



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
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
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k15570
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/90404
Type	doctoral thesis
File Information	KIMURA_Shogo.pdf



学位論文

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)

2023年6月

北海道大学

木村 将吾

学位論文

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)

2023年6月

北海道大学

木村 将吾

目次

発表論文および学会発表目録	1 頁
要旨	2 頁
略語表	5 頁
緒言	7 頁
第一章 E3 ユビキチンリガーゼ TRIM27 の分子メカニズム解析	
実験方法	15 頁
結果	34 頁
考察	49 頁
第二章 鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫における TRIM27 発現の臨床病理学的解析	
実験方法	53 頁
結果	60 頁
考察	72 頁
総括および結論	75 頁
謝辞	77 頁
利益相反	78 頁
引用文献	79 頁

発表論文および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表予定である。

1. Shogo Kimura, Masanobu Suzuki, Yuji Nakamaru, Satoshi Kano, Masashi Watanabe, Aya Honma, Akira Nakazono, Nayuta Tsushima, Shigetsugu Hatakeyama, and Akihiro Homma.

TRIM27 expression is associated with poor prognosis in sinonasal mucosal melanoma

雑誌 Rhinology に投稿中

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 木村将吾、渡部昌、近藤 豪、畠山鎮次
ユビキチンリガーゼ TRIM27 の機能解析
第 59 回日本生化学会北海道支部例会

2022 年 7 月 9 日、北海道大学獣医学部講堂（優秀ポスター賞 受賞）

2. 木村将吾、中丸裕爾、鈴木正宣、本間あや、中菌彬、渡邊良亮、本間明宏
TRIM27 の鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫バイオマーカーとしての検討
第 61 回 日本鼻科学会 総会・学術講演会、2022 年 10 月 13 日-15 日、
金沢市文化ホール／金沢ニューグランドホテル

要旨

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 の悪性腫瘍における機能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 5 月から 2021 年 3 月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 (多指症、合指症)、網膜色素変性、腎機能障害、肥満、精神発達遅滞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や小胞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 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、膀胱がん、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、卵巣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 の細胞増殖に関与し、細胞遊走と浸潤に影響を与える可能性がある。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。

略語表

ACN	Acetonitrile
APC	Antigen-presenting cell
APS	Ammonium peroxodisulfate
BBS	Bardet-Biedl syndrome
BPB	Bromophenol blue
BSA	Bovine serum albumin
CI	Confidence interval
DAB	3,3'-diaminobenzidine
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
DMSO	Dimethyl sulfoxide
E1	Ubiquitin-activating enzyme
E2	Ubiquitin-conjugating enzyme
E3	Ubiquitin ligase
FBS	Fetal bovine serum
FFPE	Formalin-fixed paraffin-embedded
HAT	Histone acetyltransferase
HECT	Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus
HEK293T	Human embryonic kidney 293T
Hh	Hedgehog
HR	Hazard ratio
IFT	Intraflagellar transport
MEM	Minimum Essential Medium
p-Akt1	Phospho-Akt1
PBS	Phosphate-buffered saline
PCR	Polymerase chain reaction
PEI	Polyethylenimine
PFA	Paraformaldehyde
PSM	Peptide spectrum matches
Ptch1	Patched homolog 1
RBR	RING between RING fingers
RET	REarranged during transfection
RING	Really interesting new gene
SAG	Smoothened agonist

Shh	Sonic hedgehog
Smo	Smoothened
SNMM	Sinonasal mucosal melanoma
SUFU	Supressor of Fused
TCA	Trichloroacetic Acid
TFA	Trifluoroacetic Acid
TRIM	Tripartite motif
VIP assay	The visible immunoprecipitation assay
WCL	Whole cell lysate
WT	Wild type

Amino Acids

A	Ala	L-alanine	M	Met	L-methionine
C	Cys	L-cysteine	N	Asp	L-asparagine
D	Asp	L-aspartic acid	P	Pro	L-proline
E	Glu	L-glutamic acid	Q	Gln	L-glutamine
F	Phe	L-phenylalanine	R	Arg	L-arginine
G	Gly	glycine	S	Ser	L-serine
H	His	L-histidine	T	Thr	L-threonine
I	Ile	L-isoleucine	V	Val	L-valine
K	Lys	L-lysine	W	Trp	L-tryptophan
L	Leu	L-leucine	Y	Tyr	L-tyrosine

Nucleotides

A	adenine
C	cytosine
G	guanine
T	thymine

緒言

1. ユビキチン化修飾系

ユビキチンは、リン酸、アセチル基、メチル基、糖鎖、脂質と並ぶタンパク質翻訳後修飾分子であり、標的タンパク質にユビキチンを付加することで、プロテアソームにおける分解や細胞内シグナル伝達を介して細胞の増殖や分化などを制御している (Kwon and Ciechanover, 2017; Swatek and Komander, 2016)。その修飾の過程は 3 つの段階で構成されており、第 1 段階として、ユビキチンが ATP 依存性にユビキチン活性化酵素 (E1) のシステイン残基とチオエステル結合する。第 2 段階として、E1 からユビキチン結合酵素 (E2) にユビキチンが転移し、第 3 段階として、ユビキチンリガーゼ (E3) が E2 に結合したユビキチンを標的の基質タンパク質へ付加することで完成する (Morreale and Walden, 2016) (図 1)。さらにユビキチンは、ユビキチン自身のリシン側鎖やアミノ末端を介してイソペプチド結合し、ポリユビキチン鎖を形成する。ユビキチン分子内には K6、K11、K27、K29、K33、K48、K63 の 7 種のリジン側鎖が存在し、特に 48 番目のリシン側鎖を介して重合したポリユビキチン鎖はタンパク質の分解マーカーとして働き、プロテアソームにより認識され分解される (Hershko and Ciechanover, 1998; Wolf and Hilt, 2004)。また、近年ではユビキチン鎖がタンパク質分解以外の機能についても関与していることが明らかになり、タンパク質間相互作用や酵素の活性化の調節因子として重要な役割を担っていると報告されている (Hatakeyama, 2017)。

ヒトのゲノム遺伝子上において E3 は 600 種類以上コードされており、E1 (2 種) または E2 (30 数種) と比較して突出した多様性を有している。E3 が基質認識を司っていると考えられているため、どの標的をユビキチン化するかどうかについて E3 が決定的な役割を果たしていると考えられる。E3 はその構造的な特徴から HECT 型、RBR 型および RING 型の 3 つのグループに大別することができるが、中でも RING 型が E3 酵素群の約 95% を占めている。

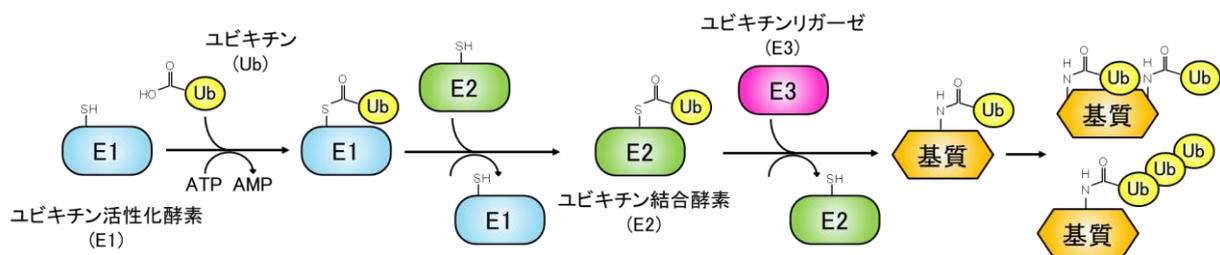


図 1 ユビキチン化修飾系の概要

2. Tripartite motifファミリータンパク質 (TRIMタンパク質)

RING型E3のサブファミリーとしてTRIMファミリータンパク質が知られており、ヒトでは80種類以上の遺伝子が存在する(Ozato et al., 2008)。TRIMタンパク質は、RING (Really Interesting New Gene) fingerドメインのほか、1つないし2つのB-boxドメイン、Coiled-coilドメインを持つ。RING、B-box、Coiled-coilドメインはTRIMタンパク質のアミノ末端側に共通して存在するが、カルボキシル末端側に存在するドメインの違いによりクラスIからクラスXIの11のサブファミリーに分類されており、大多数のTRIMタンパク質はPRY、SPRY、もしくはその両方のドメインを持つ。Coiled-coilドメインはタンパク質間相互作用を制御している。TRIMタンパク質の多くはE3ユビキチンリガーゼ活性を持ち、細胞内シグナル伝達、発生、アポトーシス、自然免疫、オートファジーなどさまざまな分野において機能することが報告されている(Hatakeyama, 2017)。また、TRIMタンパク質の半数以上は自然免疫シグナルの制御に関与しているが、それ以外にも細胞増殖やアポトーシスの抑制を通じて発がん活性化因子として機能するなど、自然免疫と発がんの二重の制御因子としての機能についても注目されている。

最近ではTRIMファミリーが発がんや腫瘍増殖、化学療法への抵抗性に関与していることが報告されており、TRIMファミリーが悪性腫瘍の診断や予後予測のためのバイオマーカーとして機能する可能性についても言及されている(Huang et al., 2022)。ただし、がんの種類によって異なるシグナル伝達経路との相互作用が指摘されており、発がんに関わるTRIMファミリーそれぞれの分子メカニズム解明と共に、がんの種類ごとに臨床研究を通じてTRIMファミリーの発現や臨床経過における関与を明らかにすることが重要である。

3. E3 ユビキチンリガーゼ TRIM27

TRIM27 は TRIM ファミリーの 1 つで、RING finger ドメイン、2 つの B-box (タイプ I とタイプ II) ドメイン、Coiled-coil ドメインを含んでいる (Hatakeyama, 2011; Micale et al., 2012) (図 2-1)。TRIM27 は受容体チロシンキナーゼをコードする RET (REarranged during transfection) がん遺伝子との融合パートナーとして同定された (Takahashi and Cooper, 1987)。TRIM27 の RING、B-box、Coiled-coil ドメインと RET がん原遺伝子のチロシンキナーゼドメインが組み合わさった融合遺伝子は、マウス胚 NIH3T3 細胞のがん化を誘導することが分かっている (Takahashi et al., 1988)。その他にも、TRIM27 は食道がん、胃がん、大腸がん、肺がん、乳がん、腎臓がん、卵巣がん、皮膚悪性黒色腫 (メラノーマ) など様々な悪性腫瘍に関与することが報告されている (Liu et al., 2020; Ma et al., 2019; Ma et al., 2016; Xia et al., 2020; Xiao et al., 2021; Xing et al., 2020; Yao et al., 2020; Zhang et al., 2018)。また、TRIM27 が関与する発がんのシグナル伝達経路として、大腸がんや卵巣がんでは PI3K/AKT、肺がんでは Wnt/ β -catenin、腎細胞がんでは NF- κ B、胃癌では Hippo-BIRC5 などが報告されており、さまざまなシグナル伝達経路との相互作用が指摘されている (Yu et al., 2022) (図 2-2)。しかし、なぜ複数のがんにおいて、それぞれ異なるシグナル経路の変化が観察されているのかについて未だに明らかにされていない。

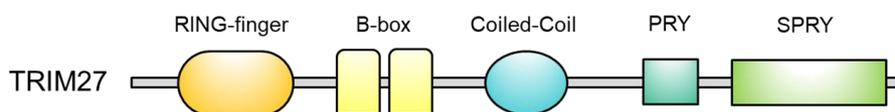


図 2-1 E3 ユビキチンリガーゼ TRIM27 のドメイン構造

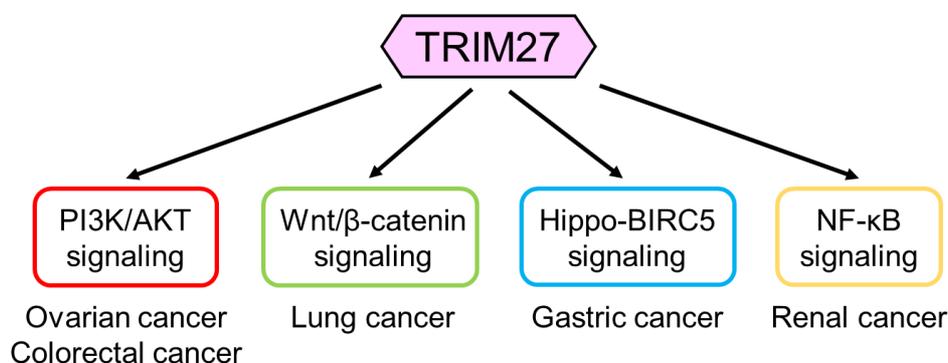


図 2-2 発がんにおいて TRIM27 の関与が報告されているシグナル伝達経路

4. ソニックヘッジホッグ (Sonic hedgehog : Shh) シグナル伝達経路

ヘッジホッグシグナル経路は、最初にショウジョウバエで発見され、その後にヒトの発生や疾患において基本的な役割を担っていることが判明した経路の1つである。哺乳類にはソニックヘッジホッグ (Sonic hedgehog : Shh)、インディアンヘッジホッグ、デザートヘッジホッグの3つのヘッジホッグリガンドが存在し、ヘッジホッグシグナルは胚発生期の器官形成や発がんにおいて重要な役割を担っている (Jiang, 2022)。Shh シグナルの活性化は一次繊毛において行われ、一次繊毛に局在する Patched homolog 1 (Ptch1) がリガンドと結合することで Smoothened (Smo) が一次繊毛にリクルートされ、Suppressor of Fused (SUFU) を抑制することで SUFU が抑制していた転写因子 GLI の核移行を促し、標的遺伝子 *Gli1* および *Ptch1* が誘導される (Schou et al., 2015) (図3)。

Shh シグナル伝達経路の発がんへの関与については、基底細胞がんや髄芽腫、膵臓がん、乳がん、結腸がん、卵巣がん、小細胞肺がん、悪性黒色腫 (メラノーマ) など多くの悪性腫瘍において報告されている (Skoda et al., 2018; Stecca et al., 2007)。また、発がんにおける Shh シグナル制御において Smo は重要な役割を果たしており、一次繊毛に Smo が局在し Shh シグナルが活性化することで発がんへ影響に及ぼすことが報告されている。さらに、異常活性化した Shh シグナル伝達を抑制するため、Smo を治療標的とした分子標的治療薬が基底細胞癌において承認されている (Carpenter and Ray, 2019)。

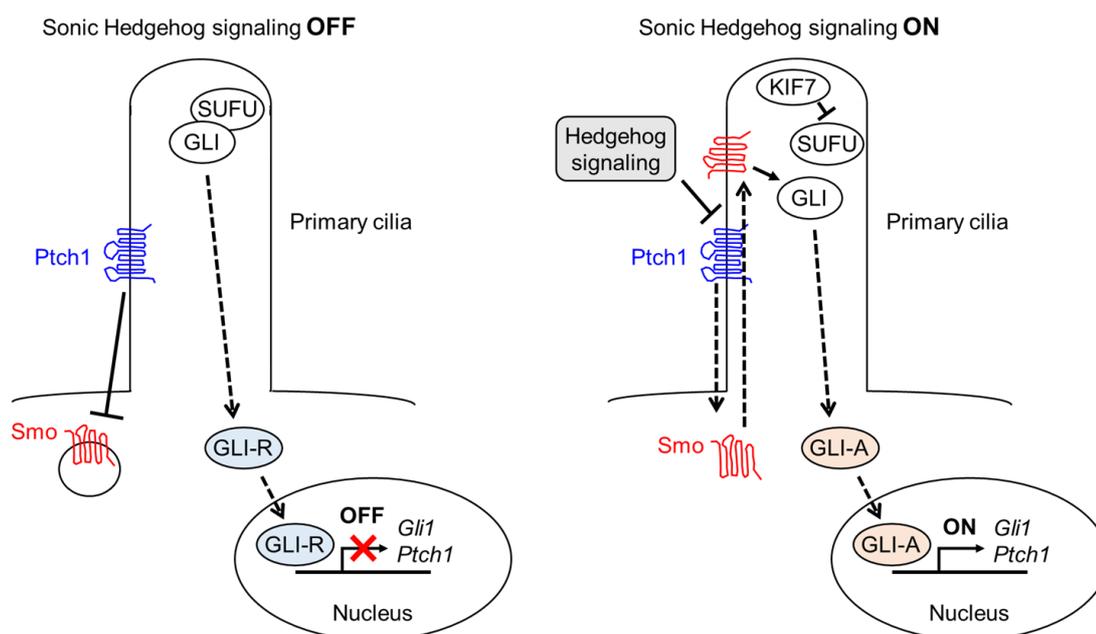


図3 Shh シグナル伝達経路の概要

5. Shh シグナル伝達経路と一次繊毛の形成

Shh シグナル伝達が行われる一次繊毛は、ヒトをはじめとする多くの哺乳類生物が持つ細胞内小器官である。気道粘膜上皮などに存在する運動性繊毛とは異なり、一次繊毛は不動性の構造体で数多くの受容体やチャネルが局在しており、さまざまな細胞外シグナルを受容して細胞内へと伝達する。また、一次繊毛は常に発現しているわけではなく、細胞周期のうち G0-G1 期に一次繊毛の形成が誘導され細胞周期に合わせて退縮する。培養細胞では血清飢餓にすることで一次繊毛形成を誘導し、血清を付加し血清飢餓を解消することで一次繊毛の退縮を認める (Kasahara and Inagaki, 2021) (図 4-1)。また、一次繊毛は主に基底小体 (basal body)、移行帯 (transition zone)、細胞膜から突出した繊毛から構成されている。一次繊毛におけるさまざまなタンパク質の輸送は繊毛内輸送 (intraflagellar transport:IFT) によって行われ、IFT-A、IFT-B、BBSome (Bardet-Biedl 症候群の責任遺伝子産物による複合体) を介して一次繊毛に沿って移動する (Wingfield et al., 2018)。また、Shh シグナル伝達が無い状態では、一次繊毛内に局在している Smo がユビキチン化を介して BBSome に認識され、一次繊毛の逆行性輸送によって一次繊毛外へ除去されることが近年明らかになった (Lv et al., 2021)。 (図 4-2)

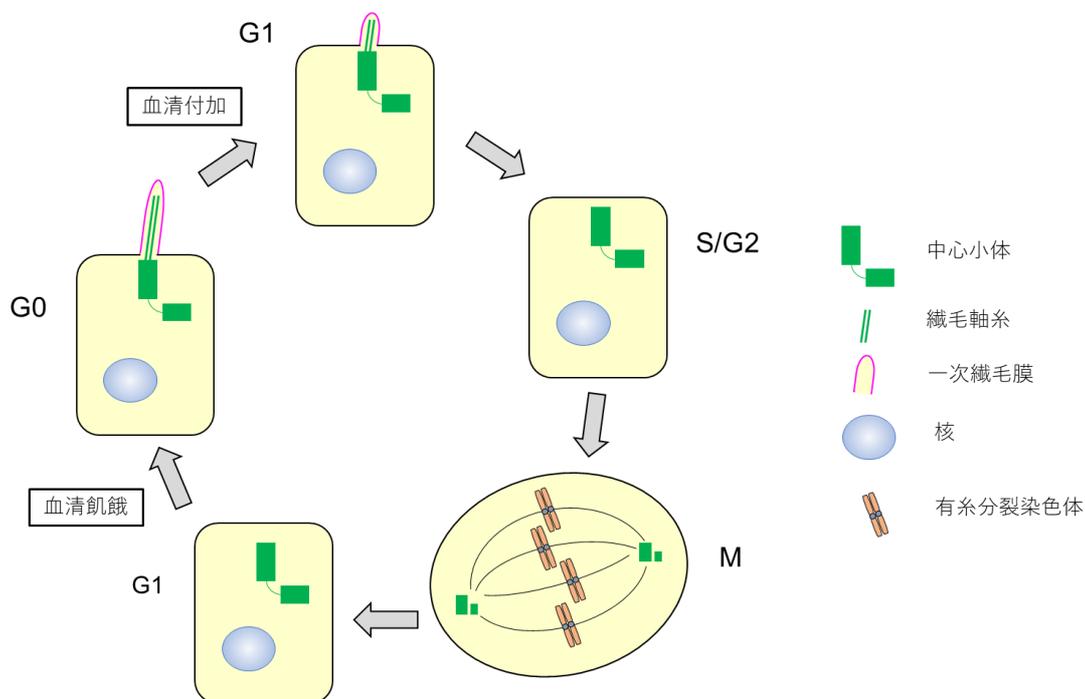


図 4-1 一次繊毛の形成過程と細胞周期

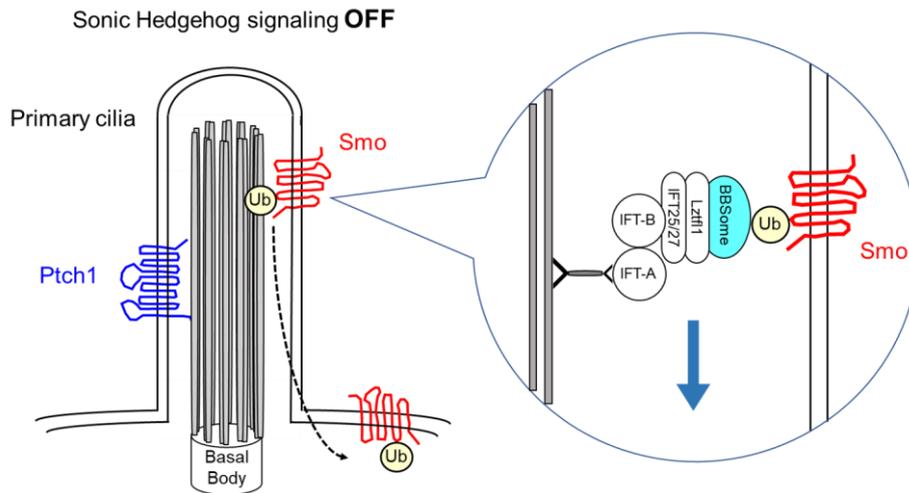


図4-2 ユビキチン化された Smo が BBSome を介して一次繊毛外へ排出される機構

6. BBSome (Bardet-Biedl syndrome 遺伝子産物による複合体)

BBSome は Bardet-Biedl 症候群の責任遺伝子産物である BBS タンパク質による複合体である。BBS1, BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8, BBS9, BBS18 によって構成され、一次繊毛の基部に向かって段階的に形成される。BBSome は IFT-A, B と共にキネシンによる順行輸送とダイニンによる逆行性輸送によって一次繊毛に沿って標的タンパク質を輸送する (Novas et al., 2015) (図5)。また、BBS サブユニットの異常により BBSome が形成されなければ、一次繊毛におけるタンパク質輸送が正常に行われないことが報告されている (Liu and Lechtreck, 2018)。

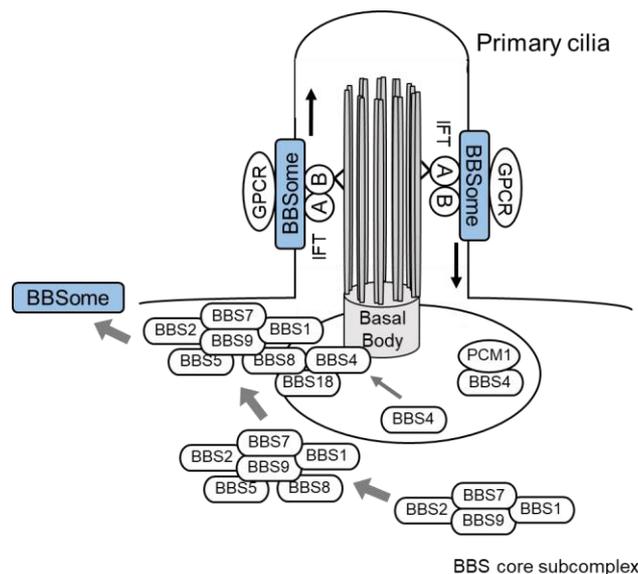


図5 BBSome の形成過程および一次繊毛における動き

7. 悪性黒色腫（メラノーマ）における Shh シグナルの関与

悪性黒色腫において Shh シグナル伝達経路の関与が報告されており、皮膚悪性黒色腫について Shh シグナルを阻害することによりマウスを用いた実験でメラノーマ移植片の増殖、再発、転移が抑制されることが明らかとなっている (Stecca et al., 2007)。また、皮膚悪性黒色腫と良性母斑における一次繊毛形成の比較研究により、皮膚悪性黒色腫では一次繊毛が低形成であることが示されているが (Kim et al., 2011)、髄芽腫や膵がんなどで一次繊毛形成が抑制された状態でもヘッジホッグシグナルの異常活性化が発がんへ関与する可能性について報告されており (Hassounah et al., 2012)、皮膚悪性黒色腫において一次繊毛形成が低形成であっても Shh シグナル伝達経路が発がんに関与している可能性がある。

8. 悪性黒色腫における TRIM27 の関与

複数のデータベースを用いて悪性黒色腫における多種の TRIM ファミリーの発現について網羅的な解析を行った研究では、TRIM27 の発現と皮膚悪性黒色腫における全生存期間、無病生存期間との関連を認めており、TRIM27 が皮膚悪性黒色腫の予後予測因子となる可能性について言及している (Xia et al., 2020)。しかし、悪性黒色腫の発がんメカニズムへの TRIM27 の直接の関与について詳細は不明のままである。

9. 皮膚悪性黒色腫と鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫 (sinonasal mucosal melanoma : SNMM)

悪性黒色腫の大部分は皮膚悪性黒色腫が占めており、粘膜悪性黒色腫は全ての悪性黒色腫のうち約 1.3% を占める稀な疾患であるが (Gal et al., 2011)、そのうち頭頸部原発が 55% と最も多く (Troussier et al., 2015)、さらに頭頸部粘膜悪性黒色腫のうち約 70% が鼻副鼻腔原発が占めており (Moya-Plana et al., 2019)、鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫 (sinonasal mucosal melanoma : SNMM) とよばれる。臨床経過については、皮膚悪性黒色腫の 5 年全生存率は 90% 以上であるのに対して (Siegel et al., 2012)、SNMM の 5 年全生存率は約 20% と報告されており (Konuthula et al., 2017)、予後不良である。また、遺伝子変異などの生物学的特徴として、皮膚悪性黒色腫では BRAF の遺伝子変異出現頻度が高く BRAF 阻害薬による分子標的治療も治療方針の 1 つとして検討されるが、SNMM では BRAF、NRAS といった特定の遺伝子変異の発現頻度が低く、分子標的治療の対象となる症例は非常に限られている (Zebary et al., 2013)。このよ

うに、同じ悪性黒色腫ではあるが、皮膚悪性黒色腫と SNMM では臨床経過や生物学的特徴が大きく異なっている。

1 0. SNMMにおける TRIM27 の関与を検討する意義

前述のとおり、SNMM は皮膚悪性黒色腫における BRAF 遺伝子変異のような治療選択につながるバイオマーカーが確立しているとは言い難く、SNMM における予後予測や治療選択につながる新たなバイオマーカーの確立が求められている。また、SNMM における発がんメカニズムについては、SNMM の予後が p-Akt1 発現と相関があることから PI3K/AKT 経路が関与している可能性について指摘されているものの (Soares et al., 2018)、詳細については依然として不明な点が多い。一方、ユビキチンリガーゼ TRIM27 はこれまで胃がんや肺がんなど多くの悪性腫瘍の予後との関連が報告され、近年では皮膚悪性黒色腫の予後との関連についても明らかにされている。SNMM の臨床経過において TRIM27 発現が関与しているか解析することで、SNMM における新たなバイオマーカーとして TRIM27 が寄与するか検討する意義は大きいと考える。

本研究の目的

ここまで述べてきたように、TRIM ファミリータンパク質はさまざまな細胞機能を持ち、多くの疾患原因へ関与していることが知られているが、未だ十分な解析がされていない。その中でも TRIM27 はいくつかの悪性腫瘍において発がんメカニズムへの関与が報告されているが、頭頸部がんにおいては依然として解明されていない点が多い。また、がんの種類によって TRIM27 が関与する発がんメカニズムやシグナル制御の報告が異なっており、詳細な分子メカニズムは未だ解明されていない。近年、皮膚悪性黒色腫の予後因子として TRIM27 が関与している可能性が報告されたが、生物学的特徴や臨床経過の異なる SNMM において TRIM27 がどのように関連するか明らかになっていない。本研究では詳細な分子メカニズムを解明すべく、第 1 章で TRIM27 の分子生物学的機能解析と細胞内シグナル制御に関する解析を行う。さらに、第 2 章では臨床検体を用いて SNMM における TRIM27 の発現および臨床経過との関連について解析を行う。

第1章

E3 ユビキチンリガーゼ TRIM27 の分子メカニズム解析

《実験方法》

1. 実験材料

以下に本研究で用いた実験材料の由来及び調整法などを示した。各装置などの製造元の社名は社名の後に社あるいは（株）と略記した。

< 1 > 培養細胞

HEK293T 細胞 (ATCC)

hTERT-RPE1 細胞 (ATCC)

mIMCD-3 細胞 (ATCC)

NIH3T3 細胞 (ATCC)

293PlatE 細胞 (東京大学医科学研究所 北村俊雄博士より御供与頂いた。)

< 2 > 装置

PCR 装置 :

MJ Mini (バイオラッドラボラトリーズ (株))

StepOne™リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems 社)

DNA シークエンサー: ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社)

電気泳動槽: トランスブロットセル (バイオラッドラボラトリーズ (株))

超音波破砕機: Sonifier250 (Branson 社)

濾紙: 3MM (Whatman 社)

CO₂ インキュベーター:

Forma series II water jacketed CO₂ incubator (Thermo electron 社)

遠心機:

Centrifuge 5415R (Eppendorf 社)

MX-300 (TOMY 社)

Avanti J-E centrifuge (Beckman Coulter 社)

顕微鏡:

BX-51 (OLYMPUS 社)

LSM710 (Carl Zeiss 社)
pH メーター: Seven Easy (Mettler Toledo 社)
オートクレーブ装置: KS-323 (TOMY 社)
濾過滅菌用フィルター: MILLEXHV (Millipore 社)

質量分析:

Orbitrap Elite (Thermo Fisher Scientific 社)
ナノフローウルトラ HPLC (EASY-nLC 1000; Thermo Fisher Scientific 社)
C18 Reprosil 分析カラム (日京テクノス社)
Xcalibur ソフトウェア (Thermo Fisher Scientific 社)
Proteome Discoverer ソフトウェア (バージョン 2.4; Thermo Fisher Scientific 社)

< 3 > キット

cDNA 合成キット: ReverTra Ace (TOYOBO (株))
RNA 抽出キット: ISOGEN (ニッポンジーン (株))
プラスミド抽出キット:
NucleoBond® Xtra Midi EF (タカラバイオ (株))
FastGene™ Plasmid mini kit (日本ジェネティクス (株))
DNA シークエンスキット: BigDye Terminator Kit (Applied Biosystems 社)
Power SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems 社)

< 4 > 各種酵素

DNA 合成酵素:
KOD plus (TOYOBO(株))
KOD FX (TOYOBO(株))
RNA 分解酵素:
Rnase A (Novagen 社)
トリプシン (Sigma 社)
制限酵素類 (BamHI、EcoRI、KpnI、NotI、XhoI): TaKaRa (株) 製の制限酵素を使用した。

< 5 > 各種核酸

pQCXIP (タカラバイオ社)
pMX-puro (東京大学医科学研究所 北村俊雄博士より御供与頂いた。)

< 6 > 転写用膜 (メンブレン)

PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜 :

Immobilon-P Transfer membrane (MILLIPORE 社)

MILLEX-HV (0.45 μm フィルター) (MILLIPORE 社)

< 7 > 細胞培養試薬

Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) (Sigma 社)

Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F-12 (DMEM/Ham's F-12)

(Nacalai tesque 社)

Fetal bovine serum (FBS) (Gibco 社)

Bovine serum (BS) (Gibco 社)

< 8 > ビーズ類

FLAG M2 agarose (Sigma 社)

< 9 > タンパク質分解酵素阻害剤

N-ethylmaleimide (NEM) (Sigma 社)

MG132 (Calbiochem 社)

< 10 > 抗生物質類

Puromycin (Sigma 社)

Blasticidin S (Sigma 社)

Hygromycin B (Sigma 社)

Cycloheximide (Sigma 社)

< 11 > 組織細胞染色関連試薬

Bovine Serum Albumin (BSA) (Equitech bio 社)

Saponin (Sigma 社)

ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen 社)

< 12 > 抗体

マウス抗 FLAG タグモノクローナル抗体 (M2) (Sigma 社)

マウス抗 GAPDH モノクローナル抗体 (6C5) (Ambion 社)

ウサギ抗 TRIM27 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)

ウサギ抗 TRIM27 ポリクローナル抗体 (Atlas Antibodies 社)
ウサギ抗 Acetyl- α -Tubulin モノクローナル抗体
(Cell Signaling Technology 社)
マウス抗 Acetylated Tubulin モノクローナル抗体 (Sigma 社)
マウス抗 Smo モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 γ -Tubulin モノクローナル抗体 (Sigma 社)
ウサギ抗 PTCH1 ポリクローナル抗体 (abcam 社)
ウサギ抗 PTCH1 ポリクローナル抗体 (Sigma 社)
ウサギ抗 BBS1 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS2 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS3 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS4 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS5 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS6 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS7 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS8 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS9 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
ウサギ抗 BBS10 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
マウス抗 BBS1 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 BBS2 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 BBS4 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 BBS5 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)
マウス抗 BBS8 モノクローナル抗体 (Santa Cruz Biotechnology 社)
ヤギ抗 GLI2 ポリクローナル抗体 (R&D SYSTEMS 社)
ヤギ抗 GLI3 ポリクローナル抗体 (R&D SYSTEMS 社)
ウサギ抗 GPR161 ポリクローナル抗体 (proteintech 社)
Alexa488 標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (Invitrogen 社)
Alexa488 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (Invitrogen 社)
Alexa555 標識ロバ抗マウス IgG 二次抗体 (Invitrogen 社)
Alexa555 標識ヤギ抗ウサギ IgG 二次抗体 (Invitrogen 社)
Alexa555 標識ロバ抗ヤギ IgG 二次抗体 (Invitrogen 社)
Alexa680 標識ヤギ抗マウス IgG 二次抗体 (Invitrogen 社)

< 1 3 > 細胞培養関連試薬

遺伝子導入試薬: FuGENE ®HD (Roche 社)

SAG (Focus biomolecules 社)

DMSO (Sigma 社)

< 1 4 > SDS-PAGE、ウエスタンブロット関連試薬

アクリルアミド (Sigma 社)

SDS-PAGE 用タンパク質分子量マーカー :

プレステインドエクセルラダー Broad range (アプロサイエンス (株))

X線フィルム :

CL-XPosure Film (Thermo Scientific 社)

BioMax Light Film (Carestream 社)

< 1 5 > その他試薬

エタノール (Sigma 社)

イソプロパノール (Sigma 社)

SDS (Sigma 社)

Tween20 (Sigma 社)

2-メルカプトエタノール (Sigma 社)

グリセロール (Sigma 社)

Bromophenol blue sodium (BPB) (Sigma 社)

HCl (Sigma 社)

アガロース (Sigma 社)

1kb plus DNA ラダーマーカー (Invitrogen 社)

Trizma base (Sigma 社)

EDTA (Sigma 社)

Glycine (Sigma 社)

NaCl (Nacalai tesque 社)

IGEPAL CA-630 (Sigma 社)

Ammonium Bicarbonate (富士フィルム和光純薬社)

Benzonase (Sigma 社)

Iodoacetamide (Thermo Scientific 社)

Trichloroacetic Acid (TCA) (富士フィルム和光純薬社)

Trifluoroacetic Acid (TFA) (富士フィルム和光純薬社)

Acetonitrile (ACN) (富士フィルム和光純薬社)

4-(2-aminoethyl)-benzenesulfonyl fluoride hydrochloride (AEBSF) (Roche 社)
PhosStop phosphatase inhibitors (Sigma-Aldrich 社)
ジチオスレイトール (Thermo Fisher Scientific 社)
ヨードアセトアミド (Thermo Fisher Scientific 社)
トリプシン (Promega 社)
RapiGest SF (Waters 社)
GL-Tip GC (GL Sciences 社)
GL-Tip SDB (GL Sciences 社)

< 1 6 > 調整試薬類

純水は Milli Q 水を使用した。試薬類は特級試薬、生化学実験用、分子生物学実験用、細胞実験用試薬を所定の濃度に溶解し、オートクレーブ滅菌または濾過滅菌した後を使用した。%という表記は、固体を液体に溶解して調整した際には質量/体積パーセント濃度を表すこととする。

細胞培養用

DMEM

Sigma 社製の DMEM を使用した。血清 (FBS) は 56°C、30 分の非働化を行い、HEK293T 細胞用として FBS を最終濃度 10%となるよう調整した。また、血清 (BS) は 56°C、30 分の非働化を行い、NIH3T3 細胞用として BS を最終濃度 10%となるよう調整した。

DMEM/Ham's F-12

Nacalai tesque 社製の DMEM/Ham's F-12 を使用した。血清 (FBS) は 56°C、30 分の非働化を行い、mIMCD-3 細胞用、hTERT-RPE1 細胞用として FBS を最終濃度 10%となるよう調整した。

タンパク質泳動、ウエスタンブロット用試薬

SDS-PAGE 分離ゲル緩衝液

1.5 M Tris/HCl (pH 8.8)

SDS-PAGE 濃縮ゲル緩衝液

0.5 M Tris/HCl (pH 6.8)

20% APS 溶液

2 g の APS を 10ml の純水に溶解後、-20°Cに保存した。

0 mM NaCl 細胞溶解緩衝液

50 mM Tris/HCl (pH 7.5)
10% Glycerol
0.2% NP40

300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液

300 mM NaCl
50 mM Tris/HCl (pH 7.5)
10% Glycerol
0.2% NP40

100 mM NaCl 免疫沈降用洗浄緩衝液

300 mM NaCl
50 mM Tris/HCl (pH 7.5)
10% Glycerol
0.2% 10% NP40

質量分析サンプル調製用細胞溶解緩衝液

50 mM Tris-HCl (pH 7.6)
300 mM NaCl
10% glycerol
0.2% NP-40
10 mM iodoacetamide
10 mM NEM
5 mM AEBSF
10 μ M MG132
1×PhosStop phosphatase inhibitors

10×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液

0.25 M Tris
1.92 M Glycine

1×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液

10%となるようにメタノールを加え、10×ウエスタンブロットトランスファー緩衝液を純水にて10倍に希釈した。

10×TBS

0.2 M Tris/HCl (PH7.6)
1.5 M NaCl

1×TBST

10×TBS を純水にて 10 倍に希釈し、0.05% となるように Tween20 を加えた。

10×PBS

1.37 M NaCl
81 mM Na₂HPO₄
27 mM KCl
15 mM KH₂PO₄

1×PBS

10×PBS を純水にて 10 倍希釈して調整した。

トリプシン/EDTA 溶液

0.05% Trypsin
0.5 mM EDTA 2Na

以上を 1×PBS に溶解し、1 l になるように調整して濾過滅菌した。

エチジウムブロマイド含有アガロースゲル

アガロースは Sigma 社のものを使用した。1×TAE 溶液中にアガロースゲルが 0.7% となるように調製し、さらに 200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 μl 加えたゲルを調製した。

アガロース電気泳動用色素

各制限酵素に添付されている 10×loading buffer を使用した。

制限酵素用緩衝液

各制限酵素に添付されている 10×buffer を使用した。

蛍光免疫細胞用緩衝液

0.1% BSA
0.1% Saponin
PBS

大腸菌の培地

LBプレート培地

1%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
170 mM	NaCl
1.5%	Bacto Agar
100 µg/ml	Ampicillin
25 µl/ml	Kanamycin

滅菌後約 50°Cに冷却し、抗生物質 (Ampicillin、Kanamycin) は必要に応じて添加して使用した。

2×YT 培地

1.6%	Bacto Trypton
1%	Yeast Extract
86 mM	NaCl
100 µg/ml	Ampicillin
25 µl/ml	Kanamycin

抗生物質 (Ampicillin、Kanamycin) は必要に応じて添加して使用した。

SOB 培地

2%	Bacto Trypton
0.5%	Yeast Extract
10 mM	NaCl
2.5 mM	KCl
10 mM	MgSO ₄
10 mM	MgCl ₂

Bacto Trypton、Yeast Extract、NaCl、KCl を純水に溶解し、オートクレーブにより滅菌後、フィルター濾過滅菌した MgSO₄、MgCl₂ 混合溶液を加えて調製した。

2. 実験方法

2-1. 分子生物学実験の方法

< 1 > DNA アガロースゲル電気泳動

1×TAE 溶液中にアガロースゲルが 0.7%となるよう調整し、さらに 200 ml あたり 20 mg/ml エチジウムブロマイド溶液を 1 μ l 加えたゲルを調製した。1×TAE 溶液中で電気泳動を行った後、UV トランスイルミネーターを用いて検出および撮影を行った。

< 2 > エタノール沈殿・イソプロパノール沈殿

核酸を含む溶液に 1/20 量の 5 M 塩化ナトリウムと 2.5 倍量のエタノールを加え攪拌後、4°C、16,200×g、5 分間遠心しエタノール沈殿を行った。イソプロパノール沈殿の場合は、0.7 倍量のイソプロパノールを加え、同様に沈殿させた。沈殿物は 70% エタノールで洗浄後乾燥させ、適当量の純水または TE 緩衝液に溶解した。

< 3 > 大腸菌形質転換

(1) コンピテント細胞の調整

各種大腸菌を LB プレートに播種、37°C、14 時間培養し、単一コロニーを 25 ml の SOB 培地にて 37°C、8 時間振盪培養した。100 ml の SOB 培地を 3 つ用意し、それぞれに培養した菌液をそれぞれ 5 ml、2 ml、1 ml 加え、全てを 18°Cにて一晩培養した。それぞれの A_{600} 値を測定し、 $A_{600} = 0.5$ 前後の培養液のみを選び（またはその程度になるまで培養を続け）、氷上で 10 分間冷却した後に 4°C、2,500×g、10 分間延伸して集菌した。菌体を氷冷した 40ml の TB に再懸濁し、さらに 750 μ l の DMSO を加えて穏やかに混和し、10 分間氷上静置した後、1.5 ml チューブに 100 μ l ずつ分注して直ちに液体窒素中で凍結させ、-80°Cで保存した。

(2) 形質転換

凍結コンピテント細胞を氷上で融解し、ライゲーション反応後の DNA 試料またはプラスミド DNA に、100 μ l のコンピテント細胞を加え、氷上で 30 分間静置した。その後 42°Cで 45 秒間のヒートショックを与え、再び 2 分間氷上に静置し、4 倍量の 2×YT 培地を加えて 37°Cで 30 分間培養した。その後低速遠心で菌体を集菌し、適当量の培地で再懸濁させ、適当な抗生物質を含む LB プレートに播種して 37°Cで一晩培養した。

< 4 > プラスミドの調整

(1) キットを使用したシークエンス反应用プラスミドの少量調製

プラスミド抽出キット FastGene™ plasmid mini kit を用いた。手順は、添付したプロトコールに従った。

(2) キットを使用した細胞トランスフェクション用プラスミドの大量調製
プラスミド抽出キット NucleoBond® Xtra Midi EF を用いた。手順は、添付したプロトコールに従った。

< 5 >塩基配列の決定

ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer (Applied Biosystems 社) を使用して決定した。BigDye Terminator Kit のプレミックス溶液 4 μ l、5 \times シーケンス緩衝液 2 μ l、DNA 400 ng、プライマー 1.6 pmol を混ぜ、純水にて全量を 20 μ l として PCR 反応を行った。PCR 条件は、(96 $^{\circ}$ C、10 秒 \rightarrow 50 $^{\circ}$ C、5 秒 \rightarrow 60 $^{\circ}$ C、4 分) \times 25 サイクルで行った。PCR 反応後、反応液をエタノール沈殿し、沈殿物を 80%エタノールで洗浄後乾燥させ、25 μ l の Formamide (Sigma 社) に溶解させ、溶解後室温で 15 分間静置した。これを試料として、ABI PRISM 3130 Genetic Analyzer にて配列を決定した。データは付属のソフトウェアにて解析を行った。

< 6 >タンパク質のポリアクリルアミド電気泳動 (SDS-PAGE)

下表に示す組成の分離ゲル溶液を作製し、直ちに SDS-PAGE 用ガラス板に流し込み、イソプロパノールを重層した。アクリルアミドが固化した後、イソプロパノールを水洗し、濃縮用ゲル溶液を作製して分離ゲルの上に重層し、コームを刺してゲルを固化させた。泳動は SDS-PAGE 泳動緩衝液を用いて、150 V の電圧でおよそ 50 分を行った。

分離用ゲル溶液	10%
30%アクリルアミド溶液 (ml)	2.50
DDW (ml)	3.05
1.5M Tris pH 8.8 (ml)	1.88
10% SDS (μ l)	75
20% APS (μ l)	28.1
TEMED (μ l)	7.5

濃縮用ゲル溶液	
30%アクリルアミド溶液 (ml)	0.40
DDW (ml)	2.01
0.5M Tris pH 6.8 (ml)	0.63

10% SDS (μl)	25
20% APS (μl)	12.5
TEMED (μl)	2.5

< 7 > ウェスタンブロット

ウェットタイプのウェスタンブロット装置を用いた。PolyVinylidene DiFluoride (PVDF) 膜をあらかじめメタノールに 1-2 分浸した後に、転写緩衝液に濾紙と共に浸した。電気泳動後ゲルを取り出し、ウェスタンブロット装置の陽極から順にスポンジ→濾紙→PVDF 膜→ゲル→濾紙→スポンジとなるように重ね、400 mA の電流で 60 分間転写した。転写後の PVDF 膜はブロッキング溶液に浸し、4°C で一晩または室温で 2 時間抗体反応を行った。抗体反応後、TBST で 3 回洗浄した後さらに 15 分間洗浄し、TBST で希釈した 2 次抗体希釈液に浸し、室温で 1-2 時間抗体反応を行った。TBST で 3 回洗浄した後さらに 30 分間洗浄し、ECL Western Blotting Detection Reagents にて化学発光を行い、X 線フィルムに露光して検出した。

< 8 > 細胞の継代培養

全ての細胞は CO₂ インキュベーター内で、5% CO₂、37°C の条件で培養した。HEK293T 細胞は Fetal bovine serum (FBS) を 10% 添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で、NIH3T3 細胞は Bovine serum (BS) を 10% 添加した Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) で培養した。mIMCD-3 細胞、hTERT-RPE1 細胞は Fetal bovine serum (FBS) を 10% 添加した DMEM/Ham's F-12 で培養した。HEK293T 細胞における TRIM27 過剰発現細胞は FBS を 10%、Puromycin を 5 μg/ml となるよう添加した DMEM で培養した。NIH3T3 細胞における TRIM27 過剰発現細胞は BS を 10%、Puromycin を 2 μg/ml となるよう添加した DMEM で培養した。mIMCD-3 細胞における TRIM27 過剰発現細胞は FBS を 10%、Puromycin を 2 μg/ml となるように添加した DMEM/Ham's F-12 で培養した。hTERT-RPE1 細胞における TRIM27 過剰発現細胞は FBS を 10%、Puromycin を 8 μg/ml となるように添加した DMEM/Ham's F-12 で培養した。TRIM27 ノックアウト細胞については FBS が 10% となるように添加した、抗生物質不含の DMEM/Ham's F-12 で培養した。継代は 70-90% コンフルエントとなった細胞の培地を吸引除去し、培地の約 1/5 量の PBS で洗浄した。洗浄後 PBS を吸引し、培地の約 1/10 量のトリプシン/EDTA 溶液を加えて 37°C、5 分間静置し、細胞が底面から剥離したことを顕微鏡観察により確認後、培地をトリプシン/EDTA 溶液の 2 倍量加えて中和した。この細胞懸濁液の約 1/10~1/20 量を残して、そこに不足分の培地を加え、ディッシュ内で均一になるように懸濁して 5% CO₂、37°C で培養した。

< 9 > リポフェクション法を用いた細胞への遺伝子導入

Roche 社の FuGENE® HD 試薬を用いた。遺伝子導入を行う細胞をあらかじめ 10 cm ディッシュに撒いておき、一晩かけて培養した。導入する遺伝子の DNA を 20 µl 分注し、Opti-MEM 500 µl を添加した。この DNA 混合液に FuGENE® HD 30 µl または Polyethylenimine Max® 50 µl を添加し 15 分間静置した後、細胞に滴下し、5% CO₂、37°C で培養した。

< 10 > レトロウイルスあるいはレンチウイルスを用いた安定発現および安定ノックダウン細胞株作製

293PlatE 細胞はレトロウイルスの 1 種であるモロニーマウス白血病ウイルス構成タンパク質を安定発現するパッケージング細胞であり、パッケージングシグナル配列を含んだレトロウイルスベクターをこれらの細胞に導入することによって成熟したレトロウイルスを産生する。293PlatE 細胞は同種感染、つまりマウス細胞への感染が可能なレトロウイルスを作製できる (Morita et al., 2000)。マウス細胞である NIH3T3 細胞と mIMCD-3 細胞には 293PlatE 細胞をパッケージ細胞として、あらかじめ 10 cm ディッシュに撒いておき、リポフェクション法によりレトロウイルスベクターを導入し、翌日に感染させたい細胞を 6 穴プレートに 15-30%コンフルエント程度で撒いた。導入より 48 時間後にレトロウイルスを含むパッケージング細胞の上清を回収し、フィルターで限外濾過した後に、感染させたい細胞の培地に添加してレトロウイルスを感染させた。さらに 48 時間培養を続け、Puromycin を含む培地と交換し、1 週間程度培地交換または継代培養を続けて安定細胞株を樹立した。

ヒト細胞である HEK293T 細胞、hTERT-RPE1 細胞についてはパッケージ細胞をあらかじめ 10 cm ディッシュに撒いておき、リポフェクション法によりレンチウイルスベクターを導入し、翌日に感染させたい細胞を 6 穴プレートに 15-30%コンフルエント程度で撒いた。導入より 48 時間後にレンチウイルスを含むパッケージング細胞の上清を回収し、フィルターで限外濾過した後に感染させたい細胞の培地に添加してレンチウイルスを感染させた。さらに 48 時間培養を続け、Puromycin を含む培地と交換し、1 週間程度培地交換または継代培養を続けて安定細胞株を樹立した。

< 11 > CRISPR/Cas9 を用いた TRIM27 ノックアウト細胞株作製

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて TRIM27 をノックアウトした細胞株を作製した。gRNA の配列は CATCTATAACAGCATCAACG で、GPP sgRNA Designer を用いてデザインした。SpCas9(BB)-2A-Puro (PX459) V2.0 vector にデザインした gRNA を挿入したのち、Polyethylenimine Max をキャリアーとして NIH3T3 細胞、mIMCD-3 細胞にトランスフェクションした。トランスフェクションから 24 時間後に 1 µg/ml の Puromycin を含む培

地で 48 時間培養し、その後 Puromycin 耐性を持つ細胞のみを単離して 96 穴プレートに撒き、約 1 週間培養した。ノックアウトのスクリーニングは、まずウエスタンブロット法で TRIM27 の発現量を確認し、目的のバンドが消失しているクローンを、引き続き DNA シークエンス解析にて評価した。KOD FX DNA ポリメラーゼを用い、PCR にて目的の DNA 配列を増幅させた後、ExoSAP-IT Ex-press PCR Cleanup Reagents にて ExoSAP 処理した。塩基の欠失によりフレームシフトが生じていることを確認できた 2 クローンを以降の実験で使用することとした。

< 1 2 > 細胞溶解液の調整

細胞をディッシュよりトリプシン/EDTA 溶液にて剥離し、15 ml チューブに回収して 4°C、3000 xg、2 分間遠心した。沈殿した細胞を 1 ml の PBS で懸濁して 1.5 ml チューブに移し、4°C、3000 xg、1 分間遠心し上清を除去した。直ちに細胞を溶解しない場合は -80°C 保存とした。溶解する場合、300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液を用いるか、または 1×SDS サンプル緩衝液を直接添加して、細胞を氷上で溶解した。各緩衝液を加えて懸濁した後、超音波破碎機にて凝集塊が見えなくなるまで数秒間破碎後、300 mM NaCl 細胞溶解緩衝液を用いた場合は 10 分間氷上で静置し、1×SDS サンプル緩衝液を用いた場合はそのままヒートブロックにて 100°C、5 分間加熱し、使用時まで -20°C で保存した。

< 1 3 > 免疫沈降実験

前項のような方法で得られた細胞溶解液について、全体の 1/25 量を全細胞溶解液 (Whole cell lysate; WCL) として別の 1.5 ml チューブに移し、その 1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100°C、5 分間加熱し、使用時まで -20°C で保存した。残りの溶解液は 1000 µl ずつ、50 µl の 50 (v/v) % FLAG M2 agarose を加え 4°C にて 1 時間転倒混和した後、4°C、4000 rpm、1 分間の遠心、上清除去を行うという処置を、溶解液がなくなるまで繰り返した。その後、4°C、6000 rpm、10 秒間の遠心、上清除去と 800 µl の免疫沈降用洗浄緩衝液での懸濁を 5 回繰り返した後、免疫沈降用洗浄緩衝液にて 20 倍に希釈した 1×FLAG ペプチドを 100 µl 加えた。氷上で 10 分間溶出させ、溶出液を回収し、さらにもう一度この操作を繰り返し 200 µl の溶出液を得た。100 µl は質量分析用に -80°C で保存し、残りの 100 µl は 1/2 量の 3×SDS サンプル緩衝液を加え、ヒートブロックにて 100°C、5 分間加熱し、使用時まで -20°C で保存した。

< 1 4 > RNAの抽出

QIAGEN社のRNeasy Plus Mini Kitを用いて、Total RNAを抽出した。手順は添付したプロトコールに従った。最終的に50 µlのRNaseフリーの滅菌水で溶かし、1 mg/mlに濃度を調整した。

< 1 5 > 逆転写反応

TOYOBO社のReverTra Ace® qPCR RT Kitを用いて、mRNAを鋳型に逆転写反応を行い、cDNAを合成した。まず65°C、5分間RNAを熱変性させた後、氷上で急冷した。下記のように各試薬を熱変性済みRNAに加え、さらに下記の条件で逆転写反応を行った。

to 10 µl	Nucleaseフリー滅菌水
2 µl	5×RT 緩衝液
0.5 µl	RT Enzyme Mix
0.5 µl	Primer Mix
1 µg	熱変性済みRNA

反応条件: 37°C、15分 → 98°C、5分 → 4°C

< 1 6 > 0.2% BSAを添加したOpti-MEMによる血清飢餓刺激

血清飢餓刺激により一次繊毛形成を誘導するため、NIH3T3細胞、mIMCD-3細胞、hTERT-RPE1細胞について6穴プレートに撒き、24時間後に培地を除去して、0.2% BSAを添加したOpti-MEM培地2 mlに交換した。37°Cで培養し、24時間後に細胞を回収した。

< 1 7 > 200nM Smoothened agonist (SAG)の添加によるSmoへの刺激

NIH3T3細胞、mIMCD-3細胞、hTERT-RPE1細胞について6穴プレートに撒き、24時間後に培地を除去して0.2% BSAを添加したOpti-MEM培地2 mlに交換する際に、200nM Smoothened agonist (SAG)あるいは同量のDimethyl sulfoxide(DMSO)を添加した。37°Cで培養し、24時間後に細胞を回収した。

< 1 8 > PCR反応

(1) Real-time PCR

Power SYBR Green PCR Master Mixを使用し、StepOne™リアルタイムPCRシステムにて検出を行った。データは付属のソフトウェアにて解析した。また、テンプレートは別項の記述に従って作製した。PCR反応液の組成および反応条件を以下に示す。

PCR 反応液組成 (総液量: 10 μ l)

テンプレート cDNA	1 μ l
各プライマー	0.2 μ M
Power SYBR Green master mix	5 μ l
滅菌水	

PCR 反応条件

(95°C、15 秒→60°C、1 分) ×40 サイクル

(2) 遺伝子クローニング用 PCR

酵素は KOD plus または KOD FX を使用した。各酵素における PCR 反応の組成は以下の通りであり、以下これら酵素を使用時は下記の組成で PCR 反応を行っている。

KOD plus を利用した PCR 反応液組成 (総液量: 50 μ l)

テンプレート DNA	100 ng
各プライマー	各 0.3 μ M
10×PCR 緩衝液	5 μ l
dNTPs	各 0.2 mM
MgSO ₄	1 mM
KOD plus DNA polymerase	1 U
滅菌水	

KOD FX を利用した PCR 反応液組成 (総液量: 50 μ l)

テンプレート DNA	100 ng
各プライマー	各 0.3 μ M
2×PCR 緩衝液	25 μ l
dNTPs	各 0.4 mM
KOD FX DNA polymerase	1 U
滅菌水	

(3) オリゴヌクレオチドの合成

INTEGRATED DNA TECHNOLOGIES 社に依頼して合成した。合成したオリゴヌクレオチドは以下の通りである。

ヒト TRIM27 遺伝子クローニング用

HumanTRIM27 sense1 5' -aaagaattcATGGCCTCCGGGAGTGTGGCC-3'
HumanTRIM27 antisense1 5' -aaagtcgacTCAAGGGGAGGTCTCCATGGA-3'

ヒト Real-time RT-PCR 用

HumanTRIM27 sense 5' -GAGCAGCTGTATCACTCCTTAAA-3'
HumanTRIM27 antisense 5' -TGCAAGAGAACTGGGTGATG-3'
HumanGLI1 sense 5' -GCAGTAAAGCCTTCAGCAATG-3'
HumanGLI1 antisense 5' -GCCAGGGAGCTTACATACATAC-3'
HumanPTCH1 sense 5' -GTATGCCAGTCCCTTTCTAC-3'
HumanPTCH1 antisense 5' -TTGCTGCAGATGGTCCTTAC-3'

マウス Trim27 欠失変異体作製用

ΔRING sense 5' -CGGGAGACCTTCCCGCAGCGC-3'
ΔB-box sense 5' -GTGCTGCCCTGGAGGAGGCG-3'
ΔB-box antisense 5' -CACGCCATCTCGCCGCCGGG-3'
ΔSPRY antisense 5' -TCAAAGTACTGAGTATAACTGAGCCTC-3'

コントロール shRNA、マウス Trim27 shRNA 用

shControl-sense, antisense

GIPZ Non-silencing Lentiviral shRNA Control (horizon 社)

Trim27KDa-sense, antisense

Name: V3LMM_506071 target sequence: TCAAGTCTTCACTCTTCT (horizon 社)

Trim27KDb-sense, antisense

Name: V2LMM_14414 target sequence: AGAATCAGACTGGGATAGG (horizon 社)

マウス Real-time RT-PCR 用

MouseTrim27 sense 5' -GGACCACCTAAGAAGAGTGAAAG-3'
MouseTrim27 antisense 5' -CTGCTCAAACCTCCAGACAA-3'
MouseGli1 sense 5' -ACCACCCTACCTCTGTCTATTC-3'
MouseGli1 antisense 5' -TTCAGACCATTGCCCATCAC-3'
MousePtch1 sense 5' -CCATCCACTGCTACTGTCTTAAT-3'
MousePtch1 antisense 5' -TCTACATCTCCCTCCTCAACTC-3'

< 19 > 蛍光免疫染色

細胞回収までの条件は、他の実験と原則同じになるように培地交換やトリプシン処理を行った。まず、15 cm dish で維持していた野生型とノックダウン細胞の培地を交換した翌日にあらかじめ滅菌カバーガラスを敷いた 24 穴プレートに 1.0×10^5 個ずつの細胞を撒いた。さらに翌日に 0.2% BSA が添加された Opti-MEM で血清飢餓刺激と 200nM SAG あるいは同量の DMSO を添加し、そのまま 5% CO₂、37°C で培養して 24 時間後に細胞を回収した。回収した細胞は 4% パラホルムアルデヒドで 37°C にて 5 分固定後にメタノールで -20°C にて 15 分間固定した。その後、4% パラホルムアルデヒドで 37°C にて 30 分固定後、0.1% Triton-X 100 で室温 5 分洗浄し、再度 4% パラホルムアルデヒドで 37°C にて 30 分固定。最後に 1% SDS で室温 5 分、0.1% Triton-X 100 で室温 5 分の洗浄を行った。その後、PBS で洗浄後、界面活性剤 Saponin を含む蛍光免疫用緩衝液で希釈した一次抗体液で、4°C にて overnight あるいは室温で 1 時間静置して反応させた。さらに PBS にて 3 回洗浄後、蛍光免疫用緩衝液で希釈した蛍光標識 2 次抗体液で、遮光して室温にて 1 時間静置した。PBS 洗浄後、ProLong™ Diamond Antifade Mountant with DAPI を用いて封入し、共焦点顕微鏡 LSM710 にて観察および画像を取得し、それぞれの細胞における一次繊毛の発現を認める細胞数や一次繊毛の長さの定量を行った。また、TRIM27 と Shh シグナルに関連する因子の一次繊毛における局在変化を解析した。

< 20 > The visible immunoprecipitation assay (VIP assay)

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。

具体的には、HEK293T を 6well plate に 8.0×10^5 /well で散布し、37°C で 24 時間培養した。そこに DNA 溶液 (plasmid DNA 各 2 μ l (GFP 発現ベクター 2 μ g、mCherry 発現ベクター 2 μ g) + Opti-MEM 250 μ l) と PEI 溶液 (PEI (2 mg/ml) を 10 μ l + Opti-MEM 250 μ l) を合わせて室温で 20 分間留置したものを加え PEI を用いたトランスフェクションを行い、さらに 37°C で 24 時間培養した。6 well plate から培地を取り除き、Lysis buffer を 250 μ l/well 加え、氷上で 5 分間留置した。ピッペンティングで懸濁した後にエッペンドルフチューブに回収し、さらに氷上で 15 分間留置した。その後、遠心 (13,200rpm、4°C、15 分間) を行い、上清 200 μ l を GFP-Nanobody 5 μ l を分注した PCR tube に注入し、4°C、1 時間ローテーションしながらビーズに結合させた。ビーズを Lysis buffer 180 μ l を用いて 3 回洗浄した後、RO 水 180 μ l でビーズを懸濁して、スライドガラスに移し、蛍光顕微鏡 BX-51) で観察した。

< 2 1 > 質量分析用サンプル調製

免疫沈降後の溶出したペプチドを真空遠心で乾燥させ、還元 (55 mM ジチオスレイトール、95°Cで5分間)、アルキル化 (10 mM ヨードアセトアミド、室温、暗所で20分間)後、0.01% RapiGest SF 存在下でトリプシン (50 ng/μl、37°Cで一晩) で消化をした。トリプシン消化後、TFA で酸性化し、GL-Tip GC および GL-Tip SDB を用いて固相抽出を行い脱塩した。

< 2 2 > 質量分析

脱塩したトリプシン消化物は、EASY-nLC 1000 にオンライン接続した Orbitrap Elite により分析した。移動相は、0.1%ギ酸/水 (溶媒 A) と 0.1%ギ酸/100%アセトニトリル (溶媒 B) を用い、ペプチドを C18 Reprosil 分析カラムにロードし、300nL/min の一定流速で150分間の2段階グラジエント (溶媒 B の0~35% 130分、35~100% 5分、100% 15分) により分離した。イオン化には、液絡電圧 1.6 kV、キャピラリー温度 200°Cを使用した。Orbitrap Elite 装置は、Xcalibur ソフトウェアを使用して、データ依存の MS/MS モードで操作し、m/z 400 で 120,000 の分解能で取得したサーベイスキャンを使用した。2 から 4 の電荷を持つ最も豊富な上位 10 個の同位体パターンを、2.0 m/z の分離ウィンドウでサーベイスキャンから選択し、規格化衝突エネルギー35 で衝突誘起解離により断片化した。サーベイスキャンと MS/MS スキャンの最大イオン注入時間は 60ms で、イオンターゲット値は 1e6 に設定した。

< 2 3 > 質量分析データからのタンパク質の同定

Proteome Discoverer ソフトウェアを使用してピークリストを生成した。MS/MS スペクトルは SequestHT 検索エンジンを使用して UniProt ナレッジベース (バージョン 2017_10) に対して検索した。プリカーサーおよびフラグメントの質量公差はそれぞれ 10ppm および 0.6Da に設定した。メチオニン酸化、タンパク質アミノ末端アセチル化、Asn/Gln 脱アミド化、Ser/Thr/Tyr リン酸化、Lys 側鎖のジグリシン修飾、Cys カルバミドメチル修飾をデータベース検索用の可変修飾としてセットした。ペプチドの同定は1%の偽発見率でフィルタリングした。ラベルフリー定量 (LFQ) は、プリカーサーイオン定量ノードのプリカーサーイオンの強度を用いて計算した。各サンプルの全ペプチドの存在量の合計が同じになるように正規化を行った。

《結果》

1-1. ユビキチンリガーゼ TRIM27 の結合基質検索

TRIM27 の機能およびその分子メカニズムを解明するため、ユビキチンリガーゼ TRIM27 の結合タンパク質検索を行った。FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞を樹立し (図 6-1)、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、TTC8、BBS9 を結合タンパク質候補として同定した (表 1)。

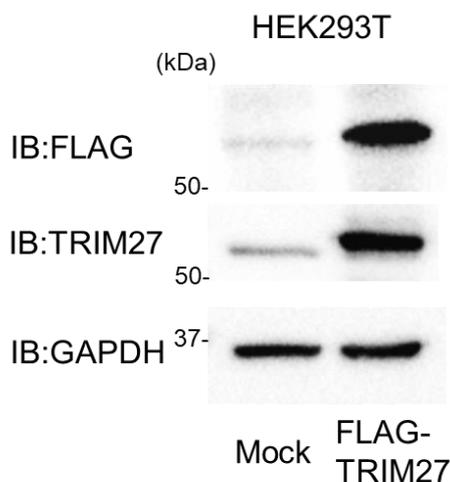


図 6-1 FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞の樹立

TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞とコントロール HEK293T 細胞からサンプルを調製し、抗 TRIM27 抗体と抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

表 1 ユビキチンリガーゼ TRIM27 の結合基質検索結果

Interactor	PSMs
TRIM27	251
BBS1	10
BBS9	5
BBS4	4
BBS5	2
BBS2	2
BBS8	1

1-2. TRIM27 と BBSome の相互作用解析 (HEK293T 細胞)

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 との細胞内における特異的な結合を認めた (図 6-2)。

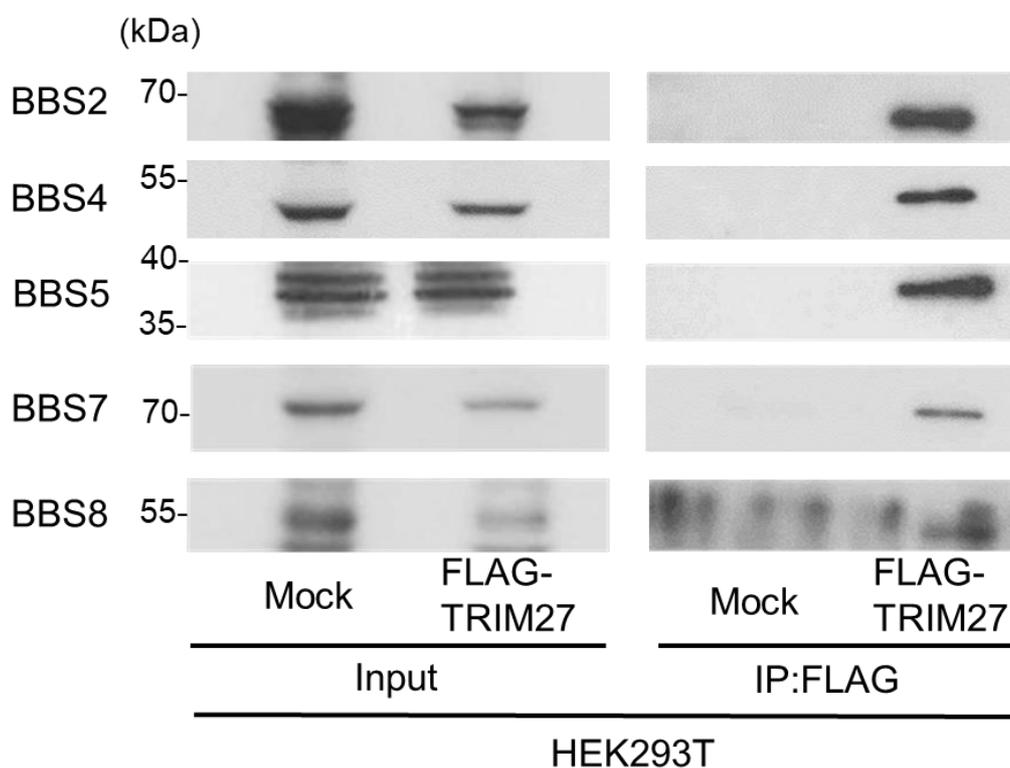


図 6-2 抗 FLAG 抗体の免疫沈降とウエスタンブロット解析による TRIM27 と BBSome サブユニットごとの相互作用解析

FLAG-TRIM27 過剰発現 HEK293T 細胞とコントロール 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。

1-3. VIP assay による TRIM27 と BBSome の相互作用解析

タンパク質同士の相互作用を検証するため VIP assay を行ったところ、TRIM27 は BBS4 と BBS18 それぞれについての強い相互作用を認めた (図6-3)。

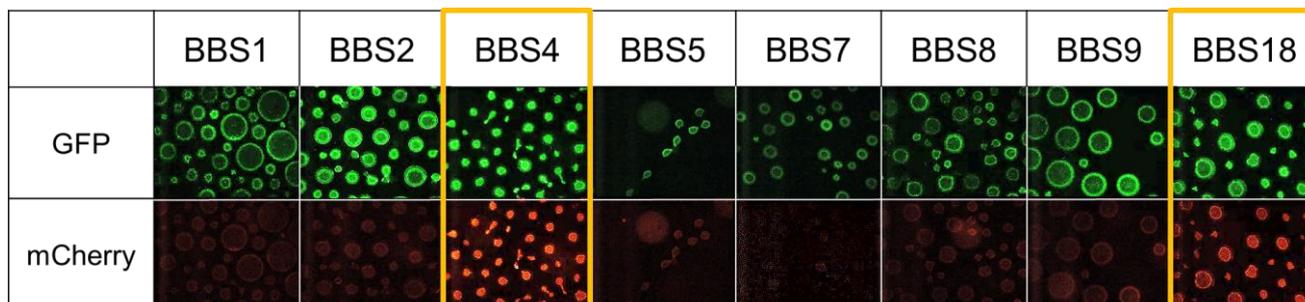


図6-3 VIP assay による TRIM27 と BBSome サブユニットの相互作用解析

TRIM27 に GFP タグを、BBSome サブユニットに mCherry タグをそれぞれ付加し、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。

2-1. TRIM27 過剰発現 NIH3T3 細胞、mIMCD-3 細胞、hTERT-RPE1 細胞の樹立

一次繊毛に関する TRIM27 の機能およびその分子メカニズムを検討するために、一次繊毛の評価が可能な細胞を用いて、FLAG-TRIM27 過剰発現 mIMCD-3 細胞、NIH3T3 細胞、hTERT-RPE1 細胞を樹立した。FLAG 配列を融合した TRIM27 遺伝子をレトロウイルスによって安定に導入し、ウエスタンブロットで発現を検証した (図7-1)。

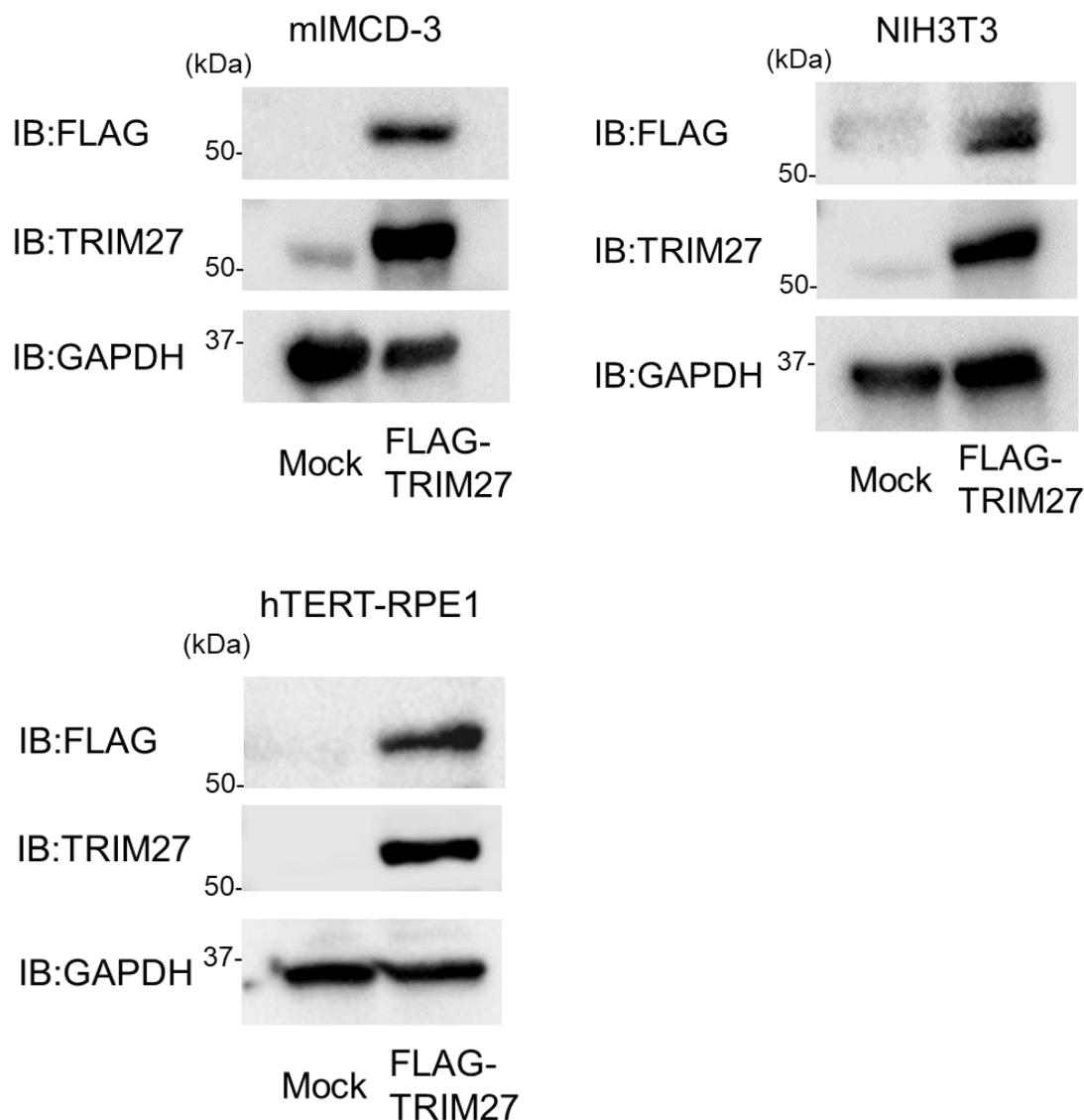


図7-1 FLAG-TRIM27 過剰発現 mIMCD-3 細胞、NIH3T3 細胞、hTERT-RPE1 細胞の樹立
TRIM27 過剰発現 mIMCD-3 細胞、NIH3T3 細胞、hTERT-RPE1 細胞とコントロール mIMCD-3 細胞、NIH3T3 細胞、hTERT-RPE1 細胞からサンプルを調製し、抗 FLAG 抗体、抗 TRIM27 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

2-2. TRIM27 と BBSome の相互作用解析 (hTERT-RPE1 細胞)

FLAG-TRIM27 過剰発現 hTERT-RPE1 細胞を用いて、抗 FLAG 抗体による免疫沈降とウェスタンブロット解析を行ったところ、HEK293T 細胞による解析と同様に、BBS2, BBS4, BBS5, BBS7, BBS8 との細胞内における特異的な結合を認めた (図 7-2)。

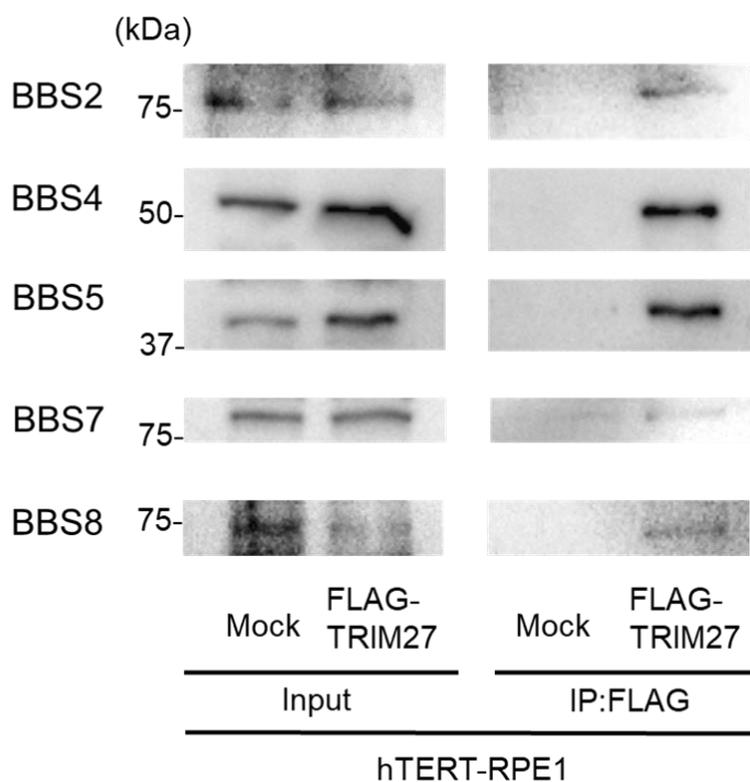


図 7-2 抗 FLAG 抗体の免疫沈降とウェスタンブロット解析による TRIM27 と BBSome サブユニットごとの相互作用解析

FLAG-TRIM27 過剰発現 hTERT-RPE1 細胞とコントロール hTERT-RPE1 細胞を用いて、抗 FLAG 抗体による免疫沈降とウェスタンブロット解析を行った。

2-3. 一次繊毛における TRIM27 の局在

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 (図 7-3)。

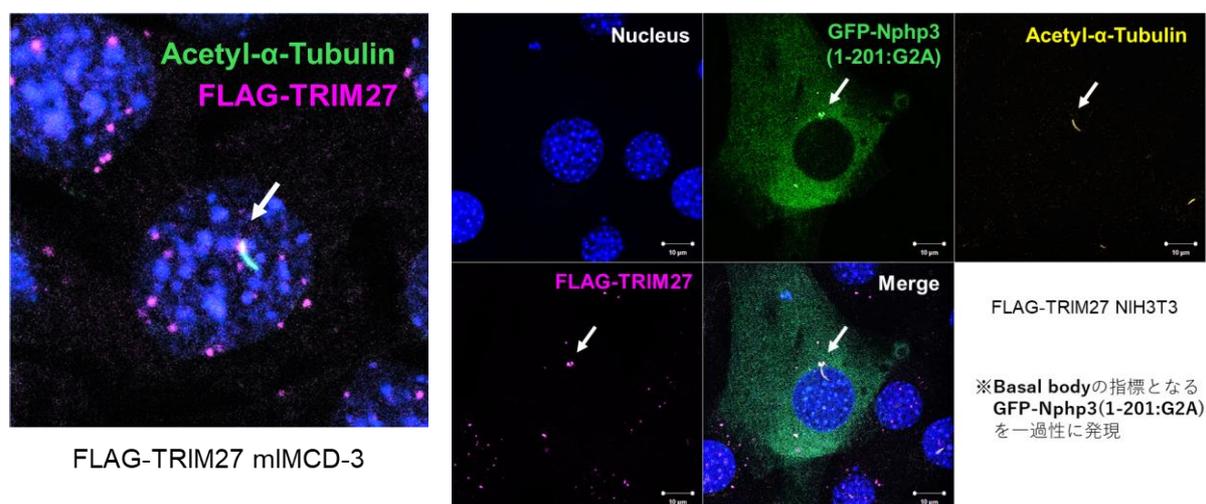


図 7-3 一次繊毛における TRIM27 の局在

左：FLAG-TRIM27 過剰発現 mIMCD-3 細胞において、抗 FLAG 抗体と抗 Acetyl- α -Tubulin 抗体を用いた蛍光免疫染色にて TRIM27 と一次繊毛の局在を評価した。

右：FLAG-TRIM27 過剰発現 NIH3T3 細胞において、一次繊毛の基底小体 (Basal body) のマーカーとなる GFP-Nphp3 (1-201:G2A) を一過性に発現し、抗 FLAG 抗体と抗 Acetyl- α -Tubulin 抗体を用いた蛍光免疫染色にて TRIM27 との Basal body の局在を評価した。

3-1. Trim27 ノックダウン細胞株の樹立

TRIM27 の一次繊毛における役割を検討するために、マウス Trim27 に対する shRNA をコードするレンチウイルスベクターを用いて Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を樹立した (図 8-1、図 8-2)。

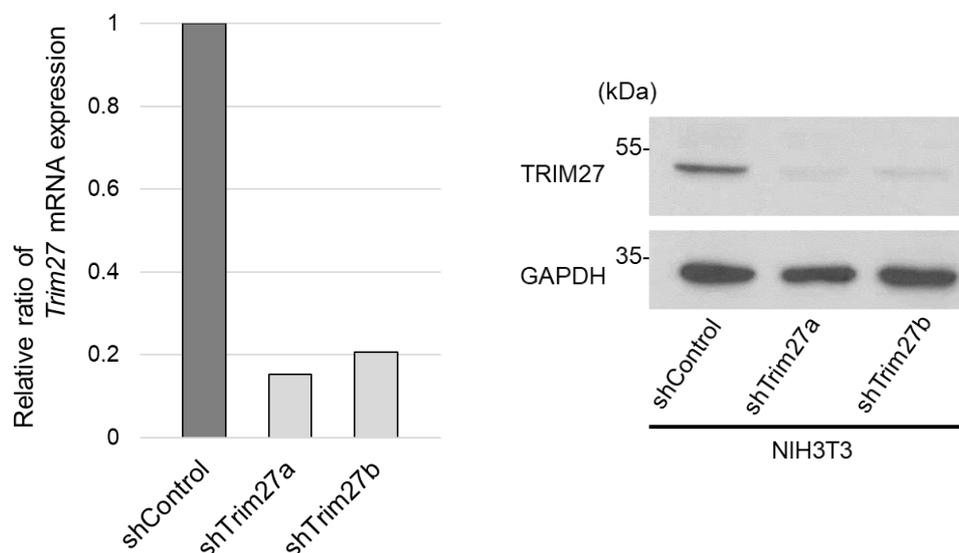


図 8-1 Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞の樹立

Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞を樹立し、リアルタイム PCR 法にて Trim27 のノックダウン効率を測定した。また、抗 TRIM27 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、タンパク質レベルでの TRIM27 発現を評価した。

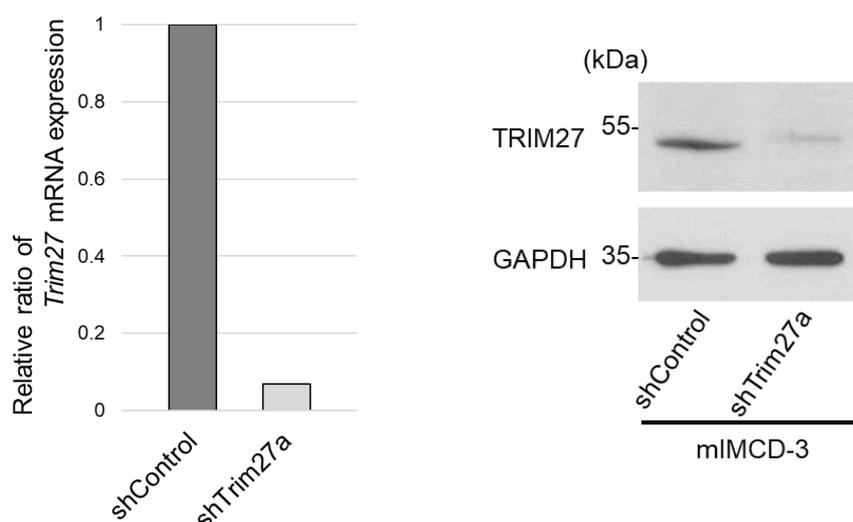


図 8-2 Trim27 ノックダウン mIMCD-3 細胞の樹立

Trim27 ノックダウン mIMCD-3 細胞を樹立し、リアルタイム PCR 法にて Trim27 のノックダウン効率を測定した。また、抗 TRIM27 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、タンパク質レベルでの TRIM27 発現を評価した。

3-2. Trim27 ノックアウト細胞株の樹立

CRISPR/Cas9 ゲノム編集を用いて、Trim27 ノックアウト NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を作製した。樹立した細胞株の細胞溶解液を調製し、抗 TRIM27 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行ったところ、TRIM27 タンパク質の発現が消失していることを確認した (図 8-3)。

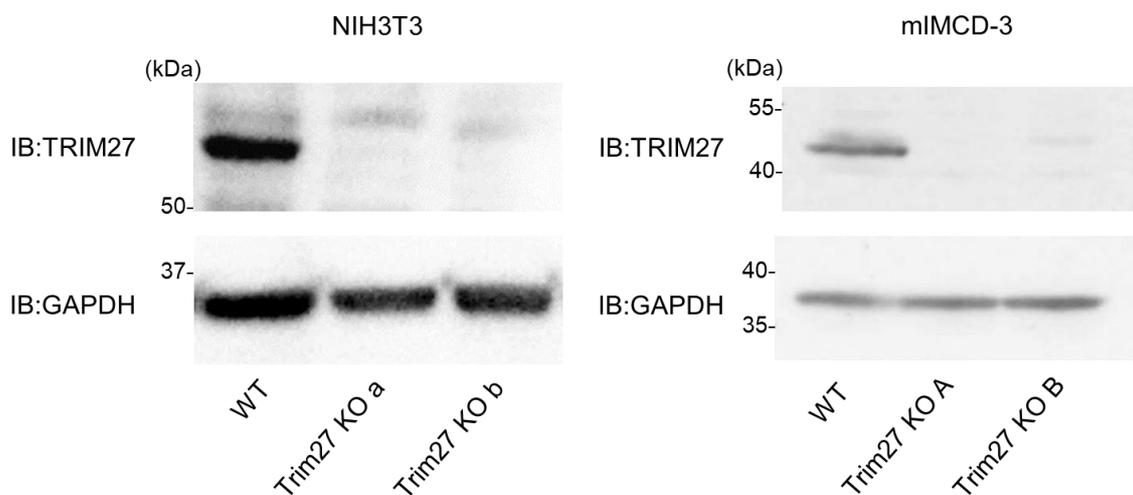


図 8-3 Trim27 ノックアウト NIH3T3 細胞、mIMCD-3 細胞の樹立

野生型 (Wild type : WT) の NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞と Trim27 ノックアウト NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞からサンプルを調製し、抗 TRIM27 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロットを行った。

3-3. Trim27 ノックダウンによる一次繊毛の伸長作用

Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞および mIMCD-3 細胞を用いて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 (図 8-4)。

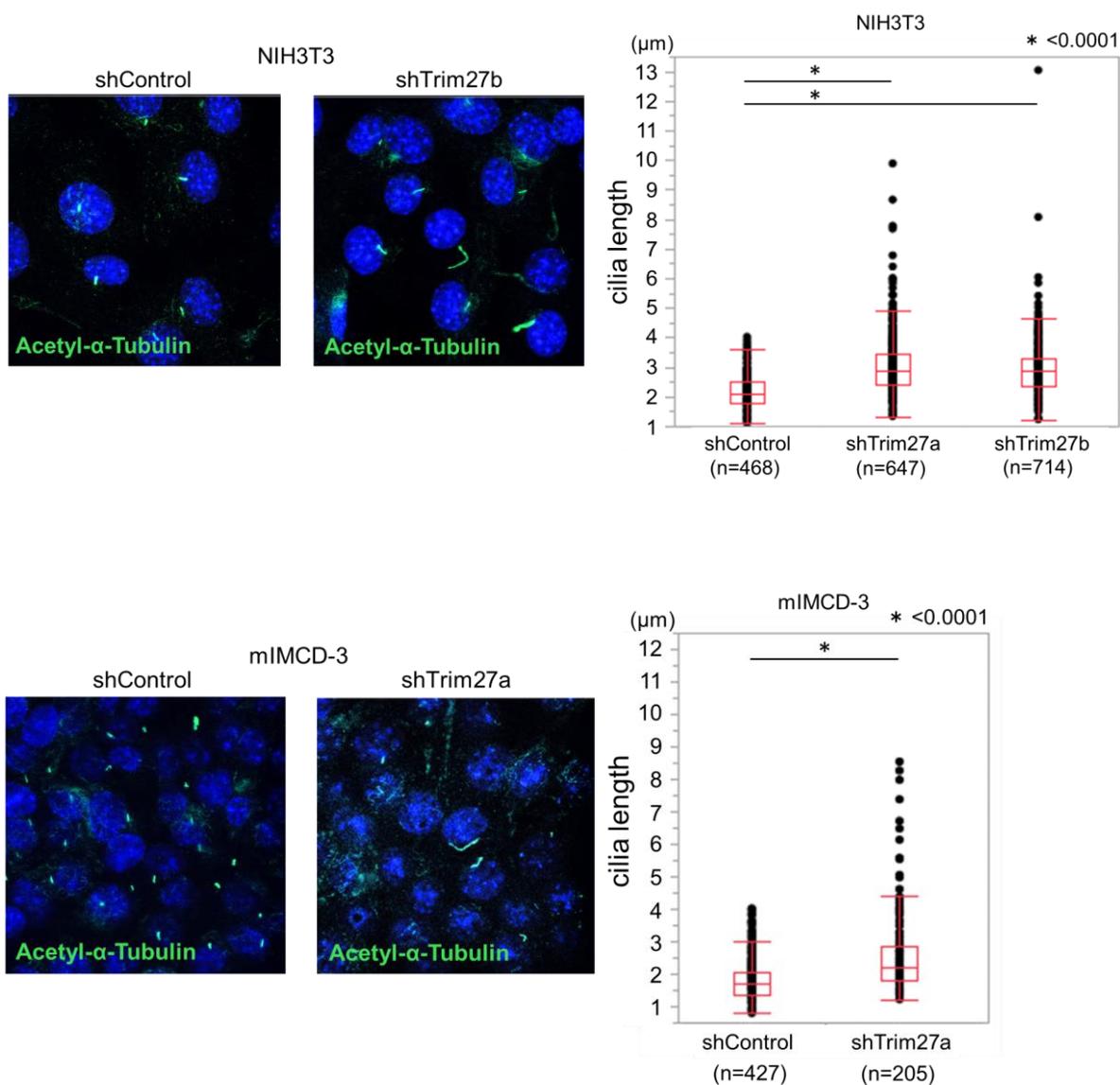


図 8-4 Trim27 ノックダウン細胞における一次繊毛の長さについて測定解析
Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞、mIMCD-3 細胞において、抗 Acetyl- α -Tubulin 抗体を用いた蛍光免疫染色にて一次繊毛の長さを測定した。

3-4. TRIM27 ノックダウンによる Smo 局在変化

蛍光免疫染色にて 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 (図 8-5、図 8-6)。

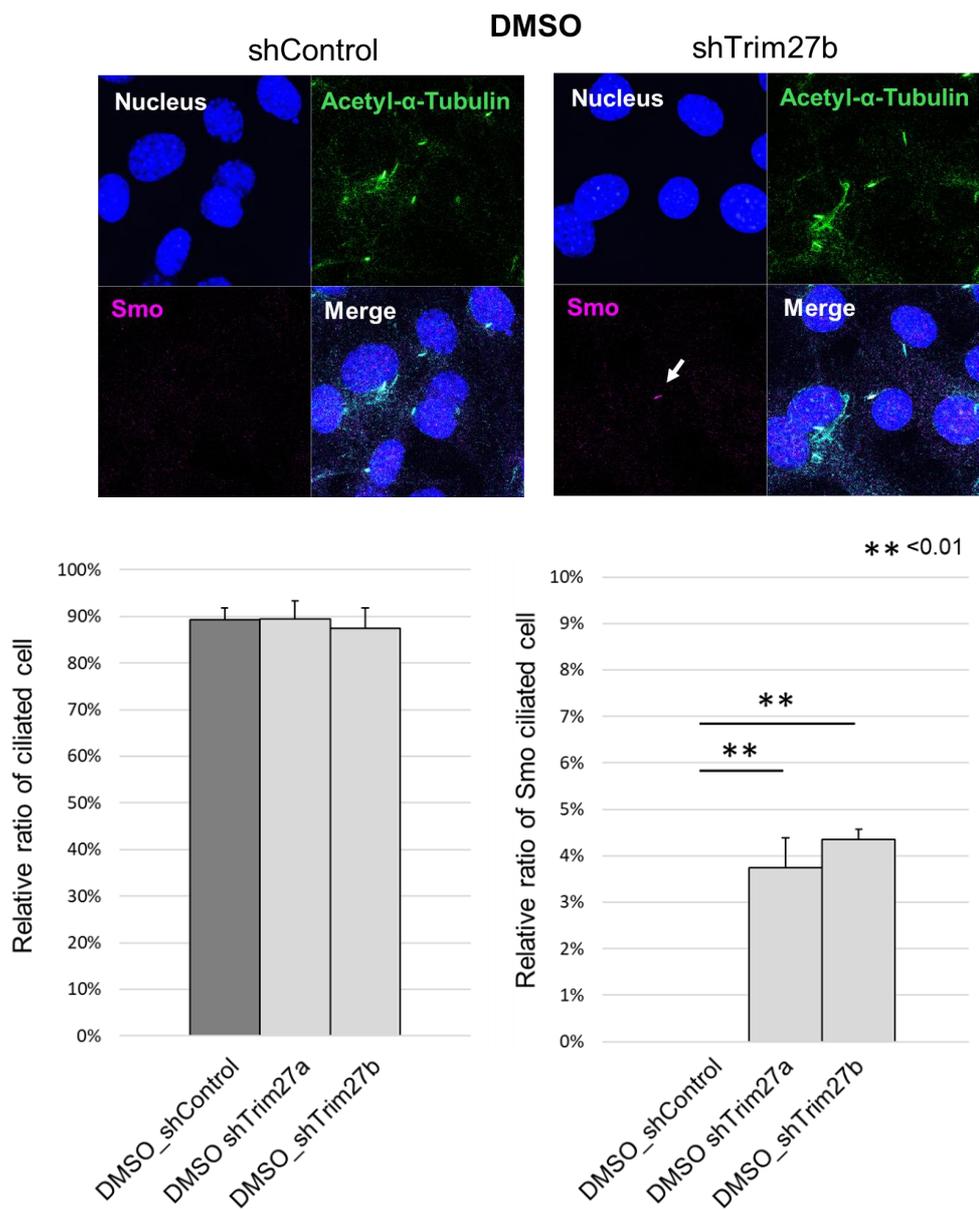


図 8-5 DMSO 投与時に一次繊毛が発現している細胞の比率および Smo が一次繊毛に局在している細胞の比率

Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞とコントロール NIH3T3 細胞において、DMSO 投与時の一次繊毛形成細胞の比率と Smo が一次繊毛と共局在を認める細胞の比率を解析した。

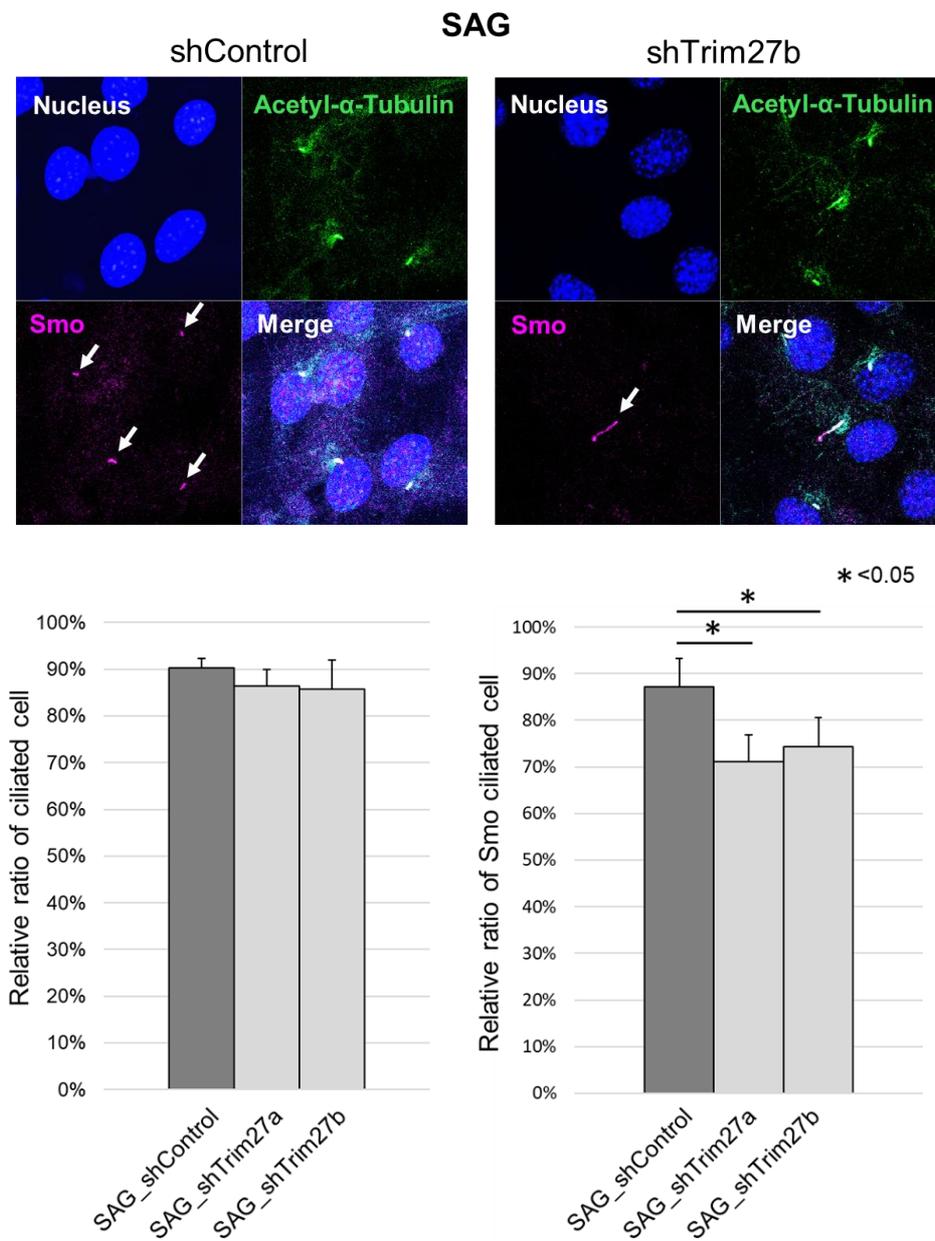


図8-6 SAG 投与時に一次繊毛が発現している細胞の比率および Smo が一次繊毛に局在している細胞の比率

Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞とコントロール NIH3T3 細胞において、SAG 投与時の一次繊毛形成細胞の比率と Smo が一次繊毛と共局在を認める細胞の比率を解析した。

3-5. Trim27 ノックダウンによる Shh シグナル抑制

Shh シグナルにおける TRIM27 の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、DMSO 投与時には *Gli1* の上昇を認める一方、Shh シグナルリガンドである SAG 投与時に *Gli1*、*Ptch1* が低下した (図 8-7)。

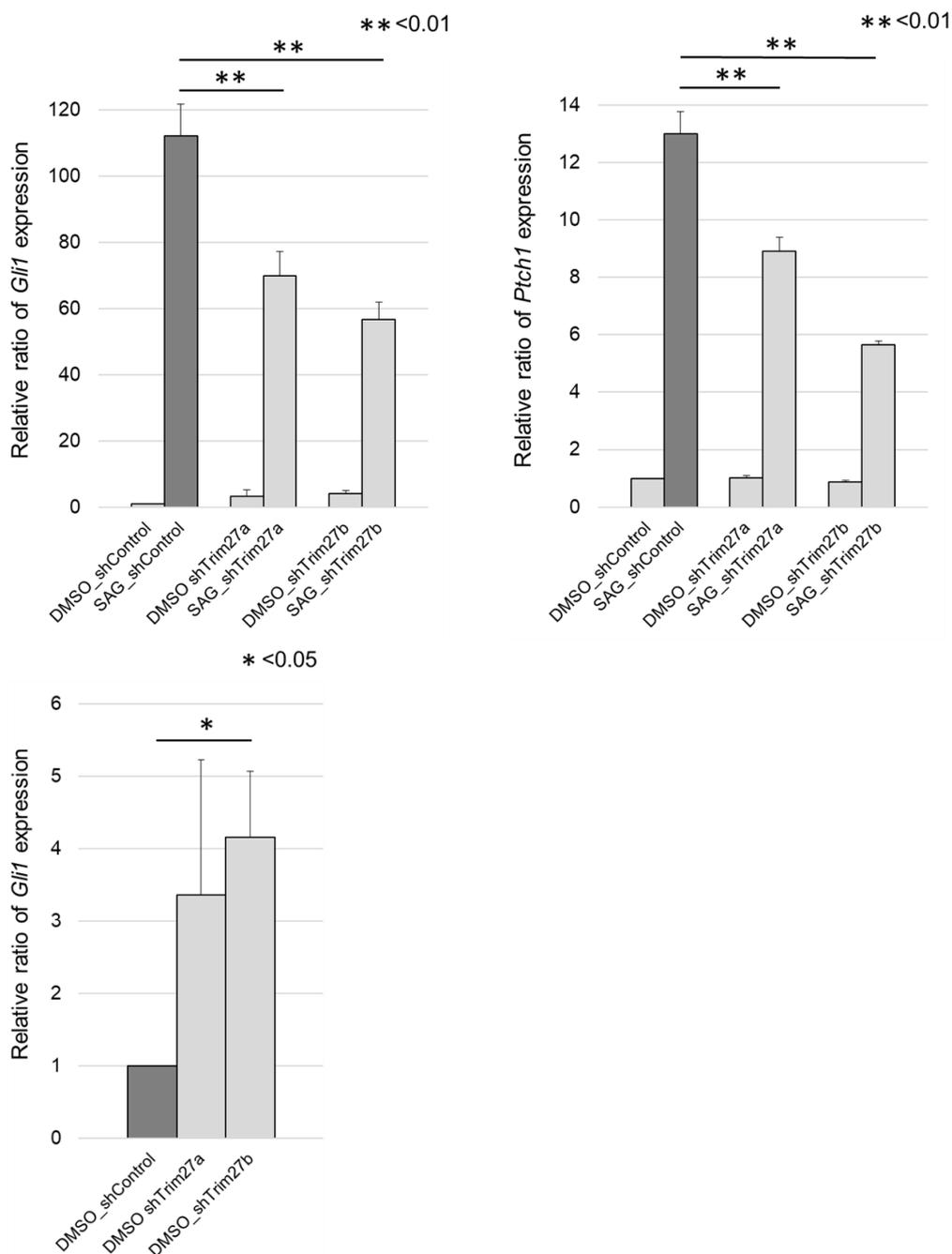


図 8-7 SAG および DMSO 投与時における *Gli1*、*Ptch1* mRNA 量
Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞とコントロール NIH3T3 細胞において、qPCR 法を用いて SAG 投与時と DMSO 投与時それぞれの *Gli1* および *Ptch1* の mRNA 発現量を解析した。

3-6. Trim27 ノックアウトによる Shh シグナル抑制

Shh シグナルにおける TRIM27 の役割を評価するため、Trim27 ノックアウト 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、DMSO 投与時には *Gli1* の上昇を認める一方、Shh シグナルリガンドである SAG 投与時に *Gli1*、*Ptch1* が低下した (図 8-8)。

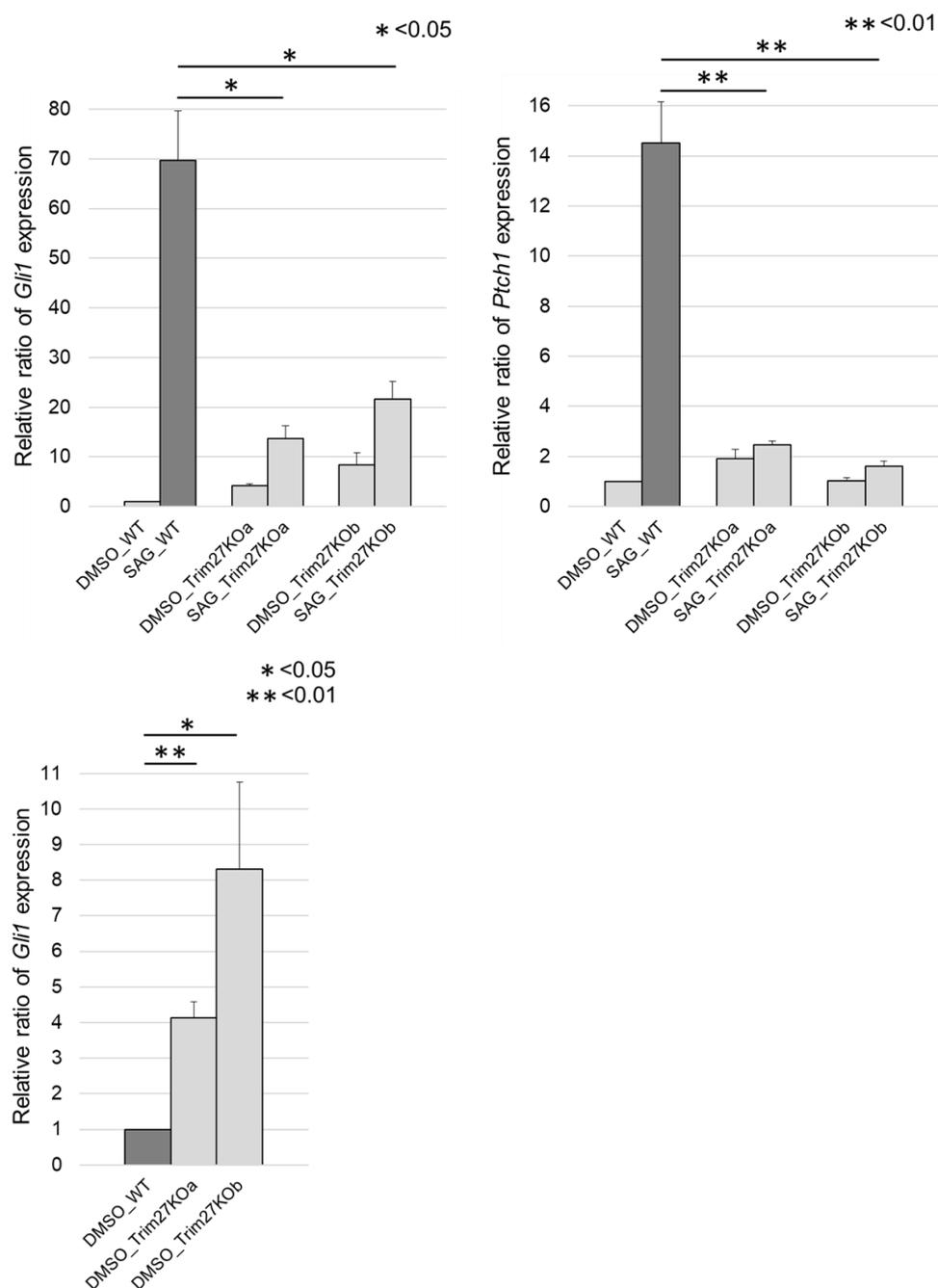


図 8-8 SAG および DMSO 投与時における *Gli1*、*Ptch1* mRNA 量

Trim27 ノックアウト NIH3T3 細胞とコントロール NIH3T3 細胞において、qPCR 法を用いて SAG 投与時と DMSO 投与時それぞれの *Gli1* および *Ptch1* の mRNA 発現量を解析した。

4-1. Trim27 deletion mutant 安定発現細胞の樹立

Trim27 ノックアウト mIMCD-3 細胞に pMX FLAG-Trim27 遺伝子と Trim27 遺伝子の各 domain を除外した Δ RING、 Δ B-box、 Δ SPRY の pMX FLAG-Trim27 deletion mutant をレトロウイルスによって安定に導入し、抗 TRIM27 抗体を用いたウエスタンブロット解析で発現を検証した (図9-1、図9-2)。

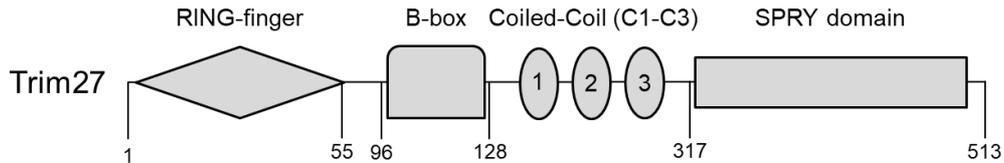


図9-1 Trim27 遺伝子の構造

Trim27 は、1つの RING フィンガー-domain、1つの B-box domain、3つの Coiled-Coil domain、SPRY domain を含んでいる (Zhuang et al., 2016)。

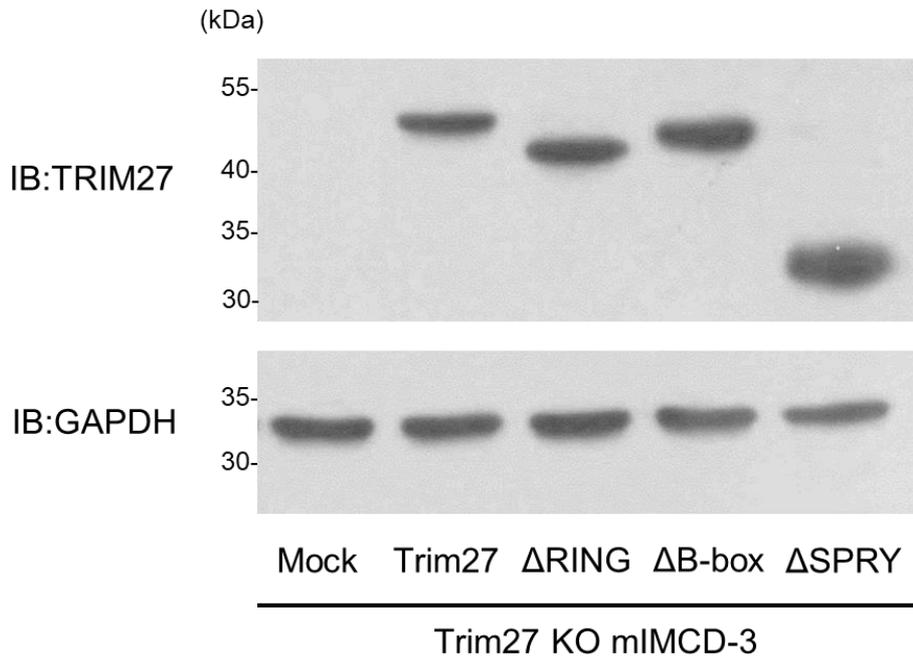


図9-2 Trim27 deletion mutant 安定発現細胞のウエスタンブロット解析

Trim27 ノックアウト mIMCD-3 細胞に pMX FLAG-Trim27 deletion mutant を安定発現し、抗 TRIM27 抗体、抗 GAPDH 抗体を用いてウエスタンブロット解析を行った。

4-2. Trim27 deletion mutant 安定発現細胞における BBSome との結合能評価

pMX FLAG-Trim27 deletion mutant 安定発現細胞において、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、pMX FLAG-Trim27 ΔSPRY 安定発現細胞では BBS5 の結合が減弱した (図 9-3、図 9-4)。

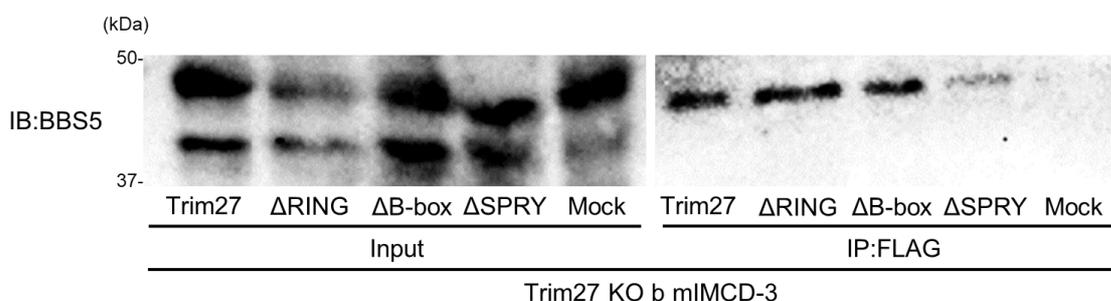


図 9-3 Trim27 deletion mutant 安定発現細胞における BBSome サブユニットとの結合能を比較解析

pMX FLAG-Trim27 deletion mutant 安定発現 mIMCD-3 細胞とコントロール mIMCD-3 細胞において、抗 FLAG 抗体による免疫沈降と BBS5 抗体を用いたウエスタンブロット解析を行った。

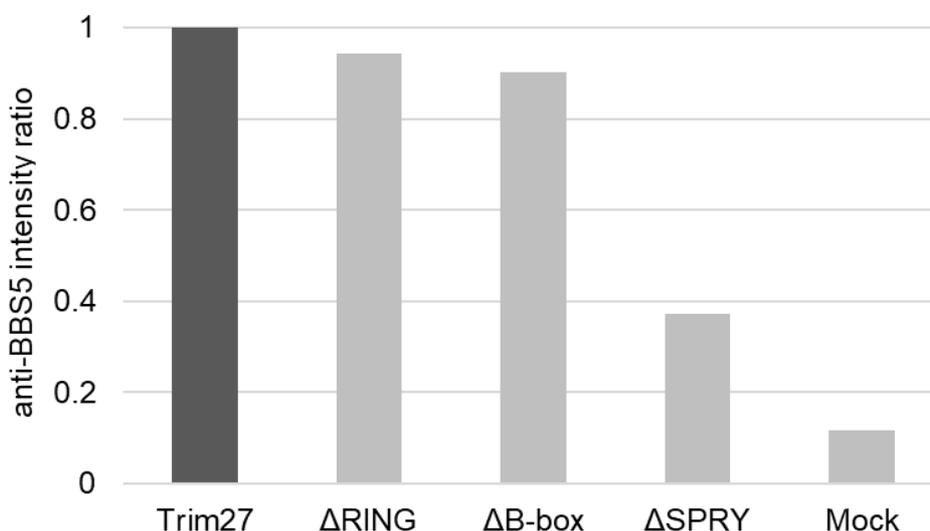


図 9-4 Trim27 deletion mutant 安定発現細胞における抗 BBS5 抗体によるウエスタンブロット解析の定量的評価

pMX FLAG-Trim27 deletion mutant 安定発現 mIMCD-3 細胞とコントロール mIMCD-3 細胞において、抗 FLAG 抗体による免疫沈降と BBS5 抗体を用いたウエスタンブロットの intensity についてそれぞれ定量的に評価した。

《考察》

本研究において、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、BBSome を構成する BBS1、BBS2、BBS4、BBS5、BBS8、BBS9 を結合分子候補として同定した。さらに、免疫沈降とウエスタンブロットによる解析や VIP assay の結果からも BBS4 をはじめとした特定の BBSome サブユニットと TRIM27 との特異的結合を認めた。また、蛍光免疫染色にて TRIM27 は部分的に一次繊毛の basal body に局在しており、これまでの報告で BBS4 が一次繊毛の Basal body に局在し BBSome 形成の最終段階で関与することが明らかとなっていることから、TRIM27 が BBS4 と特異的結合を認めることで一次繊毛の Basal body に局在する可能性が考えられる (図 10-1)。

また、Trim27 deletion mutant 安定発現細胞を用いた免疫沈降およびウエスタンブロットによる解析では、Trim27- Δ SPRY 発現細胞において BBS5 の結合が減弱しており、Trim27 と BBSome との結合ドメインとして SPRY ドメインが重要である可能性を示唆している。ただし、Mouse 細胞由来の mIMCD-3 細胞では、VIP assay にて TRIM27 と強い相互作用を認めた BBS4 による結合を確認出来なかったため、今後 BBS4 との結合が確認されている Human 細胞由来の hTERT-RPE1 細胞を用いて BBS4 抗体による結合ドメインの評価を行うことも重要である。なお、Human と Mouse のいずれにおいても胚発生期の器官形成や髄芽腫や基底細胞癌における一次繊毛と Shh シグナルの関与などについて同様の傾向が報告されており (Bangs and Anderson, 2017)、Human と Mouse 両方の細胞を用いた実験によって一次繊毛形成や Shh シグナルについて解析する意義は大きいと考える。

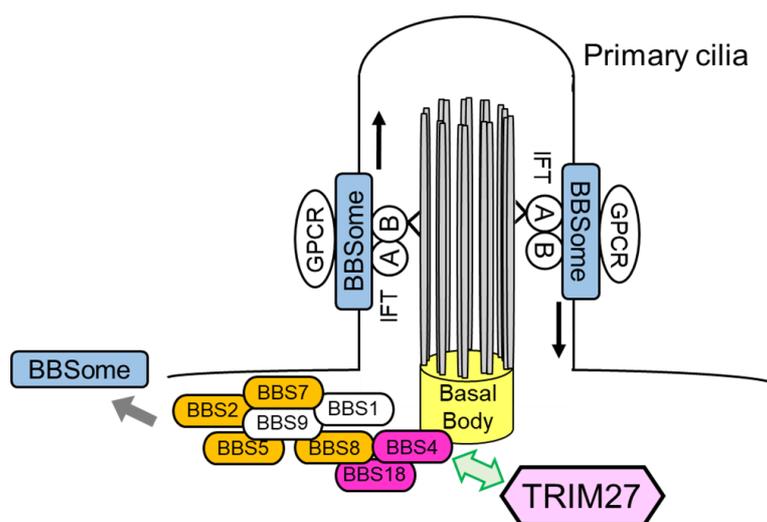


図 10-1 TRIM27 の一次繊毛における局在ならびに BBSome との結合

本研究にて Trim27 ノックダウン細胞において一次繊毛の伸長作用を認めており、一次繊毛は細胞周期の G0-G1 期に形成が誘導され、血清飢餓などにより細胞周期が休止すると一次繊毛の伸長がみられる (Kasahara and Inagaki, 2021) ことを踏まえると、TRIM27 が一次繊毛形成の制御に関与している可能性が考えられた。今後、頭頸部がんの細胞株を用いた実験においても、TRIM27 ノックダウンによって一次繊毛形成や細胞周期に影響を及ぼすか検証することが重要であると考えられる。

さらに、一次繊毛形成に与える影響だけでなく、Shh シグナル伝達経路における影響として、Shh シグナルリガンドである SAG を投与した際、Trim27 ノックダウン細胞では Shh シグナル標的遺伝子 *Gli1* および *Ptch1* の誘導が低下していた。つまり、Trim27 が SAG 刺激下において *Gli1* および *Ptch1* の誘導を上昇させている可能性が考えられる。また、蛍光免疫染色にて Trim27 ノックダウン NIH3T3 細胞とコントロールの細胞のいずれも一次繊毛形成を認める細胞の割合に有意な差はなかったが、Trim27 ノックダウン細胞では SAG 投与時に Smo が一次繊毛に局在する細胞の割合が低下していた。一方で、SAG の非刺激下において Trim27 ノックダウン細胞では *Gli1* の誘導が上昇しており、SAG の刺激が無い状態では Trim27 が *Gli1* の誘導を抑制している可能性が考えられる。また、蛍光免疫染色にて Trim27 ノックダウン細胞では SAG の非刺激下においても Smo が一次繊毛に局在しており、Shh シグナルが活性化されていない状態にもかかわらず、Smo が一次繊毛に局在していた。近年、ソニックヘッジホッグシグナルの伝達が無い状態において、一次繊毛内に局在している Smo はユビキチン化を介して BBSome に認識され、一次繊毛の逆行性輸送によって一次繊毛外へ除去されることが明らかにされた (Lv et al., 2021)。本研究により TRIM27 が BBSome と特異的に結合することが示され、Trim27 ノックダウンにより Smo の局在制御に影響を及ぼしていることを踏まえると、Smo のユビキチン化あるいはユビキチン化された Smo が BBSome に認識される機構に TRIM27 が関与している可能性があり、以下の仮説が考えられる。

Trim27 をノックダウンすると、Smo のユビキチン化が抑制される、または BBSome によるユビキチン化 Smo が BBSome の認識が抑制される。その結果、Smo の一次繊毛外への排出が阻害され、一次繊毛内に一定数の Smo が局在し、SAG 非刺激下においても *Gli1* の誘導が上昇したと考えられる (図 10-2)。

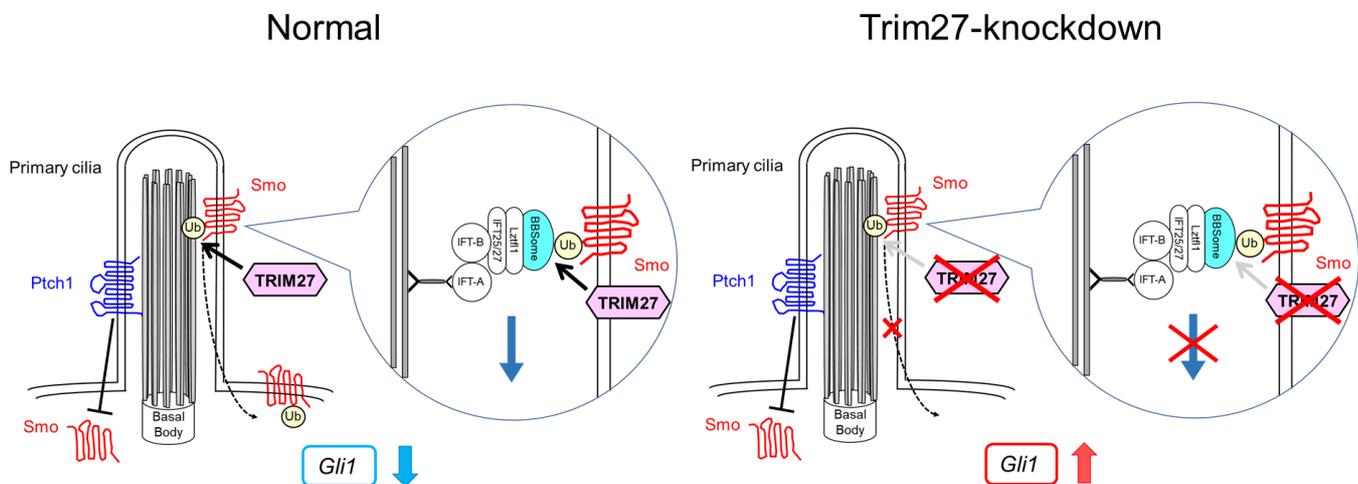


図10-2 コントロール細胞ならびに Trim27 ノックダウン細胞における SAG 非刺激下の Smo 局在制御に対する TRIM27 の関与

一方 SAG 刺激下では、一次繊毛内の Smo は脱ユビキチン化型で存在し、BBSome による排出を受けずに留まり、GLI の活性化や核内移行を促進する。Trim27 ノックダウンは何らかの形でこの過程を阻害し、排出により一次繊毛内に局在する Smo が減少し、標的遺伝子 *Gli1* および *Ptch1* の誘導が低下したと考えられる (図10-3)。

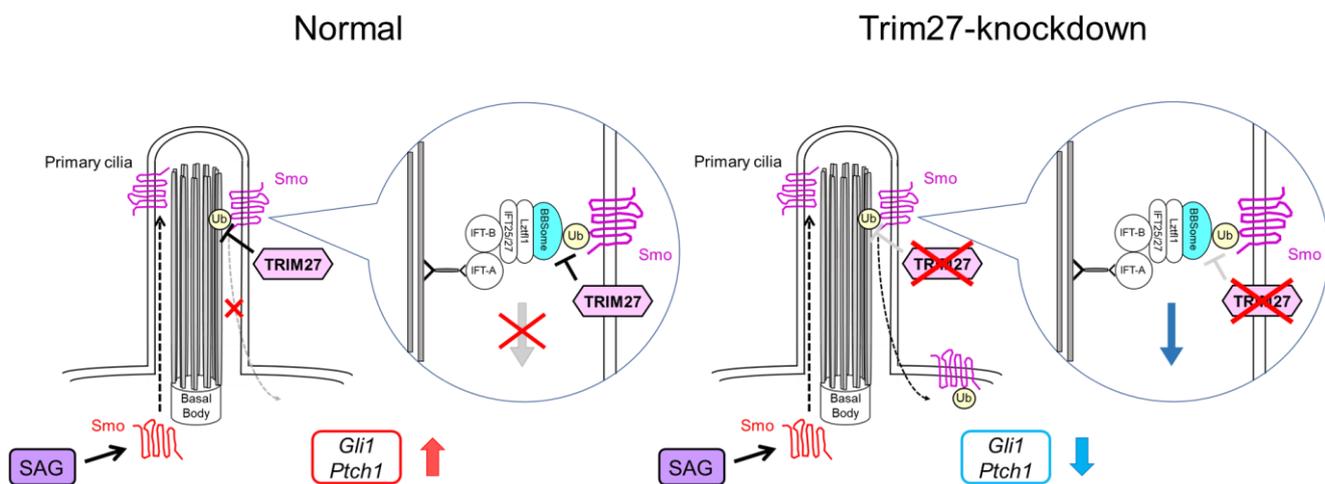


図10-3 コントロール細胞ならびに Trim27 ノックダウン細胞における SAG 刺激下の Smo 局在制御に対する TRIM27 の関与

以上より、Trim27 ノックダウンにより一次繊毛が伸長し、リガンド非投与時には Shh シグナル経路がわずかに活性化し、リガンド投与時には Shh シグナル経路の活性化が抑制されていることから、Trim27 が一次繊毛形成や BBSome を介した Smo 局在変化による Shh シグナルの制御因子として機能している可能性を見出した。その詳細な機構については不明な点も残されているが、Trim27 がユビキチンリガーゼであることと一次繊毛におけるユビキチン化修飾の重要性を踏まえると、Trim27 による一次繊毛・Shh シグナル制御因子のユビキチン化がその機構の実体である可能性があり、今後検証していく必要がある。

さらに、これまで TRIM27 の発がんメカニズムへの関与として、PI3K/AKT シグナル (卵巣がん、大腸がん)、Wnt/ β -catenin シグナル (肺がん)、NF- κ B シグナル (腎細胞がん)、Hippo-BIRC5 シグナル (胃がん) などが報告されているが、TRIM27-Shh 経路による発がんへの関与は明らかにされていない。Shh シグナルはさまざまな臓器の悪性腫瘍において発がんの制御へ寄与することが知られているため、TRIM27-Shh 経路の発現における重要性が明らかになれば、がん治療における有望な標的となる可能性がある。また、SNMM における TRIM27 の関与は未だ明らかになっておらず、前述した PI3K/AKT などのさまざまなシグナル経路や本研究の細胞実験で TRIM27 の関与が示唆された Shh シグナルの関連について検討することが今後重要となってくる。まずは SNMM における TRIM27 の発現および臨床経過への関連を明らかにすることで TRIM27 の関与を解明する。その上で、発がんに関与するシグナル伝達経路についても今後検証していくことが重要であると考えられる。

第2章

鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫における TRIM27 発現の臨床病理学的解析

《実験方法》

1-1. 対象症例

本研究の対象基準は以下の通りである。(1)2003年5月から2021年3月までに北海道大学病院で治療を受けた、(2)原発部位が鼻腔または副鼻腔、(3)組織学的に悪性黒色腫と診断され、(4)根治を目的とした治療が行われた。本研究は、「ヘルシンキ宣言(2013年10月修正)」および「人を対象とする医学系研究に関する倫理指針」を遵守し、試験デザインならびにインフォームドコンセントフォームは北海道大学病院倫理委員会の承認を得て実施した(承認番号018-0352)。対象患者のうち、外来通院患者を含めて連絡可能な方に関しては、文書を用いた個別同意取得を行った。既に死亡した方や現在通院しておらず連絡困難な方に関しては、研究の目的を含む研究の実施についての情報を北海道大学病院ホームページに掲載するオプトアウトを行い、研究対象者(もしくは代諾者)に拒否の機会を保障した。

1-2. 臨床所見の検討

解析対象である28症例について、年齢、性別、T分類、頸部リンパ節転移、遠隔転移、臨床病期、治療法、予後などの臨床情報を集積した。

2-1. 病理組織標本作製

免疫組織化学染色法(immunohistochemistry: IHC)は、腫瘍組織を外科的に摘出された標本から、正常鼻粘膜組織を対照として同じ患者から採取した。ホルマリン固定パラフィン包埋(formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE)検体を用いて厚さ3 μ mの薄切切片を作製し、TRIM27、Ki-67、p-Akt1の免疫染色を施行した。IHC試薬の一覧とTRIM27、Ki-67、p-Akt1染色のプロトコールの以下に示す。

IHC 試薬一覧

キシレン (富士フィルム和光純薬, 大阪)
エタノール (99.5) (富士フィルム和光純薬)
Epitope Retrieval Solution (×10 Concentrate) pH9 (Leica, Wetzlar, Germany)
抗原賦活化液 pH9 (10 倍濃縮) (ニチレイバイオサイエンス, 東京)
メタノール (富士フィルム和光純薬)
過酸化水素 (関東化学, 東京)
2-アミノ-2 ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール (富士フィルム和光純薬)
塩酸 (関東化学)
塩化ナトリウム (関東化学)
ポリオキシエチレン (20) ソルビタンモノラウレート (Tween® 20)
(富士フィルム和光純薬)
リン酸二水素ナトリウム二水和物 (関東化学)
リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 (関東化学)
抗 TRIM27 ウサギポリクローナル抗体 (proteintech 社)
抗 Ki-67 ウサギモノクローナル抗体 (SP6) (ニチレイバイオサイエンス)
抗 p-Akt1 マウスモノクローナル抗体 (proteintech 社)
シンプルステイン MAX-PO (MULTI) (ニチレイバイオサイエンス)
EnVision+ System- HRP Labelled Polymer Anti-Mouse (Dako, Glostrup, Denmark)
シンプルステイン DAB 溶液 (ニチレイバイオサイエンス)
マイヤー・ヘマトキシリン溶液 (1.5 倍法) (武藤化学, 東京)
マリノール封入液 (武藤化学)

TRIM27 染色プロトコール

1. 脱パラフィン処理

- ・切片をキシレンの入った染色瓶に約 10 分間浸漬、2 回行った
- ・エタノール (100%→90%→80%→70%の順) にそれぞれ約 5 分間浸漬した
- ・蒸留水に約 5 分間浸漬した

2. 抗原賦活化

- ・脱パラフィン化した切片を Antigen retrieval solution (Tris-EDTA buffer (pH9.0)) の緩衝液に浸し、耐熱容器で密閉した
- ・マイクロウェーブにて最初に 15 分 500W 照射し、次に 15 分 250W 照射した
(最初の 15 分で一旦耐熱容器内を確認し、もし沸騰して緩衝液が減少した場合には、同様の緩衝液を追加して次の照射を行った)

- ・切片を緩衝液につけたまま容器ごと回収し、室温に30分ほど静置し穏やかに冷却した
 - ・30分後、容器から切片を取り出し、蒸留水に約5分間浸漬した
3. ブロッキング
- ・切片を0.3%過酸化水素含有メタノール溶液（蒸留水300 ml+メタノール300 ml+30%過酸化水素6 ml）に約10分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした
 - ・スライドを1xTBSで3回、各3分間すすぐ
 - ・Blocking buffer (5% goat serum in TBS)で、切片を室温で1時間浸す
4. 一次抗体反応
- ・切片をTBST*aに約20分間浸漬した
 - ・抗TRIM27抗体（TBST*aで1:200に希釈）を切片一枚につき約100 µlずつ滴下し、室温に1時間静置した
 - ・PBS (-) *bに約5分間浸漬、3回行った
5. 二次抗体反応
- ・切片をTBST*aに約20分間浸漬した
 - ・Dako Enbision+System-HRP Labelled Polymer Anti-Mouseを切片一枚につき約2滴ずつ滴下し、室温に1時間静置した
 - ・PBS (-) *bに約5分間浸漬、3回行った
6. 発色
- ・シンプルステイン DAB 溶液を切片一枚につき約2滴ずつ滴下し、顕微鏡で染色具合を確認しながら室温に約20-25分間静置した
 - ・蒸留水に約5分間浸漬した
7. 核染色
- ・マイヤー・ヘマトキシリン溶液の入った染色瓶に50秒間浸漬した
 - ・蒸留水に数分間浸漬した
8. 脱水
- ・切片をエタノール（70%→80%→90%→100%の順）にそれぞれ約5分間浸漬した
 - ・キシレンの入った染色瓶に約5分間浸漬、3回行った
9. 封入
- ・マリノール封入剤を切片上に滴下しカバーガラスで覆った

*a Tris-buffered saline with Tween® 20 (TBST) の調製

1. 2-アミノ-2 ヒドロキシメチル-1,3-プロパンジオール 121.14 g を 90 ml の塩酸、蒸留水と混合し PH6.8 に調整したトリス塩酸緩衝液 (Tris-HCl) 1,000 ml を作製した
2. 5M 塩化ナトリウム 300 ml + トリス塩酸緩衝液 200 ml + 蒸留水 500 ml で 10×TBS を作製した
3. 1 で作製した 10×TBS 100 ml に蒸留水を 900 ml 混ぜ合計 1,000 ml にした (1×TBS の作製)
4. 2 で作製した 1×TBS 1,000 ml に Tween® 20 を 500 µl 加えて攪拌し、TBST が完成

*b Phosphate-buffered saline (PBS) の調製

リン酸二水素ナトリウム二水和物 3 g + リン酸水素二ナトリウム・12 水和物 28.7 g + 塩化ナトリウム 85 g に蒸留水を加えて合計 10 l とし、PBS (-) が完成

Ki-67 染色プロトコール

1. 脱パラフィン処理
 - ・切片をキシレンの入った染色瓶に約 10 分間浸漬、2 回行った
 - ・エタノール (100%→90%→80%→70%の順) にそれぞれ約 5 分間浸漬した
 - ・蒸留水に約 5 分間浸漬した
2. 抗原賦活化
 - ・脱パラフィン化した切片を、蒸留水で 10 倍希釈した抗原賦活化液 pH9 の緩衝液に浸し、耐熱容器で密閉した
 - ・マイクロウェーブにて、最初に 15 分 500W 照射し、次に 15 分 250W 照射した (最初の 15 分で一旦耐熱容器内を確認し、もし沸騰して緩衝液が減少した場合には、同様の緩衝液を追加して次の照射を行った)
 - ・切片を緩衝液につけたまま容器ごと回収し、室温に 30 分ほど静置し穏やかに冷却した
 - ・30 分後、容器から切片を取り出し、蒸留水に約 5 分間浸漬した
3. ブロッキング
 - ・切片を 0.3%過酸化水素含有メタノール溶液 (蒸留水 300 ml + メタノール 300 ml + 30%過酸化水素 6 ml) に約 10 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした
 - ・スライドを 1xTBS で 3 回、各 3 分間すすぐ

- ・Blocking buffer (5% goat serum in TBS)で、切片を室温で1時間浸す
- 4. 一次抗体反応
 - ・切片をTBST*aに約20分間浸漬した
 - ・抗Ki-67抗体(希釈済)を切片一枚につき約2滴ずつ滴下し、室温に1時間静置した
 - ・PBS(-)*bに約5分間浸漬、3回行った
- 5. 二次抗体反応
 - ・切片をTBST*aに約20分間浸漬した
 - ・シンプルステインMAX-PO(MULTI)を切片一枚につき約2滴ずつ滴下し、室温で1時間静置した
 - ・PBS(-)*bに約5分間浸漬、3回行った
- 6. 発色
 - ・シンプルステインDAB溶液を切片一枚につき約2滴ずつ滴下し、顕微鏡で染色具合を確認しながら室温に約20-25分間静置した
 - ・蒸留水に約5分間浸漬した
- 7. 核染色
 - ・マイヤー・ヘマトキシリン溶液の入った染色瓶に50秒間浸漬した
 - ・蒸留水に数分間浸漬した
- 8. 脱水
 - ・切片をエタノール(70%→80%→90%→100%の順)にそれぞれ約5分間浸漬した
 - ・キシレンの入った染色瓶に約5分間浸漬、3回行った
- 9. 封入
 - ・マリノール封入剤を切片上に滴下しカバーガラスで覆った

p-Akt1 染色プロトコール

1. 脱パラフィン処理
 - ・切片をキシレンの入った染色瓶に約10分間浸漬、2回行った
 - ・エタノール(100%→90%→80%→70%の順)にそれぞれ約5分間浸漬した
 - ・蒸留水に約5分間浸漬した
2. 抗原賦活化
 - ・脱パラフィン化した切片を、蒸留水で10倍希釈した抗原賦活化液pH9の緩衝液に浸し、耐熱容器で密閉した
 - ・マイクロウェーブにて、最初に15分500W照射し、次に15分250W照射した

(最初の 15 分で一旦耐熱容器内を確認し、もし沸騰して緩衝液が減少した場合には、同様の緩衝液を追加して次の照射を行った)

- 切片を緩衝液につけたまま容器ごと回収し、室温に 30 分ほど静置し穏やかに冷却した
- 30 分後、容器から切片を取り出し、蒸留水に約 5 分間浸漬した

3. ブロッキング

- 切片を 0.3%過酸化水素含有メタノール溶液 (蒸留水 300 ml + メタノール 300 ml + 30%過酸化水素 6 ml) に約 10 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性をブロックした
- スライドを 1xTBS で 3 回、各 3 分間すすぐ
- Blocking buffer (5% goat serum in TBS) で、切片を室温で 1 時間浸す

4. 一次抗体反応

- 切片を TBST*a に約 20 分間浸漬した
- 抗 p-Akt1 抗体 (TBST*a で 1:200 に希釈) を切片一枚につき約 2 滴ずつ滴下し、室温に 1 時間静置した
- PBS (-) *b に約 5 分間浸漬、3 回行った

5. 二次抗体反応

- 切片を TBST*a に約 20 分間浸漬した
- シンプルステイン DAB 溶液を切片一枚につき約 2 滴ずつ滴下し、室温に 1 時間静置した
- PBS (-) *b に約 5 分間浸漬、3 回行った

6. 発色

- シンプルステイン DAB 溶液を切片一枚につき約 2 滴ずつ滴下し、顕微鏡で染色具合を確認しながら室温に約 20-25 分間静置した
- 蒸留水に約 5 分間浸漬した

7. 核染色

- マイヤー・ヘマトキシリン溶液の入った染色瓶に 50 秒間浸漬した
- 蒸留水に数分間浸漬した

8. 脱水

- 切片をエタノール (70%→80%→90%→100%の順) にそれぞれ約 5 分間浸漬した
- キシレンの入った染色瓶に約 5 分間浸漬、3 回行った

9. 封入

- マリノール封入剤を切片上に滴下しカバーガラスで覆った

2-2. 免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry : IHC) の評価方法

鼻副鼻腔粘膜悪性黒色腫における染色陽性細胞の評価は、光学顕微鏡を用いて 200 倍視野下で行われた。TRIM27、p-Akt1 染色の判定では、既報の論文を参考に、染色強度を「Intensity score」として、0 (No staining)、1 (Weak)、2 (Moderate)、3 (Strong) の 4 段階で評価した。TRIM27、p-Akt1、Ki-67 染色では、染色された細胞の割合を「Positive score」として、0 (Negative)、1 (<30%)、2 (30-59%)、3 (≥ 60%) の 4 段階で評価した。

3-1. 統計学的手法

全生存期間は初回治療開始日から死亡日または最終フォローアップ日までの期間と定義した。無病生存期間は初回治療開始日から再発日、死亡日、最終フォローアップ日のいずれかと定義した。全生存期間と無病生存期間の推定には Kaplan-Meier 法を使用した。全生存期間と無病生存期間については、TRIM27 の発現量 (高発現と低発現) で層別化した log-rank 検定を用いて群間比較を評価した。また、初回治療開始から遠隔転移および頸部リンパ節転移が初めて確認されるまでの期間も分析した。副鼻腔粘膜黒色腫における臨床病理学的パラメータと予後の関連性を調べるために単変量解析を行った。T 分類、免疫組織化学染色における Intensity score、Positive score などの順序変数は、フィッシャーの正確検定を用いて比較した。相対リスクと 95%CI を計算するために、Cox 比例ハザードモデルを使用した。データは平均値 ± SD で表した。p 値 < 0.05 は統計的に有意であるとみなされた。すべての統計学的検定は JMP® pro version 16 software program (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行われた。

《結果》

1-1. SNMMにおける免疫組織化学染色像 (TRIM27、p-Akt1、Ki-67)

TRIM27 による免疫組織化学染色では、腫瘍部分において腫瘍表面と腫瘍実質の両方に染色像を認め、核を中心に染色されており一部では細胞質にも染色像がみられた。腫瘍の無い鼻粘膜組織においては、TRIM27 による染色像は限定的であった。p-Akt1 による免疫組織化学染色では、腫瘍部分において核と細胞質の両方に染色像を認めた。腫瘍の無い鼻粘膜組織においても、部分的に p-Akt1 による染色像を認めた。Ki-67 による免疫組織化学染色では、腫瘍部分において核が染色された細胞が散見され、腫瘍の無い鼻粘膜組織においては Ki-67 で染色された細胞は腫瘍部分に比べ少なかった (図 1 1-1)。

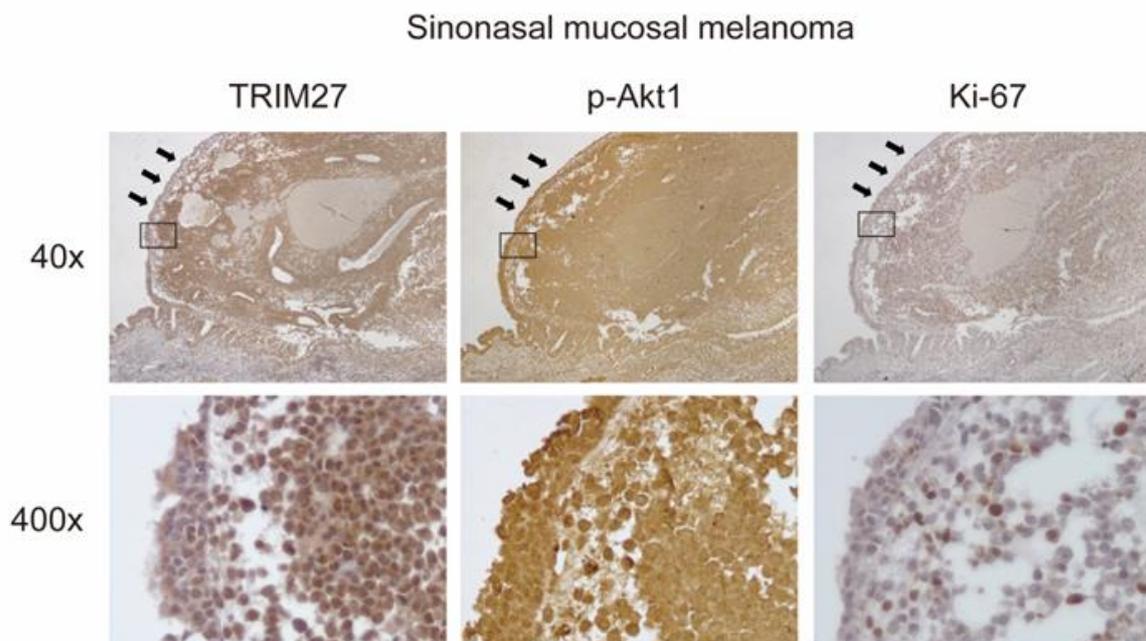


図 1 1-1 SNMMにおける免疫組織化学染色像 (TRIM27、p-Akt1、Ki-67)

上段：40倍、下段：400倍、矢印：SNMMの腫瘍部位

1-2. TRIM27

TRIM27 は染色強度を「Intensity score」とし、0 (No staining)、1 (Weak)、2 (Moderate)、3 (Strong) の4段階で評価した。また染色された細胞の割合を「Positive score」として0 (Negative)、1 (<30%)、2 (30-59%)、3 (≥60%) の4段階で評価した (図1 1-2、表2-1)。TRIM27 の Total staining score は、胃がんや卵巣がんにおける TRIM27 免疫組織化学染色評価の既報 (Ma Y et al., 2016; Yao Y et al., 2020) と同様に、Intensity score と Positive score の積として定義した。TRIM27 の Total staining score が4以下であれば TRIM27 低発現群、4より高ければ TRIM27 高発現群として層別化した (表2-2)。

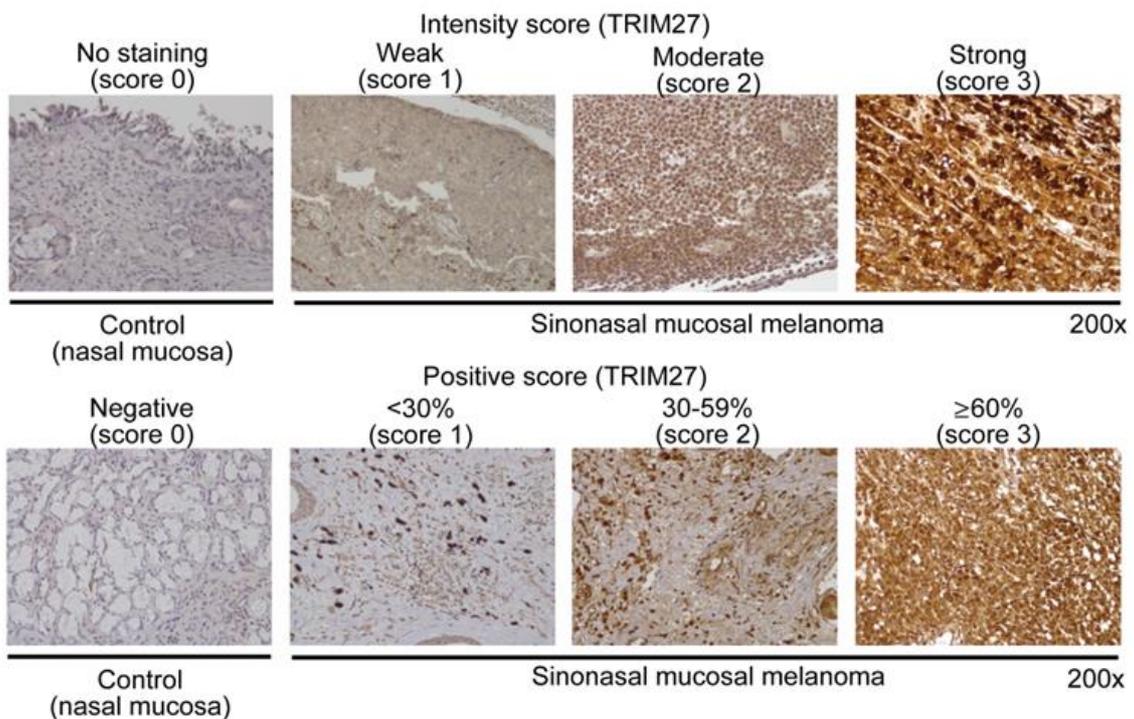


図1 1-2 SNMM と正常鼻粘膜組織における TRIM27 の Intensity score と Positive score

表 2-1 SNMM と正常鼻粘膜組織における TRIM27 の Intensity score と Positive score

Intensity score (TRIM27)

	No. of patients (%)				
	No staining (score 0)	Weak (score 1)	Moderate (score 2)	Strong (score 3)	
SNMM	0	12 (42.9)	7 (25.0)	9 (32.1)	<0.001*
Control	16 (64.0)	9 (36.0)	0	0	

Positive score (TRIM27)

	No. of patients (%)				
	Negative (score 0)	<30% (score 1)	30-59% (score 2)	≥60% (score 3)	
SNMM	0	3 (10.7)	11 (39.3)	14 (50.0)	<0.001*
Control	16 (64.0)	9 (36.0)	0	0	

*<0.05 (Fisher's exact test)

表 2-2 SNMM における TRIM27 染色の Total staining score

Total staining score (TRIM27)

	No. of patients (%)	
	Low (score ≤4)	High (score >4)
SNMM	13 (46.4)	15 (53.6)

1-3. p-Akt1

p-Akt1 は染色強度を「Intensity score」とし、0 (No staining)、1 (Weak)、2 (Moderate)、3 (Strong) の4段階で評価した。また染色された細胞の割合を「Positive score」として0 (Negative)、1 (<30%)、2 (30-59%)、3 (≥60%) の4段階で評価した (図1 1-3、表3-1)。p-Akt1 の Total staining score は、Intensity score と Positive score の積として定義した。p-Akt1 の Total staining score が4未満であればp-Akt1 低発現群、4以上であればp-Akt1 高発現群として層別化した (表3-2)。

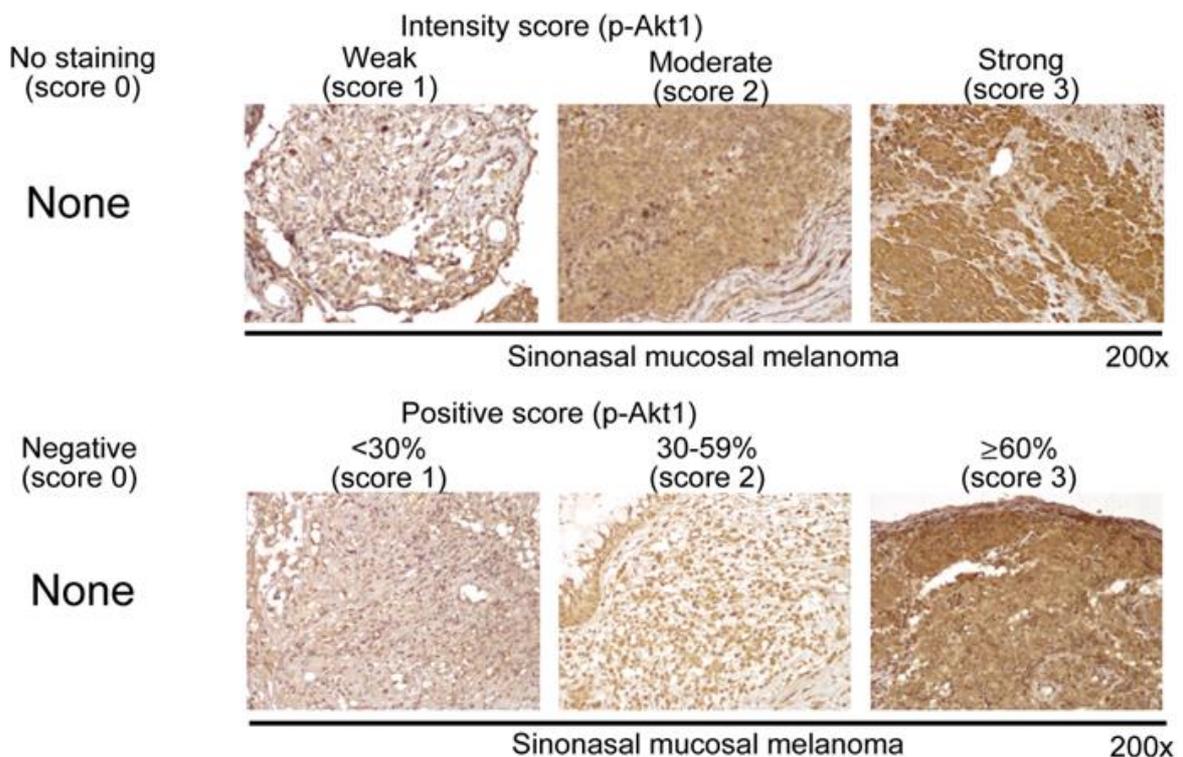


図1 1-3 SNMMにおけるp-Akt1のIntensity scoreとPositive score

表3-1 SNMMにおける p-Akt1 の Intensity score と Positive score

Intensity score (p-Akt1)	No. of patients (%)			
	No staining (score 0)	Weak (score 1)	Moderate (score 2)	Strong (score 3)
SNMM	0	9 (32.1)	12 (42.9)	7 (25.0)

Positive score (p-Akt1)	No. of patients (%)			
	Negative (score 0)	<30% (score 1)	30-59% (score 2)	≥60% (score 3)
SNMM	0	2 (7.1)	8 (28.6)	18 (64.3)

表3-2 SNMMにおける p-Akt1 染色の Total staining score

Total staining score (p-Akt1)	No. of patients (%)	
	Low (score <4)	High (score ≥4)
SNMM	9 (32.1)	19 (67.9)

1-4. Ki-67

Ki-67 は染色された細胞の割合を「Positive score」として 0 (Negative)、1 (<30%)、2 (30-59%)、3 (≥60%) の4段階で評価した (図1 1-4)。

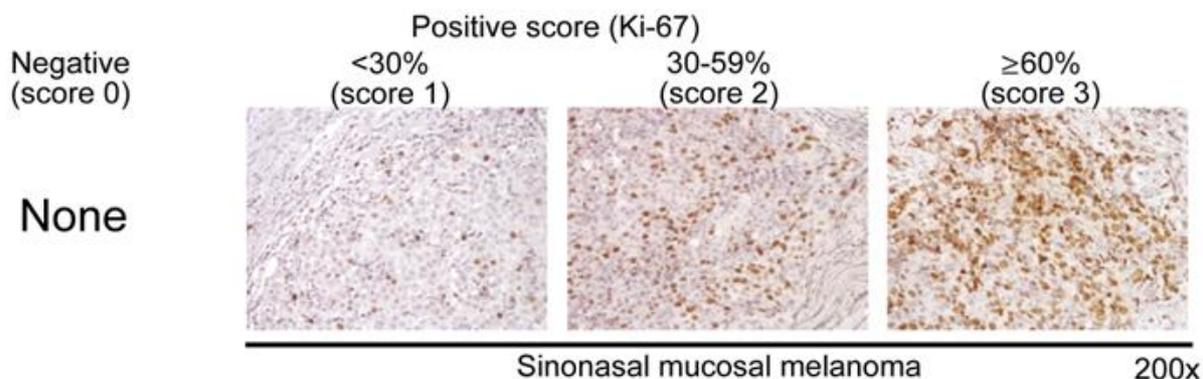


図1 1-4 SNMMにおける Ki-67 の Positive score

2-1. SNMM 患者の臨床的特徴

SNMM 患者は男性 16 名 (57.1%)、女性 12 名 (42.9%) であった。年齢の中央値は 73 歳 (範囲: 45-83 歳) であった。T 分類は T3 が 21 名 (75.0%)、T4 が 7 名 (25.0%) であった。頸部リンパ節転移を有する症例は 1 例 (3.6%) で、遠隔転移を有する症例はなかった。臨床病期は stage III が 20 例 (71.4%)、stage IV が 8 例 (28.6%) であった (表 4)。全例に手術と術後放射線治療が施行され、手術治療内容としては内視鏡下副鼻腔手術 (ESS) が 21 例 (75.0%)、外切開手術が 7 例 (25.0%) であった。頸部リンパ節転移を有する 1 例 (3.6%) には頸部郭清を行った。放射線の種類は、X線が 20 例 (71.4%)、陽子線が 8 例 (28.6%) であった。手術および術後放射線治療後に補助化学療法が行われた患者はいなかった。

2-2. TRIM27 発現と臨床病理学的背景因子の検討

SNMM と正常鼻粘膜組織で TRIM27 の免疫組織化学染色を行い、TRIM27 の発現を検討した (図 1 1-2)。SNMM は正常鼻粘膜組織に比べ、TRIM27 の Intensity score、Positive score とともに有意に高かった ($p < 0.001$) (表 2-1)。Intensity score と Positive score から Total staining score を算出したところ、15 名が TRIM27 高発現群、13 名が TRIM27 低発現群に分類された。TRIM27 発現と臨床的特徴の関連を検討したところ、TRIM27 発現は T4 で T3 より有意に高く ($p = 0.01$)、stage IV で stage III より高かった ($p = 0.04$)。一方、TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群では、性別、年齢、原発巣、頸部リンパ節転移、切除断端、放射線治療について有意差はなかった (表 4)。

表4 SNMにおける TRIM27 発現と臨床的特徴の関連性

Clinical characteristics	n (%)	TRIM27 expression		p-value
		High, n (%)	Low, n (%)	
Sex				0.28
Male	16 (57.1)	7 (25.0)	9 (32.1)	
Female	12 (42.9)	8 (28.6)	4 (14.3)	
Age (years)				1.00
≤70	11 (39.3)	6 (21.4)	5 (17.9)	
>70	17 (60.7)	9 (32.1)	8 (28.6)	
Primary tumor site				0.72
Nasal cavity	16 (57.1)	8 (28.6)	8 (28.6)	
Paranasal sinuses	12 (42.9)	7 (25.0)	5 (17.9)	
T classification				0.01*
T3	21 (75.0)	8 (28.6)	13 (46.4)	
T4	7 (25.0)	7 (25.0)	0 (0.0)	
Neck lymph node metastasis				1.00
Present	1 (3.6)	1 (3.6)	0 (0.0)	
Absent	27 (96.4)	14 (50.0)	13 (46.4)	
Clinical stage				0.04*
stage III	20 (71.4)	8 (28.6)	12 (42.9)	
stage IV	8 (28.6)	7 (25.0)	1 (3.6)	
Surgical margins				0.41
Positive	12 (42.9)	8 (28.6)	4 (14.3)	
Negative	13 (46.4)	5 (17.9)	8 (28.6)	
Non-evaluable	3 (10.7)	2 (7.1)	1 (3.6)	
Radiation therapy				0.41
X-ray	20 (71.4)	12 (42.9)	8 (28.6)	
Proton beam	8 (28.6)	3 (10.7)	5 (17.9)	

*<0.05 (Fisher's exact test)

TRIM27 High: total staining score >4, TRIM27 Low: total staining score ≤4

2-3. TRIM27 発現と全生存期間、無病生存期間の検討

全症例における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群の全生存曲線を Kaplan-Meier 法で示す (図 1 2 左)。全生存期間を比較したところ、TRIM27 高発現群が TRIM27 低発現群と比較して有意に低下していた (log-rank 検定 $p = 0.01$ 、2 年全生存率 50.3% vs. 100.0%)。また全症例における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群の無病生存曲線を Kaplan-Meier 法で示す (図 1 2 右)。無病生存期間を比較したところ、TRIM27 高発現群が TRIM27 低発現群と比較して有意に低下していた (log-rank 検定 $p = 0.02$ 、2 年無病生存率 13.3% vs. 40.7%)。

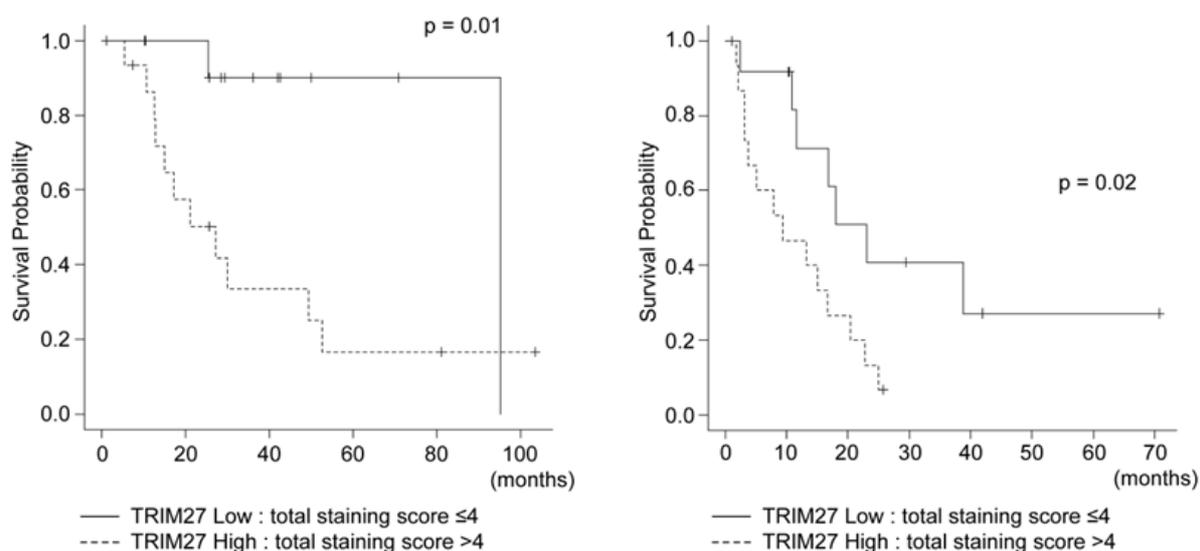


図 1 2

全生存曲線における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群との比較 (左)

無病生存曲線における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群との比較 (右)

2-4. TRIM27 発現と遠隔転移、頸部リンパ節転移の検討

全症例における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群の遠隔転移の累積発生率は、TRIM27 高発現群が TRIM27 低発現群に比べ有意に高かった ($p = 0.02$) (図 1 3 左)。一方、頸部リンパ節転移の累積発生率には、両群間に有意差は認められなかった ($p = 0.22$) (図 1 3 右)。

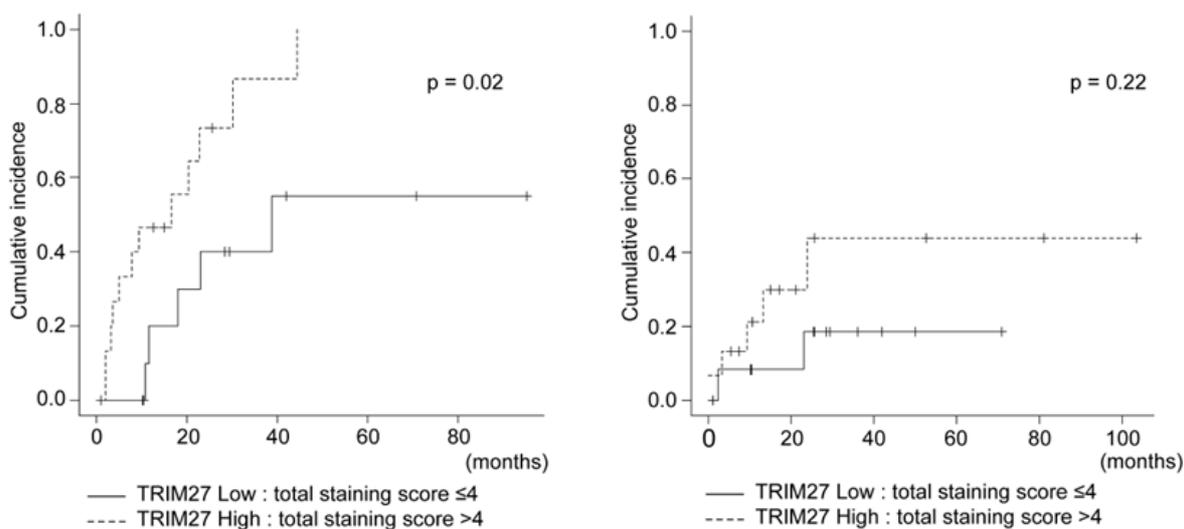


図 1 3

遠隔転移の累積発生率における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群との比較 (左)

頸部リンパ節転移の累積発生率における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群との比較 (右)

2-5. 全生存期間、無病生存期間における単変量解析、多変量解析

TRIM27 を含めた 7 つの臨床病理学的因子を用いて、全生存期間と無病生存期間に関する予後因子について解析を行った (表 5)。全生存期間の単変量解析にて有意であった因子は、T 分類、TRIM27 発現の 2 因子であった。さらに、この 2 因子を用いて多変量解析を行ったが、独立した予後不良因子はなかった。無病生存期間の単変量解析にて有意であった因子は、T 分類、頸部リンパ節転移、TRIM27 発現の 3 因子であった。さらに、この 3 因子を用いて多変量解析を行ったが、独立した予後不良因子はなかった。

表 5-1. 全生存期間、無病生存期間に対する単変量解析

Variable	全生存期間		無病生存期間	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
Sex (Male vs. Female)	0.91 (0.31-2.72)	0.87	1.09 (0.46-2.59)	0.84
Age (>70 vs. ≤70 years)	2.20 (0.67-7.19)	0.19	1.76 (0.72-4.29)	0.21
Primary tumor site (Paranasal sinuses vs. Nasal cavity)	1.42 (0.45-4.42)	0.55	1.30 (0.55-3.11)	0.55
T classification (T4 vs. T3)	6.48 (1.88-22.33)	<0.01*	4.66 (1.59-13.67)	<0.01*
Neck lymph node metastasis (Present vs. Absent)	1.91 (0.24-15.15)	0.54	25.50 (1.59-407.66)	0.02*
Surgical margins (Positive vs. Negative)	0.96 (0.30-3.05)	0.95	2.01 (0.80-5.01)	0.14
Radiation therapy (X-ray vs. Proton beam)	4.13 (0.53-32.2)	0.18	1.69 (0.61-4.68)	0.32
TRIM27 expression (High vs. Low)	5.48 (1.21-24.84)	0.03*	2.90 (1.10-7.62)	0.03*
Ki-67 expression (High vs. Low)	6.64 (0.86-51.47)	0.07	2.39 (0.86-6.61)	0.09
p-Akt1 expression (High vs. Low)	7.83 (1.01-60.55)	0.05	1.55 (0.59-4.09)	0.38

HR; hazard ratio, CI; confidence interval

TRIM27 High: total staining score >4, TRIM27 Low: total staining score ≤4

Ki-67 High: positive score 2-3, Ki-67 Low: positive score 0-1

p-Akt1 High: total staining score ≥4, p-Akt1 Low: total staining score <4

表 5-2. 全生存期間、無病生存期間に対する多変量解析

Variable	OS		DFS	
	HR (95% CI)	p-value	HR (95% CI)	p-value
T classification (T4 vs. T3)	3.78 (0.92-15.50)	0.06	2.85 (0.84-9.73)	0.09
TRIM27 expression (High vs. Low)	2.84 (0.50-15.95)	0.24	2.01 (0.67-5.99)	0.21
Neck lymph node metastasis (Present vs. Absent)			10.73 (0.64-179.11)	0.10

3-1. p-Akt1 の発現

SNMMにおけるp-Akt1のIntensity scoreでは、9名(32.1%)がWeak(スコア1)、12名(42.9%)がModerate(スコア2)、7名(25.0%)がStrong(スコア3)であった。SNMMにおけるp-Akt1のPositive scoreは、<30%(スコア1)が2名(7.1%)、30-59%(スコア2)が8名(28.6%)、≥60%(スコア3)が18名(64.3%)であった(表3-1)。p-Akt1をIntensity scoreとPositive scoreの積であるTotal staining scoreで分類すると、19名(67.9%)がp-Akt1高発現群に、9名(32.1%)がp-Akt1低発現群に分類された(表3-2)。その結果、p-Akt1のTotal staining scoreはTRIM27高発現群がTRIM27低発現群に比べ有意に高かった(6.73 ± 2.12 vs 3.38 ± 1.98, p < 0.01)。また、TRIM27のTotal staining scoreとp-Akt1のTotal staining scoreについて線形回帰分析を行ったところ、正の相関を認めた(p < 0.0001, R² = 0.50)(図14-1)。

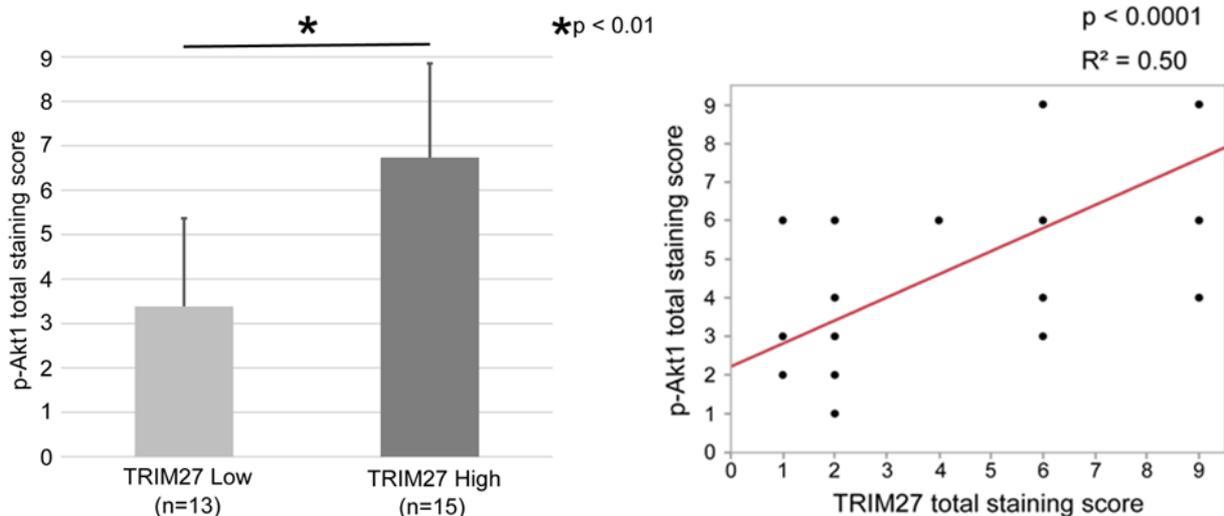


図14-1

p-Akt1 total staining score における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群との比較 (左)

p-Akt1 total staining score と TRIM27 total staining score との線形回帰分析 (右)

3-2. Ki-67 の発現

SNMM における Ki-67 の Positive score は、<30% (スコア 1) が 12 例 (42.9%)、30-59% (スコア 2) が 10 例 (35.7%)、 $\geq 60\%$ (スコア 3) が 6 例 (21.4%) であった。Ki-67 Positive score は、TRIM27 高発現群が TRIM27 低発現群に比べ有意に高かった (2.33 ± 0.62 vs 1.38 ± 0.51 , $p < 0.01$)。また、TRIM27 の Total staining score と Ki-67 の Positive score について線形回帰分析を行ったところ、正の相関を認めた ($p < 0.0001$, $R^2 = 0.55$) (図 1 4-2)。

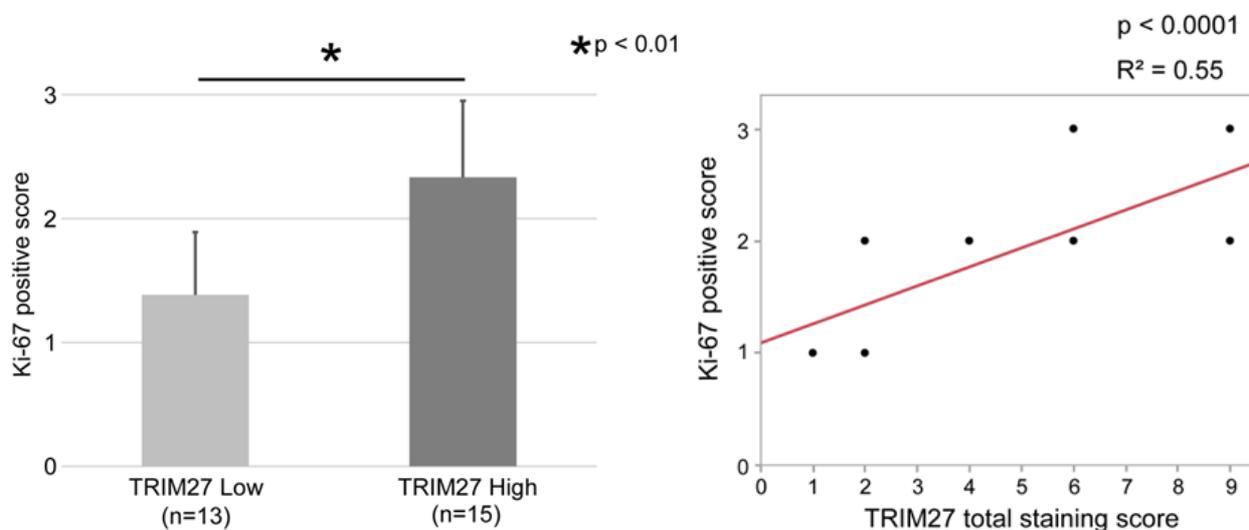


図 1 4-2

Ki-67 positive score における TRIM27 高発現群と TRIM27 低発現群との比較 (左)

Ki-67 positive score と TRIM27 total staining score との線形回帰分析 (右)

《考察》

本研究により、SNMMにおいて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予後不良であることが明らかになった。また、TRIM27の発現とT分類は、全生存期間と無病生存期間の両方の単変量解析において有意な関連を認めた。これらの知見は、TRIM27がSNMMの予後因子となる可能性を示唆している。TRIM27高発現群における予後不良は、食道がん、胃がん、大腸がん、肺がん、乳がん、腎がん、卵巣がん、皮膚悪性黒色腫（メラノーマ）などいくつかのがんの他の研究(Liu et al., 2020; Ma et al., 2019; Ma et al., 2016; Xia et al., 2020; Xiao et al., 2021; Xing et al., 2020; Yao et al., 2020; Zhang et al., 2018)と同様の傾向を示している。さらに、TRIM27はSNMMに関連する遠隔転移の累積発生率と有意な相関があることが明らかになった。SNMMでは遠隔転移の割合が高いことが報告されており(Roth et al., 2010)、SNMMにおける遠隔転移に起因する死亡率が高いことも報告されている(Kumar et al., 2009)。

またSNMM組織において、TRIM27発現は腫瘍増殖能のマーカーであるKi-67と同様にT分類および臨床病期と正の相関がある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。TRIM27は他のがんにおいても細胞増殖に関与していることが報告されている。卵巣がんではTRIM27のノックダウンにより腫瘍形成が抑制され(Ma et al., 2016)、大腸がんではTRIM27がアポトーシスの抑制と細胞周期の制御により細胞増殖が促進し、細胞遊走・浸潤にも関与する(Liu et al., 2020)。TRIM27発現と細胞増殖との関与については、今後頭頸部がんの細胞株を用いた実験による検証も重要であると考えられる。

また本研究では、TRIM27はp-Akt1と正の相関があった。食道がん、膵がん、卵巣がん、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(Ke et al., 2015; Ramaswamy et al., 2012; Sharma et al., 2015; Wei and Xu, 2011)と報告されていることから、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る。さらに、乳がん、胃がん、食道がんでは、p-Akt1の核発現が予後不良と密接に関連しており(Cao et al., 2017; Liu et al., 2012)、大腸がんや肺がんなどのいくつかの悪性腫瘍では、Akt1が転移の発生に関与していることが報告されている(Agarwal et al., 2013; Yu et al., 2015)。また、Akt1は細胞遊走と浸潤を促進することや(Chen et al., 2014; Franks et al., 2016; Shen et al., 2014; Wu et al., 2014; Yang et al., 2009)、細胞周期進行の酸化還元調節との関連が報告されている(Antico Arciuch et al., 2009)。胃がんにおいてShhシグナルがAktを活性化することで悪性腫瘍の転移へ影響を及ぼし(Yoo et al., 2011)、卵巣がん細胞において

TRIM27 のノックダウンにより p-AKT 発現を低下させることで細胞周期停止とアポトーシスを誘導することから (Liu et al., 2020; Ma et al., 2016)、TRIM27 は SNMM において shh シグナルを介した Akt1 の活性化によって細胞増殖および細胞遊走・浸潤に影響を与えている可能性がある。

なお、悪性黒色腫における一次繊毛形成や Shh シグナル伝達経路の関与については、皮膚悪性黒色腫における Shh シグナル伝達経路の関与が報告されている (Stecca et al., 2007)。また、皮膚悪性黒色腫で一次繊毛が低形成であることが指摘されているが (Kim et al., 2011)、髄芽腫や腓がんなどで一次繊毛の形成が抑制された状態でも Shh シグナルが異常活性化を示し発がんへ関与する報告も確認されており (Hassounah et al., 2012)、一次繊毛形成が低形成であっても悪性黒色腫において Shh シグナル伝達経路が発がんに関与している可能性がある。SNMM については希少癌のため報告が乏しくデータベースによる検証は困難であったが、皮膚悪性黒色腫において The Cancer Genome Atlas Program のデータベースでは Shh シグナル伝達経路の制御因子である BBS 遺伝子の変異は登録されていなかった。今後、SNMM における一次繊毛形成や Shh シグナル伝達経路に関する検討を行うことも重要であると考えられる。

本研究の限界として、本研究は IHC による TRIM27 発現を中心に解析しており、TRIM27 発現と SNMM の予後との関連は示唆されたが、今後、悪性腫瘍の細胞株を用いた実験によって腫瘍の増殖能や遊走能の評価が重要となる点が挙げられる。また、SNMM は希少癌であるため本研究で検討した症例数は 28 例と限られていたが、今後さらに症例数を増やして検討を行うことや多施設共同研究によって SNMM の TRIM27 発現や予後解析を行うことも重要であると考えられる。SNMM における全生存期間、無病生存期間において単変量解析で有意差を認めた因子についてそれぞれ多変量解析を行ったところ有意な因子はみられなかった。その理由として、SNMM が希少癌であり症例数が少ないことや T 分類と TRIM27 が交絡関係にある点などが考えられた。また、今回は原発腫瘍の手術摘出検体を用いた評価であったため、腫瘍増殖に伴う TRIM27 発現の経時的変化は評価できなかったが、これまでに卵巣がんや胃がんにおいて TRIM27 による細胞増殖への関与が報告されており (Ma et al., 2016; Yao et al., 2020)、今後、頭頸部がんの細胞株を用いた実験によっても細胞増殖に伴う TRIM27 発現の経時的変化の評価も重要であると考えられた。

最後に、SNMM における新たなバイオマーカーとして TRIM27 が寄与する可能性について述べる。診療上の課題として、皮膚悪性黒色腫が BRAF 遺伝子変異を対象とした分子標的治療や免疫療法の拡充により予後が改善されている一方で、SNMM は根治治療後においても遠隔転移を来し亡くなる症例が多く、依然として予後不良である現状が挙げられる。本研究結果では SNMM において TRIM27 発現が根治治療後の遠隔転移発生率と正の相関を示しており、TRIM27 が SNMM の遠隔転移の予測因子あるいは、根治

治療後に補助化学療法を追加する指標として利用できる可能性を示唆している。さらに、TRIM27 は予後因子としてだけでなく、SNMM の新規治療法開発におけるターゲットとして作用する可能性がある。現時点で TRIM27 阻害薬として承認されているものはないが、今後 In vitro、In vivo において TRIM27 の機能を抑制することで抗腫瘍効果が得られた場合、TRIM27 阻害は有望な創薬標的となる可能性がある。また、第1章にて TRIM27 が Shh シグナル伝達経路の制御に関与している可能性が示されており、今後 SNMM における TRIM27 や Shh シグナルの関与や分子メカニズムを解明することで、SNMM についても Shh シグナル阻害薬を臨床応用できる可能性も秘めている。

総括および結論

本研究全体から得られた新知見

- TRIM27 は、抗 FLAG 抗体による免疫沈降とウエスタンブロット解析にて BBS2、BBS4、BBS5、BBS7、BBS8 との細胞内における特異的な結合を認め、VIP assay にて BBS4 と BBS18 に強い相互作用を認めた。
- TRIM27 が BBS4 をはじめとした特定のサブユニットを介して Shh シグナル制御因子である BBSome と特異的結合することが予想される。
- 一次繊毛での Shh シグナルにおいて、TRIM27 が Smo の局在変化と *Gli1*、*Ptch1* の上昇に関与していることが分かった。すなわち、TRIM27 が Smo の局在変化を制御することによって Shh シグナル制御へ関与している可能性が示唆された。
- SNMM において TRIM27 高発現群は、T 分類、臨床病期、Ki-67、p-Akt1 との関連を認めた。これらの結果より TRIM27 が SNMM の細胞増殖に関与し、さらに p-Akt1 を介して制御している可能性も示唆された。
- SNMM において TRIM27 高発現群は、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。これらの結果より TRIM27 が SNMM の予後予測因子ならびに根治治療後の遠隔転移の予測因子となり得る。

新知見の意義

今回の新知見の意義は、TRIM27 が BBSome への結合や Smo の局在変化を介して Shh シグナル制御を行っている可能性を新たに見出した点である。Shh シグナルは発がんメカニズムに関与しており、これまで TRIM27 が BBSome を介して Shh シグナル制御へ関与しているとの報告はなく、発がんにおける TRIM27 の新たな役割を見出した。

また、TRIM27 が SNMM の予後予測因子ならびに根治治療後の遠隔転移の予測因子として有用なバイオマーカーである可能性が示されたことも大きな意義がある。

今後の研究展開と課題

本研究により導かれた結果に基づいて、TRIM27 の実臨床への応用や TRIM27 発現のメカニズムの解明のため、以下の研究展開を検討している。

- ① TRIM27 が SNMM 以外の頭頸部がんの臨床経過に関与していることを明らかにすべく、免疫組織化学染色法と Real-time-qPCR により咽喉頭扁平上皮がんや嗅神経芽細胞腫などについても TRIM27 の発現量を解析し、TRIM27 発現と臨床経過（局所再発、頸部リンパ節転移、遠隔転移など）や予後について統計学的に解析を行う。
- ② TRIM27 が Shh シグナル制御因子のユビキチン化を行っているか解明すべく、BBSome 構成因子を中心に Shh シグナル制御因子について細胞内ユビキチン化アッセイを行う。
- ③ TRIM27 と直接結合する BBSome の特定のサブユニットと結合ドメインを同定し構造解析を行う。本研究で明らかになった特異的結合の知見を基に、TRIM27 と BBSome 構成因子のリコンビナントタンパク質を作製し、試験管内で1対1の結合実験を行うことで直接結合する因子を決定する。また、TRIM27 および当該因子について変異体を作製して結合ドメインを決定し、得られた知見を基に TRIM27 と構成因子の共結晶構造解析を行い、創薬標的となる構造学的知見を得る。

【謝辞】

本研究で使用したVIPアッセイに必要なプラスミドや免疫沈降用の抗体ビーズなどを分与して下さった京都大学 薬学研究科 薬科学専攻生体情報薬学講座 教授 中山和久先生、講師 加藤洋平先生にお礼申し上げます。

本研究を遂行し学位論文をまとめるにあたり、北海道大学大学院医学研究院 生理系部門生化学分野 医化学教室 教授 畠山鎮次先生、同 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室 教授 本間明宏先生より多くのご支援とご指導を賜りました。ここに深くお礼申し上げます。また、基礎研究に必要な実験手法や理論に関しまして大変丁寧にご指導を戴きました北海道大学大学院医学研究院 生理系部門生化学分野 医化学教室 講師 渡部昌先生、助教 近藤豪先生を始めとする同教室員の皆様、臨床研究に関しましてご指導ご教授して下さいました北海道大学大学院医学研究院 耳鼻咽喉科・頭頸部外科学教室 准教授 中丸裕爾先生、助教 鈴木正宣先生を始めとする同教室員の皆様にも重ねてお礼申し上げます。

最後に、私の研究を応援し、支えてくれた家族に心より感謝申し上げます。

【利益相反】

本研究に関して、開示すべき利益相反はない。

引用文献

- Agarwal, E., Brattain, M.G., and Chowdhury, S. (2013). Cell survival and metastasis regulation by Akt signaling in colorectal cancer. *Cell Signal* *25*, 1711-1719.
- Antico Arciuch, V.G., Galli, S., Franco, M.C., Lam, P.Y., Cadenas, E., Carreras, M.C., and Poderoso, J.J. (2009). Akt1 intramitochondrial cycling is a crucial step in the redox modulation of cell cycle progression. *PLoS One* *4*, e7523.
- Bangs, F., and Anderson, K.V. (2017). Primary Cilia and Mammalian Hedgehog Signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *9*.
- Cao, F., Zhang, C., Han, W., Gao, X.J., Ma, J., Hu, Y.W., Gu, X., Ding, H.Z., Zhu, L.X., and Liu, Q. (2017). p-Akt as a potential poor prognostic factor for gastric cancer: a systematic review and meta-analysis. *Oncotarget* *8*, 59878-59888.
- Carpenter, R.L., and Ray, H. (2019). Safety and Tolerability of Sonic Hedgehog Pathway Inhibitors in Cancer. *Drug Saf* *42*, 263-279.
- Chen, L., Kang, Q.H., Chen, Y., Zhang, Y.H., Li, Q., Xie, S.Q., and Wang, C.J. (2014). Distinct roles of Akt1 in regulating proliferation, migration and invasion in HepG2 and HCT 116 cells. *Oncol Rep* *31*, 737-744.
- Franks, S.E., Briaire, R., Jones, R.A., and Moorehead, R.A. (2016). Unique roles of Akt1 and Akt2 in IGF-IR mediated lung tumorigenesis. *Oncotarget* *7*, 3297-3316.
- Gal, T.J., Silver, N., and Huang, B. (2011). Demographics and treatment trends in sinonasal mucosal melanoma. *Laryngoscope* *121*, 2026-2033.
- Hassounah, N.B., Bunch, T.A., and McDermott, K.M. (2012). Molecular pathways: the role of primary cilia in cancer progression and therapeutics with a focus on Hedgehog signaling. *Clin Cancer Res* *18*, 2429-2435.
- Hatakeyama, S. (2011). TRIM proteins and cancer. *Nat Rev Cancer* *11*, 792-804.
- Hatakeyama, S. (2017). TRIM Family Proteins: Roles in Autophagy, Immunity, and Carcinogenesis. *Trends Biochem Sci* *42*, 297-311.
- Huang, N., Sun, X., Li, P., Liu, X., Zhang, X., Chen, Q., and Xin, H. (2022). TRIM family contribute to tumorigenesis, cancer development, and drug resistance. *Exp Hematol Oncol* *11*, 75.
- Jiang, J. (2022). Hedgehog signaling mechanism and role in cancer. *Semin Cancer Biol* *85*, 107-122.
- Kasahara, K., and Inagaki, M. (2021). Primary ciliary signaling: links with the cell cycle.

Trends Cell Biol *31*, 954-964.

Ke, Z., Caiping, S., Qing, Z., and Xiaojing, W. (2015). Sonic hedgehog-Gli1 signals promote epithelial-mesenchymal transition in ovarian cancer by mediating PI3K/AKT pathway. *Med Oncol* *32*, 368.

Kim, J., Dabiri, S., and Seeley, E.S. (2011). Primary cilium depletion typifies cutaneous melanoma in situ and malignant melanoma. *PLoS One* *6*, e27410.

Konuthula, N., Khan, M.N., Parasher, A., Del Signore, A., Genden, E.M., Govindaraj, S., and Iloreta, A.M. (2017). The presentation and outcomes of mucosal melanoma in 695 patients. *Int Forum Allergy Rhinol* *7*, 99-105.

Kumar, S., Gupta, A.K., Yadav, B.S., and Ghoshal, S. (2009). Primary sinonasal malignant melanoma: a clinicopathologic and prognostic study. *Ear Nose Throat J* *88*, 1269-1272.

Kwon, Y.T., and Ciechanover, A. (2017). The Ubiquitin Code in the Ubiquitin-Proteasome System and Autophagy. *Trends Biochem Sci* *42*, 873-886.

Liu, J., Wei, X.L., Huang, W.H., Chen, C.F., Bai, J.W., and Zhang, G.J. (2012). Cytoplasmic Skp2 expression is associated with p-Akt1 and predicts poor prognosis in human breast carcinomas. *PLoS One* *7*, e52675.

Liu, P., and Lechtreck, K.F. (2018). The Bardet-Biedl syndrome protein complex is an adapter expanding the cargo range of intraflagellar transport trains for ciliary export. *Proc Natl Acad Sci U S A* *115*, E934-e943.

Liu, S., Tian, Y., Zheng, Y., Cheng, Y., Zhang, D., Jiang, J., and Li, S. (2020). TRIM27 acts as an oncogene and regulates cell proliferation and metastasis in non-small cell lung cancer through SIX3- β -catenin signaling. *Aging (Albany NY)* *12*, 25564-25580.

Ly, B., Stuck, M.W., Desai, P.B., Cabrera, O.A., and Pazour, G.J. (2021). E3 ubiquitin ligase Wwp1 regulates ciliary dynamics of the Hedgehog receptor Smoothed. *J Cell Biol* *220*.

Ma, L., Yao, N., Chen, P., and Zhuang, Z. (2019). TRIM27 promotes the development of esophagus cancer via regulating PTEN/AKT signaling pathway. *Cancer Cell Int* *19*, 283.

Ma, Y., Wei, Z., Bast, R.C., Jr., Wang, Z., Li, Y., Gao, M., Liu, Y., Wang, X., Guo, C., Zhang, L., *et al.* (2016). Downregulation of TRIM27 expression inhibits the proliferation of ovarian cancer cells in vitro and in vivo. *Lab Invest* *96*, 37-48.

Micale, L., Chaignat, E., Fusco, C., Reymond, A., and Merla, G. (2012). The tripartite motif: structure and function. *Adv Exp Med Biol* *770*, 11-25.

Morreale, F.E., and Walden, H. (2016). Types of Ubiquitin Ligases. *Cell* *165*, 248-248.e241.

Moya-Plana, A., Mangin, D., Derclé, L., Taouachi, R., Casiraghi, O., Ammari, S., Nguyen,

- F., Temam, S., Robert, C., and Gorphe, P. (2019). Risk-based stratification in head and neck mucosal melanoma. *Oral Oncol* *97*, 44-49.
- Novas, R., Cardenas-Rodriguez, M., Irigoín, F., and Badano, J.L. (2015). Bardet-Biedl syndrome: Is it only cilia dysfunction? *FEBS Lett* *589*, 3479-3491.
- Ozato, K., Shin, D.M., Chang, T.H., and Morse, H.C., 3rd (2008). TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* *8*, 849-860.
- Ramaswamy, B., Lu, Y., Teng, K.Y., Nuovo, G., Li, X., Shapiro, C.L., and Majumder, S. (2012). Hedgehog signaling is a novel therapeutic target in tamoxifen-resistant breast cancer aberrantly activated by PI3K/AKT pathway. *Cancer Res* *72*, 5048-5059.
- Roth, T.N., Gengler, C., Huber, G.F., and Holzmann, D. (2010). Outcome of sinonasal melanoma: clinical experience and review of the literature. *Head Neck* *32*, 1385-1392.
- Schou, K.B., Pedersen, L.B., and Christensen, S.T. (2015). Ins and outs of GPCR signaling in primary cilia. *EMBO Rep* *16*, 1099-1113.
- Sharma, N., Nanta, R., Sharma, J., Gunewardena, S., Singh, K.P., Shankar, S., and Srivastava, R.K. (2015). PI3K/AKT/mTOR and sonic hedgehog pathways cooperate together to inhibit human pancreatic cancer stem cell characteristics and tumor growth. *Oncotarget* *6*, 32039-32060.
- Shen, G., Rong, X., Zhao, J., Yang, X., Li, H., Jiang, H., Zhou, Q., Ji, T., Huang, S., Zhang, J., *et al.* (2014). MicroRNA-105 suppresses cell proliferation and inhibits PI3K/AKT signaling in human hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* *35*, 2748-2755.
- Siegel, R., DeSantis, C., Virgo, K., Stein, K., Mariotto, A., Smith, T., Cooper, D., Gansler, T., Lerro, C., Fedewa, S., *et al.* (2012). Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin* *62*, 220-241.
- Skoda, A.M., Simovic, D., Karin, V., Kardum, V., Vranic, S., and Serman, L. (2018). The role of the Hedgehog signaling pathway in cancer: A comprehensive review. *Bosn J Basic Med Sci* *18*, 8-20.
- Soares, C., Melo de Lima Morais, T., Carlos, R., Mariano, F.V., Altemani, A., Freire de Carvalho, M.G., Corrêa, M.B., Dias Dos Reis, R.R., Amorim, L.S., Paes de Almeida, O., *et al.* (2018). Phosphorylated Akt1 expression is associated with poor prognosis in cutaneous, oral and sinonasal melanomas. *Oncotarget* *9*, 37291-37304.
- Stecca, B., Mas, C., Clement, V., Zbinden, M., Correa, R., Piguët, V., Beermann, F., and Ruiz i Altaba, A. (2007). Melanomas require HEDGEHOG-GLI signaling regulated by interactions between GLI1 and the RAS-MEK/AKT pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A* *104*, 5895-5900.
- Swatek, K.N., and Komander, D. (2016). Ubiquitin modifications. *Cell Res* *26*, 399-422.

Takahashi, M., and Cooper, G.M. (1987). ret transforming gene encodes a fusion protein homologous to tyrosine kinases. *Mol Cell Biol* 7, 1378-1385.

Takahashi, M., Inaguma, Y., Hiai, H., and Hirose, F. (1988). Developmentally regulated expression of a human "finger"-containing gene encoded by the 5' half of the ret transforming gene. *Mol Cell Biol* 8, 1853-1856.

Troussier, I., Baglin, A.C., Marcy, P.Y., Even, C., Moya-Plana, A., Krenkli, M., and Thariat, J. (2015). [Mucosal melanomas of the head and neck: State of the art and current controversies]. *Bull Cancer* 102, 559-567.

Wei, L., and Xu, Z. (2011). Cross-signaling among phosphoinositide-3 kinase, mitogen-activated protein kinase and sonic hedgehog pathways exists in esophageal cancer. *Int J Cancer* 129, 275-284.

Wingfield, J.L., Lechtreck, K.F., and Lorentzen, E. (2018). Trafficking of ciliary membrane proteins by the intraflagellar transport/BBSome machinery. *Essays Biochem* 62, 753-763.

Wu, Y., Kim, J., Elshimali, Y., Sarkissyan, M., and Vadgama, J.V. (2014). Activation of Akt1 accelerates carcinogen-induced tumorigenesis in mammary gland of virgin and post-lactating transgenic mice. *BMC Cancer* 14, 266.

Xia, Y., Zhao, J., and Yang, C. (2020). Identification of key genes and pathways for melanoma in the TRIM family. *Cancer Med* 9, 8989-9005.

Xiao, C., Zhang, W., Hua, M., Chen, H., Yang, B., Wang, Y., and Yang, Q. (2021). TRIM27 interacts with Ikba to promote the growth of human renal cancer cells through regulating the NF- κ B pathway. *BMC Cancer* 21, 841.

Xing, L., Tang, X., Wu, K., Huang, X., Yi, Y., and Huan, J. (2020). TRIM27 Functions as a Novel Oncogene in Non-Triple-Negative Breast Cancer by Blocking Cellular Senescence through p21 Ubiquitination. *Mol Ther Nucleic Acids* 22, 910-923.

Yang, L., Xiao, L., Ma, X., Tang, M., Weng, X., Chen, X., Sun, L., and Cao, Y. (2009). Effect of DNazymes targeting Akt1 on cell proliferation and apoptosis in nasopharyngeal carcinoma. *Cancer Biol Ther* 8, 366-371.

Yao, Y., Liu, Z., Cao, Y., Guo, H., Jiang, B., Deng, J., and Xiong, J. (2020). Downregulation of TRIM27 suppresses gastric cancer cell proliferation via inhibition of the Hippo-BIRC5 pathway. *Pathol Res Pract* 216, 153048.

Yoo, Y.A., Kang, M.H., Lee, H.J., Kim, B.H., Park, J.K., Kim, H.K., Kim, J.S., and Oh, S.C. (2011). Sonic hedgehog pathway promotes metastasis and lymphangiogenesis via activation of Akt, EMT, and MMP-9 pathway in gastric cancer. *Cancer Res* 71, 7061-7070.

Yu, C., Rao, D., Wang, T., Song, J., Zhang, L., and Huang, W. (2022). Emerging roles of TRIM27 in cancer and other human diseases. *Front Cell Dev Biol* 10, 1004429.

- Yu, S.H., Zhang, C.L., Dong, F.S., and Zhang, Y.M. (2015). miR-99a suppresses the metastasis of human non-small cell lung cancer cells by targeting AKT1 signaling pathway. *J Cell Biochem* *116*, 268-276.
- Zebary, A., Jangard, M., Omholt, K., Ragnarsson-Olding, B., and Hansson, J. (2013). KIT, NRAS and BRAF mutations in sinonasal mucosal melanoma: a study of 56 cases. *Br J Cancer* *109*, 559-564.
- Zhang, Y., Feng, Y., Ji, D., Wang, Q., Qian, W., Wang, S., Zhang, Z., Ji, B., Zhang, C., Sun, Y., *et al.* (2018). TRIM27 functions as an oncogene by activating epithelial-mesenchymal transition and p-AKT in colorectal cancer. *Int J Oncol* *53*, 620-632.
- Zhuang, X.J., Tang, W.H., Feng, X., Liu, C.Y., Zhu, J.L., Yan, J., Liu, D.F., Liu, P., and Qiao, J. (2016). Trim27 interacts with Slx2, is associated with meiotic processes during spermatogenesis. *Cell Cycle* *15*, 2576-2584.