

令和元年5月22日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20003

研究課題名(和文) エピゲノム修飾因子を標的とした悪性脳腫瘍の異常エピゲノムの修復

研究課題名(英文) Remodeling of altered epigenetic regulation via targeting epigenetic factor during glioma formation

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脳腫瘍形成を継時的に解析する、個体レベルで治療標的としての有用性を評価するために脳腫瘍自然発生マウスモデルであるMADMマウスモデルを樹立し、そのマウスを用いて解析を進めた。エピゲノム因子であるEZH2は腫瘍形成早期から発現が増加しており、その標的ヒストン修飾であるH3K27me3の修飾異常を誘導していた。MADMマウスから樹立した腫瘍細胞株に対してEZH2阻害剤を投与すると増殖を抑制することができた。またMADMマウスのEZH2をノックアウトする、もしくはEZH2阻害剤を経口投与すると腫瘍内の遺伝子発現が変化することで腫瘍増大を抑制することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性脳腫瘍に対する治療薬は未だ少なく、極めて予後不良疾患である。本研究では悪性脳腫瘍の一部のサブグループではエピゲノム因子であるEZH2が腫瘍形成に重要な役割を果たしており、EZH2を阻害することで腫瘍の増大を抑制することができた。細胞実験のみでなく動物実験でも有望な効果が見られており、予後不良である悪性脳腫瘍の有望な新規治療薬の候補として今後さらに研究を発展していくための基礎となる知見を得ることができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：We established MADM mouse model which generates malignant glioma spontaneously. From an early stage of tumor formation, expression level of EZH2 was highly upregulated. Using glioma cell lines which are derived from MADM mice tumors, we found that EZH2 inhibitor (EPZ6438) inhibited cell growth of tumor cells. Also MRI imaging revealed that both oral administration of EPZ6438 and genetic depletion of EZH2 inhibited tumor growth in MADM mice significantly. We harvested tumor tissue of EZH2 knock-out MADM mice tumors, EZH2-intact MADM mice tumors and normal mice brains. Gene expression analysis with microarray revealed that expression levels of genes which are associated with neuronal differentiation are retained by knock out of EZH2 gene. These data indicated that EZH2 plays pivotal roles in glioma formation via dysregulation of histone modifications.

研究分野：脳神経外科学(脳腫瘍)

キーワード：悪性脳腫瘍 エピゲノム異常

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

1. 研究開始当初の背景

米国 NIH ロードマップ・エピゲノミクス・コンソーシアムより、大規模エピゲノム研究の成果が多くのグループから同時に報告され、これらのビッグデータはエピゲノムロードマップと名付けられた。エピゲノムロードマップは、2008年より開始した多数の正常組織や、疾患検体の網羅的なエピゲノム解析の成果である。エピゲノム機構はがんの形成において重要な役割を果たしていることは明らかであり、エピゲノムロードマップの成果により、エピゲノム機構の全容の解明が進むとともに、今後がん治療標的としてのエピゲノム研究が急速に進むことが期待される。エピゲノム修飾因子は、多くの遺伝子発現を同時、かつ厳密に制御しているマスターレギュレーターであり、有用な新規治療標的と考えられる。近年、極めて予後不良疾患である膠芽腫では腫瘍形成において、重要な役割を果たすエピゲノム修飾因子が同定されつつある。当研究室では階段状の悪性化を示す二次性膠芽腫において、*IDH1* 遺伝子異常はドライバー遺伝子異常であり、エピゲノム異常を誘導して腫瘍形成に重要な役割を果たすことを明らかにした。一方予後不良である原発性膠芽腫ではエピゲノム修飾酵素である *EZH2* が高発現し、腫瘍形成に重要であることを明らかにした。当研究室ではこれまでに、網羅的なエピゲノム解析により、膠芽腫形成時に *EZH2* がクロマチンリモデリングを誘導し、多くの遺伝子発現異常を誘導していることを明らかにしている。膠芽腫形成において多くの遺伝子のクロマチンリモデリングを誘導し、遺伝子発現異常を誘導している *EZH2* を治療標的とすることは、効率的であり有用な新規治療戦略と考えられる。研究代表者はこれまでに *EZH2* は、原発性膠芽腫の中で最も予後の不良な腫瘍群で、著明な高発現を示すことを明らかにした。これらの腫瘍群は *IDH1* 遺伝子異常を示さない腫瘍群であり、*EZH2* の発現異常は、*IDH1* 遺伝子変異に匹敵する膠芽腫形成のドライバー異常として機能していると考えた。以上より膠芽腫形成において *EZH2* が誘導するエピゲノム異常を解明することを計画した。

2. 研究の目的

これまでの細胞実験や臨床検体解析研究の結果から、*EZH2* を標的とする新規治療戦略は膠芽腫において極めて有用であり、動物実験を用いた前臨床研究が必要であると考えた。研究代表者は *IDH1* 遺伝子異常を有さず、*EZH2* を高発現した膠芽腫を自然発生するマウスモデルを樹立している。Mosaic Analysis with Double Markers system (MADM システム) を用いたこのマウスモデルは、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マウスモデルである (Zong H et al, Cell 2011)。このマウスモデルでは前がん細胞を回収し、解析することができ、腫瘍形成過程におけるエピゲノム異常の変化を経時的に解析できるため極めて有用である。このマウスモデルでは生後 90 - 100 日にて全例膠芽腫を形成する。腫瘍形成前、形成後のいくつかの時期の GFP 陽性細胞を経時的に解析するために、FACS セルソーティング法を用いて、脳組織から直接 GFP 陽性細胞を回収する方法を確立した。*EZH2* は生後 20 日程から高発現を示し、多くの神経分化関連遺伝子にエピゲノム異常を誘導し、腫瘍形成とともにそれらの遺伝子発現を低下させていることが明らかになった。未分化細胞のマーカーである Nestin は腫瘍形成後期に著明に増加する。すなわち *EZH2* は腫瘍形成過程においてクロマチンリモデリング異常を介して、脱分化現象を誘導していることが示された。以上より *EZH2* は特に脱分化を誘導し、未分化細胞を増加させることによって、腫瘍形成に重要な役割を果たすと考え、*EZH2* のノックアウトマウスを MADM マウスに交配し、*EZH2* ノックアウト MADM マウスを作成した。*EZH2* のノックアウトにより腫瘍は有意に縮小し、神経分化関連遺伝子の発現は正常化していた。以上の結果より、*EZH2* は膠芽腫の有用な治療標的と考えられるが、*EZH2* 阻害剤の臨床応用を検討する上では、前臨床研究として、同一個体の治療前後の腫瘍体積の評価をする必要があると考えた。そこで、これまでの組織検体を用いたヘマトキシリン・エオジン染色による評価に加えて、同一個体の腫瘍形成過程を MRI にて評価する方法を確立した。本方法を用いて、MADM マウスに *EZH2* 阻害剤を投薬し、*EZH2* を標的とした治療法の有用性を、個体レベルで厳密に評価する前臨床研究を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究では *in vitro* 研究として、脳腫瘍細胞株への阻害剤投与実験を行い、細胞増殖抑制効果を評価した。阻害剤投与前後に、神経分化関連遺伝子の遺伝子発現変化を qPCR 法にて解析した。動物実験では治療前の MRI 施行後に EPZ6438 の投与を開始し、治療後の MRI を用いて腫瘍形成抑制能を評価した。*EZH2* をノックアウトした MADM マウスの脳腫瘍から回収した腫瘍細胞の遺伝子発現を、マイクロアレイ法にて解析し、神経分化関連遺伝子の発現変化を中心に遺伝子発現変化を解析した。

(1) 腫瘍細胞株への阻害剤投与実験による、細胞増殖抑制効果の評価と遺伝子発現解析

これまでに 3 匹のマウスから腫瘍細胞株 (3 細胞株) を樹立しており、これらの細胞に各種濃度の EPZ6438 を投与することにより、細胞増殖抑制効果を MTT アッセイで評価した。また阻害剤を数日間投与した細胞株から RNA、タンパク質を回収し、遺伝子発現等を解析した。また *EZH2* はヒストン修飾の中でも、ヒストン H3 リシン 27 トリメチル化 (*H3K27me3*) 修飾を行うことが知られている。阻害剤使用後のタンパク質に対して *H3K27me3* 修飾の標的遺伝子に対する抗体を用いたウエスタンブロッティング法を行い、*H3K27me3* 修飾の低下による遺伝子発現の回復を確

認した。

(2) MADM マウスに対する EPZ6438 投与による腫瘍抑制効果の評価

MADM マウスの腫瘍形成過程を、動物用脳 MRI にて評価する方法は確立していたため、本研究では腫瘍形成期に MRI を施行後、EPZ6438 を経口投与し、治療終了後に MRI にて評価し、脳組織（脳腫瘍検体）を回収し、効果を分子レベルでも評価した。統計学的な見解からコントロールマウス 7 匹と治療マウス 8 匹を用いて比較した。

(3) MADM マウスに対する EPZ6438 投与による腫瘍抑制効果の評価

EZH2 遺伝子のノックアウトによる腫瘍抑制効果の評価するために、EZH2 ノックアウトマウスと MADM マウスを交配したマウスを作成した。この EZH2 ノックアウト MADM マウスの腫瘍の大きさを継時的に解析し、また生存期間も解析した。EZH2 ノックアウト MADM マウスの腫瘍組織から mRNA を回収し H3K27me3 修飾遺伝子の発現変化をマイクロアレイにて解析した。

4. 研究成果

まずは EPZ6438 を他がん腫に用いている論文を参考にして in vitro 実験に用いる EPZ6438 投与量を決定するための予備実験を行った。MADM マウスから樹立した細胞株に予定した濃度の EPZ6438 を投与することで、腫瘍細胞の増殖を抑制することを見出した（図 1）。また、MADM マウスは IDH 野生型脳腫瘍であるため、同様のジェノタイプを有するヒト脳腫瘍細胞株（TM31）を用いて同様の実験を行い、EPZ6438 は TM31 の細胞増殖を抑制することを明らかにした。EPZ6438 投与後の TM31 を解析すると、EZH2 による H3K27me3 修飾の標的遺伝子の遺伝子発現レベルが回復していることが明らかになった。In vivo 研究として、MADM マウスに対する EPZ6438 投薬実験を行なった。MADM マウスの MRI 撮影を行う予備実験をしたところ、腫瘍は生後 90 日ほどからでき始めることが明らかになった。そのため、生後 90 日に MRI を撮影し、小さな腫瘍が形成されていることを確認したのちに、EPZ6438 を 20 日間連続にて経口投与を行なった (n=8)。同様に溶媒のみを投与したコントロール群 (n=7) も設けて、投薬後の MRI にて腫瘍体積を測定したところ、EPZ6438 投薬により有意に腫瘍増大が抑制されていることが明らかになった（図 2）。投薬後の MADM マウスの脳組織を回収し組織切片を作成し、免疫染色にて解析したところ H3K27me3 修飾は EPZ6438 の投与により有意に低下していることが明らかになった。また、EZH2 のノックアウトマウスを作成し、MADM マウスと交配することで、

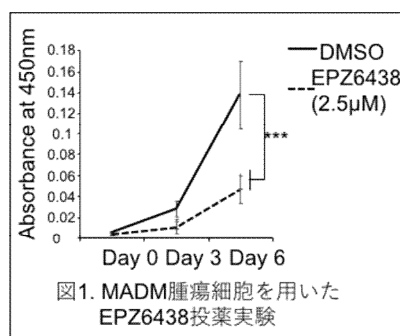


図1. MADM腫瘍細胞を用いた EPZ6438投薬実験

EZH2 ノックアウト MADM マウスを作成し、腫瘍の増大速度を解析しコントロール群と比較したところ、EZH2 のノックアウトにより有意に腫瘍の増大が抑制されていることが明らかになった。EZH2 ノックアウトにより生存期間も有意に延長していた。EZH2 ノックアウト MADM マウスの脳組織を回収し、腫瘍部から mRNA を抽出しマイクロアレイにて解析をした。正常マウス脳組織と MADM マウス（EZH2 野生型）の脳腫瘍部からも同様に mRNA を回収して解析した。正常脳組織と比較して MADM マウス（EZH2 野生型）腫瘍で有意に遺伝子発現が低下している遺伝子群の発現は EZH2 ノックアウト MADM マウス腫瘍ではその発現が正常脳と同レベルまで回復していることが明らかになった。また、EZH2 ノックアウト MADM マウス腫瘍と MADM マウス（EZH2 野生型）腫瘍を比較すると神経分化に関わる遺伝子群の発現レベルが有意に増加していることが明らかになった。

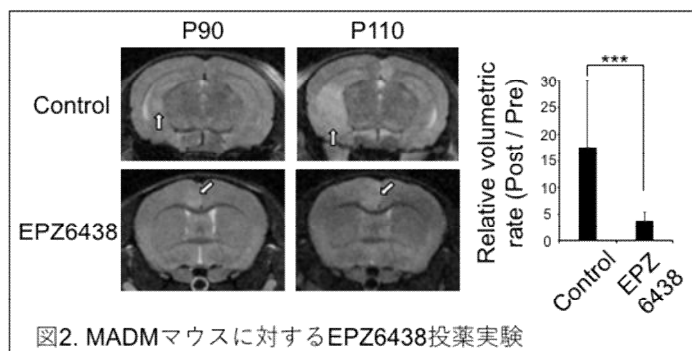


図2. MADMマウスに対するEPZ6438投薬実験

以上の結果より膠芽腫では EZH2 がヒストン修飾異常を誘導しており、EZH2 を阻害することでその修飾異常が修復され腫瘍増大も抑制されることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 4 件)

大岡史治・マウスモデルを用いた IDH 野生型グレード III グリオーマ形成に寄与するエピゲノム異常の解析・第 19 回日本分子脳神経外科学会・2018 年

大岡史治・IDH 野生型グレード III グリオーマ形成におけるエピゲノムリプログラミング・第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会・2017 年

大岡史治・Epigenetic treatment strategy for IDH-wildtype grade III glioma・日本脳神経外科学会第 76 回学術総会・2017 年

〔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

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：なし

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号(8桁)：

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：なし

ローマ字氏名：

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。