

令和元年9月6日現在

機関番号：17601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10763

研究課題名(和文)毛様細胞性星細胞腫における増殖血管内皮の起源の解明

研究課題名(英文)Origin of the microvascular proliferation in pilocytic astrocytoma

研究代表者

竹島 秀雄(takeshima, hideo)

宮崎大学・医学部・教授

研究者番号：70244134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：増殖血管内皮細胞(MVP)の一部が腫瘍細胞由来である仮説を検証するために、KIAA-BRAF融合遺伝子を腫瘍マーカーとして毛様細胞性星細胞腫(PA)6例を解析した。3例で融合遺伝子が確認され、breakpointを決定した。次に、Laser microdissection法にて増殖血管内皮を採取し、Digital PCR法で融合遺伝子の存在を解析した。MVP内に占める腫瘍細胞の割合は、腫瘍本体と比べ25-65%と高率であった。FISHでMVP内に融合遺伝子を示す蛍光シグナルを検出した。以上より、PAのMVPの起源に腫瘍細胞が関与していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、悪性グリオーマにしばしば見られる血管内皮増生が、良性星細胞腫である毛様細胞性星細胞腫に何故存在するかという疑問に対して、そのメカニズムを解明した研究である。本研究の成果は、腫瘍血管が正常の血管内皮のみならず、腫瘍細胞の形質転換が関与することを示す、腫瘍生物学的に重要な発見であるとともに、血管新生療法での治療経過中、腫瘍が耐性を獲得するに到る機序の1つとして、この現象の関与が示唆されるものであり、耐性克服に向けての新たな治療法の開発への足がかりとなるものである。

研究成果の概要(英文)：To determine whether microvascular proliferation (MVP) in Pilocytic astrocytoma (PA) contained tumor-derived cells, we used the KIAA1549-BRAF fusion gene as a marker. The breakpoint was identified by Sanger sequencing. Distinct tumor cells and cellular components of MVP were obtained by laser microdissection. For the qualitative and quantitative detection of the fusion gene, we performed digital PCR assays and fluorescence insitu hybridization (FISH). Samples from three PA patients harbored the KIAA1549 exon 15, BRAF exon 9 fusion gene. In two patient, digital PCR showed that vis-a-vis tumor tissue, its relative expression in cellular components of MVP was 42% in one- and 76% in another sample. FISH revealed amplified signals in both tumor cells and cellular components of MVP indicative of tandem duplication. Our findings suggest that in patients with PA, some cellular components of MVP contained tumor derived cell.

研究分野：脳神経外科

キーワード：microvascular proliferation KIAA-BRAF fusion gene pilocytic astrocytoma microdissection mesenchymal transition

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は、全固形がんの中で最も悪性で予後の悪い腫瘍の1つである。その理由は、1)中枢神経系に発生し、浸潤性に進展するため、外科的切除により機能を温存した肉眼的全摘出が困難であること、2)血管豊富な腫瘍であり、摘出自体にリスクが伴うこと、3)放射線照射に多少の感受性はあるものの、脳の耐容線量の範囲内では、その抵抗性のため根治には至らないこと、4)化学療法においては、血液脳関門の存在により腫瘍に到達可能な抗がん剤が限られること、などの要因が挙げられる。

それでも、近年新規アルキル化剤 Temozolomide の登場により、全生存期間中央値は1年から16ヶ月まで延長した。これに加えて、豊富な栄養血管をターゲットとする分子標的治療薬：VEGF2のヒト型化抗体 bevacizumab が本邦でも承認され、更なる生存期間の延長が期待された。しかし、予想に反して、2つの独立した無作為割付け第3相臨床試験(RTOG0825, Avaglio 試験)において無増悪生存期間は延長をみたまもの、全生存期間においては、統計学的有意差をもった延長効果を示さなかった。

そのメカニズムとして、従来 VEGF のみの抑制では、その他の増殖因子シグナルを介した血管内皮細胞の増殖が代償することが考えられてきた。しかし、これに加えて、腫瘍細胞自体が mesenchymal transition により、腫瘍細胞由来の microvascular proliferation (MVP) を供給する可能性が指摘された。また、この腫瘍由来の MVP の増殖は、正常血管内皮とは異なり VEGF とは異なるシグナル伝達系により制御されているため、bevacizumab 抵抗性の原因により深く関わっている可能性がある。

この可能性を検証するため、我々は p53 を腫瘍細胞マーカーとして、免疫組織化学的に 61例の膠芽腫(GBM)を解析した。陽性率 10%を cut-off として p53 陽性腫瘍と定義したところ、46例の腫瘍がこれに分類された。次に、この 46例の腫瘍組織の MVP に焦点を当て、MVP のうち 50%以上の細胞で p53 陽性を示すものを検索したところ、3例(4.9%)でこれに該当する所見が得られた。Laser microdissection で遺伝子異常を確認したが、もとの腫瘍の遺伝子異常と完全に一致した(Kawasoe et al., JNS, 2015)。即ち、GBM においては、腫瘍自らが作り出した血管内皮が、antiangiogenic therapy に対する治療抵抗性に関与する可能性が示唆された。

ここで、WHO grade 1 の良性腫瘍であるにもかかわらず、形態学的に酷似した MVP を有する脳腫瘍に毛様細胞性星細胞腫, pilocytic astrocytoma (PA) がある。最大の好発部位である小脳発生の腫瘍は、摘出は比較的容易であり、全摘出できれば治癒さえ望める腫瘍である。しかし、もう1箇所の好発部位である視神経-視床下部腫瘍においては、機能温存と全摘出を両立することは困難であり、現在 carboplatin と vincristine を組み合わせた長期間化学療法を繰り返すことで、腫瘍の増大を防ぐことがゴールドスタンダードとなっている。

ここで毛様細胞性星細胞腫(PA)は、GBM と同様非常に vascular rich な腫瘍であることを考えると、bevacizumab の併用により治療効果を高めることが期待され、海外に於いてはその併用療法の試みも始まっている。

2. 研究の目的

本研究では良性腫瘍である PA において、GBM で指摘されている antiangiogenic therapy に対する抵抗性メカニズムとなり得る mesenchymal differentiation が存在するかを、これまでに我々が GBM で培った手法を適用することで、検証することが最大の目的である。また、その過

程に於いて、PA の約半数で見られる KIAA1549-BRAF 融合遺伝子の検出法として、通常用いられている cDNA からの DNA シークエンス解析以外に、染色体 DNA を材料とした簡便な検出法を確立したい。この方法により、凍結組織のみならず、古いパラフィン包埋切片からの遺伝子異常の検出も容易となる。

3 . 研究の方法

(1) 形態学的解析

毛様細胞性星細胞腫に見られる microvascular proliferation (MVP) は形態上、GBM のそれと酷似している。良性の神経膠腫において、例外的に MVP が存在する腫瘍として知られる。

予備研究として、免疫組織化学的 (IHC) に GBM に見られる MVP との相違を生物学的および機能的側面から比較検証する。

(2) KIAA1549-BRAF 融合遺伝子の簡易検出法の開発

毛様細胞性星細胞腫 (PA) の約 50% の腫瘍で KIAA1549-BRAF 融合遺伝子が driver mutation として存在することが報告されている。これを腫瘍細胞のマーカーとして利用するために、簡易検出法を開発し、正常細胞由来の血管内皮とを明確に鑑別する (GBM で用いた p53 の手法を応用するため)

パイロット実験として、PA の凍結組織から cDNA を合成し、PCR にて融合遺伝子の存在を確認。融合遺伝子の部位は 4 タイプで 98% をカバーしているため (図 1 参照) genomic DNA より検出するプライマーセット 4 組を設定する。(予備実験で効率的な検出を確認する)

また、融合遺伝子の存在を簡便に検出するべく、KIAA1549 (exon 15, 16), BRAF (Exon 9, 11) のプライマーを用いて intron ごと増幅する LA-PCR 法を開発する。

各症例で増幅された融合遺伝子の breakpoint を Sanger sequence で決定し、これを検出する特異的プライマーセットを作成する。

パラフィン包埋切片より MVP を LMD にて分離し (図 2) これら細胞が正常由来か腫瘍細胞由来かを確定する。特異的 primer を用いた PCR および、次世代シーケンサーで微量の遺伝子変異の混在を確認する (digital PCR)。

融合遺伝子の存在を組織学的に検出するため、FISH を用いて解析する。

4 . 研究成果

宮崎大学にて手術を行った毛様細胞性星細胞腫 6 症例を解析した。凍結保存された腫瘍サンプルより合成した cDNA を用いて RT-PCR を行い KIAA-BRAF 融合遺伝子の存在を解析すると、6 症例中 3 症例で KIAA15-BRAF9 の融合遺伝子が確認された。次に、染色体 DNA を用いて、LA-PCR を行い融合遺伝子を長い領域ごと増幅し、Sanger sequence にて各症例に固有の遺伝子 breakpoint の塩基配列を決定し、近傍に腫瘍特異的マーカーとしてのプライマーを個別に設計した。次に、パラフィン包埋切片から LCM (laser microdissection) 法にて腫瘍細胞および増殖血管内皮細胞塊を別々に採取し、先のステップで決定した breakpoint 近傍に primer を設計し、RT-PCR および Digital PCR 法で融合遺伝子の存在を解析したところ、MVP 内に占める腫瘍細胞の割合は、腫瘍本体と比較して 25-65% とかなり高い割合であった。最後に FISH を行い、MVP 内に腫瘍細胞特異的な蛍光のシグナルを証明し、仮説である毛様細胞性星細胞腫における増殖血管内皮の起源に腫瘍細胞が関与していることを実証した。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

山下真治、竹島秀雄 他 10 名

Detection of the KIAA1549-BRAF fusion gene in proliferating vascular cells in pilocytic astrocytoma.

PLOS ONE 14 (7) : e0220146. 1-13 , 2019 年 [査読有]

〔学会発表〕(計 1 件)

山下真治、竹島秀雄 他 6 名

Pilocytic astrocytoma の microvascular proliferation (MVP) は腫瘍由来の細胞を混じている
第 19 回日本分子脳神経外科学会 , 2018 年

〔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〕

6 . 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名 : 横上 聖貴

ローマ字氏名 : yokogami kiyotaka

所属研究機関名 : 宮崎大学

部局名 : 医学部

職名 : 准教授

研究者番号 (8 桁) : 40284856

研究分担者氏名 : 山下 真治

ローマ字氏名 : yamashita shinji

所属研究機関名 : 宮崎大学

部局名 : 医学部

職名 : 助教

研究者番号 (8 桁) : 40468046

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。