

令和 6 年 5 月 22 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16634

研究課題名(和文) DIF-1によるMycを標的とした新たな髄芽腫治療研究

研究課題名(英文) Development of a novel therapeutic strategy against medulloblastoma targeting Myc by DIF-1

研究代表者

伊藤 寛 (Ito, Hiroshi)

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：50795375

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：髄芽腫は代表的な小児悪性脳腫瘍である。Group3/4の髄芽腫でMYC増幅があるMBは予後不良である。DIF-1は様々な癌種で抗腫瘍効果が報告されている。DIF-1は髄芽腫細胞株のMyc発現を転写抑制によって減弱し、アポトーシスを起こし細胞増殖を抑制した。この増殖抑制効果はMYC増幅を有する細胞株に顕著であった。

しかし、siRNAによるMYCノックダウンはMYC増幅の有無に関わらず細胞増殖を抑制しなかった。DIF-1による細胞増殖抑制効果はMYC転写抑制の関与は少ないと考えられた。

DIF-1は髄芽腫細胞の治療候補になりうるが、その機序はさらなる検証が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最も予後不良なGroup3/4髄芽腫に対する標的治療はない。予後不良な因子としてMYC増幅が報告されているがMYCを直接標的とした治療もない。本研究では、DIF-1が髄芽腫細胞のMYC転写を抑制し、かつMYC増幅細胞の細胞増殖を抑制することを示した。ただし、DIF-1による細胞増殖抑制は単純なMyc発現抑制によるものではないことが明らかとなった。

本研究の結果、DIF-1が髄芽腫治療候補になりうる可能性を示したことやDIF-1にMYC自身の転写を抑制する効果があることが示されたため他癌種においてもMYCを標的とする新たな治療候補としての有効性も提示できたことに意義がある。

研究成果の概要(英文)：Medulloblastoma (MB) is a representative pediatric brain tumor. Group 3/4 medulloblastoma with MYC amplification have a poor prognosis. DIF-1 had been reported its anti-tumor effect in various cancer. We revealed DIF-1 reduced expression of Myc by transcriptional repression, caused apoptosis and downregulated cell growth in MB cell lines. This downregulation of cell growth is more remarkable in MYC amplified MB cell lines. However, MYC knock down by siRNA did not downregulated cell growth in MB cell lines. It suggested that downregulation of cell growth in MB cells may not be involved in transcriptional repression of MYC.

We concluded that DIF-1 may be a therapeutic option, but further studies are necessary about its mechanism.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Medulloblastoma MYC DIF-1

1. 研究開始当初の背景

髄芽腫 (Medulloblastoma; MB) は代表的な小児悪性脳腫瘍であり進行が早く、脊髄を含む中枢神経系に播種性に進展することが特徴である。近年、MB の全ゲノム解析が行われ、ドライバー遺伝子変異の発見と、それに基づいた遺伝子分類 (WNT 活性化タイプ、SHH 活性化タイプ、Group3、Group4) が行われた (図 1)。このうちドライバー遺伝子が明らかとなっていない Group3/4 は高率に転移・播種をきたし予後不良である。標準治療は手術に加え白金製剤を含めた化学療法、脳脊髄を含めた広範な放射線治療である。たとえ生存しても小児期のこのような治療により、精神発達遅滞や成長後の二次性腫瘍などの様々な問題を抱えており、この腫瘍に有効な治療薬剤の創出は非常に重要である。

近年の遺伝子解析の結果、MYC/MYCN 遺伝子の増幅・過剰発現がある MB は予後不良であり、治療標的として注目されている (Menyhárt O, et al., J Hematol Oncol. 2019)。MYC/MYCN 遺伝子はがん遺伝子として知られており、HLH タイプの転写因子である c-Myc、N-myc タンパクをコードする。その増幅や過剰発現は、パーキットリンパ腫やびまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫の原因であり、神経芽腫の予後不良因子として知られている。これまでに c-Myc/N-myc を直接標的とした有望な薬剤は存在しない。Myc の転写機構に関わる分子や転写標的遺伝子を標的とした治療が研究されているが、現在までに有効な薬剤は開発されていない。

我々はこれまでに、N-myc に発現が抑制される分化関連遺伝子 N-myc downstream regulated gene 1 (NDRG1) は、悪性脳腫瘍である GBM の予後良好因子であり、NDRG1 発現を上昇させる薬剤として Differentiation inducing factor-1 (DIF-1) を見出した。DIF-1 は *Dyctiostelium discoideum* の形態分化に関わる物質であり、最近ではその抗腫瘍効果が報告されている (Furukawa S, et al., BBRC, 2019)。加えて、我々はこれまでの研究で、DIF-1 はマウス血液脳関門を通過し、同所移植髄芽腫モデルにおいて腫瘍増殖を抑制することを発見し、報告した (Ito H, et al., Cancer res. 80(2):234-248, 2020.)。

その研究の過程で、DIF-1 は MYC/MYCN 増幅を有する患者由来髄芽腫幹細胞 (glioma stem cells: GSCs) の Myc 発現を著明に低下させることを発見した (図 2; 未発表データ)。さらに、MYC 増幅や Myc 高発現の MB 細胞株においても、DIF-1 は GSCs と同様に腫瘍細胞増殖を抑制する (図 3; 未発表データ)。DIF-1 は MYC/MYCN 増幅を有する予後不良な MB の Myc を標的とした新規治療薬になりうる。

上記、これまでに我々が得ている研究結果をまとめると、

- ・ DIF-1 は MYC/MYCN 増幅を有する腫瘍細胞の c-Myc/N-myc 発現を低下させる。
- ・ DIF-1 は MB 細胞の増殖を抑制する。
- ・ DIF-1 は血液脳関門を通過し、同所移植 GSCs マウスモデルで抗腫瘍効果を有する。

である。これらの結果をさらに発展させることによって、本研究では、DIF-1 による MYC 発現抑制の分子機構を明らかにすることで、MYC/MYCN 増幅を有する髄芽腫の DIF-1 を用いた新たな Myc 標的治療の開発につなげていきたい。

2. 研究の目的

本研究の目的は DIF-1 による MB 細胞の増殖抑制機序や、DIF-1 による Myc 発現抑制の作用機序を解明し、DIF-1 による Myc を標的とした新しい髄芽腫治療を創出することである。

3. 研究の方法

DIF-1 による MB 細胞の増殖抑制機序を解明するために、細胞増殖抑制効果が MYC 増幅の有無によって変化するかを検証した。また、DIF-1 が MYC/MYCN 増幅の MB 細胞の増殖抑制効果の機構がアポトーシスなどの細胞死によるのかを検証した。さらに細胞増殖/生存に関わるシグナルの変化を検証した。DIF-1 処理による細胞増殖抑制効果と Myc 発現の因果関係を検証した。

DIF-1 による髄芽腫細胞の c-Myc/N-myc 発現制御機序が転写レベルか翻訳レベルか翻訳後修飾レベルかを検証した。

4. 研究成果

細胞増殖抑制機序の解明

- ・ DIF-1 処理により MYC 増幅の有無に関わらず、c-Myc/N-myc の発現は抑制された。
- ・ DIF-1 処理による細胞増殖抑制は MYC 増幅株において有意に効果が強かった。

- ・ DIF-1 処理は、PARP の切断を起こすことを Western blot で確認し、さらに Live cell assay によって細胞死を誘導していることを確認した。この結果から DIF-1 による髄芽腫細胞の増殖抑制機序はアポトーシスが関与していると考えられた。

- ・ さらに生存/増殖シグナルを評価したところ AKT 経路や MAPK 経路の活性が抑制されていた。

MYC 発現抑制機序

- ・ DIF-1 処理によって MYC mRNA 発現が有意に低下した。これは DIF-1 は MYC 転写を抑制していることを示す。

- ・ siRNA によって MYC ノックダウンを行い発現を低下させた。

- ・ しかし、MYC ノックダウンは髄芽腫細胞の増殖を抑制しなかった。

DIF-1 は髄芽腫細胞の MYC 発現を転写抑制によって低下させ、かつ MYC 増幅髄芽腫細胞の増殖をより効率的に抑制する。増殖を抑制する機序として AKT 経路や MAPK 経路などの活性抑制を介したアポトーシスの誘導がその機序として考えられた。ただし、MYC ノックダウンのみでは髄芽腫細胞の増殖を抑制することはなく、DIF-1 による細胞増殖抑制効果は MYC 発現抑制以外の原因も関わるものであることが明らかとなった。

DIF-1 は髄芽腫細胞の新たな治療候補となりうるが、その機序の解明にさらなる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤寛、中原由紀子、並川裕貴、増岡淳、阿部 竜也
2. 発表標題 Mycを標的とした髄芽腫の新規治療の開発研究
3. 学会等名 第40回 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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