

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 9 月 24 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09380

研究課題名(和文) 網羅的メチル化解析で同定された頭蓋内高悪性度胚細胞腫治療標的候補分子群の機能解析

研究課題名(英文) Functional analysis of oncogenic microRNAs identified by comprehensive methylation analysis in the regulation of oncogenic roles of central nervous system germ cell tumors

研究代表者

富山 新太(Tomiya, Arata)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 脳神経外科・講師)

研究者番号：40385810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：我々は難治性である中枢神経非ジャーミノーマ胚細胞腫瘍(NGGCT)に対する新規治療標的/治療薬を探索すべくNGGCT症例の網羅的メチル化解析を行った結果、NGGCTに特異的に関与する3つのマイクロRNAを同定し、さらなる網羅的機能解析にて、これらのマイクロRNAは共通してミトコンドリア依存的細胞死の誘導する分子シグナル群を負に制御していることを見出した。ミトコンドリア依存的細胞死の誘導剤(分子標的薬)による処理をヒトNGGCT培養細胞群に行ったところ、従来の抗腫瘍薬と比較し効率良く細胞死を誘導することが明らかとなったことから、これらの薬剤群はNGGCTの新規治療薬となる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

中枢神経胚細胞腫瘍は特に日本を含む東アジア地域に多く発生することがこれまで知られているが、その中でも特に高悪性度群である中枢神経非ジャーミノーマ胚細胞腫瘍(NGGCT)難治性であり未だ有効な治療法が存在していない。また、その発生頻度の少なさから新規治療標的に関する研究も殆ど進んでいないのが現状であった。この度の我々の研究成果、すなわちこれまで有効な治療法の存在しなかった難治性NGGCTに対する全く新しい分子標的薬の世界に先駆けた発見は、世界の中でも特に我々日本を含む東アジア地域の将来的な実医療に大きく貢献する可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：To screen the novel therapeutic targets against refractory central nervous system (CNS) non-germinomatous germ cell tumors (NGGCTs), we analyzed our cohort of CNS germ cell tumor cases by comprehensive methylation analysis. As a result, we identified three microRNAs (miRs) which were suggested to specifically regulate the malignancy of NGGCTs. We further analyzed the function of these miRs by comprehensive analysis and discovered that these miRs commonly negatively regulated the mitochondria dependent cell death signaling. Based on these findings, we treated human NGGCT cell lines by the agonists of mitochondria dependent cell death and found that these agonists triggered cell death against the NGGCT cells more effectively compared with conventional DNA damaging agents. As a conclusion, it is suggested that the agonists of mitochondria dependent cell death would be novel therapeutic agents against refractory CNS NGGCTs.

研究分野：腫瘍学

キーワード：中枢神経系胚細胞腫瘍 非ジャーミノーマ性胚細胞腫瘍 マイクロRNA 新規分子治療標的開発

## 1. 研究開始当初の背景

中枢神経胚細胞腫瘍(CNSGCT)は稀ではあるものの世界的にみて特に本邦を含む東アジア地域で多く発症する頭蓋内悪性腫瘍群であるが、その中でも高悪性度群である非ジャーミノーマ胚細胞腫(NGGCT)に対する有効な治療法は未だ存在しない。また、その発生頻度の少なさから新規治療標的に関する研究も殆ど進んでいないのが現状であった。従って、NGGCTに対する新規治療薬開発は我々にとって急務であると考えられる。

## 2. 研究の目的

我々が2012年に設立し世界有数の症例数を保有するAll JapanのGCT症例バンクであるiGCT consortiumに集められたiGCTサンプル群に対し、特に近年発がんメカニズムとして注目されているメチル化異常に着目して網羅的解析を行い、NGGCTに特異的に関与しているマイクロRNA(miR)の抽出・機能解析を行うことによりNGGCTに対する新規治療標的/治療薬の同定を試みた。

## 3. 研究の方法

iGCTコンソーシアムに集積されたおよそCNSGCT症例サンプルのうち約50サンプルに対し網羅的メチル化アレイ解析を行い、その結果から導出される分子として、今回は特に低悪性度GCT群と比較しNGGCT群にて特異的に高発現を認めるマイクロRNA(miR)に注目して抽出を行った。候補miR群の抽出後、これらのヒトNGGCT細胞株(Tcam2細胞(seminoma/embryonal carcinoma mix)、YST1細胞(yolk sac tumor; 我々が国立がん研究センターにて樹立)における恒常発現導入株を作成し、マイクロアレイによる網羅的発現解析を施行した。その結果から、これらのmiRによって特異的に制御される腫瘍原性をとなり得る可能性のある分子(シグナル)を抽出し、それらに対する活性剤/阻害剤を用いてヒトNGGCT細胞株に対する抗腫瘍効果をin vitro/in vivoにて確認した。

## 4. 研究成果

(1) 上述の網羅的メチル化アレイ解析の結果、特にNGGCT症例で発現上昇を認める3つのmiR(miR-A/B/C(仮))を同定した。続いて、これらのmiRを恒常発現ベクターにクローニングしヒトNGGCT培養細胞株であるTcam2細胞ならびにYST1細胞にて恒常発現させ(発現はセレクションの後にPCRで確認)、作成したそれぞれの細胞株のRNAを抽出後に、正常のコントロールである市販のヒト正常アストロサイトならびにヒト正常繊維芽細胞より抽出されたRNAとともにRNAシーケンスによる網羅的解析を行った。

(2) (1)の結果、それぞれの分子シグナルによって制御される様々な分子(シグナル)のうち、特に今回我々は3つのmiRによって共通に制御されるものとして、アポトーシス促進性Bcl-2ファミリータンパク質群に属する分子群の発現低下を認めた。また、RNAシーケンスのみならず、前述の各細胞株(ならびに各コントロール細胞群)のRNAのqRT-PCRによる解析、ならびに細胞ライセートのウエスタンブロットによる解析でも3つのmiRは複数のアポトーシス促進性Bcl-2ファミリータンパク質群の発現を抑えており、その結果NGGCTの放射線や抗腫瘍薬に対する治療耐性を獲得している可能性が想起された。

(3) (2)の結果から、続いて我々はミトコンドリアBcl-2ファミリータンパク質依存的な細胞死の誘導剤、即ちアポトーシス促進性Bcl-2ファミリータンパク質群の拮抗分子であるアポトーシス抑制性Bcl-2ファミリータンパク質群(ex. Bcl-2, Bcl-x1, Mcl-1)の阻害剤がNGGCT細胞

群に対し細胞死を効率的に誘導する効果があると予想し、それらの効果の検証を各NGGCT細胞株において行った。具体的にはBroad spectrum であるアポトーシス抑制性Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤 2 剤を用い、それぞれを前述の細胞群に対して *in vitro* で投与したところ、処理後48 時間後のDAPI/Propidium iodide による細胞 2 重染色後の蛍光顕微鏡下での撮像 細胞死定量にて、各単剤の処理 (0.1~10  $\mu$ M 濃度下で) のみで濃度依存的に細胞死が効率的に誘導される (30~75 %) ことを確認した。この時、正常組織由来培養細胞群 (市販のヒト正常アストロサイトならびにヒト正常繊維芽細胞) では同処理にてNGGCT の場合と比較し1/3 程度の細胞死しか誘導されなかった (5~26%) ことから、これら 3 つのmiR を発現したNGGCT細胞は特異的にアポトーシス抑制性Bcl-2ファミリータンパク質群阻害剤に感受性がある可能性が示唆された。この際に、既存のNGGCT の治療薬である抗がん剤 (CDDPならびにEtoposide) は、同細胞群に対し30~300  $\mu$ Mの濃度下で処理後48 時間後に5~30 %の細胞死しか誘導しなかったことから、今回用いたアポトーシス抑制性Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤群はNGGCT細胞群に対しより効率的な殺傷能力を有する可能性が示唆された。

(4) NGGCT 細胞群に対し、アポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤群による阻害剤処理群の処理を行った際にウエスタンブロットにてアポトーシス誘導経路の活性化、即ち caspase-3 の切断ならびに PARP の切断が確認された。また、pan-caspase 阻害剤の併用によって細胞死がほぼ完全に抑制されたことから、NGGCT 細胞におけるポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤による細胞死はアポトーシスである可能性が示唆された。また、同条件下にてアポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤処理細胞群においてはアポトーシス促進性 Bcl-2 ファミリータンパク質でありプログラム細胞死のマスターレギュレーターである Bax ならびに Bak の活性化、すなわちそれらの多量体形成が、*in vitro* crosslinking を併用したウエスタンブロット方で確認された。さらに、同 NGGCT 細胞に対して Bax ならびに Bak のノックダウンを同時に行ったところ、アポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤による細胞死はほぼ完全に抑制された。さらに、コントロールとして用いている市販のヒト正常アストロサイトならびにヒト正常繊維芽細胞に於いてはアポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤処理によるアポトーシス誘導経路の活性化ならびに Bax/Bak の活性化は NGGCT 細胞群と比較し 1/3 以下程度の強度でしか生じていなかったことから、アポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤による NGGCT 細胞の細胞死は Bcl-2 ファミリータンパク質依存性に誘導されることが明らかとなった。

(5) 最後に *in vivo* での治療モデルの検証として、免疫不全マウスの頭蓋内 NGGCT モデルにおけるアポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤の効果を確認するために、ヌードマウスにおける NGGCT による頭蓋内腫瘍モデルの作成ならびにアポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤の全身投与における効果の判定を計画した。こちらに関しては、アポトーシス抑制性 Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤群の髄液移行性の問題から、現在も腫瘍作成後の同薬剤群の薬剤投与条件の検討中であり、今後も引き続き実験条件の詳細な検討を行い、それが確立されてうえで最終的な薬効試験を行う必要があると考えられた。

(6) 以上の結果から、今回のCNSGCTサンプル群の網羅メチル化解析によるmiRのスクリーニングの結果、miRによって特定のアポトーシス促進性Bcl-2 ファミリータンパク質群の発現が抑制され、その結果NGGCTが治療耐性を獲得している可能性が示唆された。また、その結果少なくとも *in vitro* でのアポトーシス抑制性Bcl-2 ファミリータンパク質群阻害剤群がNGGCTに対する新規治療薬となる可能性が示唆された。In vivoでの治療モデルの検証は今後も継続が必要ではあるものの、この度の我々の研究成果、すなわちこれまで有効な治療法の存在しなかった難治性NGGCT

に対する全く新しい分子標的薬の世界に先駆けた発見は、世界の中でも特に我々日本を含む東アジア地域の将来的な実医療に大きく貢献する可能性があると考えられた。

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 Sonehara K, Kimura Y, Nakano Y, Ozawa T, Takahashi M, Suzuki K, Fujii T, Matsushita Y, Tomiyama A, Kishikawa T, Yamamoto K, Naito T, Suzuki T, Yamaguchi S, Miwa T, Sasaki H, Kitagawa M, Ohe N, Fukai J, Ogiwara H, Kawamura A, Miyawaki S, Matsuda F, Kiyokawa N, Ichimura K, Nishikawa R, Okada Y, Terashima K	4. 巻 13
2. 論文標題 A common deletion at BAK1 reduces enhancer activity and confers risk of intracranial germ cell tumors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Nature Communications	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） 10.1038/s41467-022-32005-9	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3件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 富山新太
2. 発表標題 Keynote Lecture <Research> 超・研究入門 脳腫瘍研究.
3. 学会等名 第149回 一般社団法人日本脳神経外科学会関東支部学術集会.（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Takashi FUJII, Yoshitaka NARITA, Yoshinao ODA, Akihide KONDO, Kojiro WADA, Koichi ICHIMURA, Arata TOMIYAMA
2. 発表標題 BCL2 Dependent Pathway may be Novel Treatment Target for CNS Non-Germinomatous Germ Cell Tumors
3. 学会等名 第40回 日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Keita Terashima, Kyuto Sonehara, Yui Kimura, Yoshiko Nakano, Tatsuya Ozawa, Meiko Takahashi, Kenji Suzuki, Takashi Fujii, Yuko Matsuhita, Arata Tomiyama, et. al.
2. 発表標題 GENOME-WIDE ASSOCIATION STUDY OF INTRACRANIAL GERM CELL TUMORS: A COMMON DELETION AT BAK1 ATTENUATES THE ENHANCER ACTIVITY AND CONFERS RISK FOR THE BRAIN TUMORS IN CHILDREN ADOLESCENTS AND YOUNG ADULTS
3. 学会等名 The 2023 Pediatric Neuro-Oncology Research Conference（国際学会）
4. 発表年 2023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	里見 介史  (Satomi Kaishi)  (10633977)	杏林大学・医学部・講師   (32610)	
研究 分担者	市村 幸一  (Ichimura Koichi)  (40231146)	杏林大学・医学部・特任教授   (32610)	

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