

令和 6 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2023

課題番号：19K09485

研究課題名（和文）悪性脳腫瘍におけるポリグルタミル化制御による新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of a Novel Treatment for Malignant Brain Tumors by Controlling Polyglutamylation

研究代表者

篠島 直樹 (Shinojima, Naoki)

熊本大学・病院・講師

研究者番号：50648269

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）：中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL）におけるポリグルタミル化（PG化）制御に関する分子機序に関しては、PG化にエピジェネティクスが関与していることを見出した。またPG化率とリン酸化Tau蛋白発現が相関し、PCNSL患者においてPG化高率群で有意に認知機能が低下していることを見出した。PCNSLは認知機能低下で発症することが多いことはよく知られているがその原因の一つとしてPG化/Tauの関与が示唆された。PCNSLの新規治療に関してはメソトレキセート（MTX）をin vitroおよびin vivoでHDAC阻害剤と併用し、MTXのポリグルタミル化を誘導すると、抗腫瘍効果が増強された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリグルタミル化（PG化）の制御は、中枢神経原発悪性リンパ腫（PCNSL）のメソトレキセート治療効果を増強するだけでなく、アルツハイマー型認知症をはじめとするTau蓄積が関与する認知症治療にも効果が期待できる可能性が示唆された。PG化制御の機序解明はPCNSL治療だけでなく、超高齢社会にある日本で今後益々増加傾向にある認知症の新規治療開発にも繋がるpromisingな研究と考える。

研究成果の概要（英文）：With regard to the molecular mechanisms of polyglutamylation regulation in primary central nervous system lymphoma (PCNSL), we found that polyglutamylation is involved in epigenetics. In addition, we found that the polyglutamylation rate and phosphorylated Tau protein expression were correlated in PCNSL, and that cognitive function was significantly impaired in the group with high polyglutamylation in PCNSL patients. It is well known that PCNSL often develops with cognitive impairment. The involvement of polyglutamylation/Tau was suggested as one of the causes of cognitive impairment in PCNSL. With regard to new treatments, the antitumor effect was enhanced when methotrexate (MTX) was used in combination with HDAC inhibitors in vitro and in vivo to induce MTX polyglutamylation.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：ポリグルタミル化 中枢神経原発悪性リンパ腫 脳腫瘍 認知機能

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) の標準治療は葉酸代謝拮抗剤であるメソトレキセート (MTX) の大量投与であるが、治療抵抗例が存在し生存期間中央値は 30 ~ 40 か月で予後不良である。ポリグルタミル化は可逆的蛋白修飾の一つで、一般にがん細胞ではポリグルタミル化が高率に生じている。申請者は PCNSL においてポリグルタミル化の程度にはばらつきがあり、ポリグルタミル化が高率であれば MTX 療法の治療効果が高いことを初めて見出し報告した。また他の悪性脳腫瘍においてもポリグルタミル化率にばらつきがあることを見出している。ポリグルタミル化を人為的に制御できれば MTX の治療効果を最大限に引き出せると考えられるが、ポリグルタミル化制御の詳細な分子メカニズムはわかっていない。そこで本研究では PCNSL や神経膠芽腫などの悪性脳腫瘍におけるポリグルタミル化制御の分子メカニズムを明らかにし、ポリグルタミル化制御を基盤とした新規治療法を開発する。

## 2. 研究の目的

研究目的はポリグルタミル化制御を基盤とした新規治療法を開発するために、悪性脳腫瘍におけるポリグルタミル化制御の分子機構を明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

### A. ポリグルタミル化制御の分子機構の解明

【ヒト腫瘍サンプルでの検証】ポリグルタミル化を制御する代表的分子はポリグルタミル化誘導酵素の Folylpolyl-gamma-glutamate synthetase (FPGS) と脱ポリグルタミル化酵素の gamma-glutamyl hydrolase (GGH) がある。FPGS、GGH などのポリグルタミル化制御因子の発現を PCNSL、神経膠芽腫、髄芽腫、上衣腫などの患者腫瘍サンプル、並びに各腫瘍の細胞株において免疫染色を行い、ポリグルタミル化との相関に関して検証する。また各組織での DNA メチル化解析などエピジェネティクス解析を行いポリグルタミル化率との相関を検証する。

【in vitro 実験】各細胞株の FPGS 及び GGH ノックダウン安定細胞株を shRNA で作製しポリグルタミル化を評価する。いくつかのエピジェネティクス制御化合物で細胞処理し、FPGS や GGH などポリグルタミル化制御因子の発現レベルを immunoblots などで評価する。

【細胞株】ヒト由来リンパ腫細胞株 (HKBML、TL-1、Raji、TK)、ヒトグリオーマ細胞株 (市販の細胞株のほか当科で樹立した glioma stem cells)、ヒト髄芽腫細胞株 (DAOY など)、ヒト脳幹グリオーマ (DIPG) 細胞株 (UCSF より授与)

【エピジェネティクス制御化合物】実臨床で使われている HDAC 阻害剤 (パノビノスタットやボリノスタット、バルプロ酸) のほか、プロモドメイン蛋白質阻害剤 (JQ1) やリシン脱メチル化酵素阻害剤 (LSD1 や GSK-J1)

### B. ポリグルタミル化制御を基盤とした新規治療法の開発

ポリグルタミル化を誘導するエピジェネティクス制御化合物と MTX を併用し抗腫瘍効果の高い薬剤を同定する。

【in vitro 実験】エピジェネティクス制御化合物で各細胞株を処理し、先行研究同様に MTX、ロイコボリンの順に処理し cell viability assay で抗腫瘍効果を評価する。さらに細胞内における MTX 自体のポリグルタミル化率を液体クロマトグラフィー質量分析 (LC-MS) で評価し、抗腫瘍効果との相関も検証する。

### 【in vivo 実験】

各細胞株をマウス脳に移植後、ポリグルタミル化誘導薬、MTX、ロイコボリンの順に腹腔内投与する。各薬剤の投与量、タイミングを調整し抗腫瘍効果を生存曲線、腫瘍サイズで比較検討する。また腫瘍内における MTX のポリグルタミル化を LC-MS で評価する。

## 4. 研究成果

【ポリグルタミル化制御の分子機構の解明】腫瘍のポリグルタミル化 (PG 化) 制御にエピジェネティクスが関与していることをヒト由来リンパ腫細胞株とエピジェネティクス制御化合物であるヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (HDAC 阻害剤) を用いた系で検証した。各種 HDAC 阻害剤

(パノビノスタット、ポリノスタット、バルプロ酸、NaBu)でヒト由来リンパ腫細胞株(HKBML、TL-1、TK)を処理すると、PG化誘導酵素のFolylpoly-gamma-glutamate synthetase (FPGS)発現が上昇し、脱ポリグルタミル化酵素のgamma-glutamyl hydrolase (GGH)発現が減少した。細胞をメソトレキセート(MTX)とHDAC阻害剤で処理するとPG化MTXの増加が確認された。従ってPG化制御にエピジェネティクスが関与している可能性が強く示唆された。

分子機構に関しては、共同研究施設でRNA-seqによる網羅的遺伝子解析が行われたPCNSLの解析データと臨床サンプルを収集しPG化解析を行いPG化関与遺伝子の絞り込みを行ってきたが未だ遺伝子同定には至っていない。課題としてサンプル数を増やす必要があり、PG化率の異なる細胞株を用いるなど今後計画したい。

またPG化関連因子探索の一環でPCNSLにおいてリン酸化Tauの蓄積がPG化率で異なることを見出した。即ちPG化高率群でリン酸化Tauが高発現、PG化低率群でリン酸化Tauの発現は認められなかった。PCNSLは認知機能低下で発症することが多いことはよく知られているが、PCNSL患者においてPG化高率群で有意に認知機能が低下していた。以上からPG化の制御はアルツハイマー型認知症をはじめとするTau蓄積が関与する認知症治療にも効果が期待できる可能性が示唆され、今後さらに研究を計画したいと考えている。

#### 【ポリグルタミル化制御を基盤とした新規治療法の開発】

MTXとHDAC阻害剤を併用しMTXのPG化を誘導した場合の抗腫瘍効果を*in vitro*及び*in vivo*(ヒト由来リンパ腫細胞株のnude mice皮下及び脳移植モデル)で検証したところ、MTXとHDAC阻害剤併用による抗腫瘍効果の増強が確認された。今後の臨床応用を念頭に、血液脳関門を通過可能な、またすでに皮膚T細胞性リンパ腫に対し保険適応となっているHDAC阻害剤、ポリノスタットを*in vivo*では用いた。以上を論文化し報告した(Neurooncol Adv. 2020)。PG化低率のPCNSLに対しHDAC阻害剤でPG化を誘導することでMTX治療効果を高めることが期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Fujimoto Kenji, Shinojima Naoki, Hayashi Mitsuhiro, Nakano Tomoyuki, Ichimura Koichi, Mukasa Akitake	4. 巻 2
2. 論文標題 Histone deacetylase inhibition enhances the therapeutic effects of methotrexate on primary central nervous system lymphoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdaa084	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15件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 竹島裕貴、篠島直樹、藤本健二、速形康司、武笠晃丈
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)患者の認知機能低下とポリグルタミル化
3. 学会等名 第41回日本脳神経外科学会学術集会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹島裕貴、篠島直樹、藤本健二、武笠晃丈
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫(PCNSL)患者の認知機能低下とポリグルタミル化
3. 学会等名 第23回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Naoki Shinojima , Akitake Mukasa, Kenji Fujimoto
2. 発表標題 Clinical significance of polyglutamylaton in primary central nervous system lymphoma
3. 学会等名 The 6th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠島直樹
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) 治療の最前線
3. 学会等名 神戸脳腫瘍セミナー2022 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoki Shinojima , Akitake Mukasa, Kenji Fujimoto
2. 発表標題 Clinical significance of polyglutamylation in primary central nervous system lymphoma
3. 学会等名 WFNOS 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 篠島直樹, 藤本健二, 山本隆広, 大田和貴, 竹崎達也, 黒田順一郎, 牧野敬史, 三上芳喜, 武笠晃丈
2. 発表標題 高齢者中枢神経原発悪性リンパ腫の予後因子
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠島直樹, 藤本健二, 牧野敬史, 大田和貴, 黒田順一郎, 山本隆広, 竹崎達也, 武笠晃丈
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) 治療の今後の方向性
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 篠島直樹, 藤本健二, 牧野敬史, 大田和貴, 黒田順一郎, 山本隆広, 竹崎達也, 市村幸一, 武笠晃丈
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫 (PCNSL) 治療開発の今後の方向性
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 Kenji Fujimoto, Naoki Shinojima, Keishi Makino, Jun-ichiro Kuroda, Akitake Mukasa
2. 発表標題 Clinical significance of polyglutamylation in primary central nervous system 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 Naoki Shinojima, Kenji Fujimoto, Keishi Makino, Akitake Mukasa
2. 発表標題 Clinical significance of polyglutamylation in primary central nervous system lymphoma
3. 学会等名 2019 WFNS SPECIAL WORLD CONGRESS (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠島直樹, 藤本健二, 牧野敬史, 尾田一貴, 中村和美, 黒田順一郎, 竹崎達也, 大田和貴, 城野博史, 三上芳喜, 武笠晃丈
2. 発表標題 高齢者における中枢神経原発悪性リンパ腫の治療を再考する
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠島直樹、藤本健二、大田和貴、竹崎達也、黒田順一郎、牧野敬史、武笠晃丈
2. 発表標題 中枢神経原発悪性リンパ腫におけるポリグルタミル化の臨床的意義
3. 学会等名 第57回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 篠島直樹、藤本健二、牧野敬史、尾田一貴、中村和美、黒田順一郎、竹崎達也、大田和貴、城野博史、三上芳喜、武笠晃丈
2. 発表標題 高齢PCNSLに対する治療の再考
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会
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
研究分担者	市村 幸一  (Ichimura Koichi)  (40231146)	順天堂大学・医学部・特任教授   (32620)	
研究分担者	田崎 雅義  (Tasaki Masayoshi)  (50613402)	熊本大学・大学院生命科学研究部(保)・准教授   (17401)	
研究分担者	武笠 晃丈  (Mukasa Akitake)  (90463869)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授   (17401)	

6. 研究組織（つづき）

	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	藤本 健二  (Fujimoto Kenji)  (70844413)	熊本大学・病院・医員    (17401)	
研究分担者	大田 和貴  (Ohta Kazutaka)  (60794469)	熊本大学・大学院生命科学研究部（医）・特定研究員    (17401)	

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