

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24390341

研究課題名(和文) 悪性脳腫瘍のヒエラルキーと可塑性の解析に基づくエピゲノム創薬

研究課題名(英文) epigenetic drug development based on hierarchy and plasticity of malignant brain tumors

研究代表者

夏目 敦至 (Natsume, Atsushi)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30362255

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000円

研究成果の概要(和文)：低悪性度神経膠腫(WHO grade II/III glioma)は頻度の高い脳原発悪性腫瘍である。進行は比較的ゆっくりだが、脳に染み込むように増殖するため完治させることが極めて困難な病気である。多くの患者さんでは初回治療の数年から数十年後に、より悪性度の高い腫瘍として再発し、死に至る病気であり新しい治療の開発が期待される病気である。そのため、低悪性度神経膠腫においてどのような遺伝子異常が生じているのか、これらの遺伝子異常が腫瘍の発生や悪性化に対してどのような役割をもっているか解明した。

研究成果の概要(英文)：Here, combining high-throughput sequencing data of 757 cases from two large cohorts of grade-II/III gliomas, we delineated the entire picture of genetic alterations and affected pathways in grade-II/III gliomas with sensitive detection of driver genes. Grade-II/III gliomas comprise three distinct subtypes characterized by discrete sets of mutations and distinct clinical behaviors. Mutations showed significant positive/negative correlations and chronological hierarchy as inferred from different allelic burdens among coexisting mutations, suggesting functional interplays between mutations that drive clonal selection. Extensive serial/multi-regional sampling analyses further supported this and also revealed high degrees of temporal/spatial heterogeneity generated during tumor expansion and relapse, which should be shaped by complex, but ordered processes of multiple clonal selections/evolutions.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：脳腫瘍

1. 研究開始当初の背景

成人に起こる脳腫瘍のほとんどは神経膠腫(glioma、グリオーマ)という種類の腫瘍です。世界保健機構(WHO, World Health Organization)によって悪性度に基づき Grade I から IV まで分類されている。もっとも悪性度の高い Grade IV glioma は神経膠芽腫(Glioblastoma)と呼ばれ、治療を行ってもほとんどの患者さんが2年以内に死亡する。一方、grade II または grade III の glioma は低悪性度神経膠腫とも呼ばれ、やや若年成人に好発する悪性腫瘍である。腫瘍の進行は比較的穏やかであるが正常な脳の細胞に染み込むように増殖していくため完治するのは困難な病気である。多くの患者さんでは数年から数十年たってから、より悪性度の高い腫瘍として再発しその時にはほとんどの治療が無効となる。従来、低悪性度神経膠腫は *TP53* 遺伝子の変異と染色体1番の短腕と19番の長腕が欠損する 1p/19q co-deletion が高頻度に起こり、互いに排他的に存在することがわかっていた。2009年に約80%の低悪性度神経膠腫は *IDH1* または *IDH2* の変異を持つことが明らかになった。この異常は Glioblastoma にはまれである。

2. 研究の目的

(1) 低悪性度神経膠腫の遺伝子異常は Glioblastoma と異なると考えられていたが、その全貌については明らかにすること、および、(2) 低悪性度神経膠腫は段階的に悪性化していく過程での遺伝子異常を解明することである。

3. 研究の方法

<次世代シーケンサーとスーパーコンピュータによる遺伝子異常の解明>

今回、国内5施設(名古屋大学など)から合計332例の低悪性度神経膠腫のDNAを採取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析を行った。そのうち10例は同一患者における初発時と再発時検体の解析を詳細に行い、別の4例は同一腫瘍内で複数部位を解析するマルチサンプリングの手法を用いて詳細に解析した。これらのデータに加え、米国の The Cancer Genome Atlas が公開している425例のシーケンズデータも利用した。

4. 研究成果

低悪性度神経膠腫における大規模な網羅的遺伝子解析は過去になく、これまでで最大規模の研究成果になった。

<遺伝子異常に基づく低悪性度神経膠腫の分類>

本研究により低悪性度神経膠腫は遺伝子変異パターンにおいて *IDH1/IDH2* および *TP53* 変異、1p/19q co-deletion の有無によって極めて明確に下記の3群にわかれることが明

らかとなった。我々は変異のパターンにおいて低悪性度神経膠腫を下記の Type I から Type III と名付けた(図1)。

■ Type I: *IDH1/2* 変異有、1p/19q co-deletion 有

■ Type II: *IDH1/2* 変異有、1p/19q co-deletion 無、*TP53* 変異有

■ Type III: *IDH1/2* 変異無

今まで *IDH1/IDH2* 変異をもつ低悪性度神経膠腫の約4~24%の症例は *TP53* 遺伝子の異常も1p/19q co-deletion も同定されなかった。しかし、今回詳細にデータを解析することにより1p/19q co-deletion には亜型が存在することや、従来解析では同定することが困難な *TP53* 遺伝子の異常を見つけることができ、*IDH1/IDH2* の変異を有する低悪性度神経膠腫はほぼ全例(99.7%、599/601例)が *TP53* 遺伝子の異常か1p/19q co-deletion のどちらかを有することが明らかとなった。さらに、Type II 腫瘍に起こる *TP53* 遺伝子の異常はほとんどの症例(98.0%、307/313例)で両アレルともに異常が起きており正常な *TP53* 遺伝子が完全に失われているということが明らかとなった。*IDH1/IDH2* の異常を持たない Type III 腫瘍は Glioblastoma とよく似た変異パターンを示した。しかし、Type III 腫瘍の生存期間は Glioblastoma より良い予後である。また、Type III 腫瘍を発症する患者の年齢も Glioblastoma と異なった。Type III の中でもより悪性であり Glioblastoma に近いと考えられる Type IIIb (Type III 腫瘍でかつ病理分類で悪性度が Grade III の症例)のみで比較しても Glioblastoma とは異なった年齢分布であった。そのため Type III 腫瘍は Glioblastoma とは異なった集団であり、独立して分類すべきグループということがわかった。

これらの遺伝子異常に基づく分類は患者さんの生存期間に強く影響しており、治療の現場においても有効な分類である。遺伝子異常による分類は検査を担当する人間によって結果が左右されにくいものであり、患者さん個人個人の治療を考えるうえでとても有効であり信頼のおける分類になると思われる。

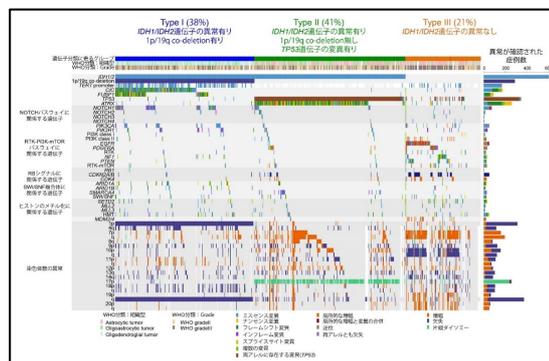


図1: 低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の全貌。合計757例の解析結果。

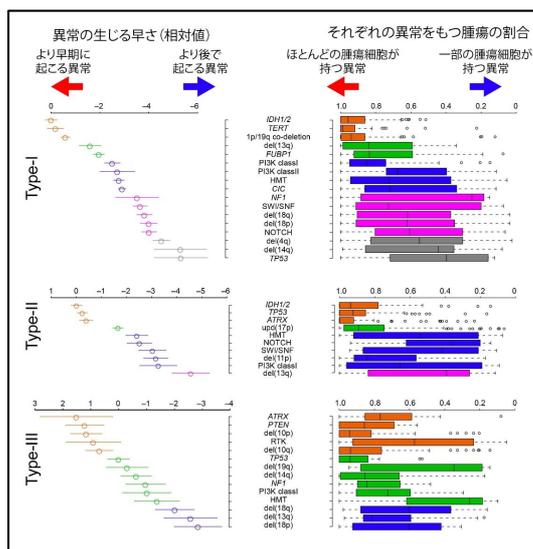
< 低悪性度神経膠腫に生じる各遺伝子変異の起こる時期とその役割 >

様々ながんにおいては遺伝子異常の生じる順番に規則性があると考えられている。低悪性度神経膠腫においてそれぞれの遺伝子異常がどのような順番で起きていて、それぞれの遺伝子異常がどのような役割を持っているのか調べた。

まず、それぞれの腫瘍において各遺伝子変異をもつ腫瘍の割合を詳細に調べた。腫瘍は1つの異常細胞から発生し増殖すると考えられている。そのため腫瘍の発生にかかわる遺伝子異常、つまり最初に起こると予測される異常はすべての腫瘍細胞で確認される。一方、遅れて生じる遺伝子異常はある程度増殖した腫瘍細胞のうちの一つの腫瘍細胞にのみ起こる。そのため、一部の腫瘍細胞でしか異常を確認できない。このような腫瘍の増殖様式を考慮すると腫瘍の割合を比較することにより各遺伝子変異の起こる時期を推測することができる。私たちはこの手法を用いることによりそれぞれのタイプで生じる遺伝子異常の起こる順番を解明した。Type I と Type II でともに確認される *IDH1* および *IDH2* の異常は初期の段階で起こり、腫瘍が発生するという段階において重要な役割をもつ遺伝子(ヒエラルキー)が存在する(図2)。これらの結果は、同一患者における初発時と再発時の異常の比較、マルチサンプリングによる解析でも同じような順番が存在することが確認された。

このように遺伝子異常の起こる順番の解明は、今後治療開発においてどの遺伝子を標的とするか、その標的に対して治療をするかどうかの程度の効果が期待できるかということが推測できる有用な情報となる。

図2：タイプごとにおける遺伝子異常の入



る順番とその遺伝子異常をもつ腫瘍細胞の割合の分布。

< 低悪性度神経膠腫の多様性と進展形式の解明 >

がんは異なる遺伝子変異をもった腫瘍グループの集合と考えられており、多様性がある。これらの多様性は治療抵抗性と密接にかかわっている。はじめ効いていた治療が効かなくなるのは、このように多様性があるため、治療に抵抗性のある腫瘍細胞が生き残るためと考えられている。マルチサンプリング検体の解析により低悪性度神経膠腫においても強い多様性が認められることがわかった。マルチサンプリングでは、同じ患者の腫瘍でもすべての場所で確認できる遺伝子異常は全体のわずか10%程度であった。他の多くの異常は一部の場所でしか認められなかった。そのうえ一か所でもしか確認できない異常は全体の60%であった。これは最近報告された肺がん・腎臓がんよりも強い多様性をもっている結果である。よって低悪性度神経膠腫はとても複雑な腫瘍であると考えられる。

マルチサンプリングの結果を詳細に解析し、各部位での複雑性を評価したあと統合すると、同一腫瘍にどのような順番で異常が起こり、腫瘍が広がっていくかということ明らかにできた。*IDH1* の異常が起こり腫瘍が発生した後に、まったく別々に3種類の異なった腫瘍細胞が異なった遺伝子異常を獲得して進展しております。順番に遺伝子異常を獲得し外へ外へと広がっていく。腫瘍の上部では別々に進展していった腫瘍が混在している。また、*CIC* 遺伝子の異常は同一腫瘍でも異なった場所に5種類の異常が起きていて、とても複雑な腫瘍であるが認められた(図3)。

このように低悪性度神経膠腫は腫瘍が発生した後に、腫瘍のあらゆる部位で独立して異なった遺伝子異常が起きており、それぞれの腫瘍細胞が独立して進展つまり悪性化していることが明らかとなった。この結果は治療戦略を考えるうえでとても有用な情報であります。腫瘍の診断において複数の部位から総合的に診断する必要があり、病気の正確な診断の手助けになる。

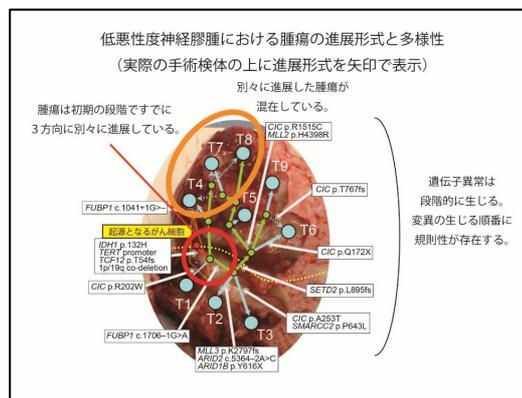


図3：マルチサンプリングの検体の1例

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 10件)

- 1) Suzuki H, Aoki K, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto

T, Tanahashi K, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. Nat Genet. in press. 査読あり

2) Sugiyama M, Hasegawa H, Ito S, Sugiyama K, Maeda M, Aoki K, Wakabayashi T, Hamaguchi M, Natsume A, Senga T. Paired related homeobox 1 is associated with the invasive properties of glioblastoma cells. Oncol Rep. 2015;33(3):1123-30. 査読あり

3) Iwami K, Momota H, Fujii M, Natsume A, Yagi S, Toriyama K, Kamei Y, Wakabayashi T. Anaplastic meningioma with rapid growth after omental flap transposition: a case report and experimental study. Brain Tumor Pathol. 2015;32(2):137-44. 査読あり

4) Tanahashi K, Natsume A, Ohka F, Momota H, Kato A, Motomura K, Watabe N, Muraishi S, Nakahara H, Saito Y, Takeuchi I, Wakabayashi T. Assessment of tumor cells in a mouse model of diffuse infiltrative glioma by Raman spectroscopy. Biomed Res Int. 2014; 860241. 査読あり

5) Suzuki A, Nobusawa S, Natsume A, Suzuki H, Kim YH, Yokoo H, Nagaishi M, Ikota H, Nakazawa T, Wakabayashi T, Ohgaki H, Nakazato Y. Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse gliomas. J Neurooncol. 2014;120(2):283-91. 査読あり

6) Wang L, Yamaguchi S, Burstein MD, Terashima K, Chang K, Ng HK, Nakamura H, He Z, Doddapaneni H, Lewis L, Wang M, Suzuki T, Nishikawa R, Natsume A, Terasaka S, Dauser R, Whitehead W, Adekunle A, Sun J, Qiao Y, Marth G, Muzny DM, Gibbs RA, Leal SM, Wheeler DA, Lau CC. Novel somatic and germline mutations in intracranial germ cell tumours. Nature. 2014 10;511(7508):241-5. 査読あり

7) Kondo Y, Katsushima K, Ohka F, Natsume A, Shinjo K. Epigenetic dysregulation in glioma. Cancer Sci. 2014;105(4):363-9. Review. 査読あり

8) Motomura K, Fujii M, Maesawa S, Kuramitsu S, Natsume A, Wakabayashi T. Association of dorsal inferior frontooccipital fasciculus fibers in the deep parietal lobe with both reading and writing processes: a brain mapping study. J Neurosurg. 2014;121(1):142-8. 査読あり

9) Ohka F, Ito M, Ranjit M, Senga T, Motomura A, Motomura K, Saito K, Kato K, Kato Y, Wakabayashi T, Soga T, Natsume A. Quantitative metabolome analysis profiles

activation of glutaminolysis in glioma with IDH1 mutation. Tumour Biol. 2014;35(6):5911-20. 査読あり

10) Tsujiuchi T, Natsume A, Motomura K, Kondo G, Ranjit M, Hachisu R, Sugimura I, Tomita S, Takehara I, Woolley M, Barua NU, Gill SS, Bienemann AS, Yamashita Y, Toyokuni S, Wakabayashi T. Preclinical evaluation of an O(6)-methylguanine-DNA methyltransferase-siRNA/liposome complex administered by convection-enhanced delivery to rat and porcine brains. Am J Transl Res. 2014 15;6(2):169-78. 査読あり

- 〔学会発表〕(計 5 件)
1. 基調・招待講演 夏目敦至. テモダールの陰翳礼賛から学ぶ悪性神経膠腫の神秘 第 32 回 日本脳腫瘍学会 2014/12/2 シェラトングランデトウキョウベイ (千葉県浦安市)
 2. 基調・招待講演 夏目敦至. 脳腫瘍に対する臨床試験デザイン 第 3 回 Neuro-Oncology West 2014/9/20 ホテル日航大阪 (大阪府大阪市)
 3. 基調・招待講演 夏目敦至. 膠芽腫ガイドラインの目的と推奨レベルの設定根拠 脳腫瘍診療ガイドラインを考える会 2014/9/18 ホテル日航大阪 (大阪府大阪市)
 4. 基調・招待講演 夏目敦至. Epigenetic plasticity and mutational landscapes reveal intratumoral heterogeneity and clonal evolutions in gliomas 3rd Cancer Stem Cell Symposium 2014/11/22 ホテル日航博多 (福岡県福岡市)
 5. 基調・招待講演 夏目敦至. 網羅的(エピ)ゲノム解析に基づく治療戦略 第 52 回 日本癌治療学会 2014/8/27 パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市)
- 〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件) 取得状況 (計 0 件)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
夏目敦至 (NATSUME, Atsushi)
名古屋大学・医学系研究科・准教授
研究者番号: 30362255
 - (2) 研究分担者
若林 俊彦 (WAKABAYASHI, Toshihiko)
名古屋大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 50220835