

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：17201
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K09101
研究課題名（和文）脳腫瘍のH3K27M変異をターゲットにした新規治療法の開発

研究課題名（英文）Development of new therapy for H3K27M mutant glioma

研究代表者
阿部 竜也（Abe, Tatsuya）

佐賀大学・医学部・教授

研究者番号：40281216
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫が治療抵抗性を獲得する原因の一つとして、脳幹など中心部位に発生する腫瘍は、手術も困難であり極めて難治の腫瘍である。その原因遺伝子としてH3F3A遺伝子のK27M変異を有している。そこで、我々が患者検体から樹立したK27M異常を有する幹細胞株（Saga027）を用いて検討したが、in vitroで既存の治療法では全く効が立たず極めて治療抵抗性であった。近年ドーパミンD2受容体（DRD2）拮抗薬であるONC201の有用性が報告され検討してみたが治療抵抗性であった。そこで、ある種のメチル化阻害剤の使用方法を工夫すると、有効な可能性を見出している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではこれらH3K27Mを標的とする薬剤を用いた治療効果を検討するとともに、ONC201を中心とした薬剤耐性のメカニズムを解析し、分子標的薬を併用することでより効果的な治療法の開発を試みた。しかし、我々が確立した細胞株Saga027では、十分な効果が得られなかった。そこで、ある種のメチル化阻害剤の中で、有効な可能性のあるコンパウンドを見出したことは今後の研究の発展が期待できるものと考えられた。

研究成果の概要（英文）：Midline glioma, such as Diffuse Intrinsic Pontine glioma (DIPG), is unresectable and shows treatment resistance. Causative gene of DIPG was reported to be K27Mutation of H3F3A gene. Therefore, we isolated and established Saga 027 stem cells, which harbors the histone H3.3 Lys 27-to-methionine (K27M) mutation and can support research and drug development efforts targeting DIPG. Recently, it is reported that DRD2 is a G protein-coupled receptor that promotes tumor growth and has emerged as a therapeutic target for gliomas and other tumors that overexpress this receptor. ONC201 is a selective antagonist of dopamine receptor D2/3 (DRD2/3) that crosses the blood-brain barrier. We examined the effect of ONC201 for Saga 027 cells. However, these cells showed resistant against ONC201. Next, we examined various methylation inhibitors, and found effective usage of some drugs.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：DIPG K27M ONC201

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫の発生には IDH 変異が関与しており、IDH 変異によって oncometabolite と呼ばれる 2-ヒドロキシグルタル酸(2-HG)が産生され腫瘍化すると考えられている。2-HG はゲノム DNA 脱メチル化酵素である ten-eleven translocation (TET)の活性を低下させる。これまでの研究で TET 蛋白は正常脳に発現しているが、がん細胞では 2-HG の蓄積により TET 酵素活性が低下し、ゲノム DNA のメチル化異常が促進されることから、tumor suppressor gene としての機能を有していることが報告されている。

一方、2021 年の脳腫瘍 WHO 分類第 5 版でも、diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant という分子診断の腫瘍群が規定されている。H3K27M 変異を有する腫瘍は小児に発生するびまん性内在性橋神経膠腫 diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG)の 70-90%に生じることが報告されている。H3K27M 変異は H3K27 のトリメチル(H3K27me3)を減少させ、腫瘍化に関与している。近年、IDH 野生型細胞に R132 変異を遺伝子導入すると、H3K27me3 が増加することが示された。ES 細胞の分化において、分化制御遺伝子のプロモーター領域に、H3K27me3 (転写抑制)と H3K4me3 (転写活性化)が共存する“bivalent domain”が形成され、その両者のバランスにより分化制御遺伝子の発現が制御されている。TET 蛋白はこのヒストン修飾に関与している分子でもある(*Verma, Nature genetics 50; 83-95, 2017*)。

エピゲノム制御に関わるものとして、DNA メチル化とヒストン修飾が重要である。ヒストンテールはエピゲノム制御に重要な領域であり、その変異は広範なエピゲノム異常を引き起こすことが知られており、IDH 変異で生じる DNA メチル化と、H3K27M 変異で生じるメチル化プロファイルでは特徴が異なっている。また、さまざまながんで、特に重要な役割を果たしているがん遺伝子では、変異型アレルの増幅もしくは野生型アレルの欠失により不均衡が生じて変異型アレルが優位になる「Mutant Allele Specific Imbalance (MASI)」という現象がおきる。これは H3F3A K27M 変異でも観察され、MASI がある症例は低頻度群と比較して不良な経過をたどることが分かってきた (*Maeda, Acta Neuropathol Commun. 2020*)。前述したように H3K27M 変異は、H3K27 のトリメチル化 (H3K27me3) を著明に減少させるが、このトリメチル化を行うのはポリコムファミリーであり、ヒストンメチル基転移酵素である EZH2 を含む polycomb repressive complex2 (PRC2)である。このカスケードに関与する様々な遺伝子の異常が複雑に絡み合って腫瘍が形成されているが、このような異常なエピゲノム状態を修復することで、DIPG, H3K27M 変異型腫瘍の治療に結び付けることも期待できる。橋詰らは H3K27 を標的とする脱メチル化酵素である JMJD3 阻害剤は H3K27 のメチル化を増加させることで、H3K27M 変異を有する細胞の増殖を抑制した (*Nature Med 20, 1394-1396, 2014*)。一方、逆に残存している H3K27 のメチル化に関与する PRC2 活性を EZH2 阻害剤などで抑制することの方が治療に結び付く可能性も報告されている (*Mohammad F, Nature Med 23, 483-492, 2017*)。更には H3K27M と共有する H3K27ac を認識して機能するプロモドメイン蛋白の阻害剤により、活性化していた転写抑制に導くことで治療効果も期待されている (*Piunti A, Nature Med 23, 493-500, 2017*)。このように、候補となる阻害剤は幾つもあるが、決定的な治療法は定まっていないとも言える。

成人再発 H3K27M 変異神経膠腫患者に対するドーパミン D2 受容体 (DRD2) 拮抗薬である ONC201 単剤療法の有効性、安全性を検証した臨床試験の結果が発表された。

ONC201 は、DRD2 拮抗作用に加え mitochondrial caseinolytic protease P (ClpP) 作動薬でもあり、腫瘍細胞をアポトーシスへ導く低分子化合物である。成人再発 H3K27M 変異神経膠腫患者に対して 1 週に 1 回 ONC201 を投与したところ、ONC201 単剤療法は忍容性も良好で、腫瘍縮小効果も見られた。また、臨床では腫瘍細胞でドーパミン D5 受容体の発現が高いと ONC201 への反応性が悪いことも報告されている。そこで、我々の研究室で保有する様々な遺伝子プロファイルを持つ脳腫瘍幹細胞や細胞株を用いて既存治療薬や ONC201 での増殖抑制効果を検討した。その結果 H3K27M 変異を有する SAGA027 はあらゆる既存の治療薬に抵抗を示した。ONC201 を様々な細胞で検討したところ、細胞の特性によって感受性が異なることが分かった。

2. 研究の目的

ヒストン脱メチル化酵素 (KDM) は、ヒストンのメチル化リシン残基を脱メチル化する反応を触媒する酵素で、エピジェネティックに遺伝子の発現を制御している。KDM は、フラビン依存性の脱メチル化酵素 (LSD1) と Jumonji C-domain を含む脱メチル化酵素 (JHDM) の二つのファミリーに分類される。LSD1 および JHDM のアイソザイムのいくつかは、がんなどの病態に関与することも報告されており、次世代エピジェネティックドラッグとして期待されている。近年、図 2 に示すように LSD1・HDAC 阻害剤の一種である Corin が、クロマチンの re-programing を生じ、DIPG 細胞の分化を誘導し、増殖を抑制する可能性が報告されている (*Anastas JN, Cancer Cell, 36, 528-544, 2019*)。

本研究では、特にヒストン H3K27M 変異幹細胞株を用いて、脳腫瘍幹細胞のエピジェネティクス機構の解明を行い、脳腫瘍幹細胞の分化誘導療法応用へと展開するための研究基盤を確立することで、新たな治療法の開発を目指したい。本研究は、DIPG の原因である H3K27M 変異腫瘍幹細胞に対する新規治療法開発へと展開するため、最も有効な分子標的治療の研究基盤を確立することが目的である。我々は、患者検体から腫瘍幹細胞株を樹立する方法を確立しており、これまでにさまざまな遺伝子変異を有する脳腫瘍幹細胞株を樹立している。保有している腫瘍幹細胞株には、IDH 変異型幹細胞株やヒストン H3K27 変異型幹細胞株も含まれる。これらの細胞株を用いて、腫瘍幹細胞がどのような機序でエピジェネティックな変化をもたらすのか、薬剤感受性・耐性のメカニズム、腫瘍の分化や増殖に関わる遺伝子をコントロールしているのか解明したい。

3. 研究の方法

大規模なゲノム解析が行われた結果、発見された神経膠腫における IDH 変異は、それまで病理組織学をベースに分類させていた WHO 脳腫瘍分類の概念を、分子生物学をベースに腫瘍を分類するという概念に変更させるほどのインパクトがあった。また、ヒストン蛋白の N 末端領域であるヒストンテールは転写調整に重要な働きを有するが、このヒストンテールのアミノ酸が、メチル化やアセチル化といったさまざまな化学的変化を受けることが、神経膠腫細胞の増殖に関与していることも、大規模なエピゲノム解析によって見つかった。特に、ヒストン H3 の変異、H3K27M 変異が分子診断にあげられ新たに WHO 脳腫瘍分類に加えられた。神経膠腫における H3K27M 変異の意義については、精力的に研究が行われているが、IDH 変異型腫瘍細胞では、H3K27 トリメチル化が上昇することがわかっている。

我々はこれまでに、腫瘍の代謝に関連する IDH 遺伝子と、エピゲノム異常の両者を橋渡す位置に存在する TET という分子に着目していた。低酸素条件下では腫瘍細胞の TET 活性が

さがり、ゲノムが 高メチル化されがん抑制遺伝子の発現が低下する。この DNA メチル化に加え、抑制性ヒストン修飾である H3K27me3 が共存することで、強固な遺伝子不活機構として働いている可能性がある。一方で、H3K27M 変異に対しては、治療が困難であることが知られているが、近年有効な治療法として ONC201 療法が注目を集めている。しかし全ての患者さんに有効ではなく、ドーパミン D5 受容体の発現が感受性の関与に示唆されることから、何らかの耐性のメカニズムが働いている。このような耐性の研究を行うと同時に、無効例に対する新たな治療法の開発は次世代の治療を考える上で極めて重要な課題である我々はすでに、さまざまな遺伝子変異を有する脳腫瘍幹細胞株を樹立している。保有している腫瘍幹細胞株には、IDH 変異型幹細胞株やヒストン H3K27 変異型幹細胞株も含まれる。そこで、これらの細胞株を用いて、本研究では、薬剤感受性や耐性機構を解明し、作用機序との異なる分子標的薬との併用効果など新たな切り口での研究を行い、治療の突破口を究明したい。

4. 研究成果

さまざまな幹細胞株に対して、分子標的薬、ONC201 を作用させ治療効果について検討した。しかしながら、H3K27M 変異を有する Saga027 細胞株に有効な治療法を見出すには至らなかった。一方で DNA メチル化阻害剤の中で、有効な新規阻害剤を見出すことができた。現在有効性が期待できる薬剤のマウス生体内での効果について検証中である。

Aoki K, Suzuki H, Yamamoto T, Yamamoto KN, Maeda S, Okuno Y, Ranjit M, Motomura K, Ohka F, Tanahashi K, Hirano M, Nishikawa T, Shimizu H, Kitano Y, Yamaguchi J, Yamazaki S, Nakamura H, Takahashi M, Narita Y, Nakada M, Deguchi S, Mizoguchi M, Momii Y, Muragaki Y, **Abe T**, Akimoto J, Wakabayashi T, Saito R, Ogawa S, Haeno H, Natsume A Mathematical modeling and mutational analysis reveal optimal therapy to prevent malignant transformation in grade II IDH-mutant gliomas. *Cancer Research*, 2021 Sep 15;81(18):4861-4873, 2021 doi: 10.1158/0008-5472.CAN-21-0985.

Nakahara Y, Ito H, Namikawa H, Furukawa T, Yoshioka F, Ogata A, Masuoka J, **Abe T** A Tumor Suppressor Gene, N-myc Downstream-Regulated Gene 1 (NDRG1), in Gliomas and Glioblastomas *Brain Sci.* 2022;12(4):473, 2022 doi: 10.3390/brainsci12040473.

Muragaki Y, Ishikawa E, Maruyama T, Nitta M, Saito T, Ikuta S, Komori T, Kawamata T, Yamamoto T, Tsuboi K, Matsumura A, Nakamura H, Kuroda J, **Abe T**, Momii Y, Saito R, Tominaga T, Tabei Y, Suzuki I, Arakawa Y, Miyamoto S, Matsutani M, Karasawa K, Nakazato Y, Maebayashi K, Hashimoto K, Ohno T. A multicenter, randomized, placebo-controlled phase IIb trial of an autologous formalin-fixed tumor vaccine for newly diagnosed glioblastomas *J Neurosurg.* 2023 Jan 20:1-11.

Yamashita S, Takeshima H, Hata N, Uchida H, Shinjima N, Yokogami K, Nakano Y, Sakata K, Fudaba H, Enomoto T, Nakahara Y, Ujifuku K, Sugawara K, Iwaki T, Sangatsuda Y, Yoshimoto K, Hanaya R, Mukasa A, Suzuki K, Yamamoto J, Negoto T, Nakamura H, Yasutomo Momii Y, Fujiki M, Abe H, Masuoka J, **Abe T**, Matsuo T, Ishiuchi S, Kyushu Neuro-Oncology Study Group

Clinicopathologic analysis of pineal parenchymal tumors of intermediate differentiation: a multi-institutional cohort study by the Kyushu Neuro-Oncology Study Group *Journal of Neuro-Oncology* 162(2):425-433.2023

Ikeda S, Yakushiji Y, Tanaka J, Nishihara M, Ogata A, Eriguchi M, Ono S, Kosugi M, Suzuyama K, Mizoguchi M, Shichijo C, Ide T, Nagaishi Y, Mori H, Ono N, Yoshikawa M, Ide K, Minagawa H, Kawamoto K, Katsuki Y, Irie H, **Abe T**, Hara H Hypertension, cerebral Amyloid, aGe Associated Known neuroimaging markers of cerebral small vessel disease Undertaken with stroke REgistry (HAGAKURE) prospective cohort study: baseline characteristics and association of cerebral small vessel disease with prognosis in an ischemic stroke cohort *Frontiers in Aging Neuroscience, section Alzheimer's Disease and Related Dementias* 2023 Mar 2;15:1117851. doi: 10.3389/fnagi.2023.1117851.

Houkin K, Osanai T, Uchiyama S, Minematsu K, Taguchi A, Maruichi K, Niiya Y, Asaoka K, Kuga Y, Takizawa K, Haraguchi K, Yoshimura S, Kimura K, Tokunaga K, Aoyama A, Ikawa F, Inenaga C, **Abe T**, Tominaga A, Takahashi S, Kudo K, Fujimura M, Sugiyama T, Ito M, Kawabori M, Hess DC, Savitz SI, Hirano T; TREASURE Study Investigators. Allogeneic Stem Cell Therapy for Acute Ischemic Stroke: The Phase 2/3 TREASURE Randomized Clinical Trial *JAMA Neurol* 2024 Feb 1;81(2):154-162. doi: 10.1001/jamaneurol.2023.5200.

Sakamoto Y, Naruo1 S, Ozaki T, Tahata1 S, Fujimoto T, **Abe T** Immediate Effects, Detailed Clinical Outcomes and Prognostic Factors of Chemonucleolysis Using Condoliase for Lumbar Disc Herniation *Neurol Med Chir (Tokyo)*. 2024 May 8. doi: 10.2176/jns-nmc.2024-0009.

OgataA, Ogasawara K, Nishihara M, Takamori A, Furukawa T, Ide T, Ito H, Yoshioka F, Nakahara Y, Masuoka J, Koike H, Irie H, **Abe T** Subarachnoid iodine leakage on dual-energy computed tomography after mechanical thrombectomy is associated with malignant brain edema *J Neurointerv Surg*. 2024 Mar 13:jnis-2023-021413. doi: 10.1136/jnis-2023-021413.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakahara Yukiko, Ito Hiroshi, Namikawa Hiroki, Furukawa Takashi, Yoshioka Fumitaka, Ogata Atsushi, Masuoka Jun, Abe Tatsuya	4. 巻 12
2. 論文標題 A Tumor Suppressor Gene, N-myc Downstream-Regulated Gene 1 (NDRG1), in Gliomas and Glioblastomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Brain Sciences	6. 最初と最後の頁 473 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/brainsci12040473	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 -
1. 著者名 Masuoka Jun, Yoshioka Fumitaka, Furukawa Takashi, Koguchi Motofumi, Ito Hiroshi, Inoue Kohei, Ogata Atsushi, Nakahara Yukiko, Abe Tatsuya	4. 巻 17
2. 論文標題 Microsurgical Approach for True Posterior Communicating Artery Aneurysms: Literature Review and Illustrative Case	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Asian Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 156 ~ 164
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1055/s-0042-1750840	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 MASUOKA Jun, YOSHIOKA Fumitaka, ITO Hiroshi, OGATA Atsushi, NAKAHARA Yukiko, ABE Tatsuya	4. 巻 9
2. 論文標題 Cervical Cord Compression by Aberrant Vertebral Artery Presenting with Neuralgic Pain: A Case Report	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 313 ~ 317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2176/jns-nmc.2022-0189	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 下川 尚子, 高守 史子, 吉岡 史隆, 有水 弘太, 田尻 涼, 川口 淳, 石井 一夫, 角間 辰之, 古川 恭治, 阿部 竜也, 森岡 基浩	4. 巻 54
2. 論文標題 National Databaseオープンデータおよび外来サンプリングデータ解析で明らかにする本邦の小児鎮静MRI検査の実態	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 脳と発達	6. 最初と最後の頁 323-329
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 Aoki K, Suzuki H, Yamamoto T, 他	4. 巻 81
2. 論文標題 Mathematical Modeling and Mutational Analysis Reveal Optimal Therapy to Prevent Malignant Transformation in Grade II IDH-Mutant Gliomas.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Res.	6. 最初と最後の頁 4861-4873
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1158/0008-5472.CAN-21-0985	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 -

1. 著者名 Inoue K, Momozaki A, Furukawa T, Yoshioka F, Ogata A, Masuoka J, Abe T.	4. 巻 12
2. 論文標題 Case of de novo cerebral microbleeds in ischemic-type pediatric moyamoya disease	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surg Neurol Int.	6. 最初と最後の頁 284
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.25259/SNI_305_2021.	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 Yoshioka F, Shimokawa S, Masuoka J, Inoue K, Ogata A, Abe T.	4. 巻 37
2. 論文標題 Elimination of the check-valve mechanism of the sacral Tarlov cyst using a rotation flap technique in a pediatric patient: technical note.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Childs Nerv Syst	6. 最初と最後の頁 1741-1745
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00381-020-05029-z.	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 伊藤 寛, 中原 由紀子, 並川 裕貴, 増岡 淳, 阿部 竜也
2. 発表標題 Myc を標的とした髄芽腫の新規治療の開発研究.
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

〔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	増岡 淳 (Masuoka Jun) (50359949)	佐賀大学・医学部・准教授 (17201)	
研究分担者	中原 由紀子 (Nakahara Yukiko) (50380770)	佐賀大学・医学部・講師 (17201)	
研究分担者	伊藤 寛 (Ito Hiroshi) (50795375)	佐賀大学・医学部・助教 (17201)	

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