

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07128

研究課題名(和文) 合成致死性を介したPRMT5に依存したHSP90を標的とした阻害剤の開発

研究課題名(英文) Strategy for development of inhibitors targeting PRMT5 for promoting synthetic lethality

研究代表者

市川 朝永 (Ichikawa, Tomonaga)

埼玉医科大学・医学部・講師

研究者番号：80586230

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)：新規がん抑制遺伝子NDRG2はATLを含む多くのがんで有意に発現低下している。NDRG2発現低下はタンパク質群の高リン酸化を引き起こして情報伝達系の恒常的な活性化を惹起し、がん発症進展に関わっていた。さらに、NDRG2発現低下がん細胞で細胞質特異的な高リン酸化PRMT5に依存したアルギニンメチル化異常を見出した。PRMT5、結合タンパク質の発現抑制や酵素活性阻害がNDRG2発現低下ATLで特異的に細胞死を誘導する合成致死性を惹起することを発見した。本研究は合成致死性の機序解析および合成致死性を介したNDRG2欠損がん特異的なPRMT5酵素活性を標的とした新規阻害剤の創出を目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NDRG2発現低下によってストレス応答の恒常性維持機構が破綻し、慢性炎症、異常な情報伝達系および翻訳後修飾の亢進が惹起され、腫瘍発症進展、予後不良、薬剤抵抗性および生存率低下に関与している。そのため、NDRG2欠損がん細胞で特異的に「合成致死」を引き起こすPRMT5阻害を標的とした阻害剤はがんの特異的に効果を発揮し、NDRG2発現が保たれる正常細胞では影響を回避できる可能性が高い。また、検索しようとしている阻害剤は細胞質でのPRMT5阻害効果であり、作用点の違う細胞表面を標的とする抗体、分子標的薬や核内を標的する阻害剤と併用することで容量の低減や副作用の軽減に繋がる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：A novel tumor suppressor N-Myc downstream-regulated gene 2 (NDRG2) is frequently downregulated in many types of tumors, including adult T-cell leukemia/lymphoma (ATL). The loss of NDRG2 expression is involved in aberrant activation of signal transduction pathways through continuous phosphorylation of several signaling molecules, leading to tumor progression. Furthermore, we identified cytoplasmic and hyperphosphorylated protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) associates with abnormal protein arginine methylation in NDRG2low ATL. We found that the suppression of PRMT5, and binding partner expression or the inhibition of enzymatic activity remarkably induces synthetic lethality followed by cell death in NDRG2low ATL. Therefore, the purpose of this study is to analyze the mechanism of synthetic lethality and to lead to a feasible and effective strategy for development of specific inhibitors that targets PRMT5 enzymatic activity for promoting synthetic lethality in NDRG2low cancers.

研究分野：腫瘍生物学関連

キーワード：PRMT5 NDRG2 HSP90 ATL がん

## 様式 C-19、F-19-1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

申請者は成人 T 細胞白血病リンパ腫 ATL(Adult T cell lymphoma/leukemia)を含む多くの腫瘍で、長期的なウイルス感染や発がん化合物暴露によるゲノムおよびエピゲノム異常が過度なストレス応答を制御する因子である NDRG2(N-myc downstream-regulated gene 2)を特異的に発現低下させることを同定した。NDRG2は脱リン酸化酵素 PP2A(Protein phosphatase 2A)と複合体を形成し、様々な情報伝達系(PI3K/AKT、NF- $\kappa$ B)の調節因子(PTEN、NIK)を脱リン酸化して過度なストレス反応を負に制御していた。NDRG2が発現低下すると PP2A と基質が複合体を形成できず、基質の高リン酸化が維持され情報伝達系の異常亢進を誘導していた。この機構により NDRG2 発現低下が腫瘍形成に関与することを見出した。ATL および悪性度の高い固形がんでは、NDRG2 発現低下が高頻度に認められ、脱リン酸化 negative feedback 機構が破綻し細胞内リン酸化修飾が亢進していることが示唆された。これらを要因とする情報伝達系および翻訳後修飾の異常が、ATL を含む様々な腫瘍の発症・進展に関わると考えている。

NDRG2 発現低下に伴うリン酸化異常を同定するために、液体クロマトグラフィー質量分析法 LC/MS(liquid chromatography Mass spectrometry)を使った NDRG2 結合タンパク質同定および 2DICAL 法(2-Dimentional Image Converted Analysis of Liquid chromatography and mass spectrometry)を用いて翻訳後修飾を網羅的に解析した。その結果、NDRG2 に結合して脱リン酸化されるタンパク質群としてアルギニンメチル基転移酵素群 PRMT5(Protein Arginine methyltransferase 5)/MEP50(Methylosome Protein 50)等の重要なタンパク質群を新たに同定した。正常 CD4<sup>+</sup>T 細胞と NDRG2 発現低下 ATL 細胞では PRMT5 と MEP50 発現量は変化していなかったが、正常 CD4<sup>+</sup>T 細胞では PRMT5 と MEP50 は核内に存在してヒストンをアルギニンメチル化していた。一方で ATL 細胞では、PRMT5 は高リン酸化型で存在し、細胞質で HSP90A(heat shock protein 90A)と複合体を形成していた。NDRG2 発現低下 ATL 特異的な PRMT5/HSP90A 複合体は PRMT5 による HSP90A のアルギニンメチル化(Arginine345、386)を惹起し、補助因子(co-chaperone)である AHA1 や p23 との結合が増強した。その結果、HSP90A のシャペロン活性が亢進し、細胞増殖亢進、アポトーシス抑制および分化制御に関与するがん促進クライアントタンパク質の安定化・活性化に寄与し、がん発症・進展を促進していた。NDRG2 発現低下 ATL がん細胞で PRMT5 を発現低下させると、HSP90A のアルギニンメチル化が消失してシャペロン活性が低下し、クライアントタンパク質の分解を誘導して細胞死を引き起こした。NDRG2 発現正常細胞では核に偏在している PRMT5 を発現低下させてもこのような細胞死を誘導しないため、NDRG2 発現低下 ATL がんにおける細胞質局在 PRMT5/MEP50 阻害が合成致死性(Synthetic lethality)を惹起することを見出した。

### 2. 研究の目的

申請者の見地である「NDRG2 発現低下 ATL がん細胞での細胞質局在 PRMT5 による HSP90 アルギニンメチル化」と「PRMT5 抑制による合成致死性」が治療標的となるかを目的として研究を行う。

NDRG2 発現は ATL や固形腫瘍で発現が低下している。NDRG2 欠損がん細胞で特異的に「合成致死」を引き起こす PRMT5 阻害を介した HSP90 活性抑制を標的とした阻害剤はがんの特異的に効果を発揮し、NDRG2 発現が保たれる正常細胞では影響を回避できる可能性が高い。また、検索しようとしている阻害剤は細胞質での PRMT5 阻害効果であり、作用点の違う細胞表面を標的とする抗体、分子標的薬や核内における DNA 合成阻害、細胞分裂阻害、DNA 損傷を惹起する阻害剤と併用することで作用場所および機構が異なって相乗効果が高まり、容量の低減や副作用の軽減に繋がる可能性がある。

### 3. 研究の方法

PRMT5/HSP90 を標的とした阻害剤の開発に着手し、スクリーニング系を構築する。合成致死性を標的とした阻害剤スクリーニングとして、第一段階は NDRG2 発現低下がん細胞で生存率が低下し(40%以下)、NDRG2 発現コントロール細胞で生存率が低下しない(80%以上)化合物を検索する。第二段階は PRMT5/HSP90 直接または複合体阻害によるシャペロン活性低下がクライアントタンパク質(AKT1)の分解を引き起こす化合物に絞って新規阻害剤の開発を目指す。

「合成致死」に関与する因子として PRMT5 と複合体を形成し、酵素活性を増強する MEP50 を同定した。PRMT5/MEP50 の機能解析を行う。

#### (1)阻害剤スクリーニング

阻害剤候補のライブラリーを用いて NDRG2 発現低下 ATL がん細胞での細胞死と HSP90 クライアントタンパク質分解を引き起こす化合物(2000~)を検討する。

**第一段階：** Control として正常 T 細胞、非 ATL の NDRG2 発現 T 細胞急性リンパ性白血病 T-ALL(Jurkat、MOLT4)細胞株や各臓器正常細胞株、NDRG2 欠損がん細胞として ATL 患者検体、ATL(KK1、SO4)細胞株や各臓器がん細胞株に候補化合物を添加する。DMSO のみの吸光度を細胞生存率 100%として候補化合物と比較検討する。正常 T 細胞・NDRG2 発現細胞では生存率 80%以上、NDRG2 欠損 ATL がん細胞では生存率 40%以下の化合物を候補とする。

**第二段階：** クライアントタンパク質分解スクリーニングを行うため高感度タンパク質量が可能な pBiT3.1 発光システム(Luciferase activity)を利用する。クライアントタンパク質として標的遺伝子 AKT1-HiBiT 融合ベクターを作製し (pBiT3.1-AKT1)、ATL がん細胞に導入する。PRMT5/HSP90 阻害効果を有する化合物で細胞を処理すると、未処理導入細胞に対して AKT1-HiBiT 融合タンパク質が分解され発光量が減少する。Luminescence 値を比較検討し、候補化合物を選別する。

#### (2)PRMT5 既知阻害剤の評価

ATL がん関連細胞株に既知 PRMT5 阻害剤を付加する。PRMT5 または HSP90 抗体を用いて免疫沈降してタンパク質間結合を確認し、さらにリン酸化認識抗体やアルギニンメチル化認識抗体(SYM10)でウェスタンブロット(WB)して翻訳後修飾を検討する。細胞局在(細胞質、核等)(免疫染色)、酵素活性(ヒストン、HSP90 のアルギニンメチル化)(特異的抗体による WB)、HSP90 クライアントタンパク質(AKT、NEMO、CDK4、CDK6 等)の安定性評価(WB、定量 PCR)および細胞表現系(形態、細胞増殖、apoptosis、FACS、invasion/migration 等)を検討する。

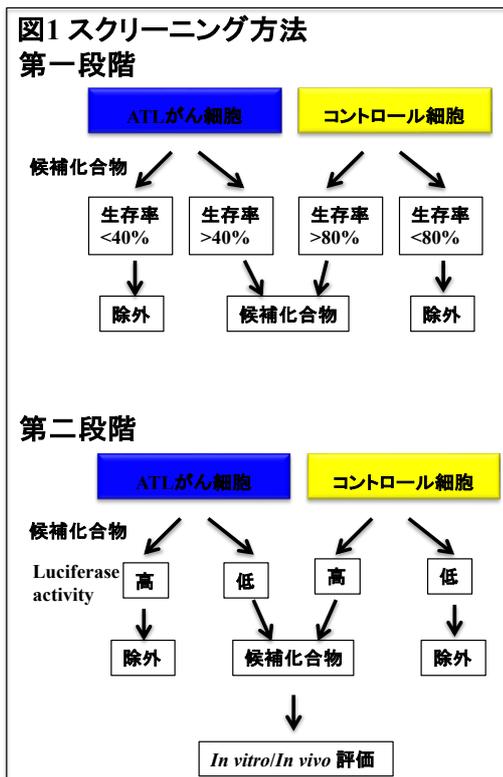
#### (3)MEP50 の機能解析

MEP50 発現低下細胞株を作製し、細胞局在、酵素活性(ヒストン、HSP90 のアルギニンメチル化)、HSP90 クライアントタンパク質(AKT、NEMO、CDK4、CDK6 等)の安定性評価および細胞表現系を検討する。

### 4. 研究成果

#### (1)阻害剤スクリーニング

新規 PRMT5/HSP90 阻害剤開発のために、2000 候補化合物の細胞生存率測定(第一スクリーニング)と高感度タンパク質量が可能な Luciferase 発光



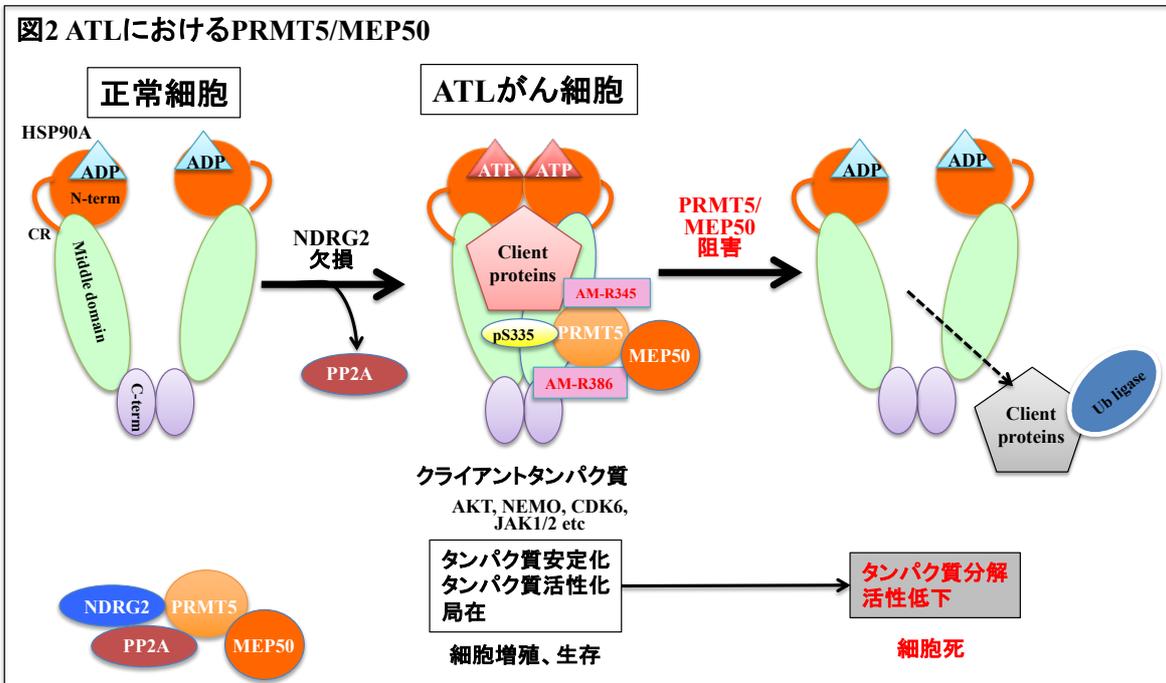
システムを用いたクライアントタンパク質分解測定(第二スクリーニング)を行なった。第一段階および第二段階の評価基準に一致した化合物を数種類同定した。さらに候補化合物を *in vitro* および *in vivo* 実験で検証していく(図 1)。

## (2)既知阻害剤の評価

NDRG2 発現低下 ATL 細胞で PRMT5 を標的として阻害をすれば、細胞質の HSP90A 活性を特異的に阻害し細胞死を誘導できると考え、既知 PRMT5 阻害剤の EPZ015666 および改良版である GSK591 を用いて ATL 細胞株に対する影響を検討した。しかし、MCL に対する IC50(nM オーダー)よりも 1000 倍以上の高濃度でも細胞増殖抑制やクライアントタンパク質分解等の特異性の高い効果が得られなかった。CMP5 や HLCL-61 では、細胞増殖阻害およびクライアントタンパク質分解効果は見られるが正常細胞との阻害効果の差異が2倍程度と小さく、NDRG2 発現低下 ATL 使用に合致しないことがわかり、新規阻害剤開発の必要性に迫られた。

## (3)MEP50 の機能解析

正常細胞では PRMT5 と MEP50 は核内に存在してヒストンをアルギニンメチル化して遺伝子発現を制御していた。NDRG2 発現低下 ATL がん細胞では、高リン酸化型 PRMT5 は MEP50 と強固の複合体を形成し細胞質に偏在して HSP90 と結合していた。さらに、HSP90 アルギニンメチル化促進によるシャペロン活性亢進、クライアントタンパク質安定化を惹起し腫瘍化と繋がっていた。MEP50 を抑制すると HSP90 シャペロン活性が低下しアポトーシスを誘導したが、NDRG2 発現細胞では、MEP50 を抑制してもがん抑制効果は見られなかった。NDRG2 発現細胞で PRMT5 脱リン酸化されると PRMT5/MEP50 複合体形成が低下し、別々に核内に存在していることを示した。NDRG2 発現低下依存的な細胞質 PRMT5/MEP50/HSP90 を抑制すると特異的にがん細胞を死滅させる合成致死性が惹起されることを明らかにし、この複合体を治療標的にすることは正常細胞に副作用が少なく、幅広い NDRG2 発現低下がんに有用であることが分かった(図 2)。



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 8件/うちオープンアクセス 8件）

1. 著者名 Wang Y, Shimosaki S, Ikebe E, Iha H, Yamamoto JI, Fife N, Ichikawa T, Hori M, Ogata M, Tsukamoto Y, Hijiya N, Moriyama M, Hagiwara S, Kusano S, Saito M, Ahmed K, Nishizono A, Handa H, Morishita K.	4. 巻 24
2. 論文標題 IMiD/CELMoD-induced growth suppression of adult T-cell leukemia/lymphoma cells via cereblon through downregulation of target proteins and their downstream effectors.	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Frontiers in Oncology	6. 最初と最後の頁 1272528
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fonc.2023.1272528	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 該当する

1. 著者名 Ichikawa Tomonaga, Sugamoto Kazuhiro, Matsuura Yasushi, Kunitake Hisato, Shimoda Kazuya, Morishita Kazuhiro	4. 巻 113
2. 論文標題 Inhibition of adult T cell leukemia cell proliferation by polymerized proanthocyanidin from blueberry leaves through JAK proteolysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1406 ~ 1416
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15277	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 該当する

1. 著者名 Suekane A, Ichikawa T, Saito Y, Nakahata S, Morishita K.	4. 巻 42
2. 論文標題 The CGRP Receptor Antagonist MK0974 Induces EVI1 high AML Cell Apoptosis by Disrupting ERK Signaling.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 4743-4752
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2187/anticanres.15979	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 該当する

1. 著者名 Permatasari HK, Nakahata S, Ichikawa T, Fauzi YR, Kiyonari H, Shide K, Kameda T, Shimoda K, Ono M, Taki T, Taniwaki M, Futakuchi, Morishita K.	4. 巻 111
2. 論文標題 Oncogenic isoform switch of tumor suppressor BCL11B in adult T-cell leukemia/lymphoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Hematology	6. 最初と最後の頁 41-49
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.exphem.2022.04.004	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 該当する

1. 著者名 Asada T, Nakahata S, Fauzi YR, Ichikawa T, Inoue K, Shibata N, Fujii Y, Imamura N, Hiyoshi M, Nanashima A, Morishita K.	4. 巻 42
2. 論文標題 Integrin 6A (ITGA6A)-type Splice Variant in Extracellular Vesicles Has a Potential as a Novel Marker of the Early Recurrence of Pancreatic Cancer.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 ANTICANCER RESEARCH	6. 最初と最後の頁 1763-1775
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21873/anticanres.15653	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 該当する

1. 著者名 Kaneda-Nakashima K, Igawa K, Suwanruengsri M, Fuke N, Ichikawa T, Funamoto Taro, Kurogi S, Sekimoto T, Yamashita Y, Chosa E, Yamaguchi R, Morishita K.	4. 巻 410
2. 論文標題 Role of Me11/Prdm16 in bone differentiation and morphology.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Experimental Cell Research	6. 最初と最後の頁 112969
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.yexcr.2021.112969	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 該当する

1. 著者名 Fauzi YR, Nakahata S, Chilmi S, Ichikawa T, Nueangphuet P, Yamaguchi R, Nakamura T, Shimoda K, Morishita K.	4. 巻 16
2. 論文標題 Antitumor effects of chloroquine/hydroxychloroquine mediated by inhibition of the NF- B signaling pathway through abrogation of autophagic p47 degradation in adult T-cell leukemia/lymphoma cells.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0256320
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0256320	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 該当する

1. 著者名 Morishita K, Nakahata S, Ichikawa T.	4. 巻 112
2. 論文標題 Pathophysiological significance of NDRG2 in cancer development through PP2A phosphorylation regulation.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 22-30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14716	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 該当する

[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 Tomonaga Ichikawa, Kazuhiro Morishita, Akihiro Nakamura, Yutaka Horiuchi, Takashi Murakami.
2. 発表標題 Interference with MEP50 inhibits HSP90 function and tumor development in NDRG2low adult T-cell leukemia.
3. 学会等名 第82回日本癌学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 Analysis of the constitutive activation of Jak/STAT signaling pathway through the loss of tumor suppressor gene NDRG2.
3. 学会等名 第81回日本癌学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 Development of the treatment for adult T cell leukemia/lymphoma (ATL) by highly polymerized proanthocyanidins from blueberry leaves.
3. 学会等名 第94回日本生化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Tomonaga Ichikawa
2. 発表標題 Treatment of ATL via proteasomal degradation of JAK by highly polymerized proanthocyanidins from blueberry leaves.
3. 学会等名 第80回日本癌学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 市川朝永、森下和広	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 2
3. 書名 Medical Science Digest	

1. 著者名 市川朝永、森下和広	4. 発行年 2021年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 4
3. 書名 月刊「細胞」	

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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