

平成21年4月30日 現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19591669
 研究課題名（和文） ポストゲノム時代における脳腫瘍のエピジェネティクス
 解析による診断・治療の新展開
 研究課題名（英文） Epigenetic Analyses of Brain Tumors for Development of Diagnosis
 and Treatment in the Era of Postgenome
 研究代表者
 夏目 敦至 (NATSUME ATSUSHI)
 名古屋大学・医学部附属病院・特任准教授
 研究者番号：30362255

研究成果の概要：

本研究では、pyrosequence を用いてエピジェネティックな DNA メチル化変化を定量することを試みた。Pyrosequence 法は、従来の methylation-specific PCR(MSP)の不定量性を改良した斬新な方法である。MSP では、メチル化の有無しか判定できないのに対し、Pyrosequencing ではグリオーマの腫瘍組織は 0-90%にわたる広範囲なメチル化が起こることを認めた。基準値を設けると MSP との相関も認められた。また、免疫組織染色との相関、テモゾロミドを投与した神経膠腫症例における予後との相関についても検討した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2008年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：脳腫瘍、遺伝子、ゲノム、エピジェネティクス、診断、治療

1. 研究開始当初の背景

テモゾロミドの本邦での承認

悪性神経膠腫に対する新しい経口アルキル化化学療法剤、テモゾロミドが日本で 2006 年に承認・発売された。平均生存期間が 1 年と予後不良な悪性神経膠腫の治療薬として、大いに期待されている。

耐性機構としての MGMT 分子

しかしながら、一方で DNA 修復分子である O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) は、アルキル化剤が抗腫瘍効果を発揮

するのに必要な DNA 架橋構造を修復するため、MGMT 分子はテモゾロミドの薬剤耐性に関与していると考えられている。また、我々の検討から MGMT の発現は遺伝子プロモータのメチル化により調節されていて、メチル化されると遺伝子の発現が見られないことがわかっている(夏目、吉田ら, Cancer Res 2005)。また、MGMT プロモータのメチル化の有無が悪性神経膠腫患者の重要な予後因子であると考えられている (Esteller ら, NEJM, 2000)、研究代表者らの臨床例においてもテモゾロミドの感受性とも相関する (図 1)。

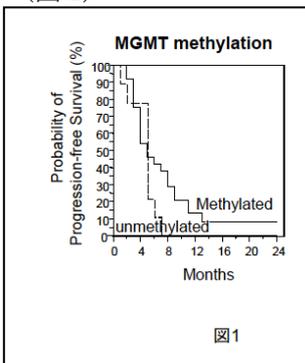
MGMT の定性・定量の問題点

本研究代表者らは、全国に先立って、MGMT プロモータのメチル化のアッセイとしての methylation-specific PCR (MSP) のシステムを立ち上げ、その成果を多数報告している。この MSP 法によって、Hegi らはテモゾロミドによる治療効果（全生存期間、無増悪期間）が MGMT プロモータのメチル化の有無に相関すると報告している。しかし、この方法は高感度な PCR を用いるために、腫瘍の不均一さ（heterogeneity）が問題となる。つまり、腫瘍内部に混在する血液や血管などの正常組織由来の遺伝子が否定できず、定量は不可能である。

一方、定量 RT-PCR による mRNA の定量の報告があるが、組織の保存状態や再現性が問題である。さらに、どの値を cut-off にするかが常に問題となる。また、抗 MGMT 抗体による組織の免疫染色は、ある程度、定性・定量が可能であると考えられるが、染色性の強弱が、腫瘍の MGMT タンパク発現の強弱を反映しているのか、あるいは手技の上の問題なのか微妙である。

上記のうちで Methylation-specific PCR を除くアッセイ法は、腫瘍遺伝子のダイナミックなエピジェネティクの変化を評価しないので、学術的な独創性は乏しい。

(図 1)



2. 研究の目的

DNA メチル化の定量

本研究では、pyro-sequence を用いて DNA メチル化を定量する。Pyro-sequence 法とは、MSP の不定量性を改良した、斬新かつ鋭敏で、再現性に優れた方法である。本法は、DNA を bisulfite 処理し、非メチル化シトシンをチミンに変換することによって、メチル化シトシンと非メチル化シトシンをあたかも SNP のように区別し、定量化する。

ゲノムワイドな DNA メチル化の定量—悪性神経膠腫の新たな予後因子の探索に向けて—

MGMT はアルキル化剤の感受性に重要であるが、そのメチル化だけで、腫瘍の生物学的特

徴を説明できるとは限らない。悪性神経膠腫はダイナミックなエピジェネティクスの変化が起こっている腫瘍である。神経膠腫の中でも、乏突起神経膠腫は薬剤感受性が高く、比較的予後良好な腫瘍として知られる。注目すべき点は、乏突起神経膠腫の病理診断マーカーとして、OLIG2 が知られているが、その遺伝子もメチル化が関与していると考えられている。Pyro-sequence の特長はゲノムワイドな CpG アイランドのメチル化の解析が可能である。したがって、この手法によって、MGMT 以外の新たな予後因子の探索の可能性を含んでいる。

3. 研究の方法

(1) pyrosequence 法

対象となる患者に対し、手術前に十分なインフォームドコンセントを行い、腫瘍組織の提供と遺伝子解析研究の同意を得る。摘出された腫瘍組織を即時に液体窒素で冷却し、サンプル抽出まで -80°C の超低温冷凍庫に保管する。約 50 種類の遺伝子プロモーターの特異的な配列のメチル化領域を HpaII (methylation-sensitive enzyme) と MSP I (methylation-insensitive enzyme) でそれぞれ切断したサンプルを用意し、multiplex PCR、蛍光ラベリングし、ハイブリダイゼーション後のシグナルによってメチル化の有無を検出する。それぞれの酵素は、同じ DNA シークエンス 5' -CCGG-3' を認識し、切断する。CpG 領域において、シトシン残基がメチル化されない場合、PCR プロダクトは Hpa II で切断されたサンプルのみ増幅され、Msp I で切断されたサンプルでは増幅されない。より小さい S/N 比を達成するためには、ハイブリダイゼーションあるいはその後の洗浄をできるだけ厳しい条件で行うことが望ましく、スポットした DNA が安定してスライドガラス上に存在できるようにする。

(2) 臨床検体の MGMT 遺伝子メチル化の定量

臨床情報とともにプールされた DNA サンプルを用いて、MGMT 遺伝子メチル化の定量による予備研究を行った。凍結標本から取ったゲノム DNA を DpnII で制限酵素処理後、PCR purification kit で精製する。調整したゲノム DNA に Buffer Mix (BioPrime labeling Kit) と混合し熱変性処理する。10 分間の氷冷のうち、dNTP mix と Cy3-または Cy5-dCTP を加え、 37°C で 2 時間インキュベートし、PCR purification kit で精製する。蛍光標識した DNA をハイブリダイゼーション反応液に溶解し熱変性させる。スキャナーで画像を取り込み、各スポットにおけるサンプルならびにコントロール DNA 由来の蛍光シグナルの強度比をもとに DNA 断片に相当する領域の DNA のコピー数を定量化する。

(3) ゲノムワイドな遺伝子メチル化の探索

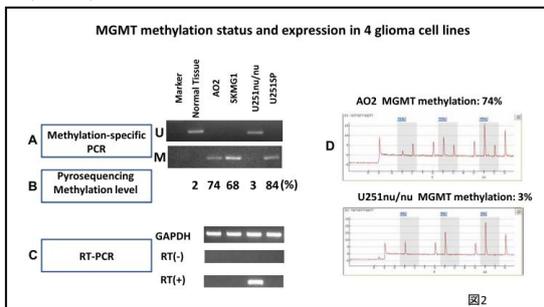
MGMT 遺伝子のみならず、ゲノムワイドに展

開する。MGMT はアルキル化剤の感受性に重要であるが、そのメチル化だけで、腫瘍の生物学的特徴を説明できるとは限らない。悪性神経膠腫はダイナミックなエピジェネティクスの変化が起こっている腫瘍である。Methylated CpG Amplification Maicroarray (MCAM) を用いて、網羅的なメチル化遺伝子の探索を行った。

4. 研究成果

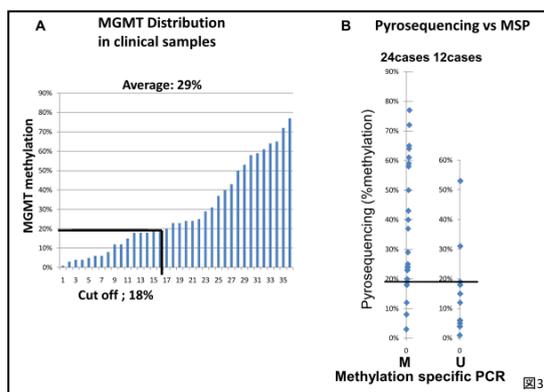
(1) 悪性神経膠腫細胞株 4 種類と正常組織から DNA, RNA を抽出し、methylation-specific PCR (MSP) によって MGMT 遺伝子メチル化を定性し、pyrosequencing 法によって定量した。また、RT-PCR によって MGMT の発現を検討した。その結果、3 種の手法には相関が認められた (図 2)。

(図 2)



(2) 神経膠腫 36 症例の抽出腫瘍から DNA を抽出し、MGMT 遺伝子の MSP と pyrosequence を行った。Pyrosequence による MGMT のメチル化の程度は、連続的に高低さまざまであった。患者背景や MSP との相関を求めるために、cutt-off を 18% と設定した。MGMT メチル化 18% 未満、18% 以上の腫瘍と MSP との相関は統計学的有意であった (図 3)。

(図 3)



(3) MGMT 免疫組織染色と pyrosequence との関連
脳腫瘍は不均一な細胞集団を形成し、MGMT 免疫組織染色は、切片上の視野の設定によって

バイアスがかかる。しかし、診療上日常的に実施されている免疫染色との相関、優位性を検討することは重要である。MGMT 強陽性、弱陽性の部分をマイクロダイセクションをし、pyrosequencing を行った。その結果、MGMT 免疫組織染色と pyrosequencing との間には相関が認められた (図 4)。

以上、我々の検討から MGMT の発現は遺伝子プロモーターのメチル化により調節されていて、メチル化されると遺伝子の発現が見られないことがわかっている。MGMT はグリオーマの 70-80% に発現していると言われていたが、標準的治療として用いられるテモゾロミドやニトロソウレアなどのアルキル化抗癌剤の薬剤耐性の主要因子である。MGMT はアルキル化抗癌剤により guanine と結合したメチル基を除去し、DNA 損傷を修復してしまうために細胞死への誘導が起こらず、抗癌剤の効果を妨げる。Stupp らによる大規模比較臨床試験⁸におけるテモゾロミド不応症例は腫瘍組織における MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化と関連性があることが証明されている。これらは MSP 法で DNA メチル化を検討したものだが、MSP 法は定量性がないため、メチル化と遺伝子発現抑制の関係を調べるには COBRA (combined bisulfite restriction analysis) が用いられる。また個々の CpG サイトのメチル化の検出には

bisulfite-sequencing が必要である。本研究では、我々は MSP 法の非定量性を克服するために、pyrosequencing 法という鋭敏かつ再現性に優れた方法を導入した。本法は、bisulfite 処理した DNA のメチル化シトシンと非メチル化シトシンをあたかも SNP のように区別し、個々の CpG サイトのメチル化を定量化することができる。

以上のように、遺伝子の異常メチル化は分子時計 (molecular clock) として前癌病変や癌の進展予測のための分子マーカーとして利用できる可能性があり、抗癌剤感受性の指標としての MGMT 遺伝子メチル化だけでなく、今後、腫瘍の個性を利用した抗癌剤の選択にメチル化の異常が取り入れられていくと考えられる。

(図 4)

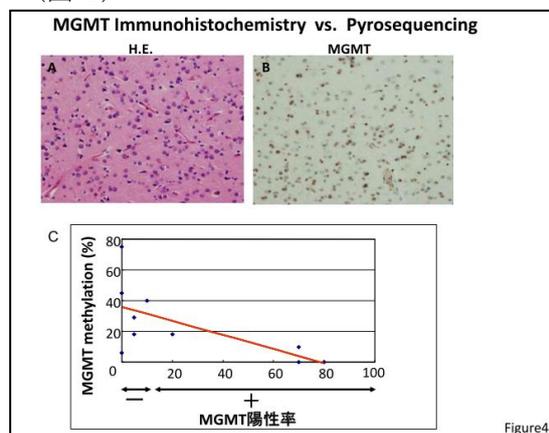


Figure4

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 18 件) すべて査読有

1. Ohno M, Natsume A, Fujii M, (5 人中 2 番目). Interferon-beta, MCNU, and conventional radiotherapy for pediatric patients with brainstem glioma. *Pediatr Blood Cancer*, in press, 2009.
2. Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, (10 人中 2 番目). p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery* 2009;64(3):455-461; discussion 461-452.
3. Oi S, Natsume A, Ito M, (8 人中 2 番目). Synergistic induction of NY-ESO-1 antigen expression by a novel histone deacetylase inhibitor, valproic acid, with 5-aza-2'-deoxycytidine in glioma cells. *J Neurooncol* 2009;92(1):15-22.
4. Ito M, Natsume A, Takeuchi H, (7 人中 2 番目). Type I Interferon Inhibits Astrocytic Gliosis and Promotes Functional Recovery after Spinal Cord Injury by Deactivation of the MEK/ERK Pathway. *J Neurotrauma* 2009;26(1):41-53.
5. Wakabayashi T, Natsume A, Hashizume Y, (6 人中 2 番目). A phase I clinical trial of interferon-beta gene therapy for high-grade glioma: novel findings from gene expression profiling and autopsy. *J Gene Med* 2008;10(4):329-339.
6. Wakabayashi T, Kayama T, Nishikawa R, (11 人中 10 番目). A multicenter phase I trial of interferon-beta and temozolomide combination therapy for high-grade gliomas (INTEGRA Study). *Jpn J Clin Oncol* 2008;38(10):715-718.
7. Shimato S, Natsume A, Wakabayashi T, (10 人中 2 番目). Identification of a human leukocyte antigen-A24-restricted T-cell epitope derived from interleukin-13 receptor alpha2 chain, a glioma-associated antigen. *J Neurosurg* 2008;109(1):117-122.
8. Natsume A, Yoshida J. Gene therapy for high-grade glioma: current approaches and future directions. *Cell Adh Migr* 2008;2(3):186-191.
9. Natsume A, Wakabayashi T, Tsujimura K, (11 人中 1 番目). The DNA demethylating agent 5-aza-2'-deoxycytidine activates NY-ESO-1 antigenicity in orthotopic human glioma. *Int J Cancer* 2008;122(11):2542-2553.
10. Natsume A, Wakabayashi T, Ishii D, (8 人中 1 番目). A combination of IFN-beta and temozolomide in human glioma xenograft models: implication of p53-mediated MGMT downregulation. *Cancer Chemother Pharmacol* 2008;61(4):653-659.
11. Gao W, Kondo Y, Shen L, (14 人中 7 番目). Variable DNA methylation patterns associated with progression of disease in hepatocellular carcinomas. *Carcinogenesis* 2008;29(10):1901-1910.
12. Tsuno T, Natsume A, Katsumata S, (11 人中 2 番目). Inhibition of Aurora-B function increases formation of multinucleated cells in p53 gene deficient cells and enhances anti-tumor effect of temozolomide in human glioma cells. *J Neurooncol* 2007;83(3):249-258.
13. Takeuchi H, Natsume A, Wakabayashi T, (11 人中 2 番目). Intravenously transplanted human neural stem cells migrate to the injured spinal cord in adult mice in an SDF-1- and HGF-dependent manner. *Neurosci Lett* 2007;426(2):69-74.
14. Shimato S, Natsume A, Takeuchi H, (11 人中 2 番目). Human neural stem cells target and deliver therapeutic gene to experimental leptomeningeal medulloblastoma. *Gene Ther* 2007;14(15):1132-1142.
15. Nakane Y, Natsume A, Wakabayashi T, (8 人中 2 番目). Malignant transformation-related genes in meningiomas: allelic loss on 1p36 and methylation status of p73 and RASSF1A. *J Neurosurg* 2007;107(2):398-404.
16. Ito M, Wakabayashi T, Natsume A, (6 人中 3 番目). Genetically heterogeneous glioblastoma recurring with disappearance of 1p/19q losses: case report. *Neurosurgery* 2007;61(1):E168-169; discussion E169.
17. Ishii J, Natsume A, Wakabayashi T, (7 人中 2 番目). The free-radical scavenger edaravone restores the differentiation of human neural precursor cells after radiation-induced oxidative stress. *Neurosci Lett* 2007;423(3):225-230.
18. Ishii D, Natsume A, Wakabayashi T, (10 人中 2 番目). Efficacy of temozolomide is correlated with 1p loss and methylation of the deoxyribonucleic acid repair gene MGMT in malignant gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2007;47(8):341-349; discussion 350.

〔学会発表〕(計 15 件)

1. 夏目敦至 脳腫瘍幹細胞の起源：エピジェネティクス解析とポリコーム蛋白標的治療の開発第 26 回日本脳腫瘍学会 2008 年 11 月 30 日-12 月 2 日 愛媛県
2. 夏目敦至 脳腫瘍治療の最近の進歩 第 67 回日本癌学会学術総会 2008 年 10 月 28 日-30 日 名古屋
3. 夏目敦至 グリオーマ幹細胞に対する分子標的治療の開発 第 67 回日本脳神経外科学会総会 2008/10/1-2008/10/3 盛岡
4. Natsume, A. Characteristics of Atypical Meningiomas. 6th International Congress on Meningiomas and Cerebral Venous System. Sep 3-6, 2008. Boston, MA, USA.
5. 夏目敦至 グリオーマ幹細胞の網羅的エピジェネティクス解析 第 9 回日本分子脳神経外科学会 2008 年 8 月 30 日~31 日 京都
6. Natsume, A. TARGETING OF GLIOMA CELLS EXPRESSING THE EGFR TYPE 3 VARIANT USING GENETICALLY ENGINEERED T-CELLS. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. June 12-14, 2008. Sapporo.
7. Natsume, A. NEURAL STEM CELLS TRANSDUCED WITH THE IFN-beta AND CYTOSINE DEAMINASE GENES ENHANCE BYSTANDER EFFECT IN EXPERIMENTAL GLIOMAS. The 14th Annual Meeting of Japan Society of Gene Therapy. June 12-14, 2008. Sapporo.
8. Natsume, A. THE DNA DEMETHYLATING AGENT 5-AZA-2-DEOXYCYTIDINE INDUCES THE EXPRESSION OF CANCER-TESTIS ANTIGENS IN HUMAN GLIOMAS: EPIGENETIC TARGET FOR TUMOR IMMUNOTHERAPY. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. June 9-12, 2008, Hakodate, Japan
9. Natsume, A. A JAPANESE MULTICENTER CLINICAL TRIAL OF INTERFERON-B AND TEMOZOLOMIDE COMBINATION THERAPY FOR HIGH-GRADE GLIOMAS: FROM BENCH TO BEDSIDE. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. June 9-12, 2008, Hakodate, Japan
10. Natsume, A. GLOBAL ANALYSES OF POLYCOMB MEDIATED TRANSCRIPTIONAL REPRESSION AND DNA METHYLATION TARGETS IN BRAIN TUMOR STEM CELLS. The 17th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. June 9-12, 2008, Hakodate, Japan
11. 夏目敦至 ポストゲノム時代のエピジェネティクス解析:MGMT 遺伝子メチル化の定量の試み 第 26 回日本脳腫瘍病理学会 2008 年 5 月 23-24 日 東京
12. 夏目敦至 グリオーマ幹細胞の網羅的エピジェネティクス解析 第 25 回日本脳腫瘍学会 2007 年 12 月 9-11 日 東京
13. 夏目敦至 バルプロ酸と DNA メチル化酵

素阻害薬による

グリオーマの癌精巢抗原遺伝子のクロマチン構造変化第 25 回日本脳腫瘍学会 2007 年 12 月 9-11 日 東京

14. 夏目敦至 Epigenetic target for cancer-testis antigen-based tumor immunotherapy 第 66 回日本癌学会学術総会 2007 年 10 月 3 日-5 日 横浜

15. 夏目敦至 グリオーマ幹細胞の網羅的エピジェネティクス解析 第 66 回日本脳神経外科学会総会 2007/10/3-2007/10/5 東京

〔図書〕(計 1 件)

脳 21, 金芳堂 2009 164 ページ グリオーマのエピジェネティクス解析

著者名: 夏目敦至、編集: 黒岩敏彦

〔その他〕

ホームページ等:

<http://www.med.nagoya-u.ac.jp/cgrm/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

夏目 敦至 (NATSUME ATSUSHI)

名古屋大学・医学部附属病院・特任准教授

研究者番号: 30362255

(2) 研究分担者 (2007 年度のみ)

吉田 純 (JUN YOSHIDA)

名古屋大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 40158449