

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 12 日現在

機関番号：32610

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23791614

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫における IDH 遺伝子異常の生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Investigation of biological effects of IDH gene mutation in malignant glioma

研究代表者

田中 雅樹 (Tanaka, Masaki)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号：80531491

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000 円、(間接経費) 990,000 円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫に高頻度で認められる遺伝子異常 IDH1 変異の腫瘍細胞に対する生物学的影響を検討した。高度に悪性化形質を獲得している膠芽腫細胞に IDH1R132H を導入し、高発現する細胞株を樹立した。IDH1R132H の高発現による明らかな腫瘍関連、細胞死関連、細胞周期関連遺伝子発現に影響は認められなかったが、CDDP に対する感受性が高まる可能性が認められた。更に、高度に亢進した造腫瘍性が IDH1R132H 高発現により抑制される可能性も示唆された。低悪性度神経膠腫のhallmarkである IDH1 変異は、高悪性度神経膠腫ではむしろ腫瘍に対してはnegativeな影響をもたらす可能性も検討課題と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated biological effects of glioma-related genetic alteration, IDH1 gene mutation, in human glioma cells. The IDH1R132H gene was introduced into highly transformed glioblastoma cells by transfection, and the cells overexpressing IDH1R132H were selected by G418 treatment. These cells did not exhibit significant changes in expression of tumor-, apoptosis-, or cell cycle-related genes, but were rather sensitive to CDDP treatment. Xenografts in athymic mice derived from these cells grew slower than parental cells. These results suggested that IDH1 mutation which is a hallmark of representative genetic alterations in lower grade glioma might bestow negative impact on aggressive behavior of higher grade gliomas.

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：神経膠腫 IDH1 遺伝子異常 治療感受性 造腫瘍性

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍の代表である悪性神経膠腫(グリオーマ)は近年の画期的な医療の進歩にも拘らず、依然難治で予後が極めて不良な疾患である。その原因のひとつに放射線治療や化学療法への耐性の存在があり、耐性の克服並びに新規の治療法の開発が臨床上極めて重要な課題と考えられている。

このような神経膠腫細胞における異常な生物学的特性は、主として腫瘍関連遺伝子の変異による作用であることが明らかにされてきており(永根基雄, 日本臨牀 63: 460, 2005), その遺伝子変異を標的とした分子標的治療が検討されている。例えば, 悪性神経膠腫に高頻度で異常が認められる epidermal growth factor receptor (EGFR) に対し, モノクローナル抗体(cetuximab)や細胞内の酵素活性部位を標的とする低分子化合物による阻害(gefitinib, erlotinib など)が欧米を中心に臨床試験が行われ, 一部は既に治療薬として認可されるに至っている。また, 乏突起膠腫系神経膠腫では, 染色体の1番短腕と19番長腕の共欠失が認められる頻度が高く, この遺伝子異常は良好な治療予後と強く関連することが報告されている(Carcross, J Clin Oncol 24: 2707, 2006)。従って, 乏突起膠腫系腫瘍では術後遺伝子解析を行い, その結果をもって(1p/19q 共欠失の有無)補助療法の内容を変更する臨床試験が欧米で施行中である(CODEL, CATNON studies)。本教室の研究協力者である永根は, 神経膠腫で顕著にみられるEGFR変異型(EGFRvIII 或いはΔEGFR)について, その発現に伴う腫瘍細胞の生物学的変化と標的治療の開発研究や, 標準治療薬であるtemozolomide (TMZ)耐性の主因と考えられているMGMT 遺伝子の検出と治療への応用につき研究を進めてきている(論文多数)。2008年に, 米国のNCIが主導するCancer Genome Atlas Projectにより, 神経膠腫にこれまでは指摘されていなかった新規の腫瘍関連遺伝子異常が明らかにされた(Nature 455: 1061, 2008)。ミトコンドリア内外でのクエン酸回路に關与するisocitrate dehydrogenase (IDH)1及び2酵素をコードする遺伝子で, 特異的なisocitrate 基質と水素結合をするこれらの酵素のactive siteに点変異が極めて高頻度で検出された。特に神経膠腫のうち, WHO grade II及びIIIの腫瘍型に認められる一方, 最も悪性度の高いgrade IVである膠芽腫においては, 低悪性度の先行病巣があるsecondary型のみその異常が検出され, 膠芽腫で初発したprimary型では殆ど認められなかったとの特徴を有した(Yan et al, N Engl J Med 360: 765, 2009)。このような腫瘍種特異性と生化学的意義を持つ遺伝子異常と治療効果や生存期間への影響は未だ明らかではない。

2. 研究の目的

未だ極めて難治性疾患である悪性神経膠腫, 悪性脳腫瘍の代表疾患, は治療の主体であ

る放射線治療や化学療法への耐性を示し, その機序の解明と新規の治療法の開発が急務となっている。これまで種々の遺伝子変異が悪性神経膠腫細胞に検出され, その多くが腫瘍の増殖・悪性化・生存に必要とされる分子を規定していることが明らかになり(Furnari, Genes Dev 21: 2683, 2007), そのような分子を標的とする新規の癌治療法が開発され始めている。2008年に米国のCancer Genome Atlas Projectで新たに指摘された(Nature 455: 1061, 2008) IDH1及びIDH2は, 極めて高頻度で神経膠腫に点変異が検出された新規の腫瘍関連遺伝子である(Yan, NEJM 365: 765, 2009)。IDH1/2はTCA回路に關与する酵素で, その変異が腫瘍細胞の生物学的変化をもたらすことが予想されるが(Thompson, 同), 未だ明らかにはされていない。今回我々は変異型IDH1/2の神経膠腫細胞における作用, 特に治療抵抗性への寄与につき, 検討・解明することを目的とした。

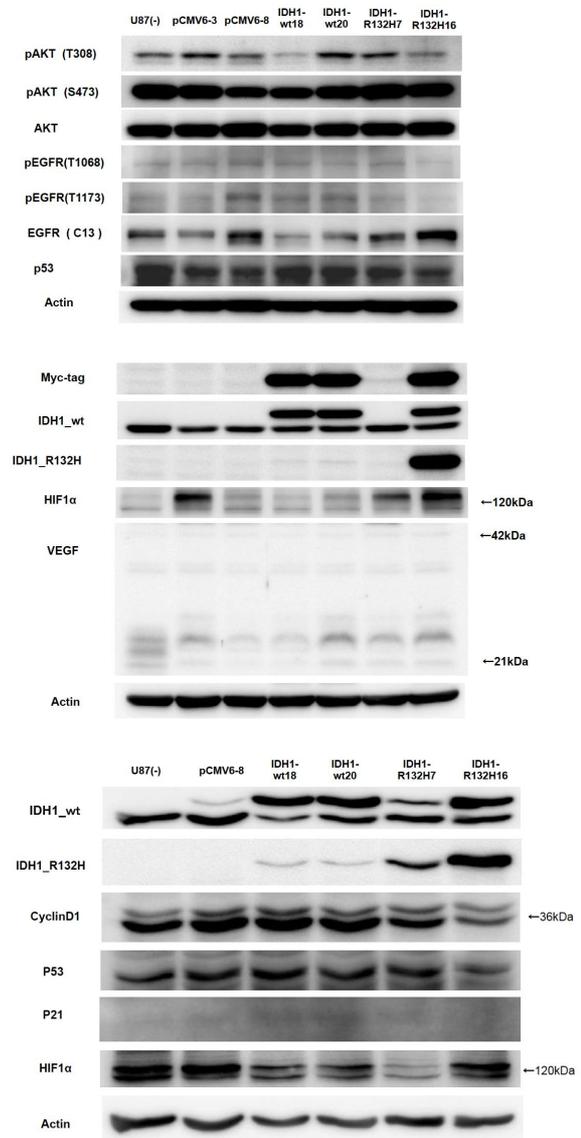
3. 研究の方法

- (1) ヒト・グリオーマ細胞株は本研究室に10種類以上がストックされており(主としてATCCから入手), また手術検体から樹立された初代培養株も数種類が保有されている。(Nagane M et al. J Neurosurg 106: 407-416, 2007)
- (2) グリオーマで最も高頻度で認められるIDH1 mutantであるIDH1^{R132H}変異の遺伝子発現ベクターをDuke UniversityのDr. Hai Yanからの供与により入手した。pCMV6 plasmidに空ベクター, wild type IDH1 (wtIDH1), 及びIDH1^{R132H}変異型を組み込まれている各ベクターを当科研究室にてexpandし, グリオーマ細胞株にtransfectionが可能なる量を精製した。
- (3) Nude mouseで造腫瘍性を示すヒト・グリオーマ細胞株: U87, LN2308, T98Gに上記発現ベクターをtransfectionし, drug markerであるG418にてtransfectantsをスクリーニングした。生存したtransfectant clonesを培養し, 各クローンからwhole cell lysatesを抽出し, Western blot法にて, IDH1, IDH1^{R132H}の発現, ならびにvectorに組み込まれているtagであるMycの発現を検出した。各IDH1蛋白を高発現しているsubcloneを選定し, 以下の実験に使用した。
- (4) 抗がん剤治療: 細胞傷害性抗がん剤として, 悪性グリオーマの標準治療薬であるTMZ及び固形癌におけるkey drugであるCDDPを用い, 各親株, 空ベクター株, wtIDH1株, IDH1^{R132H}株を治療し, その治療効果をMTTアッセイにて評価した。また, 治療後の変化をWestern blot法で評価した。
- (5) in vivo アッセイ: これら細胞株をathymic miceの皮下に移植し, 移植腫瘍を樹立させた。造腫瘍性を腫瘍体積を経時的に計測することで評価した。

4. 研究成果

- (1)当科で保管しているヒト神経膠腫細胞株は、全てにおいて IDH1 遺伝子が野生型であることを、direct sequencing にて確認した。これらの細胞株の中から、athymic mouse での造腫瘍性を示す 3 つの細胞株、U87MG, LNZ308, T98G を選択し、IDH1^{R132H} 変異遺伝子の発現ベクターならびに IDH1 wild-type 遺伝子発現ベクター、及び遺伝子の組み込みがない空ベクター (pCMV6-ENTRY) の 3 種類のベクタープラスミドを遺伝子導入し、薬物耐性マーカーである G418 にて drug selection を掛け、各クローンを培養した。その結果、T98G 以外の二つの細胞株より、各プラスミドが導入された subline が複数樹立された。IDH1^{R132H} 導入株ではその蛋白発現を Western blot にて IDH1^{R132H} の特異抗体を用いて検出した。
- (2)これらの細胞株を用いて、IDH1^{R132H} 及び wild-type (wt) IDH1 の高発現により細胞増殖及び細胞死等に関する腫瘍関連蛋白の発現変化の有無を、Western blot 法により検討した。膠芽腫で高頻度に異常が認められる受容体チロシンキナーゼからのシグナル伝達系に参与する因子 (EGFR, PI3Kp110, AKT, mTOR, p70S6K, ERK, JNK) 及びそのリン酸化の有無、p53 系と cell cycle 関連因子 (p53, p21, p27, Cyclin D1) apoptosis 関連因子 (Bcl-XL, Bcl-2, Bax, Bid) 血管新生関連因子 (VEGF, HIF1) は、いずれも親株、wtIDH1 及び IDH1^{R132H} の高発現株間に一貫した有意な発現の相違は認められなかった (図 1. U87 を用いて検討)。

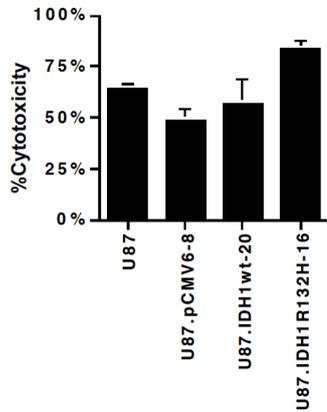
図 1. Western blot analysis of tumor-related molecules in U87 and its derivative cells.



- (3)IDH1 変異例では予後がよい傾向が示されているため、これらの細胞株を抗がん剤で治療し、その感受性を比較した。U87MG において、CDDP で治療し、MTT アッセイで cell viability を測定した。親株に比し、wtIDH1 導入株ではやや耐性が高い傾向がみられたのに対し、IDH1 変異株は CDDP 感受性が高まる傾向が認められた。この所見は、IDH1 変異腫瘍例で治療後の予後がよいことと相関する可能性も示唆された (図 2)。

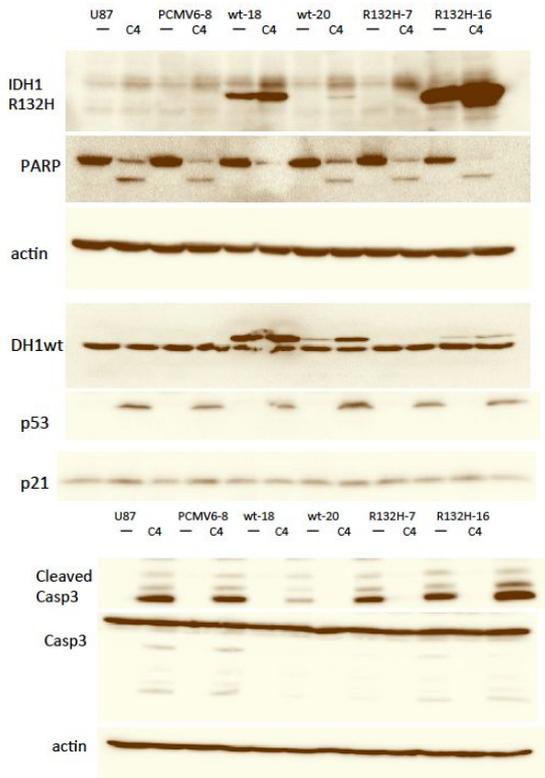
図 2. Cytotoxicity upon CDDP treatment in U87 and its derivatives in vitro.

Cytotoxicity upon CDDP Treatment



(4) IDH1 変異導入株で CDDP 感受性が亢進する傾向がみられたことから、それらの細胞を CDDP にて治療し、apoptosis 関連蛋白の発現・切断状況を Western blot にて検討した。特に IDH1^{R132H} を高発現している U87.IDH1^{R132H}-16 株では、CDDP 4 μg/ml での治療により、U87 親株、対照の空 vector 株、wtIDH1 好発現株と比較し、PARP cleavage がより高度に生じていた。また executive caspase である caspase-3 の activation も軽度亢進していることが示唆された (図 3)。

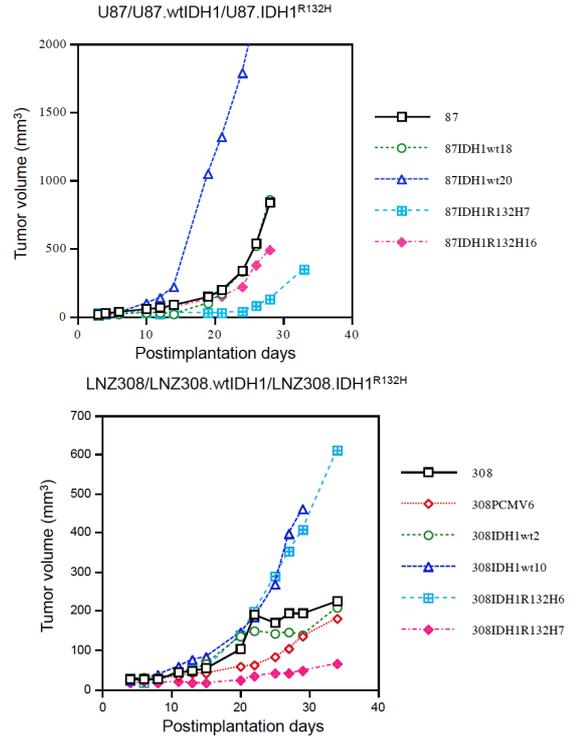
図 3. Western blot analysis of apoptosis-related molecules upon CDDP treatment in U87 and its derivative cells.



(5) IDH1^{R132H} の高発現による腫瘍細胞の増殖能への影響を検討するため、これらの細胞株を athymic mice に移植し、その成長曲線

を比較した。現在の preliminary な段階では、IDH1 mutant 株 (U87.IDH1^{R132H}-7, 16; LN308.IDH1^{R132H}-6, 7) で増殖能が亢進する結果は得られていない (図 4)。むしろ、高度に悪性化 transform している膠芽腫細胞株においては、IDH1R132H の発現は腫瘍増大速度を抑制する可能性もある。

図 4. Growth curve of subcutaneous xenografts derived from U87 and its derivative cells in athymic mice.



考察:

- 神経膠腫において、多数の遺伝子異常が確認されているが、その中で腫瘍形成に直接的に関与する driver gene mutation はその一部であると考えられている (Vogelstein)。IDH1/2 は TCA サイクルに必須な酵素であり、代謝異常を伴う癌関連遺伝子として初めて神経膠腫にてその変異が発見された。IDH1/2 の変異により、-ketoglutarate が -hydroxyglutarate (2HG) に変換され、様々な作用により腫瘍化に関わる生物学的影響が生じるとされている (Ichimura)。
- 神経膠腫では、これらの重要な driver gene mutation が腫瘍組織型別に異なる種類の mutation が一定の順番で生じ、その結果、最終病理像を呈する場合と、遺伝子異常の蓄積により悪性化が進行し、悪性度が段階別に変化していく場合があると考えられている (Ohgaki)。
- IDH1/2 mutation は、低悪性度神経膠腫 (low grade glioma, LGG) のうち、astrocytoma と oligodendroglioma の系列を

示す腫瘍群に高頻度で認められる一方、初発時から膠芽腫となる primary GBM や、最も悪性度が低い pilocytic astrocytoma (PA)では殆ど認められない。即ち、悪性転化のある LGG において、腫瘍形成の初期段階で生じる遺伝子異常の可能性が強く示唆されている異常である。

- 今回の研究においては、細胞実験系の観点から、遺伝子導入や形質変化の観察が比較的容易な established glioma cell lines を用いての実験を計画したが、このような細胞株は通常高悪性度の神経膠腫、主に GBM から樹立されており、既に高度の遺伝子異常を伴う腫瘍細胞に、腫瘍形成の初期に作用することが予想される遺伝子異常を導入することで、実際の神経膠腫における IDH1/2 異常の意義が検証しにくい体系となっている可能性が指摘される。
- 即ち、既に高度の悪性化形質を獲得している腫瘍細胞に、腫瘍形成の初期に作用する遺伝子異常が導入されても、その形質への影響はマスクされてしまう可能性が懸念される。
- また逆に、IDH1/2 異常は、背景に殆ど driver gene mutation のない前駆細胞 (subependymal neural progenitor cell など) に対しては腫瘍化の priming に重要な影響が生じるが、一旦高度な悪性腫瘍化した細胞においては、その作用は有意な意義をもたないことも可能性としては考えられる。
- その意味で、今回の実験系で明確な造腫瘍性の亢進等、IDH1 異常の細胞内導入による明確な形質変化がみられないことも想定される結果と考えられる。
- もう一点は、実際の腫瘍における IDH1/2 異常は、1 allele は正常コピー、1 allele が異常コピーとなり、遺伝子のコピー数の増加は通常伴わない。すなわち haploid の異常であり、遺伝子を強制発現するプラスミドの細胞導入である今回の実験系は、腫瘍の生理学的病態とは異なる極端な系であることを認識する必要がある。即ち、今回の研究で検出する変化は、IDH1 異常を高発現させた場合の帰結であり、1 コピーの変化で生じる緩徐な影響の転帰とは若干の違いがあり得るという点である。

結論：

- 高度に悪性化形質を獲得している膠芽腫細胞に IDH1^{R132H} を導入し、高発現する細胞株を樹立した。
- IDH1^{R132H} の高発現による明らかな腫瘍関連、細胞死関連、細胞周期関連遺伝子発現に影響は認められなかった。

- IDH1^{R132H} 高発現株では、CDDP に対する感受性が高まる可能性が認められた。
- 更に、高度に亢進した造腫瘍性が IDH1^{R132H} 高発現により抑制される可能性も示唆された。
- 低悪性度グリオーマの hallmark である IDH1 mutation は、高悪性度グリオーマではむしろ腫瘍に対しては negative な影響をもたらす可能性も検討課題と考えられた。

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 4 件)

Nagane M , Tanaka M , 他 5 名 . Predictive value of mean apparent diffusion coefficient value for responsiveness of temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab. *Int J Clin Oncol* 19: 16-23, 2014; DOI 10.1007/s10147-013-0517-x, 査読有

Shishido-Hara Y , Nagane M , 他 6 名: JC viral inclusions in progressive multifocal leukoencephalopathy: Scaffolding promyelocytic leukemia nuclear bodies grow with cell cycle transition through an S-to-G2-like state in enlarging oligodendrocyte nuclei. *J Neuropathol Exp Neurol* 73 (5), 442-453, 2014, doi: 10.1097/NEN.000000000000066. 査読有

[学会発表](計 10 件)

永根基雄: 悪性脳腫瘍治療の現状と展望. 第 8 回岐阜脳腫瘍研究会. 岐阜市, 岐阜県. 2013. 11. 9.

永根基雄. Glioma の遺伝子異常と治療成績. 第 31 回 日本脳腫瘍病理学会, 東京, 2013. 5.24

Nagane M , Tanaka M , 他 4 名: Antiangiogenic therapy for recurrent malignant glioma by bevacizumab monotherapy: Efficacy and prediction of response. The 19th International Brain Tumor Research and Therapy Conference, Niagara Falls, Canada, 2012. 6.21

Nagane M , Tanaka M , 他 4 名: Bevacizumab monotherapy for recurrent malignant glioma ---Efficacy and prediction of response ---. 9th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, Taipei, Taiwan, 2012. 4.22

永根基雄 , 田中雅樹 , 他 4 名: 再発悪性神経膠腫に対する血管新生標的治療: ベバシツマブ単独療法の効果と問題点. 第 70 回日本脳神経外科学会総会, 横浜, 2011. 10.12

田中雅樹 , 永根基雄 , 他 3 名: CT 及び MR perfusion images を用いた中枢神経系悪性リンパ腫と悪性神経膠腫の術前鑑別. 第 70 回 日本脳神経外科学会総会, 横浜, 2011. 10.12

Nagane M , Tanaka M , 他 3 名. Predictive value of mean apparent diffusion

co-efficient value for responsiveness of temozolomide-refractory malignant glioma to bevacizumab. 2011 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, IL, 2011. 6. 4

〔図書〕(計 1件)

田中雅樹, 永根基雄: 脳腫瘍 Brain tumor .
In 今日の治療と看護 改訂第3版 .永井良三,
大田健(総編),南江堂,東京 .pp739-743, 2013

〔その他〕

ホームページ等

<http://plaza.umin.ac.jp/~kyorin-n/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 雅樹 (TANAKA, Masaki)

杏林大学・医学部・助教

研究者番号: 8 0 5 3 1 4 9 1

(2)研究協力者

永根 基雄 (NAGANE, Motoo)

杏林大学・医学部・教授

研究者番号: 6 0 3 2 7 4 6 8