

令和 2 年 6 月 22 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10867

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍におけるRNAメチル化の制御機構とその役割の解明

研究課題名(英文) Regulatory system of RNA methylation in malignant brain tumors

研究代表者

上羽 哲也 (Ueba, Tetsuya)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・教授

研究者番号：00314203

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫や神経膠腫におけるRNAのシトシンメチル化の修飾に関しては、概ね未知の領域にある。本課題では、星細胞系腫瘍におけるRNAのメチル化(5-mC)の分布の把握とそれを制御する因子の探索を目的とした。膠芽腫において、DNAのシトシン脱メチル化酵素TET遺伝子がRNAのメチル化にも関与することを明らかにした。膠芽腫や星細胞系腫瘍組織において、5-mC量は変動した。また、このメチル化の制御に関わり、細胞増殖にも影響を与えている遺伝子を同定した。さらに、膠芽腫幹細胞におけるTET3の細胞分化制御への関与も考えられた。本研究は、悪性脳腫瘍とRNA修飾の異常制御の関わりを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

DNAのエピジェネティックな修飾に関する研究は精力的に行われているが、RNAの修飾に関しては限られている。RNAのシトシンメチル化が転写後のRNAの寿命や翻訳効率に関わる可能性が示唆されているが、生物学的意義は十分に検討されていない。本研究において、脳腫瘍におけるRNAメチル化量の異常が検出されたことは、RNAの修飾が脳の機能に限局せず、細胞のがん形質や発がんに関与する可能性を示唆している。がん幹細胞を用いて検討することで、RNA修飾の膠芽腫における本質的な機能を見出すことが出来た。将来的には、極めて予後の悪い膠芽腫に対する新規治療に有用なRNA標的分子の同定が期待可能である。

研究成果の概要(英文)：Current knowledge of RNA cytosine methylation is still poor in malignant glioma. In this study, we aimed the investigation of methylation level in RNA and the search for the regulatory genes. DNA demethylase TET genes were involved with regulation of RNA methylation in glioblastoma. Alteration of RNA methylation levels were observed in glioblastoma and oligodendroglioma tissues. Several genes were identified that regulated RNA methylation and affected cell proliferation. Furthermore, it was suggested that TET3 may play a role for regulation of cell differentiation in glioblastoma. This study shows linkage of malignant brain tumor and aberration of RNA modification.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 RNA修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

細胞内では RNA 転写後の修飾が頻繁に生じている。これまでの RNA 修飾の研究は tRNA や rRNA の修飾に関するものが殆どであったが、近年、ハイスループット技術の発展もあり、mRNA における 5-mC(5-methylcytosine)や 6-mA(6-methyladenine)の分布や程度も解析可能になった。RNA 修飾の役割としては、RNA の安定性や機能に関わることが報告されている。しかしながら、RNA 修飾は様々な疾患との関連性が予測されているにも関わらず報告は極めて限られている。

膠芽腫は、予後不良の原発性脳腫瘍であり、既存の治療法では完治や飛躍的な治療効果は期待が出来ない。膠芽腫を対象とした研究分野では、がんゲノムが解読され、各種オミックスも精力的に解析されているが、包括的に治療標的となる因子や分子を同定するためには、これらのデータを基盤とした新たな概念の創出が必要である。近年、発がんに関するドライバー遺伝子である IDH1/2 に変異を示す膠芽腫の多くは、トランスクリプトーム解析で 4 つに分類されるサブタイプのうち Proneural タイプに属し、メチローム解析により特徴的なエピジェネティックな状態を示す G-CIMP(Glioma-CpG Island Methylator Phenotype)に陽性を示す頻度が高いことが報告されている。一つの遺伝子の異常が細胞全体の生命現象に影響を与えている格好の例であり、腫瘍の発生を考える上でも重要である。

DNA の脱メチル化機構は 5-mC が TET1(Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 1)により 5-hmC(5-hydroxymethylcytosine)にヒドロキシル化され、細胞分裂を経るか、5-fC(5-formylcytosine)や 5-caC(5-carboxylcytosine)に変換後、塩基除去修復(BER)を受けることで結果的に脱メチル化される。IDH1/2 に変異を示す腫瘍は、発がん性代謝産物 2-HG(2-hydroxyglutarate)を産生する。2-HG は TET1 を抑制することで 5-mC は脱メチル化されずに集積し、高度にそれが進むと G-CIMP を誘導する。最近の報告では、5-hmC は他の組織と比較して脳組織で含有量が多いことが示されたことから神経系の細胞において重要な役割を担っていると考えられている。

最近、膠芽腫の一部でゲノムの 5-hmC 含量が顕著に多く、幹細胞の増殖や腫瘍の形成には TET1 が必要であることが報告された。また、腎がん細胞株 HEK293 では TET1-3(TETs)は DNA に限らず mRNA の 5-mC をヒドロキシル化することが示されている。これらのことから、IDH1/2 に変異をもつ膠芽腫は、mRNA 修飾に異常を来している可能性が高く、この腫瘍における RNA の機能や代謝を検討するために有用な系であると考えた。また、TETs に依存しない RNA のヒドロキシメチル化機構もあることから特に正常 IDH/2 をもつ腫瘍と RNA 修飾の関連性についても検討が必要である。

2. 研究の目的

星細胞系腫瘍における RNA のメチル化(5-mC)の定量、分布とそれを制御する因子を探索することを目的とする。膠芽腫や神経膠腫の幹細胞の未分化状態の維持や分化を制御する RNA メチル化に関わる因子を同定する。

3. 研究の方法

膠芽腫と神経膠腫細胞の細胞株と手術摘出組織から樹立した初代培養細胞の幹細胞株を用いた。ヒト teratocarcinoma と膠芽腫の細胞株に G-CIMP を誘導する IDH1/2 の変異体が生成する 2-HG の細胞透過性の類似体(2R)-Octyl-2-HG を添加し、細胞増殖と RNA のメチル化に与える影響を WST-8 試験と 5-C メチル化測定 Elisa キットを用いて検討した。また、正常及び脳腫瘍組織から RNA 抽出を行い、同様に RNA のメチル化レベルについて検討し

た。各腫瘍は病理組織像による分類に加え、MLPA を用いた IDH1/2 の変異や 1p19q の共欠失をゲノタイピングによりそれらの分類を確認した。

神経膠腫において、細胞増殖の制御に関わる RNA メチル化制御遺伝子を探索するために、siRNA ライブラリーを用いた候補遺伝子のノックダウンにより発現抑制し、細胞増殖に影響を及ぼす遺伝子を WST-8 試験により探索した。また、ノックダウン細胞において RNA メチル化レベルを 5-C メチル化測定 Elisa キットを用いて測定した。膠芽腫幹細胞とそれらの分化細胞において、TET1-3 をノックダウンにより阻害し、RNA メチル化の定量と細胞分化における TETs の機能を検討した。細胞分化レベルは、5 日間の分化誘導後、免疫細胞染色による Nestin と GFAP の発現頻度の定量化により検討した。

4 . 研究成果

TETs は、IDH1/2 変異腫瘍が生成する 2-HG の標的分子であり、この分子により抑制される。ヒト teratocarcinoma 細胞株 NTERA-2(NT-2)と膠芽腫の細胞株 U87MG に(2R)-Octyl-2-HG を添加し、細胞増殖に対する影響を検討した。NT-2 では細胞増殖に影響を与えなかったが、U87MG では細胞増殖が抑制された。この試験における RNA のメチル化(5-mC)量は、NT-2、U87MG 両細胞株においてそれぞれ最大で 2.7、14.9 倍増加した。この結果は、2-HG が細胞種を問わず RNA の 5-mC を増加させることと膠芽腫細胞において細胞増殖を抑制することを示唆している。

次に、正常脳組織及び脳腫瘍組織における 5-mC 量を定量した。膠芽腫では、正常脳と比較してメチル化が増加している腫瘍が 4/7 で検出された。IDH1 に変異がある乏突起膠腫 2 検体では、メチル化が増加していた。これらの膠芽腫検体は全て野生型 IDH を有していることから、IDH 変異の有無に関わらず RNA の 5-mC に異常を示す場合があることが分かった。また、乏突起膠腫では検体数が少ないながらも予想通りに 5-mC が増加していたことは、腫瘍組織においても IDH 変異が RNA のメチル化を増加させることが示唆された。

siRNA を用いたノックダウンにより、膠芽腫における RNA メチル化に関連する遺伝子を探索した。まず、膠芽腫細胞株 T98G と SNB19 において、これらの候補遺伝子のノックダウンによる細胞増殖に対する影響を検討した。ノックダウンにより細胞増殖の抑制を示した遺伝子は、Nsun2、XPC、HNRNPA2B1、HNRNPC、NSUN4、METTL14 であった。逆に、増殖を亢進させた遺伝子は殆どなかった。T98G 細胞の siRNA によるノックダウン細胞において、5-mC を定量した。5-mC 量は WTAP と YTHDF1 のノックダウン細胞において増加、HNRNPC、HNRNPA2B1、FL20628、METTL14、LOC728029、DDB1 のノックダウン細胞において減少した。これらの結果から、特に HNRNPA2B1、HNRNPC の 2 遺伝子は RNA のシトシンメチル化に関与し、細胞増殖に制御に関わっていることが示唆された。さらに、膠芽腫細胞 SNB19 の幹細胞において、HNRNPC のノックダウンがメチル化を増加させた。このことから、細胞種や細胞分化レベルによって RNA メチル化の制御機構が異なる可能性が考えられた。

次に TETs が RNA メチル化や細胞分化における機能を検討した。SNB19 と U87MG 細胞とそれらの幹細胞を多く含む Tumor sphere(TS)に 3 つの膠芽腫患者組織から初代培養細胞した TS において、TET1-3 をノックダウンした。全ての細胞ではないが TET2 と TET3 のノックダウンにより細胞の増殖抑制が観察された。5-mC 量は細胞株と TS では大きな差は観察されなかった。TET2 のノックダウンにより、一部の細胞で 5-mC 量が増加

する傾向がみられたが普遍性は見いだせなかった。また、膠芽腫患者組織から初代培養細胞した TS を分化誘導した細胞において、TET3 のノックダウンにより Nestin の単独陽性率が対照の 6.6% から 43.6% に増加し、GFAP 単独陽性率が 63.9% から 11.3% に減少することが観察された。この結果は、膠芽腫細胞において TET3 が細胞分化の制御に関わっていることを強く示唆している。

本課題において 2-HG が RNA のシトシンメチル化を制御していることが明らかとなった。しかしながら、5-hmC 量を測定していないので、実際に 5-mC が TETs により 5-hmC に変換されるのを阻害したために蓄積しているかどうかを示せていない。RNA における 5-hmC の機能は十分に検討されていないが、RNA の代謝に 5-mC と共に大きく関連すると考えられる。また、この RNA 修飾の制御が神経膠腫において異常を来している可能性が示唆された。DNA の 5-hmC は、記憶や学習といった脳機能において重要であることが示唆されているが、RNA 修飾の脳疾患における役割も重要である可能性が高い。TET1 と TET3 は、それぞれ幹細胞と分化細胞で発現が多いことが知られている。本研究において TET3 の発現抑制が細胞増殖と細胞分化を抑制したことは、膠芽腫幹細胞の非対称分裂の制御にこの分子が関与していることを示唆している。本研究で siRNA を用いた短期間での実験で効果が得られたことは、DNA に限局せず、RNA においても核酸の修飾が今後の研究の重要な標的であることを示している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Higashi Y, Shimizu T, Yamamoto M, Tanaka K, Yawata T, Shimizu S, Zou S, Ueba T, Yuri K, Saito M.	4. 巻 175
2. 論文標題 Stimulation of brain nicotinic acetylcholine receptors activates adrenomedullary outflow via brain inducible NO synthase-mediated S-nitrosylation.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Br J Pharmacol.	6. 最初と最後の頁 3758-3772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bph.14445	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Aratake T, Higashi Y, Ueba Y, Hamada T, Shimizu T, Shimizu S, Yawata T, Ueba T, Saito M.	4. 巻 10
2. 論文標題 The inhibitory role of intracellular free zinc in the regulation of Arg-1 expression in interleukin-4-induced activation of M2 microglia.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Metallomics	6. 最初と最後の頁 1501-1509
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1039/c8mt00248g	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ueba Y, Aratake T, Onodera KI, Higashi Y, Hamada T, Shimizu T, Shimizu S, Yawata T, Nakamura R, Akizawa T, Ueba T, Saito M.	4. 巻 507
2. 論文標題 Attenuation of zinc-enhanced inflammatory M1 phenotype of microglia by peridinin protects against short-term spatial-memory impairment following cerebral ischemia in mice.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Biochem Biophys Res Commun	6. 最初と最後の頁 476-483
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2018.11.067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Narita Y, Arakawa Y, Yamasaki F, Nishikawa R, Aoki T, Kanamori M, Nagane M, Kumabe T, Hirose Y, Ichikawa T, Kobayashi H, Fujimaki T, Goto H, Takeshima H, Ueba T, Abe H, Tamiya T, Sonoda Y, Natsume A, Kakuma T, Sugita Y, Komatsu N, Yamada A, Sasada T, Matsueda S, Shichijo S, Itoh K, Terasaki M.	4. 巻 21
2. 論文標題 A randomized, double-blind, phase III trial of personalized peptide vaccination for recurrent glioblastoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Neuro Oncol.	6. 最初と最後の頁 348-359
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/noy200	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Yawata Toshio, Higashi Youichiro, Kawanishi Yu, Nakajo Takahito, Fukui Naoki, Fukuda Hitoshi, Ueba Tetsuya	4. 巻 144
2. 論文標題 CD146 is highly expressed in glioma stem cells and acts as a cell cycle regulator	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 21 ~ 32
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03200-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Taniuchi Keisuke, Yawata Toshio, Tsuboi Makiko, Ueba Tetsuya, Saibara Toshiji	4. 巻 10
2. 論文標題 Efficient delivery of small interfering RNAs targeting particular mRNAs into pancreatic cancer cells inhibits invasiveness and metastasis of pancreatic tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 2869 ~ 2886
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.26880	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Iwasa Hitomi, Murata Yoriko, Nishimori Miki, Miyatake Kana, Tadokoro Michiko, Kohsaki Shino, Nogami Munenobu, Ueba Yusuke, Ueba Tetsuya, Yamagami Takuji	4. 巻 36
2. 論文標題 Remote effects in the ipsilateral thalamus and/or contralateral cerebellar hemisphere using FDG PET in patients with brain tumors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Japanese Journal of Radiology	6. 最初と最後の頁 303 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11604-018-0721-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Naoki Fukui, Toshio Yawata, Takahito Nakajo, Yu Kawanishi, Youichirou Higashi, Tatsuyuki Yamashita, Takaaki Aratake, Koichi Honke, Tetsuya Ueba.	4. 巻 印刷中
2. 論文標題 Targeting CD146 using folic acid conjugated nanoparticles suppresses tumor growth in a mouse glioma model	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 印刷中
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 八幡俊男、福井直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 マウス脳腫瘍モデルにおけるナノ粒子を用いたsiRNAのデリバリーによる治療効果
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 八幡俊男、福井直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 マウス脳腫瘍モデルにおける葉酸を結合したキトサンナノ粒子を用いたCD146に対する siRNAのデリバリーによる治療効果
3. 学会等名 第18回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 福井直樹、八幡俊男、川西 裕、福田 仁、上羽佑亮、門田知倫、野中大伸、濱田史泰、帆足 裕、金子昌憲、細川雄慎、道上 怜奈、中居永一、中城登仁、上羽哲也
2. 発表標題 マウスグリオーマ脳腫瘍モデルに対してナノ粒子を用いた siRNA のデリバリーによる治療効果の検討
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 福井直樹、八幡俊男、川西 裕、福田 仁、上羽佑亮、門田知倫、野中大伸、濱田史泰、帆足 裕、金子昌憲、細川雄慎、道上 怜奈、中居永一、中城登仁、上羽哲也
2. 発表標題 マウスグリオーマ脳腫瘍モデルに対してナノ粒子を用いたsiRNAのデリバリーによる治療効果の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 八幡俊男、福井直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146を標的とした治療法の開発
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 直樹、八幡 俊男、上羽 佑亮、川西 裕、門田 知倫、木田 波斗、松岡 溪太、山崎 大智、道上 怜奈、濱田 史泰、野中 大 伸、中居 永一、岡田 憲二、福田 仁、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146の治療標的としての有用性の検討
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 福井 直樹、八幡 俊男、川西 裕、福田 仁、門田 知倫、岡田 憲二、濱田 史泰、道上 玲奈、木田 波斗、松岡 溪太、山崎 大智、野中 大伸、中居 永一、中城 登仁、上羽 哲也
2. 発表標題 膠芽腫幹細胞で高発現するCD146の治療標的としての有用性の検討
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川西 裕、宇高 恵子、八幡 俊男、中居 永一、福田 仁、福井 直樹、上羽 哲也
2. 発表標題 初発悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 川西 裕, 宇高 恵子, 土肥 俊, 八幡 俊男, 中居 永一, 福田 仁, 福井 直樹, 上羽 哲也
2. 発表標題 初発悪性神経膠腫に対するWT1-W10免疫療法
3. 学会等名 第23回日本がん免疫学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八幡 俊男 (YAWATA TOSHIO) (40380323)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	
研究分担者	川西 裕 (KAWANISHI YU) (90527582)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教 (16401)	