

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860046

研究課題名(和文) 膵癌発症，悪性化におけるABH3の分子機能解明

研究課題名(英文) Molecular function of ABH3 in initiation and progression of pancreatic cancer.

研究代表者

上田 裕子 (Ueda, Yuko)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・助教

研究者番号：30637004

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)：前立腺癌で高発現している遺伝子として同定したDNA/RNA脱メチル化酵素AlkB homolog 3(ABH3)は、難治性癌の1つである膵癌で発現亢進していた。ヒト膵癌細胞株においてABH3の機能を抑制すると、tRNAを含むsmall RNAにおいて1-methyladenosineの蓄積とタンパク質合成能の低下が観察された。さらに、癌細胞増殖の顕著な抑制作用が認められた。以上の結果は、膵癌細胞におけるRNAエピジェネティクス制御機構の存在を示し、ABH3によるRNA脱メチル化制御の破綻、それに伴うタンパク質発現異常が癌化や癌の悪性化を惹起している可能性を示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：AlkB homolog 3 (ABH3) is a member of the ABH family with a conserved 2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase domain and DNA/RNA demethylation activity. We previously reported that ABH3 is highly expressed in prostate cancer but not in benign prostatic hyperplasia or in normal prostate epithelium and that ABH3 knockdown suppressed prostate tumor development. Pancreatic cancer is one of the most deadly cancers with no effective therapeutic options. We have recently found that ABH3 is highly expressed in pancreatic cancer but not in benign pancreatic duct. ABH3 knockdown in pancreatic cancer cell lines inhibited cell proliferation and led to tumor regression in a mouse xenograft model. Furthermore, we found that ABH3 knockdown in human cancer cells suppressed protein synthesis, which was associated with the accumulation of methylated RNAs. This result suggests that ABH3 induced aberrant of RNA demethylation lead to cancer initiation and progression.

研究分野：分子生物学

キーワード：膵癌 DNA/RNA脱メチル化 翻訳制御

1. 研究開始当初の背景

先進国における男性癌罹患率のトップを占める前立腺癌の新規分子標的探索を進め、前立腺病理組織の癌部で高発現する新規遺伝子 ABH3 を発見した ABH3 は大腸菌タンパク質 AlkB と高い類似性を示すドメイン (2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase domain) を有し、ヒト ABH3 ファミリーを構成する分子であることも明らかにし、さらに siRNA を用いた ABH3 のノックダウンは、*in vitro* では前立腺癌細胞にアポトーシスを誘導し、*in vivo* では抗腫瘍作用を示すことも突き止めた。

他の癌種における ABH3 の発現を検討するため病理組織を用いた免疫組織化学染色を行った結果、膵癌で ABH3 の顕著な発現を認めた。腫瘍細胞における ABH3 陽性率を基準に高発現群(57例)と低発現群(59例)の2群に分類すると、原発巣の進展度を表す T 因子 (P=0.0079)、進行度 (P=0.0017) および術後の予後 (P=0.036) いずれにおいても有意な相関を認めた。すなわち局所浸潤症例、高度進行症例において ABH3 の発現が顕著であり、機能との関連性を推測させる結果となった。また膵癌細胞株を用いた ABH3 siRNA による knock down 実験では、*in vitro* においてアポトーシスが、*in vivo* 膵癌細胞異所性移植モデルでは有意な抗腫瘍作用を示した。現在、膵癌治療の第一選択薬として代謝拮抗剤ゲムシタピンが使用されているが、十分満足いく治療効果は得られておらず、膵癌の有望な分子標的治療薬の早期創製が切望されている。臨床的ならびに予備的ではあるが実験データから、ABH3 は膵癌治療薬の有望な分子標的とすることが期待される。

2. 研究の目的

本邦において膵癌は死亡率第5位を占める悪性腫瘍であり、その5年相対生存率は最も低く、現在最も難治性の癌となっている。したがって、膵癌の有効な治療薬の早期開発が切望されている。そのためには、標的とする分子を早急に同定し、その膵癌における機能を明確にする必要がある。本研究目的は、当研究室で発見した分子 AlkB homolog 3 (ABH3) が、膵癌病理組織で高発現していること、またメチル化 RNA 塩基の脱メチル化酵素活性を発現するという研究成果を基に、ABH3 の膵癌細胞における分子機能を明確にし、膵癌の有望な分子標的となることを証明することを目的とする。

3. 研究の方法

(1)膵癌細胞株における ABH3 発現抑制時の RNA メチル化レベルの解析
ABH3 高発現細胞株である膵癌細胞株 PANC-1 を ABH3 siRNA をトランスフェクションし ABH3 を発現抑制する。トランスフェクション 48 時間後に small RNA(200nt 以下、主として tRNA, miRNA を含む)と large RNA

(200nt 以上、主として rRNA, mRNA を含む)に分けて抽出した。抽出した RNA を PVDF 膜にドットプロットし、抗 1-methyladenosine 抗体にて、RNA 中の 1-methyladenosine を検出することにより、ABH3 発現抑制時の RNA 中のメチル化レベルの変化を評価した。

(2) 膵癌細胞株における ABH3 発現抑制時のタンパク質合成能の解析

ABH3 を発現抑制した膵癌細胞に対して、メチオニンアナログで一定時間処理し、タンパク質合成能の変化を解析した。なお、この解析については、ABH3 発現抑制による増殖能への影響がない時点でを行った。

(3)膵癌細胞株における ABH3 発現抑制時の網羅的タンパク質発現解析

膵癌細胞株 PANC-1 に ABH3 siRNA をトランスフェクションし、48 時間後に RIPA buffer(Thermo Scientific)で細胞ライセートを調製し、iTRAQ 標識後タンパク質同定解析を行い、Control siRNA を基準としたサンプルの相対定量比を算出した。

さらに iTRAQ 解析により、ABH3 発現抑制時に変化するタンパク質に特徴を探るために GO 解析を行った。

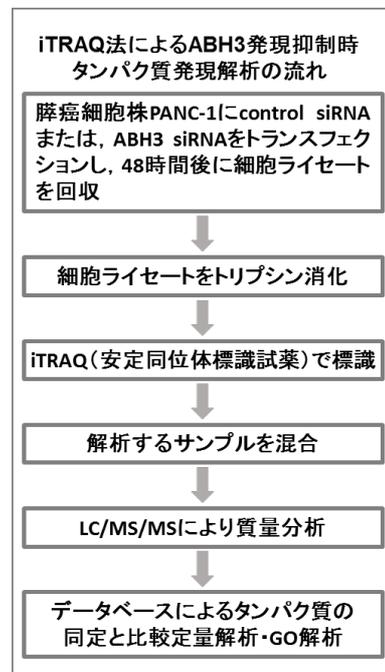
解析対象は、

ABH3 発現抑制と Control の比較において、Fold

Change(絶対値) > 1.5 である 165 遺伝子とした。

また、ABH3 発現抑制時のタンパク質発現変動に関

わる転写因子の予測をデータベース (TRANSFAC)を用いて行った。



4. 研究成果

(1)ABH3 発現抑制時の膵癌細胞内の RNA メチル化レベルの変化について解析したところ、tRNA を多く含む 200nt 以下の RNA において ABH3 で脱メチル化される 1-methyladenosine がコントロールに比べて増加していることが明らかとなった。

(2)ABH3 発現抑制により、膵癌細胞内でのタンパク質合成能がコントロールに比べて低

下することが明らかとなった。

In vitro 翻訳効率評価系において ABH3 により脱メチル化した tRNA の添加により翻訳効率が亢進することを既に明らかにしているが、今回の結果は、ABH3 の機能が抑制され、脱メチル化を受けない tRNA が蓄積することによりタンパク質翻訳効率が低下することを示唆するものである。

(3) ABH3 発現抑制時における ABH3 発現抑制時の網羅的タンパク質発現解析の結果、総検出タンパク質(4800)の 14%(673)が ABH3 発現抑制により有意に発現変化しているタンパク質として得られ、それらの 99%(664)が発現低下していた。また、GO 解析により発現低下が見られたタンパク質の多くが翻訳過程に関わるカテゴリーに分類されることがわかった。このことから、ABH3 発現抑制によるタンパク質発現変動には特異性があることが推察された。

また、発現変化していたタンパク質を制御する転写因子として、癌の浸潤能や血管新生との関連性が報告されている ETS-1 を含む 59 種類が候補として挙げられた。ABH3 発現抑制した膀胱癌細胞株において、ETS-1 のタンパク質発現低下ならびに ETS-1 の標的遺伝子であり、癌の浸潤・転移に関与することが報告されているタンパク質が発現低下することを明らかにした。

これまでの検討により ABH3 による RNA の脱メチル化制御機構の破綻が、タンパク質翻訳に影響し、癌細胞の生存に有利なタンパク質が効率良く合成されることで癌の悪性化に寄与しているのではないかと推察された。ABH3 が tRNA の 1-methyladenosine や 3-methylcytidine を脱メチル化することは明らかとなっているが、その修飾部位の特定には至っていない。今後、ABH3 により脱メチル化される部位を特定するとともに、その修飾が tRNA の機能にどのように寄与するのか明らかにする必要がある。そのことにより、癌細胞における ABH3 によるメチル化制御機構異常の癌化や癌の悪性化に対する寄与について、より詳細な機構が明らかになるものと考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Improving the bioavailability and anticancer effect of the PCA-1/ALKBH3 inhibitor HUHS015 using sodium salt. Mabuchi M, Shimizu T, Ueda M, Sasakawa Y, Nakao S, Ueda Y, Kawamura A, Tsujikawa K, Tanaka A. *In Vivo*. 29(1):39-43(2015).(査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25600528>.

Design and synthesis of prostate cancer

antigen-1 (PCA-1/ALKBH3) inhibitors as anti-prostate cancer drugs. Nakao S, Mabuchi M, Shimizu T, Itoh Y, Takeuchi Y, Ueda M, Mizuno H, Shigi N, Ohshio I, Jinguji K, Ueda Y, Yamamoto M, Furukawa T, Aoki S, Tsujikawa K, Tanaka A. *Bioorg Med Chem Lett*. 15;24(4):1071-4.(2014). (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24461353>

miR-629 Targets TRIM33 to Promote TGFβ/Smad Signaling and Metastatic Phenotypes in ccRCC. Jinguji K, Ueda Y, Kitae K, Hase H, Egawa H, Ohshio I, Kawakami R, Kashiwagi Y, Tsukada Y, Kobayashi T, Nakata W, Fujita K, Uemura M, Nonomura N, Tsujikawa K. *Mol Cancer Res*. 2015 Mar;13(3):565-74. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25381221>

LOXL2 status correlates with tumor stage and regulates integrin levels to promote tumor progression in ccRCC. Hase H, Jinguji K, Ueda Y, Kitae K, Egawa H, Ohshio I, Kawakami R, Kashiwagi Y, Tsukada Y, Kobayashi T, Nakata W, Fujita K, Uemura M, Nonomura N, Tsujikawa K. *Mol Cancer Res*. 2014 Dec;12(12):1807-17. (査読有)

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25092917>

〔学会発表〕(計 6 件)

上田裕子, 川上竜司, 神宮司健太郎, 古川龍彦, 辻川和文 ABH3 による RNA 脱メチル化制御の破綻が膀胱癌の進行に寄与する, 第 19 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2015 年 6 月 11 日, 松山全日空ホテル

河口恵, 上田裕子, 北恵郁緒里, 仲井秀一, 大塩郁未, 小林巧明, 神宮司健太郎, 深田宗一朗, 青木俊二, 馬淵美雪, 田中明人, 辻川和文, 膀胱癌細胞における ABH3 の RNA 脱メチル化を介したタンパク質翻訳制御機構の解明, 日本薬学会第 135 回年会, 2015 年 3 月 27 日, 兵庫医療大学

大塩郁未, 上田裕子, 北恵郁緒里, 河口恵, 仲井秀一, 深田宗一朗, 原田和生, 平田収正, 辻川和文, ABH family 分子による RNA エピジェネティクス制御, 日本薬学会第 135 回年会, 2015 年 3 月 27 日, 兵庫医療大学

仲井秀一, 大塩郁未, 河口恵, 上田裕子, 北恵郁緒里, 小林巧明, 神宮司健太郎, 深田宗一朗, 辻川和文, ABH3 の DNA 脱メチル化酵素活性制御による非小細胞肺癌細胞の表現型解析, 日本薬学会第 135 回年会, 2015 年 3 月 27 日, 兵庫医療大学

上田裕子, 河口恵, 信貴奈緒子, 冨本千秋, 馬淵美雪, 田中明人, 青木俊二, 小林巧明, 小嶋美樹, 神宮司健太郎, 北恵郁緒里, 辻川

和丈, DNA/RNA 脱メチル化酵素 ABH3 を分子標的とした first-in-class の前立腺癌、膵癌治療創薬, 日本薬学会第 134 回年会, 2014 年 3 月 30 日, 熊本市総合体育館

上田裕子, 神宮司健太郎, 川上竜司, 古川龍彦, 辻川和丈, ALKBH3 を分子標的とした膵癌治療創薬, 第 17 回日本がん分子標的治療学会学術集会, 2013 年 6 月 13 日, 国立京都国際会館

〔産業財産権〕

○出願状況(計 0 件)

○取得状況(計 0 件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

上田 裕子 (UEDA, Yuko)

大阪大学・大学院薬学研究科・助教

研究者番号: 30637004