

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82406

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10882

研究課題名(和文) 頭蓋内胚細胞腫瘍に特異的な遺伝子変異の機能解析と新規分子標的治療の開発

研究課題名(英文) Identification of novel oncogenic mutations of a molecule which are specifically occurred in and regulate oncogenicity of intracranial non-germinomatous germ cell tumors

研究代表者

富山 新太(Tomiya, Arata)

防衛医科大学校(医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院 脳神経外科・講師)

研究者番号：40385810

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋内胚細胞腫瘍(iGCT)は全世界の中でも本邦で特に多く発症するが、その発癌や悪性化に関わる分子メカニズムに関しては今まで明らかにされていなかった。我々は日本全国より集められた症例サンプルを解析した結果、iGCTの中でも高悪性度である非ジャーミノーマ胚細胞腫群(NGGCT)でのみ変異を認める分子を同定し、その変異によって2つのNGGCT細胞株の悪性化が増強することを明らかにした。更にこれらの細胞株を用いた動物モデルにおいても、この変異遺伝子の腫瘍造成/腫瘍悪性化への関与が示された。従って、今回我々はNGGCTのドライバー変異の一つを初めて明らかにすることが出来たと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界中でも特に日本で多く発症し、現在においても極めて予後不良であるNGGCTで特異的に変異を起こしている遺伝子と、その産生分子により活性化されるNGGCT細胞における発がん分子シグナルを同定したことにより、これまで特に日本人で大きな問題となっていた難治性疾患に対する初めての治療法開発に繋がる可能性があると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Intracranial germ cell tumors (CNS GCTs) frequently occur in Japan among all over the world. However, the molecular mechanisms which regulate malignancy of iGCTs are not well-elucidated yet. We analyzed the samples of iGCTs from all over Japan and discovered a novel molecule which was specifically frequently mutated in the non-germinomatous germ cell tumors (NGGCTs) among iGCTs. In addition, this mutated molecule upregulated the malignancy of two NGGCT cell lines in vitro. Furthermore, in vivo model using same NGGCT cells also revealed contribution of this mutated molecule in oncogenicity of these cells. Collectively, we concluded a novel NGGCT-specific oncogenic driver gene, which would be a novel therapeutic target of NGGCTs, was identified.

研究分野：脳神経外科学、脳腫瘍学、分子生物学

キーワード：頭蓋内胚細胞腫瘍 非ジャーミノーマ胚細胞腫瘍 USP28 ユビキチン化 MEK1/2

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、研究者個人に帰属します。

### 1. 研究開始当初の背景

頭蓋内胚細胞腫瘍 (iGCT) は主に AYA 世代に認められる希少頭蓋内悪性腫瘍であり、その発症頻度は稀ではあるものの、全世界の地域別の発症症例数としては特に本邦を含む東アジア地域に多いことが知られている。iGCT はその組織学的悪性度に応じて 5 つの組織亜系に分類されるが、組織学的に最も低悪性度である胚腫 (germinoma) は放射線化学療法に対して多くの場合は反応があり、次に低悪性度である mature teratoma (成熟奇形腫) は手術で全摘出が行われれば同様に比較的予後良好とされているが、それらよりも組織学的に高悪性度である亜系群 (non-germinomatous germ cell tumors; NGGCTs) に対しては未だに有効な治療法が存在せず、その治療予後は現在に至っても極めて不良である。したがって、本邦での発症頻度が世界的にみても高いことも相まって、NGGCT に対する新規治療法の開発は急務であると考えられるが、絶対的な症例数は他の腫瘍と比較して少ないということもあり、NGGCT の発癌や悪性化に関わる遺伝子変異や分子メカニズムに関する研究は、これまで殆ど進んでおらず、その治療法の開発も思うように進んでいなかったのが現状である。そこで今回我々は、そのような現状を打破すべく我々が日本全国の施設の協力の基に all Japan 体制で iGCT の臨床検体を収集・解析すべく立ち上げた、「iGCT consortium」に集められた iGCT 症例サンプルを解析し、NGGCT の新規治療標的となる候補分子/分子シグナルの同定を目指した。

### 2. 研究の目的

今回、以前に我々の過去の報告 (Ichimura, et al. Acta Neuropathol. 2016 Jun;131(6):889-901.) の際に iGCT consortium に集められた iGCT の臨床サンプルに対して施行した全エクソーム解析の結果を再検討し、今夏は特に NGGCT の特異的治療標的となりえるような変異遺伝子の同定/機能解析を行い、NGGCT に対する新規治療標的分子/分子シグナルの同定ならびに治療モデルの確立を目指す。

### 3. 研究の方法

上述の我々の過去の iGCT consortium 症例サンプルの解析結果に加え、新たに 25 例の新規 consortium 症例サンプルの全エクソーム解析を追加し、特に NGGCT 症例でのみ特異的かつ複数症例で変異を生じている遺伝子群を抽出する。次に、それらの変異遺伝子群の機能解析を行うために、NGGCT 細胞株群 (Tcam2 細胞; germinoma/embryonal carcinoma 混合性腫瘍細胞株、YST1 細胞; 国立がん研究センターにて樹立された卵黄脳腫瘍細胞株) に対して変異遺伝子群を作成・発現させ、野生型の同遺伝子群との機能の比較を行う。機能の変化が確認された場合は、その機能変化によって変化する分子シグナルを同定し、さらにその分子シグナルの変化によって、どのような腫瘍特性 (細胞増殖/浸潤 等) が制御されるのかを分子生物学的手法にて in vitro で検証する。変異遺伝子群による NGGCT 細胞の腫瘍特性の獲得が確認された場合は、同変異遺伝子群を発現させた NGGCT 細胞を用いて動物を用いた頭蓋内腫瘍モデルを作成し、腫瘍造成や移植動物の生存にどのような影響があ

るのかを検討して、可能であれば変異遺伝子によって制御される分子/分子シグナル等の阻害剤投与によって、移植動物の生存の延長が認められるか確認を行う。

#### 4. 研究成果

上述の iGCT consortium 症例サンプルの全エクソームシーケンスの結果を解析したところ、NGGCT 症例のみに高度に (6/25 例) 変異を認める遺伝子を見出した。この遺伝子 (ubiquitin specific protease 28 (*USP28*)) は、蛋白質の脱ユビキチン化酵素 *USP28* をコードしており、*USP28* の腫瘍細胞における役割としては、既に肺がんや消化器がんでは、蛋白質の直接的/間接的なユビキチン化制御によって p53 経路依存的な細胞死制御や、BRAF-MEK-ERK 経路を介した細胞増殖/細胞運動を制御することが知られているが、iGCT におけるその役割は全く判っていなかった。本研究で見出された NGGCT 症例における *USP28*、変異が陽性であった 6 例中 4 例は、欠失ならびにフレームシフトといった機能失活型変異であった。残り 2 例は点突然変異であったことから、まず我々は、これら 2 つの点突然変異が機能失活型変異であるかどうかの検討を行った。これら 2 つの *USP28* の点突然変異発現プラスミドを作成し、Tcam2 細胞に発現させた後に、その細胞ライセートを *USP28* の基質分子の一つである 53BP1 の抗体で免疫沈降。その沈降物を抗ユビキチン抗体にてウエスタンブロットで解析したところ、野生型 *USP28* と比較して、これら 2 つの点突然変異では 53BP1 の脱ユビキチン化が抑制されていたことから、NGGCT 症例群で見出された *USP28* の変異は、これら 2 つの点突然変異を含め、機能失活型変異であることが明らかとなった。そこで次に我々は、NGGCT の悪性化の制御には *USP28* の機能抑制が重要であると仮説をたて、Tcam2 ならびに YST1 細胞にて *USP28* のノックダウンを行ったところ、結果として両細胞増殖能、細胞運動能 (低血清培地下での transwell assay にて判定) の亢進、ならびに臨床の NGGCT 治療にも使用される抗腫瘍薬 CDDP に対する細胞死誘導 (propidium iodide による死細胞染色にて判定) の抑制を認めた。この時、ウエスタンブロットで細胞内シグナルの変化を調べたところ、MEK1/2 ERK1/2 経路の活性化亢進が確認されたことから、既に過去の他癌腫での報告にもあるように *USP28* の機能失活が BRAF-MEK1/2-ERK1/2 経路の活性化を促進している可能性があるかと仮定し、*USP28* をノックダウンさせた両細胞に MEK 阻害剤である trametinib による処理を行ったところ、*USP28* のノックダウンにより誘導されるはずの細胞増殖/細胞運動の亢進、ならびに CDDP 依存性細胞死に対する耐性獲得を認めなかった。この結果から、*USP28* の機能失活によって、NGGCT 細胞の細胞増殖、細胞運動や細胞死抵抗性といった腫瘍特性が、MEK-ERK カスケード依存的に増強され得ることが明らかとなった。最後に、*USP28* の transient knockdown を行った Tcam2 細胞を用いたヌードマウス (BALB/c nu/nu マウス) での頭蓋内腫瘍モデルでは、*USP28* のノックダウンを行っていない細胞 (コントロール siRNA 導入細胞) と比較し、*USP28* のノックダウン細胞を移植した動物において腫瘍組織形成の亢進ならびにマウスの生命予後の短縮を認める傾向にあった。この実験に関しては、現在実験条件を更に検討してデータを詰めている最中である。以上の結果から、このたび我々は NGGCT で特異的に失活型変異を起こし、それによって MEK-ERK カスケード依存的に NGGCT の腫瘍特性を亢進させると考えられる新規分子を同定し得たと考えられた。今後は、MEK-ERK カスケードを標的とした頭蓋内 NGGCT 治療の前臨床モデルの確立を視野に、更なる研究を進める予定である。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 富山 新太、市村 幸一、森 健太郎	4. 巻 vol.29 no.3
2. 論文標題 <こっそり入門 脳神経外科医のための分子生物学> 今さら聞けない 臨床に必要な遺伝子診断 ・今さらですが..... 小児脳腫瘍に特徴的な遺伝子異常, 特に今回はグリオーマ以外の話も交えて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経外科速報	6. 最初と最後の頁 284-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Tatsuya Kobayashi, Kojiro Wada, Kouichi Ichimura Tatsuya Kobayashi, Kojiro Wada, Kouichi Ichimura	4. 巻 Vol 1, Supplement_2
2. 論文標題 SPDR-06 PROTEIN DEUBIQUITINATION PATHWAY IS A NOVEL THERAPEUTIC TARGET AGAINST MALIGNANT CNS NON-GERMINOMATOUS SPDR-06 PROTEIN DEUBIQUITINATION PATHWAY IS A NOVEL THERAPEUTIC TARGET AGAINST MALIGNANT CNS NON-GERMINOMATOUS GERM CELL TUMORS	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 ii7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/nojnl/vdz039.0ht <a href="https://doi.org/10.1093/nojnl/vdz039.03232">https://doi.org/10.1093/nojnl/vdz039.03232</a>	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 富山 新太、市村 幸一、森 健太郎	4. 巻 vol.29 no.3
2. 論文標題 <こっそり入門 脳神経外科医のための分子生物学> 今さら聞けない 臨床に必要な遺伝子診断 ・今さらですが..... 小児脳腫瘍に特徴的な遺伝子異常, 特に今回はグリオーマ以外の話も交えて	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 脳神経外科速報	6. 最初と最後の頁 284-292
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Kojiro Wada, Kouichi Ichimura	4. 巻 Vol. 22 Supplement_3
2. 論文標題 GCT-22. PROTEIN DEUBIQUITINATION PATHWAY IS A NOVEL THERAPEUTIC TARGET AGAINST MALIGNANT NON-GERMINOMATOUS CNS GERM CELL TUMORS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-oncology	6. 最初と最後の頁 iii332
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/noaa222.242	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Daisuke Kawauchi, Kojiro Wada, Kouichi Ichimura	4. 巻 Vol. 2 Supplement_3
2. 論文標題 CBMS-11 PROTEIN DEUBIQUITINATION PATHWAY IS A NOVEL THERAPEUTIC TARGET AGAINST MALIGNANT CNS NON-GERMINOMATOUS GERM CELL TUMORS	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 ii4-ii5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdaa143.018	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Daisuke Kawauchi1, Kojiro Wada, Koichi Ichimura
2. 発表標題 Protein deubiquitination pathway is a novel therapeutic target against malignant non-germinomatous CNS germ cell tumors
3. 学会等名 ISPN02020 (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Daisuke Kawauchi1, Kojiro Wada, Koichi Ichimura
2. 発表標題 Protein deubiquitination pathway is a novel therapeutic target against malignant non-germinomatous CNS germ cell tumors
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Daisuke Kawauchi1, Kojiro Wada, Koichi Ichimura
2. 発表標題 Protein deubiquitination pathway is a novel therapeutic target against malignant non-germinomatous CNS germ cell tumors
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第79回学術総会 (国際学会) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Arata Tomiyama, Eita Uchida, Tatsuya Kobayashi, Kojiro Wada, Kouichi Ichimura
2. 発表標題 PROTEIN DEUBIQUITINATION PATHWAY IS A NOVEL THERAPEUTIC TARGET AGAINST MALIGNANT CNS NON-GERMINOMATOUS GERM CELL TUMORS
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術集会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富山 新太、内田 栄太、小林 達弥、和田 孝次朗、市村 幸一
2. 発表標題 脱ユビキチン化反応関連分子ならびにMAPK経路は 高悪性度中枢性胚細胞腫の治療標的となり得る。
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富山 新太、内田 栄太、市村 幸一
2. 発表標題 中枢性胚細胞腫の新規治療標的の探索・・・抗てんかん薬の役割も考慮して
3. 学会等名 東京脳腫瘍治療懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 富山 新太、内田 栄太、市村 幸一
2. 発表標題 中枢性胚細胞腫の新規治療標的の探索・・・抗てんかん薬の役割も考慮して
3. 学会等名 脳腫瘍治療懇話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	大谷 直樹 (Otani Naoki)  (20573637)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院脳神経外科・講師)  (82406)	
研究分担者	山本 祐太郎 (Yamamoto Yutaro)  (20785761)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・病院脳神経外科・助教)  (82406)	
研究分担者	森 健太郎 (Mori Kentaro)  (30200364)	防衛医科大学校 (医学教育部医学科進学課程及び専門課程、動物実験施設、共同利用研究施設、病院並びに防衛・脳神経外科学・教授)  (82406)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------