

令和元年6月3日現在

機関番号：32653

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15672

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍における微量元素代謝の新規制御機序とその意義

研究課題名(英文) Epigenetic regulation of iron trafficking in glioblastoma

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) 3,200,000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、EGFRおよびその下流に存在するmTORC2信号が、悪性腫瘍の発生や進展に重要と考えられる鉄の代謝を制御していることを明らかにした。mTORC2による鉄代謝の制御は、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を介した機構であることが分かった。mTORC2による鉄代謝制御機構に介入することで、腫瘍細胞の鉄の利用や細胞増殖を有意に抑制することが可能であった。いまだ有効な治療法がない膠芽腫において、mTORC2や鉄代謝を標的とする新規治療戦略が有望な治療戦略の一つとなり得る可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、悪性度が高く有効な治療法がない脳腫瘍である膠芽腫において、腫瘍細胞内の鉄代謝の制御機構に着目することで、新しい治療戦略の可能性を探索する独創的な試みである。細胞を使った基礎的な実験に加えて、実際のヒト脳腫瘍標本を用いる病理組織学的解析を行うことで、悪性脳腫瘍の病態に関わる鉄代謝という基礎的な分子メカニズムが、本研究により診断・治療を含む臨床応用まで視野に入れた形で解明されることが期待される。

研究成果の概要(英文)：Aberrant growth factor receptor signaling remodels intracellular metabolism and global gene transcription to drive aggressive cancer growth, but the underlying mechanisms are not well understood. Here we show that in the highly malignant brain tumor glioblastoma (GBM), mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2), a critical effector of the growth factor signaling system, links metabolic reprogramming and acetyl-CoA production with genome-wide alteration of histone acetylation. Integrated analyses in mouse models and human GBM samples demonstrate that mTORC2 regulates iron trafficking via histone H3 acetylation of the ferritin promoter, promoting tumor cell proliferation and survival. These results nominate mTORC2 as a critical epigenetic regulator of iron metabolism in cancer.

研究分野：神経病理学

キーワード：悪性脳腫瘍 mTOR複合体 エピジェネティクス ヒストンアセチル化 中心炭素代謝 鉄代謝

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

### 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、外科手術、化学療法および放射線療法といった集学的治療にも関わらず診断後の平均生存期間は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、がん細胞の増殖・生存に関与する現象として、解糖系やTCA回路に代表される中心炭素代謝の活性化（がん代謝）が重要視されている。一方、鉄を始めとする微量元素の代謝もがんとの関連が長らく指摘されてきたが、最近になり鉄代謝の亢進が悪性脳腫瘍の成長を促進する分子機序が報告され<sup>1)</sup>、その注目度が高まりつつある。しかしながら、微量元素代謝のがん病態への影響、特にがん細胞におけるその制御機構に関しては解明が遅れているのが現状である。

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 epidermal growth factor receptor (EGFR) - mammalian target of rapamycin (mTOR) 経路が、中心炭素代謝を活性化し (Warburg 効果)、腫瘍細胞増殖を促進することを明らかにした<sup>2, 3)</sup>。しかしながら、膠芽腫細胞は幹細胞的性質を示すなど、その病態は多彩であり、中心炭素代謝のみでは全ての病態が説明できない。この事実に対する仮説として、悪性脳腫瘍が複雑な病態を示す背景には、EGFR-mTOR 経路を始めとする主要な遺伝子異常が中心炭素代謝のみならず微量元素代謝を活性化し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、膠芽腫の病態解明を、mTOR 経路による鉄代謝の制御に着目して解明しようと試みる。

### 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および膠芽腫細胞株を用いて、1. 遺伝子・シグナル異常と鉄代謝との関連を同定する、2. 同定された遺伝子・シグナル異常による鉄代謝の制御機序を解析する、3. 鉄代謝の活性化ががんの病態へ与える機能的影響を解析する、4. 遺伝子・シグナル異常に基づく鉄代謝の活性化と治療抵抗性の関連を解析する、という目標を設定する。遺伝子・シグナル異常による微量元素代謝の制御機序という基礎的知見を、治療を含めた臨床応用にまで展開するための基盤となるような研究を目指す。具体的には、The Cancer Genome Atlas (TCGA) などの大規模遺伝学的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) 臨床膠芽腫標本を用い、mTOR 経路に関わるシグナル異常と鉄代謝活性化の関連を同定する。加えて、同一腫瘍内部の mTOR 経路の heterogeneity に基づく鉄代謝の変化も解析する。
- (2) mTOR 経路による鉄代謝の新規制御機序を明らかにする。特に、mTOR 経路により調節される鉄代謝関連遺伝子のエピジェネティクス制御に着目して解析を行う。
- (3) 同定された mTOR 経路による鉄代謝の活性化が膠芽腫の病態に与える影響について、特に細胞増殖および幹細胞化との関連に着目して解析を行う。
- (4) mTOR 経路および鉄代謝経路を改変した脳腫瘍動物モデルを用いて、遺伝子異常に基づく微量元素代謝が腫瘍の表現型と治療抵抗性へおよぼす影響を解析する。

### 4. 研究成果

(1) ヒト膠芽腫組織における mTOR 経路異常と鉄代謝の活性化：  
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 が膠芽腫の中心炭素代謝を促進する新規の病態を明らかにしてきた<sup>1, 2)</sup>。そこで、mTORC2 が同様に鉄代謝を制御する可能性に特に注目した。手術標本の解析にて、膠芽腫組織では正常脳と比較して、古典的組織染色で確認される鉄の存在量 (Fe<sup>3+</sup>: Per1 反応) が増加していた。また、mTORC2 の活性化マーカーであるリン酸化 AKT (S473) やリン酸化 NDRG1 (T346) と、細胞内貯蔵鉄に関連するフェリチンの発現を免疫染色で解析したところ、mTORC2 の活性化と鉄代謝マーカーとの間に相関がみられ (図 1)、mTORC2 と鉄代謝の間に関連があることが示唆された。

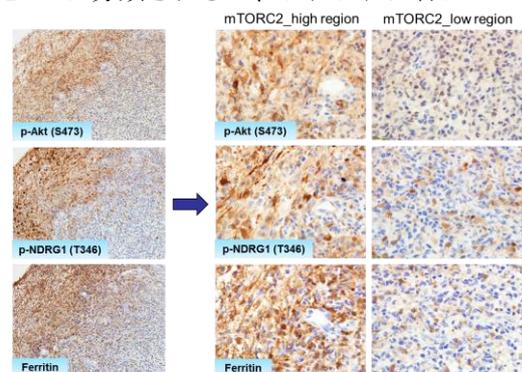


図1 mTORC2活性と鉄関連分子の相関 (組織内heterogeneity)

(2) mTORC2 によるエピジェネティクスの制御：  
続いて、膠芽腫細胞株 (U87) を用いて、mTORC2 による鉄代謝制御機構の解明に取り組んだ。制御機構の候補としては、エピジェネティクス変化に着目し、特に代謝との関連が深いヒストンのアセチル化に焦点を絞り、解析を行った。具体的には、膠芽腫細胞で、mTORC2 の主要構成要素である Rictor の RNAi ノックダウン下でのヒストン修飾 (アセチル化) の変化を解析した。mTORC2 抑制群では、種々のヒストンアセチル化 (H3K9ac, K18ac, K27ac) が有意に抑制されることが、immunoblot 法および免疫細胞染色により確認され、mTORC2 がエピジェネティクス変化であるヒストンアセチル化を制御していることが明らかとなった。

(3) 中間代謝産物を介する mTORC2 のヒストンアセチル化制御機構：

アセチル CoA は、アセチル基の供与体として働く、ヒストンアセチル化に直接関与する代謝産物と考えられている。そこで、mTORC2 の主要構成要素である Rictor の過剰発現によりヒストンアセチル化が増加するのを確認後に、アセチル CoA の産生源であるグルコースやアセテートの増減を行ったところ、mTORC2 介在性のヒストンアセチル化に強い影響がみられた。mTORC2 によるヒストンのアセチル化は acetyl-CoA の産生を介した現象であることが示唆された。さらに、mTORC2 によるアセチル CoA 産生の制御機構を解析したところ、核内アセチル CoA の増加およびヒストンアセチル化の促進には、ピルビン酸脱水素酵素 (PDH) の核内移行が関与していることが明らかとなった。

(4) mTORC2 依存的なヒストンアセチル化が制御する遺伝子群の網羅的解析：

膠芽腫細胞株を用いて、Rictor の RNAi ノックダウン下で、遺伝子プロモーター領域との関連が強い特定のヒストンアセチル化 (H3K9ac) を標的として ChIP-sequencing 法を行い、mTORC2 によるヒストン修飾が影響を与える遺伝子群を網羅的に解析した。mTORC2 抑制群では、種々の遺伝子群の転写開始領域 (TSS) 前後における H3K9ac のピークが減少しており、mTORC2 は遺伝子プロモーター領域のヒストンアセチル化に強い影響をおよぼすことが示唆された。

(5) mTORC2 依存的なヒストンアセチル化による微量元素代謝の制御：

引き続き、mTORC2 抑制下のもと、H3K9ac を標的として行った ChIP-sequencing 法および RNA-sequencing 法による網羅的解析に基づき、影響を受ける具体的な遺伝子群を探索した。興味深いことに、鉄代謝を始めとする微量元素代謝に関連する遺伝子群のヒストンアセチル化が有意に変化することが明らかとなった。実際に、mTORC2 の抑制を行うと、鉄代謝に重要なフェリチン遺伝子などのプロモーター領域のヒストンアセチル化が減少し、その転写産物の発現も抑制された。これらは、鉄代謝関連遺伝子の発現において、mTORC2 による新規エピジェネティック制御機序の存在を示す結果と考えられた。

(6) 鉄代謝の活性化と悪性脳腫瘍の病態：

本研究結果をもとに、将来的な治療応用へとつなげるべく、mTORC2 による鉄代謝活性化が、悪性脳腫瘍の細胞機能に与える影響について解析を行った。膠芽腫細胞において、mTORC2 の機能を抑制すると、鉄の取り込みや、トランスフェリンの排出能といった、実際の鉄代謝が抑制された。また、mTORC2 が活性化した膠芽腫細胞で、鉄代謝関連分子 (FTH1, FTL) の遺伝学的改変を行うと、有意に細胞増殖を抑制できることが分かった。EGFR-mTOR 経路異常を有する腫瘍における、鉄代謝への介入という新規治療戦略の可能性が示された (論文投稿準備中)。また、同様の現象が起こることを、われわれがこれまでに報告した、receptor tyrosine kinase (RTK) 活性化ラット脳腫瘍モデルにおいても確認した。

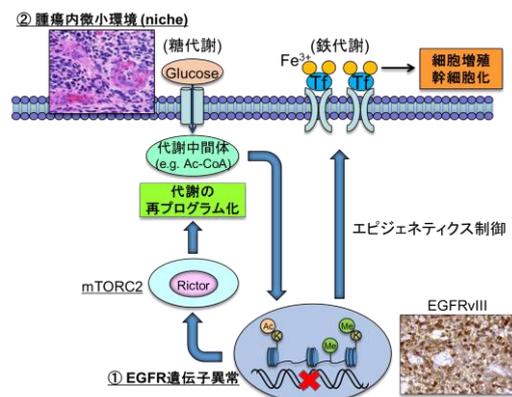


図2 EGFR-mTOR経路による鉄代謝のエピジェネティック制御

<引用文献>

- 1) Schonberg DL, Miller TE, Wu Q, et al. Preferential Iron Trafficking Characterizes Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* 28: 441-455, 2015
- 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
- 3) 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

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

- ① 鬼塚 裕美、増井 憲太、柴田 亮行、mTOR 複合体によるがん細胞の代謝の変化とその意義、*Journal of Japanese Biochemical Society*, 査読無, 2019; 91: 44-49  
doi:10.14952/SEIKAGAKU.2019.910044
- ② Masui K, Onizuka H, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N, Metabolic reprogramming in the pathogenesis of glioma: Update. *Neuropathology*, 査読有, 2019; 39: 3-13  
doi: 10.1111/neup.12535
- ③ Harachi M, Masui K, Okamura Y, Tsukui R, Mischel PS, Shibata N, mTOR Complexes as a Nutrient Sensor for Driving Cancer Progression. *Int J Mol Sci*, 査読有, 2018; 19: pii: E3267  
doi: 10.3390/ijms19103267
- ④ 増井 憲太、原地 美緒、柴田 亮行、がん微小環境における代謝の再構成、月刊「細胞」、

査読無、55巻、2018、49-51

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

⑤ Masui K, Komori T, Kato Y, Masutomi K, Ichimura K, Ogasawara S, Kaneko MK, Oki H, Suzuki H, Nitta M, Maruyama T, Muragaki Y, Kawamata T, Sawada T, Shibata N, Elevated TERT Expression in TERT-Wildtype Adult Diffuse Gliomas: Histological Evaluation with a Novel TERT-Specific Antibody. Biomed Res Int, 査読有, 2018; 2018: 7945845

doi: 10.1155/2018/7945845

⑥ Masui K, Kato Y, Sawada T, Mischel PS, Shibata N. Molecular and Genetic Determinants of Glioma Cell Invasion. Int J Mol Sci, 査読有, 2017; 18: pii: E2609

doi: 10.3390/ijms18122609

〔学会発表〕(計 5 件)

① 増井 憲太、柴田 亮行、ヒストン修飾がもたらす悪性脳腫瘍の病態—がん代謝のエピジェネティック制御—、第 59 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2018 年 9 月、宮崎市民プラザ (宮崎県宮崎市)

② Kenta Masui, Paul S. Mischel, Noriyuki Shibata, mTORC2 links metabolic reprogramming with epigenetic regulation of iron trafficking in glioblastoma, The 22nd International Conference on Brain Tumor Research and Therapy (国際学会), 2018 年 6 月, ノルウェー

③ 増井 憲太、原地 美緒、Paul S. Mischel、柴田 亮行、組織内のエピジェネティクス不均一性と膠芽腫の病態、第 35 回日本脳腫瘍学会、2017 年 11 月、JR ホテルクレメント高松・サンポートホール高松 (香川県高松市)

④ 増井 憲太、原地 美緒、Paul S. Mischel、柴田 亮行、Epigenetic heterogeneity と悪性脳腫瘍の病態、第 58 回日本組織細胞化学会総会・学術集会、2017 年 9 月、愛媛大学重信キャンパス (愛媛県東温市)

⑤ 増井 憲太、原地 美緒、Paul S. Mischel、柴田 亮行、悪性脳腫瘍の病態に関わる新規代謝経路の網羅的探索、第 5 回がんと代謝研究会、2017 年 7 月、北海道大学医学部学友会館「フラテ」大ホール (北海道札幌市)

〔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://www.twmu.ac.jp/Basic/pathol/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名:

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：ポール ミシエル

ローマ字氏名：MISCHEL, Paul

※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。