

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06929

研究課題名(和文)成人高悪性度神経膠腫の分子遺伝学的検討：2亜型に焦点を当てて

研究課題名(英文)Molecular genetic analysis of adult high-grade gliomas, focusing on two subtypes

研究代表者

柴原 純二 (Shibahara, Junji)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号：60334380

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)：FGFR3::TACC3融合遺伝子を有する高悪性度浸潤性膠腫(F3T3-HGG)について、自験例のデータと公共データを用いた解析により、一部の症例が独特のDNAメチル化プロファイルを示すことを確認した。FGFR3・TACC3遺伝子コピー数増加の検出によりF3T3-HGGの診断が一定の精度で可能であることを見出した。新たに定義した多形型膠芽腫について臨床病理学的・分子遺伝学的解析を行い、均一な腫瘍群ではないが、一部の症例が長期生存を示し、ミスマッチ修復蛋白欠失例や最近報告された新たなDNAメチル化プロファイルを呈する例など、通常の膠芽腫と区別すべき症例を高率に含むことが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGFR3::TACC3融合遺伝子を有する高悪性度浸潤性膠腫の少なくとも一部が独特のDNAメチル化プロファイルを示すことは、本腫瘍の位置付けを決める上で有意義な知見である。分子標的薬の適応の点でも注目される本腫瘍のスクリーニング法は確立されておらず、遺伝子コピー数の検出により一定の精度で診断が可能であることを見出したことは、臨床的意義があると考えられる。多形型膠芽腫が膠芽腫としては非典型的な臨床病理学的・分子遺伝学的特徴を示す症例を高率に含むことを明らかにしたことは、膠芽腫の個別化医療の推進に重要な知見であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：DNA methylation profiling analyses of high-grade infiltrating gliomas harboring FGFR3::TACC3 fusion gene (F3T3-HGG), utilizing both in-house and public datasets, revealed that a subset of the cases exhibit a distinct DNA methylation profile. Additionally, it was shown that detecting increased FGFR3/TACC3 gene copy numbers enabled the diagnosis of F3T3-HGG with a reasonable accuracy. Clinicopathological and molecular analyses were carried out on a newly defined tumor type termed polymorphic glioblastoma. The study revealed that polymorphic glioblastoma comprises a heterogeneous tumor group, including cases distinguished from conventional glioblastoma by features such as prolonged survival, loss of mismatch repair protein expression, or distinct DNA methylation profiles recently reported.

研究分野：人体病理学

キーワード：膠腫 融合遺伝子 FGFR3 多形性 DNAメチル化

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫を含む高悪性度浸潤性膠腫は形態的・分子遺伝学的に不均一な腫瘍群である。複数の亜型の存在が知られる一方で、位置付け不明あるいは未整理の群が存在する。以下の2つの腫瘍型は、高悪性度浸潤性膠腫の今後の分類を考える上で注目される。

#### (1) FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫

膠芽腫の一部が FGFR3::TACC3 融合遺伝子を有することは 2012 年に初めて報告され (PMID: 22837387)、膠芽腫の約 3% と比較的高頻度に生じるとされる。同融合遺伝子を有する高悪性度浸潤性膠腫についての報告は、2020 年時点では同一施設からの 3 報が主なものであり、その形態や分子遺伝学的特徴の全貌は明らかとはなっていない。本型は WHO 分類第 5 版で独立した疾患単位とされる可能性について言及されるも、十分な知見の蓄積がなく、更なる検証が必要な群とされている (PMID: 32307792)。WHO 分類は分子指標に基づく分類を積極的に推進しているが、融合遺伝子の存在自体が腫瘍の独立性を担保するものではない。本腫瘍の位置づけを明らかにする上で、近年重要視される DNA メチル化プロファイルを含めた、分子遺伝学的特徴の詳細を解明する必要がある。

#### (2) 多形型膠芽腫

膠芽腫には巨細胞や上皮様細胞、肉腫様紡錘形細胞成分が存在することが以前から知られている。WHO 分類改訂第 4 版 (2016) では、これら成分が顕著な腫瘍について、それぞれ巨細胞膠芽腫、類上皮膠芽腫、膠肉腫の診断名 (膠芽腫の亜型) を定義しているが、これら成分が同一腫瘍内に混在する多形型膠芽腫と称し得る一群が稀ならず経験される。こうした腫瘍の一面を捉えた症例報告が散見されるが、一連の症例を対象とした包括的検討は行われておらず、予後を含めた臨床的特徴や分子遺伝学的特徴の詳細は不明である。

### 2. 研究の目的

上記の2つの高悪性度浸潤性膠腫について、臨床病理学的検討・分子遺伝学的検討を通して、その位置付けを検証し、新たな国際分類の根拠となる基礎知見を得ることが主な研究の目的である。

FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫については、融合遺伝子の簡便な検出法が確立されておらず、新規診断法の確立もめざす。また、遺伝子発現解析により特徴的形態の背景にある分子機構の解明を試みる。

### 3. 研究の方法

#### (1) FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫の検討

##### 症例

2009 年から 2023 年に杏林大学医学部付属病院で外科切除された脳腫瘍および診断コンサルテーションに提出された脳腫瘍を病理組織学的に再検討し、既知の形態学的特徴 (PMID: 28976058) 免疫組織化学的な FGFR3 の発現状態から、融合遺伝子陽性症例候補を抽出した。各症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本から RAN を抽出し、RT-PCR 法ないし RNA シークエンスより取得されたペアエンドリード配列を用いた融合遺伝子検出により、FGFR3:TACC3 融合遺伝子を確認した。

##### 分子遺伝学的特徴の解明

##### ・DNA メチル化解析

ホルマリン固定パラフィン包埋標本から DNA を抽出し、Infinium MethylationEPIC アレイ (イリミナ社) を用いたゲノムワイドな DNA メチル化解析を行った。得られた idat ファイルを用い、ドイツがん研究センター (Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ) が WEB ツールとして公開している分類器 (DKFZ classifier, <https://www.molecularneuropathology.org/mnp/>) により DNA メチル化分類を得た。

また、一般公開された種々の腫瘍型を含む 2801 例の脳腫瘍の DNA メチル化データ (GSE109381, PMID: 29539639) および FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫の DNA メチル化データ (GSE200647, PMID: 33168106) とともに、t-distributed stochastic neighbor embedding (tSNE) 解析を行った。解析には の確定症例のほか、形態的に類似し FGFR3 高発現を示した候補症例も含めた。

##### ・RNA シークエンスによる遺伝子発現解析

確定ホルマリン固定パラフィン包埋標本から抽出した RNA を用いて RNA シークエンスを実施し、FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫で発現変動のあった遺伝子群について、PANTHER (<http://www.pantherdb.org/>) および ShinyGO (<http://bioinformatics.sdstate.edu/go/>) を用いた GeneOntology 解析を行った。

##### 診断法の検証

FGFR3::TACC3 融合遺伝子が tandem duplication により形成されることから、FGFR3・TACC3

遺伝子コピー数増加の検出による FGFR3::TACC3 融合遺伝子の検出を試みた。

で得られた DNA メチル化データに基づくコピー数解析および MLPA 法、Digital PCR 法による検討を行った。

## (2) 多形型膠芽腫の検討

巨細胞、類上皮細胞あるいは紡錘形細胞を含み、これらが主体をなす領域を少なくとも低倍率 1 視野以上含む膠芽腫を多形型膠芽腫と定義した。巨細胞膠芽腫、類上皮膠芽腫、膠肉腫の診断基準を満たす症例は除外した。

### 臨床病理学的検討

2009 年から 2023 年に杏林大学医学部付属病院で外科切除された脳腫瘍を後方視的に再検討し、上記の定義を満たす症例について、診療録を用いて患者の年齢、性別、発生部位、予後を検討した。

発育様式や炎症反応を含めた病理組織学的所見について再検討を行った。また、代表部のホルマリン固定パラフィン包埋標本を用いた免疫組織化学的検討を実施した。検討に使用した抗体は、ATRX, IDH1 p.R132H, BRAF p.V600E, MLH1, MSH2, MSH6, PMS2, SMARCA1 である。

### 分子遺伝学的検討

代表部のホルマリン固定パラフィン包埋標本から DNA を抽出し、サンガー法により IDH1/2 変異、Digital PCR 法により TERT プロモーター変異の検討を行った。

また、3.(1)と同様の手法で、DNA メチル化解析を行った。tSNE 解析では、種々の腫瘍型を含む 2801 例の脳腫瘍の DNA メチル化データ (GSE109381, PMID: 29539639) に加え、最近報告された high-grade glioma with pleomorphic and pseudopapillary features (HPAP) の DNA メチル化データ (GSE195567, PMID: 35103816) を用いた。

## 4. 研究成果

### (1) FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫の分子遺伝学的特徴

形態学的特徴、FGFR3 免疫組織化学の結果に基づく候補症例 13 例を解析し、7 例において FGFR3::TACC3 融合遺伝子が確認された。

#### DNA メチル化プロファイル

DKFZ classifier では、解析結果の得られた診断確定例 6 例のうち 5 例は Glioblastoma, IDH-wildtype に分類され、うち 4 例は mesenchymal subtype であった。1 例は no match の結果であった。

t-SNE 解析 (図 1) では、上記確定 6 例中 5 例および公共データ上の FGFR3::TACC3 陽性膠芽腫例の一部が緩やかな一群をなし、Glioblastoma, IDH-wildtype, mesenchymal subtype の近傍に分布した。また融合遺伝子が検出されなかった候補症例 5 例も近傍に位置した。

#### 遺伝子発現プロファイル

FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫における発現変動遺伝子群には、ミトコンドリア電子伝達系関連遺伝子群など様々な生物機能と関連した遺伝子群が確認されたが、注目した細胞老化と関連は見出せなかった。

#### 診断法の検証

FGFR3::TACC3 融合遺伝子陽性例を含む膠芽腫の DNA メチル化データ (GSE200647) を用いて、FGFR3・TACC3 遺伝子コピー数増加の検討を行ったところ、感度 69% (35/51)、特異度 92% (155/169)、陽性的中率 71% (35/49)、陰性的中率 91% (155/171) の精度で、FGFR3::TACC3 融合遺伝子陽性例の検出が可能であった。

自施設例を用いて、Digital PCR 法や MLPA 法でのコピー検出を試みたが、DNA メチル化アレイでの遺伝子コピー数解析以上の精度の結果は得られなかった。遺伝子重複領域が短く、同領域のプローブ密度も低いことが低精度の一因と考えられ、プローブ密度が低い背景には同領域付近は GC 含量が高く、プローブの設計自体が困難であることが考えられた。

### (2) 多形膠芽腫の臨床病理学的・分子遺伝学的検討

#### 臨床病理学的特徴

14 例が上記定義に合致する多形型膠芽腫と判断した。患者年齢の中央値は 62.5 歳 (17 歳 ~ 75 歳) 男:女=6:8 であった。全例が大脳半球発生で、前頭葉、側頭葉、頭頂葉、後頭葉の発生が、それぞれ 6 例、4 例、3 例、1 例であった。3 例は術後 5 年以上の無再発生存を維持していた。

組織学的には、圧排性増殖を 6 例に認め、リンパ球浸潤が 7 例で目立った。免疫組織化学では、CD34 異常発現を 4 例、ATRX 発現欠失を 3 例、ミスマッチ修復蛋白の蛋白発現欠失を 3 例

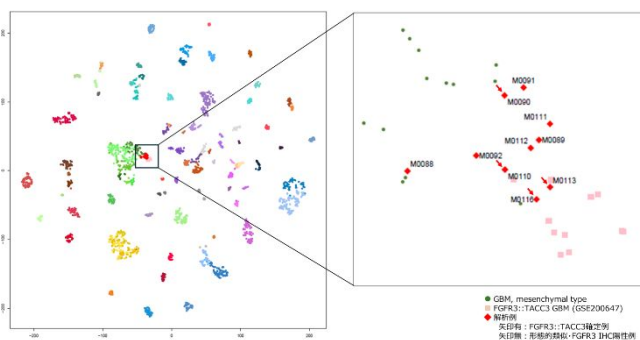


図 1: tSNE による FGFR3::TACC3 陽性高悪性度浸潤性膠腫の DNA メチル化プロファイル



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 里見介史、池村雅子、森田茂樹、内山明央、松影昭一、永根基雄、柴原純二
2. 発表標題 ゲノムワイドDNAメチル化プロファイルによるFGFR3::TACC3融合遺伝子陽性膠芽腫の同定
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------