

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 25 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601
 研究種目：若手研究（B）
 研究期間：2010～2011
 課題番号：22791334
 研究課題名（和文） 膠芽腫及びその腫瘍幹細胞の epigenetic な profile に応じた個別化療法
 研究課題名（英文） Research for personalized treatment according to the epigenetic profile of glioblastoma and glioma stem cell
 研究代表者
 齊藤 邦昭 (SAITO KUNIAKI)
 東京大学・医学部附属病院・助教
 研究者番号：50446564

研究成果の概要（和文）：

膠芽腫をはじめとする神経膠腫の検体よりDNAを抽出し、遺伝子プロモーター領域のメチル化や、基本的なゲノム遺伝子解析（IDH変異や1p19q欠失など）を行い、さらにDNAメチル化の解析をゲノム網羅的に行った。神経膠腫におけるCpG island methylator phenotype (G-CIMP)を同定し、IDH変異との強い相関を確認した。CIMP陽性腫瘍で特異的にメチル化されるCIMPマーカーを検出し、さらにそれらが特徴的なヒストン修飾を有していることが示唆され、新たなターゲットに対する個別化療法の可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：

We extracted DNA from the glioma samples including glioblastoma and performed a methylation analysis of DNA promoter region and genetic analysis such as mutation of IDH and 1p19q deletion. Genome-wide DNA methylation analysis identified G-CIMP and its strong association with IDH mutation. We selected CIMP markers which were differentially methylated in CIMP positive gliomas. CIMP marker genes showed distinct patterns of specific histone modification, suggesting the possibility of personalized treatment for the new targets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,800,000	540,000	2,340,000
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：脳腫瘍学

キーワード：①膠芽腫 ②エピジェネティクス ③メチル化 ④網羅的解析 ⑤CpG island methylator phenotype (CIMP) ⑥Isocitrate dehydrogenase (IDH) ⑦腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) Epigenetics とは、DNA の塩基配列の変化を伴うことなく、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。これは、細胞の分化や発生などにおいて重要な役割を果たすのみならず、その異常は腫瘍形成や癌の治療感受性などにも強く関与することが知られるようになり注目を集めている。癌における epigenetics の中心的

分子機構のひとつが、DNA のメチル化であり、細胞周期調節、DNA 修復、アポトーシス、血管新生などに関わる既知の遺伝子 p16, RB, PTEN, p53 などは、プロモーター領域のメチル化により発現が制御され癌化に関与すると考えられている。Epigenetics にはヒストン修飾機構も重要であり、このメチル化やアセチル化により遺伝子発現の制御が行われるが、癌においてその異常が報告されている。

(2) 膠芽腫においても種々の epigenetic な異常が存在することが報告されてきたが、近年治療に関連するものとして 06 methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、標準的化学療法剤 temozolomide の感受性に強く相関していることが報告された。しかしながら、この DNA のメチル化を認めるにもかかわらず治療に不応性の患者が存在し、抗癌剤抵抗性となった再発腫瘍においてもメチル化を認めるなど、MGMT 以外の多数の因子が治療反応性に関連していることは明らかであり、これら因子（遺伝子）を同定することは、今後の治療戦略構築において非常に重要であると考えられる。

(3) 近年、膠芽腫の化学療法抵抗性の原因として、抗癌剤に対する耐性が高いと考えられている脳腫瘍幹細胞の役割が注目されている。腫瘍幹細胞は、自己複製能および多分化能を有する腫瘍前駆細胞で、腫瘍細胞を産み出すもとになる細胞である。膠芽腫は不均一な悪性細胞の集合体であることが治療を困難にしている大きな要因であるのだが、この不均一性の原因としても腫瘍幹細胞があげられ、治療抵抗性克服のためには、この腫瘍幹細胞に働きかける薬剤を開発することも大切と思われる。もともと幼弱な細胞の発生や分化に重要な働きをもつ epigenetic な機構が、腫瘍幹細胞の働きと関連していることは十分予測されており、実際に、膠芽腫幹細胞の維持および分化に EZH2 (histone methyltransferase enhancer of zeste 2) が関与していることも報告され、epigenetic な機序が解明されつつある。しかしながら、この様な知見を治療に応用するためにはさらなる基礎研究の進展が望まれている。

2. 研究の目的

膠芽腫およびその幹細胞の epigenetic profile を様々なレベルで解明し、それと特に治療反応性との関係を明らかにすることで、epigenetic status に応じた個別化医療を実現すると共に、将来の epigenetic な modifier を併用した治療の礎を築くことを目的として本研究を計画した。

3. 研究の方法

(1) 脳腫瘍幹細胞の樹立と解析

腫瘍組織は、手術の際に病変摘出のために取り出され、診断に利用された残りの組織を使用。膠芽腫幹細胞から腫瘍懸濁液をつくり、EGF, bFGF, N2, B27 入り neurobasal medium で細胞を培養し、sphere を形成した細胞を得る。これまでに樹立された腫瘍細胞も含め、CD133 などの細胞表面マーカーを用いた検討、分化能の評価を行い、また腫瘍形成能をマウス xenograft などを用いて評価する。

(2) 主に MSP を用いた既知の遺伝子のメチル化と化学療法感受性の解析

遺伝子のプロモーター領域について、bisulfite 処理（シトシンがウラシルに変換されるがメチルシトシンではこの反応が起きない）後の DNA 試料を用いて行う。実際の解析にはシーケンス判読、Methylation specific PCR あるいは、リアルタイム PCR を用いた定量法も用いる。

(3) メチル化以外の遺伝子異常 (IDH 変異、1p19q LOH、10qLOH、p53 変異など)

神経膠腫に高頻度に認める遺伝子変異として最近発見され注目されている IDH の変異は、DNA やヒストンのメチル化に影響することが知られており、CIMP との強い相関が近年報告された。この遺伝子変異について、ダイレクトシーケンシング法を用いて全ての検体の解析を行った。また、神経膠腫の発生や悪性転化に関わる重要な遺伝子異常として、p53 変異、1p19q 欠失、10q 欠失などがあり、これらについても microsatellite 法もしくは MLPA 法により解析を行った。

(4) Infinium450K BeadChip を用いたゲノム網羅的なメチル化解析

網羅的メチル化プロファイルの取得には、東京大学先端科学技術研究センター・ゲノムサイエンス部門の協力のもと、DNA を bisulfite conversion 後、Illumina 社の Infinium 法 (HumanMethylation450 BeadChip 使用) にて解析を行う。この方法では、45 万個以上の CpG サイトのメチル化を半定量評価することができるため、神経膠腫の発生や悪性転化に関わる未知のメチル化異常の検出が可能と思われる。

4. 研究成果

(1) 幹細胞の樹立

新たに、膠芽腫13検体から幹細胞の樹立に成功しており、そのうち11種の細胞株をマウスに移植し、そのうち4種類で腫瘍の形成を確認した。

(2) MGMTメチル化と各グレードの神経膠腫の予後との関係

Grade2, 3, 4の神経膠腫のMGMTプロモーターのメチル化と予後の関係を解析してみると、Grade4の膠芽腫において、MGMTメチル化群で全生存期間、無再発生存期間共に有意な延長が認められた(図1, 図2)。ほとんどの症例において、アルキル化剤での治療をされているため、MGMTメチル化は、化学療法反応性の予測因子とすることができる。

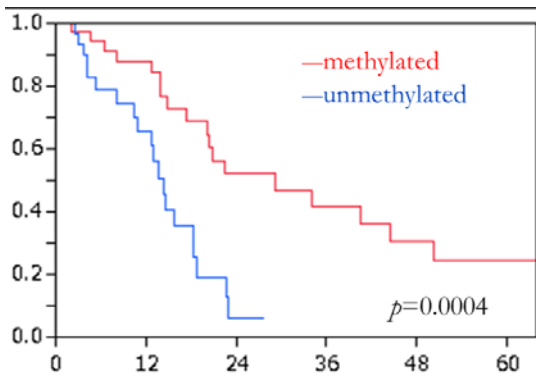


図1 膠芽腫の全生存期間 (MGMTメチル化有無で比較)

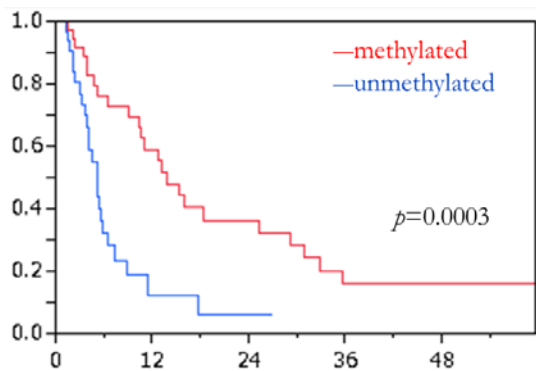


図2 膠芽腫の無増悪生存期間 (MGMTメチル化有無で比較)

Grade 3の神経膠腫の無増悪生存期間がMGMTプロモーターメチル化群で有意に延長された。一方、Grade 2の神経膠腫では、MGMTメチル化と予後との相関は認められなかった。

(3) 各グレードの神経膠腫におけるIDH変異
網羅的メチル化解析に先立ち、神経膠腫検体を用いてIDH変異の解析を行った。Grade2神経膠腫の66%、Grade3神経膠腫の45%、Grade4神経膠腫の10%にIDH変異を認め、Grade3神経膠腫において、IDH変異が予後予測因子であることを報告した (Mukasa et al. Cancer Science, 2012)。

また、Grade2およびGrade3の神経膠腫において、IDH変異とMGMTメチル化の間に相関がみられた。

(4) 網羅的メチル化解析

膠芽腫19例、Grade3 神経膠腫14例、Grade2 神経膠腫 42 例について、Infinium 450K BeadChipを用いてゲノム網羅的メチル化解析を行った。階層的クラスタリングにより、CIMPと非CIMPの2群に分類され、IDH変異との強い相関がみられた。また、MGMTメチル化および1p19q欠失とCIMPとの相関もみられた(図3)。

膠芽腫の多くは非CIMP群に分類され、Grade2 神経膠腫から進展した二次性膠芽腫はCIMP群

に分類された。また、二次性膠芽腫はCIMPの中でも部分的に脱メチル化を呈する特徴的なクラスターを形成しており、初発時の腫瘍と比べてもメチル化の変化を来すことがわかった。

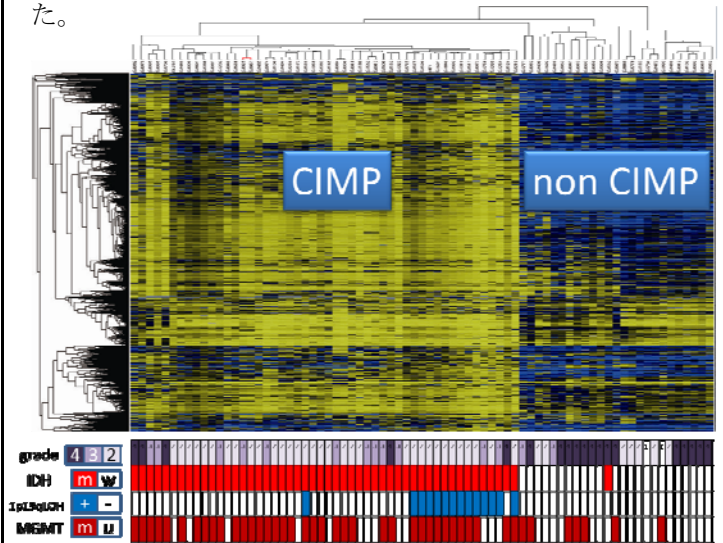


図3 神経膠腫75検体の網羅的DNAメチル化解析の階層的クラスタリング

さらに、CIMP群と非CIMP群のGrade 2/3の神経膠腫で予後を比較してみたところ、CIMP群で生存期間が有意に長いことが示された(図4)。

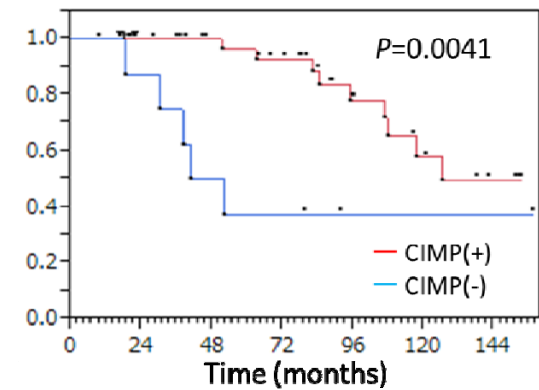


図4 Grade 2/3 gliomaにおける生存期間 (CIMP +/-で比較)

(5) CIMPマーカー

CIMPで特異的にメチル化している遺伝子について、以下の基準で抽出したところ、表1に示すような代表的なCIMPマーカーが抽出された。

Methylator markers
HNRNPf
DKK1
RADIL
CBLN3
TGIF1
SMARCD3
RBP1
CFLAR
ARNTL
MDK

マーカープローブ抽出基準
 ① CIMP+ 50例すべてにおいてβ値が0.3以上であること
 ② CIMP- 25例すべてにおいてβ値が0.2未満であること

これらは、CIMP陽性腫瘍で特異的にメチル化されている遺伝子であり、神経膠腫の発生に関与している可能性がある。よって、CIMP陽性腫瘍に対する個別化治療のターゲットとなりうると考えられる。

表1 CIMPマーカー

さらに、胚性幹細胞において知られているヒストンのリジンメチル化statusをCIMPマーカーとして抽出したプローブに当てはめると、CIMPマーカーのepigenetic statusについて興味深い事実が判明した。すなわち、ヒストンH3の4番目のリジンのトリメチル(me3)マークのあるプローブがCIMP陽性腫瘍では特異的にメチル化されており、特定のヒストン修飾がゲノムワイドなDNAメチル化を誘発し、神経膠腫の発生に関与していることが示唆された。

特定の遺伝子のみならず、ヒストン修飾などのepigenetic statusに影響を及ぼす治療法への礎となるデータを示すことで、epigenetic modifierによる治療の可能性を示すことができた。

治療のターゲットとなりうる分子の検出および、epigenetic modifierによる新たな治療の可能性を示すことができた。

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1件)
 ① 武笠晃丈、高柳俊作、齊藤邦昭、柴原純二、田部井勇助、成田善孝、西川亮、植木敬介、齊藤延人. Significance of IDH mutation varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. *Cancer Science* 103 (3):587-92, 2012.
 DOI:10.1111/j.1349-7006.2011.02175.x.

[学会発表] (計10件)

① 齊藤 邦昭. DNA メチル化網羅的解析により明らかとなった G-CIMP の特徴とその subgroup 第 30 回日本脳腫瘍学会学術集会 2012.11.26 グランドプリンスホテル広島(広島)
 ② 齊藤 邦昭. Genome-wide analysis of methylation profiling in glioma using illumina450K methylation array(ポスター) The 17th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology. 2012. 11. 16 Washington D. C. (USA)
 ③ 齊藤 邦昭. 神経膠腫における網羅的 DNA メチル化プロファイル解析により明らかとなった G-CIMP の特徴 第 71 回日本脳神経外科学会総会 2012. 10. 17 大阪国際会議場(大阪)
 ④ 齊藤 邦昭. Identification of global methylation profiling and novel methylation markers in glioma by epigenomewide analysis 第 71 回日本癌学会学術集会 2012. 9. 20 ロイトン札幌(札幌)
 ⑤ 齊藤 邦昭. MGMT promoter methylation is associated with malignant transformation in WHO grade 2 diffuse astrocytoma. The 16th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology. 2011. 11. 19 Orange County, California, USA
 ⑥ 齊藤 邦昭. 高齢者 glioblastoma に対する放射線治療・temozolomide 併用療法 第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会 2010. 11. 29 軽井沢プリンスホテル(軽井沢)
 ⑦ 齊藤 邦昭. MGMT promoter methylation is associated with malignant transformation in WHO grade 2 diffuse astrocytoma. The 15th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology. 2010. 11. 19 Montreal, Canada
 ⑧ 齊藤 邦昭. 高齢者 glioblastoma に対する temozolomide 治療の有効性と安全性 第 69 回日本脳神経外科学会総会 2010. 10. 29 福岡国際会議場(福岡)
 ⑨ 齊藤 邦昭. WHO grade2,3,4 の Glioma における MGMT プロモーター領域のメチル化および予後の解析 第 11 回分子脳神経外科学会 2010. 8. 28 長陵会館記念ホール(仙台)
 ⑩ Prognostic significance of MGMT promoter methylation in patients with grade 2, 3, 4 glioma. 7th Meeting of Adian Society for Neuro-Oncology 2010. 6. 12 ソウル、韓国

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

東京大学医学部脳神経外科 研究内容

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/kenkyu/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齊藤 邦昭 (SAITO KUNIAKI)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50446564

(2) 研究分担者

該当者なし

(3) 連携研究者

該当者なし