

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18419

研究課題名(和文)新規がん転移抑制法の開発に向けたがん転移促進因子Merm1の解析

研究課題名(英文)Functional analysis of Merm1 promoting tumor metastasis

研究代表者

竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター 基礎研究部・研究員

研究者番号：20706494

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)：本研究では、がん転移促進因子Merm1によるリボソーム制御の転移促進への関与と転移抑制の標的としての可能性を示すことを目指した。細胞増殖への寄与や発現制御により、Merm1ノックアウト細胞や変異体を用いた解析は困難であった。一方、Merm1ノックダウンによって、核小体因子の流出を伴う核小体形態変化とpre-rRNAの増加を見出した。また、Merm1抑制で多くの抗がん剤感受性は変化しなかったが、rRNA転写阻害剤感受性に変化が認められた。相互作用因子の解析からMerm1制御候補因子群を同定した。Merm1およびその制御因子の核小体での機能が、がん抑制標的として有効かは更なる検討が必要である

研究成果の概要(英文)：Merm1 is a tumor metastasis-promoting factor identified from in vivo screening. Merm1 has a role in ribosome biogenesis in a nucleolus. This research aims to clarify the relation between its functions in a nucleolus and in metastasis. We found Merm1-knockdown induced flowing out of nucleolar factors, changing nucleolar morphology, and pre-rRNA accumulation. We tried to express nucleolar-dominant or nuclear-exclusive Merm1 for analysis, however, we could not get the proper leveled expression of Merm1, possibly by the restricted regulation. To increase the knowledge about the Merm1 regulation, we searched and identified Merm1-interactants. Especially, a component of the stable Merm1-complex and ubiquitinylation enzymes were possible regulators of Merm1. Merm1 suppression exhibited the change in the sensitivity to rRNA transcription inhibitors, but not in that to anti-tumor drugs. Further analyses are required to suggest the nucleolar function of Merm1 as targets for tumor suppression.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：がん転移 リボソーム 核小体

1. 研究開始当初の背景

核小体は、核内小器官で、主な機能はリボソーム生合成の場である。核小体 rDNA から RNA polymerase I (Pol I) によって pre-rRNA が転写され、rRNA へとプロセッシングされる。リボソームタンパク質 (RP) が rRNA にアッセンブルし、リボソームサブユニットを形成し、細胞質へ運ばれ、タンパク質の合成に働く。従来から、正常細胞に比べてがん細胞の核小体は大きく、数が多いことが知られ、がんの悪性度の指標の一つとして用いられている。これは、増殖が活発ながん細胞ではタンパク質合成に必要なリボソーム生合成が亢進していることと関連している。がん遺伝子の高発現、がん抑制遺伝子の不活化が Pol I の恒常的な活性化につながることでリボソーム亢進の一因として知られるが、加えて rRNA や RP の翻訳後修飾がリボソームの構成と機能を制御する重要な機構であることが示唆されている。がん細胞におけるリボソーム亢進はがん化の結果というより、より積極的にがんの悪性化に関連しているともいわれる。したがって、がん治療の標的として注目されるが、リボソーム制御の異常ががんの悪性化、特に転移にどのようにして関連しているのかは、ほぼ明らかにされていない。

Merm1 (Metastasis-related methyltransferase 1) / WBSR22 は、本研究代表者の所属する研究室にて、マウスがん転移モデルを使ったスクリーニングにより同定された新規がん転移促進因子である (Nakazawa Y. et al., Cancer Res, 2011)。特徴的なアミノ酸配列として、S-アデノシルメチオニン (SAM) 依存的なメチル基転移酵素 (MTase) ドメインと核移行シグナルが含まれている。SAM 結合モチーフの変異体 (MD mutant) には、転移促進活性が認められないことから、MTase ドメインは Merm1 の転移促進機能に重要であると考えられる。しかし、Merm1 の MTase の基質は不明で、どのように転移を促進しているかも疑問が残されている。近年、Merm1 が出芽酵母 Bud23 の機能的ホモログであることが示唆された (Öunap K. et al. PLoS One 2013)。Bud23 が rRNA のメチル化を介して rRNA のプロセッシングを促進することが報告されていたこと (White J et al. MCB 2008)、また本研究代表者もそれまでの解析結果から、Merm1 による核小体制御に着目していたことから、核小体における Merm1 の機能と転移制御の関係に着目した本研究を計画した。

2. 研究の目的

がん転移促進因子として同定された Merm1 のがん転移における分子機構を解

析し、Merm1 を標的とした新規転移抑制法に繋がる経路を示すことを目的とした。

まず、Merm1 の核小体における機能および Merm1 を中心とした標的因子を明らかにするため、Merm1 の相互作用因子の同定と解析、それらのリボソーム生合成や核小体形態への影響の解析を行うこととした。またメチル化の基質として核小体における rRNA の可能性について検討し、結果が得られた場合にメチル化によるリボソーム制御の結果として、タンパク質翻訳の精度と量の変化を解析することとした。これらにより、がん転移における Merm1 によるメチル化の意義に迫ることを目指した。また最近、臨床試験が進められているがん細胞の核小体ストレス応答を利用した治療薬の効果に対する Merm1 の影響も解析することで、治療標的としての応用を意識した成果を得ることも目指した。

3. 研究の方法

Merm1 の核小体での機能が転移を含むがんの悪性化にどのように関与するのかについて、rRNA のメチル化を介したリボソーム制御の可能性を中心に解析する。また、核小体制御に関与する Merm1、およびその相互作用因子群の標的としての可能性を検討する。さらに、それらの核小体ストレス応答への影響を明らかにする。具体的には以下の研究計画に沿って進めた。

- (1) Merm1 による転移制御に関与し、転移抑制の標的となり得る因子の探索と解析。Merm1 と相互作用する因子群の LC/MS による同定と解析を行い、Merm1 の機能やタンパク質レベルに影響する因子の同定を行う。
- (2) Merm1 および(1)で得られた因子の核小体局在およびリボソーム制御へ関与とがん転移促進機構の解析。rRNA のある核小体で機能することが転移に関与するのか、Merm1 核小体局在および非局在変異体やノックアウト細胞を作製して核小体・リボソーム生合成への影響とマウス転移モデルで転移への影響を評価する。
- (3) Merm1 のメチル化活性と rRNA のメチル化との関係の解析。(1)の変異体や Merm1 ノックダウンにより rRNA メチル化レベルに変化があるかを調べる。
- (4) Merm1 による rRNA メチル化によるリボソーム機能への影響の解析。(2)で影響が検出できたら、レポーターアッセイによる翻訳精度の解析、タンパク質レベルの変化の網羅的解析を行う。それにより、Merm1 を介した転移促進に関与する因子群を抽出し、解析する。
- (5) Merm1 阻害による核小体ストレス応答を利用したリボソーム合成阻害剤への感受性への影響の解析。Merm1 ノックアウト、

およびノックダウンによるリボソーム合成阻害剤への感受性の変化を検討する。

4. 研究成果

(1) Merm1 による転移制御に関与し、転移抑制の標的となり得る因子の探索と解析。

Merm1 相互作用因子の LC/MS 解析から、最も量の多い結合因子として Bud23 による rRNA へのメチル化に必要なアダプターとして知られる Trm112 のヒトホモログ TRMT112 を同定した。さらに、TRMT112 ノックダウンにより Merm1 のタンパク質レベルが顕著に減少した。逆に Merm1 ノックダウンにより TRMT112 のレベルも減少したことから、結合により互いに安定的な機能的複合体を形成していると考えられた。他のグループから同様の報告が同時期になされた (Öunap Ket al. PLoS One 2015)。また重要なことに、Merm1 高発現細胞では Merm1 と結合する TRMT112 の量が多くなっていることが判明し、乳がんやメラノーマで悪性度と相関する Merm1 の発現レベルに重要な制御因子とも予想される。Merm1 のメチル化活性と両者の結合レベルとの関係を検討したが、メチル化能と TRMT112 結合活性は関係しないことが示唆された。他にも、リボソーム生合成に関与する核小体因子やユビキチン化修飾に関わる酵素群が Merm1 の相互作用因子として同定に成功した。これらの因子が Merm1 を標的とした場合のがん転移抑制法または診断マーカーとして重要である可能性がある。

Merm1 の核小体局在およびリボソーム制御へ関与とがん転移促進機構の解析。

(2) 核小体局在シグナル (Rev1-NoLS; Karni-Schmidt O et al. J Cell Sci 2008) 付加型 Merm1-AcGFP 発現細胞、核に移行しない NLS 欠損型 Merm1-AcGFP 発現細胞の作製を行った。Merm1 低発現細胞株、高発現細胞株のどちらでも発現を試みたが、顕微鏡下での観察から蛍光シグナルから弱く発現レベルが低い細胞しか得られなかった。野生型 Merm1-AcGFP 発現細胞でも発現が低かったため、変異が原因ではなく、Merm1 のタンパク質レベルが厳密に制御される機構の存在が示唆された。(3) の Merm1 相互作用因子の解析から、Merm1 のタンパク質安定性に重要な因子 TRMT112 を同定したので、共発現による発現レベルの向上を期待したが、Merm1 変異体の細胞内局在を確認できるほど十分なレベルの発現細胞を得ることはできなかった。一方、プロテアソーム阻害剤 MG132 処理により、Merm1 タンパク質の増加が検出された。ユビキチン-プロテアソーム系を介した分解制御が積極的に Merm1 のタンパク質レベルに寄与していることが明らかになった。ユビキチン化され得る部位の変異体の発現により発現レベルの問題を解消できる可能性がある。Merm1 解析ツールとして有用な Merm1 の

ノックアウト細胞の作製を CRISPR-Cas9 システムを用いて行った。ベクター導入細胞のうち半分の効率 (15/31) でヘテロなノックアウト細胞と考えられるクローンが取得できたが、ホモのノックアウト細胞はほぼ取れなかった (1/31) ことから、Merm1 が細胞の生存増殖に必須の因子であることが示唆された。そこで、Merm1 の酵母 ortholog Bud23 の機能同様 rRNA 制御への寄与を検討した。Merm1 を siRNA によってノックダウンし、rRNA 転写への影響を real-time RT-PCR により検討した。転写直後の pre-rRNA を検出する primer を用いて解析したところ、Merm1 ノックダウンによって pre-rRNA 量の増加が検出された。一方、CRISPR-Cas9 システムで Merm1 をノックアウトした細胞では pre-rRNA 量の大きな変化は認められなかった。

(3) (4) Merm1 のメチル化活性と rRNA のメチル化との関係と Merm1 による rRNA メチル化によるリボソーム機能への影響。

Bud23 のメチル化の標的である rRNA の G1575 のヒト rRNA の相同部位と予想された G1639 についてメチル化への影響を検討した。低濃度の dNTP 存在下での逆転写反応と PCR を利用したメチル化レベルの解析から、Merm1 ノックダウンによる rRNA の G1639 を含む領域のメチル化レベルに減少が認められた。一方で、Merm1 ノックアウト細胞では顕著なメチル化レベルの変化は認められなかった。この結果は、本研究遂行とほぼ同時期に別のグループからも異なる手法を用いて示された (Haag S et al. RNA 2015)。また、Merm1 は 18S rRNA のほぼ最終段階のプロセッシングを介して 40S リボソーム生合成に関与することも知られるが、この機能は Merm1 のメチル化能に依存しないことが示され、その制御機構は未だ明確ではない。本解析から、rRNA 転写もしくは初期の pre-rRNA 制御に Merm1 が関与することも示唆され、さらなる rRNA のプロセッシングネットワークとがん悪性化における破綻の理解が必要である。in vivo 転移モデルで転移との関連を解析したが、Merm1 ノックダウンにより増殖への抑制傾向が表れてしまうため難しいと判断した。

(5) 核小体ストレス応答を利用したリボソーム合成阻害剤への感受性への Merm1 阻害による影響の解析。Merm1 のノックダウンでいくつかの核小体因子が核小体外へ流出し、細胞あたり複数個あった核小体が 1, 2 個と少数になるという興味深い結果を得ている。(1) で明らかにした相互作用因子 TRMT112 のノックダウンでも同様の影響を観察した。核小体はリボソーム生合成という主機能に加え、様々な因子の足場として働き、DNA 損傷や rRNA 転写阻害といった核小体ストレスに応じて崩壊し、核小体因子の放出を誘導することが知られている。そのうちのいくつかの核小体因子は核質で、p53 の安定化に働き、

アポトーシスを引き起こすことが明らかにされている (Hein Net al. Trends in Mol Med 2013)。核小体崩壊を誘導できる rRNA 転写阻害剤は治療薬として有望視されており、Pol I 阻害剤 CX-5461 は臨床試験に入っている (Drygin D et al. Cancer Res 2011)。そこで、Merm1 ノックアウトによって Pol I 阻害剤 CX-5461 および Actinomycin D への感受性に影響するかを検討した。ノックアウト細胞はクローンごとに感受性の変化はまちまちで、他の一般的な抗がん剤であるシスプラチン、パクリタキセル、マイトマイシン C、アドリアマイシン、イリノテカンへの感受性に大きな変化がなかったことと異なる結果を得た。ノックアウト細胞取得時の長期培養により、de novo の経路が活性化し、Pol I 阻害剤への感受性の多様性に繋がった可能性が考えられたので、Merm1 の siRNA による一過性のノックダウンによる効果についても解析する必要がある。

(6)その他。がん化に強く関与する Myc の細胞増殖促進効果はリボソーム生合成の亢進作用が重要とされる。Myc 過剰発現によって核小体のサイズが増加することも知られるが、がん転移促進に関与する TGF-beta シグナルも核小体のサイズに影響し、リボソーム制御に関わることが示唆されている。今回、がん細胞依存的に活性化した血小板から TGF-beta が放出され、それによってがん細胞の上皮-間葉系転換 (EMT) と浸潤活性の促進が起こることを明らかにした。in vivo の血行性転移モデルでも TGF-beta 阻害またはがん細胞の血小板活性化を標的とした阻害により転移抑制効果が示されたことから、これらの経路の転移促進への寄与が示された。TGF-beta によるがん転移促進における核小体やリボソーム制御の寄与や EMT とリボソーム制御の関係も注目される。

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)

Miyata K, Takemoto A, Okumura S, Nishio M, and Fujita N. Podoplanin enhances lung cancer cell growth *in vivo* by inducing platelet aggregation. *Scientific Reports*, in press. (査読有)

Takemoto A, Okitaka M, Takagi S, Takami M, Sato S, Nishio M, Okumura S, Fujita N. A critical role of platelet TGF- release in podoplanin-mediated

tumour invasion and metastasis. *Scientific Reports*, 7, 42186, 2017. (査読有) doi: 10.1038/srep42186.

Takemoto A, Kawashima SA, Li JJ, Jeffery L, Yamatsugu K, Elemento O, Nurse P. Nuclear envelope expansion is crucial for proper chromosomal segregation during a closed mitosis. *Journal of Cell Science*, 129, 1250-1259, 2016. (査読有) doi: 10.1242/jcs.181560.

Sekiguchi T, Takemoto A, Takagi S, Takatori K, Sato S, Takami M, Fujita N. Targeting a novel domain in podoplanin for inhibiting platelet-mediated tumor metastasis. *Oncotarget*, 7, 3934-3946, 2016. (査読有) doi: 10.18632/oncotarget.6598.

[学会発表](計8件)

竹本愛、高木聡、藤田直也：高転移性がん細胞膜表面タンパク質 Podoplanin による血小板凝集を介した EMT の誘導と血行性転移の促進) 第 75 回日本癌学会学術総会 (2016 年 10 月 8 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市))

関口貴哉、竹本愛、藤田直也：ポドプランンの新規血小板結合部位の阻害は血小板凝集とがん転移を抑制する、第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

宮田憲一、竹本愛、藤田直也：Podoplanin を介した血小板凝集による腫瘍の増大) 第 75 回日本癌学会学術総会、2016 年 10 月 6 日、パシフィコ横浜 (神奈川県・横浜市)

竹本愛、西尾誠人、藤田直也：Podoplanin/Aggrus の新規血小板結合部位 PLAG4 の同定とそれを標的としたがん抑制効果) 第 20 回日本がん分子標的治療学会学術集会、2016 年 5 月 31 日、別府国際コンベンションセンター (大分県・別府市)

Sekiguchi T, Takemoto A, Fujita N: Suppression of platelet aggregation and tumor metastasis by anti-podoplanin mAb recognizing a novel CLEC-2 binding domain, AACR

Annual Meeting 2016, 18 Apr 2016, New Orleans (USA)

藤田直也、竹本愛：腫瘍依存的な血小板凝集を標的にしたがん治療) 第74回日本癌学会総会、2015年10月8日、名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

関口貴哉、竹本愛、高木聡、藤田直也：Aggrus/podoplaninの新規血小板結合部位 PLAG4の同定)平成27年度文科省科研費 新学術領域研究『がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動』がん若手研究者ワークショップ、2015年9月2日、蓼科グランドホテル滝の湯(長野県・茅野市)

竹本愛、大原智子、藤田直也：Aggrus依存的な血小板凝集はEMTを介してがん転移を促進する、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(愛媛県・松山市)

[図書](計3件)

竹本愛、医歯薬出版、医学のあゆみ、がん微小環境の病態理解と制御「血小板・エクソソーム」Vol. 258, No. 1, 22-28, 2016.

竹本愛、藤田直也、日本血栓止血学会誌、特集1血小板と悪性腫瘍「がんの転移治療の新たなターゲット：がん細胞 血小板相互作用」Vol. 27, No.1, 11-17, 2016.

竹本愛、藤田直也、羊土社、実験医学増刊号 がん微小環境と標的治療、「がん悪性化に関わる血小板の凝集機構を標的とした治療」Vol. 33, No.5, 186-191, 2015.

[その他]

ホームページ等

<http://www.jfcr.or.jp/chemotherapy/department/fundamental/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

竹本 愛 (TAKEMOTO, Ai)
公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター・基礎研究部・研究員
研究者番号：20706494

(2)研究協力者

高見 美穂 (TAKAMI, Miho)
佐藤 重男 (SATO, Shigeo)

大原 智子 (OH-HARA, Tomoko)
宮田 憲一 (MIYATA, Kenichi)
関口 貴哉 (SEKIGUCHI, Takaya)