

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 2 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390408

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍の根治に向けたエピジェネティクスによるリプログラミング創薬の開発

研究課題名（英文）Chemical biology reprogramming epigenetic aberration in malignant brain tumors

研究代表者

夏目 敦至 (NATSUME ATSUSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：30362255

研究成果の概要（和文）：

我々は DNA のメチル化などのエピジェネティクスが癌精巣抗原(Cancer-testis antigens, CTAs)の発現調節にも関与していることを見出し、5-aza-deoxycytidine をグリオーマに作用させると CTAs の発現が活性化することを認めた。そして CTA 特異的細胞傷害性 T 細胞によって HLA 拘束性に傷害される。以上に DNA メチル化阻害剤と癌ワクチン療法の組み合わせで強力な免疫療法の開発の展望を示した。一方、HDAC 阻害剤のうち、SAHA, MS-275, FK-288 は米国において白血病における臨床試験が行われている。また、脳神経外科領域でなじみのある抗てんかん薬のバルプロ酸が HDAC 阻害活性を有しているのも興味深い。DNA メチル化酵素や HDAC とともに EZH2 も分子標的となりうる。現在、エピジェネティクス異常を標的とする治療薬の開発が急速に進んできており、グリオーマにおいて適応になるのも近い将来可能になると期待される。

研究成果の概要（英文）：

Almost all cancer cells have multiple epigenetic abnormalities, which combine with genetic changes to affect many cellular processes, including cell proliferation and apoptosis, by silencing tumor-suppressor genes. In this study, we focused on the epigenetic mechanisms of DNA hypomethylation and CpG island hypermethylation in gliomas. Aberrant hypermethylation in promoter CpG islands has been recognized as a key mechanism involved in the silencing of cancer-associated genes and occurs at genes with diverse functions related to tumorigenesis and tumor progression. Such promoter hypermethylation can modulate the sensitivity of glioblastomas to drugs and radiotherapy. As an example, the methylation of the *MGMT* promoter is a specific predictive biomarker of tumor responsiveness to chemotherapy with alkylating agents. Finally, we also evaluated the potential of NY-ESO-1, the most immunogenic cancer/testis antigen (CTA) discovered thus far, as an immunotherapy target. The use of potent epigenetics-based therapy for cancer cells might restore the abnormally regulated epigenomes to a more normal state through epigenetic reprogramming. Thus, epigenetic therapy may be a promising and potent treatment for human neoplasia.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	9,700,000	2,910,000	12,610,000
2010 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2011 年度	2,100,000	630,000	2,730,000
総計	13,900,000	4,170,000	18,070,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：創薬

1. 研究開始当初の背景

ポストシーケンス時代を向かえた現在、ゲノム解析を踏まえ、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御機構が注目されている。細胞内にある DNA はヒストンタンパクに巻きつきヌクレオソームを形成し、ヌクレオソーム構造の集合体によってクロマチン構造が形成され、さらにその集合体によって染色体の基本構造が構築されている。エピジェネティクスとは A, G, C, T の塩基配列の変化をとまわず、さまざまな環境因子に対応し、遺伝子の発現を活性化したり不活化したりする後生的修飾機構である。動物の体細胞のゲノムは、例外を除いて同一であり、細胞の個性は、発現遺伝子や発現のない遺伝子の組み合わせによって決定され、その多くはエピジェネティクスによって制御されている。例えば、胚性幹細胞からの組織への分化はエピジェネティクスにより、極めてダイナミックにしかも繊細に決定されているし、エピジェネティクスの破綻は奇形、癌、老化、代謝異常、精神疾患などの疾病につながる。エピジェネティクスの大きな特徴は可塑性があり、人為的に再プログラムさせることが可能である点であり、発生・分化・疾病などの生命現象におけるエピジェネティクスの解明は、医療への応用を考えるうえでの重要課題である。

2. 研究の目的

悪性脳腫瘍に対する治療は現時点でも根治は困難であり、この現状の課題を克服するために、さまざまな分子標的治療薬の開発がすでに大きく進展している。しかし、これら治療薬の標的分子の多くは、正常組織においても重要な働きをしていることから、治療薬の安全性及び有用性の評価は最終的には臨床研究に委ねられている。一方、脳腫瘍幹細胞のコンセプトは、腫瘍発生のしくみを明らかにすることで新しい治療薬を開発できる可能性を提示している。そのしくみの解明の糸口として、我々は近年、ゲノムの変化を伴わず遺伝子発現を制御するエピジェネティクスな変化が腫瘍細胞への誘導の重要な引き金を担っていることを証明してきている。エピジェネティクスは可逆的であり、その変化をリプログラミングできる。本稿では腫瘍発生に関わるエピジェネティクスを解説し、エピジェネティクスの観点からリプログラミング療法の研究開発への展望を示すことが目的である。

3. 研究の方法

DNA メチル化はエピジェネティクス機構のひとつとしてよく知られている。多くの真核生物ではゲノム中に存在するシトシンの約 4% がメチル化されている。そしてゲノム中の全 CpG ジヌクレオチドの 60-90% がメチル化されている。したがってゲノム中の CpG ジヌクレオチドの多くはメチル化されていることになるが、メチル化されていないジヌクレオチドがゲノム上にランダムに散らばっているわけではなく、ドメインを形成して存在している。このような CpG が豊富なドメインを CpG アイランドという。CpG アイランドは全ゲノム上の 1-2% を占め、多くはエクソンの上流プロモータ領域に存在する。数少ない例外（インプリンティング遺伝子、不活化 X 染色体）を除いて、CpG アイランドは通常、非メチル化状態である。

4. 研究の成果

DNA メチル化により遺伝子発現が制御されている機構には大きく 2 つある。① 転写調節因子結合阻害による制御、② DNA メチル化パターンを認識するメチル化 CpG 結合タンパクの結合による発現抑制である。前者の場合、転写因子の認識する領域がメチル化されていると、メチル化に感受性のある転写因子の結合が阻害される。このような転写因子として AP-2、c-Myc、E2F、NF κ B が知られている。後者の場合は、DNA メチル化結合タンパクとヒストン修飾が密接に関連しているのにより複雑である。DNA は 8 量体を形成するコアヒストンタンパクに巻きついていてヌクレオソームを形成する。コアヒストンから立体構造に乏しいアミノ酸残基からなる正に電荷されたヒストンテールが出ていて、メチル化、アセチル化、リン酸化、ユビキチン化、SUMO 化など多岐にわたるヒストンの翻訳後化学修飾を受ける。例えば、アセチル化されると正電荷がなくなり、負電荷の DNA との相互作用が変化したり、隣接したヌクレオソームとの位置関係が変化したりする。一般にヒストン H3 Lys9 (H3-K9) および H3-K27 のメチル化は遺伝子の転写を抑制し、H3-K4 のメチル化は遺伝子の転写を活性化する。DNA メチル化結合タンパクがメチル化 CpG に結合すると転写抑制に働く。例えばメチル化 CpG に結合する MecP2 はヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC) および転写コリプレッサー Sin3a と複合体を形成し、メチル化依存的に遺伝子発現を抑制する。さらに DNA メチル化とヒストン修飾とくにヒストンのメチル化や脱アセチル化が機能的に関連して転写抑制を起こしている。癌ではヒストン H3 の Lys9 (H3-K9)

のメチル化と DNA メチル化が密接に関連し、遺伝子の不活性化のループを形成している。このように不活性化される遺伝子には MGMT, p16, hMLH1, RASSF1, BRCA1 などがある。一方、ポリコムタンパク複合体(Polycomb group; PcG)と H3-K27 メチル化に依存した遺伝子不活性化機構も明らかになっている。PcG はショウジョウバエで最初に記述され、ふつう第1肢のみに見られる櫛状 (comb) 構造をしている sex comb が、この遺伝子変異によって第2肢、第3肢にも見られることに由来している。最近、胚性幹細胞(ES)から各臓器への分化にエピジェネティクス制御が大きく関与するという知見が増えてきており、iPS(induced pluripotent stem)細胞においても Nanog, OCT3/4, Sox2 の DNA メチル化が顕著に低下していることも報告されている。ヒトの癌の初期段階や胚性幹細胞からの分化過程ではヒストンメチル化酵素とヒストン脱アセチル化酵素を含む PcG タンパク複合体(Polycomb repressive complex2; PRC2)のリクルートが H3-K27 のメチル化を誘導し、さらに Polycomb Repressive complex1 (PRC1) のリクルートによって遺伝子の不活性化が起こることが報告された。したがって、脳腫瘍の発生においてエピジェネティクスが重要な役割を果たしていることが推測された。

また、メチル化阻害剤 5-aza-cytidine, 5-aza-deoxycytidine の臨床応用の歴史は古く、1960 年代に既に抗白血病剤としての治療研究がなされている。しかし、高濃度の薬剤投与による毒性が問題となり実用化には至らなかった。最近、副作用のより少ない低濃度での抗腫瘍効果が報告され、今後、他の抗癌剤との併用により、より強い効果が期待される。MD アンダーソン癌センターのグループは低濃度の 5-aza-deoxycytidin を繰り返し投与することによって骨髄異形成症候群に高い有効率をあげ、FDA で承認薬になった。また、我々の研究室では、グリオーマに対するエピジェネティクス腫瘍ワクチン療法への可能性を示唆している。グリオーマは免疫原性が低いために、抗腫瘍免疫にとっては不利な環境にあると考えられている。癌-精巣抗原 (cancer-testis antigens (CTAs)) は精巣以外の正常組織には発現がなく、癌のみに発現する有望な癌関連抗原であるが、グリオーマではその発現はほとんど皆無である。我々は DNA のメチル化などのエピジェネティクスが CTAs の発現調節にも関与していることを見出し、5-aza--deoxycytidine をグリオーマに作用させると CTAs の発現が活性化することを認めた。そして CTA 特異的 CTL によって HLA 拘束性に傷害される。以上により、メチル化阻害剤と癌ワクチン療法の組み合わせで強力な免疫療法の開発の展望を示した。一方、HDAC 阻害剤のうち、SAHA, MS-275,

FK-288 は米国において白血病における臨床試験が行われている。また、脳神経外科領域でなじみのある抗てんかん薬のバルプロ酸が HDAC 阻害活性を有しているのも興味深い。DNA メチル化酵素や HDAC とともに EZH2 も分子標的となりうる。現在、エピジェネティクス異常を標的とする治療薬の開発が急速に進んできており、グリオーマにおいて適応になるのも近い将来可能になると期待された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 24 件、全て査読あり)

1. Kishida Y, Natsume A, Kondo Y, Takeuchi I, An B, Okamoto Y, Shinjo K, Saito K, Ando H, Ohka F, Sekido Y, Wakabayashi T. Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. *Carcinogenesis*. in press. 2011.
2. Natsume A, Kato T, Kinjo S, Enomoto A, Toda H, Shimato S, Ohka F, Motomura K, Kondo Y, Miyata T, Takahashi M, Wakabayashi T. Girdin maintains the stemness of glioblastoma stem cells. *Oncogene*. in press, 2011.
3. Wakabayashi T, Kayama, T., Nishikawa, R., Takahashi, H., Hashimoto, N., Takahashi, J., Aoki, T., Sugiyama, K., Ogura, M., Natsume A, and Yoshida, J. (2011). A multicenter phase I trial of combination therapy with interferon-beta and temozolomide for high-grade gliomas (INTEGRA study): the final report. *J Neurooncol* 104, 573-577.
4. Ohka, F., Natsume A, Motomura, K., Kishida, Y., Kondo Y, Abe, T., Nakasu, Y., Namba, H., Wakai, K., Fukui, T., et al. (2011). The global DNA methylation surrogate LINE-1 methylation is correlated with MGMT promoter methylation and is a better prognostic factor for glioma. *PLoS One* 6, e23332.
5. Natsume A, Kinjo, S., Yuki, K., Kato, T., Ohno, M., Motomura, K., Iwami, K., and Wakabayashi T. (2011). Glioma-initiating cells and molecular pathology: implications for therapy. *Brain Tumor Pathol* 28, 1-12.
6. Motomura, K., Natsume A, and Wakabayashi T. (2011). Intravenous administration of temozolomide as a useful alternative over oral treatment with temozolomide capsules in patients with gliomas. *J Neurooncol* 106: 209-211.

7. Motomura, K., Natsume, A., Kishida, Y., Higashi, H., Kondo, Y., Nakasu, Y., Abe, T., Namba, H., Wakai, K., and Wakabayashi, T. (2011). Benefits of interferon-beta and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: A multicenter study. *Cancer* 117, 1721-1730.
8. Motomura, K., Natsume, A., Fujii, M., Ito, M., Momota, H., and Wakabayashi, T. (2011). Long-term survival in patients with newly diagnosed primary central nervous system lymphoma treated with dexamethasone, etoposide, ifosfamide and carboplatin chemotherapy and whole-brain radiation therapy. *Leuk Lymphoma*. 52: 2069-75,
9. Momota, H., Iwami, K., Fujii, M., Motomura, K., Natsume, A., Ogino, J., Hasegawa, T., and Wakabayashi, T. (2011). Rhabdoid glioblastoma in a child: case report and literature review. *Brain Tumor Pathol* 28, 65-70.
10. Iwami, K., Natsume, A., and Wakabayashi, T. (2011). Cytokine networks in glioma. *Neurosurg Rev* 34, 253-263; discussion 263-254.
11. Ohno, M., Natsume, A., Ichiro Iwami, K., Iwamizu, H., Noritake, K., Ito, D., Toi, Y., Ito, M., Motomura, K., Yoshida, J., et al. (2010). Retrovirally engineered T-cell-based immunotherapy targeting type III variant epidermal growth factor receptor, a glioma-associated antigen. *Cancer Sci* 101, 2518-2524.
12. Natsume, A., Kondo, Y., Ito, M., Motomura, K., Wakabayashi, T., and Yoshida, J. (2010). Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. *Cancer Sci* 101, 1331-1336.
13. Motomura, K., Ogura, M., Natsume, A., Yokoyama, H., and Wakabayashi, T. (2010). A free-radical scavenger protects the neural progenitor cells in the dentate subgranular zone of the hippocampus from cell death after X-irradiation. *Neurosci Lett* 485, 65-70.
14. Motomura, K., Natsume, A., Kishida, Y., Higashi, H., Kondo, Y., Nakasu, Y., Abe, T., Namba, H., Wakai, K., and Wakabayashi, T. (2010). Benefits of interferon-beta and temozolomide combination therapy for newly diagnosed primary glioblastoma with the unmethylated MGMT promoter: a multicenter study. *Cancer*.117: 1721-30,
15. Kato, T., Natsume, A., Toda, H., Iwamizu, H., Sugita, T., Hachisu, R., Watanabe, R., Yuki, K., Motomura, K., Bankiewicz, K., and Wakabayashi, T. (2010). Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Ther* 17, 1363-1371.
16. Iwami, K., Natsume, A., and "" (2010). Gene therapy for high-grade glioma. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 50, 727-736.
17. Ito, S., Natsume, A., Shimato, S., Ohno, M., Kato, T., Chansakul, P., Wakabayashi, T., and Kim, S. U. (2010). Human neural stem cells transduced with IFN-beta and cytosine deaminase genes intensify bystander effect in experimental glioma. *Cancer Gene Ther* 17, 299-306.
18. Yuki, K., Natsume, A., Yokoyama, H., Kondo, Y., Ohno, M., Kato, T., Chansakul, P., Ito, M., Kim, S. U., and Wakabayashi, T. (2009). Induction of oligodendrogenesis in glioblastoma-initiating cells by IFN-mediated activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett* 284, 71-79.
19. Wakabayashi, T., Natsume, A., Hatano, H., Fujii, M., Shimato, S., Ito, M., Ohno, M., Ito, S., Ogura, M., and Yoshida, J. (2009). p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery* 64, 455-461; discussion 461-452.
20. Wakabayashi, T., Fujii, M., Kajita, Y., Natsume, A., Maezawa, S., and Yoshida, J. (2009). Advanced new neurosurgical procedure using integrated system of intraoperative MRI and neuronavigation with multimodal neuroradiological images. *Nagoya J Med Sci* 71, 101-107.
21. Oi, S., Natsume, A., Ito, M., Kondo, Y., Shimato, S., Maeda, Y., Saito, K., and Wakabayashi, T. (2009). Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells. *J Neurooncol* 92, 15-22.
22. Ohno, M., Natsume, A., Kondo, Y., Iwamizu, H., Motomura, K., Toda, H., Ito, M., Kato, T., and Wakabayashi, T. (2009). The modulation of microRNAs by type I IFN through the activation of signal transducers and activators of transcription 3 in human glioma. *Mol Cancer Res* 7, 2022-2030.
23. Ohno, M., Natsume, A., Fujii, M., Ito, M., and Wakabayashi, T. (2009). Interferon-beta, MCNU, and conventional radiotherapy for pediatric patients with brainstem glioma. *Pediatr Blood Cancer* 53,

- 37-41.
24. Ito, M., Natsume, A., Takeuchi, H., Shimato, S., Ohno, M., Wakabayashi, T., and Yoshida, J. (2009). Type I interferon inhibits astrocytic gliosis and promotes functional recovery after spinal cord injury by deactivation of the MEK/ERK pathway. *J Neurotrauma* 26, 41-53.

[学会発表] (計 6 件)

[海外招待講演のみ]

1. Natsume, A. Regulation of heterogeneity by Epigenetic modifications in GBM stem cells. IARC Seminar. 2011/3/29, Lyon, France.
2. Natsume, A. Immuno-therapay using retrovirally engineered T cells expressing chimeric antigen receptors specific to glioma-associated antigens. International Society of Cell Therapy. 2010/10/20, Miyazaki, Japan
3. A Multicenter Phase I Trial of Combination Therapy with Interferon- β and Temozolomide for High-grade Gliomas (INTEGRA study) : The Final Report. 9th annual meeting of Asian Clinical Oncology Society. 2010/8/26, Gifu, Japan
4. Epigenetic plasticity regulated by polycomb repressive complex in GBM-initiating cells. 7th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology. 2010/6/12, Seoul, Korea.
5. A clinical trial of interleukin-13 receptor alpha 2 peptide-pulsed DC vaccine for malignant gliomas. World Congress of Vaccine -2010. 2010/3/25, Beijing, China.
6. Regulation of heterogeneity by Epigenetic modifications in GBM stem cells. Seoul National University Seminar. 2009/11/6, Seoul, Korea.

[図書] (計 4 件)

1. 夏目敦至、脳腫瘍取扱い規約 (第 3 版)

- 金原出版、2010. pp50-55.
2. 夏目敦至、新時代の脳腫瘍学-脳腫瘍におけるエピジェネティクス 日本臨床、2010, pp34-42.
 3. 夏目敦至、遺伝子診療学-脳腫瘍-ゲノム異常の最新アトラス 日本臨床、2010, pp56-62
 4. 夏目敦至、脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第 3 版 医学書院、2009, pp34-37.

[産業財産権] なし

[その他] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目敦至 (NATSUME ATSUSHI)

名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号：30362255

(2) 研究分担者

若林俊彦 (WAKABAYASHI TOSHIHIKO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号：50220835

鈴木正昭 (SUZUKI MASAOKI)

独立行政法人・理化学研究所・分子イメージング科学研究センター・副センター長
研究者番号：90093046

古山浩子 (KOYAMA HIROKO)

岐阜大学・大学院医学系研究科・助教
研究者番号：50402160

(3) 連携研究者

近藤 豊 (KONDO YUTAKA)

愛知県がんセンター研究所・室長
研究者番号：00419897

竹内一郎 (TAKEUCHI ICHIRO)

名古屋工業大学・工学研究科・准教授
研究者番号：40335146