

令和元年6月27日現在

機関番号：17201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10758

研究課題名(和文) 癌の代謝とエピゲノム異常をつなぐDNA脱メチル化酵素TETの神経膠腫における役割

研究課題名(英文) Ten-eleven translocation enzymes associated metabolic and epigenomic regulation in glioma cells and glioma stem like cells.

研究代表者

中原 由紀子 (Nakahara, Yukiko)

佐賀大学・医学部・講師

研究者番号：50380770

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫細胞株と腫瘍幹細胞株を対象とした。TET1, 2, 3のmRNA発現を測定した。TET1とTET3の発現量は細胞株によって異なり逆相関を示した。TETの基質である5-mCと代謝物である5-hmCをELISAで測定した。mRNAの発現量はTETの酵素活性とは相関しなかった。ヒト臨床摘出標本に対し抗TET1抗体で免疫染色を行った。発現が核内型、細胞質型、両者発現型が存在した。蛍光免疫染色でTET1蛋白の局在を検討した。IDH1変異型ではTET1蛋白は核に発現していることがほとんどであり、IDH野生型は細胞質には発現していることが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

がんの代謝という側面とエピゲノム異常という側面の両者を橋渡す位置に存在するTETに注目し、膠芽腫細胞株および腫瘍幹細胞株のTET1, 2, 3の遺伝子発現を評価した。TET1蛋白発現は核内と細胞質に分かれIDH1遺伝子変異との間に相関関係があった。IDH変異は2HGを介して、TET蛋白酵素活性を阻害し、5-hydroxymethylcytosine (5hmC)の減少しメチル化を調整している、一方IDH野生型グリオーマでも5hmCの減少は観察されている。したがって、TET1蛋白の核からの排除が、IDH変異のないgliomaにおける5hmCの減少に関与している可能性があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The mRNA expression of TET1, 2 and 3 were measured in glioblastoma cell lines and glioma stem like cells, which established from surgical specimens of glioma patients. The expression levels of TET1 and 3 showed an inverse correlation. 5-methylcytosine and 5-hydroxymethylcytosine, which the former is a substrate and the latter is a metabolite of TET were measured by ELISA. The expression of mRNA and enzyme activity were not correlated. In immunohistochemistry for specimens of gliomas, expression of TET1 protein observed in nuclear or cytoplasm depending on IDH genotype. IDH mutant gliomas expressed TET1 protein in nuclear, while IDH wild gliomas showed cytoplasmic expression of TET1.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ TET

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

がん代謝:

IDH 変異と 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) がんは、さまざまな遺伝子異常の蓄積によって生じ、その遺伝子異常は癌腫によって異なる。しかし、がんの代謝という側面からみると、ほとんどの癌腫が、ATP 産生の面で効率のよい酸化的クエン酸回路よりも、効率の悪い解糖系を使う (Warburg 効果) 共通の特徴を有している。近年、がん抑制遺伝子 p53、がん遺伝子 c-Myc、低酸素誘導因子 (hypoxia induced factor1: HIF1) などの転写因子が解糖系の亢進に関与していることが発見され、クエン酸代謝関連酵素であるイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) の異常が癌化と関連していることが明らかになり、がん代謝の研究が注目されるようになった。IDH はイソクエン酸を ケトグルタル酸 (-KG) に変換する酵素であるが、IDH の変異によって -KG を基質として、2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) という代謝物を産生する。この 2-HG は蓄積により癌化を促進する oncometabolite (悪性代謝物) と呼ばれている物質である。この 2-HG の蓄積により影響を受ける物質 中のひとつに Ten-eleven translocation (TET) が報告された (Yang H, Clin cancer Res. 18; 5562-71, 2012)。

Ten-eleven translocation (TET) :

TET 蛋白は、ゲノム DNA 脱メチル化酵素として同定された物質で、メチル化シトシン (5-mC) を、ヒドロキシメチル化シトシン (5-hmC) に変換する。これまでの研究で TET2 蛋白は正常脳にも 発現しており、正常細胞では癌化を抑制する。しかし、がん細胞では 2-HG の蓄積により TET 酵素 活性が低下し、ゲノム DNA のメチル化異常が増加、癌化が促進される。実際、骨髄系腫瘍では TET 遺伝子の変異が発見され、TET 遺伝子は tumor suppressor gene としての機能を有していると考えられる。ただし、これまでの研究では、IDH 変異 TET pathway の下流で、エピゲノム制御を受けている分子についての詳しい探索は行われていない。

本研究を立案した経緯:

神経膠腫においても、IDH 変異が予後に関連していることが明らかになり、2-HG の蓄積が腫瘍発生機序に関与していると考えられる。最近では北米において、IDH1 変異に対する阻害剤 (AGI-5198) の腫瘍抑制効果が報告された (Rohle D, Science. 3; 626-30, 2013)。本邦でも開発が進められており、新たな分子標的治療薬として期待が寄せられている。IDH 変異は低悪性度神経膠腫に特徴的に認められる異常であるが、近年患者検体より IDH1 変異脳腫瘍幹細胞株も樹立されている (Wakimoto H, Clin Cancer Res, 2014)。加えて 2-HG の蓄積は IDH 変異がなくても、低酸素条件下で起こる点は極めて重要である。その理由として、低酸素状態でも非常に高い増殖能を示す、悪性度の高い膠芽腫では、IDH 変異がないことが挙げられる。

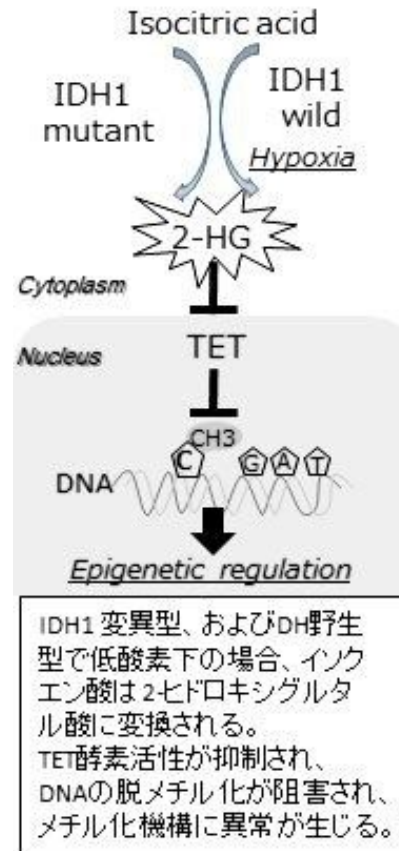
2. 研究の目的

今回、私たちは、がんの代謝という側面と、エピゲノム異常という側面の両者を橋渡す位置に存在する TET という分子に注目した。悪性神経膠腫の発生機序に、TET がどのように関与しているかを検討し、さらに TET によってエピゲノム調節を受けている遺伝子についても検索する。特に、治療抵抗性を示す一因である腫瘍幹細胞 (glioma stem cells) における TET の変化に、着目し研究を進めたい。これらの検討から、代謝異常とエピゲノム異常のつながりを明らかにし、将来、悪性神経膠腫患者の生存期間を延長させる治療法の開発につながる分子標的薬になることを期待して、この研究をすすめたい。

3. 研究の方法

この研究計画では、がん代謝異常とエピゲノム異常に関与すると考えられる TET という分子について、分子生物学的手法を用いて、悪性神経膠腫における腫瘍化機構を解明する。IDH1 変異型 幹細胞株を対象とするとともに、IDH 変異のない腫瘍細胞は、低酸素条件下で培養した細胞を使用する。また、すでに樹立している他の IDH1 変異のない腫瘍幹細胞についても対象とする。IDH1 変異型幹細胞株と、低酸素条件下に培養された膠芽腫細胞株と腫瘍幹細胞株の TET 活性、蛋白発現を評価し、TET の発現が低下し機能が抑制された細胞株 (低発現株 X) を決定する。これらの細胞株に TET 遺伝子を導入、強制発現させ、この遺伝子が tumor suppressor gene であることを証明する。さらに、TET 遺伝子によりメチル化制御を受けている遺伝子群を同定する。【

4. 研究成果



膠芽腫細胞株 (U87MG, T98G, U251MG, U373MG) および腫瘍幹細胞株 (MGG4, MGG8, MGG23, MGG31, MGG119, MGG152) を対象とした。IDH1 遺伝子の変異の有無をパイロシークエンス法で評価した。4 種の膠芽腫細胞株はすべて IDH1 遺伝子の変異はなく、腫瘍幹細胞株のうち、MGG119 と MGG152 が IDH1 遺伝子変異を有していた。正常酸素条件下で培養し、TET1, 2, 3 の mRNA 発現を qRT-PCR で測定した。TET1 と TET3 の発現量は細胞株によって異なり、逆相関を示していた。1% O₂ 低酸素状態で 24 時間、48 時間、72 時間で培養し、同様に mRNA 発現レベルを定量評価した。TET2 と TET3 は低酸素刺激で発現が抑制された。しかし正常酸素濃度条件下と比べて有意差はなかった。また、TET の発現量は、IDH1 遺伝子の変異との関連はなかった。TET 酵素活性を測定した。また TET が酵素活性を及ぼすとき基質となる 5-mC と代謝物である 5-hmC を ELISA で測定した。mRNA の発現量は TET の酵素活性とは相関しなかった。マウス正常大脳およびこれまでのヒト臨床摘出標本に対し、抗 TET1 抗体および IDH1R132 抗体を用いて免疫染色を行った。標本によって、核内に発現しているもの、細胞質に発現しているもの、両者に発現しているものとさまざまであった。TET1 蛋白の局在について検討するため、蛍光免疫染色を行った。IDH1 変異のある標本では TET1 蛋白は核に発現していることがほとんどであり、IDH1 変異のない標本は細胞質には発現していることが分かった。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

高口素史, 中原由紀子, 伊藤 寛, 井上浩平, 緒方敦之, 高瀬幸徳, 下川尚子, 増岡 淳, 阿部竜也: glioma における蛍光染色を用いた TET タンパクの細胞内局在の検討. 第 18 回日本分子脳神経外科学会. 2017 年 8 月 25-26 日. 甲府

〔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:
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:
国内外の別:

〔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: 阿部 竜也

ローマ字氏名: ABE TATSUYA

所属研究機関名: 佐賀大学

部局名: 医学部脳神経外科

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): **40281216**

研究分担者氏名: 若宮 富浩

ローマ字氏名：WAKAMIYA TOMIHIRO

所属研究機関名：佐賀大学

部局名：医学部脳神経外科

職名：客員研究員

研究者番号(8桁)：**50773769**

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

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。