

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 3 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24791486

研究課題名(和文) 悪性神経膠腫における epigenetics マーカーの探索と個別化治療への応用

研究課題名(英文) Research for epigenetic markers and targeted therapy for malignant glioma

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

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)：再発・悪性転化を来したペア検体を含む約100例の神経膠腫のメチル化網羅的解析により、CIMP(CpG island methylator phenotype)を同定し、さらにCIMP内に悪性転化に伴うメチル化の低下(脱メチル)を来す群(CIMP-脱メチル群)を同定した。悪性転化の機序のひとつに脱メチル化が関与していることが示唆され、悪性転化のメチル化マーカーとしてIGFBP2に注目し検証を行ったところ、悪性転化後の脱メチルに伴う発現上昇を確認できた。IGFBP2のメチル化は悪性転化した神経膠腫の予後予測因子と考えられ、メチル化マーカーとして、また治療標的としての応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Genome-wide methylation analysis of over 100 gliomas including matched-pairs of initial low-grade gliomas and recurrent tumors identified CpG island methylator phenotype (CIMP). Remarkably, approximately 50% of secondary glioblastomas that had progressed from low-grade tumors with the CIMP status exhibited a characteristic partial demethylation of genomic DNA during malignant progression. Demethylation might be one mechanism of malignant progression. Specifically, we identified demethylation and upregulation of IGFBP2 after malignant progression of low grade gliomas. IGFBP2 methylation was prognostic factor of malignantly progressed gliomas, and could be used as a methylation marker and a therapeutic target.

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：神経膠腫 エピジェネティクス メチル化 CIMP 悪性転化 個別化療法

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は脳腫瘍全体の約 25%を占め、様々ながんのなかでも治療が特に困難なもののひとつである。神経膠腫の発生や悪性転化、また治療感受性には様々な genetic/epigenetic な制御が関与している。

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修飾機構であり、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注目を集めている。がんにおける epigenetics の中心的分子機構のひとつが、DNA のメチル化であり、プロモーター領域のメチル化では遺伝子の発現が抑制される。

悪性神経膠腫において、DNA 修復酵素である MGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が予後と強く相関していることが報告された(Hegi ME et al. *N Eng J Med*. 2005)。研究代表者らも、methylation specific PCR 法(MSP 法)を用いて東京大学脳神経外科教室の腫瘍検体について、MGMT プロモーターのメチル化の有無と化学療法奏効率および予後の相関を解析し、その関連性を確認した。

近年、ゲノムワイドなメチル化の網羅的解析が可能となり、膠芽腫 272 例の網羅的メチル化プロファイル解析において、G-CIMP (glioma-CpG island methylator phenotype) と名付けられた、多くの領域に過剰なメチル化を有する一群が存在することが明らかとなった(Noushmehr H et al. *Cancer Cell* 2010)。また、網羅的なゲノムシーケンス解析の成果として、神経膠腫におけるイソクエン酸脱水素酵素 isocitrate dehydrogenase (IDH) の変異が報告され(Parsons et al. *Science* 2008)、神経膠腫の発生初期に重要な役割を果たす必須の異常と考えられている。IDH 変異を有する神経膠腫においてゲノムワイドなメチル化増加を来することが示され、先に述べた MGMT のメチル化や、G-CIMP においても IDH 変異との間に強い相関が認められる。当教室における grade2, 3 の神経膠腫においても、IDH 変異と MGMT のメチル化が強く相関していることが確認された。また、悪性神経膠腫のメチル化を網羅的に解析したところ、preliminary な結果であるが、メチル化プロファイルが IDH 変異と強く相関することが示唆された。

2. 研究の目的

メチル化をはじめとした epigenetics の包括的な解析によって、今後さらに体系的な異常の解明がなされていくものと期待される。そこで今回我々は、神経膠腫の epigenetic な profile を様々なレベルで解明し、神経膠腫の発生や悪性転化に関わる分子機構に迫ることで、epigenetics マーカーの確立や epigenetic status に応じた個別化治療の実現を目指し、本研究を計画した。

- 1) これまで preliminary に行ったメチル化網羅的解析の結果をさらに体系的に理解するため、症例数及び腫瘍の種類を追加して、Illumina 社の Infinium 450K chip を用いた 45 万個以上の CpG サイトの網羅的なメチル化解析を行う。Grade や IDH 変異の有無に応じた神経膠腫のメチル化プロファイルを明らかにすると共に、10 症例程度の悪性転化を来した神経膠腫のペア検体を用いて、悪性転化に伴ってメチル化が共通して変化する遺伝子を抽出する。
- 2) 網羅的解析により抽出した特定の遺伝子群に関して、当教室に保存されている多くの神経膠腫検体を用いた validation を行う。Mass array や pyrosequencing 法を用いて多数の検体におけるメチル化解析を high-throughput に行うことで、効率的に予後や化学療法反応性との関連を明らかにして、有用なメチル化マーカーの同定を行う。
- 3) 当教室にて樹立済みである腫瘍幹細胞においてもメチル化をはじめとした epigenetic profile を解析し、脳腫瘍幹細胞における増殖、分化に関わる遺伝子の解明を行う。
- 4) epigenetic profile に応じて、epigenetic status を global に変化させる薬剤を用いたり、特定の遺伝子の epigenetics を標的とした治療法を開発し、個別化治療の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) 悪性神経膠腫のメチル化網羅的解析によるメチル化プロファイルの解析

最近の IDH 変異細胞株及び腫瘍の代謝産物および臨床検体の検討により、ゲノムワイドな epigenetics の変化が、IDH 変異により引き起こされる可能性が報告されている(Figueroa et al. *Cancer Cell* 2010)。そこで、この事実を検証し、かつ実際に引き起こされている変化の様式を抽出することを目的として、我々が所有する臨床検体のうち grade2 から 3 の神経膠腫(星細胞腫と乏突起膠腫)および悪性転化をきたした膠芽腫を含めた約 100 検体を用いて、網羅的なメチル化プロファイルを取得する(preliminary な解析は実施済み)。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)にて解析を行い、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。これらの検体は、すでに IDH 変異の有無や TP53 変異、染色体 1p/19q 欠失、MGMT メチル化など、基本的な DNA プロファイルの解析を終了しており、またその大半において予後のデータも有している。またその一部においては、アフィメトリクス

社の発現アレイを用いて、遺伝子発現プロファイルの取得済みである。今回得られるメチル化プロファイルデータを、DNA 解析結果と遺伝子発現解析データと統合解析することにより、IDH 変異が及ぼす、エピジェネティックな変化とこれによる遺伝子発現の変化を同定し、影響のおよんでいる信号伝達経路の同定を行いたい。また、可能であれば、IDH の変異による腫瘍形成に関連する鍵となる分子の同定を目指したい。

2) IDH 変異及び MGMT プロモーターメチル化、メチル化プロファイルと化学療法反応性の検討

これまでに同定したメチル化プロファイルと、予後や化学療法反応性との関連が示唆されている、MGMT プロモーターメチル化や IDH 変異の相互関係を、臨床データと照らし合わせて詳細に検討することで、最も予後に関連した因子をさらに抽出し、これによる個別化治療の実現を目指す。

3) 悪性転化に關与する遺伝子の同定

膠芽腫や Grade3 の神経膠腫に悪性転化した症例において、悪性転化前後の腫瘍検体を 15 ペアほど保有しており、これらのメチル化網羅的解析を行うことで悪性転化前後のメチル化プロファイルを比較し、共通して変化する遺伝子群を抽出する。同一症例の検体においては、悪性転化後にメチル化が大きく変化する CpG サイトはそれほど多くはないため、3 ペアの解析から、悪性転化の鍵となる候補遺伝子を既にいくつか抽出した。今後、多数の検体の解析を進めていき、より確からしい候補遺伝子を絞っていく予定である。

4) 悪性転化に關与する遺伝子の検証

上記 3) で抽出した遺伝子群について、当教室で保有している悪性神経膠腫の検体を用いて、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 MassARRAY または pyrosequence 法にて多数の検体の解析を行い、臨床経過と照らし合わせて予後や悪性転化との関連について検証する。さらに、遺伝子発現についても解析を行い、プロモーターのメチル化による遺伝子の発現抑制を確認する。

5) 悪性神経膠腫幹細胞における網羅的 epigenetics 解析

現在までに、当教室にて樹立された 15 株程度の悪性神経膠腫幹細胞が利用可能である。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、この腫瘍幹細胞の分化機構を解明し、腫瘍幹細胞を標的とした薬剤を開発することも重要と思われる。腫瘍幹細胞に分化誘導を行った場合などにおいて、腫瘍検体の DNA と、腫瘍幹細胞との epigenetic profile の違いについても

検討する。

6) Epigenetic な変化をもとにした、個別化療法の開発

化学療法感受性を高めるために、epigenetic profile に応じて epigenetic status を変化させて行う patient-specific therapy を考案する。Epigenetics 異常を標的とする治療薬として、5-aza-deoxycytidine などのメチル化阻害剤や、suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) などの histone deacetylase (HDAC) inhibitors, さらには DZNep といった EZH2 complex 阻害剤が開発されている。神経膠腫およびその腫瘍幹細胞の epigenetic profile と、その化学療法反応性や予後との相関を解明し、メチル化マーカーを確立することにより、個々の epigenetic profile に応じた patient-specific な individualize epigenetic therapy の開発、確立を目指す。

4. 研究成果

(1) 悪性神経膠腫のメチル化プロファイル

100 例以上の神経膠腫のメチル化網羅的解析をクラスタリング解析した結果、IDH 変異とほぼ一致して CIMP(+) と CIMP(-) に分かれた(図 1)。CIMP(+) の腫瘍内にはさらに、メチル化の比較的低い 1 群が存在した(図 1; 左端のクラスター)。この群の腫瘍は、CIMP(+) の低悪性度神経膠腫から悪性転化した腫瘍で、悪性転化後に一部メチル化が脱けてくることから CIMP-脱メチル群と名付けた。一方で、悪性転化した神経膠腫でもメチル化プロファイルが CIMP のままの腫瘍も存在し、悪性転化には少なくとも 2 種類の機序があることが示唆された。

米国のプロジェクト、TCGA (The Cancer Genome Atlas) のデータにおいても、CIMP(+) の膠芽腫はメチル化プロファイルで 2 つに分かれてくることが検証された。

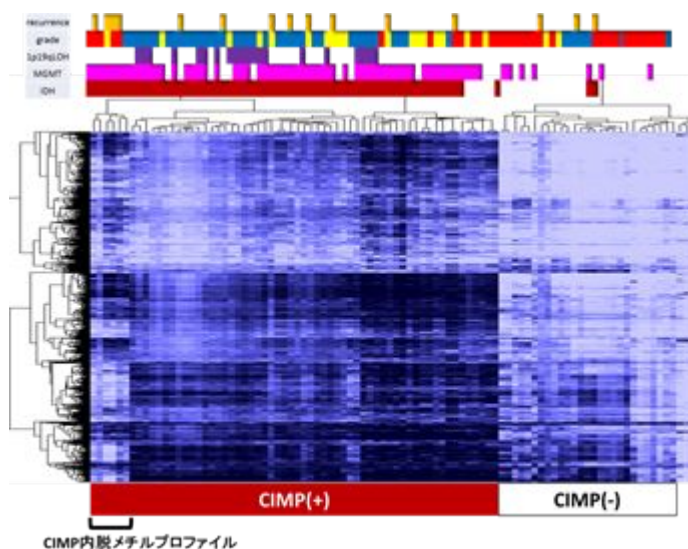


図1 神経膠腫約100例のメチル化階層的クラスタリング

(2) 脱メチル-悪性転化に関する遺伝子

TCGA のデータを用いて、CIMP(+)**膠芽腫**と、CIMP(+)**脱メチル膠芽腫**の2群においてメチル化を比較し、脱メチル群でメチル化の低下する遺伝子を抽出した。さらに、遺伝子発現についても2群間で比較をした。メチル化と発現の比較を統合してグラフにしたものが図2である。脱メチル群でメチル化が低く、かつ発現が上がっている遺伝子を選出すると、*IGFBP2*, *MKI67*, *PLAT*などがあげられた。

IGFBP2 は、膠芽腫において発現が上昇している代表的な遺伝子であり、膠芽腫の発生や維持に重要な役割を担っていることが報告されている。脱メチル群の悪性転化において発現が上昇していることから、この悪性転化においても重要な役割を果たしていることが考えられた。この *IGFBP2* については、メチル化を MassARRAY にて、発現を定量 PCR にて解析して悪性転化に伴う変化や予後との相関について検証を行った。

また、その他の脱メチル-発現上昇遺伝子についても、神経膠腫の悪性転化におけるメチル化マーカーとして有用である可能性が示唆された。

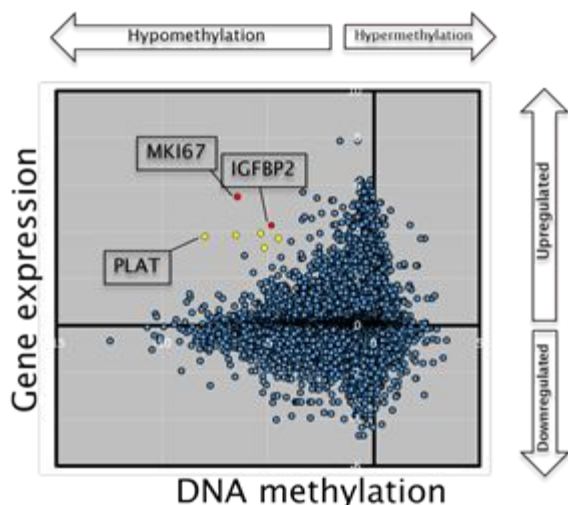


図2 脱メチル悪性転化神経膠腫のメチル化と発現の共解析 (starburst plot)

(3) *IGFBP2* についての検証

IGFBP2 について、プロモーターのメチル化を MassARRAY にて解析し、遺伝子発現を定量 PCR にて解析して検証した(図3)。

Grade 2 および Grade 3 の神経膠腫においては総じてメチル化が高く、発現が低いという結果であった。CIMP(-)の**一次膠芽腫**においてはメチル化が低く発現が高く、CIMP(+)**のGBM**においては、メチル化が高く発現が低いものと、メチル化が下がって発現が上昇するものの2パターンを認めた。

悪性転化前後のペア検体にて比較すると、メチル化が低下して発現が上がるペアと、メチル化も発現も変化しないペアが存在した。

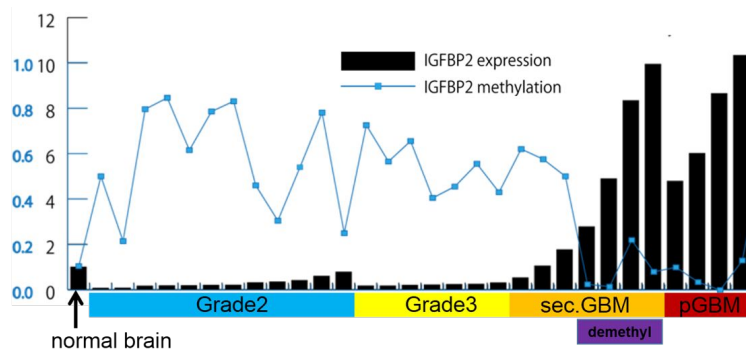


図3: 様々なグレードの神経膠腫における *IGFBP2* のメチル化(折れ線)と発現(棒)

悪性転化後の神経膠腫において、*IGFBP2* のメチル化の有無で2群に分けて、予後との関係を Kaplan-Meier 法にて解析した。

悪性転化群全体での比較では、メチル化のある症例の方が予後がいいという結果であったが($p=0.012$; 図4A)、Grade 4 への悪性転化症例 (secondary GBM)のみで比較すると、メチル化の有無で予後の差は認めなかった($p=0.45$; 図4B)。

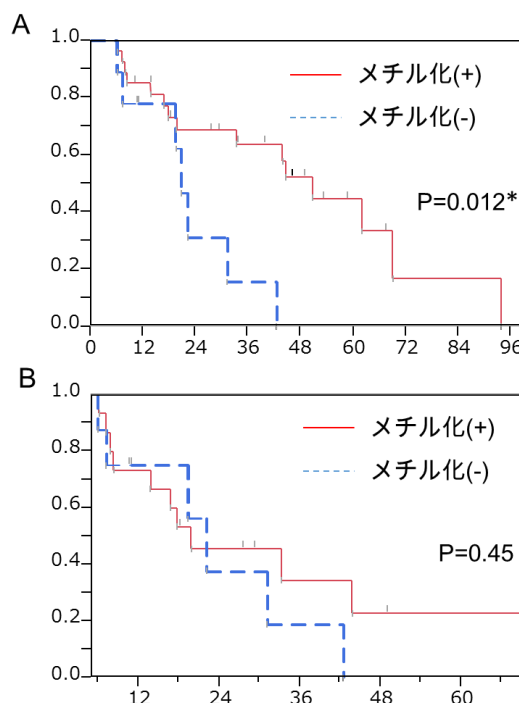


図4: 悪性転化した神経膠腫における、*IGFBP2* のメチル化の有無での生存期間の差

A: Grade 3, Grade 4 に悪性転化した神経膠腫での比較
B: Grade 4 に悪性転化した腫瘍 (secondary GBM) のみでの比較

(4) 膠芽腫幹細胞のメチル化解析

当教室にて樹立した膠芽腫幹細胞 6 例についてもメチル化網羅的解析を行ったところ、幹細胞においてもいくつかのメチル化プロファイルに分かれることが示唆された。詳細な解析は、今後症例数を増やして検討していく予定である。また、*IGFBP2* のメチル化と発現を計測したところ、幹細胞においては origin となる膠芽腫に比べても高い発現を認

めた。この幹細胞を接着培地にて分化誘導したところ、*IGFBP2*の発現の低下を認めたことから、*IGFBP2*が膠芽腫におけるstemnessに関与していることが示唆された。

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2件)

齊藤邦昭、武笠晃文、成田善孝、田部井勇助、篠浦伸禎、渋井壮一郎、齊藤延人. Toxicity and outcome of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide in elderly patients with glioblastoma: a retrospective study. *Neurol Med Chir(Tokyo)*. 2014; 54(4):272-9.

相原功輝、武笠晃文、後藤健吾、齊藤邦昭、永江玄太、他8名. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro Oncol*. 2014 Jan;16(1):140-6.

DOI:10.1093/neuonc/not144.

[学会発表](計7件)

齊藤 邦昭. メチル化網羅的解析により同定された神経膠腫悪性転化に関わる重要な分子機構. 第30回日本脳腫瘍学会学術集会 2013.12.8 フェニックス・シーガイア・リゾート(宮崎)

齊藤 邦昭. Identification of distinct subgroup of glioma and novel genes related to malignant progression by genome-wide methylation analysis. The 18th Annual Scientific Meeting of the Society for Neuro-Oncology. 2013.11.22 San Francisco (USA).

齊藤 邦昭. Identification of distinct subgroup of glioma related to malignant progression by genome-wide methylation analysis 第72回日本癌学会学術集会 2013.10.5 パシフィコ横浜(横浜)

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)

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)

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)

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)

[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