

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年3月31日現在

機関番号：15301
 研究種目：挑戦的萌芽研究
 研究期間：2011～2012
 課題番号：23659724
 研究課題名（和文）骨肉腫におけるオミックス解析技術を用いた新たな抗分子標的療法の開発
 研究課題名（英文）Identifidcation of Runx2 arginine methylation as a potent of target for osteosarcoma
 研究代表者
 尾崎 敏文（OZAKI TOSHIFUMI）
 岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
 研究者番号：40294459

研究成果の概要（和文）：骨分化に必須かつ特異的転写因子である RUNX2 とアルギニンメチル化酵素の相互作用の可能性を *in vitro* で検討し RUNX2 の PRMT4 及び 5 によるアルギニンメチル化を確認した。このメチル化修飾は骨肉腫細胞の細胞周期依存性であった。また、RUNX2 の同蛋白修飾を骨肉腫検体にて発現をみたところ、予後との関連も有る事が確認できた。RUNX2 の発現は組織特異的であるため将来の分子特異的治療のターゲットとして期待できる研究成果を示す事ができた。

研究成果の概要（英文）：We examined the interaction between PRMT4 and 5 with RUNX2, is major transcription factor in osteoblast differentiation. We found the post-translational arginine methylation of. Using aRunx2me2 antibody we also disclosed the frequency of Runx2me2s is high at Japanese OS patient of poor prognosis in long term prognosis ($p < 0.01$). A DNA binding activity of RUNX2 to certain target gene were increased by arginine methylation at mitotic phase. Protein expression of Runx2me2 was specifically at mitotic phase and existed on chromosome in the SAOS-2 cell line. Our results confirm that arginine methylation of RUNX2 by PRMTs affects its function as a transcription factor. This is first report to disclose relationship between protein arginine-methylation and cancer.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野：骨悪性腫瘍におけるバイオマーカー

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：RUNX2, PRMTs, 蛋白修飾、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

骨芽細胞を含め骨格を形成する細胞の分化は、未分化間葉系細胞からそれぞれ異なった転写因子によって決定される。Runx2 (runt-related gene2)/Cbfa1 (core binding factor1)は骨芽細胞への分化因子であると共に、軟骨細胞の成熟にも必要な因子である。Komoriらは、Runx2欠損マウスモデルを用いて骨形成の完全な欠損を示した¹。このことから、Runx2は四肢の成長にとって非常に重要な因子であることが分かる。Runx2の活性型蛋白修飾としてはリン酸化がすでに報告されている²。しかしながら、Runx2のリン酸化と骨肉腫細胞の悪性化への関与を検討した報告は無い。これは、Runx2のリン酸化のみが同蛋白の転写機能の制御を行っているだけでなく、他にもRunx2の転写制御に関わる蛋白修飾因子が存在するため活性型としてのリン酸化Runx2の機能が制御されている事が考えられる。アルギニンは陽性荷電されたアミノ酸で、自らの持つ水酸基を介して、他の蛋白との結合能力を持たせる³。しかしながら、同時にアルギニンはアルギニンメチル化酵素群 (PRMTs)により単価もしくは2価のメチル基を付加することで蛋白結合能を制御する事ができる。アルギニンは多くの転写因子や酵素活性蛋白の結合部位に多く存在し、同部位へのメチル基付加は、その蛋白の他の蛋白との複合体形成能に強く影響を及ぼす。Xhaoらは、AMLにおいて高頻度に転座遺伝子として認められるRunx1蛋白において、アルギニンメチル化があることを認め、この蛋白修飾が蛋白間結合に強く関与し、さらにAMLの癌化メカニズムに及ぼす影響を考察していることを報告した⁴。Runx1は骨芽細胞分化誘導因子のRunx2と多くの部分で相同性を示し、Runx1においてアルギニン

メチル化が認められた領域のシーケンスはRunx2とも強い相同性を示すことが分かっている。

引用文献

1. Komori T, et al. Cell 30(1997)
2. Xiao G, et al. J Biol Chem. 9(2002)
3. Bedford MT. Cell 16(2009)
4. Zhao X, et al. Genes Dev. 5(2008)

2. 研究の目的

ヒト骨肉腫において、骨芽細胞分化に重要な役割を持つRunx2遺伝子のタンパク修飾の変化(アルギニンメチル化)の機能的意義、すなわち同修飾存在の有無と悪性度への関与を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

①Runx2タンパク局在の確認

Runx2アルギニンメチル化抗体で陽性を示す蛋白発現をSaOS骨肉腫細胞株で確認する。次に、アルギニンメチル化Runx2の細胞分裂期での発現を確認するため細胞周期抑制剤を用いて細胞分裂期に同期させたSaos2細胞を用い解析を行う。

②Runx2のアルギニンメチル化を担当する酵素の同定

骨肉腫細胞株を用いて細胞内でのRunx2とアルギニンメチル化Runx2の細胞内での局在をウエスタンブロット法を用いて確認する、

③アルギニンメチル化Runx2の細胞分裂期での発現

細胞周期抑制剤を用いて細胞分裂期に同期させたSaos2細胞を用い解析を行った。

④Runx2のアルギニンメチル化の転写活性能に及ぼす影響

Runx2アルギニンメチル化が転写活性能へ及ぼす変化の性質を確認するため、抗Runx2抗

体と抗アルギニンメチル化抗体をそれぞれ用いて、クロマチン免疫沈降 (ChIP) 解析を行った。

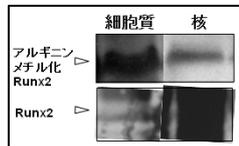
⑤ Runx2 のアルギニンメチル化と臨床評価の検討

Runx2 のアルギニンメチル化の発現頻度の確認を骨肉腫生検標本と化学療法後の抽出標本のそろった 38 検体で行い、Runx2 のアルギニンメチル化と予後の統計学的検討を行う。アルギニンメチル化の検出は特異抗体を用いたウェスタンブロット法にて行い、アルギニンメチル化の頻度は、オリジナルの Runx2 の発現頻度と比較して行う。発現頻度の確認を行い、続いて Runx2 のアルギニンメチル化と予後、薬剤耐性の有無等の統計学的検討を行い、Runx2 のアルギニンメチル化の頻度が骨肉腫組織に及ぼす意義を検討する。

4. 研究成果

① 細胞内での Runx2 とアルギニンメチル化

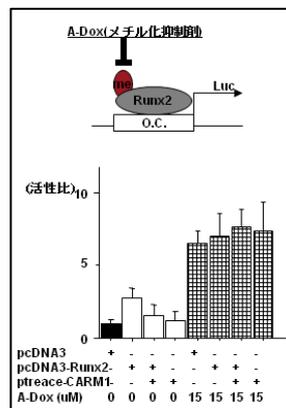
Runx2 の細胞内での局在を Saos2 細胞で確認すると、アルギニンメチル化 Runx2 は核内よりもむしろ細胞質に局在を示す事が分かった (図 1 アルギニンメチル化 Runx2 タンパクの局在)。



② ルシフェラーゼ解析を用いた転写機能解析

Runx2 のオステオカルシンプロモータへの転写活性機能が抑制されている事が分かった。

また、この抑制作用は、A-Dox (メチル化抑制剤) により解除された (図 2. Runx2

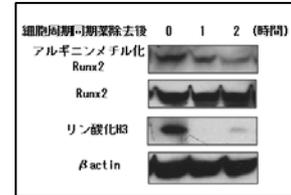


の転写活性)。

③ アルギニンメチル化 Runx2 の細胞分裂期での発現

Western Blot 解析でも G2 期同期薬除去後極めて早期よりリン酸化ヒストン H3 と同時期にアルギニンメチル化

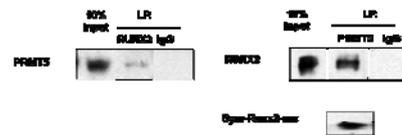
Runx2 の発現を確認できた (図



3. 細胞周期同

調後のアルギニンメチル化 Runx2 タンパクの発現)

④ Runx2 アルギニンメチル化抗体を用いる事により RUNX2 蛋白修飾の存在を確認した。

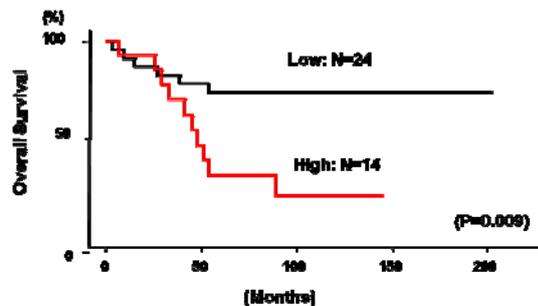


RUNX2 と PMRT 5 との蛋白結合を骨肉腫細胞抽出液で確認した。RUNX2 アルギニンメチル化抗体を用いて骨肉腫細胞株での細胞周期特異的な発現を確認した (図 4. Runx2 と PMRT5 の結合)。

これらより、Runx2 は PMRT5 と結合しており、かつ、アルギニンがメチル化していることが示された。

⑤ Runx2 のアルギニンメチル化の発現頻度の確認

RUNX2 アルギニンメチル化抗体陽性検体と陰性検体では予後に差が見られた



(p=0.009) (図 5. 骨肉腫検体におけるアルギニンメチル化 Runx2 タンパクの発現と

予後)。

本研究では、Runx2 のアルギニンメチル化と腫瘍悪性化の関連性を明らかにするとともに、骨肉腫臨床検体において悪性化との関与を示した。今後さらに Runx2 のアルギニンメチル化抑制を目的とした化学化合物の作成を行い、同化合物を用いて抗腫瘍効果を確認する予定である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

1. Aki Yoshida, Tatsuo Ito, Toshifumi Ozaki, et al. Role of post translational modification of RUNX2 transcription factor in osteosarcoma, APMSTS, Sep, 7-9, 2012, Kuala Lumpur, Malaysia
2. Tatsuo Ito, Toshifumi Ozaki, et al. Role of post-translational modification of RUNX2 transcription factor in osteosarcoma, CTOS, Nov, 15, 2012, Prague, Czech Republic

6. 研究組織

(1) 研究代表者

尾崎 敏文 (OZAKI TOSHIFUMI)
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授
研究者番号：40294459

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

(4) 研究協力者

川井 章 (KAWAI AKIRA)
独立行政法人国立がん研究センター・中央病院・医長

伊藤 達男 (ITO TATSUO)
Memorial Sloan-Kettering Cancer
Center, Molecular pathology,
researcher