

令和元年5月23日現在

機関番号：24303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10766

研究課題名(和文) 神経膠腫のトランスクリプトーム解析を基盤としたバイオマーカー・分子標的創薬研究

研究課題名(英文) A search for molecular targets of gliomas based on transcriptome analysis

研究代表者

早野 あづさ (Hayano, Azusa)

京都府立医科大学・医学(系)研究科(研究院)・研究員

研究者番号：10379018

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)：初発の神経膠腫腫瘍組織からRNAを抽出して、RNA-seq解析を行った。また、TCGAデータベースから神経膠芽腫症例の遺伝子発現情報を取得して統計学的手法により解析した結果、Th1-T細胞およびTh2-T細胞の状態をスコア化する計算式を導出することに成功した。神経膠芽腫においてはPD-L1/PD-1がん免疫機構に關与する遺伝子発現情報だけでは予後予測が難しいが、これらの遺伝子発現情報に加え、T細胞の状態(Th1, Th2)をスコア化して評価することで初めて予後予測が可能となることがわかった。さらに、免疫チェックポイント分子の中で神経膠芽腫症例の予後と關係する遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は神経膠腫のトランスクリプトーム解析を基盤とした悪性神経膠腫の新たなバイオマーカー、分子標的創薬の展開を目指したトランスレーショナル研究である。本研究により悪性神経膠腫の診断学・治療学のbreak-throughをもたらす期待がある。

研究成果の概要(英文)：We analyzed RNA sequence data on several glioma tissues. We also conducted expression profiling of immuno-related gene using data of 158 glioblastoma multiforme (GBM) patients with clinical information available at The Cancer Genome Atlas. The results revealed that Th1HighTh2Low and Th1LowTh2Low statuses indicated better prognosis than Th1HighTh2High, and were evaluated based on the down regulation of PD-L1, PD-L2, and PD-1. These results suggest that low Th2 balance and low activity of the PD-L1/PD-1 axis predict good prognosis in GBM. Furthermore, CD276 expression and the gene signature composed of GATA3 and LGALS3 are effective for prognosis in GBM and will help us understanding target pathways for immunotherapy in GBM.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：glioma RNA seence prognosis molecular target

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

### 1. 研究開始当初の背景

高速シーケンシング技術の進歩により、がんを含めたヒトゲノムの大量解読がようやく実現可能となり、これまで明らかにされていなかった新しいがん関連遺伝子の発見やがんゲノムの詳細な理解が進んでいる。がんにおける体細胞突然変異には様々なものが知られており、点突然変異・染色体コピー数変化・染色体再構成といったものがある。最近、肺がんにおいてEML4-ALK fusion, KIF5B-RET fusionなどの染色体再構成による融合遺伝子の存在が明らかにされ、それらのキナーゼ活性を抑制する分子標的薬の開発が進められている。また、長鎖非コードRNA(lncRNAs)・短鎖非コードRNA(small ncRNAs)などと細胞分化やがんとの関連が徐々に明らかにされ注目されている。

神経膠腫の高速シーケンサーによる遺伝子解析は国際的にはTCGA, ICGC を中心に進められている。しかしながら、エクソーム解析が主体であるため、トランスクリプトーム(RNA-Seq)解析はそれほど行われていない現状がある。神経膠腫に対する再構成遺伝子の報告に関してはEGFR, BRAF, neurotrophin receptor genes などに限られるが、さらに多くの種類があるものと推察される。

また近年、非コードRNA に関しては短鎖miRNA の知見が集積しており、がん組織や血清中のmiRNAを用いた診断法の探索の報告も見られる。従来、腫瘍組織中や血清中のmiRNAの定量はマイクロアレイ法やPCR法を用いて行われてきたが、これらの方法では新規のmiRNAの探索は不可能であり、マイクロアレイ法ではデータの定量性に問題点があった。従って今後は、高速シーケンサーで正確に定量したデータの集積と新規miRNAの探索が必要である。一方で、がんとlncRNAの関連に関する研究はこれからの研究領域である。非コードRNAに関する知見の集積は神経膠腫に対する新規の診断・治療法の開発のためにも今後必須の研究課題であると考えられる。

### 2. 研究の目的

神経膠腫の腫瘍組織および幹細胞の高速シーケンサーを用いたトランスクリプトーム(RNA-Seq)解析を行う。神経膠腫のサブタイプ別、初発・再発神経膠腫の腫瘍組織および神経膠腫幹細胞の疾患特異的融合遺伝子・lncRNA(長鎖非コードRNA)・small ncRNA(短鎖非コードRNA)を探索し、新たな診断技術・分子標的療法の開発を目指す。また、神経膠腫患者の髄液・血清中の疾患特異的な非コードRNAも探索する。神経膠腫の融合遺伝子・lncRNA・small ncRNA 解析に関しては、未知の領域であり研究の意義が高い。

### 3. 研究の方法

高速シーケンサーを用いて、神経膠腫の腫瘍組織RNAのトランスクリプトーム解析を行う。神経膠腫のサブタイプ別、初発・再発神経膠腫の腫瘍組織および神経膠腫幹細胞で特異的に発現している融合遺伝子や非コードRNAなどの新規転写産物の同定を行う。疾患特異的なマーカーを探索し、この分子を標的とする新たな診断技術・分子標的療法の開発を目指す。

### 4. 研究成果

高速シーケンサーを用いて神経膠腫のトランスクリプトーム解析を行い、神経膠腫のサブタイプ別、初発・再発神経膠腫組織や神経膠腫幹細胞に特異的に発現している融合遺伝子やlncRNA・small ncRNAを含む非コードRNAなどの新規転写産物の同定および新規・既知の転写産物の定量を行い、疾患特異的なマーカーを探索し、これらの分子を標的とする新たな診断技術・分子標的療法の開発を目指す。現在までに初発の神経膠腫腫瘍組織12例からRNAを抽出して、RNA-seq解析を行った。Poly(A)選択後にcDNAを合成し、シーケンシングを行うが、ncRNAの解析のためにはRibo Minus Eukaryote Kit for RNA-SeqによりリボソームRNAを除去して、Poly(A)選択を使わないRNA-seq解析を行った。Small RNAの解析のためにはSmall RNAライブラリーを作成し、高マルチプレックスプロファイリング解析を行っている。現在、データ解析を進めている。

公共データベース(TCGA: <https://cancergenome.nih.gov/>)から神経膠腫症例の遺伝子発現情報を取得して統計学的手法により解析した結果、Th1-T細胞およびTh2-T細胞の状態をスコア化する計算式を導出することに成功した。神経膠腫においてはPD-L1/PD-1がん免疫機構に関与する遺伝子発現情報だけでは予後予測が難しいが、これらの遺伝子発現情報に加え、T細胞の状態(Th1, Th2)をスコア化して評価することで初めて予後予測が可能となることがわかった。さらに、免疫チェックポイント分子の中で神経膠腫症例の予後と関係する遺伝子を同定した。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計23件)

1. Tamura S, Sakaguchi K, Yamanaka R. Concerns and return to work in patients with breast cancer receiving outpatient chemotherapy: A pilot study. *Asia Pac J Oncol Nurs* 6(2):187-192, 2019.  
doi: 10.4103/apjon.apjon\_58\_18.
2. Yamanaka R, Hayano A, Takashima Y: Trilateral retinoblastoma: a systematic review of 211 cases. *Neurosurg Rev* 42(1):39-48, 2019.  
doi: 10.1007/s10143-017-0890-4.
3. Takashima Y, Kawaguchi A, Iwadate Y, Hondoh H, Fukai J, Kajiura K, Hayano A and Yamanaka R.

MicroRNA signature constituted of miR-30d, miR-93, and miR-181b is a promising prognostic marker in primary central nervous system lymphoma. *PLoS One* 14(1):e0210400, 2019.

doi: 10.1371/journal.pone.0210400.

4. Hayano A, Takashima Y, Yamanaka R. Cell-type specific sensitivity of bortezomib in the methotrexate-resistant primary central nervous system lymphoma cells. *Int J Clin Oncol* 2019, [Epub ahead of print]

doi: 10.1007/s10147-019-01451-9.

5. Takashima Y, Kawaguchi A, Hayano A, Yamanaka R. CD276 and the gene signature composed of GATA3 and LGALS3 enable prognosis prediction of glioblastoma. *PLoS One* 14(5):e0216825, 2019.

doi: 10.1371/journal.pone.0216825.

6. Yamanaka R, Hayano A, Kanayama T: Radiation-induced gliomas: A comprehensive review and meta-analysis. *Neurosurg Rev* 41(3):719-731, 2018.

doi: 10.1007/s10143-016-0786-8.

7. Yamada C, Iwawaki Y, Harada K, Fukui M, Morimoto M, Yamanaka R. Frequency and risk factors for subsyndromal delirium in an intensive care unit. *Intensive Crit Care Nurs* 47:15-22, 2018.

doi: 10.1016/j.iccn.2018.02.010.

8. Takashima Y, Kawaguchi A, Kanayama T, Hayano A, Yamanaka R. Correlation between lower balance of Th2 helper T-cells and expression of PD-L1/PD-1 axis genes enables prognostic prediction in patients with glioblastoma. *Oncotarget* 9(27), 19065-19078, 2018.

doi: 10.18632/oncotarget.24897.

9. Takashima Y, Sasaki Y, Hayano A, Homma J, Fukai J, Iwadate Y, Kajiwara K, Ishizawa S, Hondoh H, Tokino T, Yamanaka R. Target amplicon exome-sequencing identifies promising diagnosis and prognostic markers involved in RTK-RAS and PI3K-AKT signaling as central oncopathways in primary central nervous system lymphoma. *Oncotarget* 9(44):27471-27486, 2018.

doi: 10.18632/oncotarget.25463.

10. Miyasato Y, Takashima Y, Takeya H, Yano H, Hayano A, Nakagawa T, Makino K, Takeya M, Yamanaka R, Komohara Y. The expression of PD-1 ligands and IDO1 by macrophages/microglia in primary central nervous system lymphoma. *J Clin Exp Hematop* 58(2):95-101, 2018.

doi: 10.3960/jslrt.18001.

11. Yamanaka R, Morii K, Shinbo Y, Sano M, Homma J, Tsuchiya N, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Tamura T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, and Fujii Y : Late relapse of primary central nervous system lymphoma. *Leukemia Lymphoma* 58(2):475-477, 2017.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27397141>

12. Yamanaka R, Morii K, Sano M, Homma J, Yajima N, Tsukamoto Y, Ogura R, Natsumeda M, Aoki H, Akiyama K, Saitoh T, Hondoh H, Kawaguchi A, Takahashi H, and Fujii Y : Long-term survivors of primary central nervous system lymphoma. *Jpn J Clin Oncol* 47(2), 101-107, 2017.

doi: 10.1093/jjco/hyw171.

13. Ma C, Horlad H, Pan C, Yano H, Ohnishi K, Fujiwara Y, Matsuoka M, Lee A, Niidome T, Yamanaka R, Takeya M, Komohara Y. Stat3 inhibitor abrogates the expression of PD-1 ligands on lymphoma cell lines. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology* 57(1):21-25, 2017.

doi: 10.3960/jslrt.17006.

14. Fujimoto S, Iwawaki Y, Takishita Y, Yamamoto Y, Murota M, Yoshioka S, Hayano A, Hosokawa T, Yamanaka R. Effects and safety of mechanical bathing as a complementary therapy for terminal stage cancer patients from the physiological and psychological perspective: A pilot study. *Jpn J Clin Oncol* 47(11):1066-1072, 2017.

doi: 10.1093/jjco/hyx122.

15. Hayano A, Komohara Y, Takashima Y, Takeya H, Homma J, Fukai J, Iwadate Y, Kajiwara K, Ishizawa S, Hondoh H and Yamanaka R. Programmed Cell Death Ligand 1 Expression in Primary Central Nervous System Lymphomas: A Clinicopathological Study. *Anticancer Res* 37(10):5655-5666, 2017.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28982883>

16. Yamanaka R, Hayano A: Secondary glioma following acute lymphocytic leukemia: Therapeutic implications. *Neurosurg Rev* 40(4):549-557, 2017.

doi: 10.1007/s10143-016-0733-8.

17. Yamanaka R, Hayano A, Kanayama T: Radiation-induced meningiomas: an exhaustive review of the literature. *World Neurosurg* 97:635-644, 2017.

doi: 10.1016/j.wneu.2016.09.094.

18. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced sarcomas of the central nervous system: a systematic review. *World Neurosurg* 98:818-828, 2017.

doi: 10.1016/j.wneu.2016.11.008.

19. Yamanaka R, Hayano A: Secondary craniofacial sarcomas following retinoblastoma: a systematic review. *World Neurosurg* 101:722-730.e4, 2017.

doi: 10.1016/j.wneu.2017.02.031.

20. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced schwannomas and neurofibromas: a systematic review. *World Neurosurg* 104:713-722, 2017.

doi: 10.1016/j.wneu.2017.05.066.

21. Yamanaka R, Hayano A: Radiation-induced malignant peripheral nerve sheath tumors: a systematic review. *World Neurosurg* 105:961-970.e8, 2017.

doi: 10.1016/j.wneu.2017.06.010.

22. Yamanaka R, Abe E, Sato T, Hayano A and Takashima Y. Secondary Intracranial Tumors Following Radiotherapy for Pituitary Adenomas: A Systematic Review. *Cancers (Basel)* 9(8); 1-16, 2017.

doi: 10.3390/cancers9080103.

23. Nakajima S, Morii K, Takahashi H, Fujii Y, Yamanaka R: Prognostic significance of S-phase fractions in peritumoral invading zone analyzed by laser scanning cytometry in patients with high-grade glioma (preliminary study). *Oncol Lett* 11:2106-2110, 2016.

<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4774597/>

#### 〔学会発表〕(計 13 件)

1. Tamura S, Hayama Y, Mitsuki S, Sakaguchi K, Yamanaka R. Relationship Between Stress and Saliva Biomarkers in Breast Cancer Patients Receiving Outpatient Chemotherapy The Asian Conference on Psychology & The Behavioral Sciences. Kobe, March 22-24, 2018.

2. 高島康郎, 佐々木泰史, 早野あづさ, 本間順平, 深井順也, 岩立康男, 梶原浩司, 石澤伸, 本道洋昭, 時野隆至, 山中龍也. 中枢神経系原発悪性リンパ腫における Ion Reporter エクソームシーケンシングによる分子マーカー候補の同定. 第 77 回日本癌学会学術集会, 大阪市, 9 月 27 日-29 日, 2018.

3. 早野あづさ, 高島康郎, 山中龍也. メトトレキサート耐性中枢神経原発悪性リンパ腫細胞株の樹立およびボルテゾミブ感受性の検討. 第 77 回日本癌学会学術集会, 大阪市, 9 月 27 日-29 日, 2018.

4. 塚久美子, 岩脇陽子, 滝下幸栄, 越智幾世, 河野留美, 金沢元洪, 石川剛, 田口哲也, 山中龍也. 外来化学療法を受けているがん患者の就労別の気がかりとストレス. 第 56 回日本癌治療学会学術集会, 横浜市, 10 月 18 日-20 日, 2018.

5. Takashima Y, Yoshimura T, Kano Y, Hayano A, Hondoh H, Ikenaka K, Yamanaka R. Expression analysis of N-oligosaccharides of glycoproteins in methotrexate-resistant central nervous system lymphoma cell lines. 第 41 回日本分子生物学会年会, 横浜市, 11 月 28 日-30 日, 2018.

6. Tamura S, Mitsuki S, Sakaguchi K, Yamanaka R. Anxiety and return to work in breast cancer patients receiving outpatient chemotherapy. The Asian Conference on Psychology & The Behavioral Sciences. Kobe, March 22-25, 2017.

7. 藤本早和子, 岩脇陽子, 滝下幸栄, 山本容子, 室田昌子, 吉岡さおり, 細川豊史, 山中龍也. 終末期がん患者に対する機械浴の生理的・心理的な影響についての予備的研究. 第 22 回日本緩和医療学会, 横浜市, 6 月 23 日-24 日, 2017.

8. 山中龍也, 早野あづさ, 藤井幸彦. 脳リンパ腫の長期生存例の検討. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 神戸市, 7 月 27 日-29 日, 2017.

9. 吉田健一, 越智陽太郎, 白石友一, 磯部知弥, 千葉健一, 田中洋子, 岡田愛, 早野あづさ, 奥野友介, 鈴木啓道, 宮野悟, 山中龍也, 小川誠司. 中枢神経原発悪性リンパ腫の統合的解析. 第 76 回日本癌学会学術集会, 横浜市, 9 月 28 日-30 日, 2017.

10. 早野あづさ, 菰原義宏, 高島康郎, 本間順平, 深井順也, 岩立康男, 梶原浩司, 石澤伸, 本道洋昭, 山中龍也. 脳原発および転移性脳悪性リンパ腫における Programmed Cell Death Ligand 1 発現の検討. 第 76 回日本癌学会学術集会, 横浜市, 9 月 28 日-30 日, 2017.

11. 高島康郎, 川口淳, 金山知彦, 早野あづさ, 山中龍也. がん免疫療法のターゲットとなる分子と予後との関連の解析. 第 40 回日本分子生物学会年会, 神戸市, 12 月 6 日-8 日, 2017.

12. 吉田健一, 千葉健一, 奥野友介, 垣内伸之, 鈴木啓道, 白石友一, 田中洋子, 村垣善浩, 椎名隆, 宮野悟, 千葉滋, 山中龍也, 小川誠司. 中枢神経原発悪性リンパ腫におけるゲノム異常の全貌. 第 75 回日本癌学会学術集会, 横浜市, 10 月 6 日-8 日, 2016.

13. Yoshida K, Shiraiishi Y, Chiba K, Okuno Y, Nakamoto-Matsubara R, Koriyama S, Yoshizato T, Shiozawa Y, Kataoka K, Ueno H, Takeda J, Tanaka H, Hayano A, Homma J, Fukai J, Kajiwaru K, Ideguchi M, Komohara Y, Yajima N, Tsuchiya N, Sano M, Nitta M, Muragaki Y, Sakata-Yanagimoto M, Iwadate Y, Hondoh H, Miyano S, Chiba S, Yamanaka R and Ogawa S: Whole-Genome Sequencing of Primary Central Nervous System Lymphoma and Diffuse Large B-Cell Lymphoma. 58th ASH Annual Meeting and Exposition. San diego, CA, December 3-6, 2016.

#### 〔図書〕(計 3 件)

1. Kanayama T, Hayano A, Yamanaka R: MICRORNAS REGULATION AND PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. PP 81-98, In Yamanaka R (ed.), *Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes*, Nova Science Publishers, NY, 2016.

2. Yamanaka R: SALVAGE THERAPY FOR PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. pp 175-187, In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, 2016.
3. Yamanaka R, Yoshioka S, Fujimoto S, Iwawaki Y: LONG-TERM OUTCOME AND SUPPORTIVE CARE IN PATIENTS WITH PRIMARY CENTRAL NERVOUS SYSTEM LYMPHOMA. pp 285-291, In Yamanaka R (ed.), Primary Central Nervous System Lymphoma (PCNSL): Incidence, Management and Outcomes, Nova Science Publishers, NY, 2016.

〔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

<http://www.f.kpu-m.ac.jp/c/kouza/igaku/>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

山中 龍也 (Ryuya YAMANAKA)  
京都府立医科大学・医学部・教授  
研究者番号：20323991

川口 淳 (Atsush KAWAGUCHI)  
佐賀大学・医学部・教授  
研究者番号：6038919

池中 一裕 (Kazuhiro IKENAKA)  
生理学研究所・分子神経生理部門・教授  
研究者番号：00144527

### (2)研究協力者

高島 康廊 (Yasuo Takashima)  
岩立 康男 (Yasuo Iwadate)  
吉田 健一 (Kenichi Yoshida)  
鈴木 孝禎 (Takayoshi Suzuki)