

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19H03773

研究課題名(和文)メチル化アレイ法によるグリオーマ上皮間葉転換メカニズムの解明

研究課題名(英文)Elucidation of the molecular mechanisms underlying mesenchymal transition of glioma cells using methylation array analysis

研究代表者

竹島 秀雄 (Takeshima, Hideo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70244134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,540,000円

研究成果の概要(和文)：上皮型のグリオーマ細胞がどのようなメカニズムで間葉型に移行するのかを分子レベルで明らかにする目的で、エピジェネティックな機序に焦点を当て、そのモデルとして膠肉腫の解析を行った。膠肉腫は、グリオーマ成分と同じ遺伝子変異を有しつつ間葉型への形質転換により、両成分が入り乱れているという組織学的特徴がある。MethylationEPIC BeadChipを用いて、得られたデータをハイデルベルク大学のAI解析ツールClassifierでデータ解析を実施した。結果は、グリオーマ成分と肉腫成分の間には、明らかなエピジェネティックなパターンの差は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫の治療抵抗性の機序の1つとしてグリオーマ幹細胞の上皮間葉転換が知られているが、今回の研究のネガティブデータによりDNAのメチル化を介したエピジェネティックなメカニズムは関与が薄い可能性が示唆された。これをもとに、今後の研究の方向性が、腫瘍における微小環境における細胞間の相互作用やマイクロRNAの発現解析など、その他の調節系に焦点を絞るべき方向性が示唆されたものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the molecular mechanism underlying mesenchymal transition of glioma cells, we focused on the epigenetic change in glioma cells. We investigated gliosarcoma, since this tumor consists of epithelial components and mesenchymal components which share the same genetic alteration in the mosaic fashion. In this project, we analyzed using methylation EPIC BeadChip and Heidelberg CNS Tumor Classifier to compare both epigenetic pattern. However, we could not find any significant difference in epigenetic changes between both two components, suggesting that there might be alternative mechanism in mesenchymal transition of glioma cells.

研究分野：脳神経外科

キーワード：膠肉腫 間葉型形質転換 DNAメチル化アレイ解析 Classifier CRC culture

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々は研究開始以前の6年間で膠芽腫や毛様細胞性星細胞腫などの神経膠腫における組織学的特徴の1つである血管内皮増殖 (Microvascular proliferation: MVP)に焦点を絞って研究を進めてきた。

その発端は、2013年我が国においてもヒト型化抗 VEGF 抗体(bevacizumab)が膠芽腫の治療薬として保険承認されたことに遡る。海外で行われた2つの第 Ⅰ 層試験(Avaglio, RTOG0825)において、初発膠芽腫では明らかな生存期間の延長を示すことはできなかった。その治療抵抗性の機序としては、PDGF など VEGF 以外の増殖因子の活性化が考えられたが、もう1つの可能性として腫瘍細胞が腫瘍幹細胞を経て、血管内皮に形質転換する可能性が *in vitro* の系で示唆された。そして、腫瘍細胞から形質転換した増殖血管内皮細胞は、VEGF の制御へ受けず、NOTCH の制御を受けることも明らかにされた。

そこで我々は、Laser microdissection (LMD)法を用いて膠芽腫の MVP を特異的に切り出して、p53 遺伝子変異を腫瘍細胞のマーカーとして解析したところ、腫瘍における MVP を構成する細胞中に膠芽腫細胞の p53 変異を有するものが少なからず含まれていることを証明した(Kawasoe et al., JNS 2015)。さらに、H28-30年の科研費のサポートで、この現象は悪性腫瘍のみならず WHO grade I に相当する良性の毛様細胞性星細胞腫においても認められることを、KIAA-BRAF 融合遺伝子を腫瘍細胞のマーカーとすることで、腫瘍細胞が mesenchymal transition を起こして正常内皮細胞とともに形成していることを見いだした (Yamashita et al., PLOS ONE, 2019)。

ただし、この LMD の手法では、サンプルが微量になるため、発現プロファイルを含めたこれまでの網羅的解析には向かないという限界があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、様々な組織型の上皮型グリオーマ細胞がどのようなメカニズムで間葉型に移行するのかを組織および分子レベルで解明する点にある。この機序が解明され、mesenchymal phenotype への移行を阻害する方法を確立することで、血管新生阻害薬に対する治療抵抗性の獲得を阻害する新たな悪性脳腫瘍の治療戦略の確立と、これを標的とした創薬への進展が期待される。更にこの現象は、脳腫瘍のみならず他の癌腫においても報告されるため、他領域への応用も期待される。

3. 研究の方法

1) Large scaleの腫瘍解析モデルとして、新にgliosarcoma (膠肉腫)を解析する。

この腫瘍自体は、膠芽腫の亜型と考えられているが、共通の遺伝子変異を有しつつ肉腫成分が大量に混在している。methylation profile は、パラフィン包埋切片から抽出した DNA で解析可能であるため、ストックしてある手術摘出検体を材料として、glioma 成分と sarcoma 成分の methylation profile を網羅的に比較する。

本研究で解析に用いるDNAメチル化アレイとして、イルミナ社：MethylationEPIC BeadChipを用いたDNAメチル化アレイ受託解析サービスを利用する。)

メチル化のパターン解析に関しては、MethylationEPIC BeadChip の生データを Heidelberg

の Web サイト(www.molecularneuropathology.org)にアップロードすることで既知の腫瘍型の解析レポートを得ることができるため、これを利用する。

さらに、併行して腫瘍本体と上皮間葉転換でのメチル化のパターン比較を個別のサンプルペアで詳細に行い、共通するパターン変化からメチル化遺伝子をリストアップし、上皮間葉転換に重要な driver 遺伝子候補を絞り込む。

2) 細胞培養モデルからのアプローチ

これまでに、毛様細胞性星細胞腫の手術検体を、最近報告された CRC 培地で培養し、細胞株を作成する。培養細胞株の確立に 1 年程度要すると考えられるため 2 年目の目標としている。また、glioblastoma に関しては、当教室で既に樹立している 3 種類の glioma stem cell line を用いる。

両者を、抗がん剤であるテモゾロミドに曝すことで、mesenchymalタイプへの変化を促し、これを材料としてmethylation profile解析を行う。

両者を低酸素下で培養し、mesenchymalタイプへの変化を促し、これを材料としてmethylation profileの比較解析を行う。

3) mesenchymal transitionと浸潤マクロファージの関連

mesenchymal transitionと浸潤マクロファージの分布に関して膠芽腫、毛様細胞性星細胞腫、膠肉腫などの腫瘍組織で解析する。

Glioma-stem cellとマクロファージ(単球性白血病細胞)を共培養し、CD31(血管内皮マーカー)、 α -SMA(血管周皮のマーカー)により上皮間葉転換を確認。

in vitroの系で様々な環境下で刺激したマクロファージの培養上清によるグリオーマ細胞の上皮間葉転換を観察する。

液性成分とエクソソームによる可能性があるが、上清から標的分子を精製し、責任物質を明らかにする。

この物質とメチル化アレイでリストアップされた責任遺伝子の比較により、メカニズムを詳細に検討する。

4. 研究成果

本研究では、エピジェネティックな機序に焦点を当て、そのモデルとして膠肉腫の解析を行った。この腫瘍の組織学的特徴は、グリオーマ成分と同じ遺伝子変異を有しつつ間葉型への形質転換により、両成分が入り乱れているという特徴がある。我々は、手術にて摘出され、パラフィン包埋されている膠肉腫から、DNAの抽出を行いmethylation profileの解析をDNAメチル化アレイ解析を行った。

実施中、この解析における問題点として、マイクロアレイ解析には 1 μ g におよぶ大量のDNAが必要であり、glioma成分とsarcoma成分が入り乱れているサンプルからのレーザーマイクロダイセクションでは十分な収量が得られなかった。そこで、glioma成分とsarcoma成分の成分が大きく分かれるサンプルのみを抽出し解析し、イルミナ社のMethylationEPIC BeadChipを用いて解析を行った。パラフィン包埋で保存されていた組織は、ホルマリン固定によりDNAの断片化が進んでおり、生データはややノイズの混入が多かった。それでもハイデルベルク大学のAI解析ツールClassifierでデータ解析を実施した。結果は、グリオーマ成分と肉腫成分の間には、明確なエピジェネティックなパターンの差は認められなかった。従って、グリオーマ細胞の上皮間葉転換の機序として、今後は腫瘍内の微小環境やマイクロRNAその他の機序に焦点を移

し研究すべきことが示唆された。

一方、サブ解析として並行して実施していた CRC culture を用いた良性腫瘍の培養株の確立には成功しており、今後このテクニックを応用していく。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita Shinji, Takeshima Hideo, Matsumoto Fumitaka, Yamasaki Kouji, Fukushima Tsuyoshi, Sakoda Hideyuki, Nakazato Masamitsu, Saito Kiyotaka, Mizuguchi Asako, Watanabe Takashi, Ohta Hajime, Yokogami Kiyotaka	4. 巻 14
2. 論文標題 Detection of the KIAA1549-BRAF fusion gene in cells forming microvascular proliferations in pilocytic astrocytoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-13
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0220146	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 横上聖貴、渡邊孝、武石剛、山下真治、中武康隆、竹島秀雄
2. 発表標題 メチオニン代謝がglioma initiating cell (GIC) に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 横上聖貴、渡邊孝、武石剛、山下真治、中武康隆、竹島秀雄
2. 発表標題 メチオニン代謝がglioma initiating cell (GIC) に及ぼす影響の解明
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kiyotaka Yokogami, Hideo Takeshima
2. 発表標題 Methionine metabolism closely related with self-renew, pluripotency and cell death in GICs through modification of cholesterol biosynthesis, ribosomal RNA and autophagy.
3. 学会等名 The 26th annual meeting of the society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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	横上 聖貴 (Yokogami Kiyotaka) (40284856)	宮崎大学・医学部・准教授 (17601)	
研究 分担者	山下 真治 (Yamashita Shinji) (40468046)	宮崎大学・医学部・助教 (17601)	
研究 分担者	渡邊 孝 (Watanabe Takashi) (90573337)	宮崎大学・医学部・講師 (17601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------