

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 26 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462185

研究課題名(和文) トランスクリプトーム解析を基盤にした膠芽腫形成の分子メカニズム解明と治療への応用

研究課題名(英文) Analysis of glioblastoma pathogenesis based on transcriptome analysis

研究代表者

吉本 幸司 (Yoshimoto, Koji)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：70444784

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：間葉系性質の獲得が膠芽腫の悪性形質獲得に関与している。そこで我々はクロマチン修飾によるエピジェネティックな機序が関与している可能性を考え、18個のクロマチン修飾遺伝子との関連性について解析を行った。その結果、クロマチン修飾遺伝子の中でヒストンのアセチル化を調整するhistone deacetylase(HDAC)の中で、HDAC7の発現がmesenchymalマーカーの発現と有意に相関していることを見出し、臨床検体を持った蛋白レベルでの解析でもこの相関は有意であることを昨年報告した。この結果はHDAC7が間葉系性質の獲得に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We evaluated the correlation between the MES score and expression of HDAC and histone demethylase genes and found that the MES score correlated only with HDAC7 expression (correlation coefficient 0.5165; $p < 0.0001$). To determine HDAC7 protein expression in GBM tissues, we selected and immunostained 10 GBM tissues with high MES scores (>6) and 11 with low MES scores (<2) by using a cutoff of the mean \pm SD of the MES score. Immunohistochemical results demonstrated a higher positive immunostaining in the high MES score group than in the low MES score group (Mann-Whitney test, $p = 0.0002$). We showed that mesenchymal gene expression in glioblastoma is associated with HDAC7 gene and protein expression; thus, HDAC7 might be a novel therapeutic target for glioblastoma.

研究分野：Neurosurgery

キーワード：Glioblastoma Mesenchymal HDAC7

1. 研究開始当初の背景

近年の TCGA(The Cancer Genome Atlas) 研究によるトランスクリプトーム解析によると、膠芽腫は間葉系マーカーを強く発現する Mesenchymal タイプ、神経発生に関連する遺伝子群が高発現している Proneural タイプと Neural, Classical の 4 つのサブタイプに分類できることが明らかにされた。別の解析アルゴリズムを用いた報告では異なったサブタイプ分類が報告されているが、Mesenchymal タイプと Proneural タイプは共通したサブタイプでありこの二つのタイプがトランスクリプトーム解析によって見出された代表的なサブタイプと考えられる。

申請者はこれまでに primary type の膠芽腫は間葉系マーカーを強く発現していることを世界に先駆けて報告し (Tso, Yoshimoto et al. Cancer Res. 2006)、間葉系性質が膠芽腫の浸潤能、治療抵抗性に関与していることも報告してきた (Tso, Yoshimoto et al. Mol Cancer Res. 2006)。Mesenchymal タイプに分類される膠芽腫は間葉系マーカーを特異的に発現している腫瘍であり、Proneural タイプは神経発生に関連する遺伝子群を強く発現しているタイプである。その臨床的な意義については、Mesenchymal タイプは特に aggressive な性格を持ち、再発時には多くの腫瘍が Mesenchymal タイプに変化していることから膠芽腫の悪性腫瘍としての形質を獲得する機序に関与していると考えられる。一方 Proneural タイプに分類される膠芽腫は比較的予後良好群に属することが多いと報告され膠芽腫に中でも特異的なタイプとされる。したがってこの 2 つのサブタイプを検出することは臨床的な意義が大きく、更には膠芽腫の病態や治療を考える上での重要な標的になると考えられるが、その分子メカニズムは現在まで解明されていない。本研究はこの 2 つのサブタイプに着目してその分子メカ

ニズムを解明し、治療への応用を目指すものである。

申請者はこれまでに定量的 PCR 法を用いた複数個の Mesenchymal, Proneural マーカー遺伝子を用いた発現解析をグレードの異なる 82 例のグリオーマに対して行った。その結果 Mesenchymal の発現は膠芽腫特異的であるが、Proneural マーカーについては傾向として低グレードのグリオーマの方が発現が高かった。しかし、一部の膠芽腫では Proneural マーカーを特異的に強く発現していることを報告した (Ma, Yoshimoto et al. Neuro-Oncology 2012)。

2. 研究の目的

- (1) 臨床サンプルを用いて Mesenchymal タイプ、Proneural タイプに分類される膠芽腫細胞の簡易的な検出法を確立する。
- (2) これらの結果に基づき、サブタイプの表現型を制御する因子の同定を行い、治療感受性のメカニズムを同定する。

3. 研究の方法

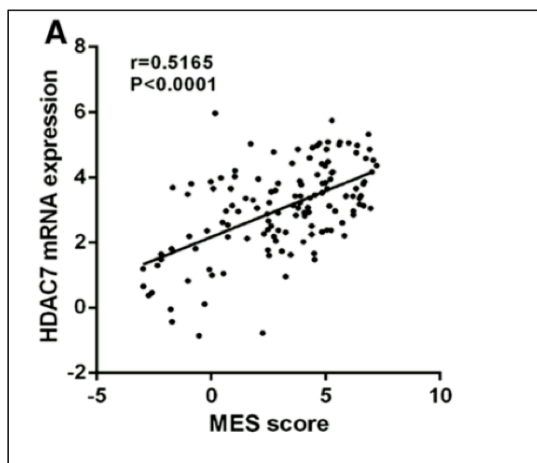
- (1) 臨床検体を用いて Mesenchymal タイプ、Proneural タイプを簡便に検出する方法を確立するために qPCR 法を用いた。具体的にはそれぞれのタイプに特徴的に高発現が見られる遺伝子を 6 つずつ選択した。Mesenchymal タイプのマーカーとしては CHI3L1, CD44, VIM, RELB, TRADD, PDPN を、Proneural タイプのマーカーとしては DLL3, BCAN, OLIG2, NCAM1, NKX2-2, ASCL1 を選択し、133 例のグリオーマ症例についてそれぞれの発現量を相対定量で評価した。
- (2) Mesenchymal feature の獲得にはクロマチン修飾によるエピジェネティックな機序に関与している可能性を考え、18 個のクロマチン修飾遺伝子との関連性について解析を行った。解析したクロマ

チン修飾遺伝子は HDAC4, 5, 7, 9, SIRT1-7, KDM1A, 2B, 4C, 5A, 5B, 6A, 6B である。

4. 研究成果

(1) Mesenchymal タイプ, Proneural タイプに発現が強く認められる 6 つの遺伝子の発現の平均値を算出し、それらをそれぞれ MES スコア、PN スコアとして解析した。その結果この 2 つの数値から引き算して P-M スコアを算出することで Mesenchymal タイプ、Proneural タイプのいずれに近い発現パターンを示すかを判定できた。

(2) 遺伝子発現の相関解析の結果から、クロマチン修飾遺伝子の中で histone deacetylase (HDAC) の一つである HDAC7 の発現が Mesenchymal タイプと有意に相関していることを見出し、臨床検体を持っていた蛋白レベルでの解析でもこの相関は有意であることを報告した (Murata, Yoshimoto et al, JNO 2016)。この結果は HDAC7 が Mesenchymal タイプの形質獲得に重要な役割を果たしていることを示唆するものである。現在はこれらの研究をさらに発展させ、クロマチン修飾遺伝子の中で HDAC7 に着目して、mesenchymal feature の獲得における意義とそのメカニズム解明を目指している。



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 1 件)

Murata H, Yoshimoto K, Hatae R, Akagi Y, Mizoguchi M, Hata N, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Sayama T, Iihara K. Detection of proneural/mesenchymal marker expression in glioblastoma: temporospatial dynamics and association with chromatin-modifying gene expression.

J Neurooncol. 2015;125(1):33-41.

[学会発表] (計 2 件)

① Yoshimoto K, Murata H, Hatae R, Akagi Y, Mizoguchi M, Hata N, Kuga D, Iihara K

HDAC7 as a possible therapeutic target for mesenchymal glioblastoma
21th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy
Okinawa, Japan, April 12th, 2016

② 吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋二郎、空閑太亮、秦暢宏、溝口昌弘、飯原弘二

Proneural 膠芽腫の簡易的検出とその問題点
第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会 (京都)
2015 年 12 月 6-8 日

③ 吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋二郎、空閑太亮、秦暢宏、溝口昌弘、飯原弘二

膠芽腫に対するエピジェネティック治療の新たな治療標的
第 74 回日本脳神経外科学会総会 (北海道) 2015 年 10 月 14-16 日

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:

発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉本 幸司 (YOSHIMOTO, Koji)
九州大学病院・講師
研究者番号：70444784

(2) 研究分担者

村上 信哉 (MURAKAMI, Nobuya)
九州大学医学研究院・研究員
研究者番号：20553283

(3) 研究分担者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI, Masahiro)
九州大学医学研究院・研究員
研究者番号：50380621

(4) 研究分担者

天野 敏之 (AMANO, Toshiyuki)
九州大学医学研究院・研究員
研究者番号：70448413

(5) 研究分担者

飯原 弘二 (IIHARA, Koji)
九州大学医学研究院・教授
研究者番号：90270727

(6) 研究協力者

村田 秀樹 (MURATA, Hideki)