

令和 6 年 6 月 16 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09332

研究課題名（和文）TET2遺伝子を用いた膠芽腫に対するマルチターゲット脱メチル化遺伝子治療研究

研究課題名（英文）Multi-targeted demethylation gene therapy for glioblastoma using the TET2 gene.

研究代表者

草鹿 元（Kusaka, Gen）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：00265258

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）：本研究は、Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2 (TET2)を治療遺伝子とする悪性神経膠腫（膠芽腫）への新規遺伝子治療の基礎研究である。申請者らはこれまで、癌抑制遺伝子に関する研究からDNAメチル化による癌抑制遺伝子の不活化が膠芽腫の発症に関わると考えてきた。TET2は脱メチル化酵素でありメチル化で不活化した複数の癌抑制遺伝子を同時に活性化できるため膠芽腫治療に適した治療遺伝子である。今回の研究では、TET2の治療遺伝子としての可能性を見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究は膠芽腫遺伝子治療の新規治療戦略の開発に寄与すると考えている。脱メチル化の効果は化学療法感受性の上昇にも寄与すると考えられ、既知の化学療法の増強作用および耐性化とその克服にも役立つ。更に、TET2の刺激は多数の癌抑制遺伝子の効果を総合的に示すものであり、既に、申請者らが得ている個々の癌抑制遺伝子の作用および情報伝達系に関する知識と対比させることにより、癌抑制遺伝子の相互作用に関する理解が深まる。今後、頭頸部癌遺伝子治療や分子標的治療への応用のみならず、癌抑制遺伝子の多くが神経学・内分泌学の分野においても重要な遺伝子であることからゲノム創薬の分野でも意義ある地位を占めるものと思われる。

研究成果の概要（英文）：This study is a basic research on a novel gene therapy for malignant glioma (glioblastoma) using ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase 2 (TET2) as a therapeutic gene. We have considered that inactivation of tumor suppressor genes by DNA methylation is involved in the development of glioblastoma based on studies on tumor suppressor genes, and TET2 is a demethylase that can simultaneously activate multiple tumor suppressor genes that are inactivated by methylation, making it a suitable therapeutic gene for the treatment of glioblastoma. In this study, we found the potential of TET2 as a therapeutic gene.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：脳腫瘍 悪性神経膠腫 DNAメチル化 遺伝子導入 膠芽腫 遺伝子治療 癌抑制遺伝子

1. 研究開始当初の背景

現在、膠芽腫の治療は、外科的切除および術後化学放射線治療、更に、維持化学療法と標準治療がある。しかしながら、進行例や再発例も多いため十分な治療効果を挙げるに至ってはいない。このため新たな治療法の開発が望まれている。TET2 遺伝子は TET (ten-eleven translocation) 遺伝子ファミリーのメンバーである。この酵素は 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) の 5-methylcytosine (5-mC) への変換を触媒する酵素であるため DNA 脱メチル化と関連している。また、DNA 脱メチル化の活性化に加えて、5hmC はそれ自体が epigenetic mark として知られており、クロマチン調整および epigenetic メンテナンスにおいて機能的な役割を果たしている。TET 蛋白の活性化と 5hmC のプロファイルは多数の生物学的プロセスに関連することが知られている。例えば遺伝子の転写、DNA 制御、細胞腫瘍化、細胞機能、分化進展 (development and differentiation) である。TET2 の遺伝子への動員とその活性はいくつかの因子により規制されている。TET2 の DNA 結合部位は IDAX と関連し、それは TET2 抑制に関連する。TET2 の発現は組織に依存し、成人における造血系および神経系で一貫して発現しており、TET2 のこれらの組織での重要性を示している。これまで TETs の調整不全は様々な病的プロセスで確認されている。また、異常な 5hmC のパターンは様々な癌で認められ、TET2 は多くの癌で癌抑制遺伝子としても認識されている。また、TET2 の発現抑制は多くの血液系の悪性腫瘍で確認され、その原因は様々な遺伝子変異が主因であると考えられている。TET2 の調整不能は他の腫瘍においても確認することができ、それらの腫瘍では、TET2 の調整障害は予後不良や生存率の低下と関連する。このよう TET family がコントロールする遺伝子は多数に亘り、様々な細胞機能を調整している。このため TET ファミリーはマルチターゲットな治療用遺伝子と位置付けることができる。このように TET family は、癌研究において非常に注目されている遺伝子であり、膠芽腫における新たな知見も報告されるようになってきている。本研究は、代表的な TET family である TET2 の膠芽腫における機能を解析するとともに TET2 を治療用遺伝子とする新規遺伝子治療法の開発を目的とした。これは、申請者らが、頭頸部癌において癌抑制遺伝子が DNA メチル化により抑制され、これが発癌の原因であることを見出したことが発端である。例えば、申請者らは、GALR1 は頭頸部癌において細胞周期を停止し細胞増殖を抑制すること、GALR2 は、この GALR1 の作用に加えアポトーシスを誘導することを見出した。更に、これらの遺伝子は DNA メチル化により抑制されており頭頸部癌発癌に大きく関わっていることも報告した。しかしながら、COL1A2、TAC1、SSTR などの遺伝子も DNA メチル化により癌抑制機能が抑制され頭頸部癌発癌の原因となっている。このため 1 つの癌抑制遺伝子自体を遺伝子導入しても、一定の治療効果はあるもののすべての細胞を死滅させるには至らなかった。このような結果から頭頸部癌を効果的に治療するためには、同時に複数の癌抑制遺伝子を活性化する必要があると考えた。この傾向は膠芽腫においても同様と考えられ、脱メチル化を促進する TET family は新規膠芽腫治療において有望な分子標的であると考えている。実際、TET2 の遺伝子導入により黒色腫細胞株の増殖や浸潤能が抑制されたとの報告もなされるようになってきている。今回の研究では、代表的な TET family 遺伝子である TET2 を膠芽腫細胞株に遺伝子導入し膠芽腫の殺細胞効果を検討するとともに、それらに特有な情報伝達経路を同定し、TET2 が次世代の膠芽腫遺伝子治療の治療遺伝子となり得るかを検討する。更に、癌抑制遺伝子の脱メチル化は、放射線や化学療法に対する感受性を上昇させることが知られている。膠芽腫は時空間的に不均一な細胞集団であり細胞ごとに化学療法感受性が異なる。この化学療法感受性の相違は各細胞の DNA メチル化の程度により生じる。このため TET2 の導入は細胞の化学療法感受性自体を上昇させることも予想される。今回解明される結果は、膠芽腫に対する DNA メチル化を標的とする新規遺伝子治療薬の開発を促進するばかりではなく、既知の分子標的治療薬や抗癌剤を含めた膠芽腫化学療法の進歩に大きく寄与するものと思われる。

2. 研究の目的

この TET2 を治療遺伝子とする膠芽腫遺伝子治療の有用性を明らかにすることが今回の研究の目標である。同時に TET2 の膠芽腫における役割も解明したい。具体的には以下の点を明らかにする。はじめに、膠芽腫における TET2 の意義を確認するために膠芽腫細胞 TET2 遺伝子発現と 5hmC 量を測定する。次に、TET2 低発現細胞に TET2 を遺伝子導入し、TET2 高発現細胞株を作成する。その細胞に対して次世代シーケンサーを用い親細胞と遺伝子挿入細胞のメチル化パターンの違いについて解析する。これにより TET2 遺伝子導入の過程で遺伝子全体のメチル化度の変化と mRNA の変化を確認する。更に、マイクロアレイ解析により遺伝子発現を確認するとともに申請者らがこれまで頭頸部癌と関連が強いことを明らかにした GALR1、GALR2、COL1A2、TAC1、SSTR などの数種の癌抑制遺伝子については作用の再活性化を検討する。続いて、シングルセル抽出システムを利用し 1 細胞別のメチル化パターンの違いについて解析する。このようにして、細胞ごとのメチル化パターンを解析し膠芽腫の

不均一性の程度を明らかにし、TET2 が膠芽腫の不均一性を克服できるかを検討する。最終的には、治療用ベクターを作成し治療効果について検討する。このようにして新たな膠芽腫遺伝子治療開発の基礎とする予定である。

3. 研究の方法

TET2 はこれまでの申請者らのデータから膠芽腫において細胞増殖抑制効果をもち治療用遺伝子として臨床応用が可能であることを示唆している。本研究では、TET2 の膠芽腫における意義と役割そして癌抑制遺伝子を介した作用機序を解明するとともに治療用遺伝子としての可能性を検討するために以下の研究をおこなった。

- (1) 膠芽腫細胞別の TET2 遺伝子発現の確認と 5hmC の定量とその相関の検討
- (2) TET2 の頭頸部細胞株への遺伝子導入と細胞動態・情報伝達経路の確認
- (3) TET2 による癌抑制遺伝子の再活性化と作用機序の確認
- (4) 実験結果を踏まえての文献的考察

4. 研究成果

- (1) 複数の膠芽腫由来細胞株と正常線維芽細胞の培養実験を行った。予備実験として、TET2 の発現と細胞内の 5hmC の量が相関するかを知るために、TET2 の発現をウエスタン解析で検討し、ゲノム DNA 中に含まれる 5hmC 量を Enzyme-Linked Immuno-sorbent Assay (ELISA 法) を用いて定量した。しかしながら、おこなった検討では膠芽腫において TET2 の発現と 5hmC 量に関して有意な相関を認めることができなかった。また、ウエスタン解析においても明らかな TET2 発現量の相違を見出すことができなかった。このため定性的 RT-PCR の結果を参考に TET2 発現が抑制されていると思われる膠芽腫由来細胞を用いて以下の実験を行っている。
- (2) TET2 と GFP が共発現するようにサイトメガロウイルスプロモーター (CMV) の下流に TET2-HA tag-Ires (internal ribosome entry site)-GFP の順で各遺伝子を配列した pCMV-TET2-IresGFP を作成した。最適な膠芽腫細胞株に pCMV-TET2-IresGFP をリポフェクタミン法により遺伝子導入した。導入した細胞を一過性発現が消失するまで継代した後、セルソーターにより GFP 陽性細胞のみを選択し TET2 安定発現細胞を樹立した。
- (3) 発現細胞株を用いて特定の癌抑制遺伝子の再活性化の有無と作用機序の回復を確認する研究を行った。具体的には、樹立した TET2 安定発現細胞の形態、増殖能、浸潤能およびアポトーシス誘導の有無などの表現型の変化を観察することを目的とするものである。更に、TET2 の情報伝達経路を確認するとともに 5hmC 量の変化も観察し膠芽腫における TET2 の意義を確認することも目的としている。対象とした癌抑制遺伝子には、これまでの研究で最も解析が進んでいる GALR1 と GALR2 を用いた。具体的には、TET2 の発現により GALR 1 や GALR2 が脱メチル化され再活性化されたことを確認するために、プロモーター領域の脱メチル化をバイサルファイトシーケンス法で解析した。機能の回復は、Galain 刺激により活性化される情報伝達系が、既に、強制発現の実験系で確認している GALR1 および GALR2 に情報伝達系と同様であるかを確認した。以前の頭頸部癌での強制発現の実験では、GALR1 の細胞周期停止作用であり GALR2 はこれに加えてアポトーシス誘導作用であるが、この作用が本実験のもとでも再現できるかが最も注目すべき点であった。しかしながら TET2 発現細胞株と親株を比較したところ GALR2 に関しては上昇する傾向は認められたものの GALR1 に関しては明らかな発現量の違いは認められなかった。また、RT-PCR を用いた GALR1 および GALR2 の発現の量の上昇も認められなかった。現時点での原因は不明であるが、TET2 の発現量が十分ではないことが考えられる。また、細胞株は継代後にも GFP による選択を繰り返したが安定細胞株としては継代維持が難しかったことも原因の 1 つかもしれない。また、GALR および GLR2 のリガンドである Galain 刺激を行った際も頭頸部癌細胞株で認められた GALR1 の細胞周期停止作用および GALR2 のアポトーシス刺激作用を認めることはできなかった。この点も GALR1 および GALR2 の直接の細胞導入に比較して TET2 遺伝子の導入の場合は GALR1 および GALR2 の発現量が低いことが原因として考えられた。このため COL1A2, TAC1, SSTR などの他の遺伝子についての再活性化も確認することができなかった。また、膠芽腫の不均一性についての “TET2 遺伝子導入癌細胞のゲノムを Fluidigm C1 single-Cell Auto Prep System により 1 細胞ごとに単離・増幅し次世代シーケンサーまたは droplet デジタル PCR でメチル化解析を行い、TET2 が膠芽腫の不均一性の解消に寄与しているかを検証する”。研究は行うことができなかった。
- (4) 研究過程での文献的検索を行うことにより以下の点が明らかになった。TET2 蛋白質は、同じようなホモロジーを有する TET1 および TET3 と同様に Epigenetic なゲノム装飾である 5-mC から 5-hmC への変換を触媒する。5-hmC はその後、酸化され

5-fC および 5-caC に変換される。この知識は、初期には TET2 酵素が活発な DNA 脱メチル化において重要な役割を果たすと考えられていました。しかしながら、最近の研究では TET2 蛋白の役割は、単に、DNA 脱メチル化ではなく生成物である 5hmC 自体が epigenetic mark である可能性が示唆されてきている。TET2 は血球系の組織において高い発現が認められており、このことは血球分化のプロセスにおいて重要な働きをしていることを示唆している。また、血球系の腫瘍においてしばしば TET2 の遺伝子変異が認められることから裏付けられる。血球系腫瘍程は多くはないが、TET2 の遺伝子変異は腎細胞がん、前立腺癌、肺癌、大腸・直腸がんなどの様々な固形癌において認められている。しかしながら、これらの遺伝子変異は癌におけるこの酵素の発現頻度の変化を説明できるわけでははない。TET2 の膠芽腫では遺伝子変異は認められないが、しばしば発現は低下している。いくつかの研究では膠芽腫における TET2 のダウンレギュレーションに關与する代替分子メカニズムを解明するために、コントロールおよび腫瘍サンプルにおける 5-mC, 5-hmC および H3K16ac の TET2 プロモーターおよび遺伝子間レベルを分析することにより epigenetic 因子の可能な役割を検討した。機能の面からは、膠芽腫細胞 LN229 における TET2 の再活性化は培養細胞において細胞増殖を抑制、動物実験でも細胞増殖を抑制した。これらの結果は、TET2 は白血病細胞や上皮小体癌、大腸がん、そして膠芽腫などに対して抗腫瘍効果をもつという以前の研究結果合致する。したがって、これらの結果は TET2 活性が異なる分子メカニズムを介して癌で頻回に破壊され、このプロセスが悪性転換に寄与する可能性があることを示唆している。私達の結果では、膠芽腫における TET2 の回復は神経分化に關わる遺伝子をアップレギュレートする傾向がある。それらの遺伝子は例えば、Brain fatty acid-binding protein (BFABP), implicated in glial lineage differentiation, the proneural basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factor Mash1 など oligodendrogenesis and neural precursor differentiation and Cystathionine b-Synthase (cbs) に關わる星状細胞に高発現しているものである。実際、cbs の低発現は膠芽腫で確認されている。このため、これらの結果は TET2 が神経分化に關わっているとのこれまでのデータを支持するものである。TET2 活性を復活させた LN229 膠芽腫細胞株ではニューロン特異的マイクロ RNA miR-124 やオリゴデンドロサイト特異的マイクロ RNA miR-338 の変化を検出することができることが報告されている。反対に、Sox2 のような分化の初期の神経分化マーカーが少しダウンレギュレートします。これらの結果は、TET2 が神経細胞の分化に重要な働きを示すこと、また、TET2 蛋白が膠芽腫の細胞に抗腫瘍効果を示すことを示唆している。このため TET2 遺伝子は膠芽腫治療において優れた分子標的であることが示唆される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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	水上 浩明 (Mizukami Hiroaki) (20311938)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	
研究分担者	金澤 丈治 (Kanazawa Takeharu) (20336374)	自治医科大学・医学部・教授 (32202)	

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