

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861268

研究課題名(和文) グリオーマの悪性転化に関わる新規バイオマーカーの機能解明

研究課題名(英文) Biomarkers associated with malignant transformation in grade II and III gliomas

研究代表者

本村 和也 (MOTOMURA, Kazuya)

名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・特任准教授

研究者番号：30467295

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマにおける悪性転化に関わるマーカーの探索のため、Grade IIおよびGrade III神経膠腫(低悪性度神経膠腫)に対する網羅的遺伝子異常解析を行った。日本国内5施設における332例とThe Cancer Genome Atlasの425例を合わせた計757例に対して次世代シーケンサーを用いた包括的な遺伝子解析を行った。低悪性度神経膠腫を遺伝子異常に基づいて3タイプに分類ができた。(Type-I: IDH変異 + 1p/19q co-deletion, Type-II: IDH変異 + 1p/19q non-co-deletion, Type-III: IDH正常)

研究成果の概要(英文)：Grade II and III gliomas are slowly progressing brain cancers, many of which eventually transform into more aggressive tumors. Grade II and III gliomas comprise three distinct subtypes characterized by discrete sets of mutations and distinct clinical behaviors. Mutations showed significant positive and negative correlations and a chronological hierarchy, as inferred from different allelic burdens among coexisting mutations, suggesting that there is functional interplay between the mutations that drive clonal selection.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 悪性転化

1. 研究開始当初の背景

最近の大規模な遺伝子解析研究によって、腫瘍細胞における遺伝子変異やその進展の多様性が明らかとなった。ほとんどの腫瘍においては、ある一連の変異をもった subclone が様々なセレクションをうけて生き残り増大する。このため、悪性転化は clonal に起こると考えられる。これらの subclone を解析することによって、特に、治療前後での腫瘍再発、悪性転化のメカニズムや治療奏功性などが明らかになると考えられる。悪性グリオーマの発生・悪性転化のメカニズムの解明の糸口として、2010年に我々は悪性グリオーマの臨床組織検体を用いて、未知のバイオマーカーのゲノミクス、エピゲノミクス、プロテオミクスを統合した網羅的な解析を行い、これまで報告のない新しい治療予後因子を見出し研究報告した (Motomura, Cancer Sci. 2012, Motomura, Cancer, 2011)。さらに、2011年~2012年にかけて、フランスにある世界保健機関 (WHO) の国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer : IARC) において、低悪性度グリオーマに対する population based study を実施し論文報告を行った (Motomura, J Neuropathol Exp Neurol. 2012, Pierscianek, Motomura, Brain Pathology. 2012)。悪性グリオーマの中には、短期間で神経症状が進行し予後不良の転帰をとる一次性膠芽腫と、WHO grade II, III glioma から悪性転化する二次性膠芽腫が知られている。我々は、両者に共通して高頻度に見られる第 10 番染色体長腕 10q 欠失及び、第 7 番染色体長腕 7q 増幅という 2 つの遺伝子異常に着目し、ある共通の遺伝子異常が低悪性度グリオーマから二次性膠芽腫への悪性転化の原因になっている、という仮説を立てた。米国で行われている大規模な The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトのデータセットを用いて、IDH1/2 mutation の有無で分けた、計 400 例の悪性グリオーマにおける DNA コピー数異常を網羅的に解析した。各両群において、10q 領域内で高度に欠失している遺伝子異常は DMBT1 (deleted in malignant brain tumor 1; 10q26.13) のみであり、7q 領域で増幅している 25 遺伝子については特に、MET (7q31.2) に注目した。世界各国から集めた 329 例の低悪性度グリオーマに対して、DMBT1 homozygous deletion 及び MET gain の解析を行った。興味深いことに、DMBT1 homozygous deletion のある diffuse astrocytomas 群の生存期間中央値 (52.8 ヶ月) は、無い群 (84.0 ヶ月) に比べて優位に予後不良であった (P=0.003)。また MET gain のある diffuse astrocytoma 群の生存期間中央値 (43.0 ヶ月) は、無い群 (70.7 ヶ月) に比べて優位に予後不良であった (P=0.004)。これまで明らかでなかった低悪性度グリオーマの新たな予後予測因子として、DMBT1 homozygous deletion 及び MET gain を同定

することに成功した。

2. 研究の目的

我々は、一次性及び二次性膠芽腫に共通して高頻度に見られる第 10 番染色体長腕欠失及び、第 7 番染色体長腕増幅という遺伝子異常に着目し、ある共通の遺伝子異常が低悪性度グリオーマから二次性膠芽腫への悪性転化の原因になっているという仮説を立てた。近年、低悪性度グリオーマにおける網羅的遺伝子解析により、DMBT1 (Motomura, J Neuropathol Exp Neurol. 2012) などの新規がん抑制遺伝子および MET (Motomura, Brain Pathology. 2012) などの新規がん遺伝子を見出した。これら遺伝子異常は、悪性転化に関わる新たなバイオマーカーとして意義が高く、今後の新規治療標的分子になることが期待される。DMBT1 欠失及び MET 増幅のあるグリオーマ幹細胞株に、DMBT1 及び MET-shRNA を遺伝子導入し、様々な機能解析をすることで、悪性グリオーマの腫瘍増殖・進展及び悪性転化に関わるメカニズムを解明することがこの研究の目的である。

3. 研究の方法

本研究の前半では、DMBT1 及び MET-shRNA を発現するベクターを作成し、遺伝子組み込み技術の確立を目指す。また、グリオーマ幹細胞株及びグリオーマ細胞株に遺伝子導入した後、in vitro にて、これらの遺伝子の細胞癌化における機能解析を行う。さらに GFAP, Nestin, TUJ1, OSP 及び GIC の分化誘導マーカーである Oct-4, SOX-2, CD133 などの発現を蛍光免疫染色法にて観察する。また、本研究の後半は、DMBT1 及び MET-shRNA 導入されたグリオーマ幹細胞をマウスの脳内に移植し、その脳腫瘍マウスモデルを用いて脳腫瘍の発生率、増殖の程度及び GFAP, Nestin, S100, NeuN, EGFRvIII などの発現を組織学的に検討し、DMBT1 及び MET の腫瘍発生、増殖に関わるメカニズムを解明する。

4. 研究成果

平成 26 年度に、DMBT1 および MET-shRNA をそれぞれ発現するベクターを細胞株に遺伝子導入し、それらをマウスに導入する予定であったが、遺伝子導入に難渋し非常に時間を要した。このため、DMBT1 および MET-shRNA をそれぞれ発現するベクターを導入された細胞株を免疫不全マウスの脳に直接移植し、DMBT1 を高発現もしくは MET の機能を抑制することで、生体内における腫瘍細胞の運動能を更新及び抑制できるか調べているが、免疫不全マウスの実験進行に難渋している。

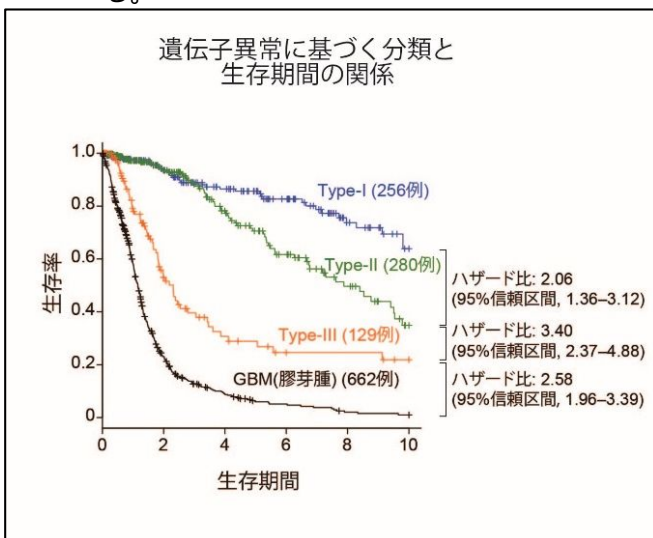
よって、平成 26 年度から、国内数施設から合計 332 例の低悪性度神経膠腫の DNA を採取し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析も同時に行っている。本研究

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。

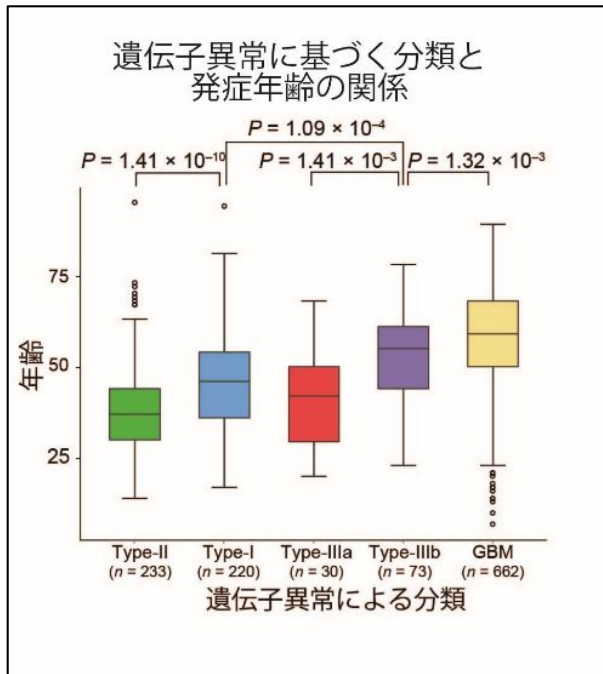
私達は変異のパターンにおいて低悪性度神経膠腫を (1) Type I: IDH1/2 変異有、1p/19q co-deletion 有、(2) Type II: IDH1/2 変異有、1p/19q co-deletion 無、TP53 変異有、(3) Type III: IDH1/2 変異無、と名付け解析を行っている。

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、従来の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 腫瘍は膠芽腫とよく似た変異パターンを示した。しかしながら Type III 腫瘍の生存期間は膠芽腫より良い結果となった。また、Type III 腫瘍を発症する患者さんたちの年齢も膠芽腫と異なった。Type III 腫瘍は膠芽腫と思われる症例が混ざっている可能性はあるが、膠芽腫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分かった。

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。しかしながら Type III 腫瘍の生存期間は Glioblastoma より良い結果となっている。



また、Type III 腫瘍を発症する患者さんたちの年齢も Glioblastoma と異った。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

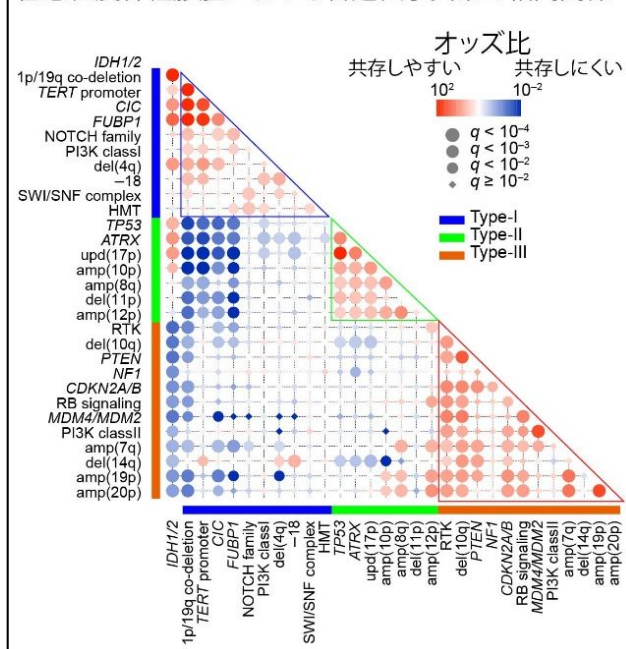


で比較しても Glioblastoma とは異なった年齢分布であった。

そのため Type III 腫瘍は Glioblastoma と混ざっている可能性はあるが、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。

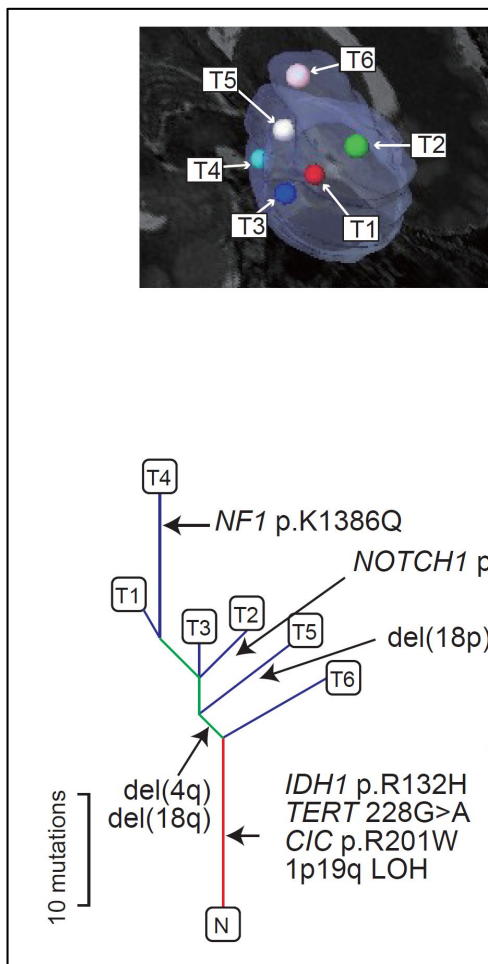
これらの遺伝子異常に基づく分類は患者の生存期間に強く影響しており、治療の現場においても有効な分類である。遺伝子異常による分類は検査を担当する人間によって結果が左右されにくいものであり、患者さん個人個人の治療を考えるうえでとても有効であり信頼のおける分類になるといえる。

低悪性度神経膠腫における各遺伝子異常の相関関係



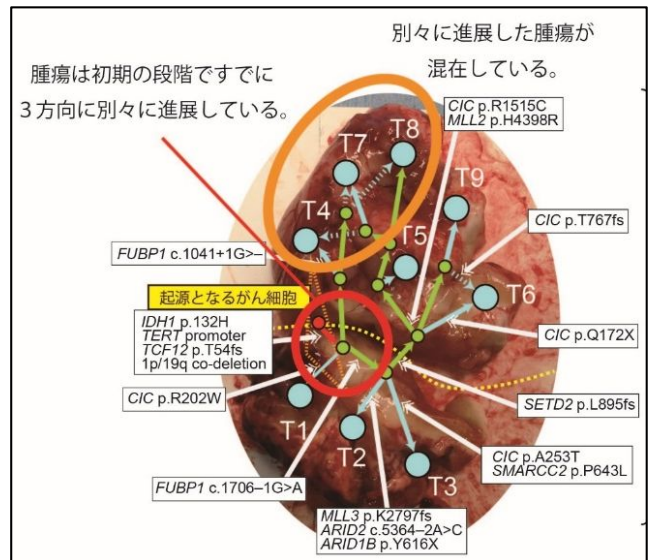
遺伝子異常の全貌がわかると低悪性度神経膠腫はあたかもまったく異なった3種類

の腫瘍の集合体という印象を与える。次に、それぞれの遺伝子異常がどのタイプに起こりやすいかを調べた。遺伝子名の隣に“青”“緑”“オレンジ”のバーで、どのタイプに起こりやすい異常なのかを示す。格子上に2つの異なる遺伝子異常の組み合わせが一緒に起こりやすいかどうかを色付きの丸でしめす。赤い丸ほど一緒に異常が起こりやすく、青いほど一方が存在する時もう片方の異常は存在しにくくなる（排他的である）関係にある。すると各タイプに特徴的な異常は同じタイプで特徴的な他の変異と一緒に起こることが多く、他のタイプで特徴的な異常とは一緒に起こりにくいということが分かった。このように、遺伝子異常による分類は腫瘍の特性をしっかりと示しており、分類された3タイプはそれぞれ特徴の異なる腫瘍であるということが分かった。



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、多様性があると考えられている。これらの多様性は治療抵抗性と密接にかかわっていると考えられている。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

サンプリングで確認されたそれぞれの遺伝子異常を示す。同じ患者さん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。そのうえ一か所でしか確認できない異常は全体の60%にもなる。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った。よって低悪性度神経膠腫はとて複雑な腫瘍であると言える。



マルチサンプリングの結果を詳細に解析し、各場所での複雑性を評価したあと統合すると一人の患者の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を示すことができる。代表例を一例示す。この患者では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種類の異なる腫瘍細胞が異なる遺伝子異常を獲得して進展している。順番に遺伝子異常を獲得し外へ外へと広がっている。図の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のが分かった。また、CICという遺伝子の異常は同じ患者さんでも異なる場所に5種類の異常が起きていることがわかりとても複雑な腫瘍であることが判明した。

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る遺伝子異常が起きて、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になった。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ると考えられる。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ることがわかり病気の正確な診断の手助けになると考えられる。

本研究では、世界最大規模の網羅的遺伝子解析を行い、低悪性度神経膠腫に起きている遺伝子異常の全貌を明らかにすることができた。近年、遺伝子解析記述の革新的な進歩に

より大規模な悪性腫瘍における遺伝子異常の解析が行われている。欧米では多施設共同のもの莫大な費用とマンパワーを使用し成果をあげている。そのような中から、我が国からこのような最大規模の網羅的遺伝子解析が発信されることはとても意義深い。低悪性度神経膠腫はいまだ治療が困難で有効な治療が見つかっていない疾患であるため新規治療の開発が期待される。私たちが低悪性度神経膠腫の遺伝子異常の全貌を明らかとし、それぞれの遺伝子異常の役割を解明したことは今後のあらゆる研究の礎となる結果となる。今後の研究により低悪性度神経膠腫の新たな分類方法や治療法の開発はもちろん、ゲノム異常に基づいた治療法や薬剤の選択、すなわちオーダーメイド医療の実現がより進むことが期待される。

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, Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, 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. 2015 May;47(5):458-68.(査読有)

[学会発表](計 1 件)

本村和也、鈴木啓道、青木恒介、夏目敦至、Hiroko Ohgaki、若林俊彦 Lower grade gliomaの悪性転化に関わる遺伝子解析 第4回 Neuro-Oncology West 2015年10月03日 帝国ホテル大阪(大阪府大阪市)

6. 研究組織

(1)研究代表者

本村 和也 (MOTOMURA, Kazuya)
名古屋大学 医学系研究科 特任准教授
研究者番号: 30467295

(2)研究分担者

なし