

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 8 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19964

研究課題名(和文) 二次性膠芽腫における遺伝子異常およびクローン進化の解析

研究課題名(英文) Mutational landscape and clonal architecture in secondary glioblastomas

研究代表者

鈴木 啓道 (Suzuki, Hiromichi)

京都大学・医学研究科・特定助教

研究者番号：90751024

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)：WHOグレード2および3に相当するLower grade gliomaに対し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子異常を行った。遺伝子異常に基づいた各LGGサブグループにおいて、予後不良に関わる遺伝子異常を同定した。同定された遺伝子異常は初発時に一部の腫瘍細胞のみにしか認められず、再発時により高い頻度で同定されることからLGGの悪性化に関与していると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Lower grade glioma (WHO grade II and III glioma) is slowly progressive but incurable disease. Recently, our group revealed that lower grade glioma is divided into three subgroups based on genetic alterations. In this study, we identified subgroup-specific genetic alterations that affected the tumor progression in lower grade glioma. The subset of patients with identified genetic alterations had poor survival, which will lead us to the better management of LGG patients.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ クローン進化 腫瘍内多様性

## 1. 研究開始当初の背景

成人脳原発悪性腫瘍のほとんどは神経膠腫とよばれる腫瘍である。神経膠腫は世界保健機構 (WHO) により悪性度に基づいた分類が行われている。神経膠腫のうち、グレード 2 および 3 に相当する神経膠腫は Lower grade glioma (LGG) と呼ばれ、成人脳原発悪性腫瘍の約 3 割をしめる。LGG は緩徐に進行するが脳に浸潤しながら進展するため完治することは極めて困難な疾患である。近年、LGG において *IDH1/2* 遺伝子の異常が約 80% に認められることが報告された (Yan H. et al. N. Engl. J. Med. 360, 765-773, 2009)。最も悪性度の高いグレード 4 神経膠腫である神経膠芽腫では *IDH1/2* 遺伝子変異の頻度は約 5% であり、LGG と神経膠芽腫において生じている遺伝子異常が異なることが示唆された。

LGG は長期生存が可能である一方、ほとんどの患者で再発が見られることから術後の化学療法・放射線療法が必要となっている。しかし、補助療法を術後すぐに行うのか、再発時に行うかや、どのくらいの強度で行うかなどは、施設や主治医に寄って異なっているのが現状である。LGG 患者の生命予後は同じ病理診断であっても、非常に多様であるため、生命予後をより正確に予測することが可能となれば適切な強度の治療を選択できることにつながると考えられている。また、再発 LGG はほとんどの場合、より悪性度の高い腫瘍となっており、治療抵抗性である。そのため、悪性化や予後不良に関わる遺伝子異常を同定することは、LGG 患者の治療の改善に繋がるのみならず、新規治療の発展に寄与すると考えられる。

## 2. 研究の目的

これまで LGG における遺伝子異常は十分に解明されていなかったが、申請者のグループは 757 例の LGG に対し網羅的な遺伝子変異解析を行い LGG における遺伝子変異の全貌を世界で初めて明らかにした (Suzuki H. et al. Nat Genet. 47(5):458-68, 2015)。その結果、LGG は遺伝子変異により明確な 3 群に別れることが明らかになった (図 1)。申請者たちの報告から 2 か月後に、同様の結果がアメリカ主体の多施設共同研究である The Cancer Genome Atlas から報告された (Cancer Genome Atlas Research N, N Eng J Med, 372(26):2481-98, 2015)。これらの結果を受け、2016 年に WHO 脳腫瘍分類の改定が行われ、神経膠腫の診断に遺伝子診断が組み込まれることとなった。

LGG は最終的に最も悪性度の高い二次性神経膠芽腫やより悪性度の高い神経膠腫として再発することがほとんどであるが、高度悪性化するメカニズムは十分に解明されていない。次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子異常解析を行い LGG の悪性化に関与する遺伝子異常を同定することを目的として研究を行った。

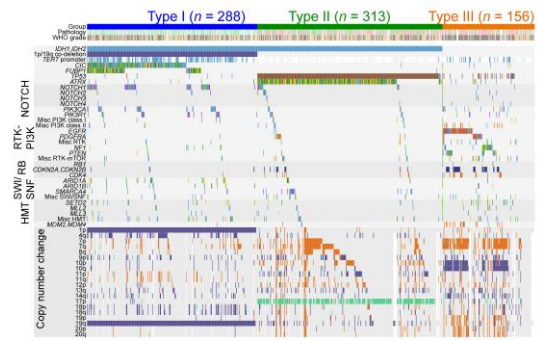


図 1. LGG における遺伝子異常の全貌

## 3. 研究の方法

これまでの研究により 757 例の LGG に対する網羅的遺伝子異常解析の結果を有している。この症例数は LGG において世界最大規模の症例数である。これらの症例における生存期間や行った治療などの臨床情報を収集し、遺伝子異常に基づいた分類を行ったあと、各疾患群における予後不良に関連する遺伝子異常の同定を行う。

同定された遺伝子異常の役割を解明するため、マルチサンプリング症例を用いた腫瘍内多様性の解析や RNA シークエンスを用いた遺伝子発現解析データを使用し、各遺伝子異常の特徴を明らかにする。

## 4. 研究成果

合計 724 例の症例に対し臨床情報の収集が可能であった。280 例の Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted, 305 例の Astrocytoma, IDH-mutant, 139 例の IDH wild type LGG に分け予後不良因子を同定した。

### (1) 各疾患群における予後不良因子の同定

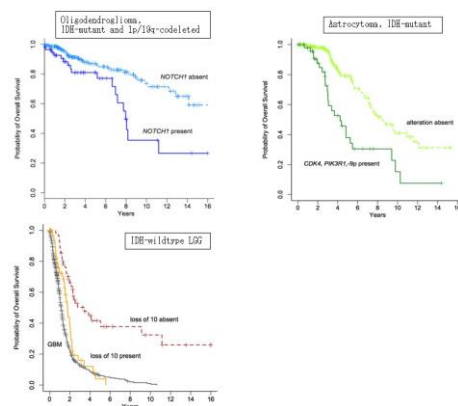


図 2. 各疾患群における生存曲線

Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted においては *NOTCH1* 遺伝子変異のみが予後不良因子であった (Hazard ratio 2.57, 95%信頼区間 1.40-4.70)。Astrocytoma, IDH-mutant においては *CDK4* focal high-level amplification (Hazard ratio 9.40, 95%信頼区間 3.08-28.7), *PIK3R1*

遺伝子変異(Hazard ratio 8.13, 95%信頼区間 2.70-24.52), loss of 9p(Hazard ratio 1.98, 95%信頼区間 1.16-3.38)が予後不良因子として同定された。IDH-wildtype LGG では loss of 10 が予後不良因子であった(Hazard ratio 2.26, 95%信頼区間 1.28-3.97)。これらの遺伝子変異のいずれかを持つ症例は持たない症例よりも生存期間が有意に短かった(図2)。

(2) Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted における *NOTCH1* 遺伝子変異

Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted において *NOTCH1* 遺伝子変異の有無の違いによる臨床所見の違いを比較した。その結果、*NOTCH1* 遺伝子変異を有する群において、造影 MRI にて造影効果を認める症例が有意に多かった(図3)。MRI 造影効果はこれまで予後不良因子と同定されているため、*NOTCH1* 変異を有する腫瘍はより悪性度が高い腫瘍と考えられた。

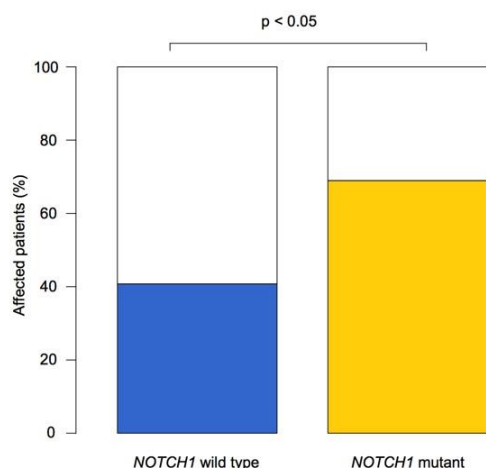


図3. *NOTCH1* 遺伝子変異を有する症例と認めない症例における、MRI 造影効果を認める症例の割合

3例のマルチサンプリング症例、8例の初発・再発検体に対し遺伝子変異解析を行い、分子進化解析にて系統樹を作成した。マルチサンプリング症例では *NOTCH1* 変異は一部のサンプリング部位でしか確認されず、*NOTCH1* 遺伝子変異は、腫瘍の発生からしばらくしてから生じている変異と考えられた(図4)。初発/再発症例で同様の解析を行うと、*NOTCH1* 変異は再発腫瘍に多く認められる傾向があり、*NOTCH1* 変異を獲得することにより腫瘍細胞はより高い悪性度を獲得することが示唆された。Oligodendroglioma, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted においては *NOTCH1* 遺伝子変異を有した生存に有利な腫瘍細胞が選択的に増殖することにより、より悪性度の高い腫瘍として再発すると考えられた。

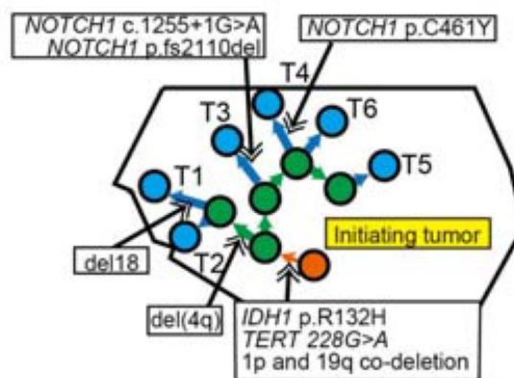


図4. *NOTCH1* 変異を認めるマルチサンプリング症例の一例

(3) Astrocytoma, IDH-mutant における loss of 9p

Loss of 9p により腫瘍に生じる異常を解明するため、RNA シークエンスデータを用いた網羅的な遺伝子発現データを用いて Gene set enrichment analysis を行った。Loss of 9p を有する腫瘍では有しない腫瘍と比較し、Cell Cycle と DNA replication パスウェイの亢進が同定された(図5)。これらのパスウェイの異常は神経膠芽腫や他の悪性疾患でも亢進が認められる異常である。特にこの領域には *CDKN2A* 遺伝子が存在している。*CDKN2A* の focal homo-deletion は神経膠芽腫において高頻度に認められる異常の一つである。Astrocytoma, IDH-mutant においても *CDKN2A* の focal deletion を有する腫瘍が認められるが、この異常を有するすべての症例において loss of 9p も認められ、結果的に *CDKN2A* が共欠失している。Loss of 9p は腫瘍の悪性化に寄与し、その後生じる *CDKN2A* の欠失により、腫瘍はさらに高度に悪性化すると考えられた。

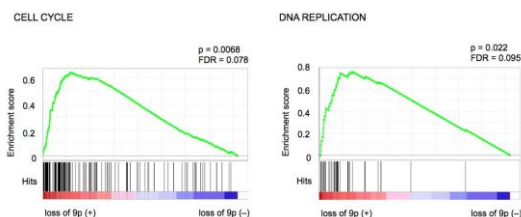


図5. Gene set enrichment analysis において Loss of 9p を認める症例で亢進が認められたパスウェイ

(4) IDH wild type LGG における loss of 10

Loss of 10 は gain of 7 と *TERT* promoter の変異とともに、神経膠芽腫で特徴的な所見と報告されている。Loss of 10 を有する IDH wild type LGG は同様に、gain of 7 と *TERT* promoter の変異が高頻度に認められ強い相関が認められた。Loss of 10 を有する腫瘍において確認される、他の遺伝子変異は神経膠腫と同様の遺伝子に異常を認めることがお

おく、神経膠腫と極めて酷似した遺伝子異常パターンを有していた(図6)。

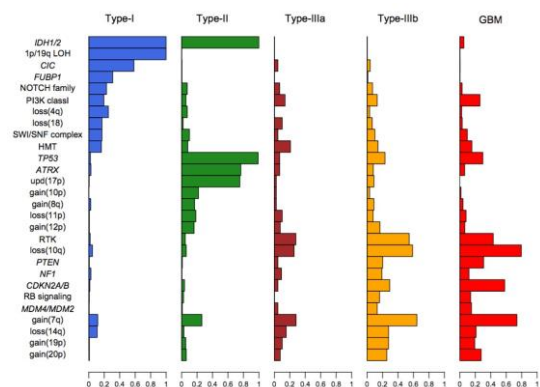


図6. 各疾患群におけるそれぞれの遺伝子異常の割合

Loss of 10を有する腫瘍を遺伝子発現の観点から神経膠芽腫と比較した。神経膠芽腫の遺伝子発現パターンは proneural, neural, classic, mesenchymal の4つに分類できるとされている。しかし、同様の手法を行ってクラスタリングを行うと、IDH wild type LGGは神経膠芽腫と異なった集団を形成することが明らかとなった。このことから、IDH wild type LGGは神経膠芽腫とほぼ同様の遺伝子変異パターンを有するが、遺伝子発現の点からは異なった様相を示すことが明らかとなった(図7)。

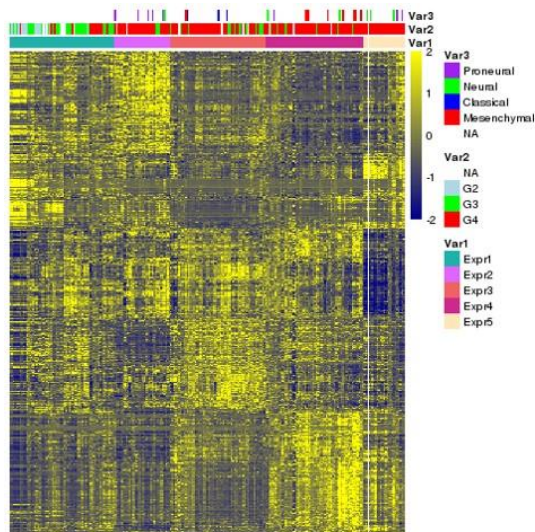


図7. IDH wild type LGG と神経膠腫における遺伝子発現パターン

#### (5) 考察

本研究により、LGGの各疾患群において、予後不良に関わる新たな遺伝子異常が同定された。これらの異常は、臨床所見やこれまで報告されている単一遺伝子変異の有無による単変量解析の結果と矛盾しない結果であった。また、再発時やより悪性度の高い神経膠芽腫でより高頻度に認められることによりLGGの悪性化に強く関与していると考えられた。

本研究結果を用いることにより患者予後をより正確に評価することが可能と考えられ、独立したコホートによる prospective な追証が期待される。別コホートにて同様の結果を得られれば、適切な治療選択を行う有用な情報となりうると考えられる。

#### 5. 主な発表論文等 (研究代表者は下線)

[雑誌論文] (計3件)

1. Kurimoto M, Suzuki H, Aoki K, Ohka F, Kondo G, Motomura K, Iijima K, Yamamichi A, Ranjit M, Wakabayashi T, Kimura S, Natsume A. (2016). Rapid sensitive analysis of IDH1 mutation in low-grade gliomas by automated genetic typing involving a quenching probe. *Cancer Investigation*. 34(1): 12-15. 2016. 査読有
2. Yamamichi A, Kasama T, Ohka F, Suzuki Hiromichi, Kato A, Motomura K, Hirano M, Ranjit M, Chalise L, Kurimoto M, Kondo G, Aoki K, Kaji N, Tokeshi M, Matsubara T, Senga T, Kaneko M. K, Suzuki Hidenori, Wakabayashi T, Baba Y, Kato Y, Natsume A. (2016). An immuno-wall microdevice exhibits rapid and sensitive detection of IDH1-R132H mutation specific to grade II and III gliomas. *Science and Technology of Advanced Materials*. 17(1): 618-625. 2016. 査読有
3. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S., Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature Genetics*, 47, 458-468, 2015. 査読有

[学会発表] (計7件)

#### (1) 国際学会

1. Suzuki H, Aoki K, Ohka F, Motomura K, Wakabayashi T, Ogawa S, Natsume A. The genetic landscape and clonal architecture in lower grade glioma. 2017 Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, Banff, Canada, 2016/2/10, (ポスター) (査読有)
2. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y,

Watanabe R, Ito I, Wakabayashi T, Ogawa S, Natsume A, The landscape and clonal architecture in lower grade glioma. 2015 ASCO annual meeting, Chicago, USA, 2015/6/2, (口演) (査読有)

3. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Niida A, Shimamura T, Sanada M, Miyano S, Wakabayashi T, Natsume A, Ogawa S, The landscape and clonal architecture in lower grade glioma. AACR annual meeting 2015, Philadelphia, USA, 2015/4/21, (ポスター) (査読有)

## (2) 国内学会

1. 鈴木啓道, 青木恒介, 千葉健一, 佐藤悠佑, 塩澤裕介, 白石友一, 島村徹平, 新井田厚司, 宮野悟, 夏目敦至, 小川誠司. 低悪性度神経膠腫における遺伝子異常とクローン進化の解明. 第 38 回分子生物学会年会・第 88 回生化学会大会合同大会 BMB2015, 神戸, 2015/12/2 (基調・招待講演)
2. 鈴木啓道, 青木恒介, 千葉健一, 白石友一, 本村和也, 大岡史治, 中村英夫, 溝口昌弘, 阿部竜也, 村垣善浩, 伊藤以知郎, 渡邊麗子, 眞田昌, 若林俊彦, 小川誠司, 夏目敦至. 低悪性度神経膠腫における遺伝子変異の全体図とクローン進化の解明. 第 74 回 日本脳神経外科学会学術総会. 札幌. 2015/10/14 (口演) (査読有)
3. 鈴木啓道, 青木恒介, 千葉健一, 佐藤悠佑, 塩澤裕介, 白石友一, 島村徹平, 若林俊彦, 夏目敦至, 小川誠司. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. 第 74 回日本癌学会学術総会. 名古屋. 2015/10/10 (口演) (査読有)
4. 鈴木啓道, 青木恒介, 千葉健一, 白石友一, 本村和也, 大岡史治, 中村英夫, 溝口昌弘, 阿部竜也, 村垣善浩, 伊藤以知郎, 渡邊麗子, 眞田昌, 若林俊彦, 小川誠司, 夏目敦至. 低悪性度神経膠腫の遺伝子異常による分類と腫瘍内多様性. 第 20 回 日本脳腫瘍の外科学会. 名古屋. 2015/9/26 (基調・招待講演)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 啓道 (SUZUKI, Hiromichi)

京都大学大学院医学研究科特定助教

研究者番号: 90751024