

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：32653

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07649

研究課題名(和文)mTOR複合体によるがんDNAメチル化形質の新規制御機構

研究課題名(英文)mTOR-dependent hypomethylator phenotype in glioblastoma

研究代表者

増井 憲太(Masui, Kenta)

東京女子医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60747682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、悪性脳腫瘍である膠芽腫で高頻度に観察されるmTORC2異常が、腫瘍細胞でゲノムワイドなDNA低メチル化を誘導する新規病態を明らかとした。また、mTORC2依存的なDNAメチル化の減少が、神経回路網の形成に関与する遺伝子群の発現と相関することを網羅的解析により同定した。更に、同定経路に関連して、グルタミン酸代謝に関わる一連の遺伝子群を絞り込むと同時に、同経路への介入により、膠芽腫細胞の増殖および浸潤能を抑制する事が可能であった。将来的には本知見を基に、グルタミン酸代謝を介する腫瘍細胞間ネットワークの破綻を狙う、新規治療戦略の構築が期待される。

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の病態を、エピゲノムの視点から解明し、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。細胞株やヒト組織を使った実験病理学的な手法に加えて、次世代シーケンスやメチル化アレイを用いた網羅的解析により、腫瘍細胞と神経細胞がグルタミン酸代謝を介してネットワークを形成するという基礎的な分子メカニズムが明らかとなり、診断・治療を含む臨床応用まで視野に入れた研究へと繋がる事が期待される。

研究成果の概要(英文)：Aberrant DNA methylation pattern, especially global “hypomethylator phenotype”, is closely associated with oncogenesis, but the underlying mechanisms are not fully understood. We demonstrate that mechanistic target of rapamycin complex 2 (mTORC2), a core component of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling, down-regulates the expression of de novo DNA methyltransferase (DNMT3A) to induce global DNA hypomethylator phenotype in the brain cancer glioblastoma (GBM). Integrated analyses with next generation sequencing and comprehensive methylation array for rat and human GBM samples reveal that mTORC2-dependent DNA hypomethylation epigenetically rewires a network of glutamate metabolism, eventually facilitating tumor cell survival. The findings nominate mTORC2 as a critical regulator of DNA hypomethylator phenotype in cancer cells as well as an exploitable target to interfere with cancer-promoting epigenetic and metabolic reprogramming.

研究分野：神経病理学

キーワード：膠芽腫 mTOR複合体 エピジェネティクス DNAメチル化 神経回路 グルタミン酸代謝

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、DNA の塩基配列変化を伴わ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が、がんの病態に大きく関与する可能性が指摘されている。膠芽腫では、エピジェネティクス変化の一つである DNA メチル化の違いにより、予後や治療反応性の異なるグループへ細分類できることが示されている¹⁾。膠芽腫の DNA メチル化に大きな影響をおよぼす異常としては、イソクエン酸脱水素酵素 (IDH) の変異がよく知られており、IDH 変異の存在はゲノム DNA の高メチル化形質 (G-CIMP) を誘導する。その一方で、膠芽腫が再発および悪性化を来す場合、即ち、より悪性度が高い膠芽腫においては、DNA メチル化が逆に減少傾向にあることが近年明らかとされた²⁾。従って、悪性化や治療上の観点から“低メチル化形質 (hypomethylator phenotype)”をもたらす制御機序の解明が急務である。

がんの initiation および progression において、中心的な役割を果たすがん特異的現象 (hallmark) の一つとして、代謝の再プログラム化 (metabolic reprogramming) が注目を集めている³⁾。近年、この細胞内の代謝活動や細胞内シグナルが、エピジェネティクスに大きな影響を与え、がんの病態に関わることが明らかとなってきた。われわれは、膠芽腫で最多の遺伝子・シグナル異常である EGFR-mTOR 経路において、mTOR 複合体の一つである mTOR complex 2 (mTORC2) が細胞内代謝を制御する中心分子であることを見出した事から^{4, 5)}、mTORC2 による代謝の再プログラム化が、がんのエピジェネティクス (DNA メチル化) をダイナミックに制御している master regulator ではないかとの仮説を立てた。本研究では、高悪性度の膠芽腫の病態と関連する DNA の低メチル化形質が、多くの膠芽腫で異常活性化されている mTOR 経路に制御されるという新規仮説の検証を行う。

2. 研究の目的

本研究では、悪性化や治療抵抗性などの、膠芽腫の病態に関与する、DNA 低メチル化形質の制御機序およびその生物学的意義を探ることを目的とする。特に、膠芽腫症例のおよそ 9 割を占め、最も予後不良である、IDH 野生型の膠芽腫に着目し、同腫瘍で高頻度に起こる mTORC2 異常が、DNA 低メチル化形質を制御する新規病態の解明に挑戦する。本研究は、未だに有効な治療法がない膠芽腫に対して、新規治療戦略へと繋がりうる、がんエピジェネティクス制御機構の解明を目指すものである。それと同時に、がん細胞であっても、これまでは比較的安定して保たれていると認識されてきた DNA メチル化に関して、mTOR 経路を介するシグナル伝達の異常が、腫瘍の悪性化に際して DNA メチル化レベルをダイナミックに増減させる可能性を明らかにしようとする独創的な研究でもある。また、大部分の膠芽腫で観察される mTOR 経路異常とエピジェネティクス (DNA メチル化) 変化との関連を探索する本研究により、多くの膠芽腫症例に当てはまる知見がもたらされる可能性があり、将来的にバイオマーカーや治療応用を視野に入れた研究に繋がることが期待される。

3. 研究の方法

mTORC2 による DNA 低メチル化形質の新規制御機序を明らかとし、膠芽腫の病態および治療への影響を解析すべく、下記実験系を計画する。

(1) mTOR 複合体による DNA 低メチル化形質制御機構の解明：膠芽腫細胞株 (U87-MG, GBM6, GBM39) を用いて、mTORC2 の構成要素 (Rictor) を遺伝学的に操作した際の DNA メチル化状態、およびメチル化に関わる酵素と基質の発現を分子生物学的手法で解析する。

(2) mTOR 複合体依存性 DNA 低メチル化が脳腫瘍の病態に与える影響の網羅的解析：mTORC2 依存性 DNA 低メチル化の影響を、網羅的メチル化アレイ解析 (制御遺伝子群のプロモーター領域メチル化評価) とトランスクリプトーム解析 (RNA-seq による遺伝子群発現評価) を組み合わせる事で、mTOR 依存性 DNA 低メチル化により制御される遺伝子群を網羅的に解析する。

(3) エピジェネティクスに介入する新規治療戦略の開発：mTORC2 依存的に、エピジェネティック制御を受ける遺伝子群の同定に続いて、同遺伝子群が腫瘍細胞の増殖や分化に与える影響を病理学的に解析する。引き続き、mTORC2 が活性化した膠芽腫細胞を免疫不全マウスへ移植し、通常の化学療法に加えて、食餌への介入や mTORC2 阻害を行うことで、がんエピゲノムへの介入を試みる。DNA 低メチル化形質を正常化することで、化学療法の効果増強を狙う。

4. 研究成果

(1) ヒトおよび動物膠芽腫モデルにおける mTORC2 経路異常と DNA 低メチル化：

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^{4, 5)}。そこで、mTORC2 が代謝の制御を介して、エピゲノム変化である DNA メチル化に影響を与える可能性に注目した。EGFR-mTORC2 経路が活性化したヒト膠芽腫手術標本やラット膠芽腫モデルの解析では、EGFR や mTORC2 の活性化マーカーであるリン酸化 AKT (S473) と、DNA メチル化の指標である 5-メチルシトシン

(5-mC) の発現が逆相関していた (図 1)。更には、膠芽腫細胞株を用いて、mTORC2 の構成要素である Rictor を遺伝学的に操作したところ、5-mC の発現に加えて、ゲノムワイドな DNA メチル化のサロゲートマーカーである LINE-1 や Alu repeats のメチル化が、mTORC2 の活性化状態と逆相関を示した。以上より、mTORC2 の活性化が DNA の低メチル化と相関する事が分かった。

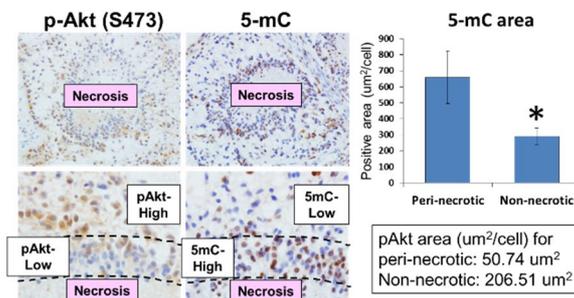


図1. mTORC2活性 (pAkt) とDNAメチル化 (5-mC) の逆相関 [PDGF誘発ラット膠芽腫モデル (Masui et al. GLIA 2010)]

(2) mTORC2 による DNA 低メチル化の制御機構：

続いて、膠芽腫細胞株を用いて、mTORC2 による DNA 低メチル化制御の分子メカニズム解明に取り組んだ。mTORC2 の構成要素である Rictor を遺伝学的に操作した条件下で、トランスクリプトーム解析を行い、DNA のメチル化修飾に関与する DNA メチル化酵素群および DNA 脱メチル化酵素群の遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、DNA 低メチル化に関わる修飾酵素として、de novo DNA メチル基転移酵素の一つである DNMT3A が、mTORC2 により負の制御を受けている事が明らかとなった。即ち、腫瘍で異常活性化した mTORC2 は、DNMT3A の遺伝子発現を抑制する事で、ゲノムワイドな DNA 低メチル化状態を誘導していると考えられた。

(3) mTORC2 依存的な DNA 低メチル化が制御する遺伝子群の網羅的解析：

Rictor の RNAi ノックダウンにより mTORC2 活性を変化させた膠芽腫細胞株を用いて、ゲノムワイドな DNA メチル化状態を網羅的に解析できる Infinium Methylation EPIC 850K 解析により、mTORC2 依存的な DNA 低メチル化により制御される遺伝子群の探索を試みた。メチル化アレイ解析でも、プロモーター領域や gene body を含むゲノムワイドな DNA メチル化状態は、mTORC2 の活性化状態と逆相関を示しており、前述の結果をサポートする結果であった。また、遺伝子発現と相関が強いプロモーター領域を標的として pathway 解析を行ったところ、CpG アイランドの DMR (DNA メチル化可変領域) として抽出される経路のトップ 5 に、“chemical synaptic transmission” という、経路の変化が同定された (図 2)。本結果より、mTORC2 依存的な DNA 低メチル化が制御する遺伝子群は、近年着目されている神経細胞とグリオーマ細胞のネットワークを制御する遺伝子群ではないかとの仮説を立てた⁶⁾。

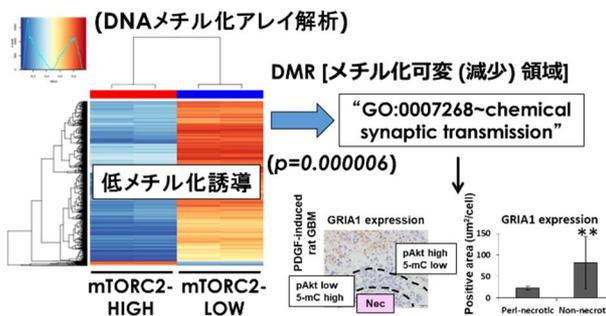


図2. EGFR-mTOR経路によるグルタミン酸代謝 (ニューロン・グリオーマネットワーク) のエピジェネティック制御

(4) mTORC2 依存的な DNA 低メチル化とグルタミン酸代謝：

引き続き、mTORC2 依存的な DNA 低メチル化によりエピジェネティックに制御される、ニューロン・グリオーマネットワークの形成に関わる遺伝子群の絞り込みを行った。その結果、種々のグルタミン酸トランスポーターや、グルタミン酸受容体の発現が、mTORC2 依存的な DNA 低メチル化により発現が有意に亢進する事が分かった。EGFR-mTORC2 経路が活性化した膠芽腫細胞にグルタミン酸やアスパラギン酸などの興奮性アミノ酸を添加したところ、細胞生存が有意に促進された事から、mTORC2 依存的な、これらのグルタミン酸代謝に関連する遺伝子発現は、増殖や浸潤など腫瘍の phenotype にも大きく影響する可能性がある。

(5) グルタミン酸代謝と悪性脳腫瘍の病態：

本研究結果を、将来的な新規の治療応用へと繋げるべく、mTORC2 によるグルタミン酸代謝の再プログラム化が、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。まず、mTORC2 依存的なエピジェネティック制御の影響が大きい遺伝子として GRIA1 (Glutamate Receptor, Ionotropic, AMPA1) を同定した (図 2)。続いて、GRIA1 の腫瘍細胞機能への影響を探るべく、脳内のニューロン・グリオーマネットワークを模倣する、膠芽腫細胞 (U87) と神経細胞 (SH-SY5Y) を共培養する系で実験を行った。同条件下で、GRIA1 由来のシグナルを阻害したところ、腫瘍細胞の増殖能が軽度、また浸潤能が有意に抑制される事が分かった。更には、TCGA の public database 検索により、GRIA1 の遺伝子発現が膠芽腫患者の予後と有意に相関していた。以上より、mTORC2 依存的な DNA 低メチル化により誘導される、グルタミン酸代謝関連の遺伝子群が、膠芽腫細胞と神経細胞の相互作用に影響を及ぼすことで、腫瘍細胞の悪性化に関与している事が示唆される (論文投稿準備中)。更には、エピゲノム経路やグルタミン酸代謝経路が、全く新しい膠芽腫の治療戦略に繋がる可能性が期待される。

<引用文献>

- 1) Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155: 462-77, 2013
- 2) Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, et al. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* 164: 550-63, 2016
- 3) Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144: 646-74, 2011
- 4) Harachi M, Masui K, Honda H, et al. Dual regulation of histone methylation by mTOR complexes controls glioblastoma tumor cell growth via EZH2 and SAM. *Mol Cancer Res* 18: 1142-1152, 2020
- 5) Masui K, Harachi M, Ikegami S, et al. mTORC2 links growth factor signaling with epigenetic regulation of iron metabolism in glioblastoma. *J Biol Chem* 294: 19740-19751, 2019
- 6) Venkataramani V, Tanev DI, Strahle C, et al. Glutamatergic synaptic input to glioma cells drives brain tumour progression. *Nature* 573: 532-538, 2019

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 6件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Harachi Mio, Masui Kenta, Cavenee Webster K., Mischel Paul S., Shibata Noriyuki	4. 巻 11
2. 論文標題 Protein Acetylation at the Interface of Genetics, Epigenetics and Environment in Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Metabolites	6. 最初と最後の頁 216 ~ 216
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/metabo11040216	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 該当する
1. 著者名 増井 憲太、小森 隆司	4. 巻 49
2. 論文標題 特集 グリオーマ-現在の常識と近未来のスタンダード グリオーマの疫学と診断 病理分類-改訂版WHO分類とcIMPACT-NOW	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Neurological Surgery 脳神経外科	6. 最初と最後の頁 510 ~ 519
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11477/mf.1436204423	査読の有無 無
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 Onizuka Hiromi, Masui Kenta, Amano Kosaku, Kawamata Takakazu, Yamamoto Tomoko, Nagashima Yoji, Shibata Noriyuki	4. 巻 54
2. 論文標題 Metabolic Reprogramming Drives Pituitary Tumor Growth through Epigenetic Regulation of TERT	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 ACTA HISTOCHEMICA ET CYTOCHEMICA	6. 最初と最後の頁 87 ~ 96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.21-00007	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 Masui Kenta, Cavenee Webster K., Mischel Paul S., Shibata Noriyuki	4. 巻 113
2. 論文標題 The metabolomic landscape plays a critical role in glioma oncogenesis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1555 ~ 1563
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.15325	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 該当する

1. 著者名 Harachi Mio, Masui Kenta, Honda Hiroaki, Muragaki Yoshihiro, Kawamata Takakazu, Cavenee Webster K., Mischel Paul S., Shibata Noriyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Dual Regulation of Histone Methylation by mTOR Complexes Controls Glioblastoma Tumor Cell Growth via EZH2 and SAM	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1142 ~ 1152
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/1541-7786.MCR-20-0024	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 該当する

1. 著者名 増井憲太	4. 巻 46
2. 論文標題 悪性脳腫瘍のヒストン修飾の制御機構とその意義	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Medical Science Digest	6. 最初と最後の頁 34 ~ 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 増井憲大	4. 巻 3
2. 論文標題 代謝とエピジェネティクスが規定する悪性脳腫瘍の病態	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Precision Medicine	6. 最初と最後の頁 88 ~ 91
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 Masui K, Harachi M, Ikegami S, Yang H, Onizuka H, Yong WH, Cloughesy TF, Muragaki Y, Kawamata T, Arai N, Komori T, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N	4. 巻 294
2. 論文標題 mTORC2 links growth factor signaling with epigenetic regulation of iron	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 19740-19751
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.011519	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 該当する

1. 著者名 Masui K, Harachi M, Cavenee WK, Mischel PS, Shibata N	4. 巻 478
2. 論文標題 mTOR complex 2 is an integrator of cancer metabolism and epigenetics	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.03.001	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 該当する

1. 著者名 Masui K, Harachi M, K Cavenee W, S Mischel P, Shibata N	4. 巻 53
2. 論文標題 Codependency of Metabolism and Epigenetics Drives Cancer Progression	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Histochemica et Cytochemica	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1267/ahc.20002	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 該当する

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 増井憲太, 小森隆司, 村垣善浩, 柴田亮行
2. 発表標題 脳腫瘍におけるエピジェネティクス異常
3. 学会等名 第62回日本神経病理学会総会学術研究会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増井憲太, Paul S. Mischel, 柴田亮行
2. 発表標題 mTOR依存的なヒストンメチル化の動態とがん細胞の生存戦略
3. 学会等名 第15回日本臨床ストレス応答学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増井憲太, Paul S. Mischel, 柴田亮行
2. 発表標題 IDH野生型膠芽腫におけるDNAメチル化形質の制御機構と意義
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増井憲太, 原地美緒, Paul S. Mischel, 柴田亮行
2. 発表標題 代謝とヒストン修飾からみる悪性脳腫瘍の病態
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増井憲太
2. 発表標題 二つのmTOR複合体による癌ヒストンメチル化の協調的制御
3. 学会等名 第24回日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増井憲太, Paul S. Mischel, 柴田亮行
2. 発表標題 EGFR変異型膠芽腫におけるヒストンメチル化の新規制御機構
3. 学会等名 第66回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増井憲太, 原地美緒, 村垣善浩, Paul S. Mischel, 柴田亮行
2. 発表標題 IDH野生型膠芽腫におけるヒストンメチル化 (H3K27me3) の新規制御機構とその意義
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増井憲太, Paul S. Mischel, 柴田亮行
2. 発表標題 タンパク質翻訳後修飾のネットワークがもたらすがん細胞の表現型
3. 学会等名 第61回日本組織細胞化学会総会・学術集会 (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鬼塚 裕美, 増井 憲太, 天野 耕作, 川俣 貴一, 山本 智子, 柴田 亮行, 長嶋 洋治
2. 発表標題 下垂体腫瘍における代謝とヒストン修飾の変化
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍病理学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 増井 憲太, Paul S. Mischel, 柴田 亮行
2. 発表標題 mTOR複合体によるDNAメチル化の新規制御機構
3. 学会等名 第7回がんと代謝研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	ミシェル ポール (Mischel Paul)		

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
---------	---------