

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17554

研究課題名（和文）肝芽腫の新規標的ADAM32の制御とPrecision Medicineへの応用

研究課題名（英文）Regulation of novel molecular target ADAM32 in hepatoblastoma and its application to precision medicine

研究代表者

深澤 賢宏（Fukazawa, Takahiro）

広島大学・自然科学研究支援開発センター・研究員

研究者番号：80734285

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：肝芽腫は治療成績が向上してきているが、未だに難治な症例もあり、治療後の晩期障害も大きな問題である。我々はこれまでにADAM32が肝芽腫細胞において特異的に高発現してがん遺伝子の役割を担っており、分子標的となる可能性を示してきた。本研究ではADAM32の制御機構に関して、固形がんの微小環境である低酸素に着目して解析を行った。そして、上流分子IGF2BP2がADAM32 mRNA発現に重要な役割を担っていることが明らかとなった。また、データベースの解析からADAM32を制御する分子としてHarminを見出し、肝芽腫に対して制がん作用を持つことを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝芽腫に対してより治療効果が高く副作用の少ない分子標的治療法開発が望まれているが未だ開発されていない。肝芽腫における新規分子標的候補ADAM32に対する制御分子としてIGF2BP2を見出した。また、肝芽腫に対して制がん作用を持つ化合物としてHarminを見出した。これらADAM32制御を可能とする分子、化合物を発見し、肝芽腫制御の新たな可能性を示した本研究は、肝芽腫における新規治療法開発に貢献すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Treatment results for hepatoblastoma have improved, but there are still some intractable cases, and late effects after treatment are also a big problem. We have previously shown that ADAM32 is specifically highly expressed in hepatoblastoma cells and plays a role as an oncogene, suggesting its potential as a molecular target. In this study, we analyzed the regulation mechanism of ADAM32 by focusing on hypoxia, which is the microenvironment of solid tumors. It was revealed that the upstream molecule IGF2BP2 plays an important role in ADAM32 mRNA expression. In addition, we found Harmin as a molecule that regulates ADAM32 from database analysis, and showed that it has an anticancer effect on hepatoblastoma.

研究分野：分子生物学

キーワード：ADAM32 低酸素 m6Aメチル化 IGF2BP2 Harmin

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

小児がんは治療成績が向上してきているが、未だに難治な症例もあり、また治療後の晩期障害も大きな問題となっている<sup>1)</sup>。我々はADAMファミリーが様々なヒトがん腫において発現変動が報告されていたことから、ADAMファミリーに着目して解析を進めたところ、肝芽腫において特異的に発現亢進する分子としてADAM32を見出した。そして、肝芽腫細胞株を用いた解析から、ADAM32にはがん遺伝子としての機能があることを明らかにしてきた。しかしながら、ADAM32の発現制御機構に関してはほとんど明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

ADAM32の発現制御機構を解明することにより、肝芽腫に対する効果的な新規治療法開発をめざして本研究を立案した。

### 3. 研究の方法

#### (1) m<sup>6</sup>Aメチル化によるADAM32発現制御

これまで固形がんの微小環境である低酸素に着目して、ADAM32の発現制御機構を解析した所、プロモーター活性の影響は軽度であった。次に、汎用なRNA修飾として知られるm<sup>6</sup>Aメチル化が遺伝子発現制御に関与していることが示唆されているため、これに着目して解析を進めた。

m<sup>6</sup>Aメチル化関与の検討：メチル化阻害剤3-deazaadenosine(DAA)を用いて、mRNA発現変動への影響を検討した。

m<sup>6</sup>Aメチル化レベルの検討：ADAM32 mRNAにおけるm<sup>6</sup>Aメチル化部位をSRAMP<sup>2)</sup>により推定した。次にこの部位のメチル化状態をSELECTアッセーにて検討した。

メチル化関連分子の探索：低酸素で発現が上昇し、かつ発現レベルがADAM32と相関する分子の探索をマイクロアレイデータセット(GSE131329)を用いて行った。

#### (2) IGF2BP2ノックダウン実験

shRNAベクター作製とノックダウン安定株の取得

ノックダウン実験のために、IGF2BP2に対するshRNAベクターの作製を行った。肝芽腫細胞株HepG2にshRNAベクターをトランスフェクションして、安定株を取得後、ウェスタンブロットティングにてIGF2BP2の発現が抑制されていることを確かめた。

IGF2BP2ノックダウンによるADAM32発現への影響

IGF2BP2ノックダウンによるADAM32発現への影響を検討するために、リアルタイムPCR法にて発現を検討した。

#### (3) ADAM32の発現を制御する可能性のある化合物の探索

ADAM32の発現を抑制する可能性のある化合物を探索するために、データベース(Drug Gene Budgeter)<sup>3)</sup>を用いた。

#### (4) 化合物の肝芽腫に対する制がん効果の検討

肝芽腫細胞株に候補となった化合物を加えて、ADAM32の発現をリアルタイムRT-PCR、cell viability やシスプラチンへの感受性をMTTアッセーにて検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) m<sup>6</sup>Aメチル化によるADAM32発現制御の検討

m<sup>6</sup>AのADAM32発現への影響

HepG2をメチル化阻害剤3-deazaadenosine(DAA)で処理した後、SELECTアッセーにてm<sup>6</sup>Aレベルを解析した結果、濃度依存的にADAM32 m<sup>6</sup>Aメチル化レベルが低下した(図1)。また、DAA処理により、ADAM32発現が低下することから、m<sup>6</sup>Aメチル化がADAM32 mRNA発現制御に関与していることが示唆された(図2)。

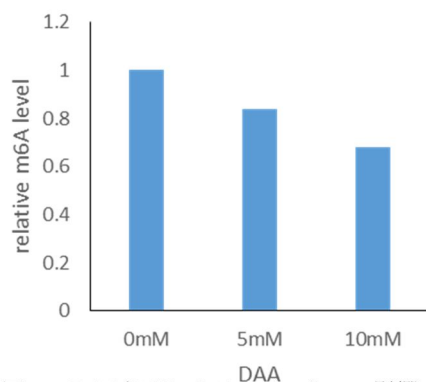


図1. DAA処理によるメチル化への影響

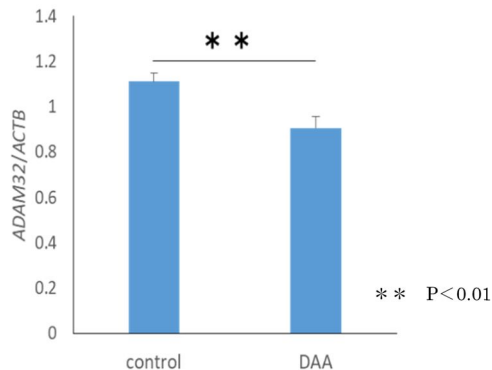


図2. DAA処理によるADAM32発現への影響

### ADAM32 発現制御に関わる m<sup>6</sup>A 関連分子の探索

マイクロアレイデータ解析により肝芽腫で発現が強く、また m<sup>6</sup>A に関連している分子の絞り込みを行ったところ、*IGF2BP1*、*IGF2BP2*、および *IGF2BP3* が見出された。さらに、マイクロアレイデータの解析から、遺伝子発現が *ADAM32* と相関を持つ分子として *IGF2BP2* が見出された (図 3)。

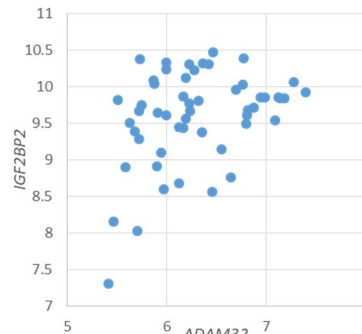


図 3. *ADAM32* と発現が相関する m<sup>6</sup>A 関連分子

### (2) *IGF2BP2* の *ADAM32* 発現変動への影響

*IGF2BP2* をノックダウンするために shRNA ベクターを安定導入した HepG2 で、*IGF2BP2* 発現が抑制されていることを確かめた。そして、*ADAM32* の発現をリアルタイム PCR 法にて確かめたところ、*ADAM32* 発現が低下していた (図 4)。以上のことから、*IGF2BP2* は *ADAM32* の上流分子として mRNA 発現を制御していることが示唆された。

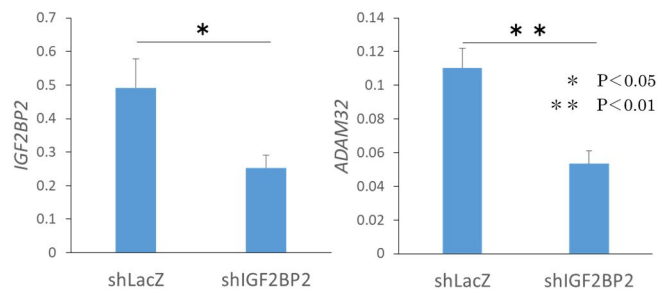


図 4. *IGF2BP2* ノックダウンの影響

### (3) *ADAM32* の発現を抑制する化合物の探索

*ADAM32* の発現を制御できる可能性のある化合物の探索をデータベース (Drug Gene Budger) を用いて行ったところ、 $\beta$ -カルボリンの一種である Harman が見出された。Harman に加えて、同様に  $\beta$ -カルボリンに属する Harmine を肝芽腫細胞株に加えた結果、Harmine が *ADAM32* の発現を抑制することが分かった (図 5)。

### (4) 肝芽腫細胞株における Harmine の効果

肝芽腫に対する Harmine の作用を確かめるために、HepG2 を用いて機能解析を進めたところ、Harmine の処理により cell viability が低下した (図 6)。以上のことから Harmine は肝芽腫に対し制がん作用があることが示唆された。

### (5) まとめ

本研究の結果から、*ADAM32* の発現を制御する可能性のある方法が複数見出された。さらなる研究により、肝芽腫を制御するメカニズムの詳細が明らかになれば、治療に抵抗する症例に対する新たな分子標的治療法開発や併用療法開発に繋がると考えられる。

### <引用文献>

Hiyama E, Hishiki T, Watanabe K, et al. Resectability and tumor response after preoperative chemotherapy in hepatoblastoma treated by the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT)-2 protocol. *J Pediatr Surg.* 2016; 51: 2053-2057.

Zhou Y, Zeng P, Li YH, et al. SRAMP: Prediction of Mammalian N6-Methyladenosine (m<sup>6</sup>A) Sites Based on Sequence-Derived Features. *Nucleic Acids Res.* 2016; 44: e91, doi:10.1093/nar/gkw104.

Wang Z, He E, Sani K, et al. Drug Gene Budger (DGB): an application for ranking drugs to modulate a specific gene based on transcriptomic signatures. *Bioinformatics.* 2019; 35(7):1247-1248.

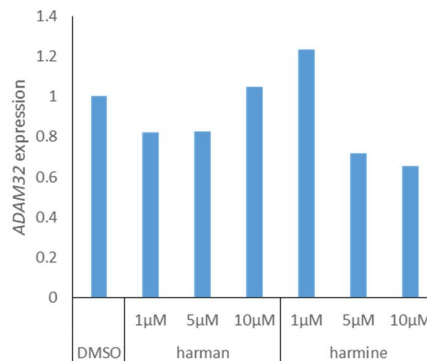


図 5.  $\beta$ -カルボリン化合物の *ADAM32* 発現への影響

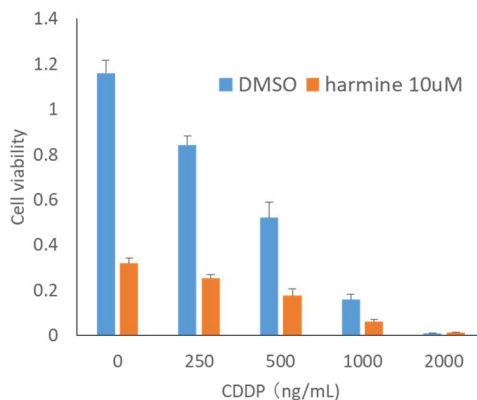


図 6. Harmine の cell viability への影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Fukazawa Takahiro, Tanimoto Keiji, Yamaoka Emi, Kojima Masato, Kanawa Masami, Hirohashi Nobuyuki, Hiyama Eiso	4. 巻 14
2. 論文標題 Oncogenic Role of ADAM32 in Hepatoblastoma: A Potential Molecular Target for Therapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 4732 ~ 4732
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cancers14194732	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 深澤 賢宏, 谷本 圭司, 金輪 真佐美, 廣橋 伸之, 檜山 英三
2. 発表標題 肝芽腫におけるがん遺伝子ADAM32の発現制御機構解明
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022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
研究協力者	檜山 英三  (Hiyama Eiso)	広島大学・自然科学研究支援開発センター・特任教授  (15401)	
研究協力者	谷本 圭司  (Tanimoto Keiji)	広島大学・原爆放射線医科学研究所・准教授  (15401)	

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
---------	---------