

令和元年6月3日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16644

研究課題名(和文) 神経膠腫に対するGOS2遺伝子の及ぼす影響

研究課題名(英文) Methylation dependent down-regulation of GOS2 leads to suppression of invasion and improved prognosis of IDH1-mutant glioma

研究代表者

福永 貴典 (Fukunaga, Takanori)

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：30745005

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)：本研究では、実際の神経膠腫検体を用いてIDH変異型ではGOS2の発現が低下し、神経膠腫細胞株のGOS2の発現を低下すると浸潤能が抑制されることを同定した。また、GOS2の発現を低下した神経膠腫細胞株をマウスの脳内に移植し、正常群に比べて周囲の正常脳への浸潤が抑制され、生存期間が延長することを同定した。さらに、IDH変異で低下する脱メチル化酵素TET2を神経膠腫株に過剰発現させるとGOS2の発現が上昇することも同定した。以上より、IDH変異型神経膠腫では高メチル化によってGOS2の発現が低下して細胞浸潤が抑制され、予後が改善していると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

神経膠腫は難治性原発性中枢神経系腫瘍であり、最も悪性度が高い膠芽腫の平均生存期間は16.8ヶ月と短い。二次性膠芽腫は、de novo膠芽腫に比べてイソクエン酸脱水素酵素(IDH)変異を多く認め、予後が良いことが知られていたが、IDH変異群で予後が良い機序は解明されていなかった。本研究の結果により、IDH変異型神経膠腫では高メチル化によってGOS2の発現が低下して細胞浸潤が抑制され、予後が改善していると考えられ、IDH変異型神経膠腫の予後が良い理由の一端を解明した。これらの結果は難治性神経膠腫の病態解明に役立つものと思われる。

研究成果の概要(英文)：Isocitrate dehydrogenase (IDH) mutations are a prognostic factor in diffuse glioma. However, the mechanism by which these mutations improve prognosis are not clear. In a subset of IDH-mutant glioma, remodeling of the methylome results in the glioma-CpG island methylator phenotype (G-CIMP) and transcriptional reorganization. In this study, we focus on G0/G1 switch 2 (GOS2), which is highly downregulated in G-CIMP glioma. We found that GOS2 expression tended to increase as the WHO grade increased, and GOS2 knockdown inhibited glioma invasion. In addition, the stereotactic delivery of glioma cells with decreased GOS2 expression in the mouse brain resulted in prolonged survival. The Cancer Genome Atlas (TCGA) analysis also indicated that survival is longer in the lower GOS2 expression group than in the higher GOS2 expression group. These results provide one explanation for the improved survival in IDH1-mutant glioma as well as a new epigenetic target for glioma treatment.

研究分野：脳神経外科

キーワード：神経膠腫 IDH変異 浸潤

## 1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は原発性中枢神経系腫瘍の中で最も頻度が高い腫瘍である。神経膠腫は WHO Grade I-IV に分類され、最も悪性度が高い GradeIV の膠芽腫は標準的な治療である摘出術、及び術後放射線化学療法を行っても全生存期間中央値が 14.6 か月と非常に短く、あらゆる癌の中で最も予後不良ながんである。2016 年に改訂された WHO 分類では、分子遺伝子情報も併せて評価することでより細分化した診断が可能となり、それらが腫瘍の生物学的特性だけでなく、治療への反応性や予後などの臨床面に関わる情報も明らかとなってきている。さらに、従来の遺伝子情報のみならず、DNA 塩基配列の変化を伴わない遺伝子発現あるいは細胞表現型の変化と呼ばれるエピジェネティクスにも注目がおかれてきており、DNA メチル化、ヒストン修飾異常などのエピゲノム修飾により遺伝子発現が調整されていることも知られるようになった。最近になってゲノム高次構造の変化によって癌遺伝子が調節されていることも報告されている。

IDH1(イソクエン酸デヒドロゲナーゼ 1)は、TCA 回路を構成する変換酵素で、エネルギー産生に重要な役割を担っている。現在までに、急性骨髄性白血病や前立腺癌など、様々ながんで IDH1 の変異が報告されており、腫瘍の形成に深く関与する可能性が指摘されている。WHO GradeII-III 神経膠腫、及び二次性膠芽腫においては 80%程度に IDH1 の 132 番目のリジンの変異が同定されており、IDH1 変異のある方が野生型と比較して予後が良いことが分かっている。IDH 変異は単なる機能低下ではなく、変異型酵素が  $\alpha$  ケトグルタル酸を 2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)に変換するという新たな酵素活性を獲得し、2-HG の蓄積がエピゲノムの変化を誘導して癌化を促進する可能性が示唆されている。また、IDH 変異のあるものでは DNA プロモーター領域の高メチル化(G-CIMP, glioma-CpG island methylator phenotype)が高頻度に認められ、G-CIMP を有する方が G-CIMP を認めない群に比べて予後が良いことも報告されているが、理由については解明されていない。G-CIMP 群と G-CIMP を認めない群で遺伝子の発現量を網羅的に比較すると、G-CIMP 群では G0S2 がメチル化により最も発現が抑制されており、IDH 変異によって G0S2 遺伝子の発現が調節されている可能性がある。G0S2 は G0 期から G1 期へとリエントリし細胞周期を進行させる遺伝子として同定され、増殖、アポトーシス、炎症、代謝などに関与することが報告されている。肺癌では非扁平上皮癌に比べて扁平上皮癌で G0S2 のメチル化が高頻度に見られたという報告や、乳癌、肝癌、前立腺癌の悪性癌細胞株においては G0S2 遺伝子の発現を抑制することで浸潤が抑制されたという報告もある。しかし、その機序については不明である。加えて、神経膠腫における G0S2 の機能については報告されていなかった。

## 2. 研究の目的

これまでの研究により、DNA プロモーター領域の高メチル化(G-CIMP)を認める神経膠腫は、予後が良いことが分かっており、G-CIMP 群では G0S2 遺伝子の発現が最も低いことが報告されている。しかし、この過剰なメチル化の意義や G0S2 の神経膠腫の発症・病態への寄与はまだ明らかになっていない。近年、悪性神経膠腫の発生や悪性化において、直接的な遺伝子変異だけではなく、特定の部分の DNA メチル化やヒストン修飾の異常などのエピジェネティックな変化が関与していることがわかってきている。そのため、本研究では、悪性神経膠腫に対して G0S2 遺伝子ががん化、および悪性度へ及ぼす影響を解明することを目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、IDH1 変異を伴う神経膠腫において、G0S2 発現の減少が予後改善をもたらすメカニズムを解明することを目的とした。悪性神経膠腫における G0S2 遺伝子の機能解析、及び G0S2 発現低下による悪性神経膠腫の治療効果を明らかにするため、以下の要領で研究を推進した。

- (1) 神経膠腫における G0S2 発現低下と予後改善の関連
- (2) IDH1 変異における G0S2 プロモーター領域の高メチル化
- (3) G0S2 発現低下による神経膠腫細胞の増殖・細胞浸潤への影響

## 4. 研究成果

(1) 神経膠腫のがんゲノムのデータベースとして The Cancer Genome Atlas (TCGA)を用いて G0S2 遺伝子の発現と神経膠腫の WHO 悪性度分類、生命予後との相関を調べたところ、IDH1 変異群では IDH 野生型と比較して、G0S2 発現量が低下しており、G0S2 発現量はメチル化と負の相関関係であった。また、WHO 悪性度分類が高いほど、G0S2 遺伝子の発現量が増加しており、G0S2 発現量によって 2 群に分類して生命予後を比較すると、G0S2 高発現群に比べて、低発現群の方が生命予後が良いという結果を得た。

(2) TCGA を解析した際に、IDH 変異群では GOS2 発現量が低下しているにも関わらず、GOS2 の変異は見られず、IDH 変異によって引き起こされる DNA メチル化によるエピジェネティックな変化により GOS2 の遺伝子発現がコントロールされている可能性が考えられたため、IDH 変異で低下する脱メチル化酵素 TET2 を神経膠腫株 U251 に過剰発現させ、GOS2 の発現量が改善するかどうかを調べたところ、IDH 変異において発現低下した GOS2 は、DNA 脱メチル化酵素 TET2 遺伝子を過剰発現することで発現が上昇した。

(3) さらに、TCGA の解析で得られた結果を実際の検体でも確かめるべく、手術の余剰検体を用いてヒト神経膠腫検体から RNA を抽出し、RT-PCR により、GOS2 遺伝子と悪性度について解析すると、IDH 変異群で GOS2 遺伝子の発現は低く、WHO 分類悪性度が上がるにつれ、GOS2 遺伝子の発現量は高い傾向にあった。さらに、GOS2 遺伝子の機能解析を行うべく、siRNA を用いて神経膠腫株 U251 の GOS2 の発現量を低下させ、*in vitro* で浸潤能を評価すると、GOS2 を発現低下させた群では浸潤能が抑制された。また、レスキュー実験を行い、siRNA の効果を打ち消し、GOS2 の発現を元のレベルまで改善すると細胞浸潤への影響が解消されるか検証したところ、GOS2 発現量を低下させると神経膠腫細胞の浸潤が抑制された。これらの結果により、神経膠腫においては、GOS2 は浸潤に関与していることが明らかになった。次に、shRNA を作製し、レンチウイルスベクターを用いて、神経膠腫株 U87 に shRNA を安定発現させ、*in vivo* でマウス脳内に GOS2 の発現を低下させた腫瘍細胞を移植し、生存期間を評価すると、周囲正常組織への浸潤が抑制され、生存期間が延長された。

これらの結果により、IDH 変異型神経膠腫においては、GOS2 の発現が低下することにより、周囲への腫瘍細胞の浸潤が抑制され、IDH 野生型神経膠腫に比べて予後が良い理由の一端を担っていると考えられた。神経膠腫は難治性腫瘍であり、単一の治療では効果が限られているため、様々な治療を組み合わせることで治療していくことが重要であり、今回の研究成果は今後の治療に役立つ可能性があると思われる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Fukunaga, T., Fujita, Y., Kishima, H. and Yamashita, T. Methylation dependent down-regulation of GOS2 leads to suppression of invasion and improved prognosis of IDH1-mutant glioma. PLoS ONE 13, 2018, e0206552.

〔学会発表〕(計 3 件)

福永貴典、藤田幸、阿知波孝宗、永野大輔、有田英之、香川尚己、藤本康倫、山下俊英、貴島晴彦「IDH 野生型、及び IDH 変異型神経膠腫における浸潤に寄与する因子の分子生物学的検討」第 18 回日本分子脳神経外科学会、2017 年 8 月 25 日

Takanori Fukunaga, Yuki Fujita, Hideyuki Arita, Naoki Kagawa, Yasunori Fujimoto, Haruhiko Kishima, Toshihide Yamashita “A new molecular prognostic marker for malignant glioma” 22<sup>nd</sup> annual scientific meeting of the Society for Neuro-oncology, 2017.11.17

福永貴典、藤田幸、藤本康倫、吉峰俊樹、山下俊英、「G0/G1 switch 2 gene (GOS2) is required for the invasion of glioma cells」第 21 回グリア研究会、2016 年 12 月 3 日

〔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：

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：山下 俊英

ローマ字氏名：Yamashita Toshihide

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。