

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591883

研究課題名（和文）神経膠腫の生物学的特性に関与するエピジェネティクス制御機構の解明

研究課題名（英文）Epigenetic regulations associated with biological and clinical relevancies in diffuse gliomas

研究代表者

渡邊 学郎（WATANABE TAKAO）

日本大学・医学部・准教授

研究者番号：40287652

研究成果の概要（和文）：脳腫瘍のうち最も分化度の低い glioblastoma は、治療に難渋する浸潤性悪性腫瘍である。エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列によらない遺伝子発現制御に関わる後成的修飾である。癌治療の観点では、エピジェネティックな異常は可逆的な反応であることから、その変化の修復は効果的な治療法になり得ると期待されている。本研究では、革新的な DNA 解析装置として注目されている飛行時間型質量分光計 MassARRAY を用いて、神経膠腫細胞株において、数々の遺伝子群のメチル化を網羅的にプロファイル解析した。この結果、A172、U87MG、U251MG、T98G、YH13、AM38、および U138MG の 7 つの神経膠腫細胞株において、zygote arrest 1 (ZAR1) のメチル化が高頻度で検出された。ZAR1 は卵巣に特異的に発現し、卵細胞の形成に関与するといわれているが、癌の発生に関わるとの報告はなされていない。このメチル化はプロモーター領域以外の CpG アイランドに認められ、遺伝子発現上昇に関与していることが明らかとなった。正常脳では、メチル化は検出されなかった。脳腫瘍手術検体 86 例にて検討したところ、diffuse astrocytoma 7 例全例 (100%)、anaplastic astrocytoma 17 例中 16 例 (94%)、glioblastoma 29 例中 26 例 (90%)、oligodendroglioma 3 例全例 (100%)、anaplastic oligodendroglioma 3 例全例 (100%)、pituitary adenoma 10 例中 9 例 (90%) に ZAR1 のメチル化が認められた。ZAR1 のメチル化は glioma と pituitary adenoma に高頻度に検出された。特に glioma では grade 1 以外のいずれの grade でも極めて高頻度に認められており、その腫瘍形成に必須のエピジェネティクス変異と考えられる。さらに神経膠腫細胞株において、RT-PCR にて mRNA の発現解析を行ったが、ZAR1 発現を認めることができなかった。ZAR1 のメチル化は他の遺伝子変異や腫瘍形成過程における二次的な変化を反映したものと推察される。

研究成果の概要（英文）：Zygote arrest 1 (ZAR1) is a novel maternal-effect gene that plays crucial roles during the oocyte-to-embryo transition. Comprehensive methylation analysis of tumor-specific differentially methylated regions in human malignant melanomas has recently led to the identification of non-promoter hypermethylation of the ZAR1 gene that had never been identified as an aberrant methylated region in any human tumor. Notably, ZAR1 hypermethylation was frequently observed in melanomas but was absent in benign nevi, and ZAR1 expression was found to be up-regulated in methylated tumors. These findings prompted us to screen for ZAR1 non-promoter methylation in various types of human brain tumors using MassARRAY EpiTYPER. Strikingly, hypermethylation of ZAR1 was observed frequently in diffuse astrocytomas (100%), anaplastic astrocytomas (94%), glioblastomas (93%), oligodendrogliomas (100%), anaplastic oligodendrogliomas (100%), and pituitary adenomas (90%), but not at all pilocytic astrocytomas. Other tumor types showed infrequent ZAR1 hypermethylation: 17% of vestibular schwannomas and 33% of meningothelial meningiomas. Detectable ZAR1 transcript was not found in any of hypermethylated glioma cell lines. Our data indicate that hypermethylation of the ZAR1 non-promoter is extremely frequent in diffuse gliomas and pituitary adenomas, although ZAR1 expression is unlikely to play a tumorigenic role.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 21 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
平成 22 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
平成 23 年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：脳神経外科学

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：神経膠腫、メチル化、エピジェネティクス、MassARRAY、ZAR1

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は外胚葉神経上皮より由来する脳実質内腫瘍であり、その浸潤性格ゆえに手術による完全治癒が困難な疾患である。特に最も頻度の高い膠芽腫は、治療に難渋する浸潤性悪性腫瘍である。従来、膠芽腫に対する術後補助療法は放射線照射が主体であったが、化学療法の有効性が質の高い大規模な臨床試験にて検証されるようになり、確実にそのエビデンスが蓄積されつつある。特に 2005 年、多施設共同第 III 相臨床試験にて temozolomide (TMZ) の有効性が証明されたことにより、膠芽腫の治療方法は大きな転換期を迎えたといえる。しかしながら、TMZ がエビデンスを持つとはいえ、延命効果は 3 ヶ月に満たず、その恩恵はわずかといわざるをえない。

ヒトゲノム・プロジェクト以降、生命科学の研究がポストゲノム時代に突入した今日、最も脚光をあびている研究テーマがエピジェネティクスである。エピジェネティクスとは、DNA の塩基配列によらない遺伝子発現制御に関わる後成的修飾である。癌治療の観点では、エピジェネティックな異常は可逆的な反応であることから、その変化の修復は効果的な治療法になり得ると期待されている。神経膠腫のエピジェネティクスに関わる最大のトピックスは、*O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 遺伝子の高メチル化である。MGMT は TMZ や nitrosourea などのアルキル化剤により形成された *O*<sup>6</sup>-アルキルグアニンを特異的に修復する DNA 修復酵素であり、その活性化はアルキル化剤耐性の主因と考えられている。前述の多施設共同臨床試験では、高メチル化による MGMT の不活性化は TMZ 感受性を高めることが証明された。しかしながら、後述するように、メチル化解析の手法には様々な問題点があり、ルー

チンに臨床応用するにはその解析システムを確立しなければならない。また、TMZ の耐性・感受性には、MGMT 以外の遺伝子のエピジェネティックな異常が関与していると推察されるが、その分子機構についてはほとんど解明されていない。

2. 研究の目的

本研究の課題は、メチル化解析システムを向上させ、神経膠腫の治療反応性を含めた生物学的特性と関連するエピジェネティックな変化を網羅的に解析することにより、化学療法感受性を予測し得るマーカーとして臨床へトランスレーションすることにある。

本研究の独創性は、1) メチル化定量の試み、2) 神経膠腫の生物学的特性と関連する遺伝子群の網羅的なメチル化解析、の 2 点にある。いずれも MassARRAY の利点を生かした本研究の特色ともいえる。メチル化の解析方法として最も一般的に用いられているのは MSP であるが、簡便、低コストという利点を有する反面、その精度と感度には限界があり、定量が不可能という欠点を有する。MassARRAY ではメチル化比率を定量でき、メチル化プロファイル解析も可能である。神経膠腫においては、これまでに様々な遺伝子のメチル化が検索されてきたが、網羅的にメチル化プロファイルを解析した報告はない。

今後、治療反応性を含めた生物学的特性と密接に関わるエピジェネティクスが解明され、その変化を制御できるようになれば、癌治療への応用が可能になると考えられる。本研究はその制御機構解明のブレークスルーとなり得るものであり、悪性神経膠腫に苦しむ患者に光明をもたらすものと期待される。

3. 研究の方法

本研究では、革新的な DNA 解析装置として注目されている MassARRAY を用いて、神

経膠腫細胞株において、TMZ感受性と関連する遺伝子群のメチル化を網羅的にプロファイル解析した。MassARRAYでは、200-600bpのターゲット領域内の複数のCpGサイトを一度に同定・定量することが可能であり、ターゲット領域数やサンプル数を自由に組み合わせることが出来ることから、メチル化プロファイルの作成に適しているといえる。また、神経膠腫患者の臨床検体においてMassARRAYにて網羅的に解析し、それらの臨床的意義を検証した。さらに、神経膠腫細胞株において、リアルタイム定量PCRを用いたRT-PCRにてメチル化標的遺伝子のmRNA発現解析を行った。

#### 4. 研究成果

A172、U87MG、U251MG、T98G、YH13、AM38、およびU138MGの7つの神経膠腫細胞株において、*zygote arrest 1 (ZAR1)*のメチル化が高頻度で検出された。ZAR1は卵巣に特異的に発現し、卵細胞の形成に関与するといわれているが、癌の発生に関わるとの報告はなされていない。このメチル化はプロモーター領域以外のCpGアイランドに認められ、遺伝子発現上昇に関与していることが明らかとなった。正常脳では、メチル化は検出されなかった。脳腫瘍手術検体86例にて検討したところ、diffuse astrocytoma 7例全例(100%)、anaplastic astrocytoma 17例中16例(94%)、glioblastoma 29例中26例(90%)、oligodendroglioma 3例全例(100%)、anaplastic oligodendroglioma 3例全例(100%)、pituitary adenoma 10例中9例(90%)にZAR1のメチル化が認められた。ZAR1のメチル化はgliomaとpituitary adenomaに高頻度に検出された。特にgliomaではgrade 1以外のいずれのgradeでも極めて高頻度に認められており、その腫瘍形成に必須のエピジェネティクス変異と考えられる。さらに神経膠腫細胞株において、RT-PCRにてmRNAの発現解析を行ったが、ZAR1発現を認めることができなかった。ZAR1のメチル化は他の遺伝子変異や腫瘍形成過程における二次的な変化を反映したものと推察される。

#### 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4件)

- ① Yoshino A, Ogino A, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Watanabe T, Katayama Y, Okamoto Y, Naruse N, Sano E, Tsumoto K: Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. *Int J Oncol* 36:1367-1377, 2010.

- ② Watanabe T, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Katayama Y, Shinojima Y, Terui T, Nagase H: Aberrant hypermethylation of non-promoter *zygote arrest 1 (ZAR1)* in human brain tumors. *Neurol Med Chir* 50:1062-1069, 2010.
- ③ Yoshino A, Tashiro S, Ogino A, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Watanabe T, Katayama Y, Okamoto Y, Sano E, Tsumoto K: Gene expression profiles predicting the response to IFN- $\beta$  and a combination of temozolomide and IFN- $\beta$  in malignant gliomas. *Int J Oncol* 39:529-542, 2011.
- ④ Watanabe T, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Katayama Y, Shinojima Y, Terui T, Nagase H: Non-promoter hypermethylation of *zygote arrest 1 (ZAR1)* in human brain tumors. *Brain Tumor Pathol* 28:199-202, 2011.

[学会発表] (計11件)

- ① Watanabe T: Clinical relevance of MGMT methylation in the treatment of diffuse gliomas. XIV World Congress of Neurological Surgery, Boston, USA, September 2009
- ② 渡邊学郎, 谷地一成, 太田隆, 福島崇夫, 吉野篤緒, 片山容一, 永瀬浩喜: 脳腫瘍における *zygote arrest 1 (ZAR1)* 遺伝子の non-promoter領域のメチル化 (シンポジウム: グリオーマの分子生物学). 第28回日本脳腫瘍病理学会, 大阪, 2010年5月
- ③ 太田隆, 谷地一成, 福島崇夫, 渡邊学郎, 吉野篤緒, 片山容一, 永瀬浩喜: 脳腫瘍における *zygote arrest 1 (ZAR1)* 遺伝子のメチル化解析. 第11回日本分子脳神経外科学会, 仙台, 2010年8月
- ④ Watanabe T, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Yoshino A, Katayama Y: Aberrant hypermethylation of non-promoter *zygote arrest 1 (ZAR1)* in human brain tumors. The 9<sup>th</sup> Meeting of the European Association of NeuroOncology, Masstricht, Netherland, September 2010.
- ⑤ Yoshino A, Ogino A, Yachi K, Ohta T, Fukushima T, Watanabe T, Katayama Y, Okamoto Y, Naruse N, Sano E, Tsumoto K: Gene expression profiling predicts response to temozolomide in malignant gliomas. The 9<sup>th</sup> Meeting of the European Association of NeuroOncology, Masstricht, Netherland, September 2010.
- ⑥ Ohta T, Yachi K, Ogino A, Yokoyama T, Fukushima T, Watanabe T, Yoshino A, Katayama Y, Honma T, Sugitani M: Pleomorphic granular cell astrocytoma in

the pineal gland. The 9<sup>th</sup> Meeting of the European Association of NeuroOncology, Maastricht, Netherland, September 2010.

- ⑦ 吉野篤緒, 谷地一成, 太田隆, 荻野暁義, 福島崇夫, 渡邊学郎, 片山容一: 悪性神経膠腫における temozolomide ならびに IFN-β 感受性に対する遺伝子解析 (悪性神経膠腫: 分子病態から治療まで). 社団法人日本脳神経外科学会第 69 回学術総会, 福岡, 2010 年 10 月
- ⑧ 吉野篤緒, 谷地一成, 太田隆, 荻野暁義, 福島崇夫, 渡邊学郎, 片山容一: 悪性神経膠腫における TMZ, IFN-β, TMZ+IFN-β 感受性に対する遺伝子解析. 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会, 軽井沢, 2010 年 11 月
- ⑨ 太田隆, 谷地一成, 福島崇夫, 渡邊学郎, 吉野篤緒, 片山容一, 永瀬浩喜: 脳腫瘍における *zygote arrest 1 (ZAR1)* 遺伝子の non-promoter 領域のメチル化解析. 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会, 軽井沢, 2010 年 11 月
- ⑩ 吉野篤緒, 谷地一成, 太田隆, 荻野暁義, 福島崇夫, 渡邊学郎, 片山容一: 悪性神経膠腫に対するテモゾロミドとインターフェロンベータによる相乗効果. 社団法人日本脳神経外科学会第 70 回学術総会, 横浜, 2011 年 10 月
- ⑪ 吉野篤緒, 谷地一成, 太田隆, 荻野暁義, 福島崇夫, 渡邊学郎, 片山容一, 岡本豊, 田代晋也, 佐野恵美子, 津本浩平: 膠芽腫に対するテモゾロミドと IFN-beta の相乗効果. 第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会, 下呂, 2011 年 11 月

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

○取得状況 (計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

[その他]

ホームページ等  
特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 学郎 (WATANABE TAKAO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 40287652

(2) 研究分担者

福島 崇夫 (HUKUSHIMA TAKAO)

日本大学・医学部・助教

研究者番号: 20350019

吉野 篤緒 (YOSHINO ATSUO)

日本大学・医学部・准教授

研究者番号: 50256848

片山 容一 (KATAYAMA YOICHI)

日本大学・医学部・教授

研究者番号: 00125048

(3) 連携研究者

なし