

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26861172

研究課題名(和文) 膠芽腫形成においてエピゲノム異常を誘導する新規分子の同定

研究課題名(英文) Identification of a novel epigenetic modifier in gliomagenesis

研究代表者

大岡 史治 (Ohka, Fumiharu)

名古屋大学・医学系研究科・助教

研究者番号：10725724

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では神経膠腫で高発現しているEZH2が腫瘍形成に寄与するメカニズムを解明することを目的とした。当部ではこれまでに脳腫瘍自然発生マウスモデルを樹立している。このマウスモデルを用いて、腫瘍形成前から腫瘍形成後までの細胞を回収して経時的に解析した。EZH2は腫瘍形成前の早期の段階から発現増加しており、EZH2が誘導するヒストン修飾異常は徐々に蓄積していくことが明らかになった。EZH2は遺伝子増幅異常により発現増加した他のエピゲノム修飾酵素と協調的に機能していることが明らかになった。以上よりEZH2はヒストン修飾異常を誘導することで神経膠腫の形成に重要な役割を果たしていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the mechanisms of upregulated EZH2 in gliomagenesis. We already established a unique mouse model, which spontaneously develops glioma. Using this mouse model, we analyze the significance of EZH2 in gliomagenesis, sequentially. EZH2 is upregulated from an early stage of gliomagenesis, inducing accumulation of dysregulation of histone modification. We found that EZH2 plays pivotal roles with other histone modifier whose copy number of gene is amplified, cooperatively. Our data suggests that EZH2 might play pivotal roles in gliomagenesis via dysregulation of epigenetic alteration.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：神経膠腫

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の中で最も悪性度の高い悪性神経膠芽腫は悪性新生物の中でも最も予後不良である。そのため米国 The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトではすべての癌腫の中から悪性神経膠芽腫の研究が最初に着手された。臨床検体を用いた大規模な研究から膠芽腫には DNA メチル化異常をはじめとした多彩なエピゲノム異常が混在しており、発生の母地やメカニズムが大きく異なる様々な性質を持った腫瘍群が混在していることが示唆された。膠芽腫の治療成績を向上させるためには、腫瘍発生のメカニズムを解明し、治療対象と成り得る可塑性を持った新規治療標的を同定することが極めて重要である。エピゲノム異常は可塑性を持つため有用な治療標的となる可能性があると考え、当研究室ではこれまで脳腫瘍のエピゲノム研究を展開してきた。極めて組織多様性の強い膠芽腫には、その多様性の形成に寄与する脳腫瘍幹細胞が存在すると考えられている。この脳腫瘍幹細胞が自己複製と分化、脱分化を繰り返すことにより膠芽腫の治療抵抗性に強く寄与していると考えられている。当研究室ではこれまでに脳腫瘍幹細胞の分化、脱分化においてエピゲノム関連因子である EZH2 が重要な役割を果たしており、新規治療標的と成り得ることを報告した。当研究室では、膠芽腫マウスモデルを用いてこれまでに同定したエピゲノム異常を経時的に解析し、個体レベルで治療標的としての有用性を評価する研究を行っている。

Mosaic Analysis with Double Markers system (MADM システム) を用いたマウスモデルは胎生期に遺伝子異常を導入された細胞が脳組織内に散発的に出現し、その細胞を Green Fluorescent Protein (GFP) にて追跡することができる極めて有用な遺伝子改変システムである。この MADM システムを用いて膠芽腫によく見られる *p53* 遺伝子と *Nf1* 遺伝子異常を導入した MADM マウスは GFP 陽性の膠芽腫を形成する。従来の遺伝子改変膠芽腫マウスモデルと比較して、このマウスモデルではよりヒトの腫瘍に近い腫瘍形成過程を示し、GFP 陽性細胞を回収することにより純度の高い腫瘍細胞を回収することができ、また前腫瘍細胞の段階から腫瘍形成までの過程を追跡することができる。申請者は MADM システムの発明者であるバージニア大学 Dr. Hui Zong との共同研究にてこれまでに前腫瘍細胞と腫瘍細胞のヒストン修飾異常と DNA メチル化異常を解析し、腫瘍細胞には未分化性の獲得を示唆するエピゲノム異常が蓄積していることを明らかにした。腫瘍細胞では EZH2 が高発現しており、高発現した EZH2 により誘導されるエピゲノム異常が腫瘍形成において重要な役割を果たしていることを同定している。また、MADM 腫瘍細胞を用いた全エクソン解析にて複数の個体で共通に見られる、過去に報告

のない極めて限局的な高度遺伝子増幅異常領域を同定した。この遺伝子増幅異常領域にはエピゲノム修飾酵素をコードする遺伝子と細胞増殖に関わる転写因子をコードする遺伝子が含まれていた。発現解析においても高発現を示すこれらのエピゲノム修飾酵素と転写因子は、EZH2 と相互作用することでこれまでに同定しているエピゲノム異常に寄与している可能性がある。本研究では腫瘍形成過程において EZH2 の発現異常と遺伝子増幅異常が出現する時期を同定すること、EZH2 が高発現を示すメカニズム、高発現した EZH2 が特定の遺伝子群に誘導されるメカニズムの解明を目的とした。新規に同定したこれらの遺伝子群が遺伝子増幅異常により高発現をすることで EZH2 との相互作用を介してエピゲノム異常に強く寄与している可能性について解析した。

2. 研究の目的

上述のように本研究では EZH2 と増幅異常の見られる遺伝子群がどのように協調して腫瘍形成に寄与するか、そのメカニズムを解明することを目的とした。EZH2 は多くの分子と結合しポリコム複合体 (Polycomb Repressive Complex 2; PRC2) を形成している。遺伝子増幅異常領域から転写されるエピゲノム修飾酵素が EZH2 と直接結合し PRC2 の形成に関与する、もしくは別の複合体を形成する可能性について解析した。抗 EZH2 抗体もしくは遺伝子増幅異常領域のエピゲノム修飾酵素に対する抗体を用いた免疫沈降法にて腫瘍細胞内における EZH2 とエピゲノム修飾酵素の結合を解析した。EZH2 とエピゲノム修飾酵素をそれぞれノックダウンすることにより、これまでに同定している EZH2 の標的遺伝子群のエピゲノム異常の変化を解析した。転写因子についてはその機能解析を目的とした。転写因子のノックダウンを行わずには腫瘍細胞の増殖抑制効果を評価することを目的とした。以上に加えて EZH2 の発現異常と遺伝子増幅異常が腫瘍形成過程において出現する時期を同定することを目的とした。

近年膠芽腫において多くのゲノム異常とエピゲノム異常が同定されているが、そのクロストークメカニズムの詳細についてはその大部分が明らかになっていない。申請者はこれまでに報告のないゲノム異常である遺伝子増幅異常を示す遺伝子群を同定しており、当研究ではこれらの遺伝子群の中から同定したエピゲノム修飾酵素と転写因子の機能解析を行う計画とした。MADM マウスモデルを用いることで、これまでヒト腫瘍検体の研究では困難であった脳腫瘍の発生における前腫瘍細胞の解析をすることができ、これらの異常が出現する時期を同

定することができる。当研究の進展によりゲノム異常から誘導されるエピゲノム異常が腫瘍形成に寄与するメカニズムを解明する手掛かりとなり、極めて予後不良である膠芽腫の新規治療戦略の開発につながることを期待した。

3. 研究の方法

本研究では腫瘍細胞を用いて、遺伝子増幅異常領域のエピゲノム修飾酵素に対する抗体と抗 EZH2 抗体を用いた免疫沈降法を確立した。またエピゲノム修飾酵素と転写因子、EZH2 のノックダウン実験のためそれぞれの shRNA ベクターを作成する。その前段階の実験として siRNA の導入実験を行い、効果を評価した。これらのノックダウンを腫瘍細胞で行い、in vitro 実験で腫瘍抑制効果を解析した。

また本研究中、これまでに樹立した脳腫瘍自然発生マウスモデルである MADM マウスの系統維持、適宜腫瘍マウスの作成を継続した。これらのマウスを用いて、複数の時期から前腫瘍細胞のみを回収して DNA, RNA を回収した。これらを用いて、EZH2 の発現異常と遺伝子増幅異常の出現時期を経時的に解析した。また EZH2 の発現異常に伴う、ヒストン修飾異常を経時的かつ網羅的に解析し、その経時的な変化と、腫瘍形成における役割について解析を進めた。

4. 研究成果

(1) 遺伝子増幅異常領域のエピゲノム修飾酵素に対する抗体を用いた免疫沈降実験

エピゲノム修飾酵素に対する抗体を準備し、正常細胞と腫瘍細胞を用いてウエスタンブロッティング法を行い腫瘍細胞で強発現していることを確認した。同領域のエピゲノム修飾酵素に対する抗体はやや不安定であったため、他社の抗体も確認したが同様の結果であった。そのため、この酵素と複合体を形成することが知られている分子に対する抗体を代用として用いて免疫沈降実験を進めた。腫瘍細胞でダイナビーズを用いた免疫沈降法を行い、エピゲノム修飾酵素と EZH2 が共に回収できることをウエスタンブロッティング法にて確認することができた。腫瘍細胞をホルマリン固定にてクロスリンクした後に、超音波断片機にて断片化したクロマチンを回収して転写因子に対する抗体による ChIP 法を行う。回収した DNA を精製後に、EZH2 のプロモーター領域を標的としたプライマーを用いて定量 PCR 法にてインプット DNA と比較して同領域がより多く回収されていることを確認する。

(2) エピゲノム修飾酵素と転写因子に対する siRNA の導入実験

エピゲノム修飾酵素と転写因子に対するノックアウト実験を行うため、それぞれの siRNA を準備した。まずはそれぞれの細胞に対して、siRNA を導入してその発現変化をウエスタンブロッティングにてかくにんした。導入効率は問題ないにもかかわらず、十分な発現抑制効果を得られなかった。siRNA 量や導入期間等を十分に検討したが、著明な改善を認めなかった。原因としては、遺伝子の増幅異常が極めて高度であったため、siRNA では発現を抑制しきれないことが考えられた。そのため現在 CRISPR/Cas9 システムによるゲノム編集技術の導入を検討している。

(3) EZH2 の発現異常と遺伝子増幅異常の出現時期の同定

MADM マウスでは遺伝子改変細胞が、出生後、前がん状態の段階から GFP 陽性となる。このシステムを活用して、腫瘍形成前のマウス脳組織から GFP 陽性細胞を回収する技術を確立した。出生後 20 日、60 日、90 日、120 日のマウスに対して適切な安楽死を行った後に脳組織を回収し、パイン溶液等を用いて、慎重に組織融解を行った。これらの脳細胞から FACS セルソーティング法を用いて GFP 陽性細胞のみを回収した。一匹のマウスから回収した GFP 陽性細胞はその後の解析に用いる DNA, RNA を回収するのに十分な量であった。これらの DNA を用いて、リアルタイム PCR 法にて、遺伝子コピー数を解析することで遺伝子増幅異常の出現時期の同定を試みた。RNA は cDNA へ逆転写し、リアルタイム PCR 法を用いて、EZH2 の発現異常を解析し、経時的な発現の推移を解析した。興味深いことに EZH2 は出生後早期より発現が増加しており、遺伝子増幅異常は腫瘍形成期の直前に出現していることが明らかになった。

(4) EZH2 の発現異常に伴うヒストン修飾異常の経時的な解析

上記の結果より EZH2 は腫瘍形成早期から発現が増加していることが明らかになった。この結果をうけて、EZH2 が修飾する発現抑制型ヒストン修飾であるヒストン H3 リシン 27 トリメチル化(H3K27me3)修飾を受ける遺伝子の同定を試みた。抗 H3K27me3 抗体を用いたクロマチン免疫沈降法(ChIP 法)を行い、マイクロアレイにて網羅的に解析を行った。H3K27me3 修飾は EZH2 の発現増加と一致して腫瘍形成前の早期の段階から修飾異常を認め、腫瘍形成に伴い修飾異常が蓄積していくことが明らかになった。また腫瘍形成後は、遺伝子増幅異常を認めるエピゲノム修飾酵素も同様にヒストン修飾異常を誘導していること

を示唆する結果が得られた。これらの結果について、現在より詳細に解析を行っている。

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 17 件)

1. Ohka F, Natsume A et al. (16 名中 1 番目) A novel all-in-one intraoperative genotyping system for IDH1-mutant glioma. *Brain Tumor Pathol.* 2017 Apr;34(2):91-97. (査読有)
2. Kuramitsu S, Ohka F, Natsume A et al. (6 名中 3 番目) Adoptive immunotherapy for the treatment of glioblastoma: progress and possibilities. *Immunotherapy.* 2016 Dec;8(12):1393-1404. (査読有)
3. Katsushima K, Ohka F, Kondo Y et al. (16 名中 3 番目) Targeting the Notch-regulated non-coding RNA TUG1 for glioma treatment. *Nat Commun.* 2016 Dec 6;7:13616. (査読有)
4. Yamamichi A, Ohka F, Natsume A et al. (23 名中 3 番目) An immuno-wall microdevice exhibits rapid and sensitive detection of IDH1-R132H mutation specific to grade II and III gliomas. *Sci Technol Adv Mater.* 2016 Oct 4;17(1):618-625. (査読有)
5. Torigata K, Ohka F, Nojima H et al. (11 名中 5 番目) LATS2 Positively Regulates Polycomb Repressive Complex 2. *PLoS One.* 2016 Jul 19;11(7):e0158562. (査読有)
6. Sato S, Ohka F, Kondo Y et al. (10 名中 5 番目) Histone Deacetylase Inhibition in Prostate Cancer Triggers miR-320-Mediated Suppression of the Androgen Receptor. *Cancer Res.* 2016 Jul 15;76(14):4192-204. (査読有)
7. Shiina S, Ohka F, Natsume A et al. (19 名中 3 番目) CAR T Cells Targeting Podoplanin Reduce Orthotopic Glioblastomas in Mouse Brains. *Cancer Immunol Res.* 2016 Mar;4(3):259-68. (査読有)
8. Kurimoto M, Ohka F, Natsume A et al. (12 名中 4 番目) Rapid sensitive analysis of IDH1 mutation in lower-grade gliomas by automated genetic typing involving a quenching probe. *Cancer Invest.* 2016;34(1):12-5. (査読有)
9. Kuramitsu S, Ohka F, Natsume A et al. (13 名中 3 番目) Lenalidomide enhances the function of chimeric antigen receptor T cells against the epidermal growth factor receptor variant III by enhancing immune synapses. *Cancer Gene Ther.* 2015 Oct;22(10):487-95 (査読有)
10. Ichimura N, Ohka F, Kondo Y et al. (13 名中 6 番目) Aberrant TET1 Methylation Closely Associated with CpG Island Methylator Phenotype in Colorectal Cancer. *Cancer Prev Res (Phila).* 2015 Aug;8(8):702-11. (査読有)
11. Ranjit M, Ohka F, Natsume A et al. (5 名中 3 番目) Applicable advances in the molecular pathology of glioblastoma. *Brain Tumor Pathol.* 2015 Jul;32(3):153-62 (査読有)
12. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Wakabayashi T et al. (12 名中 3 番目) Activation of Yes-Associated Protein in Low-Grade Meningiomas Is Regulated by Merlin, Cell Density, and Extracellular Matrix Stiffness. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2015 Jul;74(7):704-9 (査読有)
13. Suzuki H, Ohka F, Natsume A et al. (31 名中 10 番目) Mutational landscape and

clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet.* 2015 May;47(5):458-68. (査読有)

14. Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Wakabayashi T et al.(12名中3番目) Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. *Biomed Res Int.* 2014;2014:860241. (査読有)
15. Ohka F, Ito M, Natsume A et al.(12名中1番目) Quantitative metabolome analysis profiles activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. *Tumour Biol.* 2014 Jun;35(6):5911-20. (査読有)
16. Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K. (5名中3番目) Epigenetic dysregulation in glioma. *Cancer Sci.* 2014 Apr;105(4):363-9. (査読有)
17. Ando H, Natsume A, Ohka F, Wakabayashi T et al.(14名中8番目) Peptide-based inhibition of the HOXA9/PBX interaction retards the growth of human meningioma. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2014 Jan;73(1):53-60. (査読有)

〔学会発表〕(計7件)

1. 大岡史治, 出口彰一, 鈴木啓道, 青木恒介, 加藤 彰, 勝島啓佑, 新城恵子, 若林俊彦, 近藤豊, 夏目敦至, IDH 野生型グレード3 グリオーマに対する新規エピジェネティクス治療の開発, 第34回日本脳腫瘍学会学術集会, 2016.12.5 甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)
2. Fumiharu Ohka, Atsushi Natsume, Hiromichi Suzuki, Kosuke Aoki, Shoichi Deguchi, Keisuke Katsushima, Keiko Shinjo, Toshihiko Wakabayashi, Yutaka Kondo, Epigenomic treatment for IDH wild-type grade III glioma, targeting dysregulation of EZH2-H3K27me3, 2016 SNO annual meeting, 2016.11.18, Scottsdale (USA)
3. 大岡史治, 夏目敦至, 鈴木啓道, 出口彰一, 勝島啓佑, 新城恵子, 若林俊彦, 近藤豊, EZH2 を標的とした IDH1 野生型グリオーマの新規治療戦略, 第75回日本癌学会学術総会, 2016.10.7 パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)
4. 大岡史治, 出口彰一, 鈴木啓道, 青木恒

介, 加藤 彰, 勝島啓佑, 新城恵子, 若林俊彦, 近藤豊, 夏目敦至, IDH 野生型グレード3 グリオーマ形成に寄与するエピゲノム異常を標的とした新規治療, 日本脳神経外科学会第75回学術総会, 2016.9.29 福岡国際会議場(福岡県福岡市)

5. 大岡史治, 出口彰一, 鈴木啓道, 勝島啓佑, 新城恵子, 若林俊彦, 近藤豊, 夏目敦至, エピゲノム異常を誘導する EZH2 を標的とした Proneural GBM に対する新規治療戦略, 第33回日本脳腫瘍学会学術集会, 2015.12.7 京都国際ホテル(京都府京都市)
6. 大岡史治, 出口彰一, 鈴木啓道, 勝島啓佑, 新城恵子, 若林俊彦, 近藤豊, 夏目敦至, クロマチンダイナミクスを誘導する EZH2 を標的とした膠芽腫の新規治療戦略, 日本脳神経外科学会第74回学術総会, 2015.10.14 ロイトン札幌(北海道札幌市)
7. Ohka F, Natsume A, Deguchi S, Katsushima K, Shinjo K, Wakabayashi T, Kondo Y, Role of Dysregulation of EZH2-H3K27me3 in Gliomagenesis, 第74回日本癌学会学術総会, 2015.10.8 名古屋国際会議場(愛知県名古屋市中)

〔図書〕(計1件)

Ohka F, Natsume A, Kondo Y. Academic press, Elsevier, Epigenetic Cancer Therapy. 721p (339p-350p), 2015

〔その他〕

特記事項なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大岡 史治 (Ohka Fumiharu)

名古屋大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号: 10725724