

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 14 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19968

研究課題名(和文)テロメア維持機序に基づく髄膜腫再発予測と治療法の開発

研究課題名(英文)Telomere maintenance in meningiomas

研究代表者

永野 大輔 (Eino, Daisuke)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：70726520

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)：がん細胞が無限に増殖し続けるには、染色体末端にあるテロメア配列の延長・維持が必須とされている。本研究では、脳腫瘍において最も頻度の高い髄膜腫におけるテロメア維持機序の解析をおこなった。多くのがんのテロメア維持に関わっているテロメラーゼ逆転写酵素のプロモーター領域の有無を検索したところ、悪性度が高く再発性の高い腫瘍に認められた。一方、大半の髄膜腫においては同遺伝子の変異やテロメラーゼ活性はなく、本経路の関与は少ないことが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：Telomere maintenance is mandatory for cancer proliferation. In this research, we investigated the mechanisms of telomere lengthening or maintenance in meningiomas. Upregulating mutations in the promoter of telomerase reverse transcriptase were infrequent in meningiomas, and were invariably observed in aggressive malignant meningiomas. We also analyzed the activity of telomerase in meningioma samples, but telomerase reactivation was not observed in most tumors. Thus, telomerase is rarely reactivated in meningiomas, and this type of brain tumor might depend on other mechanisms of telomere lengthening.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：髄膜腫 テロメア

1. 研究開始当初の背景

髄膜腫は原発性脳腫瘍で 24%を占め、最も多い腫瘍のひとつである(脳腫瘍全国集計 2001-2004 年)。本疾患は、WHO grade I に相当する良性腫瘍から、脳や骨などの周囲組織への浸潤・再発傾向があり生命に関わりうる WHO grade III に相当する悪性腫瘍まで含、まれる。また、発症当初は grade I と病理診断されたが、のちに再発し、悪性化するものもある。髄膜腫に対する治療は、手術が基本であるが、脳や神経などの周囲正常構造物などとの関係から全摘出が困難な例もある。切除困難な髄膜腫に対しては放射線治療が行われるが、腫瘍が制御できないことも少なくない。そこで、本疾患は再発性の予測法や、有効な薬物療法の開発が望まれる。

テロメアは染色体末端に存在する、繰り返し配列であり、染色体の安定化に関わっている。細胞分裂による DNA 複製のたびにテロメア配列は短縮し(末端複製問題)、テロメアが短くなると DNA の損傷反応により細胞周期が停止する(細胞老化)。腫瘍の無限の増殖には、このテロメアを維持・延長する機序が必須である。このテロメア延長は大半のがんではテロメア配列を延長するテロメラーゼの活性化によると考えられている。成人では幹細胞や生殖細胞を除き、この機序は働いていないことから、テロメラーゼを含むテロメアの延長機能は腫瘍に選択性の高い治療のターゲットになると考えられている。髄膜腫においても以前より、一部の腫瘍でテロメラーゼ活性が確認されていたが、以後、腫瘍の特性などとの関係や、機序などは不明だった。

近年、がんのゲノム解析が進み、2013 年には全ゲノムシーケンスにより、悪性黒色腫においてテロメラーゼ逆転写酵素(telomerase reverse transcriptase: TERT)のプロモーター領域における点突然変異(TERT-p mut)が高頻度にみられることが明らかになった。本遺伝子変異は TERT の発現量を増加させることで、テロメラーゼを活性化しテロメア維持機序に関わっていることが示された。その後、本遺伝子変異は脳腫瘍の中では神経膠腫、また髄膜腫においても一部にみられることが海外で報告された(Goutagny S et al, Brain Pathol 2014)。この報告では比較的少数の症例での検討に限られていたが、同遺伝子変異は悪性髄膜腫でおもに認められると報告された。

以上から、本遺伝子変異を含むテロメア延長機序が、本疾患の特性と強く関連し、治療のターゲットにもなりうるのではないかという、研究の着想に至った。

2. 研究の目的

本研究では臨床症例におけるサンプルを用い、髄膜腫におけるテロメラーゼ活性の有無や TERT-p mut の有無、テロメア延長・維持機序を検討し、臨床経過と比較、髄膜腫に

おける生物学的特性との関係を明らかにすることを目的とした。また基礎的研究とし、本経路が髄膜腫において治療ターゲットとなりうるかを髄膜腫の細胞株を用いて検討した。

3. 研究の方法

1) 臨床腫瘍検体を用いたテロメア維持機序の検討

TERT プロモーター変異のスクリーニング
上述の TERT-p 変異の有無を検索すべく、髄膜腫の手術切除標本を用い検討を行った。凍結保存検体もしくは、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)検体より、腫瘍のゲノム DNA を抽出し、TERT-p mut の有無をサンガーシーケンス法で調べた。

テロメラーゼ活性の有無の検索

凍結検体のある例については、Telomerase repeat amplification protocol (TRAP) assay を用い、テロメラーゼ活性の有無を調べた。

2) ヒト髄膜腫細胞株を用いたテロメラーゼ阻害薬の効果の検討 (In vitro)

髄膜腫におけるテロメア維持機序が治療のターゲットとなるか検証すべく、髄膜腫細胞株においてテロメラーゼ阻害薬の効果を検討した。本検討においてはヒト由来髄膜腫細胞株として HKBMM、HBL-52 の 2 種を用いた。阻害薬実験に先立ち、テロメラーゼ活性の有無(TRAP assay)、TERT の mRNA の発現量(real-time quantitative PCR 法)、および TERT-mut(サンガーシーケンス法)の有無をそれぞれ調べた。テロメラーゼ阻害薬としては MST-312 および B1BR1532 を用い、Cell Titer-Blue(Promega 社)を用いた cell viability assay 法で増殖阻害効果を評価した。

4. 研究成果

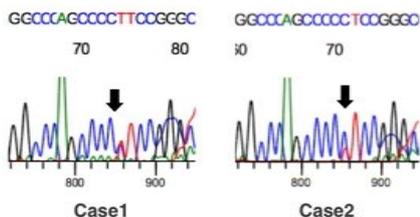
1) 臨床腫瘍検体を用いたテロメア維持機序の検討

TERT プロモーター変異のスクリーニング
髄膜腫の臨床検体 63 例(WHO grade I 40 例、WHO grade II 23 例)を用い、TERT-p mut の検索を行った。うち、2 例で TERT-p mut を認め、他癌腫で指摘されているものと同様の変異(c.-124C>T)であった(図 1)。これらの症例はいずれも WHO grade II の悪性髄膜腫であり、TERT-p mut の頻度は 8.6%(2/23 例)であった。このことから、海外での報告と同様に低頻度ではあるが、日本人の例でも TERT-p mut は悪性髄膜腫にみられる遺伝子変異であることが明らかとなった。

TERT-p mut を認めた 2 例の WHO grade II の悪性髄膜腫はいずれも再発例であり、術後の臨床経過は、腫瘍再発を各々摘出術 6.2 ヶ月後、13.4 ヶ月後と早期に認めた。TERT-p mut を認めない WHO grade II の悪性髄膜腫の腫瘍再発までの中央値が 53.6 ヶ月(n=15, range1.8-93.8)であったことと比較し、

TERT-p mut を認める症例では早期に腫瘍再発する傾向があることが示された。

図1 Atypical meningioma (WHO Grade II)
TERT promoter mutation
C228T c.-124C>T

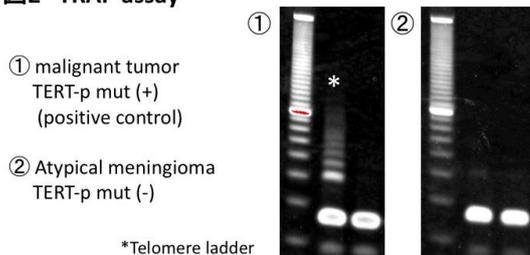


しかし、本検討においては、WHO grade III の高悪性の髄膜腫の検討が行えておらず、さらなる症例の集積が必要と考えられた。

テロメラーゼ活性の有無の検索

凍結検体を利用し得た、20 例(WHO grade I 7 例、WHO grade II 13 例)において TRAP assay を行い得た。20 例はいずれも TERT-p mut は陰性の症例だったが、全症例で、テロメラーゼ活性は陰性だった(図 2)。このことより、TERT-p mut のない髄膜腫においてテロメラーゼ活性は認めず、TERT-p mut がテロメラーゼ活性化の主たる機序となっていると考えられた。TERT-p mut の悪性髄膜腫では凍結検体を利用できず、テロメラーゼ活性は検討できていない。

図2 TRAP assay

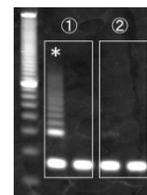


2) ヒト髄膜腫細胞株を用いたテロメラーゼ阻害薬の効果の検討 (In vitro)
髄膜腫細胞株として用いた HKBMM (悪性髄膜腫より樹立されたもの)、HBL-52(WHO grade I の良性髄膜腫より樹立されたもの)のテロメラーゼ活性などを調べた。HKBMM は TERT-p mut が陽性(c.-124C>T)、TERT の mRNA は高発現であり、TRAP assay においてもテロメラーゼ活性が確認された。一方、HBL-52 は TERT-p mut は認めず、TERT の mRNA は低発現で、テロメラーゼ活性は確認できなかった(図 3)。これらより、髄膜腫細胞株における TERT-p mut とテロメラーゼ活性の関連性が示された。テロメラーゼ阻害の効果を見る実験系として、これらの細胞株での結果を対比することが妥当であることが確認できた。

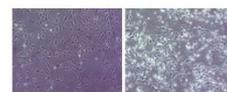
テロメラーゼ阻害薬 MST-312 の投与においては、1 μM 以上の濃度で HKBMM、HBL-52 の双方で細胞増殖抑制が確認された。BIBR1532 の投与においては、HKBMM では 25 μM 以上で、HBL-52 では 50 μM 以上で濃度依存的に細胞増

殖抑制を認めた(図 4)。MST-312 ではテロメラーゼ活性が異なる各細胞株において大きな効果の違いは認めないことから、細胞増殖抑制はテロメラーゼ阻害効果によるものとは考えにくい。BIBR1532 はテロメラーゼ活性のある HKBMM にやや選択的に効果がある印象があった。増殖抑制機序の解明や他のテロメラーゼ阻害薬での検討も今後必要である。

図3 Meningioma cell line

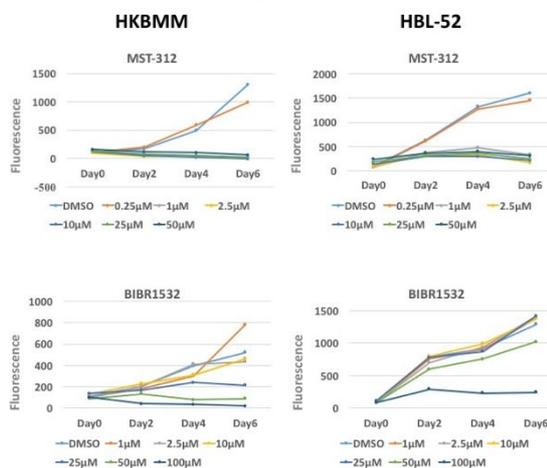


*Telomere ladder
①HKBMM ②HBL-52



	HBL-52	HKBMM
WHO grade	I	? (malignant)
Gender/age	Female/47	Female/48
Country of product	Germany	Japan
TERT-p mutation (hot spot)	NM	C228T c.-124C>T
TERT mRNA expression	-	+++
Telomerase activity	-	+++

図4 Cell viability assay



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 件)

〔学会発表〕(計 3 件)

1. Ryuichi Hirayama, Manabu Kinoshita, Hideyuki Arita, Daisuke Eino et al., "Voxel-based lesion mapping technique reveals the spatial distribution of meningioma" 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology. 2017年11月17日 米国 サンフランシスコ ポスター発表
2. 永野大輔、香川尚己、阿知波孝宗、横田千里、福永貴典、有田英之、藤本康倫、貴島晴彦、高倉伸幸 「リゾホスファチジン酸を用いた脳腫瘍血管正常化による薬剤到達の改善」 日本脳神経外科学会第76回学術総会 2017年10月12日 名古屋

屋

3. 永野大輔、香川尚己、阿知波孝宗、横田千里、福永貴典、有田英之、藤本康倫、貴島晴彦、高倉伸幸 「リゾホスファチジン酸を用いた脳腫瘍血管正常化は免疫療法を増強させる」 第35回日本脳腫瘍学会学術総会 2017年11月26日 高松

〔その他〕

ホームページ等：なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

永野 大輔 (EINO Daisuke)
大阪大学・医学部附属病院・医員
研究者番号：7072620

(2) 研究協力者

橋本直哉 (HASHIMOTO Naoya)
藤本康倫 (FUJIMOTO Yasunori)
有田英之 (ARITA Hideyuki)
平山龍一 (HIRAYAMA Ryuichi)
阿知波孝宗 (ACHIHA Takamune)