

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：37104

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K10761

研究課題名(和文)多様なエピジェネティクス異常に基づく悪性神経膠腫の体系化の確立と治療抵抗性の克服

研究課題名(英文) Establishment of pathogenic mechanism based on the various epigenetic alterations and analysis of drug resistance in malignant glioma

研究代表者

中村 英夫 (Nakamura, Hideo)

久留米大学・医学部・准教授

研究者番号：30359963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：悪性神経膠腫は致死率の高い病気であり、その原因は浸潤性の腫瘍であり、外科的に完全に摘出できないこと、比較的抗がん剤に抵抗性である事が挙げられる。我々は、治療成績の向上に対して抗がん剤を含む様々な薬剤抵抗性のメカニズムの解明が必須であると考えた。我々の研究はエピジェネティクス異常が腫瘍細胞の生物学的性質、特に薬剤感受性を変化させることの証明を行い、そのメカニズムを解明することによって何らかの新規治療法確立への道筋を立てることを目標とした。エピジェネティクス異常を持つ悪性神経膠腫が、確かにある薬剤の耐性に関与している現象は確認できたが、メカニズムの解明に関しては今後も継続して研究を行う計画である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々の研究成果は悪性神経膠腫の新規治療に将来的につながるものであると確信している。正常の細胞が腫瘍化する段階でなんらかのエピジェネティックな部分を含む遺伝子の異常が起こるが、ある特定の遺伝子異常に関しては分子標的薬剤などを開発し、その遺伝子の機能を正常化する試みを行うことが可能である。しかし、エピジェネティクス異常に関してはその下流の一つの遺伝子の異常を起こす場合と、数多くの遺伝子の発現が変化して複雑な生物学的特徴が生じる可能性があることが今回の研究で痛感した。薬剤耐性というメカニズムにエピジェネティクス異常が関与している現象は捉えたものの、そのメカニズムは壮大であるという印象を感じた。

研究成果の概要(英文)：Malignant glioma is one of dismal prognosis cancer. The cause of this reason is that the tumor cells are invasive, therefore, we cannot completely resect the tumor cells and they are resistant against chemotherapies. We considered that to find a new mechanism of drug resistance in malignant glioma is necessary to obtain a good therapeutical result. We analyzed about the biological properties such as sensitivity for anti-tumor drugs based on the epigenetic alterations and aimed to find the way to establish a new concept for the therapy in malignant glioma. We confirmed that the epigenetic abnormality influenced the phenomenon of drug resistance in glioma cells, however, we could not discover the mechanism of downstream after the epigenetic alterations.

研究分野：脳腫瘍生物学

キーワード：悪性神経膠腫 治療抵抗性 薬剤耐性 H3F3A MGMT エピジェネティクス異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は難治性の疾患であるが、その治療抵抗性のメカニズムにおいて、いままで様々な報告がなされてきた。グリオーマ幹細胞の存在が薬剤や放射線治療に抵抗性を示す最大の要因であると考えられてきたが、最近ではエピジェネティクスの異常による遺伝子発現の制御が関与し、重要な役割を果たしていることがわかってきた。DNAのメチル化によって遺伝子発現がコントロールされているが、グリオーマ幹細胞のみならず、腫瘍細胞においてDNAのメチル化が異なるという報告がなされた。すなわちエピジェネティクスの異常が悪性神経膠腫の生物学的特性を多様化させ、治療反応性を複雑にしていると考えられている。

2. 研究の目的

我々は、遺伝子や染色体の異常の解析は多くの悪性神経膠腫のサンプルで行ってきたが、エピジェネティクス異常が実は腫瘍細胞の生物学的特性に重要な役割を果たしているという事であれば、可能な限りエピジェネティクス異常の解析を加えることでより複雑な治療抵抗性のメカニズムの解明ができると考えられる。悪性神経膠腫におけるいくつかのエピジェネティクスの異常に基づく特性を明らかにすることで、治療抵抗性のメカニズムを解明し、それを克服する新規治療法の確立を目的とする。

3. 研究の方法

悪性神経膠腫の臨床検体における遺伝子発現とゲノム解析を徹底し、エピジェネティクスの異常のあるものにおいて、その遺伝子発現の特徴を捉える。既存のエピジェネティクス異常(H3F3A遺伝子異常)を伴う細胞株はK27MとG34Vであるが、臨床的にはどちらもアルキル化剤には耐性を示したが、G34Vにおいてはイフォマイドとプラチナ系の抗がん剤に感受性を示した。この臨床的なデータを細胞株で検証する必要があり、また同様な所見が培養細胞で得られたら、そのメカニズムを追及する。更に既存の様々な抗がん剤に対する反応を細胞株で検討し、エピジェネティクスの相違が実際に、薬剤耐性に関連しているかを検証する。我々が樹立した悪性神経膠腫の細胞株においては、臨床的にはアルキル化剤にも反応性を示しているものといえないものが存在する。これらの細胞株のエピジェネティクスの状態をチェックするとともにIDH1遺伝子変異やH3F3A遺伝子変異を持つ悪性神経膠腫の細胞株との遺伝子発現、DNAメチル化の状態を比較する。H3F3Aの遺伝子異常を持つ2つの細胞株およびIDH1遺伝子異常を持つ細胞株の遺伝子発現の相違を検出後、それらの遺伝子が本当にその細胞株のエピジェネティクスの異常に起因するかどうかを見極める必要がある。ヒストン tail の脱メチル化酵素はいくつか同定されており、それらを阻害することでヒストン tail におけるメチル化の状態が変化する。例えば27番目のリシンを脱メチル化する酵素はKDM6であり、4番目のリシンを脱メチル化する酵素はKDM1Aである。またヒストン tail はメチル化だけでなくアセチル化の制御も受けており、脱アセチル化酵素としてHDACが関与している。このようにヒストン tail の修飾する酵素に注目し、それらのインヒビターなどを用いることによって細胞株の生物学的特性変化や同定された遺伝子の発現の変化などを検討する。エピジェネティクス異常を伴う悪性神経膠腫の細胞株は、アルキル化剤に耐性を示す事を確認している。薬剤耐性のメカニズム解明に連結する実験結果が得られた場合は、薬剤耐性克服するケミカルコンパウンドを獲得し、イメージアナライザーを用いて、有効性を検討する。もし存在すれば、さらにその薬剤耐性克服のメカニズムの解明を行う。最終的には動物実験を行うことによって *in vitro* の事象を検証したい。薬剤耐性のスクリーニングで同定されたもの、もしくはそれらの実験で解明されたエピジェネティクス異常をもつ悪性神経膠腫における薬剤耐性のメカニズムに關与するケミカルコンパウンドや既存の薬剤などが使用可能であれば、それらを用いて動物実験をおこなう。悪性神経膠腫の細胞株をヌードマウスの脳に移植し、薬剤を尾静脈から注入したり、腹腔内に投与し、*in vivo* にて *in vitro* で得られた結果の再現性をチェックする。*In vitro* で薬剤耐性を克服できた細胞が *in vivo* ではその効果が認められなかった場合は、その原因を追究する。最終年度は臨床応用に少しでも近づける実験データの獲得を目指したい。

4. 研究成果

悪性神経膠腫の抗ガン剤などの薬剤に対する反応性において、エピジェネティクスの異常が非常に關与していると報告されている。我々は悪性神経膠腫において 明らかなエピジェネティクス異常を持つ腫瘍細胞の生物学的特徴を明らかにすることを目的として研究を行った。いくつかのエピジェネティクス異常を持つ細胞株に *in vitro* で薬物反応性などの実験を行い、有意な結果がえられたものの、そのメカニズムの解明には至らなかった。臨床で得られた手術検体においては全てのサンプルにおいて解析を行い、MGMT においてはプロモーター領域のメチル

表 1

		TMZ の治療反応性
MGMT メチル化	67%	87%
MGMT 非メチル化	33%	42%

化の腫瘍に比べて明らかに薬剤反応性は良かった(表 1)。H3F3A の K27M の遺伝子異常を持つサンプルは臨床的には得ることができなかった。主に細胞株での実験であったが、薬剤反応性が非

常に悪い、つまり抗がん剤耐性のメカニズムが働いていると思われた。H3F3A 遺伝子変異を持つ悪性神経膠腫の細胞株との遺伝子発現、DNA メチル化の状態を比較したが、変異がない細胞株と比べて有意な変化がみとめられなかった。DNA メチル化の検索は全体のメチル化を調べるのではなく、ある程度絞ったところのメチル化の状態を比較する必要があるのではと思われた。また、一つの知見として培養細胞ではエピジェネティクスの状態が継代を重ねるうちに変化していくことが確認できた。このように悪性神経膠腫において、薬剤耐性のメカニズムに関してはエピジェネティクスの関与があることは確信できたが、エピジェネティクス異常が起こることによって、それが薬剤耐性にどのように連結するのはかなり詳細で綿密な実験が必要と思われた。本来はどのようなメカニズムによってエピジェネティクス異常が最終的にその悪性神経膠腫の腫瘍細胞の生物学的特徴を変化させるのかを解明したかったが、まだまだ複雑なメカニズムが存在すると思われた。エピジェネティクス異常そのものが問題なのか、それに基づく特定の遺伝子が関与しているのかを解明したかったが、その特定の遺伝子の同定もできなかった。今後の更なる課題である

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Hide T, Komohara Y, Miyasato Y, Nakamura H, Makino K, Takeya M, Kuratsu JI, Mukasa A, Yano S.	4. 巻 30
2. 論文標題 Oligodendrocyte Progenitor Cells and Macrophages/Microglia Produce Glioma Stem Cell Niches at the Tumor Border.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 EBioMedicine.	6. 最初と最後の頁 94 104
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.ebiom.2018.02.024.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Shinojima N, Fujimoto K, Makino K, Todaka K, Yamada K, Mikami Y, Oda K, Nakamura K, Jono H, Kuratsu JI, Nakamura H, Yano S, Mukasa A.	4. 巻 6
2. 論文標題 Clinical significance of polyglutamylation in primary central nervous system lymphoma.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 15
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40478-018-0522-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Aoki Kosuke, Nakamura Hideo, Suzuki Hiromichi et al.	4. 巻 20
2. 論文標題 Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 66-77
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/neuonc/nox132	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Wakabayashi T, Natsume A, Mizusawa J, Katayama H, Fukuda H, Sumi M, Nishikawa R, Narita Y, Muragaki Y, Maruyama T, Ito T, Beppu T, Nakamura H et al.	4. 巻 38
2. 論文標題 JCOG0911 INTEGRA Study: A Randomized Screening Phase II Trial of Interferon Plus Temozolomide in Comparison With Temozolomide Alone for Newly Diagnosed Glioblastoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Neurooncol	6. 最初と最後の頁 627-636
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-018-2831-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中村英夫
2. 発表標題 中枢神経原発胚細胞腫の病態と治療
3. 学会等名 第60回日本小児血液学会学術集会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村英夫
2. 発表標題 新規分子標的
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 中村英夫、黒田順一郎、篠島直樹、牧野敬史、矢野茂敏
2. 発表標題 電気刺激や蛍光g診断を用いたeloquent areaのグリオーマの摘出
3. 学会等名 第22回日本脳腫瘍の外科学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 中村英夫
2. 発表標題 悪性脳腫瘍の治療～アバスチン投与などの解決すべきクリニカルクエスト～
3. 学会等名 悪性脳腫瘍研究会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村英夫
2. 発表標題 脳腫瘍てんかんの病態と治療～ペランパネル早期併用における可能性～.
3. 学会等名 脳腫瘍セミナーin福岡(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 哲、古田拓也、宮城尚久、中村英夫、杉田保雄、森岡基浩
2. 発表標題 当院における膠肉腫6例の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第30回石打カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 哲、杉田保雄、古田拓也、吉武秀展、音琴哲也、宮城尚久、中村英夫、森岡基浩
2. 発表標題 悪性転化をきたしたmixed germ cell tumorの一例
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中村英夫
2. 発表標題 脳腫瘍てんかんの病態と治療
3. 学会等名 第36回筑後・佐賀脳神経外科懇話会ビデオカンファランス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小牧 哲、中村英夫、古賀誉久、牧園剛大、音琴哲也、坂田清彦、宮城尚久、森岡基浩
2. 発表標題 悪性髄膜腫に対する光線力学的治療の工夫
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 中村英夫	4. 発行年 2019年
2. 出版社 メジカルビュー社	5. 総ページ数 355
3. 書名 脳腫瘍外科 経験したい手術16	

1. 著者名 中村英夫 隈部 俊宏	4. 発行年 2018年
2. 出版社 三輪書店	5. 総ページ数 272
3. 書名 グリオーマ	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	秀 拓一郎 (HIDE TAKUICHIROU) (40421820)	北里大学・医学部・准教授 (32607)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	篠島 直樹 (SHINOJIMA NAOKI) (50648269)	熊本大学・病院・講師 (17401)	
研究分担者	牧野 敬史 (MAKINO KEISHI) (90381011)	熊本大学・病院・非常勤診療医師 (17401)	
研究分担者	黒田 順一郎 (KURODA JUN-ICHIRO) (90536731)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・助教 (17401)	