

機関番号	21601
研究種目	基盤研究 (C)
研究期間	2008 ~ 2010
課題番号	20591710
研究課題名 (和文)	ポストゲノム時代における良性脳腫瘍のエピジェネティクス・バイオマーカーの開発
研究課題名 (英文)	Identification of epigenetic biomarkers in benign brain tumors in the post-genome era
研究代表者	
	齋藤 清 (SAITO KIYOSHI)
	福島県立医科大学・医学部・教授
	研究者番号: 00240804

研究成果の概要 (和文): ポストシーケンス時代をむかえ、髄膜腫のエピジェネティクス異常を網羅的に解析した。ゲノムワイドの6157 遺伝子、15173 CpG のメチル化を解析できるマイクロアレイを用いて、WHO Grade 1 の20 例と Grade 2 の10 例を解析した結果、WHO grade に関係なく2つのグループに分類され、浸潤性の強い髄膜腫と再発を来たした髄膜腫がグループ2に分類された。DNA メチル化によるエピジェネティックな変化は、形態を基にする WHO 分類とは別に、浸潤や再発など腫瘍の動的な現象を反映することが示唆された。

研究成果の概要 (英文): We analyzed exhaustive epigenetic changes of the meningioma, the most common brain tumor. Using microarrays that can analyze 6157 genomes, 15273 CpG islands, 20 WHO grade 1 and 10 grade 2 meningiomas were analyzed. The data showed 2 clusters, hypo-methylated and hyper-methylated groups, independent of WHO grading. Most invasive meningiomas and recurrent meningiomas were included in the hyper-methylated cluster. Our results suggest that epigenetic changes of DNA methylation reflect active nature, such as invasion or recurrence, of the meningiomas.

交付決定額

(金額単位: 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2009年度	700,000	210,000	910,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
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・脳神経外科学

キーワード: 良性脳腫瘍、髄膜腫、エピジェネティクス、マイクロアレイ、DNA メチル化、バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

髄膜腫・神経鞘腫など良性脳腫瘍にも治療に難渋し予後不良な例がみられるが、病理検査では浸潤性・悪性転化・治療感受性・再発などの予測は困難である。遺伝子解析により神経膠腫など悪性腫瘍では治療感受

性・予後判定が可能になってきたが、良性腫瘍では有益な結果は得られていない。

(1) 髄膜腫の遺伝子異常

髄膜腫は脳腫瘍の中で最も頻度が高い WHO grade 1 に属する良性腫瘍であるが、約10%は Grade 2 もしくは Grade 3 に属す

るいわゆる悪性髄膜腫であり、局所再発の危険性が高く治療に苦渋する。髄膜腫の悪性化についてはさまざまな遺伝子異常モデルが報告されている。初期段階には NF-2 やその他の癌抑制遺伝子などの 22 番染色体遺伝子異常が起こるとされるが、次段階での遺伝子異常に関しては不明な点が多い。

(2) 我々の基礎研究

我々は 10 例の悪性髄膜腫の遺伝子解析を行った。そのなかには初発時は WHO Grade 1 であったが、再発時には Grade 2 もしくは Grade 3 へ悪性転化した症例が 3 例含まれる。これらの髄膜腫に対する LOH 解析では、1p32 と 1p36 が重要な領域であることが示唆され、また癌抑制遺伝子 RassF1A のプロモーターのメチル化が髄膜腫の悪性化に関与することを認めた。

2. 研究の目的

ポストシークエンスを向かえた現在、ゲノム解析を踏まえ、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御機構が注目されている。エピジェネティクスとは A, G, C, T の塩基配列の変化をとまわず、さまざまな環境因子に対応し、遺伝子の発現を活性化したり不活性化したりする後生的修飾機構である。体細胞のゲノムは例外を除いて同一であり、細胞の個性は発現遺伝子や発現のない遺伝子の組み合わせによって決定され、その多くはエピジェネティクスによって制御されている。エピジェネティクスの破綻は奇形、癌、老化、代謝異常、精神疾患などの疾病につながる。エピジェネティクスの大きな特徴は、可塑性があり人為的に再プログラムさせることが可能である点であり、発生・分化・疾病などの生命現象におけるエピジェネティクスの説明は、医療への応用を考えるうえでの重要課題である。

本研究では髄膜腫のエピジェネティクスの網羅的解析を行い、浸潤性・悪性転化・治療感受性・再発などに関与する因子（バイオマーカー）を解明し、治療方針決定や予後判定に有用な scoring system を構築することが目的である。また、これらの解析結果は新しい治療開発にも結びつくと考えられる。

- (1) ゲノムワイドなエピジェネティクス解析による過メチル化遺伝子の同定
- (2) 過メチル化遺伝子における DNA メチル化の定量
- (3) 臨床情報との照合によるバイオマーカーの探索と scoring system の構築
- (4) Scoring system の検証

3. 研究の方法

(1) MCAM による過メチル化遺伝子同定

MCAM (Methylated CpG islands amplification microarray) により 6157 遺伝子、15137 CpG アイランドでのメチル化解析を行った。腫瘍サンプルのプロモーター領域 CpG メチル化状態は 2 色法により Control (非腫瘍患者の脳皮質、男女各 1 例) に対する比として表し、このシグナル比 2 倍以上を異常な過メチル化状態と判定した。

① 20 例の WHO Grade 1 および 10 例の Grade 2 髄膜腫凍結手術標本からゲノム DNA を抽出。

② SmaI, XmaI (New England Biolabs) にてメチル化シトシンを含む DNA 断片に切断した後、RMCA adaptor, primer を結合させ PCR を施行。

③ 産物をそれぞれ Cy3 (緑)、Cy5 (赤) でラベリングした後マイクロアレイに競合的にハイブリダイズ。

④ 結果は Feature Extraction software (Agilent Technologies)、Subio platform (Subio) にて解析。

(2) Pyrosequencing によるメチル化定量

マイクロアレイデータの検証は bisulfite pyrosequencing 法にて行った。

① 対象症例と 3 系統の cell line の DNA を bisulfite 処理 (非メチル化シトシンのウラシル化)。

② 対象遺伝子ごとに、Pyrosequencer (Biotage) を用いて pyrosequence を施行。

③ 解析領域の CpG/TpG 比にて同領域の CpG メチル化を定量。

④ global methylation status の指標である LINE-1 遺伝子のメチル化についても同様に定量化。

(3) Real-time reverse transcription PCR

MCAM と pyrosequencing にて臨床検体、cell line とともに過メチル化を示した遺伝子につき、real-time RT PCR にて遺伝子発現を解析した。さらに 2 系統の cell line (IOMM-Lee、HKBM) についてはメチル化阻害剤として 5-Aza-2'-deoxycytidine (DAC) を培養液に添加した培養細胞と、未処理の cell line とで発現の差異を比較した。

(4) バイオマーカーの探索

得られた遺伝子情報と髄膜腫の臨床情報 (浸潤性、WHO grade、治療法と効果、再発、予後など) を照合し、浸潤性・悪性転化・治療感受性・再発に関与する因子 (バイオマーカー) を抽出し、scoring system を構築した。

(5) Scoring system の検証

異なる validation set (n=20) にて追加検証を行った

(倫理面への配慮)

主施設では全例術前に文書及び口頭説明によるインフォームドコンセントを得た。関連施設から得た手術検体の使用については同施設における倫理委員会にて承認を得た。検体は主施設において連結可能匿名化を行い、外部記録装置にて単独の研究分担者が連結表を保管している。

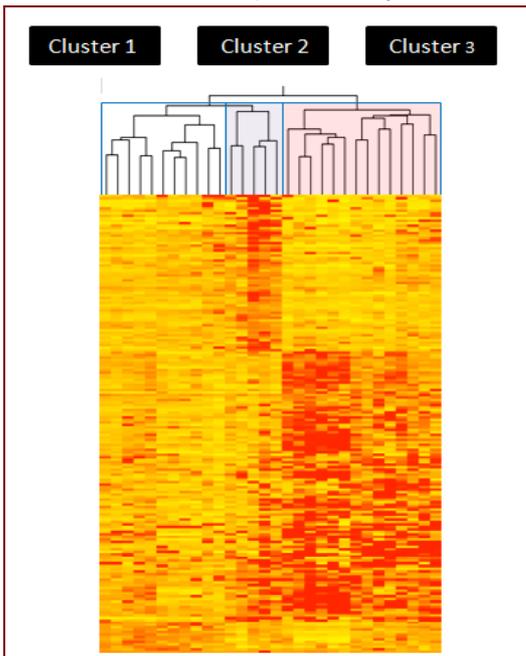
4. 研究成果

(1) MCAM による過メチル化遺伝子同定

① 遺伝子プロモータ領域の過メチル化と判定された遺伝子は Grade 1 で 250/6157 (4.06%) 445/15137 CpG loci (2.94%)、Grade 2 では 323/6157 (5.25%) 567/15137 loci (3.75%) であった。

② Grade 1 優位に高頻度に過メチル化傾向を示した遺伝子 (Grade 1 4/6 例以上かつ Grade 2 3/6 例以下) は 24 遺伝子、Grade 2 優位に高頻度に過メチル化を示した遺伝子 (Grade 2 4/6 例以上かつ Grade 1 3/6 例以下) は 79 遺伝子で、Grade 2 に遺伝子プロモータ領域のメチル化が集積する傾向が見られた。両群ともに高頻度に過メチル化が見られた遺伝子は、8/12 例以上では 55 遺伝子、10/12 例以上では 19 遺伝子であった。

③ MCAM に基づく髄膜腫の階層クラスタリングは 3 群を形成し、クラスター 1 に対し 2, 3 では高メチル化遺伝子の集積が認められた (165 vs 323345、 $P < 0.001$)。



④ クラスター 1 を低メチル化群、クラスター 2, 3 を高メチル化群と再分類したところ、高メチル化群には男性の全例、再発症例の 9/10 (90%)、浸潤性腫瘍の 12/14 (86%)、悪性髄膜腫の 8/10 (80%) が含まれた。

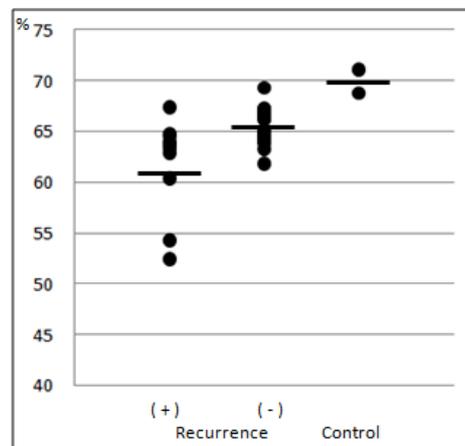
(2) Pyrosequencing によるメチル化定量

① 14 遺伝子 (MMP14, HOXA5, MGMT, FAIM2, HIF3A, TUBA4, MCF2L2, SFRP-1, RUNX3, RASSF1A, WNT6, CHAD, CLIC6, REC8) で pyrosequencing を施行し、MCAM と関連した結果を示したのは 6/14 遺伝子であった。HOXA5 では Grade 1 優位に、また CHAD では Grade 2 優位に過メチル化傾向が見られ、REC8, CLIC6, HIF3A では全体に高いメチル化状態を示した。

MCAM と pyrosequencing の結果が関連しない遺伝子が存在するが、pyrosequencing が解析対象部位に含まれる CpG のうち 2-5 個程度のシトシンメチル化を定量する検査であるのに対し、MCAM は各遺伝子内に含まれる複数の fragment の Sample/Control シグナルの最も高いものをその遺伝子のメチル化レベルとして解析しているために生じる差異である。

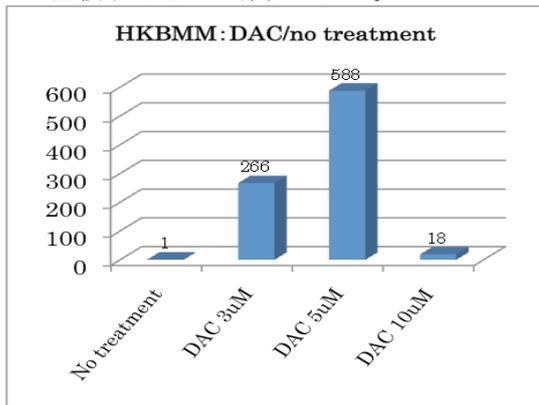
② 任意に選択した 3 遺伝子の bisulfite pyrosequencing 法でのメチル化定量値を MCAM のシグナル比と比較し、マイクロアレイデータの妥当性を検証した。算出した 3 遺伝子の感度/特異度はそれぞれ 93%/75%, 91%/72%, 61%/50%であり、1 遺伝子ではやや相関が低かったもののマイクロアレイデータには妥当性があると判断し解析を進めた。

③ 再発群、非再発群、コントロールの LINE-1 メチル化はそれぞれ平均値にて 61.77%, 65.46%, 69.95%であり、腫瘍ではやや低く、再発群ではさらに低下する傾向を認めた。



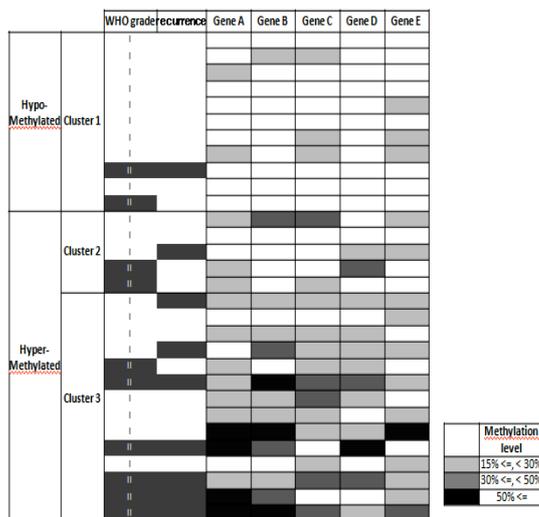
(3) Real-time reverse transcription PCR
 ① MCAM と pyrosequencing にて臨床検体、cell line とともに著明な過メチル化を示した HIF3A 遺伝子に対する real-time RT PCR では、臨床検体のうち 2 例で Control より高発現を示し 2 例で Control と同程度の発現であったものの、25 症例及び 2 系統の cell line では $1/10^2 - 10^3$ 程度の著明な発現低下が見られた。

② DAC を添加し培養した cell line においては、未処理の cell line に比し 18-588 倍の cDNA が認められ、DAC にて HIF3A の発現が回復することが確認された。



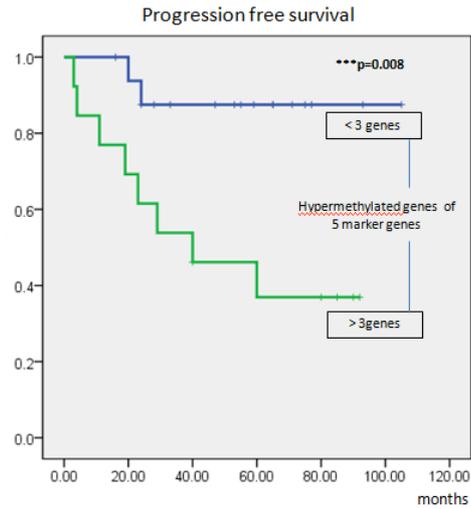
(4) 臨床情報との照合によるバイオマーカーの探索

高及び低メチル化群間でメチル化レベルの差の大きい遺伝子を抽出して定量化を行い、5 遺伝子で群間の差を確認した。



(5) Scoring system の検証

上記の 5 遺伝子をバイオマーカーとして scoring を行うと、3 遺伝子以上にメチル化を認める群では有意に高い再発率を示した。



(6) 考察と展望

過メチル化状態を示した遺伝子のうち HIF3A について、スプライシングバリエントである IPAS: inhibitory PAS (Per/Arnt/Sim) は低酸素環境下で誘導され、血管新生に働く VEGF, EPO, PDGF など低酸素誘導因子の発現抑制因子である可能性が示唆されている。今回われわれの検体において、腫瘍組織及び cell line でその発現が大きく低下していたことは、髄膜腫において低酸素誘導因子発現の調節機構が破綻している可能性を示唆しており、興味深い。DAC 添加により発現が回復したことより、DNA メチル化が HIF3A の発現抑制に重要な役割を持っており、かつ可逆的反応であることが示された。

DNA メチル化は遺伝子プロモータ領域において RNA polymerase の結合を阻害し遺伝子発現を抑制するが、複数の腫瘍において発現抑制とは無関係に特定の遺伝子のメチル化が予後予測マーカーとなることが報告されている。また Toyota らは 1999 年、単独遺伝子のメチル化のみではなく、colorectal cancer においては遺伝子群としてメチル化の集積傾向を示す症例集団が存在することを明らかにし、CpG island methylator phenotype (CIMP) の概念を提唱した。現在 CIMP1 については予後との相関につき consensus の得られた知見として認知されている。また 2010 年 The Cancer Genome Atlas Research Network も glioblastoma の網羅的メチル化解析により Glioma-CIMP の存在を示唆し、組織学的には同様の所見を示す腫瘍内にも subgroup が存在することを示している。本研究でも DNA メチル化に基づく階層クラスタリングでは 3 群の subgroup が認められた。髄膜腫は DNA プロモータ領域のメチル化状態により組織型と独立して subgroup を形成し、

高メチル化群では高い再発率が示す。LINE-1メチル化レベルの評価に加えて、今回同定した5遺伝子のメチル化状態の評価を組み合わせることにより、病理組織分類に依存しない細分類が可能であり、易再発群のマーカーになりうると考えられる。

現在、エピジェネティクス異常を標的とする治療薬の開発が急速に進んできており、髄膜腫などの良性脳腫瘍においても近い将来可能になると期待される。

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 22 件)

- ① Natsume A, Kondo Y, Ito M, Motomura K, Wakabayashi T, Yoshida J. Epigenetic aberrations and therapeutic implications in gliomas. *Cancer Sci* 101: 1331-1336, 2010, 査読有
- ② 齋藤 清, 伊藤英治, 市川優寛, 佐藤 拓, 渡邊 督, 佐久間潤. 髄膜腫治療の問題点. 「新時代の脳腫瘍学」. *日本臨床* 68 増刊号 10 : 324-328, 2010, 査読無
- ③ Kato T, Natsume A, Toda H, Iwamizu H, Sugita T, Hachisu R, Watanabe R, Yuki K, Motomura K, Bankiewicz K, Wakabayashi T. Efficient delivery of liposome-mediated MGMT-siRNA reinforces the cytotoxicity of temozolomide in GBM-initiating cells. *Gene Therapy* 17: 1363-1371, 2010, 査読有
- ④ Wakabayashi T, Natsume A, Hatano H, Fujii M, Shimato S, Ito M, Ohno M, Ito S, Ogura M, Yoshida J. p16 promoter methylation in the serum as a basis for the molecular diagnosis of gliomas. *Neurosurgery* 64: 455-461, 2009, 査読有
- ⑤ Oi S, Natsume A, Ito M, Kondo Y, Shimato S, Maeda Y, Saito K, Wakabayashi T. 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* 92: 15-22, 2009, 査読有

[学会発表] (計 27 件)

- ① Saito K, et al. Aggressive resection of invasive skull base meningiomas. North American Skull Base Society 21st Annual Meeting, 2011/2/18-20, Scottsdale, USA
- ② 岸田悠吾, 夏目敦至, 近藤 豊, 齋藤 清, 若林俊彦. エピゲノムの見地からみた髄膜腫の再分類. 第 28 回日本脳腫瘍学会, 平成 22 年 11 月 28-30 日, 軽井沢

- ③ 岸田悠吾, 夏目敦至, 近藤 豊, 齋藤 清, 若林俊彦. 髄膜腫のエピゲノム解析. 第 69 回日本脳神経外科学会総会, 平成 22 年 10 月 27-29 日, 福岡
- ④ Saito K, et al. Skull base surgeries and long-term outcome for malignant skull base tumors. XIV World Congress of Neurological Surgery of the World Federation of Neurosurgical Societies, 2009/8/30-9/4, Boston, USA
- ⑤ Natsume A, Saito K, et al. Genetic characteristics of malignant meningiomas. 6th International Congress on Meningiomas and Cerebral Venous System, 2008/9/3-6, Boston, USA

[図書] (計 8 件)

- ① 齋藤 清. 小脳橋角部髄膜腫. 医学書院, イラストレイテッド脳腫瘍外科学, 2011, 152-155
- ② 齋藤 清ら. 静脈洞に進展した髄膜腫の摘出術. 編集室なるにあ, 脳腫瘍の外科 Science, Art and Technology, 2010, 160-165
- ③ 齋藤 清. 嗅溝髄膜腫. *メディカルビュー*, NS NOW 3 テント上髄膜腫, 2008, 82-92

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 清 (SAITO KIYOSHI)
福島医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00240804

(2) 研究分担者

夏目 敦至 (NATSUME ATSUSHI)
名古屋大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 30362255

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

伊藤 英治 (ITO EIJI)
福島医科大学・医学部・助教
研究者番号: 30402605

岸田 悠吾 (KISHIDA YUGO)

名古屋大学・大学院医学系研究科・大学院生
研究者番号: なし