

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 26 日現在

機関番号：13901

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2011～2015

課題番号：23107010

研究課題名(和文) 遺伝子解析と分子トレーシングを基盤とした細胞標的分子の創製

研究課題名(英文) Exploration of target molecules based on genome analysis and molecular tracing

## 研究代表者

夏目 敦至(Natsume, Atsushi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30362255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 76,700,000円

研究成果の概要(和文)：ストレス顆粒はRNAと多くのタンパク質からなる凝集体であり、熱や活性酸素などのストレスにより形成される。その形成メカニズムは不明であり、RNAの翻訳停止やタンパク質の修飾が関与していると考えられている。また、ストレス顆粒の構成タンパク質の異常は神経疾患の発症と関連している。我々は分子生物学的手法とイメージングの手法を用いてストレス顆粒形成のメカニズムを解析した。ストレス顆粒の新たな構成因子を同定し、そのダイナミックな細胞内局在と複合体形成を解析し、関連する病態の解明をした。

研究成果の概要(英文)：Various serine/threonine kinases are activated in cells upon numerous extracellular stresses, such as heat, hypoxia and oxidation. These stresses activate four different types of kinases, EIF2AK1, EIF2AK2, EIF2AK3, EIF2AK4, which consequently promote phosphorylation of eIF2 at Ser51. Our proteomics analysis of SG components revealed UBAP2L is a critical component of SG. UBAP2L contains ubiquitin-associated domain and RGG motif. UBAP2L is localized to SGs when cells are treated with heat, arsenite, hydrogen peroxide, and sorbitol. Fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) analysis revealed that UBAP2L localization to the SG is dynamic. UBAP2L depletion by siRNA transfection showed that UBAP2L was critical for the organization of SG. Formation of SG is associated with cell survival in the presence of extracellular stresses. Further analysis of UBAP2L and UBAP2 functions in RNA processing and SG formation may give insight for the pathogenesis of neurodegenerative diseases.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：脳腫瘍 がん ゲノム

### 1. 研究開始当初の背景

成人に発症する脳腫瘍の約半数を占める神経膠腫は、病理学的に低悪性度と高悪性度に低悪性度は緩徐に進行するが数年から十数年の経過を経てより高悪性度の腫瘍として再発する。段階的に悪性化する腫瘍であるため腫瘍内多様性及び単一細胞クローンがどのように進展していくかの過程を解明することは今後の治療の発展につながると考えられる。

### 2. 研究の目的

低悪性度神経膠腫瘍(LGG)の遺伝子異常はいまだ十分に解明されていない。我々は低悪性度神経膠腫瘍における遺伝子異常の全貌を明らかにすることが目的であった。

### 3. 研究の方法

High throughput sequencingを行った。同時に、我々は4患者の multisampling 腫瘍と10患者の初発/再発腫瘍に対し、次世代シーケンスである Whole exome sequencing (WES)を行った。確認された変異について deep sequencing を行い正確なアレル頻度を測定し、統計的な解析手法である PyClone analysis を行うことにより subclone を同定し腫瘍内多様性を明らかにすることを目的とした。また、同定された subclone を用いクローンの動態の解析を試みた。

### 4. 研究成果

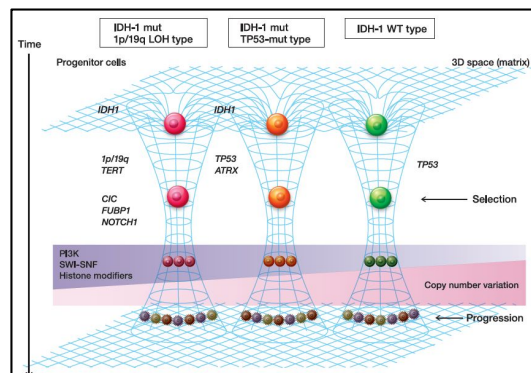
52例の whole exome sequencing (WES)と283例の target sequencing を行った。TCGA から425例の WES data を使用し合計760例の LGG に対し遺伝子解析を行った。LGG において既知の遺伝子変異に加え新たに RTK-mTOR pathway ,NOTCH pathway, SWI/SNF complex および histone methyltransferase (HMT) の変異が有意に認められた。LGG は *IDH1/2* の変異と 1p19q LOH によって特徴的な3 type に分類される。Type I (*IDH*mut / 1p19q LOH)は *TERT* promoter (98%), *CIC* (59%), *FUBP1* (31%)変異を有しコピー数異常は 4q / -18 といった deletion を起こす。Type II (*IDH*mut / 1p19q intact)では97%に *TP53* の biallelic inactivation を認めた。*ATRX*(77%)の変異も高頻度であり 8q/10p などに copy 数 gain を起こしやすい。Type III (*IDH* wt)は *EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A/2B* などの変異の頻度が高く GBM-like pattern を有する。これらの変異は高い排他性を有し各 Type ごとに特徴的な遺伝子変異パターンをとる(図)。各遺伝子における変異アレル頻度から Bradley-Terry model を用いて変異の生じる順番を検討する規則性が認められる。*IDH1/2*, *TERT*, 1p19q LOH, *TP53*, *ATRX* 変異は腫瘍発生早期に生じると考えられ、その後 *NOTCH* pathway, *SWI/SNF* complex, HMT の変異が生じる。

multisampling 検体において各部位で変異

パターンは異なり腫瘍内多様性が確認された。Phylogenetic tree を描くと *IDH1*, 1p19q LOH, *TERT* promoter, *TP53*, *ATRX* 変異はいずれも truncal mutation として存在し腫瘍の発生に重要な変異と考えられた。一方 *FUBP1*, *CIC*, *NOTCH1* 及び Histone methyltransferase などの変異は分岐を形成した。また同一遺伝子であっても同一患者内で異なる変異パターンを有する parallel mutation が認められた。そのためこれらの driver 変異は clonal evolution を引き起こし腫瘍の進展を引き起こしていると考えられた。

経時的検体において同様の解析を行うと *IDH1*, 1p19q LOH, *TERT* promoter はいずれも truncal mutation であった。一方, *TP53*, *ATRX* に parallel mutation を認め分岐を形成する症例があり *IDH1* より後に発生すると考えられた。multisampling 検体と同様に *FUBP1*, *CIC*, *NOTCH1* には parallel mutation を認め clonal evolution を引き起こしていると考えられた。

今回、我々の解析により LGG において新たな遺伝子変異が明らかとなった。遺伝子変異



パターンは極めて排他性の強い3 type に分類され、各 Type において遺伝子変異はヒエラルキーを有する。LGG は決まった順番で変異が発生し、その driver 変異を獲得することにより clonal evolution を引き起こして進展していくことが明らかとなった。

LGG は時間的・空間的に多様性を有する腫瘍であり、その遺伝子変異には変異の生じる順番が存在すること、腫瘍が生じた後に一部の subclone がヒエラルキーを有する driver 変異を順番に獲得し多様性を形成しながら進展していくことが明らかになった。

一方、ストレス顆粒を形成する多くの因子はアルギニンとグリシンからなる配列 (RGG 配列) を有している。RGG 配列のアルギニンはメチル化酵素である PRMT1 によりメチル化される。そこで我々は新たなストレス顆粒形成因子を同定するため、PRMT1 との結合タンパク質の網羅的な解析をおこなった。その結果多くの RGG 配列を含む RNA 結合タンパク質が PRMT1 と結合し、ストレス顆粒に局在することが判明した。我々はその中のいくつかのタンパク質に関してさらに詳細な検討をおこなった。

UBAP2L はユビキチン結合領域と RGG を配列

有する機能不明のタンパク質である。PRMT1によりアルギニンがメチル化され、そしてストレス顆粒に局在することが観察された。ストレス顆粒における GFP-UBAP2L の局在を ( Fluorescence Recovery after Photobleaching; FRAP ) を用いて観察したところ、ストレス顆粒における UBAP2L はダイナミックに動くことが分かった。さらに siRNA を用いて UBAP2L の発現を抑制したところ、ストレス顆粒の形成が顕著に抑制された。UBAP2L の機能をさらに検討するため、UBAP2L と複合体を形成するタンパク質を質量分析により検討した。その結果、FMR1 と G3BP1 というタンパク質が結合することが分かった。FMR1 は遺伝性の神経疾患の原因遺伝子であり、G3BP1 はストレス顆粒に局在するタンパク質である。結合を詳しく解析したところ、UBAP2L と G3BP1 は RNA を介して結合していることが明らかとなった。UBAP2 は UBAP2L のホモログであるが、興味深いことに UBAP2 は UBAP2L と異なる複合体を形成することが分かった。UBAP2 と UBAP2L は RNA を含む複合体を形成し、RNA の翻訳や RNA の代謝に関連していると予想される。また神経疾患に関連するタンパク質と複合体を形成することから、病気との関連性も考えられる。

#### 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 16 件 )

1. Kurimoto M, Suzuki H, Aoki K, Ohka F, Kondo G, Motomura K, Iijima K, Yamamichi A, Ranjit M, Wakabayashi T, Kimura S, Natsume A: Rapid sensitive analysis of IDH1 mutation in lower-grade gliomas by automated genetic typing involving a quenching probe. *Cancer Invest.* 2016 2;34(1):12-5. 査読あり
2. Kuramitsu S, Ohno M, Ohka F, Shiina S, Yamamichi A, Kato A, Tanahashi K, Motomura K, Kondo G, Kurimoto M, Senga T, Wakabayashi T, Natsume A: Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses. *Cancer Gene Ther.* 2015;22(10):487-95. 査読あり
3. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Motomura K, Alim A, Tanaka I, Senga T, Harada I, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Sekido Y, Wakabayashi T: Activation of Yes-Associated Protein in Low-Grade Meningiomas Is Regulated by Merlin, Cell Density, and Extracellular Matrix Stiffness. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015;74(7):704-9. 査読あり
4. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S: Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet.* 2015;47(5):458-68. 査読あり
5. Iwami K, Momota H, Fujii M, Natsume A, Yagi S, Toriyama K, Kamei Y, Wakabayashi T: Anaplastic meningioma with rapid growth after omental flap transposition: a case report and experimental study. *Brain Tumor Pathol.* 2015;32(2):137-44. 査読あり
6. Torii K, Yamada S, Nakamura K, Tanaka H, Kajiyama H, Tanahashi K, Iwata N, Kanda M, Kobayashi D, Tanaka C, Fujii T, Nakayama G, Koike M, Sugimoto H, Nomoto S, Natsume A, Fujiwara M, Mizuno M, Hori M, Saya H, Kodera Y: Effectiveness of plasma treatment on gastric cancer cells. *Gastric Cancer.* 2015 Jul;18(3):635-43. 査読あり
7. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Momota H, Kato A, Motomura K, Watabe N, Muraishi S, Nakahara H, Saito Y, Takeuchi I, Wakabayashi T: Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:860241. 査読あり
8. Momota H, Fujii M, Tatematsu A, Shimoyama Y, Tsujiuchi T, Ohno M, Natsume A, Wakabayashi T: Papillary glioneuronal tumor with a high proliferative component and minigemistocytes in a child. *Neuropathology.* 2014;34(5): 484-90. 査読あり
9. Motomura K, Fujii M, Maesawa S, Kuramitsu S, Natsume A, Wakabayashi T: Association of dorsal inferior frontooccipital fasciculus fibers in the deep parietal lobe with both reading and writing processes: a brain mapping study. *J Neurosurg.* 2014;121(1):142-8. 査読あり

10. Ohka F, Ito M, Ranjit M, Senga T, Motomura A, Motomura K, Saito K, Kato K, Kato Y, Wakabayashi T, Soga T, Natsume A: Quantitative metabolome analysis profiles activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. *Tumour Biol.* 2014;35(6):5911-20. 査読あり
11. Umebayashi D, Natsume A, Takeuchi H, Hara M, Nishimura Y, Fukuyama R, Sumiyoshi N, Wakabayashi T: Blockade of gap junction hemichannel protects secondary spinal cord injury from activated microglia-mediated glutamate excitotoxicity. *J Neurotrauma.* 2014 15;31(24):1967-74. 査読あり
12. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Momota H, Kato A, Motomura K, Watabe N, Muraishi S, Nakahara H, Saito Y, Takeuchi I, Wakabayashi T: Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:860241. 査読あり
13. Deguchi S, Kondo Y, Natsume A: Epigenetic regulation and the role of non-coding RNAs in gliomas. *No Shinkei Geka.* 2014;42(8):701-9. 査読あり
14. Suzuki A, Nobusawa S, Natsume A, Suzuki H, Kim YH, Yokoo H, Nagaishi M, Ikota H, Nakazawa T, Wakabayashi T, Ohgaki H, Nakazato Y: Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse gliomas. *J Neurooncol.* 2014;120(2):283-91. 査読あり
15. Wang L, Yamaguchi S, Burstein MD, Terashima K, Chang K, Ng HK, Nakamura H, He Z, Doddapaneni H, Lewis L, Wang M, Suzuki T, Nishikawa R, Natsume A, Terasaka S, Dauser R, Whitehead W, Adekunle A, Sun J, Qiao Y, Marth G, Muzny DM, Gibbs RA, Leal SM, Wheeler DA, Lau CC: Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. *Nature.* 2014 Jul 10;511(7508):241-5. 査読あり
16. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K: Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Sci.* 2014;105(4):363-9. 査読あり

## 6 . 研究組織

### (1)研究代表者

夏目敦至 (NATSUME, Atsushi) 名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：30362255

### (2)研究分担者

干賀 威 (SENGA Takeshi) 名古屋大学・医学系研究科・准教授  
研究者番号：80419431

宇理須 恒雄 (URISU, Tsuneo) 名古屋大学・工学研究科・客員教授  
研究者番号：50249950  
(平成27年度)