

令和元年6月12日現在

機関番号：33916
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：16K10773
研究課題名（和文）iPS細胞を用いた変異型IDH1に基づくグリオーマモデルの作成

研究課題名（英文）Mutant IDH-induced iPS-derived glioma cells

研究代表者

大場 茂生（OHBA, SHIGEO）

藤田医科大学・医学部・准教授

研究者番号：80338061

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）：腫瘍発生を促すとされる変異型IDH1を発現させるプラスミドをiPS細胞に導入した。IDH1が高発現した細胞は増殖が抑制されたが、低発現した細胞は増殖を維持できた。この細胞を用いてアストロサイトへと分化させている状況である。
ヒトアストロサイト由来の、変異型IDHにより腫瘍化した細胞と非依存性に腫瘍化した細胞を用いて網羅的な遺伝子解析、代謝解析を行い、その差異を調べた。これらの結果から新規治療の標的となりうる候補に対して検討を行っている。その一つとして変異型IDHによりプロトポルフィリンIXが低下することを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫は脳腫瘍の中でも頻度の多い腫瘍の一つであるが、既存の治療法では予後は必ずしもよくなく、その原因の一つとして分子発生的な解明が十分になされていない点がある。
本研究では、変異型IDHによる脳腫瘍モデルを作成し、その性質を解明することで新規治療法の開発へつなげる。また、変異型IDHを有する神経膠腫と有さない神経膠腫の差異を検討することで、それぞれの特質にあった治療法の開発をめざす。本研究から得られる結果は治療困難な病気の新たな治療法へとつながりうる非常に有意義なものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：To make mutant IDH1-induced iPS-derived glioma cells, iPS cells was transfected with the construct expressing mutant IDH1. The cells expressing high level of mutant IDH1 did not grow, whereas the cells expressing low level of mutant IDH1 maintained growth. The cells expressing low level of mutant IDH1 have been differentiating into astrocyte.
To investigate the differences between astrocyte-derived glioma cells transformed by mutant IDH1 and by H-Ras, comprehensive gene analysis, and metabolic analysis were performed using these cells. New therapeutic targets have been searched based on these data. For example, it was found that mutant IDH1 reduced protoporphyrinogen by increasing the activity of enzymes associated with degradation of protoporphyrinogen.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioma mutant IDH iPS

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

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は脳腫瘍の中でも頻度の多い腫瘍の一つであるが、放射線やテモゾロマイドを中心とした化学療法などの既存の治療法では予後は必ずしもよくなく、その原因の一つとして分子発生的な解明が十分になされていない点があげられる。現在まで神経膠腫の新規治療法の開発や腫瘍発生の解明に関して様々な研究がなされており、神経膠腫の分類が大きく変化しつつある。その中で最も特に大きな役割を担うものの一つがイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) であり、神経膠腫は変異型 IDH を有する群と有さない群と大きく 2 分される。変異型 IDH を有する群では p53 の変異と ATRX の変異を伴ったアストロサイトーマ系の群と 1p/19q loss を認め p53 や ATRX には変異を認めず human telomerase reverse transcriptase (hTERT) のプロモーターの変異を伴うオリゴデンドロサイトーマ系の群とにわかれる (図 1)。同じ World Health Organization (WHO) グレードでの神経膠腫においても IDH の変異の有無によって予後に差がある。このように変異型 IDH は予後に関わるだけでなく、腫瘍の発生にも関与しておりしかも非常に初期の段階において関与しているものとされている。

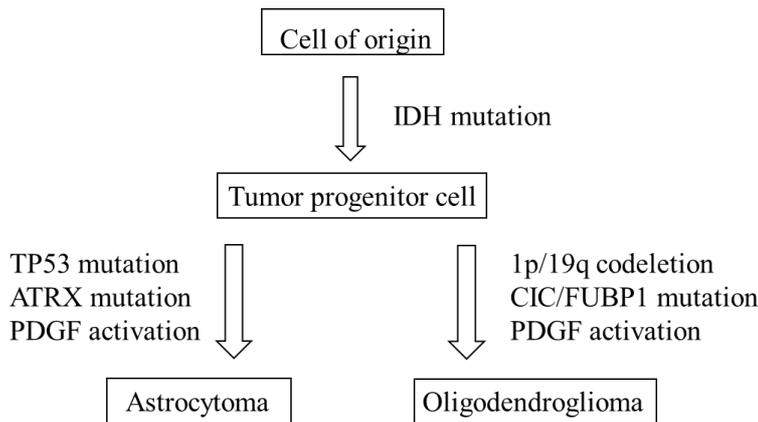


図 1 gliomagenesisにおけるIDH mutationや他のマーカーの関係

本来 IDH はイソクエン酸をアルファケトグルタル酸に変換するが、変異型 IDH はアルファケトグルタル酸を 2 - ヒドロキシグルタル酸に変換する。結果としてヒストンのメチル化や DNA のメチル化が生じ、そうしたエピジェネティックな変化により遺伝子の発現が変化し、腫瘍発生につながると認識されている。ヒト正常アストロサイト (NHA) に HPV16E6E7 を用いて p53 と Rb 蛋白を抑制させ、更には hTERT を過剰発現させることで不死化させた細胞 (NHA E6E7 hTERT) は soft agar 培地ではコロニーを形成しない、つまり腫瘍化していないのであるが、この細胞に変異型 IDH1 を過剰発現させることで腫瘍化することは、我々を含め幾つかのグループで報告された。また、我々は不死化していない NHA E6E7 に変異型 IDH1 を過剰発現させることで不死化させるだけでなく腫瘍化させることに成功した。

一方、白血病の一種である AML や胆管がんなどにおいても IDH の変異が腫瘍化と関与しているとの報告があり、変異型 IDH による腫瘍化は必ずしも神経膠腫に限ったものではないことが推測される。

2. 研究の目的

神経膠腫は大きくわけて変異型 IDH をもつものと持たないものとに 2 分され、前者の腫瘍発生において、IDH の変異は非常に早期に生じ、大きな役割を担っている (いわゆる driver mutation) であることが判明した。しかしながら、その腫瘍化過程においていかなる変化が生じているかはほとんどわかっていない。そこで神経前駆細胞へと分化しやすい iPS 細胞に変異型 IDH 発現ベクターを導入し、変異型 IDH が発現されている状況下で iPS 細胞をアストロサイトあるいはオリゴデンドロサイトへと分化させて腫瘍化させることで、神経膠腫 (アストロサイトーマ、オリゴデンドログリオーマ) のモデルを作成し、腫瘍発生の機序の解明を目的とする。

また、不死化させたアストロサイトに変異型 IDH あるいは HRas を導入し腫瘍化させた細胞を用いて変異型 IDH を有する腫瘍化細胞と変異型 IDH に非依存的に腫瘍化した細胞との差を検討する。

3. 研究の方法

変異型 IDH1 による腫瘍化モデルの作成

神経膠腫に限らず白血病や胆管がんでも変異型 IDH は腫瘍化と関連しているとの報告があることから、IDH はアストロサイトやオリゴデンドロサイトへと分化した後に変異を生じるのか、それともそれ以前に変異を生じ、変異型 IDH をもった神経前駆細胞の状態からアストロサイトやオリゴデンドロサイトへと分化して、最終的にアストロサイトーマやオリゴデンドロサイト

ーマへと変化していくのかは不明である。まず、iPS 細胞を使用し、アストロサイトへと分化させることができるかを確認する。次に変異型 IDH1 発現ベクターを iPS 細胞に導入し、その後、フローサイトメトリーにて導入細胞を抽出、あるいは薬剤にてセレクションを行い、安定株を作成する。この安定株を用いて、ウェスタンブロット法にて変異型 IDH1 の発現が上昇していることを確認できた株を用いて、iPS 細胞からアストロサイトへの分化を誘導し、腫瘍モデルを作成する。また、コントロールとして iPS から分化させたアストロサイトを用いて、その差異に関して検討する。アストロサイトへの分化の確認はアストロサイトのマーカーである GFAP などの抗体を用いて細胞免疫反応で確認する。

変異型 IDH の有無に基づいた新たな治療標的の探索

ヒトアストロサイトに HPV16E6E7、hTERT の発現ベクターを導入し、不死化させた細胞を作成する。この不死化細胞に変異型 IDH 発現ベクターを導入し腫瘍化させた、IDH 変異による腫瘍化モデルと活性型 Ras 発現ベクターを導入して腫瘍化させた野生型 IDH 腫瘍モデルを用いて、網羅的遺伝子解析、網羅的代謝解析を行う。その差異に着目し、新たな治療法を探索する。

4. 研究成果

まず、使用する iPS 細胞がアストロサイトまで分化できるのかを確認した。iPS 細胞を 6well プレートへまき、StemFit 培養液下で培養した。次に、神経幹細胞を経て、アストロサイトへの分化を誘導した。GFAP、S-100 抗体を用いて蛍光免疫染色を行ったところ、GFAP、S-100 ともに陽性の細胞を多数認め、アストロサイトへと分化できたことが確認された。

iPS 細胞に IDH1R132H を発現する 2 種類のベクター(一方にはピューロマイシン耐性遺伝子が組み込まれており、もう一方には GFP 発現遺伝子が組み込まれている)を導入し、ピューロマイシンにて薬剤セレクションあるいはフローサイトメトリーにて導入された細胞を抽出した。しかしながら薬剤セレクションを継続して生存した細胞、あるいは GFP をターゲットとして抽出した細胞を継代した後、IDH1R132H の発現を western blot 法にて確認したところ発現をみとめなかった。同結果は再現性が認められたため、高発現の IDH1R132H は iPS 細胞の増殖を抑えるあるいは殺細胞効果があることが示唆された。使用したプラスミドでは実験の継続が困難と考えられた。そのため、IDH1R132H の発現量を調節できるよう doxycycline 依存的に IDH1R132H を発現させるプラスミドを作成した。このプラスミドを iPS 細胞に導入しピューロマイシンでセレクションを行った。生存した細胞に doxycycline を様々な濃度で投与し細胞増殖を認める濃度にて継代し IDH1R132H の発現を western blot 法で確認したところ、発現を認めた(図 2)。この細胞を用いて、現在分化誘導を開始している。

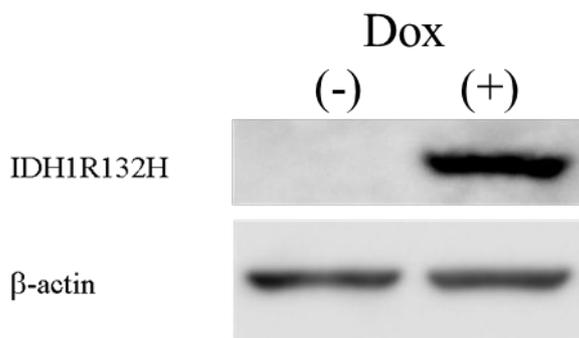


図 2 Doxycycline による IDH1R132H 発現誘導

ヒトアストロサイトに HPV16E6E7、hTERT 発現ベクターを導入し、薬剤セレクションをかけた。生存した細胞(NHAE6E7hTERT)に変異型 IDH 発現ベクターを用いてフローサイトメトリーにて導入できた細胞(NHAE6E7hTERTIDHmut)を抽出した。また HRas 発現ベクターを導入して薬剤セレクションを行った(NHAE6E7hTERTIRas)。これらの細胞において、変異型 IDH あるいは HRas が発現していることを western blot 法にて確認した(図 3)。これらの細胞を用いて、網羅的遺伝子解析、網羅的代謝解析を行った。それらの結果から新規治療の標的となりうる候補に対して検討を行っている。

また、変異型 IDH がプロトポルフィリン IX 濃度に影響を与える可能性が示唆されたことから、前述の NHAE6E7hTERTIDHmut 細胞あるいは NHAE6E7hTERTIRas 細胞を用いてその影響を調べた。変異型 IDH は、ferrochelatase、Heme Oxygenase-1 の活性を亢進させプロトポルフィリン IX の濃度を低下させることが判明した(図 4、5)。この内容に関して現在論文投稿中である。

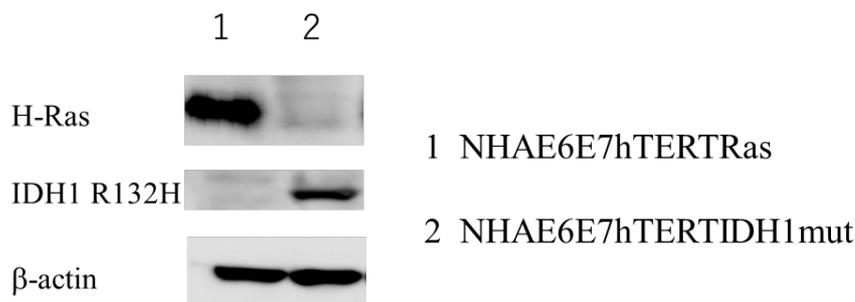


図3 各細胞株における H-Ras、IDH1R132H の発現

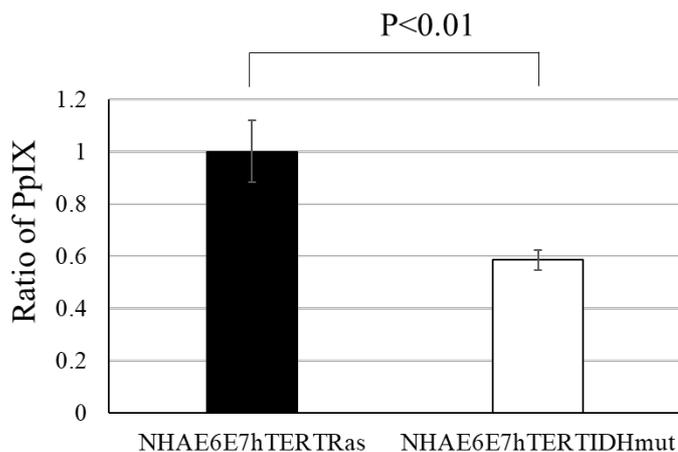


図4 各細胞株におけるプロトポルフィリン IX (PpIX) 濃度の比較

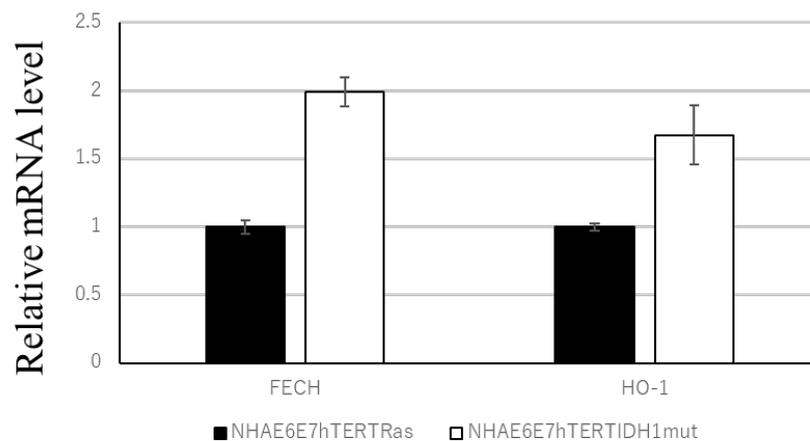


図5 各細胞株における FECH、HO-1 の発現

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 12 件)

Ohba S, Murayama K, Abe M, Hasegawa M, Hirose Y. Magnetic Resonance Imaging and Proton Magnetic Resonance Spectroscopy for Differentiating Between Enhanced Gliomas and Malignant Lymphomas. World Neurosurg. in press

Ohba S, Yamada Y, Murayama K, Sandika E, Sasaki H, Yamada S, Abe M, Hasegawa M, Hirose Y. c-Met Expression Is a Useful Marker for Prognosis Prediction in IDH-Mutant Lower-Grade Gliomas and IDH-Wildtype Glioblastomas. World Neurosurg in press

Ohba S, Hirose Y. Association between mutant IDHs and tumorigenesis in gliomas. Med Mol Morphol. 2018 Dec;51(4):194-198.

Mukherjee J, Johannessen TC, Ohba S, Chow TT, Jones L, Pandita A, Pieper RO. Mutant IDH1 Cooperates with ATRX Loss to Drive the Alternative Lengthening of Telomere Phenotype in Glioma. *Cancer Res.* 2018 Jun 1;78(11):2966-2977.

Moriya S, Ohba S, Adachi K, Nishiyama Y, Hayashi T, Nagahisa S, Kaito T, Nakae S, Hirose Y. A retrospective study of bevacizumab for treatment of brainstem glioma with malignant features. *J Clin Neurosci.* 2018 Jan;47:228-233.

Nakae S, Murayama K, Sasaki H, Kumon M, Nishiyama Y, Ohba S, Adachi K, Nagahisa S, Hayashi T, Inamasu J, Abe M, Hasegawa M, Hirose Y. Prediction of genetic subgroups in adult supra tentorial gliomas by pre- and intraoperative parameters. *J Neurooncol.* 2017 Jan;131(2):403-412.

Ohba S, Mukherjee J, Johannessen TC, Mancini A, Chow TT, Wood M, Jones L, Mazor T, Marshall RE, Viswanath P, Walsh KM, Perry A, Bell RJ, Phillips JJ, Costello JF, Ronen SM, Pieper RO. Mutant IDH1 Expression Drives TERT Promoter Reactivation as Part of the Cellular Transformation Process. *Cancer Res.* 2016 Nov 15;76(22):6680-6689.

Ohba S, Hirose Y. Current and Future Drug Treatments for Glioblastomas. *Curr Med Chem.* 2016;23(38):4309-4316.

Ohba S, Hirose Y. Biological Significance of Mutant Isocitrate Dehydrogenase 1 and 2 in Gliomagenesis. *Neurol Med Chir (Tokyo).* 2016;56(4):170-179.

Mukherjee J, Ohba S, See WL, Phillips JJ, Molinaro AM, Pieper RO. PKM2 uses control of HuR localization to regulate p27 and cell cycle progression in human glioblastoma cells. *Int J Cancer.* 2016 Jul 1;139(1):99-111.

Johannessen TA, Mukherjee J, Viswanath P, Ohba S, Ronen SM, Bjerkvig R, Pieper RO. Rapid Conversion of Mutant IDH1 from Driver to Passenger in a Model of Human Gliomagenesis. *Mol Cancer Res.* 2016 Oct;14(10):976-983.

Hattori N, Hirose Y, Sasaki H, Nakae S, Hayashi S, Ohba S, Adachi K, Hayashi T, Nishiyama Y, Hasegawa M, Abe M. World Health Organization grade II-III astrocytomas consist of genetically distinct tumor lineages. *Cancer Sci.* 2016 Aug;107(8):1159-1164..

〔学会発表〕(計 6 件)

大場茂生、村山和宏、中江俊介、安達一英、西山悠也、佐々木光、山田勢至、安倍雅人、長谷川光広、廣瀬雄一。変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼがプロトポルフィリンIX蛍光に及ぼす影響。第37回日本脳腫瘍学会。May 2019, 名古屋

Ohba S, Murayama K, Nakae S, Adachi K, Nishiyama Y, Sasaki H, et al. The correlation of fluorescence of protoporphyrinogen IX and molecular biological characters in gliomas. the 36th annual meeting of the Japan society of brain tumor pathology, Sep 2018, Tokyo.

Ohba S and Hirose Y. The mechanisms of resistance to temozolomide in glioma cells. The 23rd Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology, Nov 2018, New Orleans.

大場茂生 廣瀬雄一。グリオーマ細胞におけるテモゾロマイド耐性機構と再感受性獲得法。日本脳神経外科学会 第77回学術総会。Oct 2018. 仙台

Ohba S, Mukherjee J, Johannessen TC, Mancini A, Chow TT, Wood M, et al. Mutant IDH1 Expression Drives TERT Promoter Reactivation as Part of the Cellular Transformation Process. 第76回日本癌学会学術総会。Sep 2017. 横浜

Ohba S, Mukherjee J, Johannessen TC, Mancini A, Chow TT, Wood M, et al. Mutant IDH1 Expression Drives TERT Promoter Reactivation as Part of the Cellular Transformation Process. 第49回日本臨床分子形態学会日本癌学会学術総会。Sep 2017. 岐阜

〔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：廣瀬雄一

ローマ字氏名：HIROSE YUICHI

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：脳神経外科

職名：教授

研究者番号（8桁）：60218849

研究分担者氏名：八幡直樹

ローマ字氏名：YAHATA NAOKI

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：解剖学

職名：助教

研究者番号（8桁）：60450697

研究分担者氏名：秦龍二

ローマ字氏名：HATA RYUJI

所属研究機関名：藤田医科大学

部局名：解剖学

職名：教授

研究者番号（8桁）：90258153

(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。