

令和 2 年 2 月 17 日現在

機関番号：32202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16659

研究課題名（和文）IDH陽性グリオーマにおける網羅的代謝解析および新規バイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Comprehensive metabolic analysis in IDH1R132H glioma ; new metabolic biomarkers

研究代表者

宮田 五月 (miyata, satsuki)

自治医科大学・医学部・講師

研究者番号：10705445

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：IDH変異陽性の神経膠腫は、IDH正常の神経膠腫よりも予後が良い。この機序はいくつかの代謝酵素の変化が関わっていると考え、細胞株群と患者脳腫瘍群を用いて網羅的代謝解析を行った。その結果、TCA回路の抑制やエネルギー、アミノ酸、核酸の低下などを示した。また両群の比較では、患者群においてアシルカルニチン、カルニチンの有意な低下を認めた。この結果は酸化の抑制を示唆した。文献的にもIDH1変異に伴うケトグルタル酸の低下は、酸化を抑制する。また、細胞実験において酸化を抑制すると細胞分裂が抑制されると確認した。そのため患者群においてIDH変異に伴う酸化の抑制は、予後に影響すると示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脳腫瘍におけるIDH変異は予後良好であるが、他の癌腫においてIDH変異は予後良好マーカーではない。IDH変異の予後良好の機序は不明である。そのため我々は網羅的代謝解析を行いIDH変異の機序を解明した。今回の研究結果から、IDH正常群の脳腫瘍や他の癌腫における予後良好機序を応用した新規治療などの可能性がある。また、網羅的代謝解析を行って判明した新規バイオマーカー候補物質の可能性もある。つまり、脳腫瘍においてはMRSを用いた術前診断が精度高く可能となり、将来的に手術などを含めた治療戦略の一助となる可能性もある。他の癌腫においては、血液などからバイオマーカー診断を行える可能性もある。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to determine a mechanism for the better prognosis of gliomas with IDH mutation by performing metabolomic analysis. To understand the metabolic state of human gliomas, we analyzed clinical samples of glioma patients with or without the IDH1 mutation, and compared the results with U87 glioblastoma cells expressing IDH1 or IDH1R132H. Gliomas with IDH mutation also showed decreased intermediates in the tricarboxylic acid cycle and pathways involved in the production of energy, amino acids, and nucleic acids. The marked difference in the metabolic profile in IDH mutant clinical glioma samples compared with that of mutant IDH expressing cells includes a decrease in  $\beta$ -oxidation due to acyl-carnitine and carnitine deficiencies. These metabolic changes may explain the lower cell division rate observed in IDH mutant gliomas and may provide a better prognosis in IDH mutant gliomas.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：網羅的代謝解析 酸化 脂質代謝 イソクエン酸脱水素酵素 神経膠腫 バイオマーカー MRS LC model

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

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍において最も頻度の多い神経膠腫(グリオーマ)はイソクエン酸脱水素酵素(IDH)変異を有すると予後が良好であると指摘されている。この予後良好の機序は、不明な点が多い。IDH変異を有する悪性新生物は血液腫瘍や大腸がん、乳がんなど様々な悪性新生物で指摘されている。しかしながら脳腫瘍以外の他の悪性新生物において、IDH変異は予後良好のマーカーではない。このため脳腫瘍におけるIDH変異には特別な機序があると考えられている。この脳腫瘍における予後良好の機序を解明することは、悪性新生物の病態解明の一助となると考えられる。

2. 研究の目的

IDHはTCA回路内の代謝に関する酵素であり、IDH変異を有することで、数多くの代謝の変化を認めると考えられる。そのため本研究では、網羅的代謝解析を行うことでIDH変異の病態解明につながると考えられた。

本研究では、下記2つの研究目的を有する。

- IDH変異グリオーマにおける網羅的代謝解析; その病態の解析、予後良好因子の検討
- IDH変異グリオーマにおける特異的発現物質; バイオマーカーとしての信頼性確立

3. 研究の方法

ヒトU87神経膠芽腫細胞株にIDH変異遺伝子をトランスフェクションした細胞株と、手術で摘出したグリオーマサンプルを用意した。これらをCE-TOFMS法とLC-TOFMS法で網羅的に代謝解析を行った。解析した化合物数は、TCA回路を中心とした500程度である。得られた結果から代謝マッピングを構築しIDH変異の機序を解明した。

上記研究において得られた化合物において、IDH変異に特異的に上昇する物質と低下する物質を同定した。特異的に上昇する物質として2-hydroxyglutarate(2HG)が指摘されており、この物質をMRSにて解析するソフトウェアとしてLC model<sup>®</sup>がある。LC model<sup>®</sup>を用いて2HGを効率よく同定する方法を開発した。

4. 研究成果

**IDH変異グリオーマにおける網羅的代謝解析; その病態の解析、予後良好因子の検討**

U87脳腫瘍細胞株と患者臨床サンプルを用いて網羅的代謝解析を施行した。

その結果、IDH変異陽性群において、2HGの特異的上昇を認めた。またTCA回路の抑制、アミノ酸の低下を認めた(図1A-1C)。

またプリン代謝を調べると、IDH変異群ではATPなどエネルギーの低下を認めた。Adenylate energy charge や total adenylate を検討するとIDH変異群では抑制されていた(図2A, 2B)。

これらの結果は、細胞実験及び臨床腫瘍サンプルの実験において両者同じ傾向だった。

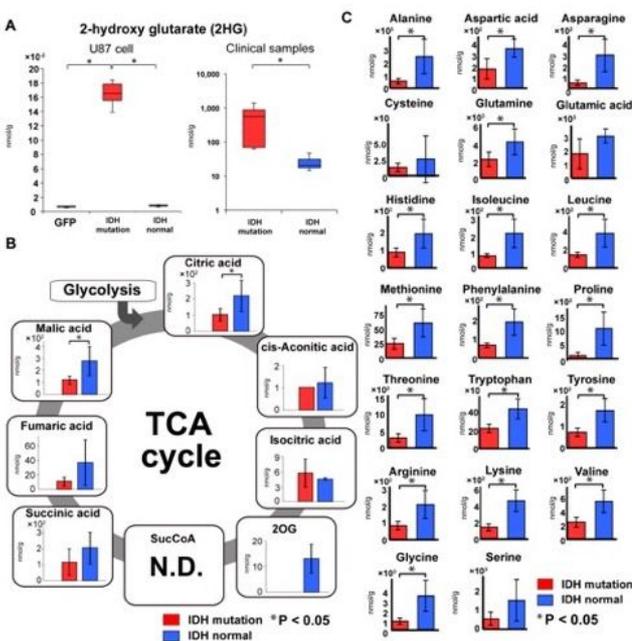


図 1

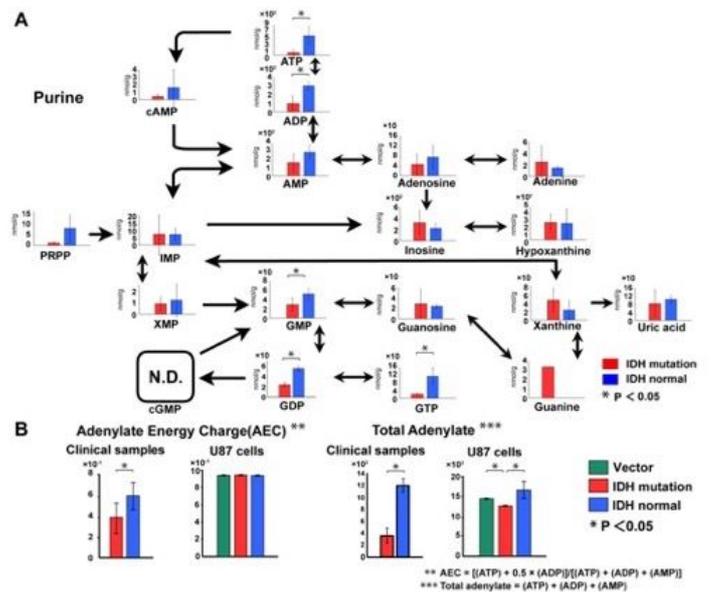


図 2

脂質代謝の解析としてカルニチン、アシルカルニチン、脂肪酸を解析した。その結果、細胞株、臨床腫瘍サンプルで差を認めた(図 3;臨床サンプル, 図 4;細胞株)。つまり、 $\beta$ 酸化の経路(図 3A)を参照に解析結果を提示すると、臨床腫瘍サンプルは細胞実験と比較してカルニチンの過度な低下を認めた(図 3B, 図 4A)。そのため経路下流のアシルカルニチンは臨床腫瘍サンプルで更に低下しており、 $\beta$ 酸化が抑制されていると考えられた。経路上流の脂肪酸については IDH 変異群、正常群共に明らかな差異は認めなかった。

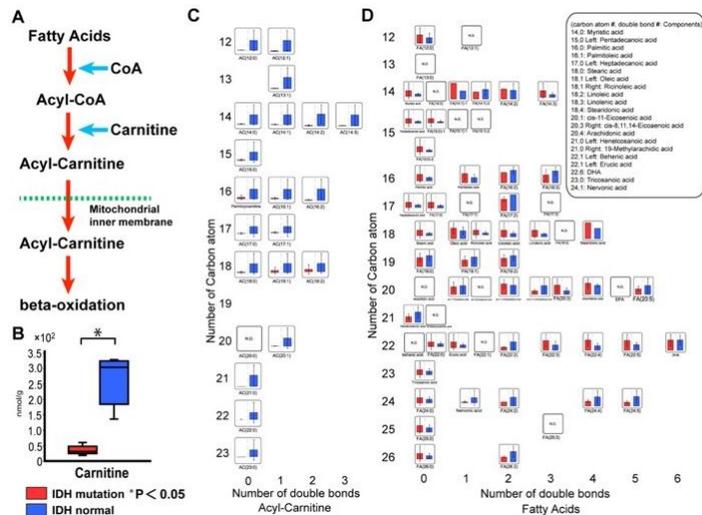


図 3 臨床サンプル解析

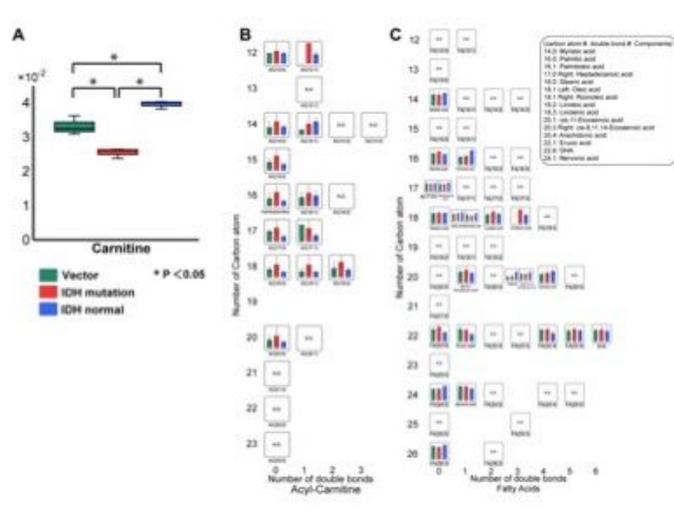


図 4 細胞株解析

本研究の機序において考察すると、IDH 変異によって産生される 2HG は  $\alpha$ -ketoglutaric acid (2OG) と拮抗阻害すると報告されている。2OG 依存性酵素として  $\beta$ 酸化に関わる酵素が報告されている。つまり、臨床検体における IDH 変異群ではカルニチンが枯渇し、 $\beta$ 酸化が抑制される。その結果、エネルギーの枯渇、細胞分裂の抑制となり予後良好の機序となると考えられた(図 5)。

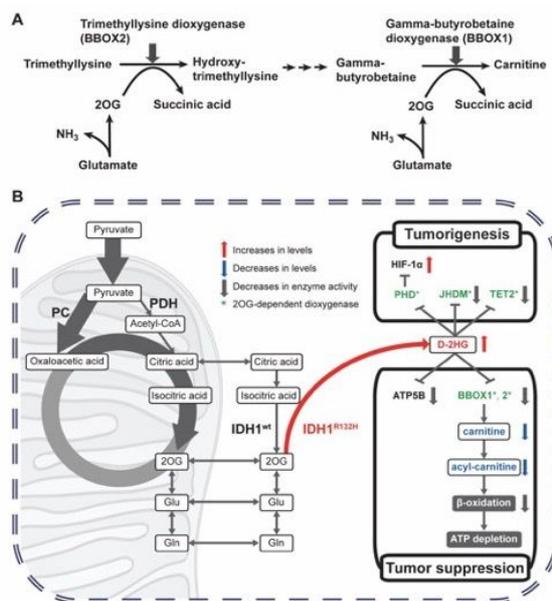


図 5

ここで、何故 細胞実験でカルニチンの抑制は軽度なのか？この疑問を検討するために、以下の仮説を立てた。

**仮説「細胞実験においてカルニチンは培養液中の血清から補充されている」**

この仮説を実証するために、カルニチン投与群の血清とカルニチンなし群の血清を用いた細胞分裂実験とβ酸化を抑制する薬剤（meldonium）を用いた細胞分裂の追加実験を行った。その結果、カルニチンを抑制すると細胞分裂も抑制されることがわかった(図6)。つまり本研究の細胞実験では、カルニチンは培養液中から補充されていると判明した。また細胞分裂にはカルニチンは重要な役割を果たしていることがわかった。

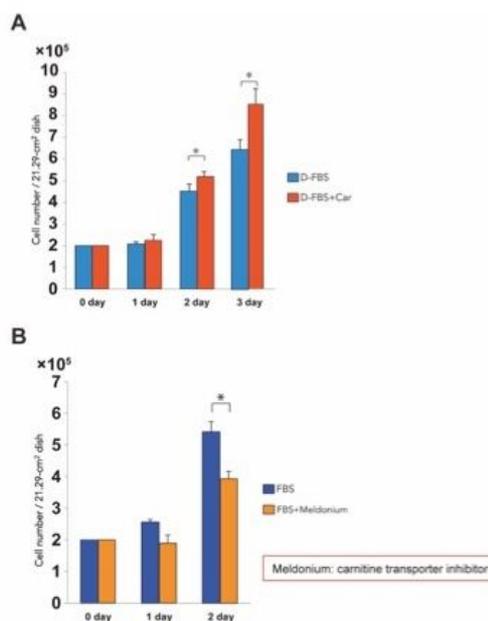


図 6

以上より、患者サンプルと細胞実験では網羅的代謝解析で得られた結果が異なった。それは、周辺環境の違いと考えられるが、細胞実験単独ではなく患者サンプルを用いた実験であるからこそ、より臨床に近い予後良好の機序を示せたと結論した。

**IDH 変異グリオーマにおける特異的発現物質；バイオマーカーとしての信頼性確立**

IDH 変異グリオーマは 2HG が特異的に上昇すると指摘されている。我々の細胞実験、臨床サンプルでの実験も同様の結果だった(図 1A)。2HG を手術前に同定するには MRS の解析を行うと報告されるが、実際単一患者において、single voxel 法で解析を行っても、患者個人のバラツキも大きく信頼性にかけることが多い(図 7)。

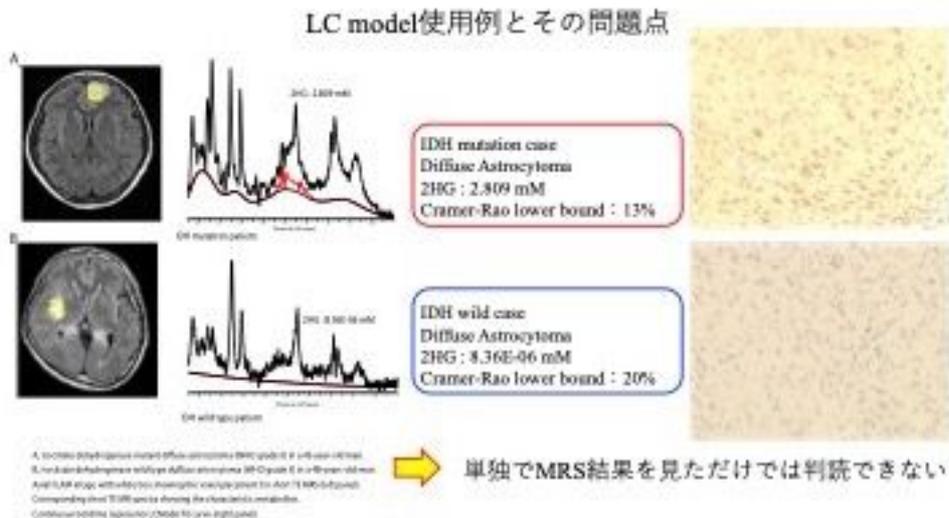


図 7

単一患者において腫瘍を標的とする領域と左右対称の正常領域を設定して MRS 解析を行った (対象: IDH 変異陽性 12 例、陰性 6 例のグリオーマ, 2HG 抽出条件: 2HG threshold > 1mM, Cramer-Rao lower bound < 25%) (図 8)

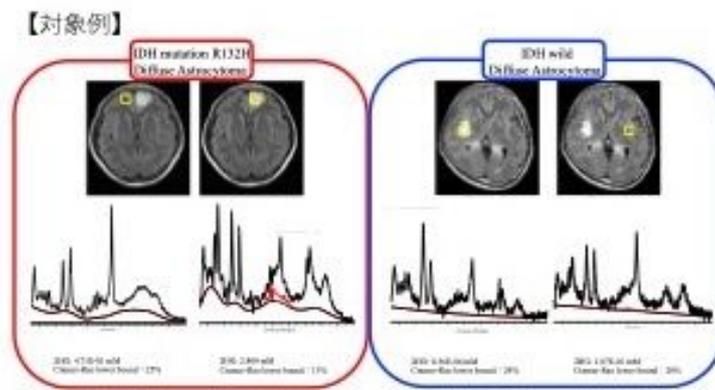


図 8

single voxel 法では ;  
 2HG threshold を 1mM 以上とすることで感度 91.7%、特異度 83.3%と求めることができた( 図 9)。この結果は、まだ 2HG を MRS で解析するには信頼性が低かった。

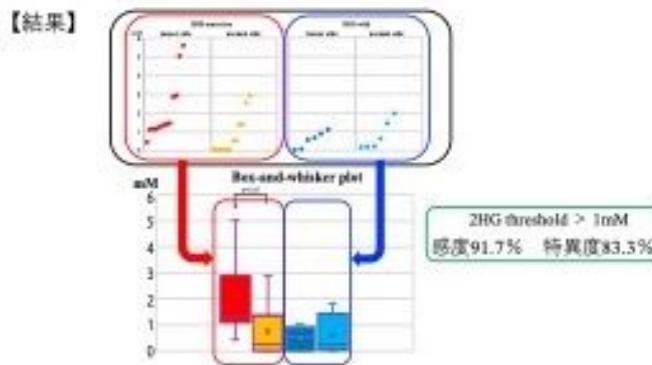


図 9

左右対称の領域を関心領域として解析した double voxel 法では ;  
 Tumor side / normal side を比較した。すると IDH mutation 群では全例 2 倍以上であった。この結果は感度、特異度共に 100%であった ( 図 10)。

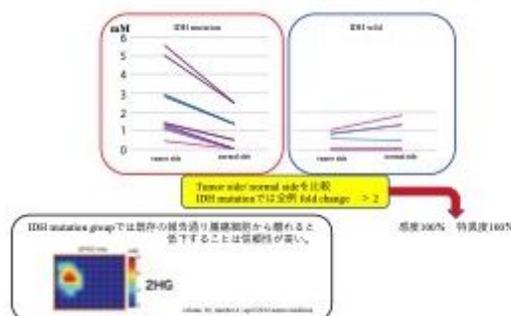


図 10

MRS を用いて 2HG を解析するには、患者個人のバラツキが大きく単回の MRS の評価では解析の信頼性が十分ではない。腫瘍領域と左右対称の正常領域の 2 つを解析する Double voxel 法にて解析を行うことで、感度・特異度共に問題ない結果を得ることができた。これは、multi voxel 法にてすべての領域を MRS 解析するよりも短時間で済むため、患者負担も少なく効率的である。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Miyata Satsuki et al, Comprehensive Metabolomic Analysis of IDH1R132H Clinical Glioma Samples Reveals Suppression of  $\beta$ -oxidation Due to Carnitine Deficiency. Sci Rep. 2019 Jul 5;9(1):9787.

〔学会発表〕(計 6 件)

宮田五月 他,WHO grade ~ glioma における予後規定因子の検討, 日本脳神経外科学会 第 75 回学術総会, 福岡 2016 年 9 月 29 日

内山拓,宮田五月 他,当院における悪性神経腫瘍に対する bevacizumab の使用経験. 日本脳神経外科学会第 75 回学術総会, 福岡, 2016 年 9 月 29 日

宮田五月 他, IDH mutation glioma における脂質解析の検討, 第 18 回日本分子脳神経外科学会, 甲府, 2017 年 8 月 26 日

宮田五月 他, IDH mutation glioma における脂質代謝の検討 An evaluation of lipid metabolism in IDH mutation glioma, 日本脳神経外科第 76 回学術総会, 名古屋, 2017 年 10 月 13 日

富永 薫, 宮田五月 他, 変異型イソクエン酸脱水素酵素 1 (IDH1) を持つグリオーマは、低カルニチンにより 酸化が抑制されている, 第 90 回日本生化学学会大会, 神戸, 2017 年 12 月 6 日

宮田五月 他, LC model を用いた 2-Hydroxyglutarate 検出精度向上の検討 Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas: a study of 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy and LC model, 日本脳神経外科第 77 回学術総会, 仙台, 2018 年 10 月 10 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: イソクエン酸脱水素酵素変異検出マーカ

発明者: 宮田五月

権利者: 学校法人自治医科大学

種類: 特許

番号: 特許第 6195147 号

出願年: 2013 年 3 月 18 日

国内外の別: 国内

名称: 治療剤、腫瘍予後予測方法、及び治療方法

発明者: 遠藤仁司

権利者: 学校法人自治医科大学

種類: 技術

番号: 2017-076484

出願年: 2017 年 4 月 7 日

国内外の別: 国内

取得状況(計 1 件)

名称: イソクエン酸脱水素酵素変異検出マーカ

発明者: 宮田五月

権利者: 学校法人自治医科大学

種類: 特許

番号: 特許第 6195147 号

出願年: 2017 年 8 月 25 日

国内外の別: 国内

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

なし

### (2) 研究協力者

なし

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。