

審査の結果の要旨

氏名 高井 弘基

膠芽腫 (glioblastoma) は、WHO grade IV に分類される最も悪性度の高い脳腫瘍である。頭蓋内部に発生する腫瘍のうち、約 10%を占め、悪性脳腫瘍の中では最も頻度が高い。周辺組織への高い浸潤能や顕著な血管新生能を有しており、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である。原発性脳腫瘍全体の統計的な 5 年生存率が約 76%であるのに対し、膠芽腫は 10%未満であり、平均的な予後は 1.5 年程度にとどまることから、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が、その分子メカニズムはこれまで明らかではなかった。

本研究では、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、ゲノム中の全シトシンの約 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、TET1 の酵素活性は膠芽腫の生育や、幹細胞性・造腫瘍性の維持に必須であることを明らかとした。また、膠芽腫細胞においては、“glioblastoma core pathway” と呼ばれる、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判明した。さらに、質量分析計を用いた網羅的アプローチによって、新規 5hmC 結合タンパク質 chromatin target of PRMT1 (CHTOP) を同定した。加えて、CHTOP が methylosome と呼ばれるタンパク質メチル化複合体と相互作用しており、5hmC の存在する遺伝子座へと methylosome を誘導し、周辺のコルヒチンをメチル化することで、造腫瘍性の維持に寄与する因子群の転写を促進することを明らかとした。以上のことから、5hmC による転写制御メカニズムが初めて明らかとなった。

CHTOP が強い正電荷を帯びたタンパク質であることから、5hmC と CHTOP によるクロマチンの高次構造制御に着目し、膠芽腫がん幹細胞において 5hmC 依存的に開いたクロマチンが維持されており、また、開いたクロマチンが膠芽腫がん幹細胞の維持に必須であることを発見した。

さらに本研究では、5hmCがDNAだけでなく、RNA中にも存在することを見出した。5hmCはmRNA中に存在し、細胞質・核内においてfocus様の局在パターンを示すことが、申請者らの考案したDNA中の5hmCの特異的マスクング法により明らかとなった。また、メチオニンのアナログを利用したパルスラベル実験によって、それらのfocus様の構造体において、翻訳がおきていることが示唆された。さらに、5hmCを含んだmRNAを使用した*in vitro*翻訳アッセイにより、mRNA中の5hmCが翻訳に重要な役割を果たすことが明らかとなった。また、CHTOPがDNAだけでなく、RNA中の5hmCに結合し、mRNAの核外輸送に重要な役割を果たすことが示唆された。

本研究により、膠芽腫のゲノム中に多量の5hmCが含まれ、5hmCが膠芽腫の発生に重要な役割を果たすことが明らかとなった。本研究は、5hmCによる転写制御の分子メカニズムを初めて明らかとしただけでなく、5hmCがmRNA中にも存在し、翻訳に重要であることを明らかとした。これにより、TET1が膠芽腫の発生において中心的な役割を果たすことが明らかとなった。よって、TET1あるいはmethylosomeは膠芽腫に対する分子標的薬の有望な標的となることが考えられる。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。既に申請者らは、TET1の阻害剤スクリーニングシステムを構築し、数万化合物からの*in vitro*スクリーニングにより、有望なTET1阻害剤候補を複数得ている。

以上のことから、本論文は博士論文としての水準を満たしており、申請者に対して、博士（農学）の学位を授与できると認める。

図1：膠芽腫発生における5hmCの必須な役割

