

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19067

研究課題名(和文) Heterogeneityに着目した悪性脳腫瘍における治療抵抗性機序の解明

研究課題名(英文) The role of metabolic and epigenetic heterogeneity in glioblastoma treatment

研究代表者

増井 憲太 (Masui, Kenta)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：60747682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、ヒトの腫瘍の中でも最も悪性度が高い脳腫瘍である膠芽腫(グリオブラストーマ)において、腫瘍内部におけるEGFRおよびその下流に存在するmTORC2シグナル異常の組織内不均一性が、がん代謝関連酵素の発現およびヒストンアセチル化で代表されるエピジェネティクス変化と相関していることを明らかにした。この組織内不均一性は、mTORC2による中間代謝産物およびヒストン修飾酵素の調節により制御されており、腫瘍細胞のテロメアおよび未熟性維持に関連していた。悪性脳腫瘍においてmTORC2を標的とする新規治療戦略により、腫瘍幹細胞を含めた治療抵抗性因子の克服を目指すことが可能になると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Intratumoral heterogeneity generates subpopulations of cancer cells with distinct genotypes and phenotypes, but the mechanisms how oncogenic signaling establishes functional heterogeneity remain to be elucidated. Here, we identify an unexpected central role for mTORC2 in creating epigenetic heterogeneity where it controls diverse histone acetylation by dynamically reprogramming intracellular metabolism. We show that mTORC2 promotes the production of acetyl-CoA as well as the subcellular translocation of histone modifying enzymes, and this in turn facilitates the transcription of telomerase components via histone acetylation at the promoter regions. These central features of activated mTORC2 signaling, acetylated histone marks and telomerase expression are inter-correlated in clinical samples, and maintain telomere length and self-renewal capacity in glioblastoma cells. These results identify a specific role for mTORC2 in regulating functional heterogeneity in cancer epigenetics.

研究分野：神経病理

キーワード：悪性脳腫瘍 Heterogeneity mTORC2 がん代謝 エピジェネティクス ヒストンアセチル化 テロメア

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍である膠芽腫（グリオブラストーマ）は、集学的治療にも関わらず平均生存期間は12-15ヶ月にとどまり、新たな治療法につながる病態解明が強く求められている。近年、がんの治療抵抗性に関与する現象として腫瘍内部の heterogeneity (不均一性) が注目されている。われわれはこれまでに、膠芽腫における最多の遺伝子・シグナル異常である EGFR (epidermal growth factor receptor)-mTOR (mammalian target of rapamycin) 経路が、膠芽腫の代謝を活性化させ、標的治療への抵抗性機序となりうることを明らかにしたが、これらより推測される仮説は、脳腫瘍が治療に対して一様に反応せずに難治性であるのは、同一腫瘍内部で遺伝子・シグナル異常の不均一性にに基づきがん代謝およびそれに続くエピジェネティクス変化が異なっているためではないか、というものである。本研究ではこれらの点に留意し、膠芽腫の不均一性と治療抵抗性の関係を、mTOR 経路による代謝およびエピジェネティクス制御に着目して解明することを試みた。

2. 研究の目的

上記背景のもと、本研究は臨床のヒト膠芽腫検体を用いて、1) 遺伝子・シグナル異常に基づき腫瘍内部の不均一性を同定する、2) 同定された不均一性とがん代謝活性の関連を解析する、3) 不均一性とエピジェネティクス変化の関連を解析する、4) がん代謝およびエピジェネティクスの不均一性と治療抵抗性の関連を解析する、という目標を設定し、組織内不均一性と治療抵抗性の分子機序という基礎的知見を臨床応用にまで展開するための基盤となる研究を目指す。具体的には、The Cancer Genome Atlas (TCGA) などのプロジェクトにより、多くの膠芽腫症例で異常活性化が認められる mTOR 複合体に特に着目し、未だ有効な治療法の少ない膠芽腫の治療開発につながりうる新たな病態を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) mTOR 経路に関わるシグナル異常に基づき、臨床膠芽腫標本内部の heterogeneity (不均一性) を免疫組織化学的に同定する。
(2) 膠芽腫標本において同定された mTOR 経路の不均一性とがん代謝活性化の関連を定量的に解析する。
(3) 膠芽腫標本において同定された mTOR 経路の不均一性とエピジェネティクス変化の関連を解析する。その後、mTOR 経路による新規のエピジェネティクス制御機序を分子生物学的手法により明らかにする。
(4) 腫瘍内 heterogeneity 動物モデルを用いて、がん代謝およびエピジェネティクス変化の不均一性が腫瘍の表現型と治療抵抗性へおよび影響を解析する。

4. 研究成果

(1) mTOR 経路異常に基づく腫瘍内不均一性の同定: EGFR 下流の効果器である mTOR 複合体は mTORC1 と C2 に分類されるが、われわれは特に mTORC2 が膠芽腫の腫瘍代謝を促進する新規の病態を明らかにしてきた¹⁾。そこで、mTORC2 不均一性の重要性に特に着目し、生検、手術、剖検から得られた膠芽腫標本を用い、mTORC2 の主要構成要素である Rictor、下流の効果器であるリン酸化 AKT (S473) やリン酸化 NDRG1 (T346) に対する免疫染色を施行したところ、同一腫瘍内部を mTORC2 の活性化部位と非活性化部位に領域化することができ、膠芽腫の内部に EGFR-mTOR 経路の heterogeneity が存在することが示唆された。

(2) 腫瘍内不均一性とがん代謝活性の定量解析: 続いて、臨床標本で検出可能であった mTORC2 シグナル異常の不均一性と代謝経路活性化との関連を解析した。具体的には、がん代謝の中心的現象である好氣的条件下での解糖系活性化（ワールブルグ効果）に関連する代謝酵素について、連続切片を用いた免疫染色解析により検討を行った。代謝は基本的な細胞活動であり免疫染色では単純に陽性、陰性と判定するのが困難であり、ソフトウェア (Visiopharm) を用いて定量化したところ、EGFR-mTORC2 経路の活性化とワールブルグ効果の中心酵素である LDHA (lactate dehydrogenase A) 発現に正の相関がみられ、EGFR-mTOR 信号の組織内不均一性によりがん代謝が異なって制御される可能性が示された (metabolic heterogeneity)。

(3) mTORC2 によるがん代謝の制御: 臨床検体を用いた組織学的解析により、mTORC2 と代謝の不均一性の関連が明らかとなったが、この代謝の活性化が腫瘍細胞の病態に与える影響について検討を行った。細胞内代謝が活性化される過程においては、多くの中間代謝産物が産生され、翻訳後修飾を介した細胞内タンパクの機能調節に重要な役割を果たす。網羅的解析の結果、mTORC2 はがん代謝を亢進させ、中間代謝産物の中でもアセチル基の供与体となるアセチル CoA の産生を有意に促進することが分かった。また、産生が亢進したアセチル CoA は、がん原性タンパクの翻訳後修飾を介して腫瘍細胞の増殖維持および治療抵抗性に関わることが分かり²⁾、mTORC2 による metabolic heterogeneity が、がん細胞の病態に大きく関与することが示唆された。

(4) 腫瘍内不均一性とエピジェネティクス変化の解析: 近年、DNA やヒストン修飾など DNA の塩基配列変化によらない遺伝子発現制御システムであるエピジェネティクスに代謝活動が大きな影響を与え、がんを含む様々な疾患の病態に関与することが明らかにされている。事実、中間代謝産物アセチル CoA や SAM (S-adenosylmethionine) は、ヒスト

ン蛋白をはじめとする核内タンパクの翻訳後修飾（アセチル化、メチル化）、すなわちエピジェネティクス変化に強い影響力をもつ。そこで、膠芽腫内の組織内不均一性が、がん代謝に続きエピジェネティクス変化を介して病態に関与する可能性を検討した。臨床標本で検出可能であった mTORC2 シグナル異常の不均一性とエピジェネティクス変化との関連を、ソフトウェアを用いて定量解析したところ、複数のヒストンアセチル化 (H3K9ac, K18ac, K27ac) が mTORC2 信号と関連しており、mTORC2 の組織内不均一性によりエピジェネティクスが異なって制御される可能性 (epigenetic heterogeneity) が示された。これは mTORC2 による代謝の制御およびアセチル CoA 産生の結果とも矛盾なく、「遺伝子・シグナルの不均一性 代謝の不均一性 エピジェネティクスの不均一性」という制御軸が存在することが推測された (図 1)。

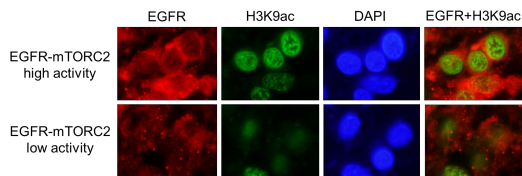


図1 臨床膠芽腫検体におけるEGFR-mTOR経路の不均一性とヒストンアセチル化

(5) mTORC2 によるエピジェネティクス制御の in vitro 解析：臨床検体で明らかとなった、mTORC2 と代謝およびエピジェネティクスの不均一性の関連について、細胞株を用いた分子生物学的実験によりその制御機序を解析した。興味深いことに、mTORC2 によるがん代謝の亢進およびアセチル CoA の産生を介してヒストンアセチル化が促進されるのみならず、mTORC2 により制御されることをわれわれが報告した¹⁾ヒストン脱アセチル化酵素の一つである class IIa HDAC (histone deacetylase) を遺伝学的に改変することで、mTORC2 によるエピジェネティクスの表現型を再現することができた。以上の結果より、mTORC2 が代謝を介した基質の産生と、ヒストン修飾酵素の機能調節という両者の制御を介して、エピジェネティクスを変化させる新規の制御機構が明らかとなった。

(6) がん代謝およびエピジェネティクスと腫瘍細胞の病態：これまでの実験で明らかとなった腫瘍内不均一性に基づく代謝およびエピジェネティクスの制御がもたらす、腫瘍生物学的および治療的意義を in vitro の系で検討した。膠芽腫細胞株を用いて、mTORC2 の主要構成要素である Rictor の RNAi ノックダウン下で、転写活性化領域の active histone mark として重要な H3K9ac を標的とした ChIP-sequencing 法による解析を行った結果、mTORC2 による制御下に、telomerase を始めとする腫瘍細胞の生存や幹細胞化に関わる遺伝子群のヒストンアセチル化が調節され、転写が亢進することが分かった。す

なわち、mTORC2 による代謝の活性化は、エピジェネティクス制御を介して、がん細胞の生存に大きな影響を与えることが明らかとなった。

(7) がん代謝およびエピジェネティクス不均一性と治療抵抗性の解析：これまでの結果から、腫瘍内部で mTORC2 異常のある部位ではがん代謝およびエピジェネティクス変化 (ヒストンアセチル化) が促進され、その部位が幹細胞化などの表現型を獲得し、腫瘍化促進および治療抵抗性に関与している可能性が考えられる (図 2)。臨床膠芽腫検体および脳腫瘍動物モデルの解析では、mTORC2 の組織内 heterogeneity と、ヒストンアセチル化、幹細胞マーカーおよび増殖能が有意に関連していた。注目すべきことに、mTORC2 を標的として膠芽腫細胞のエピジェネティクス経路に介入することで、flow cytometry による表面抗原の解析で分化誘導が確認され、colony formation assay による造腫瘍能が減少した。さらには、膠芽腫治療で汎用されるアルキル化剤の効果が、同処置により促進され、mTORC2 およびエピジェネティクスへの介入が悪性脳腫瘍の新規治療戦略のひとつとなり得る可能性が示された (投稿準備中)。

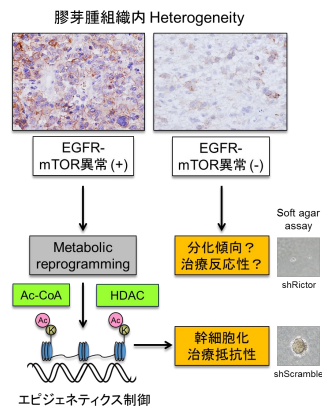


図2 腫瘍内heterogeneityと治療抵抗性

< 引用文献 >

1) Masui K, Tanaka K, Akhavan D, et al. mTOR complex 2 controls glycolytic metabolism in glioblastoma through FoxO acetylation and upregulation of c-Myc. Cell Metab 18: 726-39, 2013
 2) Masui K, Tanaka K, Ikegami S, et al. Glucose-dependent acetylation of Rictor promotes targeted cancer therapy resistance. Proc Natl Acad Sci U S A 112: 9406-11, 2015

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 4 件)

増井 憲太, Heterogeneity とがんの治療抵抗性、月刊「細胞」、査読無、49 巻、2017、

47-51

<http://www.hokuryukan-ns.co.jp/magazine/s/cell.html>

Masui K, Shibata N, Cavenee WK, Mischel PS, mTORC2 activity in brain cancer: Extracellular nutrients are required to maintain oncogenic signaling, Bioessays, 査読有, 2016; 38: 839-44
doi: 10.1002/bies.201600026

③ Masui K, Cavenee WK, Mischel PS, Cancer metabolism as a central driving force of glioma pathogenesis, Brain Tumor Pathol, 査読有, 2016; 33 :161-8
doi: 10.1007/s10014-016-0265-5

Masui K, Cavenee WK, Mischel PS, mTORC2 and Metabolic Reprogramming in GBM: at the Interface of Genetics and Environment, Brain Pathol, 査読有, 2015; 25: 755-9
doi: 10.1111/bpa.12307

〔学会発表〕(計 7 件)

増井 憲太、Webster K. Cavenee、Paul S. Mischel、がん代謝による標的治療抵抗性機序の解明、第 3 回がん代謝研究会、2015 年 7 月、石川県立音楽堂(石川県金沢市)

増井 憲太、ポール・ミシェル、柴田 亮行、悪性脳腫瘍はグルコースの代謝を介して治療抵抗性を獲得する、第 10 回臨床ストレス応答学会、2015 年 11 月、東京農工大学 140 周年記念会館(東京都小金井市)

③ 増井 憲太、Cavenee Webster、Mischel Paul、柴田 亮行、膠芽腫はグルコース代謝を利用して標的治療抵抗性を獲得する、第 33 回日本脳腫瘍学会、2015 年 12 月、グランドプリンスホテル京都(京都府京都市)

Kenta Masui, Paul Mischel, Noriyuki Shibata, GLUCOSE-DEPENDENT MECHANISM OF TARGETED CANCER THERAPY RESISTANCE, The 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy(国際学会), 2016 年 4 月、万国津梁館(沖縄県名護市)

⑤ 増井 憲太、Paul S. Mischel、柴田 亮行、がん細胞において mTORC2 は代謝系リプログラミングを介してヒストンのアセチル化を促進する、第 105 回日本病理学会総会、2016 年 5 月、仙台国際センター(宮城県仙台市)

増井 憲太、Paul S. Mischel、柴田 亮行、悪性脳腫瘍細胞の増殖と生存に蛋白の翻訳後修飾が関与する、第 57 回日本神経病理学会総会学術研究会、2016 年 6 月、ホテルニューキャッスル(青森県弘前市)

⑦ 増井 憲太、Webster K. Cavenee、Paul S. Mischel、柴田 亮行、悪性脳腫瘍の病態に関わる蛋白翻訳後修飾、第 4 回がん代謝研究会、2016 年 7 月、かごしま県民交流センター(鹿児島県鹿児島市)

Kenta Masui, Paul S. Mischel, Noriyuki Shibata, mTORC2 promotes histone acetylation through metabolic reprogramming in glioblastoma, The 13th Asian Society for Neuro-Oncology(国際学会), 2016 年 9 月、シドニー(オーストラリア)

〔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

<http://www.twmu.ac.jp/Basic/patho1/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増井 憲太(MASUI, Kenta)
東京女子医科大学・医学部・助教
研究者番号: 60747682

(2) 研究分担者

()
研究者番号:

(3) 連携研究者

()
研究者番号:

(4) 研究協力者

ポール ミシェル(MISCHEL, Paul)