

平成 30 年 6 月 13 日現在

機関番号：82504

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10349

研究課題名(和文) 創薬を目指した新たな治療感受性・抵抗性分子標的の探索

研究課題名(英文) Identification of new molecular target associated with treatment-resistance of glioblastomas

研究代表者

井内 俊彦 (UCHI, TOSHIHIKO)

千葉県がんセンター(研究所)・脳神経外科・部長

研究者番号：80370881

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)：相同結合(HR)に関するRad51と非相同末端結合(NHEJ)に関するXRCC6の遺伝子コピー数の減少は放射線化学療法後の神経膠芽腫患者の良好な生命予後と相関しており、これらの分子が治療抵抗性に関与していることが推測されたが、放射線化学療法前後の腫瘍サンプル遺伝子発現を比較解析すると、HRやNHEJに関する遺伝子発現は治療により寧ろ抑制されており、CDKN1AとDDB2の発現が症例に共通して治療後に発現亢進していた。これらのデータから、神経膠芽腫に対する放射線化学療法後の遺伝子修復に関してはCDKN1Aによる細胞周期停止と、ヌクレオチド除去修復が主役をなしている可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Copy number decrease of Rad51 (an essential factor of homologous recombination:HR) and XRCC6 (coding Ku70 which acts as the cornerstone of the non-homologous end joining: NHEJ) were associated with the survival of patients after chemo-radiotherapy, and were suspected to be a key molecule of tumor resistance to the treatment. However, from the comparative study of gene expression profiles between the samples from tumors pre- and just post-chemo-radiotherapy, genes involved in HR and NHEJ were down-regulated by the treatment, while CDKN1A and DDB2 expressions were up-regulated in the all cases. These data suggested the significant role of cell cycle arrest by CDKN1A and nucleotide excision repair, not HR nor NHEJ, plays a major role in tumor resistance to chemo-radiotherapy in glioblastomas.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：glioblastoma radiation chemotherapy resistance molecular target DNA repair

1. 研究開始当初の背景

神経膠芽腫に対する標準的治療は、可及的摘出後の放射線化学療法である。手術術式ならびに手術支援法の進歩による手術摘出率の向上、放射線照射技術の革新、テモゾロミド(TMZ)の出現など、神経膠芽腫治療における数々の進歩にも係わらず、罹患患者の生存期間中央値は14ヶ月程度と極めて予後不良な状態が続いている。本腫瘍ではEGFR変異の頻度が高いことが知られているが、既存のEGFR阻害剤の効果は臨床試験によって否定された。またVEGFを治療標的としたベバシズマブによる予後の改善が期待されたが、同薬剤も再発までの期間は延長するものの、生存期間は延長させないことが判明し、新たな治療標的の出現が待たれている。

2. 研究の目的

本研究の目的は、神経膠芽腫の放射線化学療法に対する耐性に係わる分子を明らかにし、耐性克服に向けた創薬の礎を築くことである。

3. 研究の方法

治療前腫瘍組織を用いた解析

手術摘出され、-80度に保存された腫瘍組織サンプルからDNAを抽出し、以下の解析を行った。

Array CGHを用いた遺伝子コピー数解析

放射線治療単独で治療した58例の神経膠芽腫の初回摘出(照射前)

サンプルから抽出したDNAを対象として、Microarray-based comparative genomic hybridization (array-CGH)を用い、DNA修復に係わる遺伝子群(*BRCA1/2*, *RNF2/8*, *BMI1*, *MDC1*, *TtIP*, *Rad51*, *SetD2/7*, *53BP1*, *SrCC4/6*)の遺伝子コピー数変化を検証。

各遺伝子毎にコピー数変化の有無により症例を2群に分け、2群間で生命予後を比

較することで、放射線治療耐性に係わる遺伝子を抽出した。

次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析

放射線化学療法を施行した21例の神経膠芽腫の初回摘出(放射線化学療法前)のサンプルから抽出したDNAを対象として、Iron Torrent AmpliSeq Comprehensive Cancer Panelを用いた409癌関連遺伝子の遺伝子変異を行い、DNA修復関連遺伝子の遺伝子変異の頻度を確認した。

治療前後の腫瘍組織における遺伝子発現変化を用いた解析

(1) neo-adjuvant Chemo-radiotherapy

千葉県がんセンター倫理審査委員会の承認の元、neo-adjuvant Chemo-radiotherapyの第一相安全性試験を行った。

具体的には同意取得後2週間以内に定位的脳生検術で悪性神経膠腫の病理診断を確認。手術後可及的速やかにTMZを用いた化学療法を開始すると同時に、IMRTの治療計画作成を開始。IMRTは6.0Gyを12回照射とし、16日間で照射終了。照射終了時点までTMZ内服を継続し、照射終了後1週間以内に開頭腫瘍摘出術で腫瘍の摘出を行った。その後は、Adjuvant治療として4週間毎に5日間のTMZ治療を計12サイクルまたは腫瘍再発まで継続した。生検術ならびに放射線化学療法直後の開頭術で得られた腫瘍サンプルは-80度で保存した。

(2) neo-adjuvant Chemo-radiotherapy 前後の腫瘍サンプルの解析

neo-adjuvant Chemo-radiotherapyを施行した症例を対象に、診断確定目的で採取された治療前腫瘍サンプルと、放射線化学療法後開頭術で得られた治療直後の腫瘍サンプルのペアサンプルを対象として、RNAを抽出した後、RNAseqを用いた治療前

後の網羅的な遺伝子発現変化解析を行った。

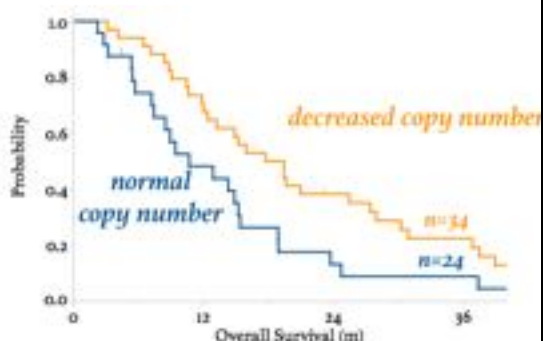
4. 研究成果

治療前の腫瘍組織を用いた解析結果

(1) 遺伝子コピー数変化

高頻度に遺伝子コピー数の減少を認められた遺伝子は、相同組換えに係わる *Rad51* 遺伝子 (56.9%) と、非相同末端結合に係わる *XRCC6* 遺伝子 (58.5%) だった。一方、放射線治療後の生命予後との関連をみると、*XRCC6* の遺伝子コピー数変化は生命予後に影響していなかったが、*Rad51* 遺伝子のコピー数減少は、有意に生命予後を改善していた (19.4m versus 8.9m, Hazard Ratio: 1.80 (95%CI: 1.03-3.09), $P=0.039$, 図 1)。

図 1



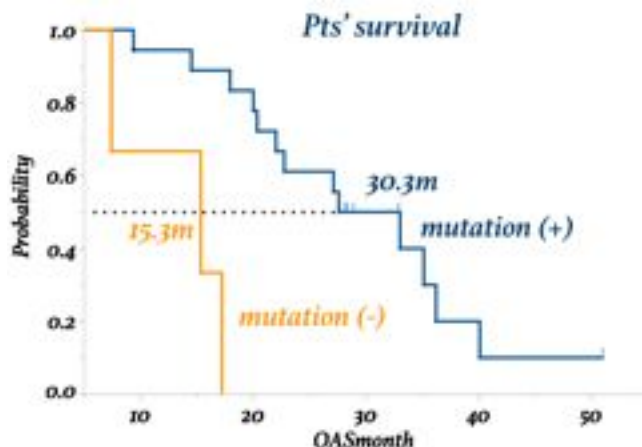
(2) 遺伝子遺伝子変異解析結果

21神経膠芽腫サンプルの解析から、56遺伝子の変異を確認した。

変異を認めた遺伝子の数は症例によって、0～8 遺伝子であり、遺伝子変異を全く認めなかった症例 (n=3) の生存期間中央値は15.3ヶ月と、少なくとも一つの遺伝子変異を認めた症例 (n=18) の30.3ヶ月と比較して有意に短かった ($P=0.0003$, 図 2)。

複数の症例で共通して認めた遺伝子変異は *TP53* (33%)・*FNI* (14%)・*mGlu8* (14%)・*PETN* (10%)・*PDGFRA* (10%)・*FLII* (10%)・*PKHDI* (10%)・*SYNE1* (10%) であった。

図 2



TCGAデータと比較すると TCGA で頻度の高かった top 20 遺伝子の内、*TP53*・*PTEN*・*EGFR*・*RB1*の遺伝子変異を今回の21症例の中でも確認された。

DNA修復関連遺伝子としては、*SYNE1*・*PARP1*遺伝子の変異を、ヒストン修飾関連遺伝子として *KMT2A*・*SETD2*・*ARID1A*の変異を認めた。

二つのDNA修復関連遺伝子 (*SYNE1*・*PARP1*) 変異のいずれかを有した症例の生存期間中央値 (未達) は、認めなかった症例 (25.0ヶ月) に比較して良好であったが、症例数が少なかったこともあり統計学的な有意差は認めなかった ($P=0.351$)。

治療前後の腫瘍組織を用いた解析結果

neo-adjuvant chemo-radiotherapy を施行した症例は6例。そのうち1例でRNAの品質低下により解析が困難であったため、5例のサンプルセットを用いて解析を行った。5例の主要な遺伝子情報としては、*IDH*は全例野生型、*MGMT*メチル化を3例で、*p53* 遺伝子蛋白強要性を2例で認めた。

放射線化学療法前と後で、有意な発現亢進を認めた遺伝子を3,106遺伝子認めた。これらの遺伝子の内、1例のみで差を認めた遺伝子は2,102個、2例で共通して差を認めた遺伝子は741個、3例で共通して差を認めた遺伝子は199個、4例で共通して差を認めた遺伝子は53個、5例全

てで共通して差を認めた遺伝子は11個だった。

DNA 2重鎖切断に対する遺伝子群では、症例に共通して発現亢進している遺伝子は認めなかった。

KEGG pathway analysis において、全例で治療前後での発現変化を認めた経路は、MPAK伝達経路・NF-kappa B伝達経路・HIF-1伝達経路・FoxO伝達経路・カルシウム伝達経路・cAMP伝達経路・cAMP-PKG伝達経路・PI3K-Akt伝達経路・サイトカイン-受容体・ECM-受容体・Phagosome・細胞周期・減数分裂・Apoptosis・p53伝達経路・細胞老化・局所粘着・Gap結合・補体凝固カスケード・Toll様受容体伝達経路・Nod様受容体伝達経路・IL17伝達経路・Chemokine伝達経路・Estrogen伝達経路・甲状腺ホルモン伝達経路・転写調節障害・MicroRNA・Proteoglycan・ウイルス発がん等であった。次にDNA修復に関連する遺伝子経路毎に遺伝の発現を検証した。

(1) Cell cycle arrest に関する遺伝子群

CDKN1A は全例で、また *MDM2* は60%の症例で治療による発現が亢進を認めた。

(2) P53 シグナル伝達経路の関与する遺伝子群

CDKN1A に加えて、DNA 修復ならびにDNA 障害予防に関与している *DDB2* の発現が全例で亢進していた。また、Apoptosis に関する *TNFRSF10B* の発現を60%の症例で認めた。

(3) 相 同 組 換 え (Homologous Recombination:HR) に関する遺伝子群

Rad51 は発現亢進を認めず、むしろ20%で発現が低下しており、*Rad52* も20%で発現が低下、*Rad54* も60%で発現が低下していた。その他、相同組換

えに関与する遺伝子群で共通して発現が亢進している遺伝子は認めなかった。

(4) 塩 基 除 去 修 復 (Base Excision Repair:BER) に関する遺伝子群

この経路に関連する遺伝子で、複数症例で発現が亢進を示すものは認めなかった。

(5) ヌ ク レ オ チ ド 除 去 修 復 (Nucleotide Excision Repair:NER) に関する遺伝子群

前述したように Global Genome Repair (GGR)に関する *DDB2* が全例で発現が亢進していた他、*CETN2* も40%の症例で発現が亢進していた。

一方、Transcription coupled repair に関する遺伝子群では治療前後での発現変化を認めなかった。

(6) DNA ミスマッチ修復に関する遺伝子群

この経路に関連する遺伝子で、複数症例で発現が亢進を示すものは認めなかった。

(7) Fanconi Anemia Pathway に関する遺伝子群

FANCI の発現低下を80%、*UBE2T* の発現低下を80%、*BLM* の発現低下を60%の症例で認めた。

5. 考察

本研究では、放射線化学療法に伴うDNA損傷からの修復機転に注目し、治療耐性の克服の標的となる分子の同定を試みた。まず、DNA double strand break repair に注目し、関連遺伝子の遺伝子コピー数変化と予後との関連の検証から、*Rad51*と*XRCC6* を候補分子として抽出した。

しかし、放射線化学療法前後の遺伝子発現の変化を解析すると、*Rad51*の発現は寧ろ低下しており、*FANCI* の発現低下がその一因と考えられ、Homologous Recombination は放射線化学療法における

治療耐性において主役を担ってはいない事が推測された。

一方、他の遺伝子修復関連経路を探索すると、*CDKN1A* の発現亢進が細胞周期をG1で止めて遺伝子修復の機会を与えたとえ、ヌクレオチド除去修復が*DDB2*の発現亢進によって進められていることが推測された。

これらの経路は、いずれも*p53*によって制御されているものと思われるが、元々の*p53*遺伝異常の有無に関わらずこれらの分子は発現が亢進しており、*p53*の制御によらず機能している可能性が高く、これらの分子が今後の放射線化学療法耐性克服に向けた分子標的となると思われた。

6. まとめ

放射線化学療法の耐性機序としては細胞周期チェックポイントにおける細胞周期停止と相同組換えや非同源末端結合が主役をなすと考えられているが、本研究により、*CDKN1A*による細胞周期停止は従来の予測通り重要な役割を担っているが、実際のDNA修復においては、ヌクレオチド除去修復が主に機能している可能性が高いことが推察された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

Luchi T., Hatano K, Uchino Y, Itami M, Hasegawa Y, Kawasaki K, Sakaida T, Hara R. Methionine Uptake and Required Radiation Dose to Control Glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 査読有り 2015;93(1):133-40.

Luchi T., Sugiyama T, Ohira M, Kageyama H, Yokoi S, Sakaida T, Hasegawa Y, Setoguchi T, Itami M. Clinical significance of the 2016 WHO classification in Japanese patients with gliomas. 査読有り *Brain Tumor Pathol.* 2018 ;35(2):71-80.

Luchi T., Kuwabara K, Matsumoto M, Kawasaki K, Hasegawa Y, Sakaida T.

Levetiracetam versus phenytoin for seizure prophylaxis during and early after craniotomy for brain tumours: a phase II prospective, randomised study. 査読有り *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2015 ;86(10):1158-62.

〔学会発表〕(計14件)

Toshihiko Luchi, Ryusuke Hara, Kazuo Hatano, Sana Yokoi, Makiko Itami, Seiichiro Hirono, Yuzo Hasegawa, Tsukasa Sakaida Synergic effect of high-dose irradiation and temozolomide on local control of MGMT unmethylated glioblastomas. *European Cancer Congress 2015/9/25~29 Vienna Poster*

T. Luchi, M. Ohira, K. Hatano, M. Itami, M. Saito, T. Sakaida, Y. Hasegawa, S. Hirono, R. Hara Chromosomal aberrations and expression levels of genes involved in DNA damage repair and their associations with survival of patients with glioblastoma after irradiation. *ASTRO2015 57th Annual Meeting San Antonio Poster*

Toshihiko Luchi, Kazuo Hatano, Ryusuke Hara, Sana Yokoi, Daisuke Ito, Seiichiro Hirono, Yuzo Hasegawa, Tsukasa Sakaida., Hypofractionated IMRT for GBMs ~ Tailor-made setting of treatment doses owing to MGMT-methylation status~ *The 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Okinawa. Japan 2016.04.10.-13. Oral*

T. Luchi, T. Sakaida, K. Hatano, M. Saito, Y. Hasegawa, S. Hirono, D. Ito, R. Hara. Changes in apparent diffusion coefficient by bevacizumab as a prognostic factor of patients with progressed GBMs after irradiation - a comparative study with methionine-uptake on PET-. *ASTRO (American Society of Therapeutic Radiation Oncology) 2016 58th Annual Meeting Boston, USA 2016.09.25-09.28 Poster*

Toshihiko Luchi, Kazuo Hatano, Ryusuke Hara, Makoto Saito, Daiki Setoguchi, Shiro Ikegami, Yuzo Hasegawa. Tailor-made setting of radiation doses

owing to the MGMT gene promoter methylation for the treatment of IDH-wildtype primary glioblastoma. ASTRO(American Society for Radiation Oncology) 2017 Annual Meeting. San Diego, USA, 2017.09.24.-27. Oral
Toshihiko Iuchi, Kazuo Hatano, Ryusuke Hara, Makoto Saito, Daiki Setoguchi, Yuzo Hasegawa, Tsukasa Sakaida. Tailor-made setting of radiation doses owing to the MGMT gene promoter methylation for the treatment of IDH-wildtype primary glioblastoma. The 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology. Osaka, Japan. 2017.10.29.-31. Oral
井内 俊彦, 幡野 和男, 河内 徹, 小玉卓史, 堺田 司, 長谷川 祐三, 廣野 誠一郎 Volumetric Modulated Arc Therapy (VMAT) による神経膠芽腫治療 ~ Static IMRT との比較検証 ~ 第24回日本定位放射線治療学会 2015年5月15日 長崎 口演
井内俊彦 大平美紀 横井左奈 伊丹真紀子 長谷川祐三 川崎宏一郎 堺田司 Mutation profiling of glioblastomas by targeted next-generation sequencing 第33回日本脳腫瘍病理学会 2015年5月29日~30日 シンポジウム
井内 俊彦, 原 竜介, 横井 左奈, 長谷川 祐三, 廣野 誠一郎, 伊東 大祐, 堺田 司 MGMT 非メチル化神経膠芽腫の局所制御に対する大線量照射とテモゾロミドの相乗効果 日本脳神経外科学会第74回学術総会 2015年10月14日~16日 札幌 口演
井内俊彦, 幡野和男, 大平美紀, 横井左奈, 廣野誠一郎, 長谷川祐三, 堺田司 1, 原竜介 膠芽腫のゲノム解析と放射線療法の展望 第53回日本癌治療学会学術集会 2015年10月30日 京都 シンポジウム
井内 俊彦, 瀬戸口大毅, 池上史郎, 長谷川祐三 神経膠芽腫に対するペバシズマブの生命予後改善効果 ~ 通常照射と寡分割大線量 IMRT 症例における効果の違い ~ 日本脳神経外科学会第75回学術総会 2016.09.28.-10.01. 福岡 口演
T. Iuchi, T. Sugiyama, S. Yokoi, M. Itami, D. Setoguchi, S. Ikegami, Y. Hasegawa. Clinical Significance of new WHO classification of gliomas. 第35回日本脳腫瘍病理学会 宇都宮

2017.05.19.-20. シンポジウム
井内 俊彦, 幡野 和男, 原 竜介, 斉藤真, 瀬戸口 大毅, 長谷川 祐三, 堺田司 IDH野生型初発神経膠芽腫治療に対する放射線治療 ~MGMT メチル化に基づく個別化線量設定~ 日本脳神経外科学会第76回学術総会 名古屋 2017.10.12.-14. シンポジウム
井内俊彦, 瀬戸口大毅, 長谷川祐三, 堺田司 神経膠腫におけるてんかん発症の診断的価値 第35回日本脳腫瘍学会学術集会 高松 2017.11.26.-28

〔図書〕(計2件)

Toshihiko Iuchi Chapter 7:Brain Tumor: How Should We Manage Glioblastoma in the Era of IMRT? Intensity Modulated Radiation Therapy. Clinical evidence and techniques. Springer 2015 分担執筆

井内俊彦 IX 脳腫瘍の治療 3. 脳腫瘍の放射線治療 (2) IMRT/VMAT 脳腫瘍学 577-582 日本臨床 2016 分担執筆

〔産業財産権〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

井内 俊彦 (IUCHI Toshihiko)

千葉県がんセンター・脳神経外科・部長

研究者番号: 80370881