HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	E3ユビキチンリガーゼTRIM27の機能と、鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫における発現の臨床病理学的解析に関する研究［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	木村, 将吾
Description	配架番号：2796
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第15570号
Issue Date	2023-06-30
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90403
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	KIMURA_Shogo_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文内容の要旨

博士の専攻分野の名称　博士（医　学）　氏 名　木村　将吾

学 位 論 文 題 名

E3 ユビキチンリガーゼ TRIM27 の機能と、
鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫における発現の臨床病理学的解析に関する研究

(Studies on the function of E3 ubiquitin ligase TRIM27,
and clinicopathologic analysis of its expression in sinonasal mucosal melanoma)

【背景と目的】

TRIM ファミリータンパク質は、細胞内シグナル伝達、発生、自然免疫、発がんなどさまざまな分野において機能を有する。TRIM ファミリータンパク質の中でも TRIM27 は悪性腫瘍の細胞増殖や遊走・浸潤能に影響を与えると報告されているが、詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。そこで、TRIM27 の機能を分子生物学的に解析し、その分子メカニズムの解明を第一の目的とした。また、TRIM27 の関与について未だ不明な点が多い頭頸部がんにおける TRIM27 発現と臨床経過の解明を第二の目的とした。対象疾患として、近年、皮膚悪性黒色腫の臨床経過と TRIM27 発現との関与が報告されたことを踏まえ、頭頸部がんの 1 つである鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫(sinonasal mucosal melanoma：SNMM)における TRIM27 発現と臨床経過について解析を行った。

【対象と方法】

TRIM27 の分子メカニズムを解明するために TRIM27 結合タンパク質の同定を行った。レトロウイルスベクターを用いて FLAG-TRIM27 過剰発現細胞を樹立し、抗 FLAG 抗体を用いた免疫沈降法により TRIM27 結合タンパク質を精製し質量分析を行った。得られた結合タンパク質の結合と細胞内での局在をそれぞれウエスタンブロット法と蛍光免疫染色法によって解析した。mRNA の発現量は qPCR 法を用いて解析した。また、タンパク質同士の相互作用を検証するために VIP assay (The visible immunoprecipitation assay)を行った。VIP assay は結合を検討する 2 つのタンパク質にそれぞれ GFP と mCherry タグを付加し、GFP 融合タンパク質を抗 GFP Nanobody を付加したグルタチオンセファロースビーズで免疫沈降処理し、蛍光顕微鏡で mCherry の蛍光を直接観察することで結合を評価した。

SNMM における TRIM27 の関与を解明するために 2003 年から 2021 年までに治療を受けた 28 名の SNMM 患者を後方視的に検討した。SNMM 組織における TRIM27、Ki-67、p-Akt1 の発現を免疫組織化学的に解析した。TRIM27 の発現と臨床的特徴、予後、腫瘍増殖能マーカーである Ki-67、粘膜悪性黒色腫の予後因子である p-Akt1 との関連性を検討した。

【結果】

FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞を樹立し、抗 FLAG 抗体で免疫沈降後に質量分析を行ったところ、BBS (Bardet-Biedl syndrome)1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS8、BBS9 を結合分子候補として同定した。Bardet-Biedl syndrome は先天奇形、網膜色素変性、腎機能障害、肥満などの症状をきたす遺伝性疾患であり、複数の責任遺伝子産物によって BBSome という複合体を形成する。FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞を用いて抗 FLAG 抗体による免疫沈降とウエスタンブロット解析を行ったところ、BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS8 との共沈降を認めた。また VIP assay により直接結合するタンパク質の検討を行ったところ、BBS4 および BBS18 との相互作用を認めた。BBSome は一次繊毛に沿って移動し、細胞内・繊毛内の微小管に局在するタンパク質の輸送やソニックヘッジホッグ(Sonic hedgehog：Shh)シグナルに関与する。一次繊毛における TRIM27 と BBSome の関係を明らかにするため、FLAG-TRIM27 過剰発現 NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を樹立し、抗 FLAG 抗体と一次繊毛マーカーである抗 Acetyl-α-Tubulin 抗体を用いて蛍光免疫染色を行った。その結果、TRIM27 は一次繊毛と共局在は認めないものの一部では一次繊毛の近傍に局在していることが明らかになったため、一次繊毛の近傍に存在する基

底小体(Basal body)との共局在を検証した。Basal body マーカーとなる GFP-Nphp3 (1-201:G2A)を一過性に発現し蛍光免疫染色を行ったところ、TRIM27 は一部で Basal body に局在することが明らかとなった。次に、TRIM27 の一次繊毛における役割を検討するために Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を樹立し、蛍光免疫染色により一次繊毛の長さを評価したところ、Trim27 ノックダウンによる一次繊毛の伸長を認めた。また、TRIM27 の Shh シグナルにおける役割を評価するため Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞について qPCR 法を用いて *Gli1* および *Ptch1* の mRNA 発現量を解析したところ、Dimethyl sulfoxide (DMSO)投与時に *Gli1* の誘導が上昇する一方で、Shh シグナルリガンドである Smoothened agonist (SAG)投与時には *Gli1*、*Ptch1* の誘導が低下した。さらに、蛍光免疫染色にて Smoothened (Smo)の一次繊毛への局在変化を解析したところ、DMSO 投与時では一部の一次繊毛への局在比率の上昇を認める一方、SAG 投与時には局在比率が低下した。

免疫組織化学染色法を用いた SNMM における TRIM27 の発現と臨床経過の解析では、T4 ($p = 0.01$) と stage Ⅳ ($p = 0.04$)において TRIM27 の発現が有意に高かった。また、TRIM27 高発現群では全生存期間($p = 0.01$)および無病生存期間($p = 0.02$)が有意に低下しており、さらに根治治療後に遠隔転移を来す割合が有意に高かった($p = 0.02$)。全生存期間の単変量解析において TRIM27 と T 分類が有意な予後不良因子であった。無病生存期間の単変量解析では、TRIM27、T 分類、頸部リンパ節転移が有意な予後不良因子であった。また、Ki-67 の Positive score は TRIM27 高発現群で TRIM27 低発現群より有意に高く(2.33 ± 0.62 vs 1.38 ± 0.51, $p < 0.01$)、p-Akt1 の Total staining score も TRIM27 高発現群の方が TRIM27 低発現群より有意に高かった(6.73 ± 2.12 vs. 3.38 ± 1.98, $p < 0.01$)。

【考察】

質量分析を用いて TRIM27 結合分子の網羅的な同定を行ったところ、Shh シグナル制御因子である BBSome 複合体を結合因子として同定した。免疫沈降とウエスタンブロットによる解析や VIP assay の結果から BBS4 をはじめとした BBSome サブユニットと TRIM27 との結合が示唆された。また、TRIM27 ノックダウン細胞では、qPCR 法にて SAG 投与時の *Gli1* と *Ptch1* の mRNA が減少しており、Shh シグナルの抑制を認めた。Shh シグナルは胚発生期において器官形成、成体において発がんに関与し、さまざまな悪性腫瘍において重要性が指摘されている。また、Shh シグナル制御におけるユビキチン化の重要性も示唆されているものの、これまで詳細な修飾機構については未だ解明されていなかった。本研究結果にて TRIM27 が BBSome を介して Smo の局在変化を調節することで Shh シグナル制御に関与し、この経路が悪性腫瘍進展メカニズムの１つを担っている可能性が示唆された。

一方、SNMM において TRIM27 は T 分類および臨床病期と正の相関を示し、腫瘍増殖能の指標である Ki-67 とも正の相関を示すことが明らかとなった。これらの結果は、TRIM27 が SNMM の細胞増殖に関与していることを示唆している。さらに、TRIM27 は p-Akt1 とも正の相関を認めており、膵がん、卵巣がん、食道がん、乳がんにおいて Shh シグナルと Akt 経路が複合的に作用することで悪性腫瘍の進展へ関与するという知見を踏まえると、SNMM において TRIM27 が Shh シグナルを介して p-Akt1 と複合的に作用することによって細胞増殖に関与している可能性も示唆された。さらに、TRIM27 高発現群は TRIM27 低発現群に比べ、全生存期間、無病生存期間ともに有意に低下しており予後不良であった。また、全生存期間と無病生存期間の単変量解析において TRIM27 の発現と T 分類は両者の予後因子となる可能性が示唆された。これらの結果は TRIM27 高発現が SNMM の予後不良因子である可能性を示唆しており、胃がんや大腸がんなど他臓器の悪性腫瘍と同様の傾向を示している。また、TRIM27 が根治治療後の遠隔転移の発生率と有意に相関しており、TRIM27 が SNMM における根治治療後の遠隔転移予測因子となる可能性がある。また胃がんにおいて Shh シグナルが Akt を活性化することで転移へ影響を及ぼすと報告されており、SNMM において TRIM27 が Shh シグナルを介して Akt 活性化することで細胞遊走・浸潤へ関与している可能性も示唆された。

【結論】

TRIM27 は、BBS4 をはじめとした特定のサブユニットを介して BBSome と特異的結合することが示唆された。また一次繊毛での Shh シグナルにおいて、TRIM27 が Smo の局在制御に関与し *Gli1*、*Ptch1* 発現を制御することで器官形成や発がんに関与している可能性が示唆された。また、SNMM において TRIM27 高発現群は、T 分類、臨床病期、全生存期間、無病生存期間、根治治療後の遠隔転移との関連を認めた。TRIM27 は SNMM の予後予測のための新規バイオマーカーとなり得る。