

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：17102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2020

課題番号：19K23891

研究課題名（和文）RNAのアセチル化に着目したグリオブラストーム幹細胞性の制御機構

研究課題名（英文）Elucidation of the mechanism of glioblastoma stemness based on acetylated RNA

研究代表者

鶴田 朗人（Tsuruta, Akito）

九州大学・薬学研究院・学術研究員

研究者番号：40847745

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究ではRNAアセチル化を担うNAT10に着目した解析により、NAT10によるグリオブラストーム幹細胞性の制御について明らかにした。またデータベースを用いたヒトグリオブラストーム患者の予後解析からもNAT10の発現と予後に相関が認められたことから、グリオブラストーム患者においても実際に同様の機構で幹細胞性が制御されていることも推察される。これまでに、NAT10を介したRNAのアセチル化に関する研究例は少なく、RNAアセチル化による、生理機能や病態の制御メカニズム解析の発展にも寄与する可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオブラストームは発症頻度の高い頭蓋内腫瘍のひとつであり、再発性が高く、患者の余命も1年半程度と極めて短い。これまでに、網羅的な解析法などでグリオブラストームの悪性化因子の探索が行われているが、その同定に至っていない。本研究では網羅的解析法では検出できずに見過ごされてきたmRNAのアセチル化に着目して解析を行ったところ、mRNAのアセチル化を担う酵素であるNAT10がグリオブラストームの幹細胞性（がん患者の予後を決定する性質のひとつ）を制御することが明らかになった。本研究を足がかりに、他の疾患におけるRNAアセチル化破綻による病態制御解明につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, we revealed the regulatory mechanism of glioblastoma stem cell by NAT10 focusing on NAT10, which is responsible for RNA acetylation. The Meta-analysis of the prognostic value of human glioblastoma patients using a database showed a correlation between NAT10 expression and survival time, it is inferred that stem cell properties are actually regulated by the same mechanism in glioblastoma patients. There have been few studies about RNA acetylation caused by NAT10, and this study may contribute to the understanding of pathology.

研究分野：腫瘍学

キーワード：グリオブラストーム がん幹細胞 RNAアセチル化

1. 研究開始当初の背景

一般に、腫瘍は不均一な細胞集団によって形成され、各集団で腫瘍の悪性度への寄与も異なると考えられている。なかでも「がん幹細胞」は高い増殖能と耐性を有し、増殖・転移・再発などにおいて中心的な役割を担っている。そのため、がんを根治するには幹細胞の根絶が重要となるが、がん幹細胞は化学療法剤や放射線照射などに対しても高い抵抗性を示し、その治療法の開発には試行錯誤が続けられている。頭蓋内腫瘍のうち最も発症頻度の高いグリオブラストーマは「最悪の悪性腫瘍」と言われ、ほとんどの患者で再発し、平均余命も約1年半と極めて短い。この原因として、グリオブラストーマの高い幹細胞性が指摘されており、幹細胞を標的とした治療が効果的であることが基礎実験レベルで検証されている (Xiuxing, et al., Cell Stem Cell, 2018)。近年、グリオブラストーマの幹細胞性の高さの原因を探るために、次世代シーケンスやゲノムワイド関連解析 (GWAS) などの網羅的解析が進められているが、その原因は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

申請者はこれまでに、NAT10 機能の阻害によりグリオブラストーマの悪性度が低下することを見出している。本酵素が次世代シーケンスや GWAS 解析では検出することのできない「RNA 修飾 (アセチル化)」を介してグリオブラストーマの幹細胞性維持に関与しているのではないかと考えた。そこで本研究では、「RNA アセチル化のグリオブラストーマ幹細胞性維持における役割」を解明することを目的として、幹細胞中の NAT10 に着目し、その機能と治療標的としての可能性について検討を行う。

3. 研究の方法

(1) NAT10 ノックアウト U251 MG 細胞の作製

NAT10 ノックアウトのノックアウトには CRISPR/Cas9 システムを用いた。gRNA は過去に用いられている配列を用いた (Daniel, et al., Cell 2018)。エレクトロポレーション法を用いて Cas9-sgRNA 複合体をトランスフェクトし、限界希釈法を用いてシングルセルを単離し、その後の解析に用いた。ノックアウトの確認はウエスタンブロット法を用いてタンパクの消失を確認することにより行った。

(2) 軟寒天コロニー形成アッセイ

下層に 0.75% の軟寒天を敷き、その上に細胞を懸濁した 0.36% 軟寒天を重層することにより、スフェロイドを形成させた。スフェロイド形成能は Hoechst 33342 を用いて細胞核を染色し、青色蛍光を観察することによって評価した。蛍光シグナルの観察には Keyence BZ-X800 を用いた。

(3) グリオブラストーマ移植モデルマウスの作製

実験に用いたマウスはいずれも明暗周期 (明期 7:00~19:00, 暗期 19:00~7:00)、自由摂食・摂水環境下で飼育した。U251 MG 細胞の移植には 5 週齢、雄性の Balb/c nude マウス (重度免疫不全マウス) を用いた。PBS に懸濁した各種 U251 MG 細胞をマウスの皮下または頭蓋内に移植した。頭蓋内では、Bregma から側方に 2 mm、前方に 1 mm の部位にドリルを用いて穴を開け移植した。

(4) RNA immunoprecipitation assay (RIP-assay)

レンチウイルスを用いて NAT10 を過剰発現させた U251 MG 細胞から核分画を抽出し、抗 NAT10 抗体で免疫沈降することで NAT10 結合 mRNA の回収した。回収した RNA は精製後、逆転写し qRT-PCR で測定した。

(5) 統計解析

他軍艦比較には分散分析および Post-hoc テストには Tukey-kramer 法を用いた。2 群間の比較には T テストを用い、有意水準は 5% とした。

4. 研究成果

(1) スフェロイド形成能に及ぼす NAT10 ノックアウトの影響解析

NAT10 ノックアウト細胞を作製するために gRNA の設計を行った。NAT10 は転写サイトの違いによって 5 種類の mRNA が転写される。そのため、すべての mRNA が標的となる Exon5 を標的とした gRNA を設計し、NAT10 ノックアウト細胞を作製した。ウエスタンブロット法を用いて NAT10 ノックアウトについて確認を行った。また、Dot Blot 法を用いてアセチル化 RNA 量について評価を行った結果、NAT10 ノックアウトによって RNA のアセチル化が抑制されることが明らかになった。この細胞を用いて以降の評価を行った。

まず、2 次元細胞培養法およびアガロース包埋による 3 次元細胞培養法を用いて細胞増殖能およびスフェロイド形成能の評価を行った。2 次元細胞培養では NAT10 KO 細胞および非変異細胞

間に大きな差異は認められなかったが、3次元培養法ではスフェロイド形成能に優位な差異が認められた。この結果から、細胞増殖能ではなくがん幹細胞性が異なっていることが示唆された。

がん幹細胞性の制御は転写因子などの細胞内因子のみならず、細胞外に分泌されている液性因子によっても制御される。そこで、NAT10によって制御される因子が内的因子か液性因子などの外的因子が明らかにするために、非変異U251 MG細胞(緑色蛍光タンパク質(GFP)で標識)およびNAT10ノックアウトU251 MG細胞(赤色蛍光タンパク質(RFP)で標識)を共培養して、スフェロイド形成能を評価した。本培養条件下では、同じシャーレ内で非変異U251 MG細胞とNAT10ノックアウトU251 MG細胞を培養しているため、細胞外部の環境は統一されているため、内部因子のみの影響が解析できる。そこで本培養方法で共培養を行った結果、共培養した場合においても非変異細胞と比較してNAT10ノックアウト細胞においてスフェロイド形成能が低下した。以上の結果から、NAT10ノックアウトによって細胞内因子の変容を介してがん幹細胞性が低下することが示唆された。

(2)浸潤能に及ぼすNAT10ノックアウトの影響解析

がん幹細胞は一般的に高い浸潤能を有することが知られている。グリオブラストーマにおいても同様に高い浸潤能を有することが知られている。NAT10がグリオブラストーマの幹細胞性を制御していることが示唆されたことから、NAT10のノックアウトによってグリオブラストーマ細胞の浸潤能が低下することが予想された。そこで、グリオブラストーマのコラーゲン層への侵入能力を測定することで、グリオブラストーマ細胞の浸潤能を計測した。その結果非変異U251 MG細胞と比較してNAT10ノックアウトU251 MG細胞においてコラーゲン層への侵入能力は低下していた。また、グリオブラストーマの組織への浸潤に関わることが知られている遺伝子について、RT-qPCR法およびウエスタンブロット法を用いて発現量を測定した結果、浸潤関連遺伝子の発現が低下していることが明らかになった。グリオブラストーマはがん細胞の中でも特に高い浸潤能を有しており、その高い浸潤能がその悪性度の根源とも考えられている。そのため、NAT10ノックアウトによって浸潤能が大きく低下したことは、NAT10阻害がグリオブラストーマの悪性度を低減させることを示唆しており、治療への応用も可能であることが考えられる。

(3)薬剤抵抗性に及ぼすNAT10ノックアウトの影響

グリオブラストーマ患者の治療法は他の臓器由来のがんと比較して進歩に乏しい。そのため現在でも古典的な治療法である、放射線治療やアルキル化剤であるテモゾロミドが第一選択として用いられている。しかし、テモゾロミドに対してもグリオブラストーマ幹細胞は抵抗性を示すことが明らかにされており、これはがん幹細胞においてテモゾロミドによってアルキル化されたDNAを修復する酵素であるO6-メチルグアニン-DNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)が高発現することが指摘されている。そのため、NAT10ノックアウトによってがん幹細胞性が低下したU251 MG細胞においてMGMT遺伝子の発現量が低下していると考え、mRNA発現量を測定した結果、予想通りMGMTの発現量は著しく低下した。そこで、非変異U251 MG細胞およびNAT10ノックアウト細胞に対してテモゾロミドを曝露し、テモゾロミド抵抗性に及ぼすNAT10ノックアウトの影響について評価を行った結果、NAT10ノックアウトによってテモゾロミドに対する抵抗性が低下することが明らかになった。以上の結果からNAT10ノックアウトによって幹細胞性が低下することにより、MGMTの発現量が低下し、テモゾロミドに対する抵抗性も低下することが示唆された。

(4)ヒトグリオブラストーマ患者のデータベースを用いた解析

マウスを用いたin vivoの実験からもNAT10がグリオブラストーマ幹細胞を制御し、その悪性度を制御していることが示唆されている。そこで、実際にグリオブラストーマ患者においてもNAT10が悪性度を制御しているか否か調べるために、がん患者のビッグデータが集約されているThe Cancer Genome Atlas (TCGA)データベースを用いて、生存期間とNAT10の発現量および、非グリオブラストーマ脳組織とグリオブラストーマ組織のNAT10発現量について解析した。その結果、NAT10と生存期間には相関が認められ、NAT10が高発現しているグリオブラストーマ患者において予後が悪いことが示唆された。さらに、グリオブラストーマ組織では非グリオブラストーマ脳組織と比較して、NAT10発現量が高値を示すことが示唆された。以上から、ヒトにおいてもNAT10はグリオブラストーマの悪性度を制御する可能性が示された。NAT10は脳組織において発現量が高値を示すことが知られているが、グリオブラストーマ組織では非病変脳組織よりも発現量が高いため、治療の標的としても有用であることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------