

令和 6 年 9 月 23 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03792

研究課題名(和文) マルチオミクス統合解析を基にしたグリオーマ再発・悪性化機構解明と新規治療戦略創出

研究課題名(英文) Elucidation of recurrence and malignant transformation mechanisms of glioma based on integrated multi-omics analysis and development of novel therapeutic strategies

研究代表者

武笠 晃丈 (Mukasa, Akitake)

熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授

研究者番号：90463869

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫(グリオーマ)の再発・悪性化機構について、エピゲノム解析においては、受動的DNA脱メチル化の結果として生じるIGF2BP3の高発現が重要な他、能動的DNA脱メチル化もKLF4などの転写因子を介して、腫瘍増殖に寄与していることを示すデータを得た。また、グリオーマ微小環境においては、腫瘍随伴マクロファージ(TAM)が重要であり、これにより分泌されるサイトカインIL-1 β が、STAT3とNF- κ Bシグナルの活性化を誘導し、IL-6やCXCL8の産生も介して相乗的に膠芽腫増殖に寄与することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫をふくむ神経膠腫は予後不良の疾患であり、再発進行を繰り返すことにて死に至ることから、そのメカニズムを明らかにし、新規治療法を創造することは極めて重要な意義を持つ。今回、悪性転化に伴うエピゲノム変化を新規手法等にて解析すること、及び、腫瘍微小環境に存在する腫瘍随伴マクロファージとグリオーマの相乗的な機能関与に焦点をあてること等にて、新たな標的治療となり得る知見を複数得ることが出来た。今後これらの知見を実際の治療薬開発などの臨床応用へと発展させることが重要である。

研究成果の概要(英文)： We analyzed the mechanism of recurrence and malignant transformation of gliomas. The results of epigenetic analysis showed that high expression of IGF2BP3 resulting from passive DNA demethylation is important. Data also showed that active DNA demethylation also contributes to tumor growth via transcription factors such as KLF4.

In the glioma microenvironment, we showed that tumor-associated macrophages (TAMs) are important, and that the cytokine IL-1 β secreted by TAMs induces activation of STAT3 and NF- κ B signaling, which synergistically contribute to glioblastoma growth through the production of IL-6 and CXCL8 as well.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 多様性 再発 悪性化 マルチオミクス解析 エピゲノム 微小環境 免疫

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは最も高頻度の悪性脳腫瘍であり、集学的治療にても制御困難で予後不良であり、新規治療法の開発が切望されている。悪性グリオーマの特徴は他のがんと比較しても、その内部の顕著な多様性であり、ゲノム・エピゲノム変化を伴った多彩な腫瘍クローンによって構成され、これが治療抵抗性の大きな原因となっている。また、免疫に関しても脳内は特殊な環境にあるとされ、これが免疫治療の障害になっているとも考えられている。

研究代表者は、これまでグリオーマ臨床検体を用いた大規模な統合的マルチオミクス・分子プロファイル解析を施行して、グリオーマの多様性の病態を明らかにしてきた。例えば、グリオーマの初発・再発例の比較、単一腫瘍内の複数部位からの採取検体の比較、発生部位の異なるグリオーマ間の比較のため、網羅的分子プロファイルデータを取得し、その統合インフォマティクス解析を施行・検討することで、グリオーマの時間的・空間的な多様性に関して、以下を中心とする種々の知見が明らかとなり報告を行っている。1) 初発・再発悪性転化検体の比較及び腫瘍内複数部位検体の比較では、腫瘍に内在する分子プロファイルの多様性が極めて顕著であり、これが再発時にはさらに大きく変化する(Johnson BE et al, *Science* 2014)。2) IDH 遺伝子変異を有するグリオーマのゲノムワイドのメチル化部位には、悪性転化に伴い脱メチル化が生じ、これが腫瘍進展にも部分的に関与している可能性がある(Nomura M et al, *Sci Rep* 2019)。3) 再発時には遺伝子変異が著明に蓄積した hypermutator phenotype が治療に伴い生じるが、このような再発時の変化は、腫瘍の分子分類による組織型や受けた治療毎に特徴がある(Johnson BE et al, *Science* 2014, Aihara K et al, *Acta Neuropathol Commun* 2017)。4) 再発時にはネオアンチゲン遺伝子発現量の減少を認め、これが免疫逃避機構に関与している可能性が示唆される(Nejo T et al, *Cancer Immunol Res* 2019)。5) 視床・脳幹部・小脳などに発生するグリオーマは、成人大脳に発生するグリオーマとは異なる特徴的な分子プロファイルを有し、それは腫瘍の始原細胞の状態に影響を受けている可能性がある(Aihara K et al, *Neuro Oncol* 2014, Nomura M et al, *Acta Neuropathol* 2017)。

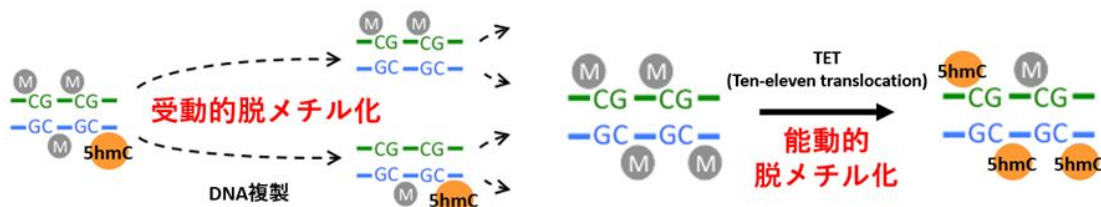
今回、ここまでの我々の研究の延長線上に、特にこれらの発展性のある研究分野に着目し、標的治療開発をはじめとした臨床応用を目指した研究継続を意図して本研究を立案した。

2. 研究の目的

本研究においては、グリオーマ再発・悪性化機構の解明と新規治療戦略の創出を目的として、主に以下 A), B) の二つのテーマを連携して進めることで、目的達成を目指す。

A) 再発・悪性転化に伴うエピゲノム変化の網羅的解析を基にした腫瘍進展機構解明

我々が探求し続けてきた問いである、「グリオーマ悪性転化に伴う 受動的 DNA 脱メチル化、及び、能動的 DNA メチル化修飾の腫瘍進展への関わり」を解明する。



B) 再発・悪性転化に伴うグリオーマ微小環境の経時的変化解析による免疫逃避機構解明

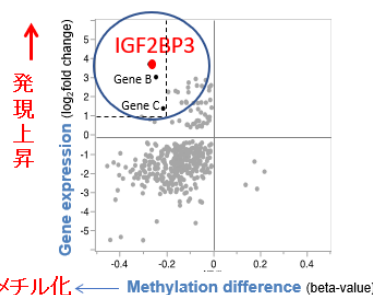
腫瘍細胞と浸潤免疫細胞の相互作用の、臨床検体のオミクス解析と直接的な観察による経時的な比較解析により、「免疫微小環境の経時的変化が、どのように免疫逃避に関わる腫瘍進展に影響を与えるか?」という問いに答えるとともに、腫瘍再発や免疫治療抵抗性の原因となっている免疫逃避機構の解明と、それに対応した治療戦略の創出を行う。

3. 研究の方法

A) 再発・悪性転化に伴うエピゲノム変化の網羅的解析を基にした腫瘍進展機構解明

【受動的 DNA 脱メチル化】

a) 再発悪性転化の際、受動的脱メチル化によって発現上昇している IGF2BP3 分子を含む複数の potential driver genes (右図)につき、腫瘍増殖と関連した機能解析を分子生物学的手法を用いて行うことで、新規治療標的の同定を行うとともに、それらを標的とした治療法開発を動物モデルなどを利用しつつ施行する。



図：受動的脱メチル化で発現上昇する遺伝子

また、b) IGF2BP3 分子機能である RNA 修飾能による N6-メチルアデノシン (m6A) とグリオーマ再発悪性転化との関連を解析する。まずは悪性転化に伴う m6A の変化を観察し、これが IGF2BP3 によりどのように影響を受けるかを検証する。さらに、m6A の変化に伴ない腫瘍増殖を促進する特定の分子を同定し、その分子の腫瘍増殖促進機構の解析を行う。

【能動的 DNA メチル化修飾】

a) 初発・再発検体ペアの網羅的 5hmc 解析の症例数を増やして、これまで同定してきた再発・悪性転化に伴い能動的メチル化変化が生じている領域の validation を行い、さらにバイオインフォマティクス的手法によって、これらを制御している再発・悪性転化にかかわるエピゲノム調節因子を同定する。b) 実際これまでの preliminary な解析からは、これら制御に関わる可能性がある bHLH 型転写因子を特定しており、本研究では、この転写因子が実際に制御領域に結合していることを ChIP-seq 等により確認し、これにより生じている遺伝子発現調整機構を解明する。

B) 再発・悪性転化に伴うグリオーマ微小環境解析

【腫瘍随伴マクロファージの腫瘍再発・悪性化機構への寄与の解明】

腫瘍進展再発に際しての腫瘍随伴マクロファージ (TAM) の免疫逃避制御における腫瘍微小環境での働きを、その経時的発現変化などに着目しつつ解明し、これに対する治療標的分子を同定することを目的とする。そのため、a) 細胞病理学講座と共同にて組織アレイを作成し、初発・再発検体を経時的に観察し、TAM 関連の分子の発現・局在変化を検討することで、再発・悪性転化にともなう免疫微小環境の変化を同定する。b) これまでマルチオミクス解析を行った初発・再発神経膠腫における免疫プロファイルの比較解析に、新たな初発・再発ペアでの解析データを加えつつ、その微小環境に存在する細胞や分子の経時的変化を組織アレイの結果と統合的に解析することで、再発進展に関わる重要な免疫関連分子を特定する。特に CD68 あるいは CD163 等の TAM マーカーと相関する分子に注目する。c) これまでの我々の研究で同定した再発に関わる TAM より分泌される IL-1 などの因子について、腫瘍幹細胞の性質や腫瘍増殖に与える影響を in vitro, in vivo で検証し、細胞相互作用によって惹起される腫瘍増殖機構を解明するとともに、これらに対する新規治療標的分子の開発を行う。

4. 研究成果

本研究は、グリオーマの再発・悪性転化に関連して生じる変化を、主にその多様な分子プロファイルデータの取得を基盤となる研究として施行することで同定し、その結果からグリオーマの悪性化機構や治療抵抗性獲得のメカニズムを解き明かすとともに、これを基にした治療法開発に至ることを目標とした。この目標に対して複数の方向からのアプローチを行ったが、特に、A) 再発・悪性転化に伴うエピゲノム変化の網羅的解析を基にした腫瘍進展機構解明と治療標的の創出、及び、B) グリオーマ微小環境の腫瘍随伴マクロファージの解析を、今回の中心的な研究課題として取り組んだ。

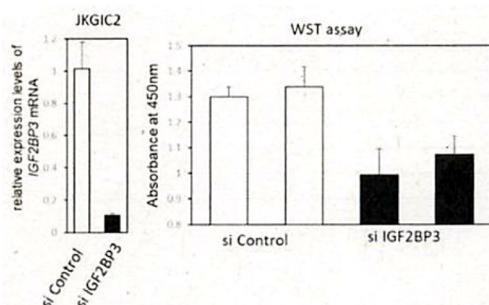
A) 再発・悪性転化に伴うエピゲノム変化の網羅的解析を基にした腫瘍進展機構解明

(1)【神経膠腫悪性転化例抽出のための CDKN2A/B 等の遺伝子異常解析】

近年、CDKN2A/B 遺伝子のホモ欠失が、IDH 変異を有する星細胞腫の悪性転化に関与していることが示された。これに伴い 2021 年に改訂された脳腫瘍 WHO 分類にて CDKN2A/B のホモ欠失が、IDH 変異を有する星細胞腫の悪性度（グレード）診断に必要となった。そのため種々の分子遺伝学的解析を行うに先立ち、これまで保存した検体の IDH 遺伝子変異、染色体 1p/19q ヘテロ接合性喪失、CDKN2A/B の欠失等を、シーケンス、MLPA (multiplex ligation-dependent probe amplification) 法、定量的リアルタイム PCR 法にて解析した。CDKN2A/B の欠失判定においては、MLPA 法と定量的リアルタイム PCR 法において結果に相違があったため、適切な検査条件の検討を行うことで、真の悪性転化症例を抽出した。さらに MLPA 法、定量的リアルタイム PCR 法、MTAP 免疫染色などを組み合わせることで、CDKN2A/B ホモ欠失の症例、及び、片側アレルの欠失の症例を新たに抽出した。また、このように蓄積した臨床症例検体に対し、そのゲノム異常の特徴や、ゲノムワイドなメチル化のプロファイルを、Infinium methylation EPIC アレイ等を用いて解析した。

(2)【受動的 DNA 脱メチル化に関連した IGF2BP3 の機能解析】

プロモーターの能動的 DNA 脱メチル化が悪性化に関連することを先に報告した IGF2BP3 遺伝子について機能解析を継続的に行った。悪性転化した IDH 変異を有する星細胞腫において、IGF2BP3 遺伝子のプロモーターが脱メチル化して発現が上昇することを報告しているが、これに着目したさらなる解析を施行した。神経膠腫のグレードと IGF2BP3 の発現の関連や、IGF2BP は m6A を認識・結合する分子であるため、神経膠腫組織内での IGF2BP3 の発現と m6A の関係を解析した。さらに、IGF2BP3 がグリオーマ腫瘍細胞増殖の関連の解析を行うなどして、グリオーマ悪性転化における IGF2BP3 の役割の検討を行った。

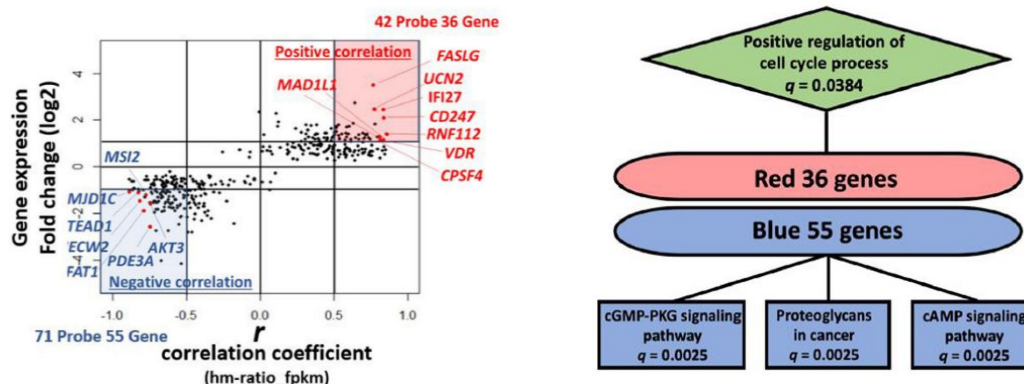


左図:siRNA にて IGF2BP3 の遺伝子発現を抑制することで、WST assay において腫瘍増殖低下を認める

(3)【能動的 DNA メチル化修飾の解析】

我々は、これまでも行ってきた IDH 変異星細胞腫の悪性転化症例におけるヒドロキシメチル化のマルチオミクス統合解析をさらに推進した。元となるデータは、5 組の原発性 / 悪性進行性 IDH 変異星細胞腫であり、5 組を oxidative bisulfite (OxBS) 法と Infinium EPIC メチル化アレイを用いて分析取得したデータのバイオインフォマティクス解析を様々な角度から施行した。EPIC メチル化アレイで解析し、850,000 以上の 5-ヒドロキシメチルシトシン (5hmC) を検出した。ヒドロキシメチル化された CpG は、open sea と intergenic regions に有意に集中しており ($p < 0.001$)、ヒドロキシメチル化された遺伝子は、がんに関連したシグナル伝達経路と有意に関連していた。RNA シークエンシングデータの統合により、有意な遺伝子 91 個が同定された。機能解析の結果、正の相関を持つ遺伝子は細胞周期の促進に関与しており、負の相関を持つ遺伝子は抗腫瘍機能に関連することが示唆された。神経膠腫に関する TCGA 臨床データの解析は、これらと同様の結果を示した。

これら遺伝子の motif enrichment 解析は、転写因子 KLF4 の関与の可能性を示唆した。これらの知見は、神経膠腫悪性転化における領域特異的 DNA ヒドロキシメチル化の重要性を示したものと考える。これらの成果を論文発表行った (Hana T, et al. Region-specific DNA hydroxymethylation along the malignant progression of IDH-mutant gliomas. Cancer Sci. 115(5):1706-1717, 2024)

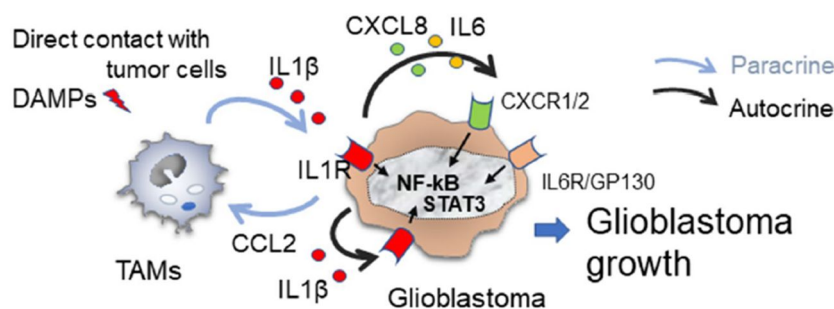


(上図:(左)神経膠腫悪性転化例におけるヒドロキシメチル化と遺伝子発現の相関。(右)相関を示す遺伝子群の機能。Hana T, et al. Cancer Sci 2024 より引用)

B) 再発・悪性転化に伴うグリオーマ微小環境の解析

(4) 【腫瘍随伴マクロファージの腫瘍再発・悪性化機構への寄与の解明】

グリオーマ微小環境変化の免疫関連解析においては、微小環境に存在する腫瘍随伴マクロファージ (tumor-associated macrophage: TAM) の機能解析を行った。特に腫瘍や TAM より分泌されるサイトカイン IL-1 により、グリオーマ細胞の細胞増殖が 3 次元培養下にて引き起こされることを確認し、その詳細な機序解明のための解析を継続して施行した。その結果、リン酸化受容体チロシンキナーゼアレイと RNA シークエンシングにより、IL-1 は STAT3 と NF- B シグナルの活性化を誘導することが示された。IL-1 で刺激された膠芽腫細胞は、IL-6 と CXCL8 の産生を誘導し、これらの産生は、STAT3 活性化と NF- B シグナル伝達を介して、相乗的に膠芽腫の増殖を促進した。免疫組織化学的には、IL-1 の発現が特に壊死周囲領域の TAM で見られた。これらの結果は、IL-1 が抗膠芽腫治療の有用な標的分子である可能性を示唆している。



(左図 : IL-1 を介した TAM と GBM の相互作用の仮説シエーマ。Kai K, et al. Hum Cell 2022 より引用)

このように、STAT3/NF- B 経路が重要であることを示し、これらの成果を論文発表行った (Kai K, et al. Macrophage/microglia-derived IL-1 induces glioblastoma growth via the STAT3/NF- B pathway. Hum Cell. 35(1):226-237, 2022)

また、特に膠芽腫において、腫瘍の悪性度に従いに発現上昇する血中蛋白質 X が、TAM を介して腫瘍の増殖に関わっていることを示すとともに、この作用が血液脳関門の破綻とも関連していることを検証した。また、この蛋白質 X は、正常血液と比較して腫瘍患者血液中での上昇を認めており、グリオーマの腫瘍マーカーとして利用できることが期待された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計20件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Hana T, Mukasa A, Nomura M, Nagae G, Yamamoto S, Tatsuno K, Ueda H, Fukuda S, Umeda T, Tanaka S, Nejo T, Kitagawa Y, Yamazawa E, Takahashi S, Koike T, Kushihara Y, Takami H, Takayanagi S, Aburatani H, Saito N.	4. 巻 115
2. 論文標題 Region specific DNA hydroxymethylation along the malignant progression of <scp>IDH</scp> mutant gliomas	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1706 ~ 1717
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.16127	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13件（うち招待講演 12件 / うち国際学会 3件）

〔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	菰原 義弘 (Komohara Yoshihiro) (40449921)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	永江 玄太 (Nagae Genta) (10587348)	東京大学・先端科学技術研究センター・特任准教授 (12601)	
研究分担者	田中 將太 (Tanaka Shota) (80643725)	東京大学・医学部附属病院・講師 (12601)	
研究分担者	篠島 直樹 (Shinojima Naoki) (50648269)	熊本大学・病院・講師 (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
---------	---------