

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 5 月 18 日現在

機関番号：14401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22978

研究課題名(和文) 上皮性卵巣癌腹膜播種、がん幹細胞に対するスクアレン合成経路阻害の有効性の検討

研究課題名(英文) Investigation of the effect of squalene synthesis pathway on peritoneal dissemination and cancer stem cell trait in epithelial ovarian cancer

研究代表者

中江 彩 (Nakae, Aya)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60880961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ヒト卵巣癌細胞株を用いUSP32が細胞増殖能、上皮間質転換能、特にスフィア形成能に強く関与する事を示した。USP32の基質蛋白を免疫沈降-質量分析法によって網羅的に探索し、基質蛋白候補を同定、コレステロール生合成に重要なメバロン酸経路のスクアレン合成酵素FDFT1に着目した。卵巣癌スフィアでUSP32、FDFT1発現は高く、これらの抑制、FDFT1阻害剤、メバロン酸経路を抑制するビスホスフォネート製剤によりスフィア形成は抑制され、スクアレンによって回復した。卵巣癌腹膜播種にはスフィア形成能獲得が必須であり、USP32、FDFT1は卵巣癌腹膜播種に対する新たな治療標的となることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で死亡者数が最も多く、特に腹膜播種を伴う 期以上の進行期症例の予後は不良である。昨今、殺細胞性抗癌剤に替わる選択肢として血管新生阻害剤やPARP阻害剤が導入され予後改善に寄与している。しかし、血管新生阻害剤は腹膜播種を有する患者では腸管穿孔のリスクから使用困難な場合があり、様々な殺細胞性抗癌剤との併用でも無増悪生存期間が3-4ヶ月程度延長するのみである。PARP阻害剤は上皮性卵巣癌の治療においてプラチナ感受性が有効性の主なバイオマーカーであり、複数レジメン終了後のプラチナ抵抗性再発卵巣癌は治療対象とならず、腹膜播種病変を制御しうる新たな治療標的の発見が尚望まれている。

研究成果の概要(英文)：In vitro and in vivo experiments using human ovarian cancer cell lines showed that USP32 altered significantly cell proliferation capacity, epithelial mesenchymal transition capacity, and especially sphere formation capacity. To catalog the substrates which were targeted by deubiquitinating enzyme USP32, immunoprecipitation-mass spectrometry experiment was conducted. Among the candidates of substrate proteins, we focused on FDFT1, a squalene synthase in the mevalonic acid pathway, which is important for cholesterol biosynthesis. USP32 and FDFT1 expression was high in ovarian cancer spheres. Sphere formation was significantly inhibited by USP32, FDFT1 suppression, FDFT1 inhibitor, and bisphosphonates that inhibit the mevalonic acid pathway, and restored by squalene. Acquisition of sphere-forming potential is essential in the course of peritoneal dissemination of ovarian cancer, suggesting that USP32 and FDFT1 are new therapeutic targets for peritoneal dissemination of ovarian cancer.

研究分野：卵巣癌、ユビキチンプロテアソームシステム

キーワード：卵巣癌 脱ユビキチン化酵素 ライブラリースクリーニング スクアレン合成経路 がん幹細胞

1. 研究開始当初の背景

卵巣癌は婦人科悪性腫瘍の中で最も死亡者数の多い疾患で、特に腹膜播種を伴う Ⅲ期以上の進行期症例の予後は不良である。卵巣癌診断時及び再発時にしばしば認められる腹膜播種は、腸閉塞、腹水貯留によって患者の全身状態を悪化させる病態で、発症からの生存期間中央値は 45-169 日と報告される。昨今、殺細胞性抗癌剤に替わる治療として血管新生阻害剤や PARP 阻害剤が導入され、卵巣癌の予後改善に寄与している。しかし、血管新生阻害剤は腹膜播種を有する患者では腸管穿孔のリスクから使用困難な場合があり、また様々な殺細胞性抗癌剤との併用によっても、卵巣癌患者の予後への寄与は無増悪生存期間が 3-4 ヶ月程度延長するのみ過ぎず、全生存期間を延長するものではない。また PARP 阻害剤は上皮性卵巣癌の治療においてプラチナ感受性がその有効性についての主なバイオマーカーであり、複数レジメンで治療後の再発卵巣癌はプラチナ抵抗性であるために治療対象とならない為、腹膜播種病変を制御しうる新たな治療標的の発見がなお望まれている。

2. 研究の目的

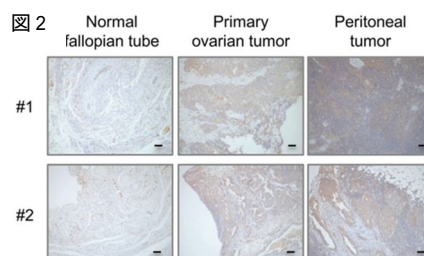
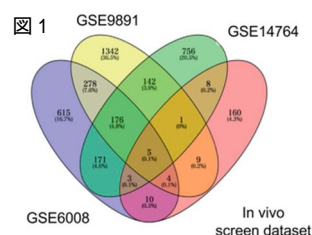
本研究では、治療標的を網羅的に同定できるフォワードジェネティクス手法を通して *in vivo* に同定された上皮性卵巣癌の腹膜播種を抑制しうる治療標的候補の 1 つである USP32 の機能について解明を目指す。

3. 研究の方法

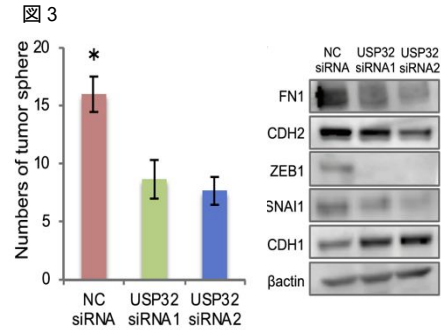
shRNA もしくは sgRNA を用いたプール型ライブラリースクリーン手法は、細胞増殖、薬剤抵抗性、合成致死等の表現型に關与する遺伝子を網羅的に検出する有力な方法である。我々のグループはプール型 shRNA 及び sgRNA ライブラリーを用い、より生体内に近い *in vivo* で行った上皮性卵巣癌新規治療標的スクリーニングの結果から (Kodama M, et al. Proc Natl Acad Sci USA. 2017;114:E7301-10)、卵巣癌を抑制しうる複数の遺伝子候補を発見した。単一細胞株を用いたデータであるこの研究の limitation を、Oncomine からダウンロードしたヒトマイクロアレイデータセット複数数を参照し、ヒト卵巣癌組織で高発現している遺伝子リストと組み合わせ補完することで、より臨床的意義の高い治療標的を絞り込むこととした。

4. 研究成果

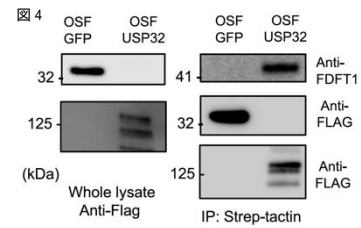
絞り込みの結果(図 1)、ヒト卵巣癌に高発現しており、その抑制が腹膜播種を抑制しうる遺伝子候補が 5 つ同定された。その中で着目した USP32(Ubiquitin Specific Peptidase 32)は、脱ユビキチン化酵素の中の USP ファミリーに属しており、乳癌組織で高発現していること、また癌遺伝子として機能が報告されていたものの、過去に卵巣癌について関連性を報告されたことはなかった。実際にヒト卵巣癌組織における USP32 発現レベルを免疫染色にて評価したところ、正常卵管組織での USP32 蛋白発現レベルは低いものの、卵巣癌組織、腹膜播種組織の順に発現レベルは高かった (図 2)



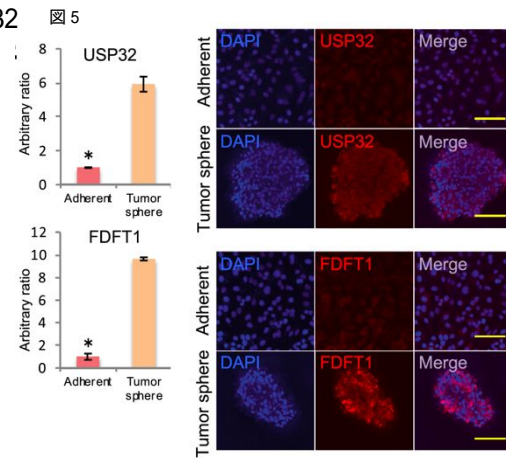
卵巣癌における USP32 の癌遺伝子としての機能を、ヒト卵巣癌細胞株を使用した *in vitro* 及び *in vivo* 実験にて、USP32 が細胞増殖能に関与すること、また上皮間質転換能、特にスフィア形成能に強く関与する事を証明した(図3)。脱ユビキチン化酵素は、基質蛋白からユビキチン鎖を外すことで、ユビキチンプロテアソームシステムによる分解を回避させ、基質蛋白を安定化させる機能を有する。USP32 の卵巣癌における癌遺伝子としての機能のメカニズムを解明するために、その基質蛋白を網羅的に同定することを目的とし、免疫沈降-質量分析法による実験を行った。その結果、USP32 の基質蛋白候補が複数同定され、その一つスクアレニン合成酵素 FDFT1 に着目した(図4)。FDFT1 はメバロン酸経路に属する合成酵素で、乳癌において癌幹細胞形質獲得、スフィア形性能に関与しているとの報告があり、卵巣癌細胞株においても検証を行った。接着培養細胞より浮遊培養細胞において USP32、FDFT1 発現は高値であることが示され(図5)、卵巣癌腹膜播種の課程においてスフィア形態での生存能獲得が必須であることを考えると、USP32



による FDFT1 安定化がこの過程を促進していると推察された。このスフィア形性能は USP32 や FDFT1 抑制、また FDFT1 阻害剤、メバロン酸経路を抑制するビスフォスフォネート製剤によって抑制され、FDFT1 下流産物であるスクアレニン添加によって回復したことから、スクアレニン・コレステロール合成経路抑制が卵巣癌腹膜播種に対する新たな治療戦略となることが示唆された。



による FDFT1 安定化がこの過程を促進していると推察された。このスフィア形性能は USP32 や FDFT1 抑制、また FDFT1 阻害剤、メバロン酸経路を抑制するビスフォスフォネート製剤によって抑制され、FDFT1 下流産物であるスクアレニン添加によって回復したことから、スクアレニン・コレステロール合成経路抑制が卵巣癌腹膜播種に対する新たな治療戦略となることが示唆された。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakae Aya, Kodama Michiko, Okamoto Toru, Tokunaga Makoto, Shimura Hiroko, Hashimoto Kae, Sawada Kenjiro, Kodama Takahiro, Copeland Neal G., Jenkins Nancy A., Kimura Tadashi	4. 巻 552
2. 論文標題 Ubiquitin specific peptidase 32 acts as an oncogene in epithelial ovarian cancer by deubiquitylating farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 120 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2021.03.049	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Aya Nakae, Michiko Kodama, Hiroko Shimura, Kae Hashimoto, Kenjiro Sawada, Tadashi Kimura
2. 発表標題 Functional analysis of USP32, detected from in vivo shRNA library screen, as a therapeutic target of epithelial ovarian cancer
3. 学会等名 第72回日本産科婦人科学術講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	小玉 美智子 (Michiko Kodama) (70791391)	大阪大学・医学系研究科・助教 (14401)	
研究協力者	志村 寛子 (Shimura Hiroko)	大阪大学・医学系研究科・招へい教員 (14401)	
研究協力者	岡村 綾子 (Okamura Ayako) (40910253)	大阪大学・医学系研究科・技術補佐員 (14401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------