

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462177

研究課題名(和文) 神経膠腫およびその幹細胞のエピジェネティクス統合解析と新規診断、治療への応用

研究課題名(英文) Genome-wide epigenetic analysis of glioma and glioma stem-like cells

研究代表者

齊藤 邦昭 (SAITO, KUNIAKI)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：50446564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫のメチル化網羅的解析より同定した神経膠腫悪性転化メチル化マーカーの検証をMassARRAYを用いて行った。Infiniumの結果と高い相関が得られ、多数の臨床検体や神経膠腫細胞株、脳腫瘍幹細胞を用いて検証を行った。脳腫瘍幹細胞におけるメチル化網羅的解析を行い、神経膠腫の悪性転化に伴い脱メチル化するプロファイルが脳腫瘍幹細胞のプロファイルと類似していることを示した。また、悪性転化に伴い脱メチル化する部位は、幹細胞においてH3K4me3マーカー、H3K27me3マーカーが有意に少ないことが示された。

研究成果の概要(英文)：Methylation markers for glioma malignant progression identified by genome-wide methylation analysis were validated using MassARRAY. The result was highly correlated with Infinium methylation analysis. Many glioma samples, glioma cell line, and glioma stem cells were validated for the methylation markers. Methylation profile of glioma stem cells were similar to that of G-CIMP demethylated group, suggesting malignant progression with demethylation was related to glioma stemness. Demethylation sites in malignantly progressed samples were poorly enriched in Histon methylation marks such as H3K4me3 and H3K27me3 in embryonal stem cells.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：神経膠腫 エピジェネティクス メチル化 幹細胞 悪性転化

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は予後不良で治療困難な腫瘍であり、多くの分子標的治療が効果を示せていない状況にある。近年、神経膠腫の発生や悪性転化において、DNA のメチル化やヒストン修飾が強く関与していることが示されており、これらのエピジェネティクス機構の解明による新たな治療戦略の構築が期待されている。DNA メチル化の網羅的解析により CpG island methylator phenotype (CIMP) と呼ばれるプロファイルが同定され (Noushmehr et al. Cancer Cell 2010)、さらに膠芽腫におけるメチル化 subgroup が報告されている (Strum et al. Cancer Cell 2012)。神経膠腫におけるヒストンの特定の遺伝子変異の関与についても、非常に興味深い報告が相次いでいる (Schwartzentruber et al. Nature 2012, Wu et al. Nature Genetics 2012)。研究代表者 (齊藤) は、自験例 100 例の神経膠腫の DNA メチル化網羅的解析から CIMP を同定し、さらに CIMP 内に悪性転化に伴い脱メチルを来すプロファイルを新たに同定した (CIMP-demethylated)。さらに遺伝子発現とメチル化の統合解析から、発現の変化を伴う脱メチル遺伝子を神経膠腫悪性転化マーカーとして抽出した。いくつかの興味深い遺伝子がこの中には含まれており、膠芽腫や膠芽腫幹細胞において高発現していることがすでに報告されているものもあるが、メチル化やヒストン修飾などのエピジェネティクスの関与については未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、悪性転化メチル化マーカーとして抽出された重要な遺伝子について、臨床検体の解析結果と照らし合わせて治療標的候補遺伝子を厳選した上で、臨床応用の可能性を神経膠腫細胞株や、当研究室で樹立した脳腫瘍幹細胞を用いて検証することを目的とした。さらに、幹細胞でのメチル化網羅的解析やヒストン修飾解析を行い、神経膠腫の発生に関与するエピジェネティクス機構の解明とマーカーの抽出を試みたいと考えた。

- (1) 研究代表者が新たに同定した悪性転化に伴う脱メチルマーカー候補の、悪性神経膠腫でのメチルおよび発現を、各種データベースおよび脳腫瘍臨床検体ライブラリー、腫瘍幹細胞を用いて検証する。また、予後との関連および既知の遺伝子変異との関連を統計解析することで、機能的に重要で、新たな治療の標的になるような分子の候補を絞り込む。
- (2) 候補遺伝子のひとつである *IGFBP2* は、神経膠腫において血清への溶出が確認されているため、臨床資料における血清のメチル化を経時的に解析し腫瘍の再発/悪性転化との関連を調べることで、血清マーカーとしての確立を目指す。
- (3) 標的治療候補遺伝子について、当教室に

保存されている神経膠腫細胞株や、当教室にて樹立済みの脳腫瘍幹細胞におけるメチル化と発現を解析し、低メチル/高発現となっている遺伝子に対して脱メチル化剤を用いた実験により発現の上昇を確認し、さらには腫瘍増殖能の変化を *in vitro* および *in vivo* の実験にて明らかにする。

- (4) 脳腫瘍幹細胞におけるメチル化網羅的解析、幹細胞および腫瘍検体におけるヒストン修飾の網羅的解析を行い、幹細胞と各グレードの腫瘍検体とのプロファイル比較を行う。また、メチル化とヒストン修飾の統合解析を行うことで、神経膠腫発生と悪性転化に深く関わるエピジェネティックメカニズムや鍵となる分子を特定する。

3. 研究の方法

- (1) メチル化網羅的解析により同定した神経膠腫悪性転化メチル化マーカーの検証(臨床検体)

東京大学脳神経外科には協力病院の検体も含めて、過去 10 年以上にわたる数百の神経膠腫に加え、数千症例にも及び同意取得済みの脳腫瘍臨床検体が、冷凍保存または病理解析用にストックされている。抽出済みの DNA、RNA、蛋白に新たな症例も加えた上で、本研究対象である神経膠腫悪性転化メチル化マーカーの DNA メチル化および発現量の解析を行い、さらには予後と関連しているかを明らかにする。メチル化解析には MassARRAY を用い、発現解析には定量 PCR を用いる。*IGFBP2* についてはすでにいくつかの検体でメチル化および発現解析を行っており、神経膠腫の grade に関連した発現と、逆関連したメチル化を確認している。メチル化のプライマー設定、解析条件が合わず MassARRAY では安定した結果が得られない可能性があり、その場合には pyrosequencing による検証を行う。

- (2) 神経膠腫悪性転化メチル化マーカーの検証(神経膠腫細胞株、幹細胞)

我々はこれまでに脳腫瘍幹細胞株を 15 例樹立しており DNA や RNA も抽出済みである。既知の脳腫瘍細胞株 (U87MG, U178MG, U251MG, U373MG など) および脳腫瘍幹細胞において、神経膠腫悪性転化メチル化マーカーのメチル化および発現を解析する。メチル化が高く、発現が低いものに関しては、5-Aza-2'-Deoxycytidine を用いて脱メチル処理することで発現の上昇がみられるか確認する。また脱メチル化処理前後の細胞において、その増殖能、細胞死、運動能の変化などを解析する。*IGFBP2* に関しては、幹細胞で高発現であることが preliminary な解析でわかっており、機能阻害により増殖、自己複製能の維持、多分化能、腫瘍形成能にどの様な

影響を与えるかを、神経幹細胞での同様の実験との比較により行う。

(3) 脳腫瘍幹細胞を用いたメチル化網羅的解析

東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス部門との共同実験により、脳腫瘍幹細胞から抽出したDNAをbisulfite変換し、Illumina Infinium 450K BeadArray Chipを用いて網羅的DNAメチル化解析を行う。腫瘍幹細胞と、ももとの腫瘍検体や、神経幹細胞との比較を行うことにより、腫瘍幹細胞特異的なメチル化の異常を検出し、幹細胞を標的とした治療につなげていく。メチル化プロファイル解析や、腫瘍検体との比較などの解析に関して研究代表者は多くの経験があり、比較的短時間に解析可能と思われる。膨大なデータとなるため、コンピュータの性能によっては解析が困難になることが予想されるため、高性能のコンピュータによる解析も予定している。

(4) ヒストン修飾網羅的解析

研究代表者は、メチル化網羅的解析により同定したメチル化プロファイルと、胚性幹細胞のヒストン修飾との関連性を見出した(投稿準備中)。しかし、実際の腫瘍検体や脳腫瘍幹細胞におけるメチル化とヒストン修飾の関連性については未知である。そこで、ヒストン修飾プロファイルについて、東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス部門との共同実験により Chip-seq 法にて網羅的に解析する予定である。既にメチル化プロファイルを取得済みの臨床検体および脳腫瘍幹細胞において、ヒストンリジンメチル化マーカー(H3K4me3, H3K9me3, H3K27me3)や、アセチル化マーカー(H3K27ac)のデータを取得し、メチル化データと比較する。さらには、脳腫瘍幹細胞と臨床検体の比較、悪性転化前後の検体の比較をすることで、神経膠腫の悪性化に關する特定のヒストン修飾や、エピジェネティックパスウェイの同定を目指す。

(5) 標的治療、個別化治療への応用

上記(3)、(4)の網羅的解析から新たに同定された有望なマーカー遺伝子やエピジェネティックパスウェイに関して、臨床検体や神経膠腫細胞株、脳腫瘍幹細胞を用いて検証をする。検証できたマーカーの中で特に有望と思われるものに対して、そのエピジェネティックステータスに応じて、メチル化や特定のヒストン修飾を標的とした治療を、個別化療法とし開発することを目指す。エピジェネティクス異常を標的とする治療薬としては、5-aza-deoxycytidineなどのメチル化阻害剤や、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)などの histone deacetylase(HDAC) inhibitors, さらには DZNep といった EZH2 complex 阻害剤が開発されている。

4. 研究成果

(1) メチル化網羅的解析により同定した神経膠腫悪性転化メチル化マーカーの検証

IGFBP2、MMP2、KLHDC7Aなどのメチル化マーカーについて、MassARRAYのプライマーを作成し、Infiniumの結果との相関を確認したところ、非常に高い相関が得られた。これらメチル化マーカーを用いて、神経膠腫100例以上のクラスタリングを行ったところ、Infiniumによるクラスタリングと同様にCIMP(-)、CIMP(+), CIMP-demethylatedの3群にきれいに分かれた(図1)。

IGFBP2について、多数の臨床検体を用いてメチル化と発現の解析を行うと、メチル化と発現の逆相関が認められ、悪性転化に伴うメチル化の低下と発現の上昇を確認することができた。

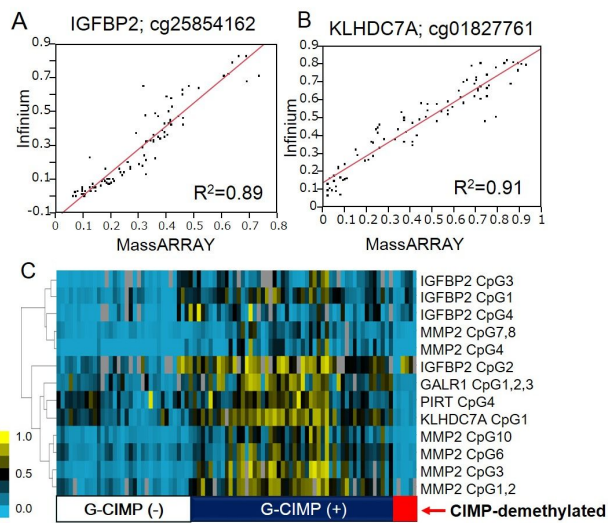


図1 MassARRAYを用いた悪性転化メチル化マーカーの検証

(2) 神経膠腫細胞株、幹細胞を用いた検証

脳腫瘍細胞株(U87, U251, LN229, LN229 EGFR など)において、神経膠腫悪性転化メチル化マーカーのメチル化および発現を解析した。IGFBP2に関して、臨床検体と同様にメチル化と発現を解析してみると、細胞株においてはメチル化が高く発現が抑えられていた。

続いて、5-Aza-2'-Deoxycytidineを用いて脱メチル処理を行い、脱メチル前後での発現の比較を行った。IGFBP2については、U87で脱メチル処理後に発現の著明な上昇を認めた。また、LN229 EGFRにおいても5-Aza濃度依存性の発現の上昇が確認された(図2)

幹細胞においては、IGFBP2の発現が上昇しており、幹細胞を分化誘導するとIGFBP2の発現が低下することが確認された。

次に、U87、U251の細胞株を脱分化させてIGFBP2の発現の変化を確認したところ、脱分化処理により著明な発現の上昇を認めた。

これらから、幹細胞においてはIGFBP2が重要な役割を果たしていることが示唆された。

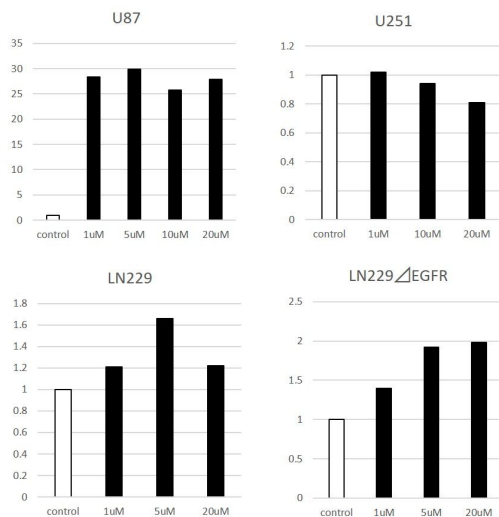


図2 脱メチル処理後のIGFBP2発現の変化

(3) 脳腫瘍幹細胞を用いたメチル化網羅的解析

膠芽腫由来の脳腫瘍幹細胞から DNA を抽出し、Infinium450K Chip を用いてメチル化網羅的解析を行った。幹細胞のメチル化データと、神経膠腫腫瘍検体のメチル化データを合わせてクラスタリング解析を行ったところ、多くの脳腫瘍幹細胞のメチル化プロファイルは、CIMP-demethylated のメチル化プロファイルにクラスターされた(図3)。また、G-CIMP demethylated 群で脱メチル化される部位は、幹細胞において低メチルとなっていた。つまり、悪性転化して脱メチル化する腫瘍は、幹細胞に近いメチル化プロファイルを呈していることがわかった。この悪性転化の機序に、幹細胞化が関わっていることが示唆された。

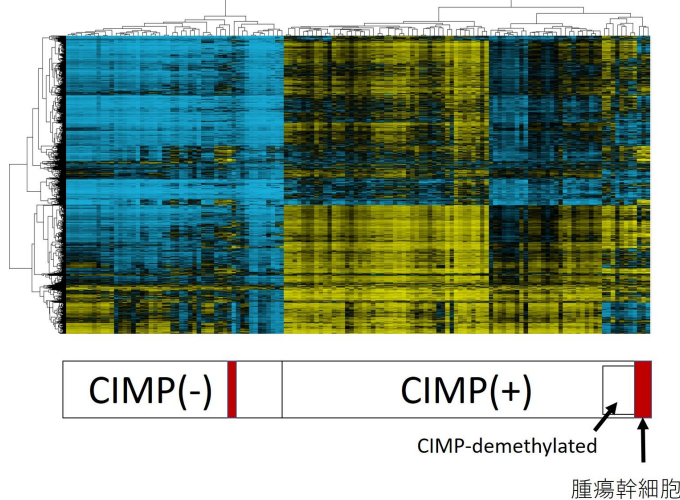


図3 脳腫瘍幹細胞のメチル化クラスタリング

(4) ヒストン修飾とメチル化網羅的解析の関連

メチル化網羅的解析の結果と、ヒストンメチル化マークとの関連を検証した。Infiniumの各プローブにおける Embryonal stem cell (胚性幹細胞、ES 細胞)および Normal human astrocyte (NHA)のヒストンメチル化マークをデータベースより取得し、CIMP メチル化マーカー、CIMP 脱メチルマーカーと照合した。

CIMP メチル化マーカーにおいては、H3K4me3 マークが enrich しており、Bivalent mark の部位が他と比べて有意に多かった。一方、CIMP 脱メチル化マーカーにおいては、H3K4me3 マークは非常に少なく、Bivalent マークの部位はほとんど認められなかった(図4)。

このことから、悪性転化により脱メチル化される部位は、他の CIMP マーカーとは異なるヒストン修飾を受けていることがわかった。悪性転化におけるメカニズムについて、さらなる検証が必要と考えられた。

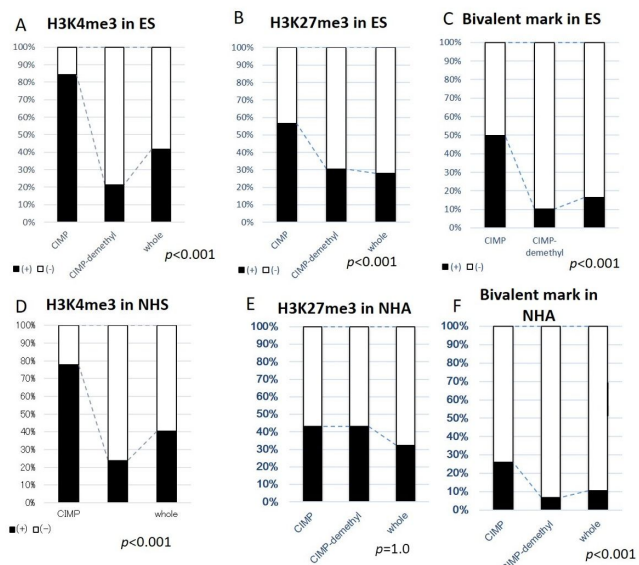


図4 メチル化マーカーとヒストン修飾との関連

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Aihara K, Mukasa A, Nagae G, Nomura M, Yamamoto S, Ueda H, Tatsuno K, Shibahara J, Takahashi M, Momose T, Tanaka S, Takayanagi S, Yanagisawa S, Nejo T, Takahashi S, Omata M, Otani R, Saito K, Narita Y, Nagane M, Nishikawa R, Ueki K, Aburatani H, Saito N.

Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas at recurrence. Acta Neuropathol Commun. 2017 Mar 7;5(1):18. DOI: 10.1186/s40478-017-0422-z. 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

齊藤 邦昭. Upfront chemotherapy prolongs progression free survival of the patients with low-grade oligodendroglial tumors. 21st Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology 2016.11.18 Scottsdale, Arizona, USA

齊藤 邦昭. Integrated analysis of *MGMT* promoter methylation and mismatch repair alteration in glioma. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.7 横浜

永根 基雄、齊藤 邦昭、他 7 名. Integrated analysis of methylation of *MGMT* promoter and alteration of mismatch repair enzymes in glioblastoma. 13th Asian Society for Neuro-Oncology Meeting 2016.9.12 Sydney, Australia

齊藤 邦昭. 神経膠腫における *MGMT* メチル化と DNA ミスマッチ修復酵素の統合解析 第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会 2015.12.7 京都

齊藤 邦昭. ミスマッチ修復酵素異常が初発膠芽腫の予後に与える影響. 第 24 回多摩脳腫瘍研究会 2015.11.28 東京

齊藤 邦昭. Mismatch repair defects predict clinical outcome of primary and recurrent malignant gliomas. 20th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology 2015.11.20 San Antonio, USA

齊藤 邦昭. *MGMT* メチル化と DNA ミスマッチ修復酵素の異常に応じた膠芽腫治療の展望. 第 74 回日本脳神経外科学会学術総会 2015.10.14 札幌

齊藤 邦昭. 低悪性度神経膠腫再発時における *MGMT* メチル化/ミスマッチ修復タンパク発現の変化. 第 29 回東京脳腫瘍治療懇話会 2015.6.19 東京

齊藤 邦昭. Genome-wide methylation analysis identifies genomic DNA demethylation during malignant progression of gliomas. 19th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology. 2014.11.16 Miami, Florida, USA

齊藤 邦昭. メチル化網羅的解析により同定された神経膠腫悪性転化に伴う脱メチル化. 第 73 回日本脳神経外科学会学術総会 2014.10.10 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 邦昭 (SAITO KUNIAKI)

杏林大学医学部・助教

研究者番号 : 50446564

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし

(4) 研究協力者

相原 功輝 (AIHARA KOKI)

大谷 亮平 (OTANI RYOHEI)

柳沢 俊介 (YANAGISAWA SHUNSUKE)

小俣 麻友 (OMATA MAYU)