

Title	Ubiquitin specific peptidase 32 acts as an oncogene in epithelial ovarian cancer by deubiquitylating farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1
Author(s)	中江, 彩
Citation	大阪大学, 2021, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/85297
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed 大阪大学の博士論文について https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed をご参照ください。

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

論 文 内 容 の 要 旨
Synopsis of Thesis

氏 名 Name	中江 彩
論文題名 Title	USP32 acts as an oncogene in epithelial ovarian cancer by deubiquitylating FDF1 上皮性卵巣癌においてUSP32はFDFT1を脱ユビキチン化することで癌遺伝子として機能する
論文内容の要旨	
〔目的(Purpose)〕	
<p>上皮性卵巣癌は婦人科癌の中でも特に予後不良であり、ほとんどの患者は腹膜播種を伴った進行期で発見されることが多く、5年生存率は50%に満たない。分子標的治療薬も昨今適応となったが、VEGF阻害剤は著名な腹膜播種を伴う患者には腸管穿孔のリスクのため使用できず、PARP阻害剤はプラチナ感受性にしか効果が期待できないといった課題がある。そのため、上皮性卵巣癌の新規治療標的の発見が求められる。</p>	
〔方法ならびに成績(Methods/Results)〕	
<p>先行研究であるin vivo loss of functionスクリーニング結果と、漿液性卵巣癌において高発現する遺伝子のトップ10%リストとを組み合わせトップにランクされたUSP32 (ubiquitin specific protease 32)に着目した。USP32は脱ユビキチン化酵素の5つのファミリーの1つである、蛋白質の機能調節を負に制御している。卵巣癌におけるUSP32の具体的な機序は不明である。臨床的なUSP32の重要性を確認するために、パブリックアクセス可能なマイクロアレイデータセットから得られる生存アウトカムを検討すると、ステージ1期、2期ではUSP32高発現症例の無増悪生存期間が有意に短かった。また、大阪大学で手術を行った高異型度漿液性腺癌16症例の臨床検体、具体的には正常卵管、卵巣癌、腹膜播種巣におけるUSP32の発現レベルを免疫染色で評価したところ、腹腔内播種巣において高発現していた。</p> <p>続いて、漿液性卵巣癌においてUSP32が治療標的となるのかを、卵巣癌細胞株SKOV3、OVCAR3を使用し検証した。RNA干渉によって、SKOV3、OVCAR3のUSP32を抑制し、MTSアッセイ、細胞数カウントアッセイ、コロニー形成アッセイから卵巣癌細胞増殖能が抑制されることをin vitroで確認し、同時にゼノグラフトアッセイでin vivoに確認した。また、先行研究は腹膜播種を抑制する治療標的を同定する系であったことから、USP32の上皮間葉転換能への影響を検討したところ、mRNAレベル及びタンパクレベルで、USP32抑制により間葉系マーカーであるFN1、CDH2、ZEB1、SNAI1は低下しており、上皮系マーカーであるCDH1は増加していた。また、USP32抑制は腫瘍スフィア形成を阻害し、スクラッチアッセイにおいて細胞遊走能を抑制した。</p> <p>一方、卵巣癌細胞株SKOV3、A2780にpEF OSF-USP32、pEF OSF-AcGFPを一過性トランスフェクションし、USP32を強制発現したところ、細胞数カウントアッセイ、コロニー形成アッセイにおいて、in vitroで細胞増殖能増加が確認された。また、USP32強制発現によりmRNAレベル及びタンパクレベルで、FN1、CDH2、ZEB1、SNAI1は増加し、CDH1は低下していた。</p> <p>USP32が細胞増殖能・上皮間葉転換に関与するメカニズムを明らかにする目的で、USP32が標的とする基質蛋白の同定を目的とした免疫沈降質量分析を行うこととした。具体的には、pEF OSF-USP32とpEF OSF-AcGFPをHEK293に一過性に導入し、ストレプトタクチンシステムにて蛋白を回収、質量分析解析を行った。基質蛋白候補からメバロン酸経路酵素であるFDFT1 (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1)に着目した。USP32抑制下であっても、ALLN (システインプロテアーゼ阻害剤)を用いてプロテアソームの分解を阻害すると、FDFT1は分解されず残存することをWBにて確認した。これはUSP32抑制下ではユビキチン化FDFT1が分解されるところ、その分解に関与するプロテアソームを阻害することでFDFT1が分解を免れることを示しており、USP32がFDFT1を脱ユビキチン化することを示唆している。FDFT1は乳癌細胞株で幹細胞化に関与し、マンモスフィア形成を促進するとの報告があるが、同様に卵巣癌細胞株スフィアにおいてUSP32、FDFT1はmRNA及びタンパクレベルで高発現していた。また、メバロン酸経路酵素であるFDPSを阻害するアレンドロネートとFDFT1を阻害するザラゴジン酸を投与すると、それぞれ卵巣癌細胞株スフィア数は低下した。</p>	
〔総括(Conclusion)〕	
<p>USP32の新規基質蛋白の1つとしてFDFT1が同定された。USP32によりFDFT1が安定化することで、癌幹細胞化、アノキス耐性獲得に寄与しており、卵巣癌腹膜播種増悪因子となっている可能性が示唆された。USP32とメバロン酸経路が今後上皮性卵巣癌の治療標的として今後期待される。</p>	

論文審査の結果の要旨及び担当者

(申請者氏名) 中江 彩	
論文審査担当者	(職) 氏 名
	主 査 大阪大学教授 木 村 正
	副 査 大阪大学教授 蘭 池 尊
	副 査 大阪大学教授 森 井 英一
<p>論文審査の結果の要旨</p> <p>上皮性卵巣癌は婦人科癌の中でも特に予後不良であり新規治療標的の発見が求められる。先行研究であるin vivo loss of functionスクリーニング結果と、漿液性卵巣癌において高発現する遺伝子のトップ10%リストとを組み合わせUSP32 (ubiquitin specific protease 32)に着目した。卵巣癌におけるUSP32の具体的な機序は不明である。ステージ1期、2期ではUSP32高発現症例の無増悪生存期間が有意に短く、高異型度漿液性腺癌の臨床検体における免疫染色では腹腔内播種巣においてUSP32は高発現していた。USP32抑制により卵巣癌細胞増殖能が抑制されることをin vitroとin vivoに確認した。またUSP32抑制により間葉系マーカーは低下し上皮系マーカーは増加していた。さらに、USP32抑制は腫瘍スフィア形成を阻害し、細胞遊走能を抑制した。一方、USP32強制発現により、in vitroで細胞増殖能増加が確認され、間葉系マーカーは増加し、上皮系マーカーは低下した。USP32が標的とする基質蛋白の同定を目的とした免疫沈降質量分析の結果からメバロン酸経路酵素であるFDFT1 (Farnesyl-diphosphate farnesyltransferase 1)に着目した。USP32抑制下であっても、プロテアソームの分解を阻害すると、FDFT1は分解されず残存することをWBにて確認した。このことはUSP32がFDFT1を脱ユビキチン化することを示唆している。卵巣癌細胞株スフィアにおいてUSP32、FDFT1は高発現しており、メバロン酸経路酵素阻害薬により卵巣癌細胞株スフィア数は低下した。USP32によりFDFT1が安定化することで、癌幹細胞化、アノキス耐性獲得に寄与しており、卵巣癌腹膜播種増悪因子となっている可能性が示唆された。USP32とメバロン酸経路が今後上皮性卵巣癌の治療標的として今後期待される。</p> <p>上記の論文は博士（医学）の学位授与に値する。</p>	