

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K09478

研究課題名（和文）スーパーエンハンサー形成が誘導する悪性脳腫瘍の異常クロマチンリモデリングの解明

研究課題名（英文）Aberrant chromatin remodeling induced by super-enhancer formation in malignant glioma

研究代表者

大岡 史治（Ohka, Fumiharu）

名古屋大学・医学系研究科・講師

研究者番号：10725724

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）：急速にビッグデータが蓄積したものの、未だ大部分の悪性脳腫瘍の腫瘍形成メカニズムは明らかになっておらず、これまでにはない新規メカニズム概念の探索が必須である。エピゲノム機構は遺伝子発現を活性化（オン）する修飾と抑制（オフ）する修飾が精密に制御されており、そのバランスが崩れることでがんの発生に寄与する。近年がんの新規ドライバーメカニズムとしてスーパーエンハンサー形成が提唱された。Myc分子等の転写因子がゲノムの立体構造を変化させ、がん関連遺伝子の遺伝子発現を亢進し、がんの形成に寄与している。本研究では脳腫瘍自然発生マウスモデルを用いて異常なクロマチン構造変化を経時的に解明する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれまで研究モデルが限られていた脳腫瘍分野で新規性の高い脳腫瘍自然発生マウスモデルを用いて、脳腫瘍形成過程における経時的な解析を行うことができる点で意義が大きいものとする。脳腫瘍ではこれまで腫瘍検体を用いた網羅的解析が主に進められてきたが、腫瘍検体を用いた解析では悪性転化した結果を見ている可能性があり、腫瘍形成過程を経時的に解析することは困難である。前腫瘍細胞の段階からGFPでトレースできる本モデルを用いてダイナミックなエピゲノム異常の解明を試みることで、新規治療戦略につながる可能性があるものとする。

研究成果の概要（英文）：Despite the accumulation of big data, the mechanism of tumorigenesis of most malignant brain tumors is still unclear, and it is essential to explore novel mechanistic concepts that have never been explored before. Epigenomic mechanisms are precisely regulated by modifications that activate (on) and repress (off) gene expression, and an imbalance between these modification contributes to cancer development. Recently, super-enhancer formation has been proposed as a novel driver mechanism of cancer, in which transcription factors such as Myc molecules alter the three-dimensional structure of the genome and enhance gene expression of cancer-related genes. In this study, we will elucidate the abnormal chromatin conformational changes during tumor formation using a mouse model which spontaneously develops brain tumor.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：Brain tumor Glioma mouse model Epigenetic alteration

1. 研究開始当初の背景

近年日本や欧米での大規模な分子解析研究から得られたビッグデータにより、悪性脳腫瘍のゲノム、エピゲノム、トランスクリプトーム異常の全容はほぼ明らかになった。これらの中で最も注目された分子異常は *IDH* 遺伝子変異であり、*IDH* 遺伝子変異の有無により悪性脳腫瘍の分子背景、臨床経過は大きく異なるため、WHO 脳腫瘍分類でも遺伝子名が診断名に組み込まれることとなった。*IDH* 変異型腫瘍は DNA の高メチル化により腫瘍形成が誘導されることが明らかになっている。一方で *IDH* 野生型腫瘍は極めて予後不良であるものの、具体的な腫瘍形成メカニズムは未だ明らかになっていない。これまでの腫瘍検体を用いた網羅的な解析では解明できないメカニズムが存在する可能性があると考えた。この問題点を解決するために、腫瘍形成前から経時的に解析できる悪性脳腫瘍自然発症マウスモデルを樹立し、経時的に新規分子異常メカニズムの解明を試みることを重要と考えた。

エピゲノム機構は網羅的かつ可逆的に遺伝子発現を制御する機構であり、がんの形成過程においてダイナミックにその修飾機構を変化させることで多彩な分子異常を誘導している。DNA メチル化修飾やヒストン修飾等が代表的な機構であり、悪性脳腫瘍においても遺伝子発現抑制型修飾である DNA メチル化異常についてはよく解析が進められている。ヒストン修飾異常についても多くの知見が得られてきており、申請者らも遺伝子発現抑制型ヒストン修飾酵素の一つである EZH2 が高発現し、異常な遺伝子発現抑制を誘導することで悪性脳腫瘍形成に重要な役割を果たしていることを報告した。エピゲノム機構は遺伝子発現を活性化する修飾と抑制する修飾が、多くの遺伝子群の発現を極めて精密に制御しているが、そのバランスが崩れることでがんの形成に寄与していることが提唱されている。悪性脳腫瘍の腫瘍形成メカニズムをさらに解明するためには、未だ明らかになっていない遺伝子発現を活性化する異常なエピゲノムメカニズムを解明すること、またそのメカニズム異常が出現するタイミングを明確に同定することが重要と考えた。近年がん特有の新規遺伝子発現制御メカニズムとしてスーパーエンハンサーという概念が提唱された。Myc 分子等、特定の転写因子がマスターレギュレーターとしてゲノムの立体構造を大きく変化させ、遺伝子発現をダイナミックに活性化する機構である。悪性脳腫瘍の腫瘍形成過程において、EZH2 が誘導する遺伝子発現抑制型ヒストン修飾異常と協調して、特異的なスーパーエンハンサー領域の形成による異常な遺伝子発現活性化が腫瘍形成に重要な役割を果たしており、その解明が新規治療法の開発につながると考えた。

2. 研究の目的

本研究では悪性脳腫瘍の形成過程において、経時的にスーパーエンハンサー領域と抑制型ヒストン修飾領域の変化を解析し、EZH2 とスーパーエンハンサーのクロストークメカニズムを解明することを目的とした。申請者はこれまでに *IDH* 野生型悪性脳腫瘍を自然発症するマウスモデルを樹立し、研究を進めている。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生後 90 - 100 日にて全例 *IDH* 野生型悪性脳腫瘍を形成する。また、FACS セルソーティング法にて GFP 陽性である前がん細胞を回収でき、腫瘍形成過程における分子異常の変化を経時的に解析できることが極めて有用な点である。これまでの研究で EZH2 は腫瘍形成前から高発現を示し、腫瘍形成過程において網羅的にクロマチンリモデリング異常を誘導し、多くの神経分化関連遺伝子の発現を抑制し、脱分

化現象を誘導していることを明らかにした。本研究ではスーパーエンハンサーのヒストン修飾であるヒストン H3 リシン(K)27 アセチル化(H3K27ac)修飾を網羅的かつ経時的に解明し、EZH2が誘導するヒストン H3 リシン(K)27 メチル化(H3K27me3)修飾領域と比較することで、そのクロストークメカニズムを解明する。本研究では MADM マウスモデルを用いて経時的に H3K27ac 修飾遺伝子を同定し、腫瘍形成への寄与について解析することを目的とする。また EZH2 阻害剤投与と *Ezh2* のノックアウト後のスーパーエンハンサー領域の変化を解析する。EZH2 阻害剤による腫瘍増大抑制効果に加えてさらにスーパーエンハンサーを抑制する JQ1 併用の相乗効果についても解析する。本研究は *IDH* 野生型悪性脳腫瘍における、EZH2 阻害剤と JQ1 の併用新規治療法の前臨床研究として重要な役割を果たしうると考える。

3. 研究の方法

本研究では *in vitro*、*in vivo* 実験を併用して、*IDH* 野生型悪性脳腫瘍の腫瘍形成過程におけるスーパーエンハンサー領域を経時的に解析し、治療標的としての有用性を評価する。

MADMマウスから回収したGFP陽性細胞を用いたChIP-Seq、RNA-Seq解析

これまでにMADMマウスからFACSセルソーティングにてGFP陽性細胞を回収する手法は確立している。同様に腫瘍形成前の生後8日、60日のマウスと腫瘍形成後の生後120日のマウスからGFP陽性細胞を回収し、ホルマリン固定した後に抗H3K27ac抗体を用いてクロマチン沈降法(ChIP法)にてその修飾領域を回収する。回収された遺伝子を次世代シーケンサーで解析してその遺伝子領域を同定する。H3K27me3領域のデータとこれらのデータについて比較解析を行う。対照群は同腹仔の正常マウスを用いて同様の解析を行う。またH3K27acは遺伝子発現活性型、H3K27me3は遺伝子発現抑制型のヒストン修飾であるため、これらのGFP陽性細胞からRNAを回収し遺伝子発現解析を行い両方のヒストン修飾状況との比較解析を行う。バイオアナライザーにて回収したRNAのクオリティー評価を行なった後にサンプル調整を行い、次世代シーケンサーにて解析しRPKM (Read Per Kilobase Million)を算出して発現量を解析する。特にH3K27me3修飾とH3K27ac修飾遺伝子群の発現変化を解析する。

EZH2阻害剤投与によるスーパーエンハンサー領域変化の解析

これまでに複数のMADM腫瘍細胞株を樹立しており、それらの細胞株を用いて解析を進める。EZH2阻害剤であるEPZ6438を細胞株に投与6日後に細胞を回収してウエスタンブロッティング法にてH3K27me3修飾が抑制されていることを確認する。同様にH3K27acも解析を行う。EZH2阻害剤投与後にH3K27me3, H3K27acの修飾遺伝子領域をChIP-Seqにて解析し、H3K27me3修飾がH3K27ac修飾に置き換わった部位を中心に解析し、それぞれの変化について解析をする。

MADM腫瘍細胞、MADMマウスへのEZH2阻害剤とJQ1投与による腫瘍増大抑制効果の評価

MADM腫瘍細胞株にEPZ6438とスーパーエンハンサーの阻害作用を持つJQ1を投与し腫瘍増大抑制効果についてその上乗せ効果を評価する。またJQ1単独投与でも解析する。生後90日のMADMマウスのMRIを撮影したのちにEPZ6438投与群、JQ1投与群、EPZ6438+JQ1投与群、対照群に分けて薬剤投与実験を行う。20日間投与を行った後に再度MRIにて評価して腫瘍増大抑制効果を評価する。

4. 研究成果

MADMマウスから回収したGFP陽性細胞を用いたChIP-Seq、RNA-Seq解析

確立された MADM マウスの P8, P60, P90, P120 の個体を用いて、FACS セルソーティングにて GFP 陽性細胞を採取する方法を確立した。それらの細胞から RNA を回収し RNA-Seq を行った。H3K27me3 修飾を行うポリコーム複合体 2 (PRC2) を構成する、*Suz12*, *Eed*, *Ezh2* の発現は腫瘍形成前の早期の段階から増加していることが明らかになった。また、同様に GFP 陽性細胞を PFA 固定し、ヒストン修飾である H3K4me3 修飾、H3K27me3 修飾、H3K27ac 修飾に対する抗体を用いて

ChIP-Seq を行った。H3K4me3 修飾は発現亢進型、H3K27me3 修飾は発現抑制型修飾であるが、H3K4me3 修飾は腫瘍形成過程において大きな変化はないものの、H3K27me3 修飾は腫瘍形成過程で著明に修飾遺伝子数の増加を認めることが明らかになった。また腫瘍形成過程においてH3K4me3 修飾とH3K27me3 修飾を同時に受けた bivalent 遺伝子数が増加することも特徴的であった。増加した H3K27me3 修飾遺伝子には Gene Ontology 解析で神経分化や発達に関わる遺伝子を多く含むことが明らかになった。また H3K27ac で修飾亢進部位も同定し、解析中である。

EZH2阻害剤投与によるスーパーエンハンサー領域変化の解析

これまでに複数のMADM腫瘍細胞株を樹立しているが、今回確立されたマウスモデルから細胞株を増やすことができた。それらの細胞株に予備実験のもとEZH2阻害薬であるEPZ6438投与を行った。細胞株に投与することで、濃度依存的に細胞増殖抑制効果を示すことが明らかになった。細胞株に投与後に細胞を回収してウエスタンブロッティング法にてH3K27me3修飾が抑制されていることを確認することができた。H3K27me3修飾の標的遺伝子として注目した *Fzd8* 遺伝子はEPZ6438投与後に発現が増加していることを確認できた。*Fzd8*はWntパスウェイを抑制する働きがあるため、腫瘍形成過程では *Fzd8* の発現低下とともにWnt関連分子である *Ccnd1* の発現増加を認めた(図1)。またH3K27me3同様にH3K27acも解析を行っているがEPZ6438投与後に細胞数の減少がみられることから、現在少数細胞からでも解析を行うことができるように予備実験を行っているところである。今後はEZH2阻害剤投与後のH3K27acの修飾遺伝子領域をChIP-Seqにて解析し、これまでに解析を行っているH3K27me3修飾がH3K27ac修飾に置き換わった部位を中心に解析を進める予定である。

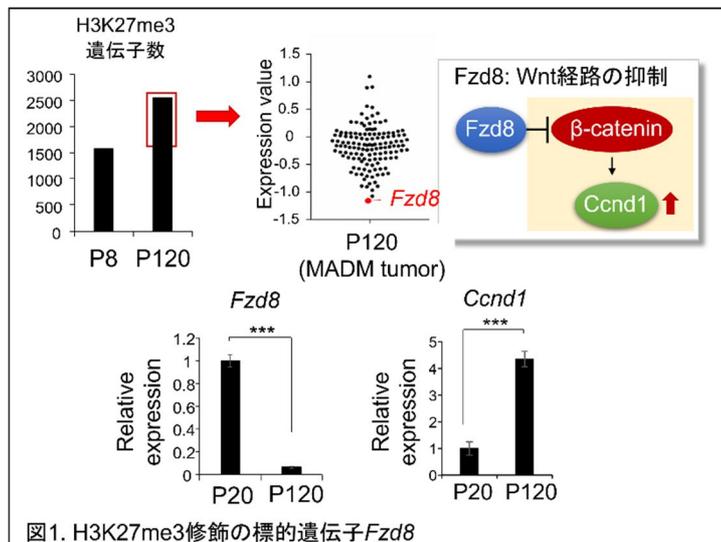


図1. H3K27me3修飾の標的遺伝子 *Fzd8*

MADM腫瘍細胞、MADMマウスへのEZH2阻害剤とJQ1投与による腫瘍増大抑制効果の評価

MADM腫瘍細胞株にEPZ6438を投与すると細胞増殖抑制効果を示すことが同定できたため、MADMマウスにEPZ6438を経口投与し、腫瘍増大抑制効果を解析した。投与を20日間行いMRIで評価したところ、コントロール群と比較して有意に腫瘍の増大抑制効果を示すことが明らかになった。またEPZ6438投与後のマウス脳を回収し免疫組織染色を行ったところ、H3K27me3修飾の減少と *Fzd8* の発現増加を確認することができた(図2)。またMADMマウスのEZH2をノックアウトしたところ、同様に腫瘍増大抑制効果を確認することができた。現在MADMマウスに対してとスーパーエンハンサーの阻害作用を持つJQ1を投与し腫瘍増大抑制効果を確認するために予備実験を行っているところである。条件が確定でき次第生後90日のMADMマウスのMRIを撮影したのちに

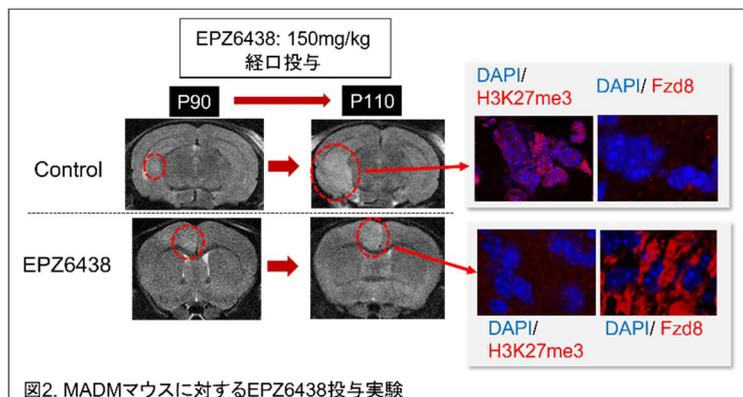


図2. MADMマウスに対するEPZ6438投与実験

現在MADMマウスに対してとスーパーエンハンサーの阻害作用を持つJQ1を投与し腫瘍増大抑制効果を確認するために予備実験を行っているところである。条件が確定でき次第生後90日のMADMマウスのMRIを撮影したのちに

EPZ6438投与群、JQ1投与群、EPZ6438+JQ1投与群、対照群に分けて薬剤投与実験を行う。20日間投与を行った後に再度MRIにて評価して腫瘍増大抑制効果を評価する予定である。また投与後のマウス脳から腫瘍組織を回収し、遺伝子発現解析等を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Maeda S, Ohka F, Okuno Y, Aoki K, Motomura K, Takeuchi K, Kusakari H, Yanagisawa N, Sato S, Yamaguchi J, Tanahashi K, Hirano M, Kato A, Shimizu H, Kitano Y, Yamazaki S, Yamashita S, Takeshima H, Shinjo K, Kondo Y, Wakabayashi T, Natsume A.	4. 巻 8
2. 論文標題 H3F3A mutant allele specific imbalance in an aggressive subtype of diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica Communications	6. 最初と最後の頁 8-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-0882-4	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2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 前田紗知、大岡史治、平野雅規、青木恒介、竹内和人、本村和也、棚橋邦明、加藤彰、北野詳太郎、西川知秀、清水浩之、山口純矢、山崎慎太郎、若林俊彦、夏目敦至
2. 発表標題 診断困難な成人diffuse midline glioma, H3 K27M-mutantにおけるddPCRの有用性
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大岡史治
2. 発表標題 Epigenetic Consequences of Genetic Alterations in Cell of Origin for Glioma
3. 学会等名 2022 SNO Annual meeting (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022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 分 担 者	夏目 敦至 (Natsume Atsushi) (30362255)	名古屋大学・医学系研究科・准教授 (13901)	

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