

令和元年6月5日現在

機関番号：12602  
研究種目：若手研究(B)  
研究期間：2017～2018  
課題番号：17K16630  
研究課題名(和文) 悪性髄膜腫の網羅的遺伝子解析および動物モデルの作成

研究課題名(英文) Exhaustive gene analysis of malignant meningioma

研究代表者

工藤 琢巳 (KUDO, Takumi)

東京医科歯科大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：90632125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：一般的には良性である髄膜腫の中に、悪性のものがあり、今回悪性髄膜腫の遺伝子の発現状況に関する研究を行ったところ、悪性髄膜腫では解糖系酵素であるPGK1の発現が優位に上昇していた。PGK1はさまざまな癌において発現が増加している。PGK1を発現抑制するとその細胞増殖が抑制された。他の癌においてPGK1の発現は予後不良因子であり、髄膜腫においても癌遺伝子として機能している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性髄膜腫と良性髄膜腫の腫瘍検体から抽出したRNAから、RNA-seqを用いて全遺伝子発現状況を測定し、いくつかの癌遺伝子の発現上昇を確認した。また乳癌における各遺伝子の発現と生存予後との関連を調べた。遺伝子発現量の順位と生存予後との関連における順位のRANK productを算出したところ、解糖系酵素のPGK1が抽出された。これは他の癌においても予後不良因子であることがわかっており、悪性髄膜腫においても癌遺伝子として機能している可能性が示唆された。今後はPGK1の発現や活性を制御する機序を解明し、あらたな治療法の開発を進める。

研究成果の概要(英文)：The whole genome expression profile of malignant meningioma using RNA-seq showed increase of some oncogenes. Rank product of gene expression and p-value of Log-Rank test of overall survival in the patients with breast cancer showed that one of glycolytic enzyme, PGK1 was one of the candidate of oncogene of malignant meningioma. In other cancers, the expression of PGK1 was increased, and high expression of PGK1 is one poor prognosis factor. PGK1 knockdown showed the decrease of cell proliferation in malignant meningioma cell line. These data suggests that PGK1 is the candidate of oncogene in malignant meningioma like other cancers.

研究分野：脳神経外科

キーワード：悪性髄膜腫 遺伝子解析 解糖系酵素

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

### 髄膜腫の疫学

髄膜腫は原発性頭蓋内腫瘍のうち **26.4%** を占め、最も発生頻度の高い腫瘍の一つであり、その悪性度により **WHO grade** ~ に分類されている。**Grade** では手術摘出により **5 年生存率 95.9%** と良好な治療効果が得られているが、**grade** (異形成髄膜腫)、**grade** (退形成性髄膜腫) では手術摘出に化学療法、放射線照射療法を加えても再発率は高く、**5 年生存率は 66.3%** と良好な治療成績が得られていない(日本脳腫瘍統計 **2009 年版**)。Grade 髄膜腫は癌のように浸潤性が高く、病理組織像では細胞分裂像および退形成性が認められる。悪性神経膠腫の研究は多岐にわたり様々な研究が行われているが、悪性髄膜腫(Grade 及び Grade 髄膜腫と定義する)は未だに不明な点が多く、研究課題の多い疾病である。

### 悪性髄膜腫の分子細胞生物学的特徴

悪性髄膜腫の遺伝子異常に関する報告はいくつかある。染色体上の変異が **Grade** 髄膜腫の **60%**、**Grade** 髄膜腫の **90%** に認められており、悪性髄膜腫においても他の悪性腫瘍と同様に遺伝学的異常との関連が示唆されている。第 **1**、**9**、**10**、**14** 染色体の異常が悪性髄膜腫の浸潤、進展に関連があると報告されており、この部位に存在する責任遺伝子の候補として、**TP73**、**CDKN2C (p18INK4c)**、**RAD54L**、**ALPL**、**Wnt**、**IGF**、**CDKN2a(p16)**、**p14(ARF)**、**CDKN2b(p15)** などが挙げられている。ほかにも **PI3K/AKT pathway**、**p38/MAPK pathway** の活性化、**EGF**、**FGF** などの成長因子の増幅も悪性髄膜腫において報告されているが、詳細な解析は現在行われているところである。

### 悪性髄膜腫に対する化学療法

**National Comprehensive Cancer Network (NCCN)** のガイドライン(**2011 年版**)によると、悪性髄膜腫に勧められる化学療法として、**ハイドロキシウレア**、**インターフェロン-2b**、**サンドスタチン** を挙げているが、これの根拠となる論文は少数であり、さらなる検討が必要である。昨今悪性髄膜腫の遺伝子解析から **mTOR inhibitor**、**PDGF inhibitor**、**EGFR inhibitor** が有望視されたが現時点で臨床的に有用性を証明した研究はなく、悪性髄膜腫に対する治療法の開発は喫緊の課題である。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、悪性髄膜腫(**WHO Grade** および **Grade** 髄膜腫と定義する)の遺伝学的特徴を解析し、その結果をもとに治療標的を探索すること、及び悪性髄膜腫の動物モデルを作成することである。**Grade** 髄膜腫は外科的治療により良好な治療成績が得られるが、悪性髄膜腫は再発率が高く、生存予後も満足のものではない。神経膠芽腫や他の悪性腫瘍と比べ分子細胞生物学的に不明な点が多く、本研究では分子細胞生物学的手法を用いて悪性髄膜腫の性格を明らかにし、新たな治療標的を同定することに目的の主眼を置く。

## 3. 研究の方法

手術により採取した悪性髄膜腫および比較対象として用いる **Grade** 髄膜腫から RNA を抽出し、microarray により全遺伝子の発現状況を網羅的に解析する。Ingenuity Pathway Analysis を用いて pathway 解析を行う。遺伝子発現量の相違、pathway analysis の結果をもとに悪性髄膜腫に影響を及ぼしうる遺伝子、pathway の候補を同定し、治療標的を探索する。

## 4. 研究成果

**Grade** 髄膜腫 5 個、**Grade** 髄膜腫 3 個、**Grade** 髄膜腫 2 個の腫瘍検体から **TRIZOL** をもちいて total RNA を抽出し、RNA sequence を用いて全遺伝子の mRNA の発現量を網羅的に測定した。**Grade** 髄膜腫 2 個は多型性が強い傾向が認められたため今回の研究の対象からは除外した。**Grade** と **Grade** とでは異なる遺伝子発現状況が観察された(図 1)。

**Grade** に比して **Grade** の髄膜腫において有意に発現量が増加していた 2045 個の遺伝子と有意に減少していた 585 個の遺伝子を Ingenuity Pathway Analysis を用いて解析した(図 2)。Functional Analysis では、Cancer、Organismal Injury and abnormalities、Gastrointestinal Diseases、Infectious Diseases、Protein Synthesis が **Grade** において認められた機能だった。

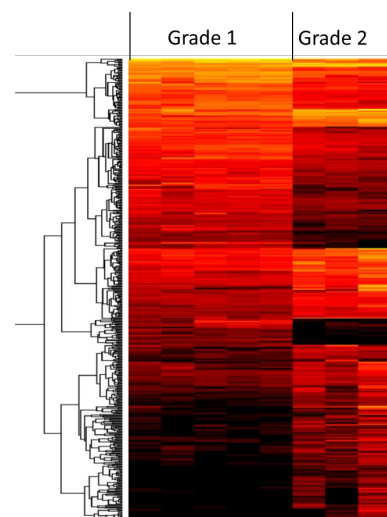


図 1

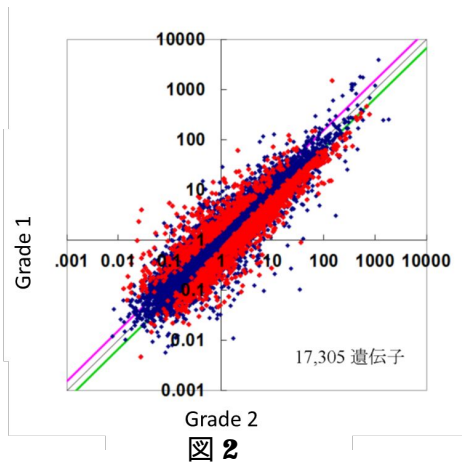
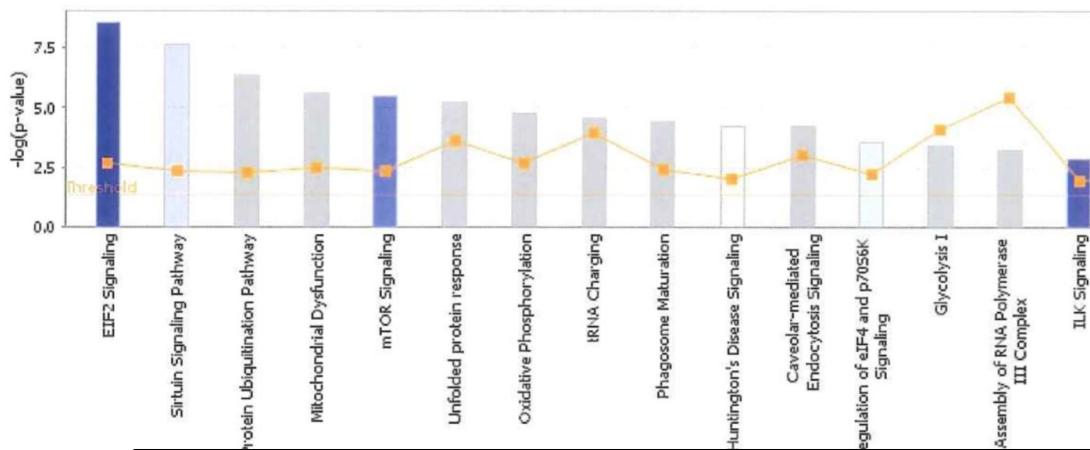


図 2

さらに Pathway analysis を行うと、EIF2 signaling Sirtuin Signaling Pathway, Protein Ubiquitination Pathway, Mitochondrial Dysfunction, mTOR Signaling の順に Grade で活性化されていることが示唆された。

Grade /Grade の発現比、Grade /Grade の発現比、TCGAの乳癌における各遺伝子発現量と生存期間の解析での Logrank test の p 値をもとに Rank Product を算出し、上位 10 個の遺伝子を抽出した(図 4)。この 10 個の遺伝子の発現量と生存期間の解析を Logrank test、Cox 比例ハザードモデル、Maxstat のそれぞれの p 値を算出すると、PGK1 が最も生存期間に関する、悪性髄膜腫において高発現する遺伝子として抽出された(図 5)。



| Name                           | p-value  | Overlap       |
|--------------------------------|----------|---------------|
| EIF2 Signaling                 | 2.60E-09 | 22.6 % 50/221 |
| Sirtuin Signaling Pathway      | 2.41E-08 | 19.9 % 58/292 |
| Protein Ubiquitination Pathway | 4.59E-07 | 19.2 % 51/265 |
| Mitochondrial Dysfunction      | 2.58E-06 | 21.1 % 36/171 |
| mTOR Signaling                 | 3.26E-06 | 19.9 % 40/201 |

図 3

| No. | Symbol   | Grade3 /Grade1 | Grade2 /Grade1 | p-value, Log-Rank | Rank Product |
|-----|----------|----------------|----------------|-------------------|--------------|
| 1   | PPP2R2C  | 210.52         | 6.47           | 0.224             | 7.63         |
| 2   | ATG9B    | 110.67         | 4.77           | 0.733             | 13.89        |
| 3   | HIST1H1D | 3.51           | 6.20           | 0.035             | 14.62        |
| 4   | BAG1     | 4.03           | 3.96           | 0.018             | 15.04        |
| 5   | PGK1     | 1.13           | 2.71           | 0.001             | 18.85        |
| 6   | ATP5D    | 4.96           | 2.97           | 0.023             | 19.27        |
| 7   | USP43    | 7.45           | 3.48           | 0.582             | 23.70        |
| 8   | GNB1L    | 5.32           | 3.15           | 0.419             | 27.78        |
| 9   | RPS15    | 2.27           | 2.50           | 0.004             | 29.41        |
| 10  | RPLP0    | 0.39           | 2.61           | 0.002             | 57.6         |

図 4

| Symbol      | Log-rank     | COX              | Maxstat         |
|-------------|--------------|------------------|-----------------|
| PPP2R2C     | 0.224        | 0.522            | 0.775           |
| ATG9B       | 0.733        | 0.260            | 0.731           |
| HIST1H1D    | 0.035        | 0.999            | 0.251           |
| BAG1        | 0.018        | 0.144            | 0.055           |
| <b>PGK1</b> | <b>0.001</b> | <b>0.0000004</b> | <b>0.000003</b> |
| ATP5D       | 0.023        | 0.005            | 0.104           |
| USP43       | 0.582        | 0.648            | 0.757           |
| GNB1L       | 0.419        | 0.774            | 0.582           |
| RPS15       | 0.004        | 0.0004           | 0.021           |
| RPLP0       | 0.002        | 0.008            | 0.004           |

図 5

PGK1 は解糖系酵素である Phosphoglycerate Kinase 1 をコードする遺伝子で、多くの癌においてその発現が確認されており、また Protein Atlas では正常組織よりも癌組織において発現が増加している (図 6)。また、乳癌、頭頸部癌、肝臓癌において、PGK1 の発現量が高い腫瘍をもつ患者は、発現量の低い患者に比べ有意に予後が悪く、PGK1 が臨床的に重要な因子であることが示唆された (図 7)

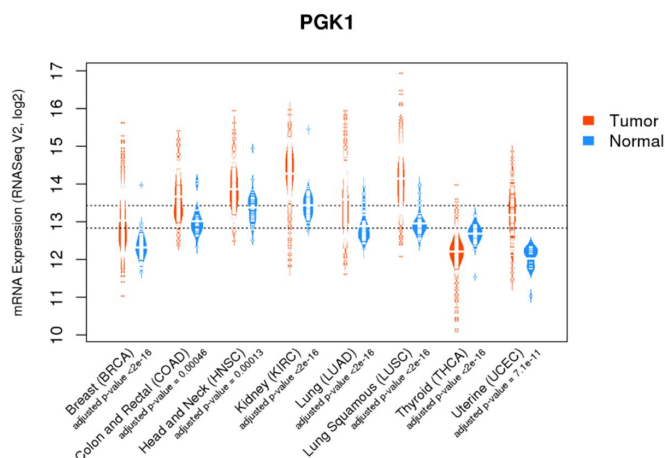


図 6

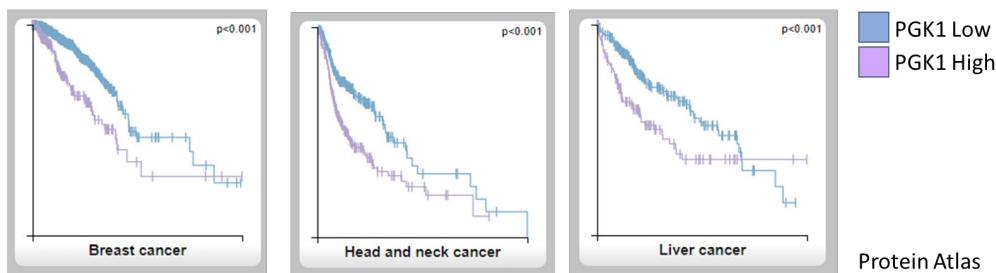


図 7

Grade 髄膜腫 5 個と Grade 髄膜腫 3 個の抽出検体における PGK1 の発現量を qPCR を用いて測定したところ、RNA sequence と同様に Grade 5 で発現が増加していた (図 8)。悪性髄膜腫細胞株である HKBMM 細胞に、siRNA 法をもちいて、PGK1 を標的とした Dharmacon Smart Pool siRNA を transfection して PGK1 の発現を抑制すると、明らかにその細胞増殖が抑制された (図 9)。

以上の結果は、PGK1 が悪性髄膜腫において腫瘍を増悪させる因子として機能していることを示唆する。現在 CRISPR- d Cas9-KRAB を用いて恒常的な発現抑制株を生成している。また Lenti-plasmid を用いて恒常的な過剰発現株を生成している。

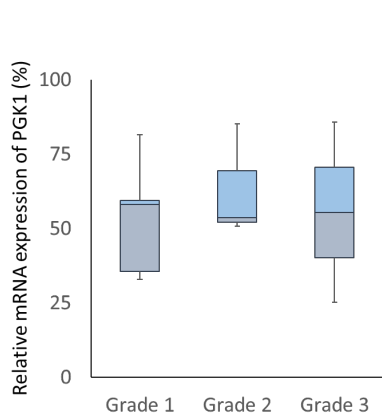


図 8

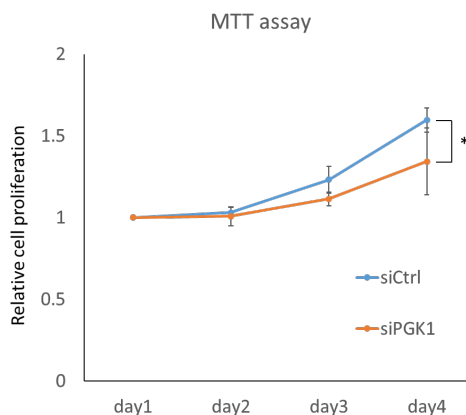
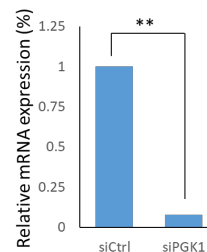


図 9



## 5 . 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 3 件)

工藤琢巳、悪性髄膜腫の新たな治療標的の探索、第 20 回日本分子脳神経外科学会、2019 年 5 月 30 日

工藤琢巳、バイアスの無い方法を用いた悪性髄膜腫の新たな治療標的の探索、第 77 回日本脳神経外科学会学術総会、2019 年 5 月 30 日

工藤琢巳、バイアスの無い方法を用いた悪性髄膜腫の新たな治療標的の探索、第 36 回日本脳腫瘍学会、2019 年

## 6 . 研究組織

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、研究者個人に帰属されます。