

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10857

研究課題名(和文) 脊髄グリオーマの遺伝子解析と新規治療標的の探索

研究課題名(英文) Genetic analysis of spinal cord glioma and identification of novel therapeutic targets

研究代表者

田中 将太 (Tanaka, Shota)

東京大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：80643725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：脊髄グリオーマ・上衣腫の臨床像を明らかにし、予後に関連する分子マーカーを探索する目的で、獨協医科大学・都立神経病院・大阪市立大学・東京大学にて治療された脊髄グリオーマ30症例・上衣腫58症例を対象に、遺伝子解析を行った。Diffuse midline glioma, H3K27M-mutantは9例(30%)で、全例悪性、臨床像は多彩であった。IDH1-R132S変異を1例に認めた。WHOグレードは全生存期間の予後因子だが、H3K27M変異は有意でなかった。上衣腫のDNAメチル化解析では、グレード2は階層化クラスタリングにて比較的均質であったが、HOX遺伝子群により発生部位を明確に区別できた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脊髄に発生する神経膠腫(グリオーマ)は治療困難で予後不良であり、上衣腫は概して予後良好だが再発や播種を来す症例もある。本研究にて国内屈指のコホートを構築した。稀少疾患である脊髄グリオーマ・上衣腫の臨床像を明らかにするとともに、その分子プロファイルを探ることができた。脊髄グリオーマにおいては、脳幹グリオーマとは異なり病理学的な悪性度が予後に与える影響が大きいたことが示唆され、安全な限り最大の検体収集が重要と思われた。脊髄上衣腫においては、発生母地が体節分化後であることが示唆され、頭蓋内ほどの生物学的な不均一性はないものと思われた。これらの新たな知見は日常診療の一助になり得ると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to unveil clinical and genetic profiles of diffuse glioma and ependymoma in the spinal cord. Thirty cases of astrocytoma and 58 cases of ependymoma treated at Dokkyo Medical University, Tokyo Metropolitan Neurological Hospital, Osaka City University, or The University of Tokyo between 2000 and 2016 were included in the study. Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant was diagnosed in 9 cases (30%). They were all high-grade with variable clinical pictures (age, location, etc). IDH1-R132S mutation was noted in 1 case. WHO grade was significantly associated with overall survival, whereas H3K27M mutation was not. Clustering of the DNA methylation data on spinal ependymoma suggested relative homogeneity among WHO grade 2 cases; however, clustering using probes of HOX cluster genes clearly differentiated them according to tumor location.

研究分野：脳神経外科

キーワード：glioma astrocytoma ependymoma spinal cord genetic analysis methylation whole exome sequencing

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫(グリオーマ)は一般に浸潤性の増殖を示し、完治が難しく再発しやすいため予後不良である。遺伝子解析技術の進歩とともにグリオーマの遺伝子解析が隆盛となり、小児に好発する脳幹グリオーマ Diffuse intrinsic pontine glioma (DIPG)を対象とした網羅的遺伝子解析で、*H3F3A*・*HIST1H3B*などヒストンをコードする遺伝子の変異が報告され^{1,2}、大脳半球に発生するグリオーマとは腫瘍発生メカニズムが異なると考えられたため、WHO 脳腫瘍分類改訂において、視床や脊髄などその他の正中に発生するグリオーマとともに“Diffuse midline glioma, H3 K27-mutant”という腫瘍概念として独立するに至った。

またグリオーマの一種である上衣腫は、脳室上衣細胞の形態を示す腫瘍で脳室と脊髄に後発する。上衣腫の発生・進展に関わる遺伝子異常は、ゲノム異常よりもエピゲノム異常が主体であるとされ、上衣腫はDNAメチル化アレイ解析により9つに分類されることが、ドイツのDKFZのグループから報告された。

我々は以前より正中グリオーマの遺伝子異常に着目し研究を行ってきた。成人の視床グリオーマでも高頻度に*H3F3A*-K27M変異を認め、変異のある症例ではメチル化プロファイルがDIPGに、ない症例では半球グリオーマに類似することを報告した³。また、成人の脳幹グリオーマでもヒストン遺伝子変異を約40%に認めることを報告した⁴。*H3F3A*-K27M変異はDIPGでは予後不良因子として知られるが、成人脳幹グリオーマや視床グリオーマでは予後との明らかな関連はなかった。表現型でなく遺伝子型で規定されるDiffuse midline glioma, H3 K27-mutantは、発生部位に関わらず生物学的挙動を同じくすると予想されるものの、実際は部位や年齢により臨床像や予後が異なる可能性が、我々の研究により示唆された。

脊髄において髄内に発生する腫瘍は稀であり、大規模な遺伝子解析研究は数少ない^{5,6,7}。我々は、国内脊髄外科主要施設である獨協医科大学・都立神経病院・大阪市立大学・東京大学の間で多施設共同研究の体制を整備済みであり、脊髄グリオーマ・上衣腫の治療の最適化及び新規治療の開発を目指し、本研究を立案した。

2. 研究の目的

WHO 脳腫瘍分類第4版改訂において独立した腫瘍概念となった“Diffuse midline glioma, H3 K27-mutant”の脊髄における臨床像を明らかにするとともに、脊髄グリオーマにおける新規治療標的を探索することを目的として、また比較的均一と思われる脊髄上衣腫における臨床像をより詳細に検討することを目的として、脊髄グリオーマ・上衣腫を対象とした大規模なゲノム・エピゲノム解析を行う。それに際し、共同研究施設より多数の臨床検体を収集する。臨床データも併せて収集し遺伝子解析データとの統合解析を行うことで、予後を規定する分子マーカーの同定を試みる。

3. 研究の方法

*IDH1/2*変異・*H3F3A*/*HIST1H3B*変異・*BRAF*変異等、頭蓋内グリオーマで既知の遺伝子異常の、脊髄グリオーマにおける頻度を検証すべく、上記の免疫染色・サンガーシーケンス等を行う。その結果を臨床データと統合し、生命予後や治療反応性の予測マーカーの抽出を試みる。特に*H3F3A*-K27M変異や*HIST1H3B*-K27M変異が脊髄グリオーマでもDIPGと同様予後因子かについて検討を加える。上記ヒストン遺伝子変異のある症例はDiffuse midline glioma, H3 K27-mutantであり、未知であるその臨床的特徴を探る。

次に、特にヒストン遺伝子変異のない症例において新規治療標的の探索を行う。凍結検体が充分収集できた段階で、癌関連遺伝子のターゲットシーケンスや全エクソーム解析等を行う。候補遺伝子があれば、遺伝子導入あるいはノックダウンによる遺伝子発現の変化や、腫瘍形成能・増殖能を検討する。

脊髄上衣腫においては、高頻度にみられる*NF2*変異・染色体22q欠失の解析を、サンガーシーケンス及びDNAメチル化アレイ解析にて行う。上衣腫ではゲノム異常よりもむしろエピゲノム異常が主体であるため、続いてDNAメチル化アレイを用いたエピゲノム解析を行う。また臨床データと統合し、エピゲノム異常に関連する臨床像の検証を行うとともに、局所再発や播種再発、予後に関連する分子マーカーの抽出を試みる。

4. 研究成果

脊髄グリオーマに関しては、獨協医科大学・都立神経病院・東京大学から30症例の臨床検体を収集した。年齢は1から84歳(中央値43歳) 男女比は19:11であった。腫瘍部位は頸髄16症例、胸髄11症例、腰髄3症例で、WHOグレードはグレード4が7症例、グレード3が12症例、グレード2が11症例であった。そのうち免疫染色にてH3K27M陽性であったのは9症例(30.0%)であり、既報の38%と同様であった⁸。陽性症例(脊髄Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant (DMGH3K27M))9例を陰性症例21例と比較すると、年齢・性別・腫瘍部位に有意な差は見られなかったが、WHOグレードに関しては陽性症例では全てがグレード3/4の悪性であり、有意差が見られた($P=0.0005$)。これも既報と合致した結果であった^{8,9}。H3K27M陽性症例は6歳から76歳にわたり全年齢層にも見られ、腫瘍部位も高位頸髄から円錐部まで存在した。造影増強効果も症例により大きく異なった。凍結検体が充分に得られた症例で*H3F3A*及び*HIST1H3B*変異の検出を行ったところ、サンガーシーケンスで確認し得た症例は全て*H3F3A*-K27M変異であった。なお、*IDH1*-R132S変異が一例に見られ、*BRAF*-V600E変異は認められなかった。予後解析では、H3K27M変異は全生存期間との有意な相関は見られず($P=0.29$)、一方でWHOグレードは全生存期間との間に有意な相関が見られた($P=0.01$)(左下図)。これらの解析結果より、脊髄グリオーマにおいてはH3K27M変異の予後に与える影響はDIPGよりも不明瞭であり、WHOグレードを加味する必要があること、また脊髄DMGH3K27Mの臨床像は成人にも多く高齢者にも見られ、発生部位や造影パターンにも一定の傾向が見られないことが示唆された。脊髄グリオーマにおけるWHOグレードの重要性は、脊髄DMGH3K27Mに関する最近の報告でも唱えられている¹⁰。今後さらなる症例の蓄積が必須と考えられた。

脊髄DMGH3K27Mの一例において、初発及び再発のホルマリン固定パラフィン包埋検体を用いてToday OncoPanel

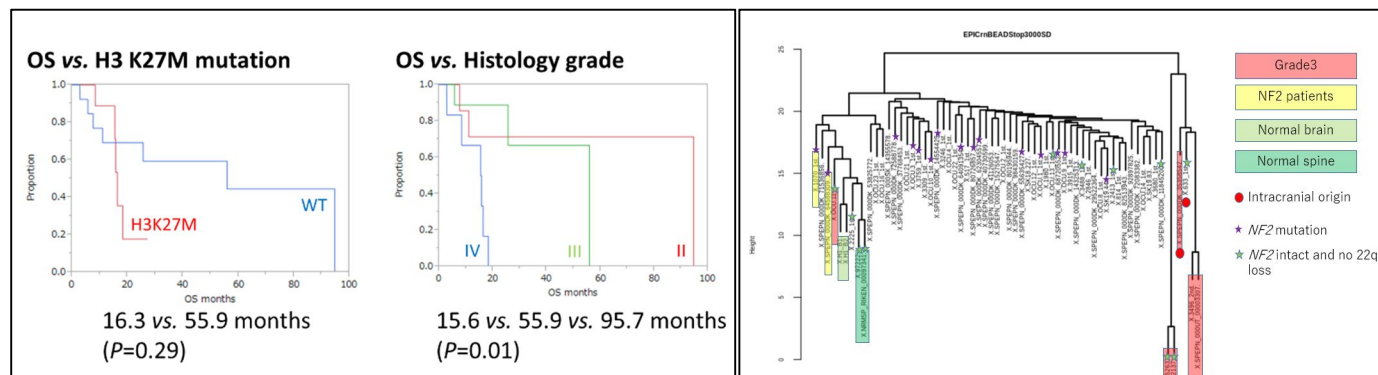
によるパネル検査（465 がん関連遺伝子）を施行したところ、初発検体において *H3F3A* K27M 変異を含む 5 つの遺伝子変異を認めたのに加え、再発検体において *NF1* 遺伝子のナンセンス変異を認め（c.1796G>A, p.W599*）これが腫瘍の悪性化に関与した可能性が示唆された。また、凍結検体と血液検体のペア検体がある症例のうち、十分な DNA 収量があり、TapeStation (Agilent)による QC により DNA 断片化が許容範囲内と思われた症例を対象に全エクソーム解析を施行した。Agilent SureSelect V6 plus COSMIC (Agilent Technologies)を用いてライブラリー作成に成功したものは 4 ペアのみであった。Illumina HiSeq2000 (Illumina)にてシーケンスを行った。腫瘍率は 0.12 ~ 0.93 (中央値 0.75) コード領域の平均深度は 32.9x ~ 111.0x (中央値 82.1x) 20 リード以上を確保できた領域は 69.5% ~ 97.5% (中央値 78.3%) オンターゲット率は 80.2% ~ 92.6% (中央値 88.0%) であった。腫瘍率で補正されたアレール頻度が 0.15 以上の体細胞変異のみを選択すると、体細胞変異数は 25 ~ 4846 (中央値 429) であった。最多の症例では *POLE* 遺伝子に変異を認め、病的意義は明らかでないものの ToMMo (<https://jmorp.megabank.tohoku.ac.jp/202102/variants>) には SNP としての記載もなく、シグニチャー解析 (https://cancer.sanger.ac.uk/signatures/signatures_v2/)にて Signature 6 に類似しており、ミスマッチ修復遺伝子の変異による hypermutator の可能性が示唆された。なお患者は 6 か月女児で、初発であり前治療歴はなかった。過半数の症例で認められた体細胞変異は *PLEC* 遺伝子が唯一であったが、ClinVar (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>)によると一症例で認められた c.G2237A: p.R746H は likely benign であり、病的意義は不明であった。解析症例数が少なく確定的とは言えないため、さらなる症例の確保のために共同研究体制の拡張を検討している。

脊髄上衣腫に関しては、全 4 施設より 57 名 58 症例の凍結検体を収集した。年齢は 18 歳から 78 歳 (中央値 52 歳)、男女比は 32:25 であった。腫瘍部位は頸髄 30 症例、胸髄 27 症例、腰髄 1 症例で、WHO グレードはグレード 2 が 53 症例、グレード 3 が 5 症例であった。都立神経病院検査科にて中央病理診断を行った結果、上衣腫以外の診断を受けた症例は解析対象から除外した。全症例において腫瘍含有率は充分高く、正常細胞の混入による影響はないと思われ、細胞異型度・細胞密度・壊死・上衣管の有無について診断を行った。

サンガーシーケンスにて *NF2* 変異解析を行い、58 症例中 15 症例 (25.9%) に認められた。後述のメチル化アレール解析により 22q loss は 58 症例中 45 症例 (77.6%) に認められた。続いて Infinium MethylationEpic BeadChip (Illumina) を用いて DNA メチル化アレール解析を行った。Cluster3.0 にて標準偏差の大きい上位 3000 プローブを用いて階層化クラスタリングを行ったところ、NF2 患者症例や WHO グレード 3 症例は、大部分の WHO グレード 2 症例とは別のクラスターに分類された (右下図)。また、上位 3000 プローブのうち *HOX* 遺伝子関連プローブが有意に多かったため、公開データベース GEO Series GSE65362⁷ と自験例データベースを統合し、*HOX* 遺伝子関連プローブのみに絞った階層化クラスタリングを行ったところ、脊髄上衣腫が発生部位ごとに明確に区別された。比較的均一な患者群と思われた WHO グレード 2 上衣腫症例のみで *HOX* 遺伝子のメチル化でクラスタリングを行った結果でも、頸髄発生と胸髄発生とで明確に別クラスターに分類された。なお、脊髄上衣腫の中で *MYCN* 遺伝子増幅がある症例は予後不良であることが知られ¹¹、次版の WHO 脳腫瘍分類では独立した腫瘍概念として提唱される予定であるが、我々の国内最大のコホートでも *MYCN* 遺伝子増幅は見られず、人種間の相違も示唆された。

【参考文献】

1. Schwartzentruber et al. Nature 2012
2. Wu et al. Nat Genet 2012
3. Aihara et al. Neuro Oncol 2014
4. Tanaka et al. 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy 2016.
5. Gessi et al. Acta Neuropathol 2015
6. Shankar et al. Acta Neuropathol 2016
7. Pajtler et al. Cancer Cell 2015
8. Zhang et al. Cancer Med 2020
9. Yi et al. Neurosurgery 2018
10. Wang et al. Neurosurgery 2021
11. Ghasemi et al. Acta Neuropathol 2019



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Takai Keisuke, Tanaka Shota, Sota Takashi, Mukasa Akitake, Komori Takashi, Taniguchi Makoto	4. 巻 108
2. 論文標題 Spinal Cord Astrocytoma with Isocitrate Dehydrogenase 1 Gene Mutation	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 991.e13~991.e16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.wneu.2017.08.142	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14件（うち招待講演 3件／うち国際学会 6件）

1. 発表者名 Shota Tanaka, Shunsaku Takayanagi, Yuki Shinya, Mariko Kawashima, Masahiro Shin, Hirofumi Nakatomi, Nobuhito Saito
2. 発表標題 Biopsy-proven diffuse midline glioma in adolescents and young adults
3. 学会等名 19th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Erika Yamazawa, Shota Tanaka, Genta Nagae, Hiroko Meguro, Takayoshi Umeda, Kenji Tatsuno, Taijun Hana, Phyo Kim, Fumi Higuchi, Toshihiro Takami, Yuta Nakanishi, Keisuke Takai, Takashi Komori, Masashi Nomura, Akitake Mukasa, Kazuhiko Ishii, Hideaki Imai, Hiroyuki Aburatani, Nobuhito Saito
2. 発表標題 Epigenomic analysis of spinal ependymoma
3. 学会等名 25TH ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE SOCIETY FOR NEURO-ONCOLOGY（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Erika Yamazawa, Shota Tanaka, Kazuhiko Ishii, Shunsaku Takayanagi, Nobuhito Saito
2. 発表標題 Clinical features of spinal ependymoma
3. 学会等名 11th Asia Spine Annual Meeting（国際学会）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kazushige Itoki, Ryu Kurokawa, Testuro Niizato, Shota Tanaka, Erika Yamazawa, Hazuki Matsuda, Phyo Kim
2. 発表標題 Thoracic diffuse midline glioma, pathological findings changed over 2 years, case report
3. 学会等名 11th Asia Spine Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Erika Yamazawa, Shota Tanaka, Genta Nagae, Hiroko Meguro, Takayoshi Umeda, Kenji Tatsuno, Taijun Hana, Phyo Kim, Fumi Higuchi, Toshihiro Takami, Yuta Nakanishi, Keisuke Takai, Takashi Komori, Masashi Nomura, Akitake Mukasa, Kazuhiko Ishii, Hideaki Imai, Hiroyuki Aburatani, Nobuhito Saito
2. 発表標題 Epigenetic analysis of spinal ependymoma
3. 学会等名 79th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田中將太
2. 発表標題 グリオーマの遺伝子異常と改訂WHO分類
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍病理学会教育セミナー (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 山澤恵理香、田中將太、高柳俊作、北川陽介、花大洵、小池司、串原義啓、齊藤延人
2. 発表標題 脊髄上衣腫の臨床像
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 田中將太
2. 発表標題 グリオーマの遺伝子異常と改訂WHO分類
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍病理学会教育セミナー（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shota Tanaka
2. 発表標題 Clinical implication of H3 K27M mutation in spinal cord astrocytoma
3. 学会等名 22nd International Conference on Brain Tumor Research and Therapy（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中將太，高柳俊作，野村昌志，牛久綾，油谷浩幸，高阪真路，間野 博行，齊藤延人
2. 発表標題 神経膠腫に対するがん関連遺伝子パネル検査（Today OncoPanel）の初期使用経験
3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 田中將太，大谷亮平，本郷博貴，松田葉月，池村雅子，野村昌志，高柳俊作，根城堯英，高橋慧，北川陽介，花大洵，小池司，武笠晃丈，植木敬介，小森隆司，谷口真，齊藤延人，金彪
2. 発表標題 脊髄グリオーマの臨床像と遺伝子解析
3. 学会等名 第36回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Shota Tanaka, Ryohei Otani, Hiroataka Hongo, Hazuki Matsuda, Akitake Mukasa, Keisuke Ueki, Takashi Komori, Makoto Taniguchi, Nobuhito Saito, Phyo Kim
2. 発表標題 Unveiling diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant in the spinal cord
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shota Tanaka, Ryohei Otani, Hiroataka Hongo, Hazuki Matsuda, Masako Ikemura, Masashi Nomura, Shunsaku Takayanagi, Takahide Nejo, Satoshi Takahashi, Yosuke Kitagawa, Taijun Hana, Akitake Mukasa, Keisuke Ueki, Takashi Komori, Makoto Taniguchi, Nobuhito Saito, and Phyo Kim
2. 発表標題 Clinical and genetic characteristics of diffuse midline glioma in the spinal cord
3. 学会等名 22ND ANNUAL SCIENTIFIC MEETING OF THE SOCIETY FOR NEURO-ONCOLOGY (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Shota Tanaka, Ryohei Otani, Hiroataka Hongo, Hazuki Matsuda, Masako Ikemura, Masashi Nomura, Shunsaku Takayanagi, Takahide Nejo, Satoshi Takahashi, Yosuke Kitagawa, Taijun Hana, Akitake Mukasa, Keisuke Ueki, Takashi Komori, Makoto Taniguchi, Nobuhito Saito, and Phyo Kim
2. 発表標題 脊髄グリオーマにおけるH3 K27M変異の臨床的意義
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017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
---------------------------	-----------------------	----

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