

令和 4 年 6 月 10 日現在

機関番号：33916

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09468

研究課題名(和文) iPS細胞由来変異型IDH神経膠腫モデルを用いた腫瘍化機序の解明と新規治療の開発

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of tumorigenesis and development of new treatments using iPS cell-derived mutant IDH glioma model

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：1) Doxycycline濃度依存性に調節可能なプラスミドをiPS細胞に導入することで、変異型IDH1を有する神経膠腫モデルを作成した。

2) 網羅的代謝解析の結果、野生型IDH神経膠腫モデルではアスパラギンが、変異型IDH神経膠腫モデルではグルタミンが他者に比べてより低いことが示された。L-asparaginaseはオートファジーを誘導し、野生型IDHモデルにおいてより抗腫瘍効果を示し、GLUD1阻害剤はROSやアポトーシスを誘導し、IDH変異型モデルにおいてより抗腫瘍効果を示した。

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、新規治療法が望まれる。本研究では、IDH変異に基づく神経膠腫モデルを作成することで、その分子生物学的特性を解明し、治療法の開発へとつなげる。また、変異型IDHを有する神経膠腫と有さない神経膠腫の代謝の差異に着目し、がん代謝を標的とした新たな治療法の開発を目指す。本研究から得られる結果は治療困難な病気において、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)：1) By induction of doxycycline-inducible plasmid, iPS cell-derived mutant IDH glioma model was made.

2) Metabolic assay revealed that the amount of asparagine was lower in IDH-wildtype glioma model compared with IDH-mutant glioma model. L-asparaginase was more effective in the former model than the latter model, inducing autophagy. IDH-mutant glioma model showed the lower amount of glutamine, glutamate and 2-oxoglutarate than IDH-wildtype glioma model. GLUD1 inhibitor suppressed the proliferation of glioma cells in IDH-mutant glioma model than IDH-wildtype glioma model, inducing ROS and apoptosis.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：神経膠腫 がん代謝 網羅的遺伝子解析 IDH iPS

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 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高い腫瘍であり、標準治療は手術に加え放射線、化学療法である。しかしながら治療成績は満足のものではなく、その原因として腫瘍の分子生物学的な解明が十分でないことがあげられる。近年、神経膠腫の発生機構や分子生物学的特徴に関して様々な研究がすすみ、2016年に出版された World Health Organization (WHO) の脳腫瘍分類において神経膠腫の診断に分子診断がとりいられることとなった。その中で注目すべきものの一つがイソクエン酸デヒドロゲナーゼ (IDH) の変異である。神経膠腫は野生型 IDH を有する群と変異型 IDH を有する群に大きく2分され、同じ WHO グレード内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とが報告されている。更にはこの変異型 IDH は予後に関わるだけでなく、変異型 IDH を有する神経膠腫における発生過程の初期の段階に深く関与するとされている (いわゆる driver mutation とされている)。IDH はイソクエン酸をアルファケトグルタル酸(α -KG)に変換するが、変異型 IDH は α -KG を 2 - ヒドロキシグルタル酸(2-HG)に変換する。2-HG は α -KG 依存性の様々な酵素 (DNA demethylase や histone demethylase) を阻害し、結果としてヒストンのメチル化や DNA のメチル化を生じさせ、様々な遺伝子の発現に影響を与える。これらのことが腫瘍発生につながるとされている。また、変異型 IDH は必ずしも神経膠腫のみの腫瘍化に関与しているわけではなく、白血病や軟骨腫瘍、胆管癌においても認められる。変異型 IDH による腫瘍化 (神経膠腫化) の過程においてどのような遺伝子発現が関与しているのか、またどのような代謝の変化が生じているのかはほとんど明らかになっていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、変異型 IDH を有する神経膠腫の発生過程において、どのような遺伝子の変化や代謝の変化が生じているのかを解明し、それらに関与した治療法を開発すること、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に着目し、遺伝子発現・代謝の変化に治療の標的を見出し新規治療への応用、発展について検討することである。

3. 研究の方法

1) 変異型 IDH による神経膠腫の発症機構を解明するために、以下の研究を行う。

iPS 細胞由来の変異型 IDH による腫瘍化モデルを作製する。

IDH の変異が神経膠腫のどの段階で生じるのか不明であるため、iPS 細胞からアストロサイトへと分化させた各段階 (iPS 細胞、神経幹細胞、アストロサイト) で変異型 IDH を導入し神経膠腫モデルを作成する。

作成した神経膠腫モデルを用いて網羅的遺伝子解析を行う。

で作成したモデルを用いて腫瘍化に関与する遺伝子の発現解析を RNAseq にて行う。

作成した神経膠腫モデルを用いて網羅的代謝解析を行う。

で作成したモデルを用いて腫瘍化によって変化する代謝物のメタボローム解析を行う。新規治療法の検討を行う。

、で得られた解析結果をもとに新規標的に対する治療法の検討を行う。

マウス脳内での腫瘍モデルの作成。

作成した神経膠腫モデルをマウスの脳内に移植し、脳内で腫瘍を形成するかを検討。

更には神経膠腫モデルの細胞と、マウス脳内で形成した腫瘍の遺伝子発現の差異を解析する。

2) 変異型 IDH の有無に基づいた新たな治療標的の探索と新規治療法へと発展させるために以下の実験を行う。

既に作成した、ヒトアストロサイト由来の IDH 変異による腫瘍化モデルと活性型 Ras にて腫瘍化した野生型 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った。治療の標的となる経路の候補がいくつか同定できたため、これらの経路を標的とした単剤、あるいは既存の治療薬との併剤で実際に抗腫瘍効果を高めるのかを明らかにし、そのメカニズムを詳細に検討する。

4. 研究成果

1) 変異型 IDH による神経膠腫の発症機構を解明

iPS 細胞に変異型 IDH1 を発現するプラスミドを導入した結果、生存することなく細胞死へとむかった。変異型 IDH1 の過剰発現が細胞生存に障害となっていると考え、変異型 IDH1 の発現を Doxycycline 濃度依存性に調節可能なプラスミドを作成し、iPS 細胞に導入した。変異型 IDH1 を発現しつつ細胞増殖を維持できる Doxycycline の濃度を同定し、その濃度下で培養することで、変異型 IDH1 を発現し増殖可能な細胞を作成した。しかしながら、この細胞は progenitor cell への分化が困難であった。それ故、まず iPS 細胞を progenitor cell へと分化誘導し、分化した progenitor cell へ変異型 IDH1 あるいは p53 や Rb の系を抑制する HPV16E6E7 を導入した。この細胞に TERT を発現させるプラスミドを導入し目的の細胞を作成した。また、TERT を発現させるプラスミド

の代わりに、ATRAX を標的とした shRNA を導入した。一方、iPS 細胞から progenitor cell へと分化させた後、HPV16E6E7、TERT の発現プラスミド、HRasV12 発現プラスミドを導入した細胞も作成した。今後これらの細胞を用いて遺伝子解析を行っていく予定である。また、iPS 細胞をアストロサイトへと分化誘導可能かについて検証し、GFAP 陽性、s-100 陽性のアストロサイトへと分化可能であったことを確認した。

2) 変異型 IDH の有無に基づいた新たな治療標的の探索と新規治療法の開発

網羅的代謝解析の結果、野生型 IDH 神経膠腫モデルではアスパラギンが、変異型 IDH 神経膠腫モデルではグルタミンが他者に比べてより低いことが示された。そこでアスパラギンをアスパラギン酸へと変換させる L-asparaginase の抗腫瘍効果を調べたところ、野生型 IDH モデルにおいてより感受性が高かった (図 1)。また抗腫瘍効果の機構としてオートファジーの関与が示唆された (図 2)。

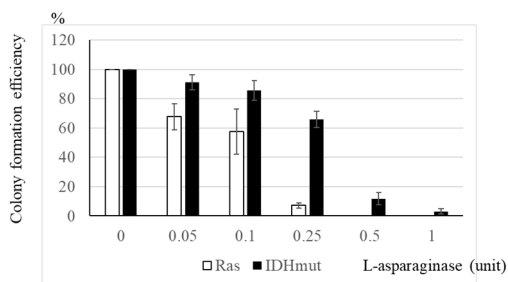


図 1. L-asparaginase による抗腫瘍効果

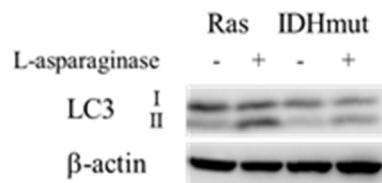


図 2. L-asparaginase によるオートファジーの誘導

次にグルタミン酸から α ケトグルタル酸 (α -KG) へと変換させる GLUD1 の阻害剤 (R162) を用いて抗腫瘍効果を調べたところ IDH 変異型モデルにおいてより感受性が高かった (図 3)。GLUD1 阻害剤はアポトーシスを誘導した (図 4)。

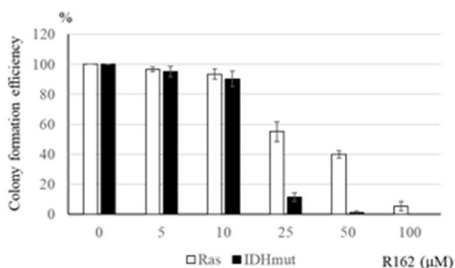


図 3. R162 による抗腫瘍効果

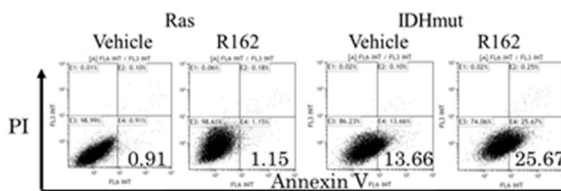


図 4. R162 によるアポトーシスの誘導

現在、マウスと用いた vivo での実験を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8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 Ohba Shigeo, Yamashiro Kei, Hirose Yuichi	4. 巻 13
2. 論文標題 Inhibition of DNA Repair in Combination with Temozolomide or Dianhydrogalactinol Overcomes Temozolomide-Resistant Glioma Cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancers	6. 最初と最後の頁 2570 ~ 2570
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13112570	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 KUMON Masanobu, NAKAE Shunsuke, MURAYAMA Kazuhiro, KATO Takema, OHBA Shigeo, INAMASU Joji, YAMADA Seiji, ABE Masato, SASAKI Hikaru, OHNO Yoshiharu, HASEGAWA Mitsuhiro, KURAHASHI Hiroki, HIROSE Yuichi	4. 巻 61
2. 論文標題 Myoinositol to Total Choline Ratio in Glioblastomas as a Potential Prognostic Factor in Preoperative Magnetic Resonance Spectroscopy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 453 ~ 460
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/nmc.oa.2020-0312	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 Mukherjee Joydeep, Pandita Ajay, Kamalakar Chatla, Johannessen Tor-Christian, Ohba Shigeo, Tang Yongjian, Dalle-Ore Cecilia L., Bjerkvig Rolf, Pieper Russell O.	4. 巻 13
2. 論文標題 A subset of PARP inhibitors induces lethal telomere fusion in ALT-dependent tumor cells	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Science Translational Medicine	6. 最初と最後の頁 7211
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1126/scitranslmed.abc7211	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 Nakae Shunsuke, Kumon Masanobu, Murayama Kazuhiro, Ohba Shigeo, Sasaki Hikaru, Inamasu Joji, Kuwahara Kiyonori, Yamada Seiji, Abe Masato, Hirose Yuichi	4. 巻 11
2. 論文標題 Association of preoperative seizures with tumor metabolites quantified by magnetic resonance spectroscopy in gliomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 7927
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-86487-6	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 Ohba Shigeo, Kuwahara Kiyonori, Yamada Seiji, Abe Masato, Hirose Yuichi	4. 巻 37
2. 論文標題 Correlation between IDH, ATRX, and TERT promoter mutations in glioma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 33 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00360-4	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 Ohba Shigeo, Hirose Yuichi	4. 巻 146
2. 論文標題 l-asparaginase and 6-diazo-5-oxo-l-norleucine synergistically inhibit the growth of glioblastoma cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 469 ~ 475
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-019-03351-4	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 Ohba Shigeo, Johannessen Tor-Christian Aase, Chatla Kamalakar, Yang Xiaodong, Pieper Russell O., Mukherjee Joydeep	4. 巻 31
2. 論文標題 Phosphoglycerate Mutase 1 Activates DNA Damage Repair via Regulation of WIP1 Activity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cell Reports	6. 最初と最後の頁 107518 ~ 107518
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2020.03.082	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 Ohba Shigeo, Murayama Kazuhiro, Kuwahara Kiyonori, Pareira Eriel Sandika, Nakae Shunsuke, Nishiyama Yuya, Adachi Kazuhide, Yamada Seiji, Sasaki Hikaru, Yamamoto Naoki, Abe Masato, Mukherjee Joydeep, Hasegawa Mitsuhiro, Pieper Russell O, Hirose Yuichi	4. 巻 87
2. 論文標題 The Correlation of Fluorescence of Protoporphyrinogen IX and Status of Isocitrate Dehydrogenase in Gliomas	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 408 ~ 417
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuros/nyz524	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 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大場茂生、平山明由、常陸圭介、山口央輝、 Joydeep Mukherjee、Russell O Pieper、廣瀬雄一
2. 発表標題 IDH変異型、IDH野生型グリオーマにおけるアミノ酸代謝を標的とした治療法の検討
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 Shigeo Ohba, Akiyoshi Hirayama, Keisuke Hitachi, Hisateru Yamaguchi, Joydeep Mukherjee, Russell O Pieper, Yuichi Hirose
2. 発表標題 Targeting amino acid metabolic vulnerabilities in IDH-mutant and IDH-wildtype gliomas
3. 学会等名 26th Annual Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大場茂生、平山明由、常陸圭介、山口央輝、 Joydeep Mukherjee、Russell O Pieper、廣瀬雄一
2. 発表標題 IDH変異型、IDH野生型神経膠腫におけるアミノ酸代謝を標的とした治療法の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大場茂生
2. 発表標題 変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼによるプロトポルフィリン の変化
3. 学会等名 第20回日本術中画像情報学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大場茂生
2. 発表標題 変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼによるプロトポルフィリン蛍光の変化
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大場茂生
2. 発表標題 ホスホグリセリン酸ムターゼ1はWIP1活性を介してDNA損傷に対する修復を行う
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大場茂生
2. 発表標題 Phosphoglycerate mutase 1 activates DNA damage repair via regulation of WIP1 activity
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 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
2. 発表標題 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 蛍光に及ぼす影響
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 大場茂生、村山和宏、兼原聖典、Pareira Eriel、中江俊介、西山悠也、安達一英、山田勢至、佐々木光、山本直樹、安倍雅人、Joydeep Mukherjee、長谷川光広、Russell Pieper、廣瀬雄一
2. 発表標題 変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼによるプロトポルフィリン 蛍光の変化
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019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	廣瀬 雄一 (HIROSE YUICHI) (60218849)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	八幡 直樹 (YAHATA NAOKI) (60450607)	藤田医科大学・医学部・講師 (33916)	
研究分担者	秦 龍二 (HATA RYUJI) (90258153)	藤田医科大学・医学部・教授 (33916)	
研究分担者	常陸 圭介 (HITACHI KEISUKE) (10508469)	藤田医科大学・総合医科学研究所・助教 (33916)	
研究分担者	平山 明由 (HIRAYAMA AKIYOSHI) (00572405)	慶應義塾大学・政策・メディア研究科(藤沢)・特任准教授 (32612)	

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
---------	---------