

平成 31 年 2 月 27 日

難治性の悪性脳腫瘍を改善する治療法の新規開発！ ～ 化学療法の抵抗性獲得システムの解明 ～

名古屋大学大学院医学系研究科（研究科長・門松 健治）脳神経外科学（若林 俊彦 教授）の夏目 敦至（なつめ あつし）准教授、Melissa Ranjit（メリッサ ランジト）研究員（筆頭著者）、平野 雅規（ひらの まさき）研究員（筆頭著者）、腫瘍病理学の榎本 篤（えのもと あつし）准教授、高橋 雅英（たかはし まさひで）教授、北里大学医学部病理学の加藤 琢哉（かとう たくや）助教らの研究グループは、RET finger protein^{*1}の働きを抑えることによって、悪性脳腫瘍である膠芽腫（こうがしゅ）に対する化学療法の効き目が改善することを示し、さらに次世代シーケンサー^{*2}を用いた解析により、それに関連するメカニズムを明らかにしました。

脳腫瘍は WHO の定める定義に基づき、難治性に応じて Grade I～IV に分類されますが、膠芽腫は最も治療の見通しが悪い Grade IV の代表的な疾患です。膠芽腫を難治性たらしめている要因の一つとして、現在、唯一明確な効果が示されている化学療法薬（テモゾロミド：TMZ）に対する耐性メカニズムの存在が挙げられ、その解明および克服は喫緊の課題となっています。

今回の研究では RET finger protein（RFP）というタンパク質に着目し、テモゾロミド抵抗性の高い脳腫瘍において RFP が多く発現していること、また、RFP 阻害とテモゾロミド投与を組み合わせることでテモゾロミドが効かなくなった脳腫瘍においても高い治療効果が得られることが明らかとなりました。さらに次世代シーケンサーを用いた解析から、RFP を阻害することによって、近年スーパーエンハンサー^{*3}の指標としても着目されているヒストン修飾（H3K27ac）^{*4}の広範な変化が引き起こされ、これが酸化ストレス^{*5}・アポトーシス^{*6}関連遺伝子の活性化、また一方で細胞周期^{*7}進行・塩基除去修復^{*8}を司る遺伝子の不活性化につながり、治療効果に寄与していることが示されました。

本研究成果は、国際生物学総合誌「Cell Reports」（英国時間 2019 年 2 月 26 日付の電子版）に公開されました。

本研究は、日本学術振興会新学術領域研究（課題番号：17928985）の助成を受けました。

難治性の悪性脳腫瘍を改善する治療法の新規開発！

～ 化学療法の抵抗性獲得システムの解明 ～

ポイント

- 膠芽腫は非常に難治性の悪性脳腫瘍である。一因として化学療法薬抵抗性の存在が挙げられるが、その仕組みは未だ不明な点が多い。
- 化学療法抵抗性の膠芽腫において RET finger protein (RFP) が多く発現しており、従来の化学療法薬に RFP 阻害を加えることで化学療法抵抗性が大きく改善することを示した。
- RFP はヒストン脱アセチル化酵素^{※9}と結合し、近年スーパーエンハンサーの指標としても着目されているヒストンのアセチル化を広範に調整している。
- RFP 阻害により、酸化ストレス・アポトーシス関連遺伝子が活性化される。また一方で、腫瘍細胞の分裂や DNA 修復を促進して化学療法を効かないようにする遺伝子も不活性化され、優れた治療効果に寄与する。

1. 背景

膠芽腫は、最も術後の予見が厳しい脳腫瘍の一つです。最大限の手術及び放射線化学療法を行っても5年生存率は10%以下であり、新たな治療法の開発が望まれています。膠芽腫を難治性たらしめている要因の一つとして、現在、唯一明確な効果が示されている化学療法薬(テモゾロミド:TMZ)に対する耐性が生じることが考えられていますが、未だ解明されていない点も多く、そのメカニズムの更なる解明及びそれらの克服は喫緊の課題となっています。

近年の分子生物学研究の進歩に伴い、遺伝子自体の異常のみならず、遺伝子の発現を調整するエピゲノム^{※10} 機構の異常が、悪性腫瘍の発生や性質に大きな影響を与えることが報告されてきています。まず、当研究グループは、その中でも特にダイナミックに遺伝子発現調節を行うスーパーエンハンサーに着目し、この問題にアプローチできないかと考えました。スーパーエンハンサーを含むシスエレメント^{※11} はヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)による調整を受けており、ヒストン H3 の 27 番目のアミノ酸であるリシンがアセチル化される修飾(H3K27ac)がその指標となることが知られています(図 1)。残念ながら HDAC をターゲットとした治療薬は副作用の問題もあるため、これまで脳腫瘍での実用化には至っていませんが、HDAC と相互作用する適切な分子をターゲットとすることで、腫瘍に特異的な形質獲得のメカニズムの解明に迫り、新規治療法の開発につなげられるのではないかと考えました。

2. 研究成果

当研究では、HDAC と相互作用する候補分子として過去に共同研究者が報告している RET finger protein(RFP)を選定し、様々な検討を行いました。その結果、テモゾロミド(TMZ)が効かない膠芽腫由来の複数の細胞系列において RFP の発現が有意に高くなっていることが分かりました。また、細胞・マウスモデルの両方で RFP 阻害によって TMZ 抵抗性が大幅に改善されることも示されました。

RFP 阻害による TMZ 抵抗性改善のメカニズムをさらに詳細に検討するため、次世代シーケンサーを用いた解析(遺伝子発現解析・クロマチン免疫沈降シーケンス^{※12} 解析)を行ったところ、RFP 阻害により広範なヒストン修飾(H3K27ac)の変化が起き、それに伴って近傍の遺伝子発現も変化していることが明らかと

なりました。酸化ストレスやアポトーシスに関連する遺伝子が活性化される一方、細胞分裂や DNA 修復を促進して化学療法を効かないようにする遺伝子群が不活化されており、これらが先述の治療効果に寄与していると考えられました(図 1)。

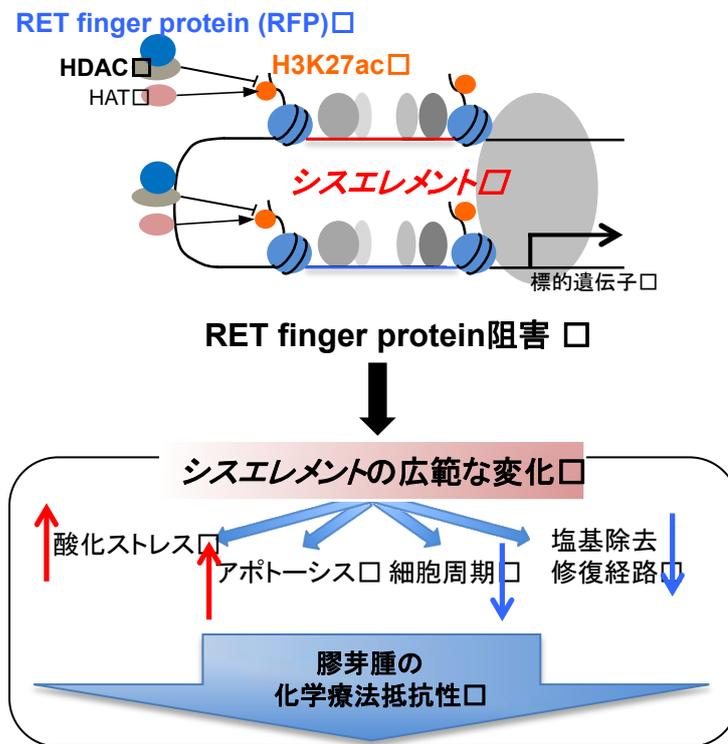


図 1. シスエレメント調整機構の概念図およびRFP阻害による効果
 膠芽腫細胞において、RFPはHDACと複合体を形成し、広範なシスエレメント調整を行っている。(上部)
 RFP阻害により酸化ストレス・アポトーシス関連遺伝子の活性化、また一方で細胞周期進行や塩基除去修復経路関連遺伝子の不活性化が起こり、膠芽腫の治療抵抗性が改善される。(下部)

3. 今後の展開

今回着目した RFP は、脳腫瘍の悪性化・化学療法抵抗性獲得に関連する複数の経路を調整する役割を果たしており、今後、これをターゲットとした新規脳腫瘍治療薬の開発が期待されます。また、今回用いた実験手法により他の有望な治療ターゲット分子を探索し、治療薬選択の幅を増やしていくことが期待されます。

4. 用語説明

1. RET finger protein：がんを引き起こす原因となる RET 遺伝子の活性化に関与する DNA 結合性タンパク質。TRIM27 としても知られる。
2. 次世代シーケンサー：近年開発された遺伝子の塩基配列を高速に読み出せる解析装置。
3. スーパーエンハンサー：後述のシスエレメントの内、エンハンサーが群集(クラスター)を作り、特に強力に遺伝子を制御する領域として近年提唱された概念。細胞運命の決定に重要な役割を果たすことが報告されている。
4. ヒストン修飾：DNA が巻きついているヒストン蛋白へのメチル化、アセチル化などの化学修飾。代表的

な物として、ヒストン H3 の 27 番目の K(リシン)に対するアセチル化(ac)が挙げられる。

- 5.酸化ストレス：活性酸素が産生され、DNA などが障害を受ける状態。
- 6.アポトーシス：遺伝子により制御された、能動的な細胞死。
- 7.細胞周期：細胞分裂に基づく細胞の活動周期。基本的には G1 期、S 期(DNA 合成)、G2 期、M 期(細胞分裂)の 4 段階からなる。
- 8.塩基除去修復：DNA 修復機構の 1 つ。損傷を受けた DNA の塩基を切断し、さらに隙間を元どおり埋めることで遺伝情報を維持する。
9. ヒストン脱アセチル化酵素：ヒストン蛋白のアセチル化を取り除く反応を触媒する酵素。
- 10.エピゲノム：DNA の塩基配列を変えずに遺伝子の働き方を調整する仕組み。DNA や DNA が巻きついているヒストン蛋白に対する化学修飾(メチル化、アセチル化など)により調整される。
- 11.シスエレメント：同一分子上にある遺伝子の発現を調節する DNA 領域。プロモーターやエンハンサーなどが含まれる。
- 12.クロマチン免疫沈降シーケンス：対象とするヒストン修飾や転写因子に特異的な抗体を用いて免疫沈降を行い、ゲノム全体のどの位置に対象が分布するかを調べる手法。当研究では、RFP 阻害の前後で結果を比較し、H3K27ac 修飾が増加/減少した領域をそれぞれ検討した。

5. 発表雑誌

論文タイトル：Aberrant active cis-regulatory elements associated with downregulation of RET finger protein overcome chemoresistance in glioblastoma

雑誌名：Cell Reports (英国時間 2019 年 2 月 26 日付けの電子版に掲載)

著者：Melissa Ranjit¹, Masaki Hirano¹, Kosuke Aoki¹, Yusuke Okuno², Fumiharu Ohka¹, Akane Yamamichi¹, Sachi Maeda¹, Akira Kato¹, Kazuya Motomura¹, Keitaro Matsuo^{3,4}, Atsushi Enomoto⁵, Yasushi Ino⁶, Tomoki Todo⁶, Masahide Takahashi⁵, Toshihiko Wakabayashi¹, Takuya Kato⁷, and Atsushi Natsume¹

所属名：

1 Department of Neurosurgery, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

2 Center for Advanced Medicine and Clinical Research, Nagoya University Hospital, Nagoya, Japan

3 Division of Cancer Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, Nagoya, Japan

4 Department of Epidemiology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

5 Department of Pathology, Nagoya University School of Medicine, Nagoya, Japan

6 Division of Innovative Cancer Therapy, Advanced Clinical Research Center, Institute of Medical Science, The University of Tokyo, Tokyo, Japan

7 Department of Pathology, Kitasato University School of Medicine, Sagamihara, Japan

DOI: [10.1016/j.celrep.2019.01.109](https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.109)

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Cell_R_20190227en.pdf