

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09044

研究課題名（和文）PRMT5による新たな膵臓癌の癌幹細胞維持機構の解明と治療法開発への展開

研究課題名（英文）Analysis of the mechanism of PRMT5-mediated pancreatic cancer stem cells maintenance, and development of therapeutic strategy targeting pancreatic cancer stem cells by PRMT5 inhibition

研究代表者

阿部 芳憲（Abe, Yoshinori）

日本医科大学・研究部共同研究施設・講師

研究者番号：00386153

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：膵臓癌は治療困難な癌の一つであるが、癌幹細胞の機能を抑制する手段は確立されていない。PRMT5は膵癌細胞において、インテグリンを介したシグナル伝達制御やRAS-ERKシグナル伝達制御に関わる遺伝子群を発現制御することが分かった。さらに、発現変動する遺伝子群の中には、スプライシングバリエーションの発現が変化する遺伝子も複数同定された。同時に、GlaxoSmithKlineが開発中のPRMT5阻害剤は、PRMT5の発現量で感受性が規定されることを見出した。このような膵癌細胞に対して、RNA-Seqの結果をもとに、MEK阻害剤とPRMT5阻害剤の併用が高い抗腫瘍効果を発揮することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

PRMT5は膵癌細胞において、インテグリンを介したシグナル伝達制御やRAS-ERKシグナル伝達制御に関わる遺伝子群を発現制御することが分かった。さらに発現変動する遺伝子群の中には、スプライシングバリエーションの発現が変化する遺伝子も複数同定された。同時に、GlaxoSmithKlineが開発中のPRMT5阻害剤は、PRMT5の発現量で感受性が規定されることを見出した。このような膵癌細胞に対して、RNA-Seqの結果をもとに、MEK阻害剤とPRMT5阻害剤の併用が高い抗腫瘍効果を発揮することが分かった。

研究成果の概要（英文）：We conducted RNA-seq analysis and found that PRMT5 upregulated gene expression involved in integrin signaling and RAS-ERK signaling pathways in pancreatic cancer cells. Additionally, we observed that inhibition of PRMT5 altered the splicing variants of several genes. We evaluated the effective dose of PRMT5 inhibitors developed by GlaxoSmithKline and determined the optimal dose through both in vitro and in vivo experiments. Our findings indicated that epithelial pancreatic cancer cells are more sensitive to PRMT5 inhibitors than mesenchymal cancer cells. Furthermore, the sensitivity of pancreatic cancer cells to PRMT5 inhibitors was found to correlate with PRMT5 expression levels. Based on RNA-seq results, we also found that the combination of a MEK inhibitor (Trametinib) and a PRMT5 inhibitor exhibited a high antitumor effect on these pancreatic cancer cells.

研究分野：分子生物学

キーワード：PRMT5 膵癌 アルギニンメチル基転移酵素

1. 研究開始当初の背景

膵臓癌は早期発見が難しく高い転移能を持ち、手術適用率も低く、たとえ手術で腫瘍を切除しても 70%が再発する、極めて悪性度の高い癌である。しかし、膵臓癌に対する有効な治療法はない。

腫瘍を形成する癌細胞の中には、腫瘍形成、転移、腫瘍再発の起点となる、癌幹細胞と呼ばれる細胞集団がある。この癌幹細胞を消失させることができれば、癌の消失へつながることが期待される。しかし癌幹細胞の機能を阻害する有効な手段は確立されていない。

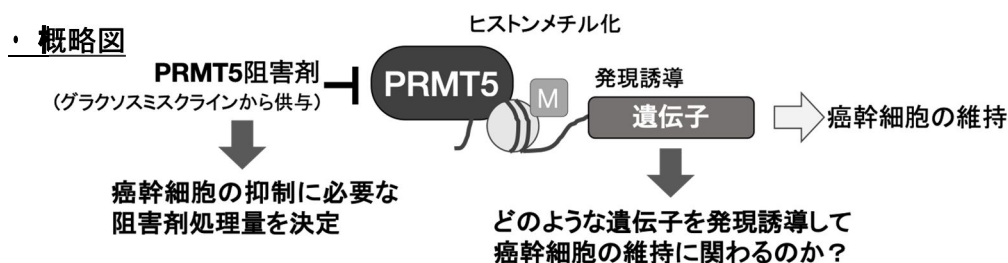
申請者はPRMT5が、細胞質内で癌幹細胞の維持に関わる転写制御因子GLI1をメチル化して、活性化することを明らかにした(Abe Y. et. al., Comm. Biol. 2, Article Number 23 (2019))。PRMT5はリンパ腫や白血病での機能解析が進んでいるが、膵臓癌でPRMT5の詳細な機能解析は皆無である。申請者はPRMT5によるGLI1活性化経路は、肺癌や膵臓癌で癌幹細胞の維持に関わることも見出した。このことからPRMT5の機能を阻害することが、膵臓癌の癌幹細胞を標的とした、新しい治療法となる可能性が浮かんた。PRMT5は細胞質と核に局在し、細胞質ではシグナル伝達に、核では主にヒストンメチル化を介した遺伝子発現制御に関わる。申請者は、細胞質に局在するPRMT5の、新しい癌幹細胞維持機構の一端を明らかにした。しかし癌幹細胞維持において核内のPRMT5が、ヒストンメチル化を介してどのような遺伝子の発現を制御するのか、については未解決であった。

PRMT5は細胞質と核に局在し、細胞質では主にシグナル伝達に、核では主にヒストンメチル化を介した遺伝子発現制御に関わる。申請者は癌幹細胞の維持において、細胞質でのPRMT5の役割を明らかにした。しかし核内のPRMT5がどのような遺伝子を発現制御して、癌幹細胞の維持に関わるのかは未解決であった。癌幹細胞特異的に起こる、ヒストンメチル化のようなエピジェネティック制御による遺伝子発現変化は、癌幹細胞の維持に重要な役割を果たす。従って本研究を通して、PRMT5を介したエピジェネティック制御による、新たな癌幹細胞維持機構を提唱できる可能性が浮かんた。

一方、阻害剤処理やRNAi法を行って様々な癌由来癌細胞株(KRAS遺伝子変異膵臓癌、肺癌、大腸癌)でPRMT5の機能を阻害すると、癌幹細胞の維持が抑制され、腫瘍形成が抑制された。このことからPRMT5の機能を阻害することが、膵臓癌に対して、癌幹細胞を標的とした腫瘍消失を目指す新しい治療法となる可能性が浮かんた。そしてグラクソスミスクライン(GSK)が申請者のこれまでの研究成果に着目し、臨床試験への道筋をつけるため、最新のPRMT5阻害剤の供与を受けることとなった。

2. 研究の目的

- (1) 膵臓癌幹細胞でPRMT5が発現制御する遺伝子群を同定してその役割を解明し、癌幹細胞を維持する上で、核内でのPRMT5の役割を明らかにする。そして、これまでの研究成果と本研究成果を、PRMT5阻害剤を使った膵臓癌に対する臨床試験へ進めるための科学的根拠とする。
- (2) GSKが開発したPRMT5阻害剤が膵臓癌幹細胞の維持を抑制し、腫瘍形成ならびに腫瘍再発を抑えるために必要なPRMT5阻害剤の量を決定する。得られた成果は、PRMT5阻害剤を使った膵臓癌に対する臨床試験の開始に向けた基盤情報とする。



3. 研究の方法

(1) 膵臓癌細胞でPRMT5が発現誘導する遺伝子の解明

間葉系膵臓癌細胞と上皮系膵臓癌細胞にPRMT5阻害剤を処理して、PRMT5の機能を抑制させる。その後RNAを回収して、RNA-seqを行い、PRMT5の機能抑制によって発現変化する遺伝子群を明らかにする。さらにPRMT5の機能抑制によってスプライシングバリエーションが発現変化する遺伝子群も明らかにする。RNA-seqの結果を使い、PRMT5が発現誘導する遺伝子群の機能

解析についてパスウェイ解析ソフトを使って調べる。次に PRMT5 が発現誘導する遺伝子の発現誘導機構を明らかにする。具体的には、遺伝子発現調節領域近傍のメチル化 Histone H3 (H3me2s) に PRMT5 が直接結合することを、ChIP アッセイを行って調べる。

(2) PRMT5 発現誘導遺伝子と膵癌発症・維持との関連性

膵癌細胞で PRMT5 発現誘導遺伝子の機能を抑制したときの細胞増殖抑制、癌幹細胞維持の抑制および腫瘍形成能抑制について検証する。

(3) PRMT5 阻害剤が膵癌幹細胞の維持を抑制し腫瘍形成ならびに腫瘍再発を抑えるために必要な PRMT5 阻害剤の量の決定

In vitro 実験系では上皮系膵癌細胞株 3 種、間葉系膵癌細胞株 4 種を使い、PRMT5 阻害剤が濃度依存的に細胞増殖能や癌幹細胞維持能を抑制するかどうか調べ、IC50 を求める。またヌードマウスに膵癌由来癌細胞株 2 種（上皮系 1 種、間葉系 1 種）の移植腫瘍に対する PRMT5 阻害剤の腫瘍抑制効果を調べる。次に、既存の抗癌剤と PRMT5 の併用効果についても検証する。

4. 研究成果

MIA-PaCa2 細胞（間葉系）AsPC-1 細胞（上皮系）に PRMT5 阻害剤を処理して PRMT5 の機能を抑制した細胞から RNA を回収して、発現変動する遺伝子群を RNA-Seq を行って調べた。その結果、間葉系、上皮系の膵癌細胞で PRMT5 はインテグリンを介したシグナル伝達制御や RAS-ERK シグナル伝達制御に関わる遺伝子群を発現制御することが分かった。

発現変動する遺伝子群の中で、膵癌との関与も報告されている受容体型チロシンキナーゼ RON に着目した。PRMT5 の機能を抑制すると RON の発現が mRNA レベルだけでなく、タンパク質レベルで抑制されることを確認した。PRMT5 による RON の発現誘導機構について、解析を進めている。さらに、PRMT5 は RON 遺伝子のスプライシング制御にも関与している可能性があり、RON 遺伝子のスプライシング制御機構についても解析を進めている。今後は RON 高発現膵癌細胞と低発現膵癌細胞について PRMT5 の活性との相関関係や腫瘍形成能の違いなどを検証する。

また、PRMT5 の機能抑制によって mRNA の発現変化はほとんどないものの、スプライシングバリエーションの発現が大きく変動する遺伝子として、LENG8 を見出した。興味深いことに、この現象は上皮系膵癌細胞と間葉系膵癌細胞の両方で見られた。このことから、PRMT5 による LENG8 のスプライシング制御機構が膵癌発症や維持と深く関わる可能性が考えられた。LENG8 は機能不明な角内タンパク質であるが PRMT5 だけでなく、PRMT6 とも結合することが示唆された。今後、PRMT5 や PRMT6 による LENG8 の制御機構を明らかにするとともに、PRMT5 の機能抑制によって変化する LENG8 スプライシングバリエーションの膵癌における役割などを解明する。

そのほか、細胞周期と密接に関係し、細胞外刺激を受け取るアンテナの役割を果たす一次繊毛の維持に関わる遺伝子群も PRMT5 によって発現制御される可能性を見出した。現在、PRMT5 が一次繊毛形成に関わるか否か、膵癌由来細胞株と膵管上皮由来不死化正常細胞株を使って検証を進めている。

同時に、GlaxoSmithKline が開発中の PRMT5 阻害剤が細胞増殖や腫瘍形成抑制効果を発揮するための処理量を決定する過程で、PRMT5 阻害剤は PRMT5 の発現量に相関して感受性が規定されることを見出した。具体的には PRMT5 は主に間葉系の性質を持つ膵癌由来癌細胞株で発現が高く、PRMT5 阻害剤に対する感受性も低かった。また、PRMT5 の活性は MTAP という分子の発現の有無によって規定されていることが報告されている。しかし、PRMT5 阻害剤の感受性は PRMT5 の発現量のみ依存し、PRMT5 の活性とは無関係であった。

Tet-ON システムを使って PRMT5 の発現抑制を誘導できる膵管細胞移植腫瘍で PRMT5 の発現を抑制すると、腫瘍形成が抑制された。In vitro 実験系の結果と同様に、移植腫瘍で PRMT5 の発現抑制による腫瘍形成抑制率は、上皮系膵癌細胞の方が間葉系膵癌細胞移植腫瘍と比べて高かった。このような膵癌細胞に対して RNA-Seq の結果をもとに、MEK 阻害剤と PRMT5 阻害剤の併用が高い抗腫瘍効果を発揮することが分かった。上述したように PRMT5 は RAS-ERK シグナル伝達経路の活性制御に関わる遺伝子の発現制御にも関わることから、その発現制御機構の解析などを進めている。

また RAS-ERK 経路は下流で cMyc または STAT3 を活性化し、PRMT5 の発現誘導に関わることも見出した。このことから RAS-ERK 経路と PRMT5 は相互に活性化する機構が存在する可能性が示唆された。本研究で明らかになったことを学術論文としてまとめるとともに、GlaxoSmithKline へ膵癌治療法開発のための基盤情報として報告する。

本研究では膵癌細胞で PRMT5 が発現制御する遺伝子群を調べ、PRMT5 を介した新たな膵癌発症・維持機構の解明するために、解析を行なった。本研究の解析は今後も続けられるが、今後は、上皮系膵癌細胞と間葉系膵癌細胞で共通または特異的な PRMT5 の基質分子同定を試みる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Motoji Yusuke, Fukazawa Ryuji, Matsui Ryosuke, Abe Yoshinori, Uehara Ikuno, Watanabe Makoto, Hashimoto Yoshiaki, Miyagi Yasuo, Nagi-Miura Noriko, Tanaka Nobuyuki, Ishii Yosuke	4. 巻 23
2. 論文標題 Statins Show Anti-Atherosclerotic Effects by Improving Endothelial Cell Function in a Kawasaki Disease-like Vasculitis Mouse Model	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 16108 ~ 16108
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms232416108	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 -
1. 著者名 Abe Yoshinori, Sano Takumi, Tanaka Nobuyuki	4. 巻 14
2. 論文標題 The Role of PRMT5 in Immuno-Oncology	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Genes	6. 最初と最後の頁 678 ~ 678
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/genes14030678	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 -
1. 著者名 Yoshinori Abe, and Nobuyuki Tanaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Fine-Tuning of G1I Activity through Arginine Methylation: Its Mechanisms and Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cells9091973	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 -
1. 著者名 Manzo Suzuki, Yoshinori Abe, Yusuke Taguchi, and Hiroyasu Bito	4. 巻 3
2. 論文標題 Effect of Remifentanil-Based Anesthesia on Perioperative Phagocytic Function of Human Monocytes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BPB Reports	6. 最初と最後の頁 45-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

1. 著者名 Wataru Sugimoto, Katsuhiko Itoh, Hiroaki Hirata, Yoshinori Abe, Takeru Torii, Yasumasa Mitsui, Yenima Budirahardja, Nobuyuki Tanaka, and Keiko Kawauchi	4. 巻 7
2. 論文標題 MMP24 as a Target of YAP is a Potential Prognostic Factor in Cancer Patients	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioengineering	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/bioengineering7010018	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4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐野匠, 阿部芳憲, 田中信之
2. 発表標題 肺癌におけるSTAT3とPRMT5の相互活性化機構の役割
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐野匠, 阿部芳憲, 田中信之
2. 発表標題 肺癌におけるSTAT3とPRMT5の相互活性化機構の役割
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 阿部芳憲
2. 発表標題 PRMT5 mediates cancer stemness and acquired drug resistance in EGFR-mutant non small cell lung cancer
3. 学会等名 日本癌学会 (第79回日本癌学会学術総会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿部芳憲
2. 発表標題 PRMT5はEGFR変異非小細胞癌において癌幹細胞維持と薬剤耐性獲得に関わる
3. 学会等名 日本分子生物学会（第43回日本分子生物学会年会）
4. 発表年 2020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	田中 信之 (Tanaka Nobuyuki)	日本医科大学・名誉教授 (32666)	

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