

令和 2 年 6 月 12 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15659

研究課題名(和文) 病理組織形態学に根ざした中枢神経系胚細胞腫の分子病態の探索

研究課題名(英文) Molecular analysis of intracranial germ cell tumors based on histopathological background

研究代表者

里見 介史 (satomi, kaishi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医員

研究者番号：10633977

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、頭蓋内胚細胞腫(iGCT)の病態解明を目指して、染色体腕コピー数異常に着目した、分子生物学的、臨床病理学的解析を行った。

iGCT83例と正常検体6例のInfinium Human Methylation 450K BeadChipによる解析では、12番染色体短腕のgain(12p gain)は37.3%の症例にみられた。臨床病理学的解析から、12p gainはiGCT患者の予後予測する指標であった。さらに、FISH法による解析で、12p gainは、倍数性の異常とともに同一腫瘍内の異なる組織型で共通しており、これらが腫瘍発生の比較的早期に発生する異常であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

頭蓋内胚細胞腫(iGCT)は、悪性度の異なる6つの組織型から構成され、複数の組織型が同一腫瘍内に混在することがある。本研究では、12番染色体短腕のgain(12p gain)は予後不良な組織型で高頻度に見られることが明らかとなり、iGCT患者の予後予測マーカーとして臨床応用可能と考えられる。

また、12p gainに加え倍数性(染色体セットの数)の異常は、同一腫瘍内であれば組織型が異なっても共通することが明らかとなり、これらの異常がiGCTの腫瘍発生の比較的早期に発生するイベントであることが示唆され、病態解明の一助となる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the pathogenesis of intracranial germ cell tumors (iGCTs). We analyzed a copy number analysis by multi-institutional study.

Firstly, we analyzed DNA methylation profile in 83 iGCTs and 6 normal control samples using Infinium Human Methylation 450K BeadChip array and found 12p gain in 37.3% of iGCTs. Then, 58 iGCTs with clinicopathological information were analyzed for progression-free survival (PFS) and overall survival (OS). Both PFS and OS were significantly worse in iGCTs with 12p gain. Lastly, fluorescence in situ hybridization (FISH) study was carried out on 3 mixed iGCT cases. Different histological components in each mixed GCT shared the same 12p copy number status within each mixed GCT case. Gain of 12p can be a molecular marker to predict prognosis and an early event in tumorigenesis prior to histological differentiation in iGCTs.

研究分野：人体病理学

キーワード：胚細胞腫 中枢神経系 DNAメチル化 コピー数異常 FISH 予後

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

胚細胞腫は小児期から青年期の性腺(精巣・卵巣)に好発する悪性腫瘍で、個体発生の初期段階を模倣する種々の組織型がみられるが、性腺外では中枢神経系に最も高頻度に発生する。中枢神経系胚細胞腫(iGCT)は下垂体部や松果体部に好発し、性腺胚細胞腫とほぼ同様の組織所見を呈し、臨床予後や発現するタンパクマーカーもほぼ同様である。現在までに、iGCTは治療指針決定の観点から、発生頻度が高く治療反応性の良いジャーミノーマとそれ以外の Non-germinomatous germ cell tumor (NGGCT) に大別される。

最も高頻度に胚細胞腫が発生する精巣では、腫瘍発生にKITおよびRAS遺伝子の異常に加え、12番染色体短腕(12p)のコピー数異常(isochromosome 12p)が関与することが知られている。当研究室は2012年より頭蓋内胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム(iGCT Consortium)を立ち上げ、250検体を超える世界最大のiGCTコホートがすでに構築され、詳細かつ大規模なゲノム解析を行い、(i) Sanger法による候補遺伝子の変異解析で、中枢神経系のジャーミノーマでも相互排他的なKIT遺伝子とRAS遺伝子の変異が高頻度(60%)にみられること [Fukushima, 2016, Acta Neuropathol.]、(ii) 次世代シーケンサーによる全エクソン解析で、ジャーミノーマとNGGCTの遺伝子変異プロファイルが共通すること [Ichimura, 2016, Acta Neuropathol.]、(iii) MAPK経路異常(主にKIT変異)とPI3K経路異常(主にMTOR変異)においてそれぞれ相互排他的な遺伝子異常を有すること [Ichimura, 2016, Acta Neuropathol.]を報告してきた。

しかし、新鮮凍結材料をホモジナイズして解析する分子生物学的解析手法では、遺伝子変異の検索は可能であっても、染色体コピー数の絶対数や比を正確にとらえることは困難であり、特に予後の異なる組織型が混在するNGGCTにおける各組織型の12pのコピー数異常を正確にとらえることは困難であった。

2. 研究の目的

頭蓋内胚細胞腫における染色体腕コピー数異常について、分子生物学的検索結果の病理組織形態学的な検証により、腫瘍発生メカニズムに迫ることを目指す。

3. 研究の方法

材料: 当研究室で収集されたiGCTコホートから、iGCT 83例、精巣胚細胞腫3例、および正常組織6例の新鮮凍結検体を選択した(表1)。そのうち、3例のiGCTと2例の精巣胚細胞腫(セミノーマ)は、新鮮凍結検体と同時に採取されたホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)材料を用いた。既に全エクソン解析により、MAPK経路異常(主にKIT変異)とPI3K経路異常(主にMTOR変異)が解析されている症例も含まれており、その情報を利用した。

表1

組織型	予後	解析数
ジャーミノーマ	Favorable	42例
成熟奇形腫	Favorable	7例
未熟奇形腫	Unfavorable	4例
卵黄嚢腫瘍	Unfavorable	5例
絨毛癌	Unfavorable	1例
胎児性癌	Unfavorable	1例
混合性胚細胞腫	Favorable/Unfavorable	22例
セミノーマ	-	3例
正常	-	6例

ゲノムワイドメチル化解析: 凍結検体から抽出したgenomic DNAに対して、EZ ENA Methylation Kit (Zymo Research Corporation)を用いてパイサルファイト処理を行い、Infinium Human Methylation 450K BeadChip (450K) (illumina)によりゲノムワイドなメチル化解析を行った。450Kで得られたidatファイルから、Rおよびそのパッケージであるminfiを用いて全485,512個のプロープのコピー数を算出し、染色体腕ごとの平均値をそのコピー数とした。対照には、同時に解析した正常組織6検体からQC値の低い1検体(血液)を除いた5検体を用いた。また、GitHubよりPurifyパッケージを取得し、腫瘍含有率を算出した。

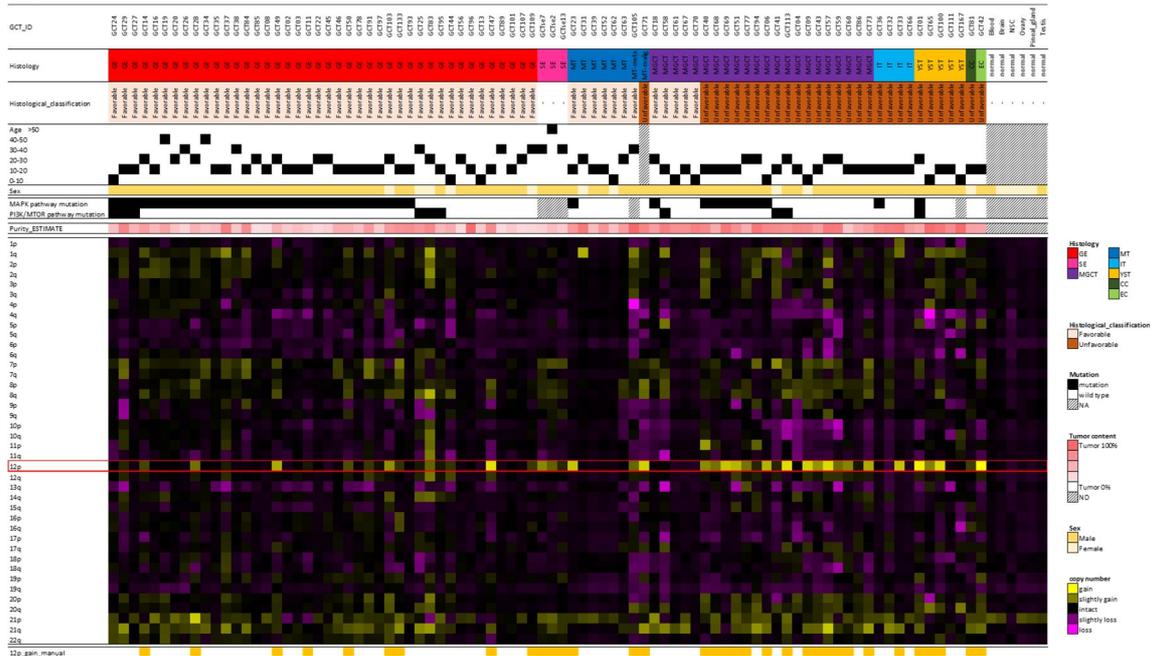
Fluorescence *in situ* hybridization 法: FFPE材料から4μmの厚さで薄切した切片を、抗原賦活化液 pH9 (Nichirei) 100 20分にて前処理したのち、12p/CEP12プロープ(Vysis)ないし19p/19qプロープ(Leica)をハイブリダイズさせ、DAPIにて対比染色をした。腫瘍細胞を100個以上評価して、12pシグナルと12番染色体セントロメア(CEP12)シグナルの比が1.5を超えるものを12p gainと評価した。CEP12シグナル、19p、19qシグナルが3以上認められた細胞をポリソミー細胞と判定した。

4. 研究成果

(1) 頭蓋内胚細胞腫における 12 番染色体短腕のコピー数異常

12p gain は、iGCT 全体の 37.3% (31/83) でみられた。さらに、iGCT のうち、ジャーミノーマの 21.4% (9/42)、NGGCT の 52.5% (21/40) で 12p gain が認められた (図 1)。既に解析されていた MAPK 経路異常や PI3K 経路異常とは 12p gain は独立しており、腫瘍含有率との関連もなかった。なお、全染色体のうち、19p と 19q は最も変化の少ない染色体腕であった。

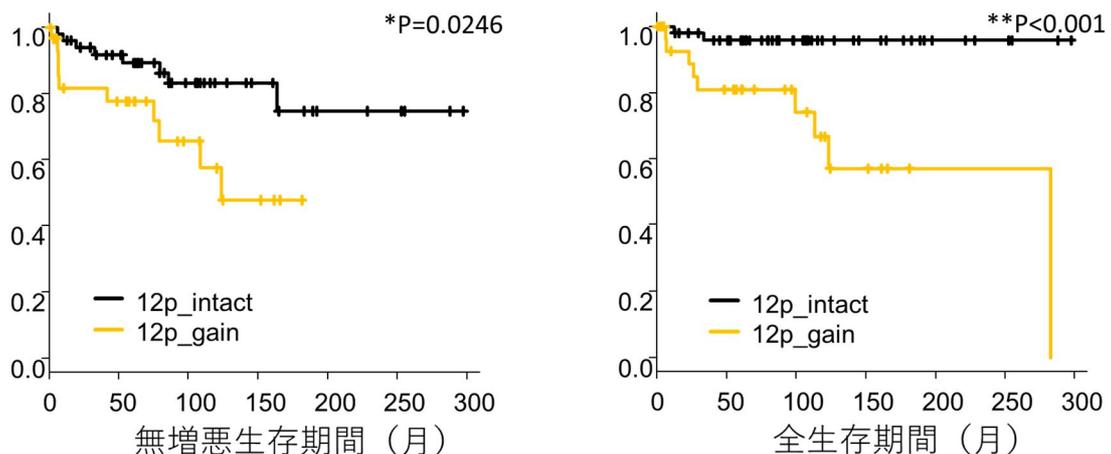
図 1



(2) 12p gain の臨床的意義

現在までにどの臓器に発生した胚細胞腫でも 12p gain は予後規定因子ではない。後ろ向き検討を行うと、iGCT においては、無増悪生存期間、全生存期間ともに 12p gain の有無は有意差がみられ、予後不良因子であった (図 2)。

図 2



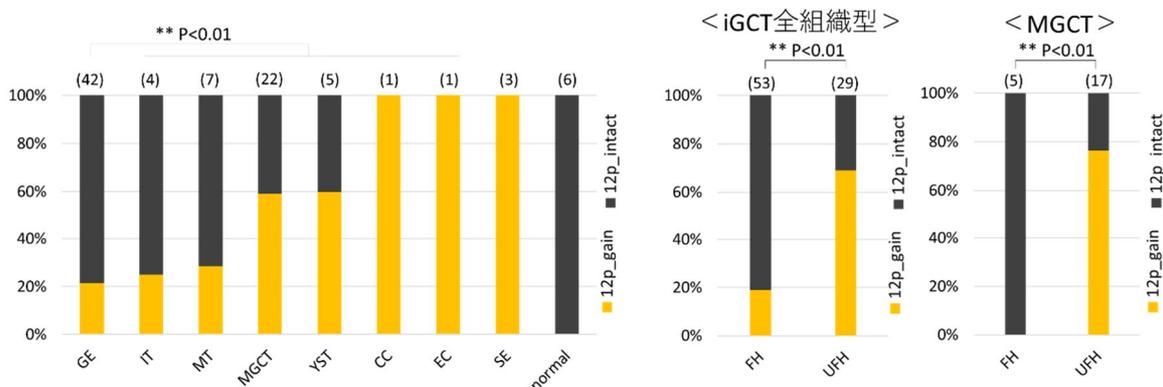
次に、胚細胞腫を、予後良好な組織型であるジャーミノーマ、成熟奇形腫 (Favorable histology; FH) と、予後不良な組織型である未熟奇形腫、絨毛癌、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍 (Unfavorable histology; UFH) に分けて、組織型と 12p gain の関連をみた。UFH では有意に 12p gain が高頻度に見られた (表 2)。さらに、臨床的に iGCT の予後因子として確立されている血清中や髄液中の AFP および β HCG 値を含む単変量解析を行ったところ、組織型と AFP 値 (血清中、髄液中) で有意差がみられたが、多変量解析では組織型のみが独立した唯一の予後不良因子となった (表 2)。

表 2

		12p_gain	12p_intact	Univariate analysis† P-value	Multivariate analysis‡		
		(N = 29)	(N = 49)		OR	95% C.I.	P-value
Age yr	<6	2	2	0.63	-	-	-
	≥6	27	47				
Sex	M	25	43	1.0	-	-	-
	F	4	6				
Site *	Typical	21	32	0.62	-	-	-
	Atypical	8	17				
Histology	FH	11	41	1.0 e-4	5.5	1.3-23	1.9 e-3
	UFH	18	8				
AFP_CSF	>10ng/mL	8	3	1.6 e-2	1.9	0.26-14	0.532
	≤10ng/mL	21	46				
AFP_Serum	>10ng/mL	15	8	1.7 e-3	1.3	0.25-7.1	0.746
	≤10ng/mL	14	41				
HCG_CSF	>5 IU/L	5	3	0.14	1.5	0.20-12	0.679
	≤5 IU/L	24	46				
HCG_Serum	>5 IU/L	7	6	0.21	1.2	0.25-5.7	0.822
	≤5 IU/L	22	43				
MAPK pathway	Mutant	15	24	1.0	-	-	-
	Wild type	14	25				
PI3K pathway	Mutant	2	8	0.31	-	-	-
	Wild type	27	41				
(Intercept)					0.24	0.12-0.49	9.1 e-5

組織型別の検討を行うと、12p gain は UFH に分類される組織型で高頻度にみられるほか、複数の組織型が混在した混合性胚細胞腫 (MGCT) に限定した解析においても、UFH に分類される組織型から構成される腫瘍群で 12p gain が高頻度にみられる一方、FH に分類される予後良好な組織型のみから構成される群では 12p gain は認められず、有意差がみられた (図 3)。

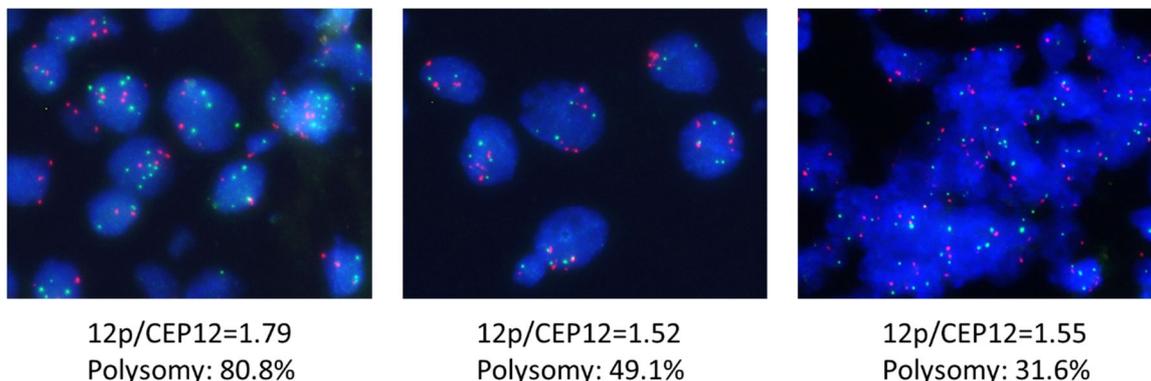
図 3



(3) FISH による 12p gain のコピー数解析

まず、精巣のセミノーマ 2 例で検討したところ、12p/CEP12 比は 1.58, 1.51 と 12p gain を認め、いずれの組織型でもポリソミー細胞が高頻度 (50%以上) にみられた。さらに、iGCT のうち、3 例の MGCT で検討をしたところ、450K の解析で 12p gain が認められた 1 例では各組織型で FISH でも 12p gain が確認された (12p/CEP12 比; 1.79, 1.52, 1.55, それぞれジャーミノーマ、未熟奇形腫、卵黄嚢腫瘍) (図 4)。いずれの組織型でもポリソミー細胞が 30%以上に認められた。

図 4



一方、450Kによるコピー数解析で12p gainが認められなかった2例では、FISHでもいずれの組織型にも12p gainはみられなかったが、ポリソミー細胞が40%以上で認められた。なお、いずれの症例でも19p, 19qプローブでもポリソミー細胞が確認されたが、19p/19q比に異常はなかった(表3)。

表3

	12p/12q_450k	12p/CEP12	chr12_polysomy	19p/19q_450k	19p/19q	19p_polysomy	19q_polysomy
GCT51-GE	amp	1.79	80.8	intact	0.86	27.1	37.5
GCT51-IT	amp	1.52	49.1	intact	0.87	18.9	26.4
GCT51-YST	amp	1.55	31.6	intact	0.88	21.4	30.1

	12p/12q_450k	12p/CEP12	chr12_polysomy	19p/19q_450k	19p/19q	19p_polysomy	19q_polysomy
GCT58-GE	intact	1.07	47.1	intact	0.89	26.2	31.1
GCT58-MT	intact	1.04	42.9	intact	0.85	33.3	46.3

	12p/12q_450k	12p/CEP12	chr12_polysomy	19p/19q_450k	19p/19q	19p_polysomy	19q_polysomy
GCT86-GE	intact	1.25	47.3	intact	0.97	44.2	46.2
GCT86-MT	intact	1.14	57.4	intact	0.97	46.3	52.2
GCT86-YST	intact	1.24	50.0	intact	0.93	48.4	56.5
GCT86-EC	intact	1.33	46.5	intact	0.85	43.1	64.7

本研究により、性腺に発生する胚細胞腫では80%以上に認められる12p gainは、iGCTでは比較的頻度が低いことが明らかとなった。さらに、12p gainは予後不良な組織型の存在を示唆し、血清や髄液中のAFP値よりも強い予後不良規定因子であるため、臨床応用可能な分子生物学的マーカーであることが示された。

性腺発生胚細胞腫は、胎生期に存在する始原生殖細胞の残存が腫瘍発生の起源と考えられており、精巣胚細胞腫では、isochromosome 12pおよび3倍体化が腫瘍発生の早期イベントであることが報告されている[Shen et al. 2018, Cell Reports]。iGCTにおいてもジャーミノーマが始原生殖細胞同様、ゲノムワイドな低メチル化状態を呈することが示され、さらにMGCTにおける遺伝子変異は各組織型で共通することから、遺伝子変異は腫瘍発生のより早期に起こるイベントであることが示唆されている[Fukushima et al. 2017, Acta Neuropathol.]。本研究でiGCTにおいても12p gainと倍数体化がMGCTの各組織型で同一の状態を呈することが明らかとなり、これらが腫瘍発生の比較的早期に発生するイベントであることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Kaishi Satomi, Hirokazu Takami, Shintaro Fukushima, Ryo Nishikawa, Masao Matsutani, Koichi Ichimura
2. 発表標題 Gain of short arm of chromosome 12 is a molecular marker to predict prognosis and represents an early event in tumorigenesis in intracranial germ cell tumors
3. 学会等名 International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 里見介史、高見浩数、福島慎太郎、中里洋一、田中將太、齊藤延人、金森政之、隈部俊宏、小林啓一、永根基雄、井内俊彦、吉本幸司、田村郁、前原健寿、酒井圭一、杉山一彦、横上聖貴、竹島秀雄、埜中正博、浅井昭雄、西川亮、松谷雅生、市村幸一
2. 発表標題 頭蓋内胚細胞腫における、12p gainの臨床病理学的検討
3. 学会等名 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaishi Satomi, Kai Yamazaki, Akihiko Yoshida, Susumu Wakai, Yuko Matsushita, Yoshitaka Narita, Keisuke Ueki, Ryo Nishikawa, Koichi Ichimura
2. 発表標題 Development of a novel FISH probe for detection of 1p/19q codeletion in routine glioma diagnosis
3. 学会等名 Maastricht Pathology 2018 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018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
---------------------------	-----------------------	----