

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07159

研究課題名(和文)新規翻訳後修飾UBL3化を基軸とした新しい抗がん剤の開発

研究課題名(英文)Development of new anticancer drugs based on the novel post-translational modification UBL3

研究代表者

上田 洋司 (Ageta, Hiroshi)

藤田医科大学・医科学研究センター・講師

研究者番号：40416649

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：エクソソームは、全ての臓器から放出される小胞である。申請者は、新規翻訳後修飾UBL3化を同定し、UBL3化修飾がエクソソームへのタンパク質輸送を制御することを見出した(Ageta et al., Nat Commun 2018, Cell Mol Life Sci 2019)。本研究では、がん免疫療法において、エクソソーム表面上に存在するPD-L1が治療効果を損ねることが知られている。申請者は、PD-L1がUBL3化修飾を受けること、臨床応用されている薬剤Xに強力なUBL3化修飾阻害効果があることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

免疫チェックポイント阻害薬は、従来の薬物療法に比べ副作用が少ない一方、奏効率が25%と少ないことが問題であり原因が不明であった。近年の研究から、PD-L1含有エクソソームの増大により免疫チェックポイント阻害薬の効果が損われることが報告されたが、PD-L1のエクソソームへの輸送機構に関しては不明であった。本研究は、免疫チェックポイント阻害薬に対してUBL3化阻害剤Xを新しい併用剤として提唱することに繋がる。

研究成果の概要(英文)：Exosomes are nano-sized vesicles that are released from almost all organs. The applicant identified a novel post-translational UBL3 modification and found that the UBL3 modification regulates protein sorting to exosomes (Ageta et al., Nat Commun 2018, Cell Mol Life Sci 2019). In cancer immunotherapy, PD-L1 on the surface of exosomes is known to impair the therapeutic effect. We found that PD-L1 is modified by UBL3 modification. Furthermore, we found that drug X, a clinically applied drug, has a potent inhibitory effect on UBL3 modification.

研究分野：分子生物学

キーワード：UBL3 MVB エクソソーム

1. 研究開始当初の背景

タンパク質の大部分は、翻訳後に多様な因子が付加(翻訳後修飾)されることから、翻訳後修飾による制御は様々な疾患に関与する。新しい翻訳後修飾の解析は、新たな治療薬ターゲットに繋がるため、重要視されている(セロトニン化: Farrelly et al., Nature 2019; 乳酸化: Zhang et al., Nature 2019)。また、ユビキチンやオートファジーに着目すると、プロテアソーム阻害剤 Bortezomib、ユビキチン化阻害剤 MLN4924、オートファジー阻害剤クロロキンなどが抗がん剤として有用であることが知られている(Paramore et al., Nat Rev Drug Discov 2003; Teresa et al., Nature 2009; Yang et al. Mol. Cancer Ther 2011)。

エクソソームは多胞体(MVB)を介して放出される細胞外小胞であり、産生細胞に由来する特定のタンパク質や miRNA を内包し、標的細胞に取り込まれ、がん転移を含めた様々な疾患に関与している。グリオーマ細胞で発現している活性変異型 EGFR がエクソソームを介して伝搬し(AI-Nedawi et al., Nat Cell Biol 2008)、メラノーマから放出されたエクソソームに存在する受容体型チロシンキナーゼ MET はがん転移に関与することが報告されている(Peinado et al., Nat Med 2012)。しかしながら、特定のタンパク質群のエクソソームへの輸送機構は不明であった。申請者は、Ubiquitin like 3(UBL3)が新規翻訳後修飾を担うこと(UBL3 化と命名)、UBL3 化がエクソソームへ輸送される全タンパク質の 60%の輸送を制御しており、同定した 1241 個の UBL3 結合分子の中に Ras や TGF β 受容体や RB1 などのがん関連分子が多数含まれ、一例として発がん性 RasG12V 変異体は UBL3 化修飾によりエクソソームへ輸送されることを示した(Ageta et al., Nat Commun 2018)。

2. 研究の目的

がん治療において、外科療法、化学療法、放射線療法、免疫療法等、様々な治療法を組み合わせる集学的治療が注目されている。UBL3 化は、他のユビキチン様タンパク質(ユビキチン、オートファジー関連分子 ATG12)のようにグリシン残基(Gly)を介した修飾ではなく、これまでに例のない還元剤処理で結合が解除されるシステイン残基(Cys)を介した修飾である。この修飾方式の違いは、ユビキチン様タンパク質が使用する E1-E2-E3 システムとは全く異なるシステムを UBL3 が用いている可能性を示している。そのため、UBL3 化阻害剤を同定し、従来のがん研究におけるパラダイムと全く異なるタイプのがん転移阻害薬を提案することは、集学的治療の見地から有望な戦略と言える。しかし、新規翻訳後修飾 UBL3 化修飾の分子機構は全く不明であり、薬剤探索を行うことは困難である。そこで本研究では、以下の三本柱を基軸として、同時並行で解析を進める。1) UBL3 化修飾の分子機構を同定し、2) *in vitro* で UBL3 化修飾の再構成系を構築し、3) 新たな抗がん剤として有効な UBL3 化阻害剤の探索を行う。これらの研究を行うことで、ユビキチンやオートファジー研究に続く形で、がん研究における「UBL3 ワールド」の開拓を目指す。

3. 研究の方法

本研究では UBL3 化修飾の分子機構を同定し、精製タンパク質を用いた再構成系を構築し、化合物や既存薬のスクリーニングにより UBL3 阻害剤を同定し、新たな抗がん剤としての提案を行うことを目的とする。

一般的に *in vitro* での酵素反応を再現するためには、修飾因子、モデル基質、酵素の同定が必要となる。申請者はモデル基質の作出のため、ドイツ Max Planck 研究所 Mann 教授との共同研究により同定した 1241 個の UBL3 結合分子群を数学的に解析し、統計的に有意に現れる UBL3 化 motif 配列(U3M)を見出す。U3M を本来 UBL3 化されない GFP へ付加することにより UBL3 化、MVB へ輸送、エクソソームとして放出されことを検定し、U3M に変異を加えると(U3Mmt)これらの反応は消失することで、U3M を検出し、U3M がモデル基質として有用性を証明する。さらに UBL3 化反応を担う酵素の同定を目指し、UBL3 結合分子群に繰り返し現れる特徴的なドメイン構造を持つ分子群に対して網羅的機能欠乏(ノックダウン)解析を行う。

4. 研究成果

網羅的プロテオミクスにより同定された 1241 個の UBL3 結合分子群を数学的に解析することで、UBL3 化標的分子の UBL3 化 motif 配列(U3M)を見出した。さらに、売上上位 10 薬効分類に含まれる薬剤 X が強い UBL3 化阻害作用を有することを見出した。

免疫チェックポイント阻害薬は、活性化した T 細胞によって、がん細胞が排除される仕組みを利用した薬剤である(Chen and Mellman, Nature 2017)。がん細胞膜表面上の PD-L1 が、T 細胞の膜表面上に発現する PD-1 へ結合することによって、T 細胞の活性を抑制する。免疫チェックポイント阻害薬では、PD-L1 もしくは PD-1 に対する抗体により、その反応系を阻害することで、T 細胞によるがん細胞の排除を促進させている。免疫チェックポイント阻害薬は有効性が非常に高い一方、治療効果が確認できた患者は全体の約 25%と低く、その原因は不明であった。近年、がん細胞から放出された PD-L1 含有エクソソームの増大が、免

疫チェックポイント阻害薬の効果を損ねることが報告された(Chen et al., Nature 2018, Cordonnier et al., J Extracell Vesicles. 2020, Shimada et al., Sci Rep 2021)。しかしながら、PD-L1 のエクソソームへの輸送制御機構は不明であった。

申請者は、PD-L1 配列中に U3M 様配列があることに着眼し、PD-L1 の UBL3 化を見出し、PD-L1 中の UBL3 化 motif 配列へ変異を加えることで、UBL3 化が阻害されることを見出した。さらに、メラノーマ細胞 WM9 や非小細胞肺癌細胞 H1299 において、UBL3 の過剰発現によって PD-L1 のエクソソームへの輸送量が増大することを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hagihara H, Shoji H, Hattori S., Ageta H, Tsuchida K, Inokuchi K., Miyakawa T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Large-scale animal model study uncovers altered brain pH and lactate levels as a transdiagnostic endophenotype of neuropsychiatric disorders involving cognitive impairment.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 eLife	6. 最初と最後の頁 RP89376
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.7554/eLife.89376.2.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Hiroshi Ageta, Kunihiro Tsuchida	4. 巻 3(2)
2. 論文標題 Novel Therapeutic Strategies for Exosome-Related Diseases	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 J Cell Signal	6. 最初と最後の頁 105-109
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.33696/Signaling.3.072	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7件（うち招待講演 2件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 上田洋司
2. 発表標題 新規翻訳後修飾UBL3化を標的とした新たな治療戦略
3. 学会等名 第41回日本ヒト細胞学会（招待講演）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 上田洋司
2. 発表標題 アスリートに対するエクソソーム研究
3. 学会等名 第7回日本バドミントン学会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 大脇有紗、伊藤駿、上田洋司、土田邦博
2. 発表標題 鯉節の摂取と運動が体脂肪率に及ぼす影響
3. 学会等名 第44回日本肥満学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Hiroshi Ageta, Kazuki Takenaka, Yusuke Yoshioka, Takahiro Ochiya, Kunihiro Tsuchida
2. 発表標題 Regulatory mechanisms of UBL3 modification and exosome release of cancer-associated proteins
3. 学会等名 The International Symposium, Ubiquitin New Frontier (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 田中結人、上田洋司、土田邦博
2. 発表標題 血清エクソソームを用いた法医学的解析手法の提案
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 上田洋司、竹中一希、吉岡祐亮、落谷孝広、土田邦博
2. 発表標題 がん関連タンパク質に対するUBL3化修飾による制御機構
3. 学会等名 第9回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 竹中一希、上田洋司、吉岡祐亮、落谷孝広、土田邦博
2. 発表標題 がん関連タンパク質に対する新規翻訳後修飾UBL3化による制御機構
3. 学会等名 第8回日本細胞外小胞学会学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 UBL3化阻害剤、がんを治療するための併用剤、および、UBL3化阻害物質のスクリーニング方法	発明者 2022	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2022-130805	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------