

令和元年5月15日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05436

研究課題名(和文) スーパーエンハンサーによる脳腫瘍の発生と悪性化のクロマチンダイナミクスの解明

研究課題名(英文) Super-enhancer and dynamic chromatin remodeling in gliomagenesis

研究代表者

夏目 敦至 (Natsume, Atsushi)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：30362255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：Isocitrate dehydrogenase (IDH)野生型グリオーマの分子・ゲノム・エピゲノム異常は十分解明されていない。本課題では腫瘍形成過程における新規ゲノム異常の解析を行った。ゲノム異常のあとにヒストン修飾などのエピゲノム異常が主に起こっていることを認め、腫瘍形成過程において重要な役割を果たすエピゲノム異常を解析した。p53, Nf1異常から腫瘍が形成されていく過程において、ヒストン修飾異常が追加のイベントとして引き起こされていることを、前腫瘍細胞、腫瘍細胞を用いたChIP-seqにより、新たな重要な遺伝子異常を見出し、その異常を引き起こすエピゲノム異常の存在を認めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍のゲノム解析により細分類されている。従来の抗がん剤治療が有効なものもあるが、未だ予後不良なものがある。予後不良な脳腫瘍はゲノム異常が十分解明されていないため、有効な治療法が見出せないことが原因のひとつである。我々は、抗がん剤の無効な脳腫瘍のゲノム異常から惹起されるエピゲノム異常を明らかにした。その中でヒストン修飾をするEZH2の異常を発見し、EZH2に対する阻害剤が有効であることを解明した。

研究成果の概要(英文)：Although isocitrate dehydrogenase (IDH)-wild-type diffuse astrocytic glioma (DAG) shows a more aggressive phenotype than IDH-mutant type, lack of knowledge regarding relevant molecular drivers for this type of tumor has hindered the development of therapeutic agents. Here, we generated a glioma mouse model, which concurrently lacks p53 and NF1 and develops tumors highly comparable with human IDH-wild-type DAG without characteristic molecular features of glioblastoma. During tumor formation, Ezh2 was upregulated and histone H3K27me3 was increased on target genes. Inhibition of Ezh2 activity effectively repressed tumor growth in vivo. Our study clarifies a pathogenic molecular pathway of IDH-wild-type DAG that depends on Ezh2 activity, and that targeting Ezh2 might be a promising treatment option for this type of glioma.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：脳腫瘍 エピゲノム ヒストン

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は浸潤性の高い脳腫瘍であり、World Health Organization (WHO)の分類で Grade II からIVまで存在する。たとえ悪性度が低い Grade II であっても、多段階的発がんメカニズムにより 5~10 年以内に悪性度の極めて高い Grade IV (膠芽腫) に悪性進展化することが知られている。Grade IV (膠芽腫) に対しては、抗がん剤や放射線治療を併用した集学的治療が行われるが、必ずしも治療効果は高くない。そのため、神経膠腫の悪性・進展化のメカニズムを明らかにし、その“アキレス腱”を狙った、腫瘍細胞に特異的で必須な分子・パスウェイを標的とする治療薬の開発が必要である。

次世代シーケンサーの普及により、脳腫瘍領域でもビッグデータを用いた網羅的遺伝子解析が行われるようになってきている。これまでに我々は、Grade II/III 神経膠腫 750 検体と悪性進展をした検体の経時的全エクソン解析を行った。そこで明らかになったことは、腫瘍細胞はクローン同士の生存競争による選択と進化をしながらゲノムの不均一性と多クローン性を獲得し、時間的/空間的に広がっていくということであった (Natsume, Kondo, Wakabayashi, Ogawa et al. Nature Genetics. 2015)。近年、ゲノム異常に加え、エピゲノム機構が腫瘍の形成や形質に重要な役割を果たしていることが報告されつつあるが、これについても既に我々は、脳腫瘍幹細胞の可塑性に関わるヒストン転写機構の破綻を中心としたエピゲノム異常を同定し、エピゲノム異常が治療の標的となり得ることを報告した (Natsume, Kondo et al. Cancer Res, 2014)。

さらに最近になって、細胞種に特異的な遺伝子群の発現をダイナミックに調整するエピゲノム機構としてスーパーエンハンサーという概念が新たに提唱された。スーパーエンハンサーはヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) による調整を受けており、ヒストン修飾 (H3K27ac) がその指標となることが知られている。細胞種特異的なダイナミックな発現調整を行うというその特性から、脳腫瘍の発生機構や脳腫瘍を難治たらしめるゲノム不均一性を生じる機構の解明、さらにはより有望な治療法の開発につながることを期待される。

2. 研究の目的

本課題では、脳腫瘍の発生・悪性化およびその治療難治性に強く寄与するスーパーエンハンサーの異常を同定し、ゲノム異常とクロマチン構造異常のクロストークの解明とその標的への創薬開発をすることを目的とする。

3. 研究の方法 (図 1)

(1) 膠芽腫 (Grade IV) で唯一効果が示されている化学療法薬 (テモゾロミド, 以下 TMZ) への抵抗性を持つ神経膠腫細胞株 (U87-MGMT, T98, TGS-01) を用い、スーパーエンハンサー調整に関連するタンパク (HDAC など) の発現を評価する。

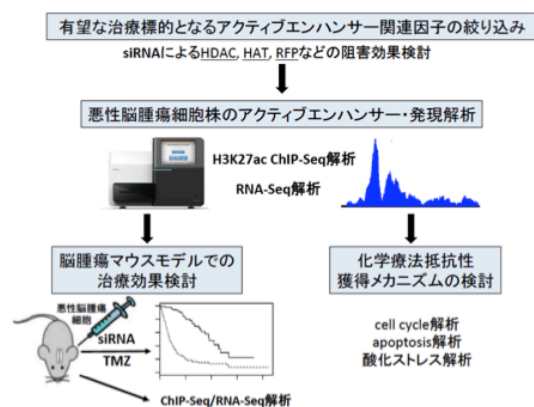
(2) TMZ 抵抗細胞株で有意に上昇を認めたタンパクにつき small interfering RNA (siRNA) を設計し、細胞増殖性などを評価する。

(3) 次世代シーケンサーによる RNA-Seq, H3K27ac ChIP-Seq 解析を実施し、TMZ 抵抗性細胞におけるスーパーエンハンサーの状態、さらに siRNA による遺伝子発現変化/スーパーエンハンサーの状態変化を網羅的に解析する。

(4) (3) で示唆された関連機構を様々な分子生物学的手法で追試する。

(5) 脳腫瘍マウスモデルを作成し、上記 siRNA 効果を追試する。

図 1. 本研究課題の流れ



4. 研究成果

(1) HDAC 関連因子の中で、RET finger protein (RFP) の発現が TMZ 抵抗性細胞株において有意に高いことが示され、まずこれを標的としたこととした (図 2)。

(2) RFP に対する siRNA (siRFP) を 3 種類設計し、qRT-PCR および Western blotting で効果的に knock down (KD) が行えることを確認した (図 2)。

siRFP+TMZ 群において最も細胞増殖抑制効果が認められた他、siRFP 単独群においても有意な増殖抑制効果が認められた (図 3)。

図 2. 各細胞株の RET finger protein 発現と siRNA の効果確認

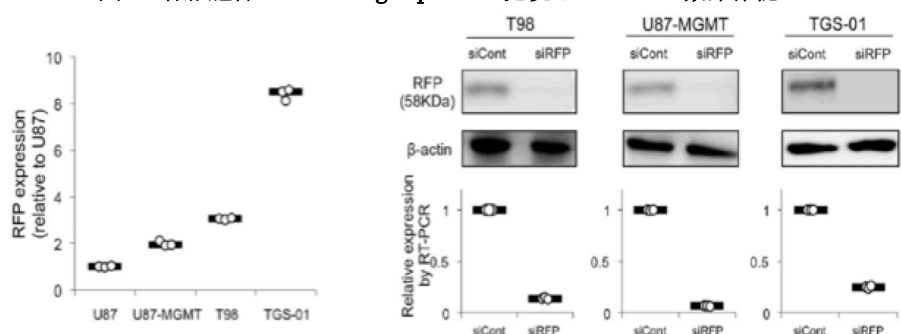
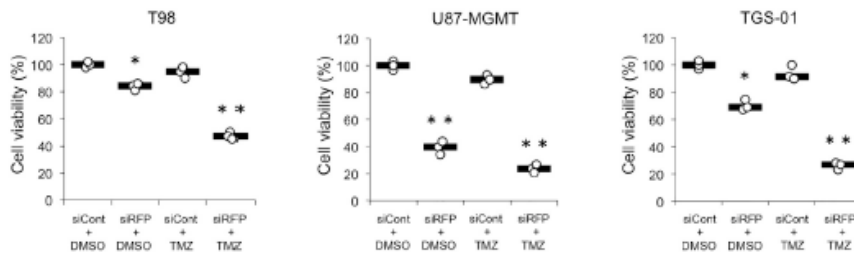
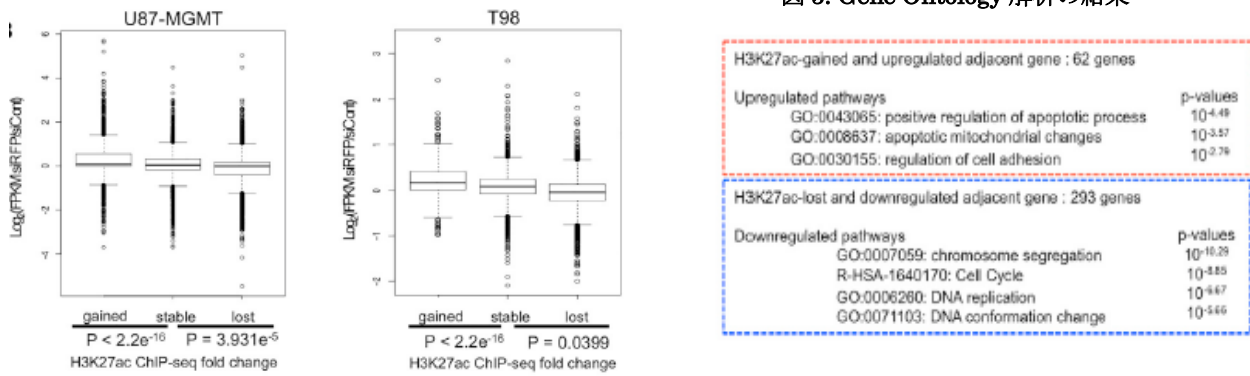


図 3. TMZ および RFP-KD が細胞増殖に与える影響



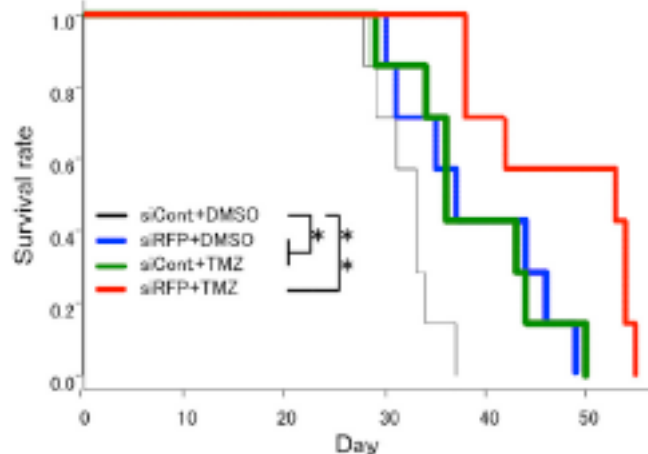
(3) siRFP を用いた RFP knock down により、スーパーエンハンサーの指標となる H3K27ac 修飾の全ゲノムにわたる変化、さらにそれに連動した遺伝子発現の変化が引き起こされることが示された(図 4)。Gene Ontology 解析からは、酸化ストレス生成やアポトーシスに関連する遺伝子群の発現が上昇している一方、細胞分裂や DNA 修復を促進して化学療法抵抗性獲得に寄与する遺伝子群の発現が抑制されていることが示唆された(図 5)。



(4) (3)で示唆された結果を追試するため、活性酸素種(酸化ストレス)生成状態の評価、細胞周期状態の評価、アポトーシスの評価を行った。予想された通り、RFP-KD により活性酸素種の生成が上昇し、細胞周期状態の変化(S, M 期の障害)が起き、TMZ との併用で有意なアポトーシスが引き起こされていることが示された。

(5) 脳腫瘍マウスモデルを作成し、RFP-KD/TMZ の治療効果を検討した。図 6 で示されたように RFP-KD と TMZ の併用により有意な生存期間延長が認められた。

図 6. 脳腫瘍マウスモデルにおける TMZ / RFP-KD の治療効果



以上のように、今回着目した RET finger protein は、脳腫瘍の悪性化・化学療法抵抗性獲得に関連する複数の経路を調整していることが示され、今後これをターゲットにした新規脳腫瘍治療薬の開発が期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

1. Ranjit M, Hirano M, Aoki K, Okuno Y, Ohka F, Yamamichi A, Kato A, Maeda S, Motomura K,

Matsuo K, Enomoto A, Ino Y, Todo T, Takahashi M, Wakabayashi T, Kato T, Natsume A.
Aberrant Active cis-Regulatory Elements Associated with Downregulation of RET Finger Protein
Overcome Chemoresistance in Glioblastoma. **Cell Rep**. 2019 Feb 26;26(9):2274-2281 査読あり

〔学会発表〕 (計 7 件)

1. 平野雅規、夏目敦至. 第 77 回日本癌学会学術総会 (英語口演) 2018 年: Aberrant active-enhancers associated with downregulation of HDAC1-RFP complex overcome chemoresistance in glioblastoma
2. 平野雅規、夏目敦至. 日本脳神経外科学会第 77 回学術総会 (一般口演) 2018 年: 化学療法抵抗因子 HDAC1-RFP 複合体に関連したアクティブエンハンサー調整機構の解明と新規治療法の開発
3. 平野雅規、夏目敦至. 第 36 回日本脳腫瘍学会学術集会 (シンポジウム) 2018 年: HDAC1-RFP 複合体に関連したアクティブエンハンサー調整機構の解明と新規治療法の開発
4. 平野雅規、夏目敦至. 第 76 回日本癌学会学術総会 (一般口演) 2017 年: RET finger protein の発現抑制に関連した super-enhancer 異常により glioblastoma の化学療法抵抗性が改善される
5. 平野雅規、夏目敦至. 日本脳神経外科学会第 76 回学術総会 (シンポジウム) 2017 年: Aberrant active enhancers associated with downregulation of RET finger protein overcome chemoresistance in glioblastoma
6. Masaki Hirano, Atsushi Natsume. 22nd SNO annual meeting (ポスター) 2017 年: Aberrant active enhancers associated with downregulation of RET finger protein overcome chemoresistance in glioblastoma
7. 平野雅規、夏目敦至. 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会 (ポスター) 2017 年: Aberrant active enhancers associated with downregulation of RET finger protein overcome chemoresistance in glioblastoma

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

- 出願状況 (計 0 件)
- 取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名: 近藤 豊

ローマ字氏名: Yutaka Kondo

所属研究機関名: 名古屋大学

部局名: 医学系研究科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 00419897

研究分担者氏名: 若林俊彦

ローマ字氏名：Toshihiko Wakabayashi

所属研究機関名：名古屋大学

部局名：医学系研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：50220835

研究分担者氏名：小川誠司

ローマ字氏名：Seishi Ogawa

所属研究機関名：京都大学

部局名：医学研究科

職名：教授

研究者番号（8桁）：60292900

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。