

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18858

研究課題名(和文)脳腫瘍におけるアルギニンメチル化酵素の役割

研究課題名(英文)The role of protein arginine methyltransferase (PRMT) in brain tumor

研究代表者

日吉 裕美(Hiyoshi, Hiromi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10406530

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：アルギニンメチル化酵素(PRMT)の中でもPRMT8は脳特異的に発現していることが知られているが、神経膠腫由来の培養細胞においてPRMT8の発現は検出されなかった。そこで、神経膠腫由来培養細胞にPRMT8を過剰に発現させたところ、細胞増殖を抑制した。しかし、PRMTの主作用であるタンパク質へのアルギニンメチル化に変化は認められなかった。次に、PRMT8の過剰発現時における癌細胞の増殖に関わるタンパク質の発現を調べたところ、細胞周期の進行に重要なRbタンパク質の発現が減少することを見出した。以上の結果より、PRMT8が新規メカニズムにより脳腫瘍細胞の増殖を抑制する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：It is known that the protein arginine methyltransferase (PRMT) 8 is a brain-specific member of the PRMT family. But, PRMT8 was not detected in glioma cell lines. We tried to over-express of PRMT8 in glioma cells. Over-expression of PRMT8 suppressed cell proliferation in glioma cell lines. There was no change in arginine methylation of protein, although it is the main action of PRMT family. Therefore, we investigated the expression of protein involved cancer cell proliferation. The level of Rb protein, key factor of cell cycle, was decreased in glioma cells over-expressed with PRMT8. These results suggest that PRMT8 inhibits the cell proliferation of brain tumor by novel mechanism.

研究分野：細胞分子生物学

キーワード：脳腫瘍 アルギニンメチル化酵素 細胞周期

1. 研究開始当初の背景

(1) 脳腫瘍は頭蓋骨の内部に生じる腫瘍であり、その部位で生じた原発性脳腫瘍と、体内の他の部位のがんが転移してきた転移性腫瘍とに分けられる。神経膠腫(グリオーマ)は、脳神経細胞(ニューロン)を支持する神経膠細胞(グリア)から発生する悪性腫瘍であり、原発性脳腫瘍の30-40%を占める。一般的に、脳実質内に発生した腫瘍は悪性で脳内に浸潤性発育をするため、正常脳との境界が明確でなく、手術で全部摘出することは困難である。そのため、通常は再発を予防する目的で術後の放射線療法や化学療法などが必要となる。ガンマナイフ(定位的放射線治療装置)等の普及により、脳腫瘍において放射線療法は広く行われているが、グリオーマは放射線感受性が一般的に低いと考えられている。また、化学療法については、一部の脳腫瘍(小児の腫瘍やリンパ腫など)を除いて、決定的に効くと言える薬剤はない。

(2) 哺乳類のタンパク質アルギニンメチル基転移酵素(PRMT)は、S-アデノシルメチオニン(SAM)をメチル基供与体として、アルギニン側鎖の δ -グアニジノ基に存在する ω -窒素原子にメチル基の導入を触媒し、モノメチル化を経て非対称性または対称性ジメチル化を起こす。PRMTはヒトでは11個のファミリーから構成されており、シグナル伝達やRNAのプロセッシング、転写制御、DNA修復など、細胞機能の制御に広く関与している(Bedford and Clarke, Mol. Cell 2009)。また、PRMTファミリーは発現の時期や組織、基質が異なる固有の特異性を持つことも知られている。その中でも、PRMT8は脳内に特異的に発現しており、ファミリーの中でも唯一細胞膜上に局在するというユニークな特徴を持っている

(3) 近年、乳がんや肺がん、前立腺がん、大腸がん等、様々ながんにおいてPRMTの発現や酵素活性が亢進しているとの知見が相次ぎ、がん治療に対する新たなターゲットとして注目されている(Yang and Bedford, Nat. Rev. Cancer 2013)。しかしながら、報告のほとんどは過剰発現したPRMTによる基質タンパク質のメチル化亢進ががんの増悪に寄与していることを示すものであり、がんにおけるPRMTの発現や活性の制御メカニズムについては全く明らかにされていない。さらに、現在までにPRMT8とがんとの関連についての報告はなく、他のPRMTにおいても脳腫瘍との関連性は報告されていない。

2. 研究の目的

申請者の所属する研究グループでは、寿命やストレス応答におけるアルギニンメチル化酵素(PRMT)の修飾制御の重要性を証明

してきた(Mol. Cell 2008, PNAS 2011, Cell Metab. 2011)。近年、様々な癌においてPRMTの過剰発現が報告され、新たな治療戦略のターゲットとして注目されつつあるが、その発現制御メカニズムや意義については不明である。そこで本研究では、脳腫瘍におけるPRMTの役割を解明することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 脳腫瘍患者におけるPRMT8の発現；脳腫瘍におけるPRMT8の発現について、臨床データはほとんど発表されていない。そこでまず、データベースを用いて、脳腫瘍におけるPRMT8の発現と様々な因子との相関関係について検討した。PRMT8の発現と脳腫瘍の悪性度が相関しているかについては、癌遺伝子の発現プロファイルを扱ったデータベースであるOncoPrintを用いて調べた。また、脳腫瘍患者の生存率や予後とPRMT8の発現パターンに相関が見られるかについて、Prognoscanデータベースを用いて解析した。

(2) 各種脳腫瘍培養細胞におけるPRMT8の発現；神経膠腫(グリオーマ)は、星細胞腫(アストロサイトーマ)と乏突起膠腫(オリゴデンドログリオーマ)に分類され、最も悪性な腫瘍は膠芽腫(グリオブラストーマ)である。グリオーマの中でも種類または悪性度によってPRMT8の発現に差があるか検討した。遺伝子発現は定量的リアルタイムPCR法、タンパク質発現はウェスタンブロット法を用いて検討した。

(3) PRMT8の発現制御が脳腫瘍培養細胞に与える影響；PRMT8の強制発現はPRMT8の発現プラスミドを細胞に導入することにより行った。脳腫瘍細胞においてPRMT8の発現制御を行うことにより、細胞増殖にどのような影響が見られるか検討した。増殖に対する影響は、細胞数をカウントすることにより評価した。

(4) PRMT8過剰発現によるタンパク質メチル化の変化；PRMT8のメチル化標的タンパク質としては、他のPRMTファミリー同様、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質が予想された。脳腫瘍培養細胞を用いて、PRMT8の強制発現によるタンパク質のメチル化状態の変化を検討した。ヒストンのメチル化は特異的なメチル化抗体を用いたウェスタンブロット法により検出した。また、非ヒストンタンパク質のメチル化は対称型ジメチルアルギニン(SDMA)、非対称型ジメチルアルギニン(ADMA)、モノメチルアルギニン(MMA)量をモニターすることにより検討した。

(5) 脳腫瘍培養細胞におけるPRMT8の標的

タンパク質の同定; PRMT8 の標的タンパク質についてさらに詳細に検討するため、癌細胞の増殖に関わる抗体が 10 数種類のっている抗体アレイを用いて検討を行った。コントロール細胞と PRMT8 過剰発現細胞で発現に差が検出されたタンパク質については、ウェスタンブロット法により確認を行った。

4. 研究成果

(1)脳腫瘍の悪性度と PRMT8 発現の相関について、Oncomine データベースを用いて解析を行ったところ、脳腫瘍の悪性度が高いと PRMT8 の発現が低いという解析結果が得られた。また、Prognoscan データベースより、PRMT8 の発現が低いほど生存率が低く、予後が悪いという解析結果も得られた。

(2)ヒト星細胞種 (アストロサイトーマ) である U251MG 細胞、ヒト神経膠芽腫 (グリオブラストーマ) である A-172 細胞および T98G 細胞を用いて、脳特異的に発現している PRMT である PRMT8 の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法により検討した。これまでの知見通り、ヒト正常脳組織において PRMT8 mRNA の発現が認められた。一方、神経膠腫細胞株である U251MG、A-172、T98G いずれの培養細胞においても、PRMT8 mRNA の発現は認められなかった。これは、Oncomine を用いた解析結果と矛盾しない結果であった。また、タンパク質レベルでの PRMT8 の発現を検討するため、ウェスタンブロット法を行った。その結果、mRNA の発現同様、ヒト正常脳組織では発現が確認されたが、神経膠腫細胞株である U251MG、A-172、T98G いずれの培養細胞においても、その発現は検出できないレベルであった。

(3)脳腫瘍培養細胞において、PRMT8 の発現が負に調節されていることが示唆されたことから、脳腫瘍培養細胞に PRMT8 を過剰に発現させた際に、どのような変化が起こるか検討した。その結果、PRMT8 過剰発現細胞では、細胞増殖の抑制が認められた。

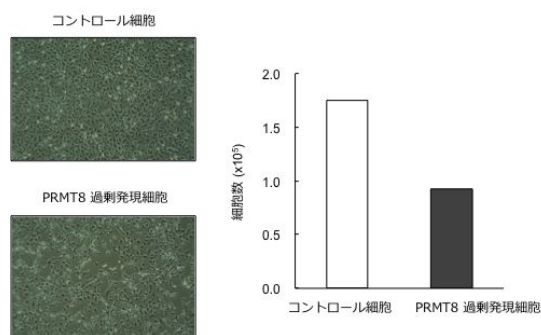


図 1. PRMT8 過剰発現による脳腫瘍培養細胞の増殖抑制

(4) PRMT8 の強制発現によるタンパク質のメチル化状態を検討するため、コントロール細胞と PRMT8 過剰発現細胞における SDMA、ADMA、MMA 量の比較をウェスタンブロット法により行った。予想に反して、PRMT8 過剰発現細胞において SDMA、ADMA、MMA 量に変化は認められなかった。また、ヒストン H3 においてメチル化が報告されている 2 番目と 8 番目のアルギニンに対するメチル化抗体を用いてウェスタンブロット法を行ったが、こちらも PRMT8 過剰発現による変化は認められなかった。この結果から、PRMT8 による細胞増殖抑制は、ヒストンおよび非ヒストンタンパク質のメチル化といった従来知られている PRMT8 の作用を介していない可能性が示唆された。

(5) 脳腫瘍培養細胞における PRMT8 の標的タンパク質を、癌細胞の増殖に関わるタンパク質に絞り、さらに検討を行った。抗体アレイを用いて、コントロール細胞と PRMT8 過剰発現細胞において発現に差が認められるタンパク質を検討した。PRMT8 を過剰発現した脳腫瘍培養細胞において、細胞周期の進行に重要な役割を果たしている Rb タンパクのリン酸化が劇的に低下していた。この PRMT8 過剰発現による Rb タンパクのリン酸化低下は、ウェスタンブロット法によっても確認できた。さらに詳細に検討を行ったところ、PRMT8 過剰発現によって Rb タンパク自体の発現が減少していることが明らかになった。以上の結果より、PRMT8 が脳腫瘍細胞において Rb タンパク質の発現を抑制した結果、リン酸化 Rb タンパク質の量を減少させ、G1 期から S 期への細胞周期の進行を遅らせることにより、PRMT8 は脳腫瘍細胞の増殖を抑制することが示唆された。これは、これまで知られていた作用とは全く異なる新たな PRMT の作用の可能性を示すものである。

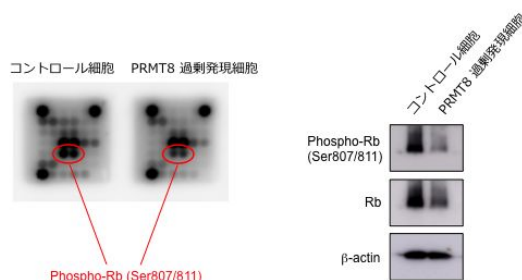


図 2. PRMT8 過剰発現による Rb タンパク発現の低下

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 4 件)

Maekawa M, Tanigawa K, Sakaue T, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Watanabe Y, Taguchi T, Higashiyama S. Cullin-3 and

its adaptor protein ANKFY1 determine the surface level of integrin $\alpha 1$ in endothelial cells. *Biol. Open*. 査読あり、6: 1707-1719 (2017)
doi: 10.1242/bio.029579

Sakaue T, Fujisaki A, Nakayama H, Maekawa M, Hiyoshi H, Kubota E, Joh T, Izutani H, Higashiyama S. Neddylated Cullin 3 is required for vascular endothelial-cadherin-mediated endothelial barrier function. *Cancer Sci.* 査読あり、108: 208-215 (2017)
doi: 10.1111/cas.13133

Kurozumi S, Yamaguchi Y, Hayashi S, Hiyoshi H, Suda T, Gohn T, Matsumoto H, Takei H, Horiguchi J, Takeyoshi I, Oyama T, Kurosumi M. Prognostic value of the ubiquitin ligase carboxyl terminus of the Hsc70-interacting protein in postmenopausal breast cancer. *Cancer Med.* 査読あり、5: 1873-82 (2016)
doi: 10.1002/cam4.780

Tsuchiya M, Nakajima Y, Waku T, Hiyoshi H, Morishita T, Furumai R, Hayashi Y, Kishimoto H, Kimura K, Yanagisawa J. CHIP buffers heterogeneous Bcl-2 expression levels to prevent augmentation of anticancer drug-resistant cell population. *Oncogene.* 査読あり、34: 4656-63 (2015)
doi: 10.1038/onc.2014.387

6. 研究組織

(1) 研究代表者

日吉 裕美 (HIYOSHI, Hiromi)

名古屋市立大学・大学院医学研究科・助教

研究者番号：10406530