

令和元年 8月30日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10754

研究課題名(和文) 低悪性度グリオーマのリプログラミング技術を用いたエピゲノム解析

研究課題名(英文) Epigenomic analysis with reprogramming technology in lower grade glioma

研究代表者

荒川 芳輝 (Arakawa, Yoshiki)

京都大学・医学研究科・特定講師

研究者番号：20378649

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)：グリオーマ手術標本から細胞株の樹立、腫瘍幹細胞を含むSpheroid colony株を複数樹立したが、IDH1R132Hを有する細胞株は樹立できなかった。ヒトinduced pluripotent stem (iPS) 細胞やiPS由来神経幹細胞にIDH1R132Hを導入すると神経幹細胞の細胞増殖が障害された。これらの結果は、IDH1R132H変異は、細胞生存維持・増殖に障害を来し、一種の老化に似た現象が生じていることが示唆された。さまざまな薬剤を用いた条件で培養したが、細胞継代は困難であった。これらの結果から、IDH1R132Hを導入したヒトiPS細胞由来神経幹細胞の樹立は不可能と判断した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマは、未だ根治は困難な疾患である。低悪性度グリオーマの多くは、IDH1/2遺伝子変異が初期の遺伝子異常である。本研究では、IDH1遺伝子変異に伴う腫瘍発生の生物学的意義解明を目指した。その結果、IDH1遺伝子変異に伴う細胞老化に似たような現象が神経幹細胞に生じることが、腫瘍発生に関わることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Although cell lines and spheroid colony lines were established from glioma surgical specimens containing tumor stem cells, cell lines with IDH1R132H could not be established. Introduction of IDH1R132H into human induced pluripotent stem (iPS) cells and neural stem cells derived from iPS cells impaired those cell proliferation. These results suggest that the IDH1R132H impairs cell survival and proliferation, which is a kind of senescence. Although the culture of cells with IDH1R132H were carried out under conditions using various drugs, difficulty of cell growth was identified. Taken together, we confirmed that it was impossible to establish iPS-derived neural stem cells with IDH1R132H expression.

研究分野：脳神経外科

キーワード：低悪性度グリオーマ エピゲノム iPS
ダイレクトリプログラミング エピゲノム異常 分化誘導 脳腫瘍 グリオーマ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは、集学的治療の進歩で生存期間が延長してきたが、未だ根治は困難な疾患である。グリオーマが治療困難な要因は、腫瘍内多様性 (heterogeneity) にある。WHO グレード 2/3 に分類される低悪性度グリオーマの多くは、IDH1/2 遺伝子変異が初期の遺伝子異常であり、その後のドライバー遺伝子異常で2つのサブタイプに分類される。さらに偶発的に生じるパッセンジャー遺伝子異常やエピゲノム異常で多様な腫瘍性格を獲得する。こうした多様性が、化学療法、放射線治療抵抗性クローン形成に働く。腫瘍幹細胞のような脱分化した状態が、多様なゲノムとエピゲノム異常を来す好条件を作り出している可能性もある。しかし、腫瘍形成に働く多様なゲノムとエピゲノム異常と腫瘍脱分化・分化の制御機構に関して十分には理解が進んでいなかった。低悪性度グリオーマでは、ゲノム異常が比較的少なく、エピゲノム異常の初期化で iPS 誘導できる可能性がある。低悪性度グリオーマのドライバーである IDH1/2 遺伝子変異は、2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) を産生し、細胞内代謝に異常を来し、エピゲノム異常を来すと考えられている。低悪性度グリオーマに対するリプログラミング技術を用いた解析は、腫瘍発生の生物学的意義解明と治療法確立に重要となると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、次の4項目を目的とした。

低悪性度グリオーマ人工幹細胞の樹立

低悪性度グリオーマの手術標本から、腫瘍細胞株樹立する。樹立した腫瘍細胞株と同一の血球細胞の全ゲノム解析を行い、遺伝子変異とメチル化状態を特定し、ライブラリーを作成する。さらに、Oct3/4、Sox2、Klf4、cMyc の4遺伝子の強制発現により、エピゲノムの初期化を行い、人工幹細胞株ライブラリーの作成に挑戦する。

クローン進化におけるドライバー遺伝子変異の生物学的意義の解明

単一の腫瘍から作成した遺伝子変異の異なった細胞株を用いることで、特定の遺伝子変異がもたらす腫瘍表現型を解析する。低悪性度グリオーマ人工幹細胞株をさまざまな細胞に分化させることで、IDH1/R132H と他のドライバー遺伝子の生物学的な意義を解明する。

腫瘍内多様性獲得におけるエピゲノム異常の同定

低悪性度グリオーマのクローン進化に伴う腫瘍内多様性にエピゲノム異常が大きく関わっている。ライブラリーの細胞株の全ゲノムメチル化状態と腫瘍表現型を解析することで、エピゲノム異常による腫瘍内多様性獲得に至るパッセンジャー遺伝子異常を同定する。

ダイレクトリプログラミングによるグリオーマ分化誘導の挑戦

低悪性度グリオーマ腫瘍幹細胞株と人工幹細胞株から、誘導した腫瘍細胞をダイレクトリプログラミング技術で神経細胞への分化誘導に挑戦し、その表現型を個体レベルで解析する。

3. 研究の方法

本研究では目的を達成するために下記研究方法で行った。

低悪性度グリオーマ人工幹細胞ライブラリー作成からクローン進化と表現型の解析

低悪性度グリオーマ手術標本を用いて細胞株を樹立する。さらに iPS 細胞誘導で使用される転写因子群を強制発現することで低悪性度グリオーマ人工幹細胞を作成する。樹立した人工幹細胞を single cell culture を介して人工幹細胞ライブラリーを作成し、それぞれの細胞株の全ゲノムの遺伝子解析、DNA メチル化状態の解析を行う。作成した低悪性度グリオーマ人工幹細胞を用いた *in vitro*、*in vivo* の解析を行う。*In vitro* では、グリア、神経細胞へと分化させた細胞を用いて増殖能、浸潤能、細胞運動、神経細胞機能を細胞生物学的解析法で同定する。*in vivo* では脳内腫瘍浸潤能や増殖のプロセスを長時間蛍光ライブ・イメージング、2光子顕微鏡で解析する。遺伝的背景の異なった細胞群での比較で、クローン進化と表現型の関係を解析する。

低悪性度グリオーマのクローン進化における IDH1/R132H 機能解析

IDH1 変異を wild type に修正した低悪性度グリオーマ人工幹細胞を用いた *in vitro*、*In vivo* の解析を行い、IDH1 変異の表現型と比較解析することで、IDH1 変異に伴う生物学的な異常を同定し、エピゲノムがもたらす腫瘍細胞性格の変化を解明する。IDH1 変異を wild type に修正した低悪性度グリオーマ人工幹細胞の DNA メチル化状態を解析し、IDH1 変異によるエピゲノムプロファイリングを決定し、その他のドライバー遺伝子との関与について解析する。

低悪性度グリオーマに対するダイレクトリプログラミングによる分化誘導の挑戦

これまでに報告された線維芽細胞から神経細胞へと直接誘導技術 (Gopalakrishnan et al., Brain Res. 2015) を低悪性度グリオーマに用いてダイレクトリプログラミングでの分化誘導を行う。本研究解析で同定したグリオーマ特異的エピゲノム変化を来す転写因子群を用いたダイレクトリプログラミングの可能性を検討する。

4. 研究成果

グリオーマ手術標本から細胞株の樹立、腫瘍幹細胞を含む Spheroid colony 株を複数樹立した。しかし、IDH1 R132H 細胞株は、継代を重ねると IDH1 R132H を有しない細胞群として間葉系細胞が主に増加し、IDH1 R132H を有する腫瘍細胞群が減少・消失した。さらに、ヒト induced pluripotent stem (iPS) 細胞や iPS 由来神経幹細胞に IDH1R132H を導入した幹細胞においても

細胞増殖が障害され、継代ができないことが明らかとなった。しかし、IDH1R132H の発現によるアポトーシスは明らかでなく、主には増殖抑制であった。これらの結果は、IDH1R132H 変異は、細胞生存維持・増殖に障害を来し、一種の老化に似た現象が生じていることが示唆された。そのような老化に似た現象を回避できるように、さまざまな薬剤を用いた条件で培養したが、細胞継代は困難であった。これらの結果から、IDH1R132H を導入したヒト iPS 細胞由来神経幹細胞の樹立は不可能と判断した。

Cre 発現依存的 IDH1R132H 遺伝子発現をできるマウスの開発を進めた。Cre/loxP システムによる IDH1R132H 遺伝子導入ベクターを作成し、Cre/loxP システム IDH1R132H 遺伝子を導入したマウス ES 細胞の作製に成功した。さらに、Cre/loxP システム IDH1R132H 遺伝子を持つマウスの作成を進めており、マウスが作成でき次第、神経幹細胞特異的な IDH1R132H 遺伝子発現に伴うマウス phenotype の探索を進めることとした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計5件)

1. Bin Liu, Yoshiki Arakawa, Ryuta Yokogawa, Shinya Tokunaga, Yukinori Terada, Daiki Murata, Yasuzumi Matsui, Ko-ichi Fujimoto, Nobuyuki Fukui, Masahiro Tanji, Yohei Mineharu, Sachiko Minamiguchi, Susumu Miyamoto. PD-1/PD-L1 expression in a series of intracranial germinoma and its association with Foxp3+ and CD8+ infiltrating lymphocytes. PLoS One. 2018 Apr 4;13(4):e0194594. 、査読有 eCollection 2018. doi: 10.1371/journal.pone.0194594.
2. Daiki Murata, Yohei Mineharu, Yoshiki Arakawa, Bin Liu, Masahiro Tanji, Makoto Yamaguchi, Ko-ichi Fujimoto, Nobuyuki Fukui, Yukinori Terada, Ryuta Yokogawa, Maki Yamaguchi, Sachiko Minamiguchi, Susumu Miyamoto. High PD-L1 expression associated with CD8+ T cell infiltration and poor prognosis in human medulloblastoma. Journal of Neurosurgery, 128: 710-716, 2017. doi: <https://doi.org/10.3171/2016.11.JNS16991>
3. Tomokazu Aoki, Yoshiki Arakawa, Tetsuya Ueba, Masashi Oda, Namiko Nishida, Yukinori Akiyama, Tetsuya Tsukahara, Koichi Iwasaki, Nobuhiro Mikuni, Susumu Miyamoto. Phase I/II Study of Temozolomide Plus Nimustine Chemotherapy for Recurrent Malignant Gliomas: Kyoto Neuro-oncology Group. Neurologia medico-chirurgica (Tokyo) 57(1): 17-27. 2017
doi: 10.2176/nmc.oa.2016-0162
4. Charlotte H. Durkin¹, Flavia Leite, João V. Cordeiro, Yutaka Handa, Yoshiki Arakawa, Ferran Valderrama, Michael Way. RhoD Inhibits RhoC-ROCK-Dependent Cell Contraction via PAK6. Developmental Cell. 41(3):315-329.e7, 2017,
doi:<https://doi.org/10.1016/j.devcel.2017.04.010>
5. Yoshitaka Narita, Yoshiki Arakawa, Fumiyuki Yamasaki, Ryo Nishikawa, Tomokazu Aoki, Masayuki Kanamori, Motoo Nagane, Toshihiro Kumabe, Yuichi Hirose, Tomotsugu Ichikawa, Hiroyuki Kobayashi, Takamitsu Fujimaki, Hisaharu Goto, Hideo Takeshima, Tetsuya Ueba, Hiroshi Abe, Takashi Tamiya, Yukihiko Sonoda, Atsushi Natsume, Tatsuyuki Kakuma, Yasuo Sugita, Nobukazu Komatsu, Akira Yamada, Tetsuro Sasada, Satoko Matsueda, Shigeki Shichijo, Kyogo Itoh, Mizuhiko Terasaki. A randomized, double-blind, phase III trial of personalized peptide vaccination for recurrent glioblastoma. Neuro-Oncology, 2018, doi: [doi: 10.1093/neuonc/noy200](https://doi.org/10.1093/neuonc/noy200)

[学会発表](計12件)

1. Yoshiki Arakawa, Bin Liu, Yukinori Terada, Yasuzumi Matsui, Etsuko Hattori, Sosuke Sumiyoshi, Nobuyuki Fukui, Masahiro Tanji, Yohei Mineharu, Susumu Miyamoto. HMGA2 is a prognostic factor to induce malignant phenotype in medulloblastoma. 2018 International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (ISPNO). Poster 2018/7/2 Denver
2. Yoshiki Arakawa, Bin Liu, Masahiro Tanji, Yohei Mineharu, Susumu Miyamoto. High mobility group AT-hook 2 (HMGA2) is a prognostic factor associated with malignant phenotype in medulloblastomas. 23th ANNUAL SCIENTIFIC MEETING AND EDUCATION DAY OF THE SOCIETY FOR NEURO-ONCOLOGY, Poster 2018/11/16, New Orleans
3. Yoshiki Arakawa, Takayuki Yasuda, Yuhikiro Yamao, Masaharu Tanji, Yohei Mineharu, Hiroharu Kataoka, Kazumichi Yoshida, Susumu Miyamoto Future perspectives of endoscopic surgery for intraparenchymal brain tumors The 36th Annual Meeting of the Japan Society for Neuro-Oncology, Symposium, December 3, 2018 Odawara
4. Yoshiki Arakawa, Yoo Kang, Masaharu Tanji, Yohei Mineharu, Kazumichi Yoshida, Yasuhi Takagi, Susumu Miyamoto Indication of endoscopic surgery with advanced technology for intraparenchymal and ventricular tumors, The 76th Annual Meeting of the Japan Neurosurgical Society, Nagoya, Symposium11, 10/12/2017
5. Yoshiki Arakawa, Masaharu Tanji, Yohei Mineharu, Kazumichi Yoshida, Yasuhi Takagi, Susumu Miyamoto, Endoscopic surgery for intraparenchymal and ventricular tumors.

The 14th Asian Society for Neuro-Oncology (ASNO) Meeting October 30, 2017, Osaka, Oral presentation

6. Yoshiki Arakawa, Bin Liu, Yohei Mineharu, Masahiro Tanji, Ryuta Yokogawa, Shinya Tokunaga, Daiki Murata, Ko-ichi Fujimoto, Nobuyuki Fukui, Yukinori Terada, Etsuko Hattori, Susumu Miyamoto. PD-1/PD-L pathway is associated with two cell pattern formation in intracranial germinoma. the 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology 2017/11/16-19 San Francisco, Poster
7. Yoshiki Arakawa, Bin Liu, Yohei Mineharu, Masahiro Tanji, Ryuta Yokogawa, Daiki Murata, Ko-ichi Fujimoto, Nobuyuki Fukui, Yukinori Terada, Susumu Miyamoto. PD-1/PD-L pathway is associated with tumor-infiltrating lymphocytes in intracranial germinoma. 5th ICGCTS Columbus June 10, 2017, Columbus, Oral presentation
8. 荒川芳輝 安田崇之 山尾幸広 丹治正大 峰晴陽平 菊池隆幸 片岡大治 吉田和道 宮本享 膠芽腫に対する治療の現状から今後の展望を考える 第 23 回日本脳腫瘍の外科学会 シンポジウム 2018/9/14 和歌山
9. 荒川芳輝 姜裕 丹治正大 峰晴陽平 吉田和道 高木康志 宮本享. 内視鏡手術に適した凝固吸引管の開発と coagulating suction technique. 第 27 回脳神経外科手術と機器学会 口演 2018/4/14 奈良
10. 荒川芳輝 姜裕 安田崇之 山尾幸広 丹治正大 峰晴陽平 菊池隆幸 片岡大治 吉田和道 宮本享 脳室内・脳室近傍腫瘍に対する内視鏡手術の治療成績と今後の課題 日本脳神経外科学会 第 77 回学術総会 ビデオシンポジウム 2018/10/11 仙台
11. 荒川芳輝 姜裕 丹治正大 峰晴陽平 吉田和道 高木康志 宮本享, 内視鏡下脳腫瘍摘出に適した凝固吸引管の開発と coagulating suction technique. 第 24 回日本神経内視鏡学会 2017/11/10 横浜, シンポジウム
12. 荒川芳輝 坂井かをり 川島鉄司 増田裕康 丹治正大 峰晴陽平 菊池隆幸 吉田和道 高木康志 宮本享 Super high vision system の時代は脳腫瘍手術戦略を変えるのか? 第 22 回日本脳腫瘍の外科学会 2017/9/9 鹿児島 シンポジウム

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://neurosurg.kuhp.kyoto-u.ac.jp/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：平田 英周

ローマ字氏名：Hirata Eishu

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学部

職名：講師

研究者番号(8桁): 40761937

研究分担者氏名： THUMKEO Dean

ローマ字氏名：THUMKEO Dean

所属研究機関名：金沢医科大学

部局名：医学研究科

職名：特定准教授

研究者番号(8桁): 40372594

連携研究者氏名：山田泰広

ローマ字氏名：Yasuhiro Yamada

所属研究機関名：京都大学

部局名：iPS細胞研究所

職名：教授

研究者番号(8桁): 70313872

(2)研究協力者

研究協力者氏名：劉 濱

ローマ字氏名：Bin Liu

研究協力者氏名：福井 伸行

ローマ字氏名：Nobuyuki Fukui

研究協力者氏名：寺田 行範

ローマ字氏名：Yukinori Terada

研究協力者氏名：松井 恭澄

ローマ字氏名：Yasuzumi Matsui

研究協力者氏名：牧野 恭秀

ローマ字氏名：Yasuhide Makino

研究協力者氏名：住吉 壮介

ローマ字氏名：Sosuke Sumiyoshi

研究協力者氏名：服部 悦子

ローマ字氏名：Etsuko Hattori

研究協力者氏名：横川隆太

ローマ字氏名：Ryuta Yokogawa

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。