

論文の内容の要旨

応用生命工学専攻
平成 24 年度博士課程進学
氏 名 高井 弘基
指導教員名 秋山 徹

論文題目

5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis as an Epigenetic and Epitranscriptomic Regulator

(5-ヒドロキシメチルシトシンはエピジェネティック及びエピトランスクリプトミック制御を介して膠芽腫形成に必須な役割を果たす)

1. 序論

近年、がん組織を構成する細胞集団のうち、一部の細胞群が高い造腫瘍能をもつことが明らかとなった。これらの細胞は高い薬剤排出能力や DNA 修復能力を有しているとともに、自己複製能や多分化能などの幹細胞様の性質を持つことから、がん幹細胞 (cancer stem cells) と呼ばれる。1990 年代、急性骨髄性白血病におけるがん幹細胞の存在が示唆され、さらに 2003 年に固形がんである乳がんにおいてもがん幹細胞の存在が示されたことを端緒とし、他のがん種においても次々とがん幹細胞の存在が報告された。膠芽腫においても、膠芽腫がん幹細胞が分離・同定されており、当研究室においても、ヒト膠芽腫の多数の検体から膠芽腫がん幹細胞の分離・培養を試み、既に複数の細胞株の樹立に成功している。

膠芽腫 (glioblastoma) は、WHO grade IV の最も悪性度の高い脳腫瘍である。主な特徴として、周辺組織への高い浸潤能や顕著な血管新生が挙げられ、生命活動を律する脳という臓器の特殊性からも外科手術による全摘出は困難を極める。最近の統計では、原発性脳腫瘍全体の統計的な 5 年生存率が 76%であるのに対し、膠芽腫は 10%未満であることがわかっており、膠芽腫に対する新たな治療法の開発が希求されている。

5-hydroxymethylcytosine (5hmC) は、5-methylcytosine (5mC) が Ten-Eleven Translocation (TET) family によって酸化されることにより生じる DNA 塩基である。5hmC はシトシンの脱メチル化プロセスにおける中間体とされるほか、特異的な結合タンパク質を介して転写制御にも関与すると考えられている。本研究で筆者らは、東京大学医

学部附属病院の脳神経外科より膠芽腫検体の提供を受け、無血清培養により、がん幹細胞を維持した状態で培養した。次に、それらの膠芽腫細胞を解析することで、膠芽腫において TET1 が高発現しており、全シトシンの約 1% に相当する多量の 5hmC が存在することを見出した。さらに、質量分析計を用いたアプローチによって、新規 5hmC 結合タンパク質 chromatin target of PRMT1 (CHTOP) を同定し、TET1 や CHTOP が膠芽腫発生に必須な役割を果たす分子メカニズムを明らかとした。

2. TET1 は膠芽腫の発生に必須である

まず、RNAi ライブラリーを使用した網羅的スクリーニングによって、膠芽腫においてがん幹細胞マーカー CD133 の発現を正に制御する因子を約 150 同定した（高井弘基 修士論文）。次に、同定された 150 の遺伝子の中でも、特に 5hmC 産生酵素である TET1 に着目した。膠芽腫細胞のゲノムを Dot blot 法によって解析すると、正常な神経幹細胞や、血清培養によって維持される既存の膠芽腫細胞と比較して、無血清培養によってがん幹細胞を維持した状態で培養した膠芽腫はゲノムの 5hmC 含量が顕著に高いことが判明した。これらの株において、TET family (TET1~TET3) の発現量を比較すると、TET1 の発現量が特に高いことも判明した。質量分析計を用いて 5hmC を絶対定量した結果、ゲノム中の全シトシンの約 1% にも及ぶ 5hmC が存在することが見出された。同様の結果は、摘出直後の膠芽腫組織においても確認された。

次に、網羅的シーケンシング技術を用い、膠芽腫細胞と正常な神経幹細胞のゲノムにおける 5hmC のマッピング比較解析を行った (hMeDIP-seq 法)。神経幹細胞においては 5hmC は約 600 遺伝子に存在するのに対し、膠芽腫細胞においては約 6500 遺伝子に 5hmC が検出された。また、5hmC はプロモーター領域のほか、遺伝子の内側の領域に多く存在することが判明した。特に、*EGFR*, *AKT3*, *CCND2*, *CDK6*, *BRAF* など、膠芽腫において高頻度に活性化しているシグナル伝達経路や、造腫瘍性の維持に寄与する因子群の遺伝子座に 5hmC が多く存在することが明らかとなった。

膠芽腫細胞において RNAi 法を用いて TET1 の発現を抑制すると、増殖やスフィア形成が顕著に抑制され、免疫不全マウスの脳内における腫瘍形成能が失われていた。また、このとき 5hmC の量が減少し、上記の遺伝子群の発現量が低下していた。これらの結果から、膠芽腫細胞においては TET1 の高発現によってゲノム中に多量の 5hmC が存在し、5hmC が造腫瘍性に重要な遺伝子群の転写を促進していることが示唆された。

3. 新規 5hmC 認識タンパク質複合体の同定

5hmC が造腫瘍性と関連する遺伝子群の転写を促進する分子機構を明らかとするため、膠芽腫細胞の核抽出液から、化学合成した 5hmC に特異的に結合するタンパク質を精製し、質量分析計によって解析した。中でも候補タンパク質 CHTOP が 5hmC に特異的に結合することが、5hmC オリゴを用いたプルダウン実験及びゲルシフト実験によって確認さ

れた。さらに、CHTOPがSDS-PAGE上で2重のバンドを呈することから、CHTOPが受ける翻訳後修飾を質量分析によって解析した。結果、CHTOPの多数のアルギニン残基がメチル化修飾を受けていることが判明した。さらなる生化学的解析により、CHTOPが5hmCと結合するためには、CHTOPが持つグリシンとアルギニンに富む領域 (glycine and arginine rich domain) の後端に連続して存在する特定のアルギニン残基群が、protein arginine methyltransferase 1 (PRMT1) によって非対称的にジメチル化されることが必要であることが判明した。

4. CHTOPはゲノム上の5hmCにmethylosomeを誘導し、転写を正に制御する

CHTOPの機能を明らかにするため、CHTOPの複合体を精製し、質量分析によって解析した。その結果、CHTOPがPRMT1, PRMT5, methylosome protein 50 (MEP50), enhancer of rudimentary homolog (ERH) と相互作用していることが判明した。これらのタンパク質は、methylosomeと呼ばれるヒストンメチル化酵素複合体の最小構成因子群であった。CHTOPとmethylosomeが5hmCに特異的に結合することは、膠芽腫細胞を用いたプルダウン実験によって確認された。

RNAiによってTET1あるいはCHTOPを抑制すると、クロマチンからmethylosomeが遊離することが判明した。またこのとき、5hmCを伴う遺伝子座に存在するmethylosomeや、ヒストンH4のアルギニンのメチル化修飾が減少していた。さらに、TET1、CHTOP、PRMT1、PRMT5をRNAiによって抑制した場合のtranscriptomeをRNA-seq法によって解析すると、これらの因子を抑制したときのtranscriptomeの変化が互いに強い正の相関を持っていることが見出された。

さらに、RNAiによってCHTOPを抑制すると、TET1を抑制した場合と同様に、5hmCを伴う造腫瘍性に重要な因子群の発現量が低下し、増殖・スフィア形成が抑制され、免疫不全マウス脳内における造腫瘍性が失われることが明らかとなった。これらの結果から、CHTOPがmethylosomeを5hmCの存在する遺伝子座に誘導し、周辺のヒストンH4をメチル化することで転写を正に制御していることが示唆された。

5. 総括

本研究で筆者らは、血清培養で維持される従来の膠芽腫細胞ではなく、無血清培地で維持された膠芽腫検体を用いることで、これまで見出されなかった、造腫瘍性を支える新しい分子機構を解明した。本研究によって、膠芽腫のゲノム中には5hmCが多量に含まれ、さらに5hmCがCHTOP-methylosome複合体を誘導することで、造腫瘍性と関連する遺伝子群の転写を正に制御し、膠芽腫の発生に必須な役割を果たすことが明らかとなった。これらの結果から、TET1あるいはmethylosomeが膠芽腫に対する分子標的薬の有望な標的となると考えられる。また、TET1のノックアウトマウスが正常に生育することから、TET1に対する分子標的薬は副作用の少ない抗がん剤となることが期待される。

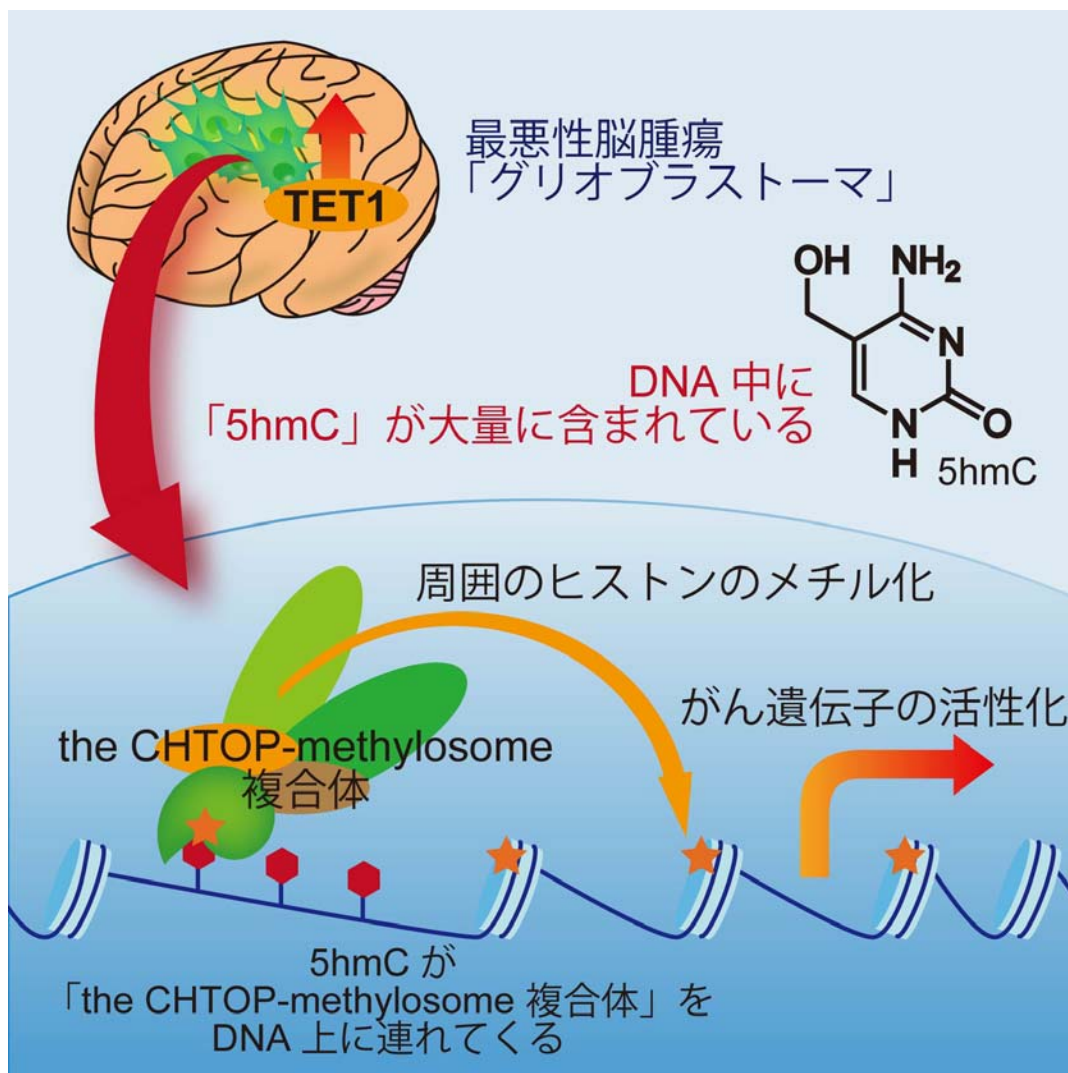


図1. 膠芽腫発生における 5hmC の必須な役割

発表論文

Takai, H. *et al.* 5-Hydroxymethylcytosine Plays a Critical Role in Glioblastomagenesis by Recruiting the CHTOP-Methylosome Complex. *Cell reports* **9**, 48-60, doi:10.1016/j.celrep.2014.08.071 (2014).