

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15528

研究課題名(和文)ゲノムインプリンティングの異常によるマウス脳腫瘍モデルの構築

研究課題名(英文)Development of mouse brain tumor models by epigenetic disturbance of imprinting genes

研究代表者

福田 真紀(FUKUDA, Maki)

高知大学・医学部・研究員

研究者番号：20735691

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,700,000円

研究成果の概要(和文)：悪性脳腫瘍の一部では、腫瘍特異的な代謝によってエピジェネティックな因子の制御に異常がみられることが報告されている。その標的分子であるメチル化DNAをヒドロキシル化し、脱メチル化する機能をもつ遺伝子であるTET1とTET2の膠芽腫における発現を検討した。膠芽腫細胞や組織においてTET1は正常星状細胞や正常脳組織と同程度の発現を示した。一方、TET2は膠芽腫細胞株では正常星状細胞と同様に発現が低かったが、膠芽腫組織では正常脳組織と比較して高い発現を示すことを見出した。膠芽腫の発生にTET1が関与することが報告されているがTET2も重要な機能を担っていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Tumor-specific metabolism influences epigenetic regulation in malignant brain tumor. Of these targeted molecules, TET1 and TET2 genes are involved in hydroxylation of methylated DNA and lead to DNA demethylation. In this study, the expression of TET1 and TET2 genes was examined in glioblastoma cells and tissues. There was no difference of expression of TET1 between cell lines, tumor, and normal tissue cells. On the other hand, TET2 was strongly expressed in tumor tissues, but not in normal tissue cells and cell lines. TET2 might play a role for glioblastomagenesis as well as TET1.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

DNA メチル化やヒストン修飾といったエピジェネティックな因子の異常が発がんやがん形質に影響を与えることが知られている。最近、予後が不良で、遺伝子に有意な変異をもたないタイプの上皮腫において、CpG island methylator phenotype (CIMP)が同定され、この腫瘍ではDNAやヒストン H3K27 のメチル化を制御するエピジェネティック薬が抗腫瘍効果を示すことが報告された。また、膠芽腫のうち、IDH1 の変異を伴う2次的に発生する膠芽腫はその腫瘍特異的な代謝産物がエピジェネティックな因子の異常を誘導していることが明らかにされてきた。悪性脳腫瘍には、高頻度にごん幹細胞が含まれ、その造腫瘍性や各種治療法に対する抵抗性の高さから有望な治療の標的として考えられている。我々は、悪性脳腫瘍患者から従来の初代培養細胞に加え、幹細胞株を樹立し、DNA メチル化やヒストン修飾に関して研究を行っており、これらの細胞におけるエピジェネティクス異常の発生機序を明らかにすることを一つの目標としている。エピジェネティック因子により発現制御されているインプリント遺伝子は、様々な先天性疾患や悪性腫瘍に関与することが知られている。人為的にインプリントの消失(LOI)を起こしたキメラマウスでは、肝細胞癌や腸癌、精上皮腫、リンパ腫、白血病を発症し、その胎児線維芽細胞は、継代培養による細胞老化を起こさず、既に不死化した状態であった。実際に膠芽腫においてLOIが観察され、インプリント遺伝子が腫瘍細胞の増殖を制御していることが報告されている。LOIを起こした細胞やキメラマウスにおいて、神経幹細胞やアストロサイトの性状を検査すること、脳腫瘍の誘導を試みることで発がんにおけるグローバルなLOIの役割を解明可能であると考えた。2次的膠芽腫はIDH1/2に変異をもち、代謝産物として oncometabolite である2-HG(2-hydroxy glutarate)を産生する。この2-HGはヒストン修飾やDNA脱メチル化において機能するTET1やTET2の活性を阻害することが報告されている。TET1やTET2の詳細な役割は報告されていない。近年、漸くTET1が膠芽腫の発生に必要であることが報告されたに過ぎない。このTET1またはTET2の発現を操作することでより臨床検体に類似したエピジェネティクス異常を示す細胞の作製が可能であると考えた。よって、膠芽腫におけるこれらの遺伝子の発現レベルを検査する必要性があると考えた。

2. 研究の目的

膠芽腫におけるエピジェネティクス異常におけるTET1とTET2の役割を明らかにし、これらの異常による脳腫瘍のモデル細胞を創出する。

3. 研究の方法

正常星状細胞、正常脳組織、膠芽腫細胞株、臨床検体由来の膠芽腫幹細胞を多く含む培養細胞、膠芽腫組織において定量的PCRによりTET1とTET2の発現量を検討する。膠芽腫幹細胞の培養は腫瘍組織をパパイんとDNaseにより酵素処理し細胞を単一細胞として分散化し、増殖因子EGF、FGF2、N2 supplementを含むDMEM/F12を用いてスフェア培養を行った。細胞の幹細胞の含有率はフローサイトメトリーでCD133陽性細胞の率として決定した。各細胞と組織からRNA抽出を行い、逆転写反応の後、定量的PCRを行った。発現量は、 β アクトンに対する量として求めた。

4. 研究成果

TETsはメチル化シトシンをヒドロキシメチル化シトシンに変換する酵素である。ヒドロキシメチル化シトシンはDNAの修復か複製を経ることで脱メチル化するためTETsは脱メチル化において重要な分子である。2次的な膠芽腫で産生される2-HGはこのTETの活性を妨げるため、細胞内のメチル化シトシンはヒドロキシル化されることが無くなり、メチル化シトシンが蓄積する。これにより多くのCpGがメチル化され2次的な膠芽腫のhallmarkであるG-CIMP (glioma-methylator phenotype)に陽性となる。この現象により多くの癌抑制遺伝子が不活性化されることが一つのがん化の原因とも考えられている。一方、膠芽腫の発生においてTET1によるヒドロキシメチル化シトシンの産生が重要である報告がされた。つまり、がん化を促進する場合と抑制する場合があると考えられる。

本課題では、膠芽腫におけるTET1と2の発現レベルを調べることで、これらの遺伝子の役割を検討した。TET1の発現量は、正常星状細胞、膠芽腫細胞株、膠芽腫初代培養細胞、膠芽腫幹細胞を多く含むスフェア培養、スフェアから分化誘導した細胞、正常脳組織、膠芽腫組織の間で最大で2倍以内の差に収まった。一方、TET2は細胞においては大きな発現量の差が観察されなかったが膠芽腫組織では正常脳と比較して最大で5倍程度、高発現していた。これらのことから、膠芽腫においてTET1に限局せず、TET2も膠芽腫の発がんや形質に関与する可能性が示唆された。免疫組織化学染色をによる多検体の膠芽腫組織におけるTET2の発現レベルと局在の検討が必要である。また、この結果を受けてTET2の過剰発現やノックダウンによるエピジェネティックな因子の攪乱による膠芽腫の発がんモデルの構築に着手している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

Higashi Y, Aratake T, Shimizu S, Shimizu T, Nakamura K, Tsuda M, Yawata

T, Ueba T, Saito M: Influence of extracellular zinc on M1 microglial activation. Sci Rep.7: 43778,2017. 査読有

DOI:10.1038/srep43778

Yawata T, Higashi Y, Shimizu T, Shimizu S, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Saito M: Brain opioid and nociceptin receptors are involved in regulation of bombesin-induced activation of central sympatho-adrenomedullary outflow in the rat. Mol Cell Biochem. 411: 201-11, 2016. 査読有

DOI:10.1007/s11010-015-2582-0

Shimizu T, Tanaka K, Shimizu S, Higashi Y, Yawata T, Nakamura K, Taniuchi K, Ueba T, Yuri K, Saito M: Possible inhibitory role of endogenous 2-arachidonoylglycerol as an endocannabinoid in

(±)-epibatidine-induced activation of central adrenomedullary outflow in the rat. Neuropharmacology 95: 278-89, 2015. 査読有

DOI:10.1016/j.neuropharm.2015.03.034

Nonaka M, Yawata T, Takemura M, Higashi Y, Nakai E, Shimizu K, Ueba T: Elevated cell invasion in a tumor sphere culture of RSV-M mouse glioma cells. Neurol Med Chir (Tokyo) 55: 60-70, 2015. 査読有

DOI:10.2176/nmc.oa.2014-0067

Hashida Y, Taniguchi A, Yawata T, Hosokawa S, Murakami M, Hiroi M, Ueba T, Daibata M: Prevalence of human cytomegalovirus, polyomaviruses, and oncogenic viruses in glioblastoma among Japanese subjects. Infect Agent Cancer 10: 3, 2015. 査読有

DOI:10.1186/1750-9378-10-3

〔学会発表〕(計 6 件)

八幡 俊男、福井 直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也: 葉酸を結合した乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を用いた膠芽腫細胞への siRNA のデリバリー効率の検討、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016/12/4-12/6, 甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)

川西 裕、宇高 恵子、八幡 俊男、近藤 雄一郎、西本 祥大、濱田 史泰、竹村 光広、上羽 佑亮、中居 永一、福井 直樹、中城 登仁、上羽 哲也: 悪性神経膠腫に対する WT-1W10 免疫療法の臨床試験、第 34 回日本脳腫瘍学会学術集会、2016/12/4-12/6, 甲府富士屋ホテル、(山梨県甲府市)

八幡 俊男、東 洋一郎、福井 直樹、川西 裕、中城 登仁、上羽 哲也: 葉酸を結合した乳酸キトサンオリゴ糖ナノ粒子を用いた膠芽腫細胞への siRNA のデ

リバリー効率の検討、第 17 回日本分子脳神経外科学会、2016/8/26-8/27、帝京大学板橋キャンパス(東京都板橋区)

八幡 俊男、東 洋一郎、川西 裕、中居 永一、野中 大伸、上羽 哲也: 膠芽腫幹細胞で高発現する CD146 による細胞周期の制御、第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会、2015/12/6-12/8、グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

Yumiko Hashida, Ayuko Taniguchi, Toshio Yawata, Sena Hosokawa, Moe Tanaka, Masanao Murakami, Mikio Kamioka, Makoto Hiroi, Tetsuya Ueba, and Masanori Daibata: Virus infection in glioblastoma multiforme (GBM): Possible association of human papillomavirus with pathogenesis of GBM. 第 63 回日本ウイルス学会学術集会、2015 年 11 月 22 日~24 日、福岡国際会議場(福岡県福岡市)

上羽 哲也: 中枢神経系悪性腫瘍に対する治療法の最近の知見についてーグリオーマを中心にー、第 53 回日本癌治療学会、2015 年 10 月 29 日~31 日、国立京都国際会館(京都府京都市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等
http://www.kochi-ms.ac.jp/~fm_nrsrg/

6. 研究組織

(1) 研究代表者
福田 真紀(FUKUDA, Maki)
高知大学・医学部・研究員
研究者番号: 20735691

(2) 研究分担者

上羽 哲也 (UEBA, Tetsuya)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・教授
研究者番号：00314203

八幡 俊男 (YAWATA, Toshio)
高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部
門・助教
研究者番号：40380323