

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10342

研究課題名(和文) 神経膠腫およびその幹細胞の新規メチル化マーカーの確立と個別化療法への応用

研究課題名(英文) Novel methylation markers of glioma and glioma stemcell and their application to individualized medicine

研究代表者

小林 啓一 (Kobayashi, Keiichi)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：70406990

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：神経膠腫と脳腫瘍幹細胞について、パイロシーケンス法を用いてメチル化の解析を行い、新規メチル化マーカーの検索を行った。既知の予後予測因子であるMGMTに加えて、新規メチル化マーカーとなるIGFBP2について解析を行った。IGFBP2のメチル化が、神経膠腫の悪性度を反映するマーカーであることがわかり、また腫瘍幹細胞でメチル化が低下することから、幹細胞形成と関連していることが示唆され、治療標的としても有望な分子と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We performed methylation analysis of glioma and glioma stemcell using pyrosequencing to find novel methylation marker. Methylation of MGMT, known prognostic factor, and IGFBP2 were analyzed. IGFBP2 methylation revealed to predict glioma grade. Furthermore, methylation level of IGFBP2 was significantly lower in glioma stemcell, indicating that IGFBP2 was associated with stemness and could be therapeutic target of glioma.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：神経膠腫 メチル化 パイロシーケンス MGMT IGFBP2 幹細胞

1. 研究開始当初の背景

(1) 神経膠腫は治療困難な腫瘍であり、特に grade IV の膠芽腫は予後不良で、標準化学療法剤であるテモゾロミドを用いて治療を行っても予後が 15 ヶ月程度である(Stupp et al. N Engl J Med. 2005)。テモゾロミドの治療反応予測因子として、O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 遺伝子のプロモーター領域のメチル化が、テモゾロミドの感受性に強く関連していることが報告された(Hegi et al. N Engl J Med. 2005)。しかしながら、この DNA のメチル化を認めるにもかかわらず治療に不応性の患者が存在し、抗癌剤抵抗性となった再発腫瘍においてもメチル化を認めるなど、MGMT 以外の多数の因子が治療反応性に関連していることは明らかであり、これら因子(遺伝子)を同定することは、今後の治療戦略構築において非常に重要であると考えられる。特に DNA メチル化は様々ながんにおいてバイオマーカーとして広く用いられている。そのアッセイ方法として近年注目を集めているのがパイロシーケンス法であり、多数の検体の複数の部位のメチル化を短時間に定量的に解析できる手法である。

(2) 近年の解析技術進歩に伴い、DNA メチル化のゲノムワイドな網羅的解析が可能となっている。連携研究者(齊藤)の有する Infinium450K BeadChip(Illumina)を用いた神経膠腫および膠芽腫幹細胞の網羅的メチル化データや、米国の The Cancer Genome Atlas(TCGA)が公開しているデータを解析することで予後や抗がん耐性に関するメチル化部位の候補リストが抽出できる。Infinium で選択されたメチル化部位を検証するには、短時間に多数の検体を定量的に解析できる方法が望ましく、パイロシーケンス法が最も適していると考えられる。

2. 研究の目的

(1) 本研究では、パイロシーケンス法を用いて詳細な臨床情報が既知の多数の自験例において標的遺伝子のメチル化の解析を行い、メチル化マーカーを確立することを目的とした。

(2) また、腫瘍幹細胞におけるメチル化解析を行い、origin である神経膠腫検体と比較して、治療耐性や予後と幹細胞との関連を探る。

(3) さらに、メチル化のステータスに応じて治療を選択することで個別化治療を実現させると共に、将来のメチル化を調節する薬剤を用いた新規治療の礎を築くことを目指した。

3. 研究の方法

(1) テモゾロミド耐性に関する遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析

現在保有している神経膠腫検体 DNA を用いて、MGMT をはじめとして、今までに報告されているテモゾロミド耐性に関する

遺伝子のメチル化についてパイロシーケンスで解析する。MGMT に関しては多くの検体ですでに解析済みであり、MSP 法との高い相関を確認している。メチル化と臨床情報とを合わせて単変量・多変量解析することで、予後やテモゾロミド感受性と関連する遺伝子や遺伝子の組み合わせを明らかにする。

(2) 新規メチル化マーカーの確立

Infinium によるメチル化網羅的解析を行った神経膠腫を、テモゾロミド耐性群と感受性群に分けて群間比較を行い、メチル化が大きく異なる CpG サイトをリストアップする。この中から遺伝子における位置や周辺の CpG の密度、遺伝子の機能なども考慮した上でメチル化マーカーとして適した CpG サイトを選ぶ。パイロシーケンス用のプライマーを作成し、保有する神経膠腫検体のメチル化についてパイロシーケンスで解析、検証する。テモゾロミド感受性や予後などの臨床情報と対比させて統計解析を行い、メチル化マーカーとして最も有用なものを選出する。

(3) 神経膠腫幹細胞の解析

当教室にて樹立した神経膠腫幹細胞を用いて、(1)、(2)で検証したメチル化マーカーについてパイロシーケンス法にて解析する。幹細胞の origin である神経膠腫検体との比較を行い、治療耐性や予後と幹細胞との関連を探る。

(4) 血清中を循環している神経膠腫腫瘍細胞由来の cell free DNA 解析法の確立

上記(1)で腫瘍検体において検証ができたメチル化マーカーについて、血清中の DNA についても解析を行う。同一症例の腫瘍における結果と血清における結果を比較し、血清メチル化マーカーとして用いることができる遺伝子を選定する。神経膠腫患者の血清 DNA をフォローし、再発の早期検出に有用かどうか、また再発時の腫瘍の性質を正確に反映しているかなどを検証する。

(5) 新規診断・治療への応用

化学療法感受性を高めるために、メチル化の有無により脱メチル化剤やヒストン脱アセチル化酵素阻害剤などを用いた patient-specific therapy を考案する。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関連を解明し、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 individualized epigenetic therapy の開発、確立を目指す。

4. 研究成果

(1) MGMT メチル化解析

308 例の神経膠腫検体において、パイロシーケンス法を用いた MGMT メチル化解析を行った。そのうち、予後が明らかとなっている 225 例(grade 32 例、grade 56 例、grade 137 例)の初発神経膠腫を用いて、メチル化と予後との比較を行った。予想されたように、MGMT メチル化のある腫瘍

の方が無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)共に有意に長いことが確認された。メチル化と判定するための cut-off によって結果は少し異なるが、grade の膠芽腫(GBM)に関しては cut-off 10、grade の lower grade glioma(LrGG)に関しては cut-off 20 が予後予測に適していると考えられた。GBM および LrGG の PFS および OS を Kaplan-Meier 曲線にて以下に示す(図 1)。

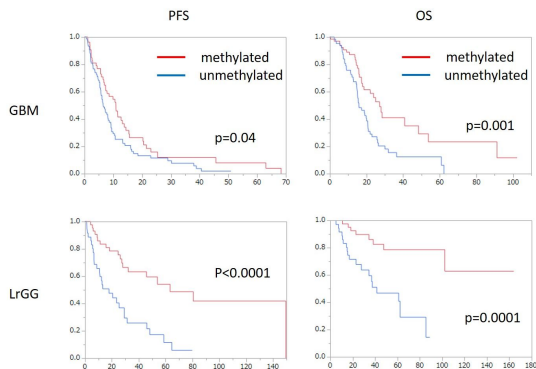


図 1 : MGMT メチル化の有無による GBM、LrGG の PFS および OS

(2) 新規メチル化マーカー候補の選出

Infinium450K を用いたメチル化解析のデータおよび TCGA のデータの解析から、神経膠腫の予後に関連する因子として *IGFBP2* のメチル化が候補にあがった。多数の神経膠腫検体を用いて検証するために、パイロシーケンス法を用いて *IGFBP2* のメチル化を検出して、予後との関連などを解析することとした。プライマーについては、QIAGEN 社が Infinium450K に対応して作成したものを使用してメチル化解析を行った。

(3) *IGFBP2* のメチル化解析

186 例の神経膠腫検体において *IGFBP2* のメチル化解析をパイロシーケンスにて行った。grade 26 例でメチル化が 2.5 ± 0.25 、grade 39 例でメチル化が 1.55 ± 0.21 、grade 4 121 例でメチル化が 1.35 ± 0.12 であり、*IGFBP2* のメチル化は、grade が上がるにつれて低下することが判明し、悪性度との相関が示唆された(図 2)。MGMT のメチル化と悪性度には全く相関が見られなかった。

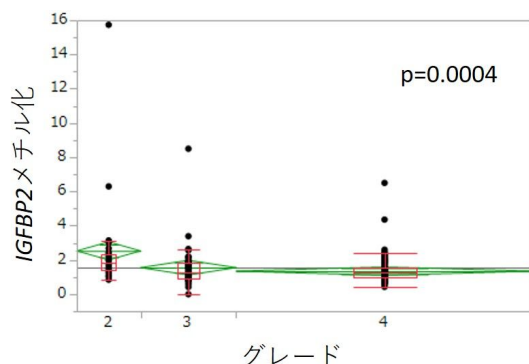


図 2 : Grade ごとの *IGFBP2* メチル化予後との相関に関しては、神経膠腫すべてを

合わせて解析すると *IGFBP2* のメチル化のある方が PFS、OS 共に有意に延長することがわかった(図 3)。予後予測に最適な cut-off は 1.5 であった。各 grade の神経膠腫に分けて解析した場合は、*IGFBP2* のメチル化は予後と関連しなかった。

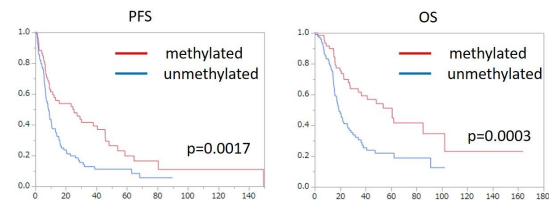


図 3 : *IGFBP2* メチル化の有無による神経膠腫瘍の PFS および OS

(4) メチル化の組み合わせによる予後予測

MGMT と *IGFBP2* のメチル化の有無でグループ分けをしたところ、共にメチル化を認めるものが最も OS が長く(中央値 85 ヶ月)、MGMT メチル化/*IGFBP2* 非メチル化(同 34 ヶ月)、MGMT 非メチル化/*IGFBP2* メチル化(同 21 ヶ月)、共に非メチル化(同 15 ヶ月)と続き、詳細に予後を予測することができた(図 4)。

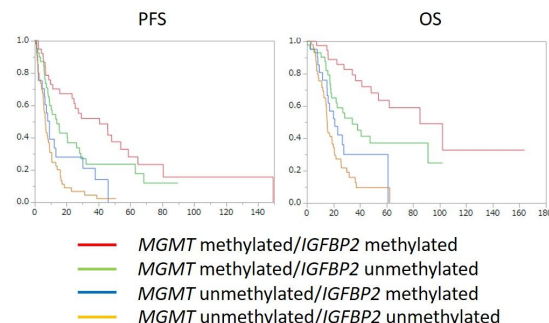


図 4 : MGMT と *IGFBP2* の組み合わせにより分類した場合の神経膠腫の PFS と OS

(5) 幹細胞のメチル化解析

21 例の神経膠腫由来の腫瘍幹細胞についても、メチル化の解析を行った。*IGFBP2* のメチル化は、 1.0 ± 0.28 であり、grade の膠芽腫と比べても低メチル化であった。さらにもとからの腫瘍検体と腫瘍幹細胞のペアにおいて *IGFBP2* メチル化を比較すると、幹細胞でメチル化が有意に低下していることがわかった。MGMT ではそのような傾向はみられなかった(図 5)。

幹細胞で *IGFBP2* のメチル化が低いことから、その発現は上昇していることが予想され、幹細胞の性質に *IGFBP2* が関係していると考えられた。

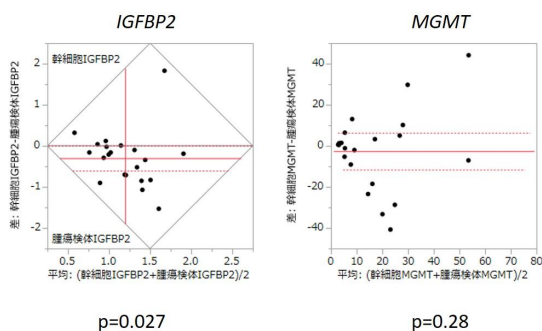


図 5 : 腫瘍検体と腫瘍幹細胞のペアにおける IGFBP2 メチル化の変化

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 7 件)

山岸 夢希, 小林 啓一, 齊藤 邦昭, 久米賢, 川井田 善太郎, 佐々木 重嘉, 塩川 芳昭, 永根 基雄: 高齢者膠芽腫に対する術後放射線治療および化学療法との選択と予後に関する検討 . Geriatric Neurosurgery 29: 25-37, 2017(査読有) Aihara K, Nagane M (20 番目, 他 22 名): Genetic and epigenetic stability of oligodendrogliomas at recurrence. Acta Neuropathol Comm 5: 18, 2017. DOI 10.1186/s40478-017-0422-z (査読有)

Lee J, Shishido-Hara Y, Suzuki K, Shimizu S, Kobayashi K, Kamma, H Shiohara Y, Nagane M: Prognostic factors for primary central nervous system lymphomas treated with high-dose methotrexate-based chemo-radiotherapy. Jpn J Clin Oncol, 2017, 1-10. doi:10.1093/jjco/hyx098 (査読有)

Nomura M, Kobayashi K (11 番目), Nagane M(21 番目, 他 23 名): Distinct molecular profile of diffuse cerebellar gliomas. Acta Neuropathol 134: 941-956, 2017. DOI 10.1007/s00401-017-1771-1 (査読有)

Nitta Y, Shimizu S, Shishido-Hara Y, Suzuki K, Shiohara Y, Nagane M: Nimotuzumab enhances temozolomide induced growth suppression of glioma cells expressing mutant EGFR *in vivo*. Cancer Med 5 (3): 486-499, 2016. 2016 Jan 18. doi: 10.1002/cam4.614. [Epub ahead of print] (査読有)

Arita H, Saito K(13 番目), Kobayashi K (14 番目), Nagane M (46 番目, 他 51 名): A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed

glioblastomas. Acta Neuropathologica Communications 4:79, 2016, DOI 10.1186/s40478-016-0351-2. (査読有) 小林 啓一, 永根 基雄: 再発膠芽腫に対する治療の up to date. 脳神経外科速報 26 (9): 939-947, 2016 (査読無)

[学会発表](計 13 件)

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 9 名 . Integrated molecular analysis of newly diagnosed and recurrent glioblastoma after temozolomide treatment. 第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会 2017.11.26 高松

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 9 名 . Temozolomide-induced mismatch repair insufficiency and hypermethylation of MGMT promoter with hypermutation in malignant glioma. 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology 2017.11. 17 San Francisco, USA

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 8 名 . Goal-setting of extent of resection on the basis of molecular status in glioma surgery. 第 76 回日本脳神経外科学会学術総会 2017.10.12 名古屋

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 8 名 . Integrated molecular analysis of newly diagnosed and recurrent glioblastoma after temozolomide treatment. 第 35 回日本脳腫瘍病理学会 2017.5.19 宇都宮

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 4 名 . Prognostic significance of MGMT promoter and mismatch repair system in newly-diagnosed and recurrent malignant gliomas. 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS) 2017.5.5 Zurich, Switzerland

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 4 名 . Upfront chemotherapy prolongs progression free survival of the patients with low-grade oligodendroglial tumors. 21st Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology 2016.11.19

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 4 名 . Integrated analysis of MGMT promoter methylation and mismatch repair alteration in glioma. 第 75 回日本癌学会学術総会 2016.10.6

永根 基雄, 小林 啓一, 他 7 名 . Integrated analysis of methylation of MGMT promoter and alteration of mismatch repair enzymes in glioblastoma. 13th Asian Society for Neuro-Oncology Meeting 2016.9.12

齊藤 邦昭, 小林 啓一, 他 7 名 . 神経膠

腫におけるMGMTメチル化とDNAミスマッチ修復酵素の統合解析.第33回日本脳腫瘍学会学術集会 2015.12.7

齊藤 邦昭、小林 啓一、他6名. ミスマッチ修復酵素が初発膠芽腫の予後に与える影響. 第24回多摩脳腫瘍研究会 2015.11.28

齊藤 邦昭、小林 啓一、他6名 Mismatch repair defects predict clinical outcome of primary and recurrent malignant gliomas. 20th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology 2015.11.20

齊藤 邦昭、小林 啓一、他6名. MGMTメチル化とDNAミスマッチ修復酵素の異常に応じた膠芽腫治療の展望. 第74回日本脳神経外科学会学術総会 2015.10.14

齊藤 邦昭、小林 啓一、他6名. 低悪性度神経膠腫再発時におけるMGMTメチル化/ミスマッチ修復タンパク発現の変化. 第29回東京脳腫瘍治療懇話会 2015.6.19

〔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: なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 啓一 (KOBAYASHI, Keiichi)
杏林大学・医学部・学内講師
研究者番号: 70406990

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者

永根 基雄 (NAGANE, Motoo)
杏林大学・医学部・教授
研究者番号: 60327468

齊藤 邦昭 (SAITO, Kuniaki)
杏林大学・医学部・助教
研究者番号: 50446564

(4)研究協力者

清水 早紀 (SHIMIZU, Saki)
杏林大学・医学部・実験助手