

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 4 日現在

機関番号：24303  
研究種目：基盤研究(C) (一般)  
研究期間：2018～2020  
課題番号：18K09001  
研究課題名(和文) 脳腫瘍における免疫チェックポイントを標的としたがん細胞リプログラミングの基盤研究  
  
研究課題名(英文) Cancer cell reprogramming targeting immune checkpoint in brain tumors  
  
研究代表者  
高島 康郎 (Takashima, Yasuo)  
  
京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授  
  
研究者番号：50621083  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：中枢神経系原発リンパ腫(PCNSL)において予後不良を示すエクソン変異、がん免疫遺伝子の発現変動が見つかり、miR-101/548b/554/1202の組合せで予後予測が可能であった。メソトレキセート(MTX)耐性PCNSL細胞株において細胞型特異的解糖系亢進、高マンノース増加、シアル酸化型A2G2FとA2G2FBの減少がわかり、ボルテゾミブはPCNSLのMTX感受性を上昇させた。膠芽腫においてもがん免疫チェックポイントの遺伝子発現により予後予測が可能であった(B7-H3, GATA3, LGALS)。また、間葉系およびグリオーマ幹細胞の遺伝子高発現は予後不良であった。

## 研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、中枢神経系原発悪性リンパ腫および膠芽腫におけるトランスクリプトーム、マイクロRNAアレイ、プロテオーム、メタボローム、網羅的N型糖鎖発現、レクチンアレイのデータを取得し、がん免疫や微小環境に関わるマイクロRNAを含む複数のリプログラミング因子の候補を得た。さらに候補因子を絞り込み、これらの腫瘍細胞においてリプログラミングを行うことで正常細胞へと誘導できる可能性がある。これは、これまでの外科治療、化学療法、放射線治療、がん免疫療法に続く次世代型がん治療再生医療へと発展する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Exon-mutations and expression changes of cancer immunity genes associated with poor prognoses were found in primary central nervous system lymphoma (PCNSL). Prognosis prediction in PCNSL enables by expression changes of miR-101/548b/554/1202. In methotrexate (MTX)-resistant PCNSL cell lines, cell-type-specific increased glycolysis and high-mannose and decreased sialylated A2G2F and A2G2FB were found. Bortezomib increased MTX sensitivities in PCNSL. While, in glioblastoma, expression changes of B7-H3, GATA3, and LGALS on immune checkpoint pathway could also predict prognoses. In addition, expression of mesenchymal and glioma stem cell genes enables prognosis predictions.

研究分野：細胞生物学, 腫瘍生物学

キーワード：中枢神経系原発リンパ腫 エクソーム トランスクリプトーム メタボローム がん免疫 マイクロRNA  
膠芽腫 グリオーマ幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経系原発悪性リンパ腫(primary central nervous system lymphoma; PCNSL)は脳や脊髄に発症する節外性悪性リンパ腫で非ホジキンリンパ腫、びまん性大型 B 細胞リンパ腫に分類される。原発脳腫瘍に占める頻度はわずかに 3%程度ではあるが年々増加傾向にある。60 代以上の高齢者に多く発症し、標準治療を施しても再発率が高く予後も悪い。本研究では、ゲノムからタンパク・代謝物までのオミクス解析データを取得して統計解析することで、PCNSL におけるメソトレキセート(methotrexate; MTX)標準治療を向上させることを目的とする。

## 2. 研究の目的

葉酸代謝拮抗剤である MTX は PCNSL の標準治療として用いられるがほとんどの症例において耐性を獲得して再発する。本研究において PCNSL における中心炭素代謝および葉酸代謝の MTX 耐性機構を明らかにし、その下流にあるメチオニン回路および酸化ストレス耐性へのシグナル経路を遺伝子およびタンパクレベルで明らかにすることで、MTX による PCNSL の治療効果を改善することを目的とする。

## 3. 研究の方法

PCNSL 検体および MTX 耐性 PCNSL 細胞株を用いて葉酸代謝およびその下流のメチオニン回路と酸化ストレス耐性機構を解析した。ゲノムからタンパク、代謝物、糖鎖発現を調べ、臨床情報とともに統計解析した。これらの結果をまとめて MTX 耐性 PCNSL における活性化遺伝子とその発現制御機構を明らかにした。とくに解糖系、酸化ストレス耐性に着目し、シグナル伝達経路、タンパクのリン酸化、薬剤耐性などを調べた。

## 4. 研究成果

検体のエクソーム解析において、PIM1, MYD88, CD79B, DST, IRF4, ERBB3, MYH11, DCC, KMT2D に高頻度の変異が検出され、KMT2A, AR, NSD1, EPHA3, MYH11, NTRK1, UBR5 のエクソン変異は予後不良であった。また、RAS, MAPK, PI3K, AKT, mTOR, MYC のいずれかのコピー数増加と FAS, PTEN, FOXO1, TP53 のいずれかのコピー数減少が同時に検出された場合は予後不良であった。がん免疫関連遺伝子について調べた結果、CD40(high), CD70(high), LAG3(high), PD-1(high), PD-L2(low)は予後不良であることがわかった。このとき、ヘルパー T 細胞のバランス評価において、Th1(low)およびTh2(high)は予後不良であった。とくに Th1(low)Th2(high)は TIM-3(low)、PD-L2(low)と関連した。また、マイクロ RNA については miR-30d/93/101/181b/548b/554/1202 が予後予測因子であることがわかった。また、メタボローム解析の結果、MTX 耐性 PCNSL 細胞

は解糖系亢進と酸化ストレス耐性を起こしており、糖鎖解析において、シアル酸化型高マンノースの増加、シアル酸化型 A2G2F および A2G2FB の減少がわかった。さらに、ボルテゾミブを併用したとき、MTX 耐性 PCNSL 細胞の MTX 感受性が上がることをわかった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Takashima Y, Hayano A, Yamanaka R	4. 巻 26(11)
2. 論文標題 Metabolome Analysis Reveals Excessive Glycolysis via PI3K/AKT/mTOR and RAS/MAPK Signaling in Methotrexate-Resistant Primary CNS Lymphoma-Derived Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Clin Cancer Res	6. 最初と最後の頁 2754 - 2766
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1158/1078-0432.CCR-18-3851	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Iwadate Y, Hondoh H, Fukai J, Kajiwara K, Hayano A, Yamanaka R	4. 巻 15(2)
2. 論文標題 miR-101, miR-548b, miR-554, and miR-1202 are reliable prognosis predictors of the miRNAs associated with cancer immunity in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0229577
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0229577	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Yamanaka R	4. 巻 8(11)
2. 論文標題 Promising Prognosis Marker Candidates on the Status of Epithelial-Mesenchymal Transition and Glioma Stem Cells in Glioblastoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cells	6. 最初と最後の頁 pii: E1312
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/cells8111312	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Takashima Y, Yoshimura T, Kano Y, Hayano A, Hondoh H, Ikenaka K, Yamanaka R	4. 巻 19(1)
2. 論文標題 Differential expression of N-linked oligosaccharides in methotrexate-resistant primary central nervous system lymphoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 910
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s12885-019-6129-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Sato R, Yoshida K, Hayano A, Homma J, Fukai J, Iwadate Y, Kajiwara K, Ishizawa S, Hondoh H, Nakano M, Ogawa S, Tashiro K, Yamanaka R	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 Differential expression of individual transcript variants of PD-1 and PD-L2 genes on Th-1/Th-2 status is guaranteed for prognosis prediction in PCNSL	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Sci Rep	6. 最初と最後の頁 10004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-46473-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Hayano A, Yamanaka R	4. 巻 14(5)
2. 論文標題 CD276 and the gene signature composed of GATA3 and LGALS3 enable prognosis prediction of glioblastoma multiforme	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0216825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0216825	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Hayano A, Takashima Y, Yamanaka R	4. 巻 24(9)
2. 論文標題 Cell-type-specific sensitivity of bortezomib in the methotrexate-resistant primary central nervous system lymphoma cells	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Int J Clin Oncol	6. 最初と最後の頁 1020-1029
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-019-01451-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Yasuo, Kawaguchi Atsushi, Iwadate Yasuo, Hondoh Hiroaki, Fukai Junya, Kajiwara Koji, Hayano Azusa, Yamanaka Ryuya	4. 巻 14
2. 論文標題 MicroRNA signature constituted of miR-30d, miR-93, and miR-181b is a promising prognostic marker in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0210400
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0210400	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Yasuo, Horisawa Kenichi, Uono Miyako, Ohkawa Yasuyuki, Suzuki Atsushi	4. 巻 109
2. 論文標題 Prolonged inhibition of hepatocellular carcinoma cell proliferation by combinatorial expression of defined transcription factors	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3543 ~ 3553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.13798	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Miyasato Yuko, Takashima Yasuo, Takeya Hiroto, Yano Hiromu, Hayano Azusa, Nakagawa Takenobu, Makino Keishi, Takeya Motohiro, Yamanaka Ryuya, Komohara Yoshihiro	4. 巻 58
2. 論文標題 The expression of PD-1 ligands and IDO1 by macrophage/microglia in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Clinical and Experimental Hematopathology	6. 最初と最後の頁 95 ~ 101
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3960/jslrt.18001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Yasuo, Sasaki Yasushi, Hayano Azusa, Homma Jumpei, Fukai Junya, Iwadata Yasuo, Kajiwara Koji, Ishizawa Shin, Hondoh Hiroaki, Tokino Takashi, Yamanaka Ryuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Target amplicon exome-sequencing identifies promising diagnosis and prognostic markers involved in RTK-RAS and PI3K-AKT signaling as central oncopathways in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 27471 ~ 27486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.25463	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Yasuo, Kawaguchi Atsushi, Kanayama Tomohiko, Hayano Azusa, Yamanaka Ryuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Correlation between lower balance of Th2 helper T-cells and expression of PD-L1/PD-1 axis genes enables prognostic prediction in patients with glioblastoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 19065 ~ 19078
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.24897	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Yasuo, Hamano Momoko, Fukai Junya, Iwadate Yasuo, Kajiwara Koji, Kobayashi Tsutomu, Hondoh Hiroaki, Yamanaka Ryuya	4. 巻 10
2. 論文標題 GSEA-assisted gene signatures valid for combinations of prognostic markers in PCNSL	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-65463-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Takashima Y, Kawaguchi A, Fukai J, Iwadate Y, Kajiwara K, Hondoh H, Yamanaka R	4. 巻 -
2. 論文標題 Survival prediction based on the gene expression associated with cancer morphology and microenvironment in primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0251272	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 高島 康郎、川口 淳、佐藤 隆一、吉田 健一、早野 あづさ、本間 順平、深井 順也、岩立 康男、梶原 浩司、石澤 伸、本道 洋昭、中野 正和、小川 誠司、田代 啓、山中 龍也
2. 発表標題 中枢神経系原発悪性リンパ腫におけるTh1/Th2バランスとPD-1およびPD-L2遺伝子発現による予後予測
3. 学会等名 第42回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuo Takashima, Atsushi Kawaguchi, Yasuo Iwadate, Hiroaki Hondoh, Junya Fukai, Koji Kajiwara, Azusa Hayano, Ryuya Yamanaka
2. 発表標題 The miRNA signature constituted of miR-30d, miR-93, and miR-181b as promising prognostic markers in primary CNS lymphoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yasuo Takashima, Yasushi Sasaki, Azusa Hayano, Jumpei Homma, Junya Fukai, Yasuo Iwadate, Koji Kajiwara, Shin Ishizawa, Hiroaki Hondoh, Takashi Tokino, Ryuya Yamanaka
2. 発表標題 Identification of molecular marker candidate by Ion Reporter exome sequencing in primary central nervous system lymphoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Azusa Hayano, Yasuo Takashima and Ryuya Yamanaka
2. 発表標題 Establishment of methotrexate-resistant primary central nervous system lymphoma cell lines and sensitivity to bortezomib
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuo Takashima, Takeshi Yoshimura, Yuichiro Kano, Azusa Hayano, Hiroaki Hondoh, Kazuhiro Ikenaka, Ryuya Yamanaka
2. 発表標題 Expression analysis of N-oligosaccharides of glycoproteins in methotrexate-resistant central nervous system lymphoma cell lines
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yasuo Takashima, Azusa Hayano, Ryuya Yamanaka
2. 発表標題 Excessive glycolysis with mTOR and hypoxia signaling pathways in methotrexate-resistant primary CNS lymphoma cells
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高島康郎, 川口淳, 山中龍也
2. 発表標題 膠芽腫における上皮間葉転換およびグリオーマ幹細胞に関する遺伝子発現による予後予測
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高島 康郎, 山中 龍也. 中枢神経系原発悪性リンパ腫における予後予測因子の次世代がん治療再生医療への応用. プレジジョン・メディシン 2020年11月号 3(13) 47 - 48 2020年10月
高島康郎, 山中龍也. 中枢神経系原発悪性リンパ腫のがん細胞ダイレクトリプログラミング候補因子の同定. メディカル・サイエンス・ダイジェスト 2020年 7月臨時増刊号 46(8) 52 - 53 2020年6月
山中龍也, 高島康郎. 再発脳腫瘍モデルにおけるがんの代謝経路とATPエネルギー産生経路の解明～代謝物プロファイリングによる次世代医療の基盤研究～. 京都府立医科大学 報道発表 2020年3月

#### 6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	山中 龍也 (Yamanaka Ryuya) (20323991)	京都府立医科大学・医学部・特任教授  (24303)	
研究分担者	川口 淳 (Kawaguchi Atsushi) (60389319)	佐賀大学・医学部・教授  (17201)	

#### 7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------