

様 式 C - 1 9、F - 1 9、Z - 1 9 ( 共通 )

## 科学研究費助成事業

## 研究成果報告書



平成 2 7 年 6 月 4 日現在

機関番号： 8 2 6 0 6

研究種目： 若手研究(B)

研究期間： 2013 ~ 2014

課題番号： 2 5 8 3 0 0 9 3

研究課題名 ( 和文 ) 頭蓋内胚細胞腫瘍におけるDNAメチル化の全ゲノムの探索

研究課題名 ( 英文 ) Genome-wide methylation study in intracranial germ cell tumors

研究代表者

福島 慎太郎 ( Shintaro, Fukushima )

独立行政法人国立がん研究センター・研究所・リサーチレジデント

研究者番号： 3 0 5 2 9 4 5 9

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

研究成果の概要 ( 和文 ) : 我々は頭蓋内胚細胞腫の病態解明を目指して全ゲノムの遺伝子解析の多施設共同研究を展開している。今回ジャーミノーマ(GE)22例、非ジャーミノーマ性胚細胞腫(NGGCT)36例、正常組織6例の凍結検体から抽出されたDNAを使用し、Illumina社製HumanMethylation450 BeadChipを用いてゲノムワイドなメチル化解析を行った。GEはNGGCTおよび正常組織と比べ広範な低メチル化により特徴づけられ、個体発生の過程において同様に全般的な低メチル化状態を呈する始原生殖細胞起源である可能性が示唆された。

研究成果の概要 ( 英文 ) : To elucidate the pathogenesis of intracranial germ cell tumors (iGCTs), we are going to execute a comprehensive genomic analysis by multi-institutional study. We used genomic DNA extracted from each frozen samples of 25 germinomas, 36 non-germinomatous GCTs (NGGCTs), and 6 normal tissues. A genome-wide methylation status was analyzed using HumanMethylation450 BeadChip (Illumina®). Germinomas were characterized by a global DNA hypomethylation in comparison to NGGCTs and normal tissues, which suggested germinomas originate from primordial germ cell showing a global hypomethylation during mammalian embryogenesis.

研究分野： 脳腫瘍のゲノム解析

キーワード： 頭蓋内胚細胞腫 ジャーミノーマ ゲノムワイドな低メチル化 始原生殖細胞由来

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋内胚細胞腫の概要はゲノミクス解析の項に述べたので省略する。上述のゲノミクス解析においてジャーミノーマの過半数が *KIT/RAS* の遺伝子異常を有していることがわかった。同時進行で exome sequence による遺伝子変異解析が行われており、上記以外にも新たな遺伝子変異の関与がわかってきているが、それら合わせても我々は頭蓋内胚細胞腫の発生メカニズムの多くを解明するに未だ至っていない。

頭蓋内胚細胞腫瘍においては、異なる組織型の混在する混合型が約 30%に存在するのだが、それぞれの組織型が別々の遺伝子変異を持つとは考えにくい。頭蓋内胚細胞腫瘍は、初発時と異なった組織型の胚細胞腫瘍を再発することがあり、腫瘍発生のメカニズムは単一の遺伝子変異のみでは説明がつかない。精巣発生の胚細胞腫瘍においては、セミノーマ群は全般的な低メチル化状態を呈するのに対し、非セミノーマ群では通常の固形がんと同程度のメチル化が起こっていることが既に報告されている。小児脳腫瘍においては、これまでにエピジェネティックな異常が数多く報告されているが、頭蓋内胚細胞腫瘍においては、まだ報告がない。

## 2. 研究の目的

本研究では頭蓋内胚細胞腫におけるエピゲノムの役割の解明を目的として網羅的解析を行い、その発生メカニズムに迫ることを目指す。

## 3. 研究の方法

・材料：全国他施設から提供された胚細胞腫検体 61 例

剖検材料および健常成人から採取した正常検体 5 例

培養細胞から得た神経幹細胞 1 例

|               | 病理組織診断  | n  | 計  |
|---------------|---------|----|----|
| 純型ジャーミノーマ     | ジャーミノーマ | 22 | 25 |
|               | セミノーマ   | 3  |    |
| 非ジャーミノーマ性胚細胞腫 | 混合型     | 19 | 36 |
|               | 奇形腫     | 10 |    |
|               | 胎児性癌    | 1  |    |
|               | 卵黄嚢腫瘍   | 5  |    |
|               | 絨毛癌     | 1  |    |
| 正常検体          | 大脳皮質    | 1  | 5  |
|               | 松果体     | 1  |    |
|               | 精巣      | 1  |    |
|               | 卵巣      | 1  |    |
|               | 血液      | 1  |    |
| 培養細胞          | 神経幹細胞   | 1  | 6  |

上記全て凍結検体より抽出した genomic DNA に対して、EZ DNA Methylation Kit (Zymo Research Corporation) を用いてバイサルファイト処理を施した。

・ゲノムワイドメチル化解析：バイサルファイト処理済み DNA に対して、*Infinium*® HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) を用いて行った。

・データ解析：各症例において、全 485,512 プローブの  $\beta$ -value のヒストグラムを作成

して比較検討した。さらに全 67 サンプル間で高標準偏差 (0.26) を示す約 28,000 プローブを選択し heatmap を用いた unsupervised hierarchical clustering を行った。

## &lt; 混合型胚細胞腫における解析 &gt;

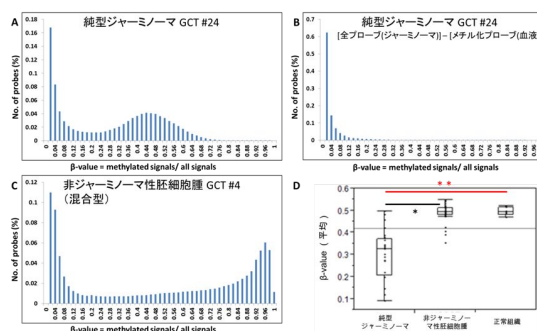
・マイクロダイセクション：混合型胚細胞腫のうちジャーミノーマ成分とそれ以外の腫瘍成分の境界が比較的明瞭であった 4 例において、FFPE スライド上でマッピングを行った後に、各成分を別々に採取し DNA を抽出し、以下の解析に用いた。純型ジャーミノーマ 2 例、卵黄嚢腫瘍 1 例の FFPE スライドからも同様に genomic DNA を抽出し比較に用いた。

・ゲノムワイドメチル化解析：バイサルファイト処理済み DNA に対して、*infinium*® HumanMethylation450 BeadChip を用いて行い、Fig. 1 と同じ約 28,000 プローブを選択し supervised hierarchical clustering を行った。

・遺伝子変異解析：共同研究により同時並行で行われている exome sequence の結果から導き出した遺伝子変異に対して直接シーケンシング (Sanger 法) で行った。

## 4. 研究成果

Fig. 1 頭蓋内ジャーミノーマはゲノムワイドな低メチル化状態を呈する



$\beta$ -value は methylated signals / all signals を意味しており、 $\beta$ -value が高値であるほど、メチル化状態が高いことを意味している。つまりヒストグラムの右側 (1.0 に近い) に高い peak があるほどその組織のメチル化状態が高いということになる。

Fig. 1-A, C はそれぞれの代表例を提示しているのだが、純型ジャーミノーマは非ジャーミノーマ性胚細胞腫と比べてゲノム全体的にメチル化状態が低いことがわかる。全 485,512 プローブの  $\beta$ -value の平均値をとって統計学的解析を行うと、メチル化状態は純型ジャーミノーマ群と非ジャーミノーマ性胚細胞腫群 (\* $P < 0.001$ )、純型ジャーミノーマ群と正常組織群 (\*\* $P < 0.001$ ) のそれぞれ 2 群間で有意差がみられた (Fig. 1-D)。ジャーミノーマの病理組織像の典型例は大型の腫瘍細胞のシート増殖像に小型の浸潤リンパ球を伴ったいわゆる two-cell pattern であることは周知の事実である。実際に純型

ジャーミノーマにおける全てのプローブから正常血液細胞（リンパ球）でメチル化されているプローブ（ $-value > 0.2$ ）を除くと、純型ジャーミノーマはほぼメチル化されていない細胞から構成されていることがわかる (Fig. 1-B)。

#### Supplemental figure

左は典型的な悪性腫瘍細胞株におけるゲノムワイドなメチル化状態のヒストグラムを示す。

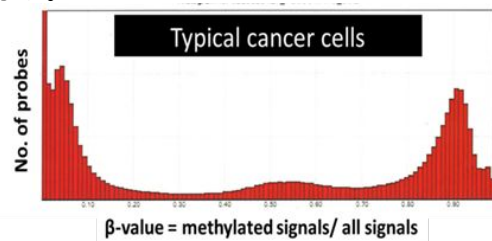
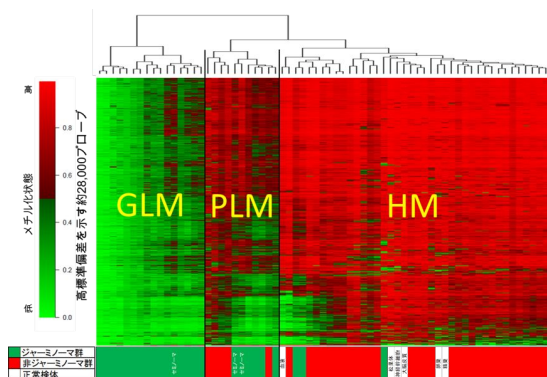


Fig. 2 胚細胞腫はメチル化状態により3つのクラスターに分類される



胚細胞腫は全般的な低メチル化状態を呈する群 (GLM)、一部低メチル化状態を呈する群 (PLM)、全般的な高メチル化状態を呈する群 (HM) の3つの subgroup に分類された。純型ジャーミノーマは GLM 群に、非ジャーミノーマ性胚細胞腫は HM 群にそれぞれ分類される傾向がみられた。正常組織は血液を除いて全般的に高メチル化状態を呈していた。

Fig.3 ジャーミノーマ成分と成熟奇形腫成分の境界が明瞭な例におけるマイクロディスプレイ

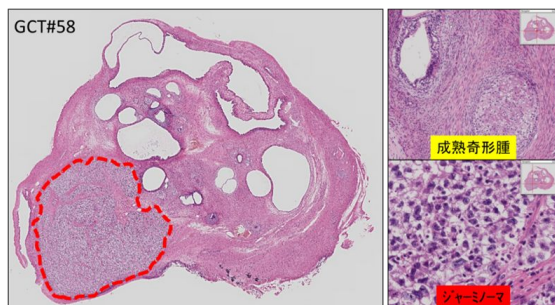
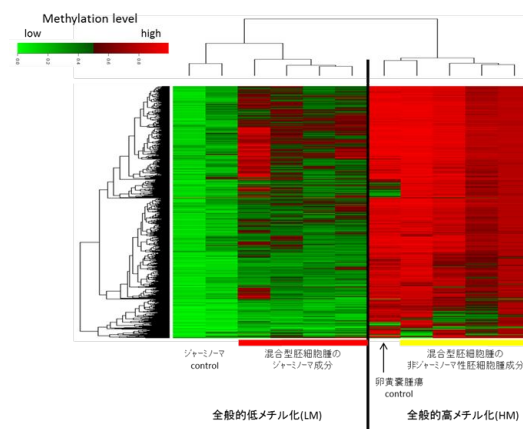


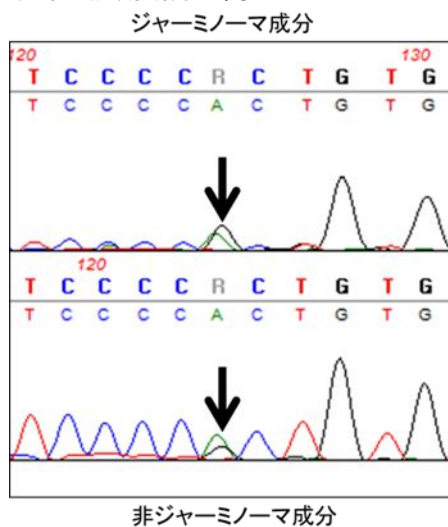
Fig. 4 混合型胚細胞腫におけるゲノムワイドな

ドメチル化プロファイルはジャーミノーマ成分とそれ以外の腫瘍成分で異なる



混合型胚細胞腫においても、コントロールサンプルと同様にジャーミノーマ成分は全般的な低メチル化状態を、それ以外の非ジャーミノーマ成分は全般的な高メチル化状態を呈しており、それぞれは完全に別々のクラスターに分類された。

Fig. 5 混合型胚細胞腫における遺伝子変異プロファイルはジャーミノーマ成分とそれ以外の腫瘍成分で同じである



上記4例中、exome sequence で有意な遺伝子変異が同定できたのは2例であったが、そのいずれにおいても混合型胚細胞腫のジャーミノーマ成分（上段）で確認された遺伝子変異（矢印）は非ジャーミノーマ成分（下段）においても確認された（矢印）。

- GCT58: mTOR mutation (c.6725A>G, p.2242H>R)
- GCT51: CBL mutation (IVS8-2A>G)

#### 考察

ジャーミノーマは他の胚細胞腫に比べ広範な低メチル化により特徴づけられた。これは全身を含む他のあらゆるがん腫においても類をみない特異なメチル化プロファイルであり (supplemental figure)、頭蓋内胚細胞

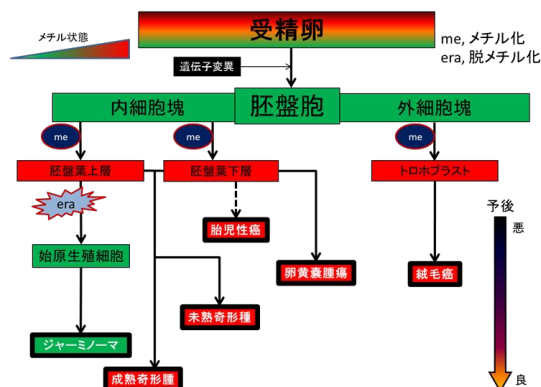


腫において個々のメチル化パターンの比較を行うことは、有用な分子診断マーカーとなりうる可能性が示唆された。

性腺発生胚細胞腫の起源は始原生殖細胞であるという定説(germ cell theory) [Teilum G, Acta pathol, 1956]があり、頭蓋内胚細胞腫もその例外ではなく、始原生殖細胞迷入あるいは遺存の結果であると考えられている。その一方で頭蓋内胚細胞腫の発生源は1. 神経幹細胞であるとする説も唱えられている[Tan C, et al. J Pathol, 2013]。今回の我々のゲノムワイドメチル化解析の結果から、ジャーミノーマの多くはGLM群に属する傾向がみられたが、神経幹細胞はHM群に属することがわかった(Fig. 1)。2013年に小林らによって発表されたマウス gametogenesis 2. および embryogenesis メチローム解析の結果においては、その過程において全般的な低メチル化状態を呈する組織は、始原生殖細胞および胚盤胞のみであることが示されている[Kobayashi H et al. Genome Res, 2013]。エピゲノミクス解析の結果に基づいた時、ジャーミノーマは始原生殖細胞由来であることが強く示唆された。また混合型胚細胞腫の解析からジャーミノーマ成分と非ジャーミノーマ成分ではメチル化プロファイルは異なるが、遺伝子変異プロファイルは同じであることがわかった。このことから遺伝子変異は腫瘍発生の過程において、メチル化よりも3. 先に起こるイベントであることが示唆された。

以上の結果および文献を基に、以下のような胚細胞腫発生モデルを考えている(Fig. 6)。

Fig. 6



## 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0件)

〔学会発表〕(計4件)

Shintaro Fukushima, Satoshi Yamashita, Hiromi Nakamura, Mamoru Kato, Hirokazu Takami, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Narita, Toshikazu Ushijima, Yoichi Nakazato, Masao Matsutani, Ryo Nishikawa,

and Koichi Ichimura on behalf of the Intracranial Germ Cell Tumors Genome Analysis Consortium (iGCT Consortium); Genome-wide methylation profiles in primary intracranial germ cell tumors suggest primordial germ cell origin of germinoma. The 4th International CNS Germ Cell Tumor Symposium, Tokyo, April, 2015.

福島慎太郎, 山下聡, 牛島俊和, 中村浩美, 加藤護, 柴田龍弘, 成田善孝, 松谷雅生, 西川亮, 市村幸一, 胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム; 頭蓋内発生ジャーミノーマにおける全ゲノムのメチル化プロファイルは始原生殖細胞起源を示唆する, 第32回日本脳腫瘍学会学術集会, 千葉, 2015年12月

Shintaro Fukushima, Satoshi Yamashita, Hirokazu Takami, Mamoru Kato, Akitake Mukasa, Nobuhito Saito, Yoshitaka Narita, Soichiro Shibui, Toshikazu Ushijima, Tatsuhiro Shibata, Masao Matsutani, Ryo Nishikawa, Koichi Ichimura on behalf of the Intracranial Germ Cell Tumor Genome Analysis Consortium (iGCT Consortium); Primary intracranial germinomas are characterized by global DNA hypomethylation. 16th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology (ISPN0), Singapore, July, 2014.

福島慎太郎, 山下聡, 牛島俊和, 加藤護, 柴田龍弘, 成田善孝, 松谷雅生, 西川亮, 市村幸一, 胚細胞腫ゲノム解析コンソーシアム; 頭蓋内ジャーミノーマは全ゲノムの低メチル化状態により特徴づけられる, 第32回日本脳腫瘍病理学会, 徳島, 2015年5月

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

[http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/brain\\_tumor/index.html](http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/brain_tumor/index.html)

6．研究組織

(1)研究代表者

福島 慎太郎 (Shintaro Fukushima)  
国立がん研究センター研究所 脳腫瘍連  
携研究分野 リサーチレジデント  
研究者番号：30529459

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：