

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：82685

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K15286

研究課題名（和文）19q欠失のみを伴う神経膠腫の新たなentityの確立と分子遺伝学的機序の解明

研究課題名（英文）Biological mechanisms of IDH-mutated astrocytomas harboring only 19q-loss

研究代表者

大谷 亮平（Otani, Ryohei）

東京都立駒込病院（臨床研究室）・脳神経外科・医長

研究者番号：30786968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,000,000円

研究成果の概要（和文）：我々は以前、IDH変異型星細胞腫の中に19q欠失のみを有するサブグループが存在し、他の星細胞腫に比べて予後良好であることを報告したが、そのメカニズムを解明するべく、19q-lossと19q-intactの星細胞腫の遺伝子発現パターンを、マイクロアレイ解析にて比較した。その結果、幹細胞の維持やグリオーマの進行に関連する複数の遺伝子が発現低下していた。19q-loss星細胞腫の発現パターンは、星細胞腫内でサブグループを構成していた。以上より、星細胞腫における19q欠失は後天的に獲得され、その生物学的特徴は、幹細胞の維持やグリオーマの進行に関連する遺伝子の発現変化に関連していることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果は、未だ予後不良な悪性脳腫瘍であるグリオーマの分類に新たなサブグループを提唱することで、今後のグリオーマにおける予後予測、治療戦略に大きな影響を与える。現在、星細胞腫の19qの状態は臨床において測定されていないが、本研究の結果は19q欠失の有無を同定する重要性を示しており、特に乏突起膠腫様の病理像を含む星細胞腫においては、遺伝学的に星細胞腫と同定されていても、19q欠失の有無を確認する必要性を示している。

研究成果の概要（英文）：We previously reported that there was a subgroup of IDH-mutated astrocytomas harboring only 19q-loss showing better prognosis compared with 19q-intact astrocytomas. To further explore the biological mechanism of this subgroup, we compared gene expression pattern between 19q-loss and 19q-intact astrocytomas by microarray analysis. Multiple genes associated with stem cell maintenance and glioma progression were down-regulated in 19q-loss astrocytomas, and the expression pattern of the 19q-loss astrocytomas constituted a subgroup of astrocytoma. These findings suggested that 19q-loss in astrocytomas is acquired, and that the biological features are possibly related to differentially expressed genes associated with stem cell maintenance and glioma progression.

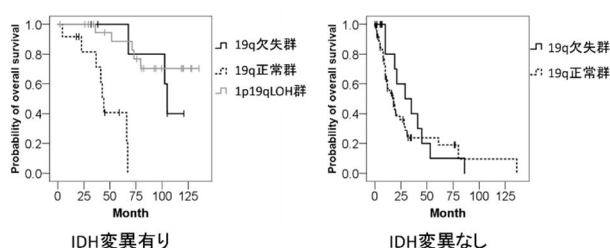
研究分野：脳腫瘍

キーワード：グリオーマ 脳腫瘍 genomics 19q

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫ははまだ治療困難であり、新たな治療法へ向けた研究が急がれている。神経膠腫における分子生物学的異常の解明は、近年の網羅的遺伝子解析により大きな進歩を遂げてきた。WHO grade 3 の神経膠腫は、IDH 変異、1p/19q 共欠失、TP53 変異の有無により大きく3つに分けられ、それぞれ予後が異なる。すなわち、IDH 変異(+)、1p/19q 共欠失(+)の群、IDH 変異(+)、TP53 変異(+)の群、IDH 変異(-)の群であり、この順に予後が良い。1p/19q 共欠失と TP53 変異は IDH 変異(+)腫瘍において相互排他的であり、組織学的には前者が乏突起膠腫、後者が星細胞腫に一致する。1p/19q 共欠失とは、染色体 1 番短腕と 19 番長腕の共欠失であり、1p のみ、もしくは 19q のみの欠失は、従来予後と関連しないとされてきた。しかし、これまでの我々の解析において、IDH 変異(+)、TP53 変異(+)の群の一部に、1p 正常、19q 欠失の腫瘍を一部に認めている。自験例 170 例のグリオーマにおいて、75 例に IDH 変異を認め、その内 19q 正常は 12 例、19q 欠失は 7 例、1p/19q 共欠失は 23 例認めた。19 欠失群全例において、乏突起膠腫様の組織を認めた。全生存期間は、19q 欠失群が 19q 正常群と比較し有意に長かった ($p=0.001$, Log-rank test)。むしろ、1p/19q 共欠失を伴う乏突起膠腫に近い予後であった。19q 欠失群における他の遺伝子変異を解析すると、星細胞腫で認める TP53 変異を全例に認め、乏突起膠腫に認める TERT promotor 変異は全例で認めなかった。これらの結果は、遺伝子学的分類では 1p/19q 共欠失を伴わない星細胞腫に分類されるものの、19q 欠失が加わることで病理学的、臨床的に明らかに異なる 1 群となり得ることを示唆している。一方、IDH 変異を伴わない膠芽腫においては、19q 欠失の有無は予後に影響していなかった (図 1)。

図 1



2. 研究の目的

以上のように、我々は IDH 変異を伴う星細胞腫の中に 19q 欠失を伴う一群が存在し、その一群は乏突起膠腫様の組織像を示すと共に予後良好であることを報告した。同様の報告は過去になく、この一群は他の 19q 欠失を伴う星細胞腫とは明らかに異なるものである。しかし、このような臨床的挙動に関連する生物学的特徴の裏付けは不明であった。我々は、19q 欠失星細胞腫の特徴が、19q 正常星細胞腫の特徴から、1p/19q 共欠失を有する乏突起膠腫の特徴へとシフトしたのではないかという仮説を立てた。そこで本研究では、19q 染色体の欠失が腫瘍細胞の分子生物学的特性にどのような影響を与えるのかを調べ、それがこのサブグループにおける予後の良さと乏突起膠腫様の形態にどのように関連しているかを検討することを目的とした。

3. 研究の方法

患者およびサンプル

腫瘍サンプルは、2006 年から 2016 年の間に獨協医科大学病院での手術中に得られた。本研究では、7つの 19q-loss および 12 の 19q-intact の退形成性星細胞腫 (WHO グレード III) が観察されたが、グレード II の星細胞腫では、1p-loss を伴わない 19q-loss のみを保有するものはなかった。本研究では、5 例の 19q-loss と 5 例の 19q-intact 星細胞腫を、凍結サンプルの残存量が多い順に選んで解析した。患者の年齢分布は両群間で有意な差はなかった (年齢中央値はそれぞれ 40 歳と 33 歳、 $p=0.17$)。患者はすべて男性であった。乏突起膠腫様の形態は、19q-loss 星細胞腫の全例に認められたが、19q-intact 星細胞腫の 1 例以外には認められなかった。神経細胞の分化を示す Neuropil-like island が、19q-loss 星細胞腫の 4 例と、19q-intact 星細胞腫の 1 例に観察された。すべての症例で、テモゾロミド投与と同時に局所拡大放射線治療が行われた。全生存率 (OS) は、手術日から死亡日または最新の追跡調査日までの期間として算出した。腫瘍サンプルは、切除後すぐに液体窒素で凍結し、使用するまで -80 で保存した。腫瘍組織の DNA は、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて、メーカーのマニュアルに従って抽出した。登録されたすべての患者から書面によるインフォームド・コンセントを得た。ヒト試料を用いたすべての実験は、獨協医科大学の倫理委員会の承認を得た (No.1431 および 24053)。

変異解析およびマイクロサテライト解析

変異解析およびマイクロサテライト解析は、以前報告した方法で行った。簡潔に記すと、TP53, ATRX, CIC, FUBP1 を含む 93 個の脳腫瘍関連遺伝子を網羅したパネル (NCC Brain Tumor Panel, Thermo Fisher Scientific) を用いて、20 ng の DNA を用いて multiplex PCR を行い、Ion Torrent System を用いた次世代シーケンシングで複数の変異解析を行った。IDH1/2, TERT プロモーター、および TP53 の変異は、直接サンガーシーケンスで検証した。LOH (Loss of heterozygosity) は、1p と 19q の染色体全体をカバーするマイクロサテライトマーカーを用いたマイクロサテライト解析により検出した。

マイクロアレイ解析

マイクロアレイ解析は、タカラバイオ株式会社の開発製造受託センターにおいて、GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Arrays (Affymetrix, California, USA) を用いて行った。ビオチン化した相補的 RNA (cRNA) は、メーカーの指示に従い、100 ng の total RNA から GeneChip 3' IVT PLUS Reagent Kit (Thermo Fisher Scientific 社) で合成した。ビオチン化した cRNA の収量は、NanoDrop ND-2000 Spectrophotometer を用いて確認した。フラグメンテーション後、15ug の cRNA を GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array 上で 45 °C で 16 時間ハイブリダイズさせた。GeneChip Fluidics Station 450 (Thermo Fisher Scientific) を用いて、GeneChip アレイの洗浄と染色を行い、GeneChip Scanner 3000 7G を用いてスキャンした。Single Array Analysis は、Microarray Suite version 5.0 (MAS5.0) を用いて、Thermo Fisher Scientific のデフォルト設定で、正規化方法として global scaling を用いて行った。各アレイのトリミングされた平均ターゲット強度は 500 とした。

すべての解析対象遺伝子の発現レベルを、19q-loss 群と 19q-intact 群で比較した。各遺伝子の fold change (FC) は、19q-loss 群の平均発現量 / 19q-intact 群の平均発現量として算出した。両群の比較には Student's t-test を用い、 $P < 0.05$ が統計的有意性を示した。 $p < 0.05$ 、絶対値 $\log_2 FC > 1$ の場合、遺伝子は有意に変化したとみなした。クラスター 3.0 を用いて、Pearson 相関の平均結合度に基づく階層的クラスタリングを行い、Java Tree View 1.1 を用いて樹形図を可視化した。NIH DAVID Tools を用いてパスウェイ解析を行った。

Cancer Genome Atlas (TCGA) データ

TCGA のグリオーマデータから、cBioPortal (<http://www.cbioportal.org>) を用いてマイクロアレイベースの遺伝子発現データを取得した。解析には、変異データ、LOH データ、マイクロアレイベースの発現データの両方が得られた症例を用い、共欠失のない IDH-mt 星細胞腫の 11 例と、1p/19q 共欠失のある IDH-mt 乏突起膠腫の 7 例を使用した。我々の症例と TCGA の症例の発現データは、quantile normalization によって正規化された。t-Distributed Stochastic Neighbor Embedding (t-SNE) 解析は、IDH-mt グリオーマのサブグループ間の関係を可視化するために、遺伝子発現レベルを用いて tsne package for R (version 3.5.0) で行った。

結果を検証するために、TCGA グリオーマデータセットの RNA sequence ベースの遺伝子発現データを、マイクロアレイベースのデータとは別に使用した。このデータセットには、10 例の 19q loss 星細胞腫、237 例の 19q intact 星細胞腫、166 例の 1p/19q 共欠失の乏突起膠腫を含む 413 例の IDH-mt グリオーマが含まれていた。

統計解析

全生存率の比較には、log-rank 検定を用いた。2 群間の差の評価には、Student's t-test および Fisher's exact test を用いた。統計解析には SPSS v.23 (IBM, New York, USA) を用いた。 $P < 0.05$ を統計的有意性を示すとした。

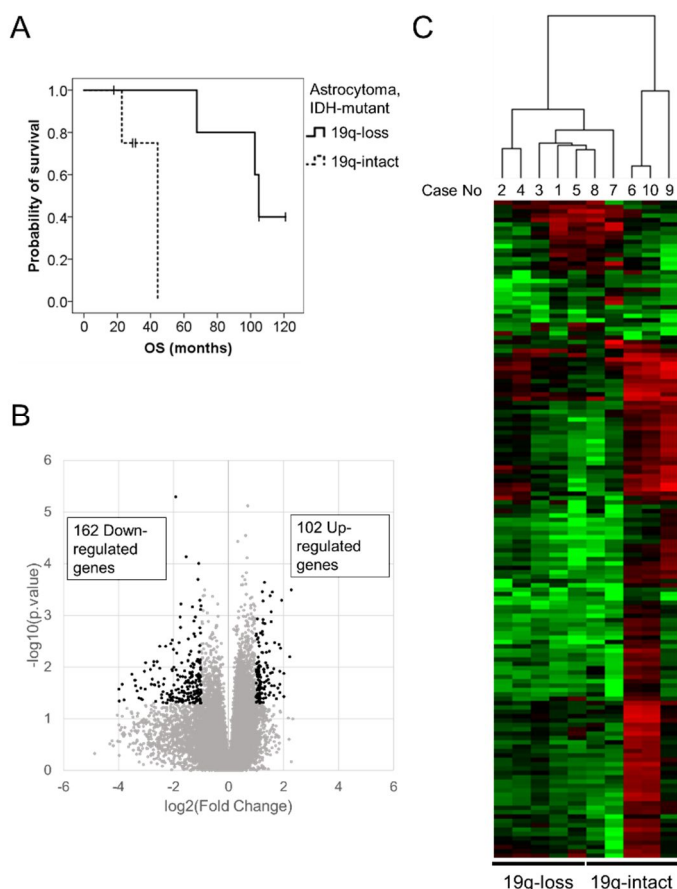
4. 研究成果

TP53 変異は 19q-loss 星細胞腫の全症例に認められたが、TERT プロモーター変異、CIC 変異、FUBP1 変異はいずれも認められなかったことから、全症例が IDH-mt 星細胞腫と遺伝的に合致することが示唆された。19q-loss 星細胞腫患者の OS は、同一のアジュバント治療にもかかわらず、19q-intact 星細胞腫患者に比べて有意に長かった (OS 中央値: 105 カ月 vs 44 カ月、 $p = 0.025$ 、Log-rank 検定、図 2A)。

19q-loss 星細胞腫の遺伝子と 19q-intact 星細胞腫の遺伝子の発現レベルを比較することで、102 の発現亢進遺伝子と 162 の発現低下遺伝子が抽出された (図 2B)。上昇した遺伝子には、神経系の発達、FGFR シグナル伝達経路の負の制御、アポトーシスに関連する遺伝子が含まれていた。一方、発現が低下した遺伝子には、MAP キナーゼ活性の正の制御、細胞形状の制御、神経系の発達、Ras シグナル経路に関連する遺伝子が含まれていた。19q-loss 星細胞腫の発現パターンは、標準偏差 1 以上の 152 遺伝子を用いたクラスター分析によって、19q-intact 星細胞腫の発現パターンと比較した。19q-loss 星細胞腫の発現パターンは、19q-loss 星細胞腫と co-clustered した症例 7 と 8 を除き、19q-intact 星細胞腫の発現パターンとは分離していた (図 2C)。発現量の異なる遺伝子はすべての染色体に分布していたが、発現量の少ない遺伝子は 19q と 4p に、発現量の多い遺伝子は 4q に多く分布していた (図 3A)。また、19q 上の発現低下遺伝子は、19q 全

体に広く分布していた (図 3B)。

図2



発現量の異なる遺伝子のうち、幹細胞の維持に関連する遺伝子である fibroblast growth factor 1 (FGF1)が発現低下されていた ($p=0.038$) また、elongation of very long chain fatty acids protein 2 (ELOVL2, $p=0.031$), phosphatidylethanolamine binding protein 4 (PEBP4, $p=0.023$), cell adhesion molecule L1 (CHL1, $p=0.044$), and phospholipase A2 Group V (PLA2G5, $p=0.020$)など、グリオーマの進行に関連することが知られている複数の遺伝子も発現が低下していた (図 3C)。これらの知見は、独立した検証データセットを用いて検証された (FGF1, $p<0.001$; ELOVL2, $p=0.010$; PEBP4, $p=0.006$; CHL1, $p=0.001$; PLA2G5, $p=0.030$)。19q-loss 星細胞腫の遺伝子発現パターンを、TCGA グリオーマデータセットを用いて、IDH-mt グリオーマの他のサブグループと比較した。19q-intact 星細胞腫、1p/19q-共欠失の乏突起膠腫、19q-loss 星細胞腫の関係を可視化するために、バイアスがない遺伝子 ($SD > 1$)から抽出した 19q-intact 星細胞腫と乏突起膠腫の間で発現が有意に異なる 123 遺伝子を用いて t-SNE 解析を行った。その結果、19q-loss 星細胞腫の発現パターンは、1p/19q-共欠失を持つ乏突起膠腫の発現パターンへの偏位は認めず、星細胞腫のサブグループを形成していることがわかった (図 3D)。

本研究では、19q-loss 星細胞腫の遺伝子発現パターンを他のグリオーマサブグループの遺伝子発現パターンと比較し、より良い予後をもたらす要因を特定することを目的とした。19q-loss 星細胞腫の形態的特徴が乏突起膠腫に類似していることから、19q-loss 星細胞腫の発現パターンは、1p/19q 共欠失を有する乏突起膠腫の発現パターンと類似しているのではないかと仮説を立てた。しかし、19q-loss 星細胞腫の発現パターンは乏突起膠腫のそれとは異なっており、星細胞腫内の独立したサブグループを構成していることがわかった。また、19q-loss 星細胞腫の予後を左右する可能性のある複数の遺伝子を特定した。FGF1 は、神経幹細胞の成長と自己再生を維持するのに重要であり、グリオーマ幹細胞の維持にも不可欠である。最近のシングルセル RNA-seq 解析では、IDH-mt グリオーマは星細胞腫系細胞、乏突起膠腫系細胞、および幹細胞の混合集団で構成されており、星細胞腫では幹細胞集団の割合が多いほど予後が悪いことが明らかになった。19q-loss 星細胞腫では幹細胞の維持を促進する遺伝子の発現が低下していることから、19q-loss 星細胞腫では結果的に幹細胞性が低下している可能性があり、予後が良いことの説明になると考えられる。さらに、19q-loss 星細胞腫で観察された乏突起膠腫様の形態と神経細胞の分化は、幹細胞集団の分化の結果である可能性がある。なぜなら、幹細胞集団が小さいことは、乏突起膠腫系の集団や神経細胞の分化が大きいことと相関するという報告があるからで

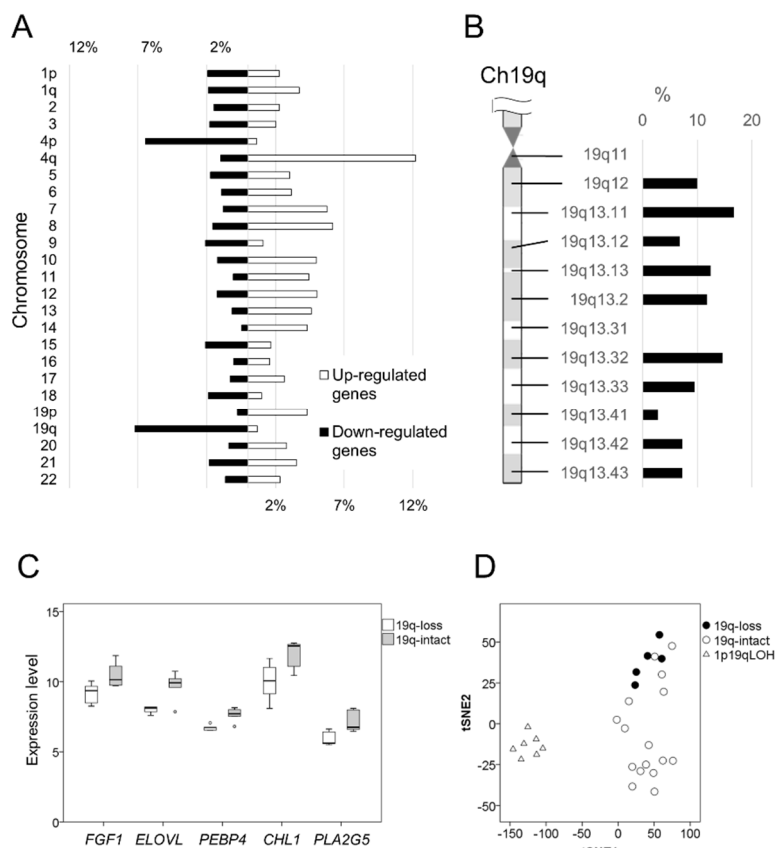
ある。

19q-loss 星細胞腫で観察された複数の発現低下遺伝子は、同様に予後の良さと関連している可能性がある。ELOVL2 の発現はグリオーマの進行を促進することが報告されており、グリオーマ患者の予後不良と関連していた。PEBP4 は抗アポトーシスタンパク質であり、その発現は ERK1/2 シグナル伝達経路を介してグリオーマの進行や生存率の低下と相関することが明らかになった。CHL1 は、細胞接着分子 L1 (L1CAM) 遺伝子ファミリーに属し、in vitro および in vivo において、ヒトグリオーマ細胞の細胞増殖、転移、移動を促進することが示されている。PLA2G5 は、生理活性脂質の産生、防御機構、細胞シグナル伝達など、さまざまな生理的過程において重要な役割を果たしていることが知られている。PLA2G5 の高発現は、神経膠腫患者の予後不良と関連していた。

19q-loss 星細胞腫における変異パターンと遺伝子発現パターンから、このサブグループにおける 19q 欠失は初期の発癌イベントではなく、IDH や TP53 の変異によって星細胞腫の成立後に獲得されたものである可能性が示唆され、19q-loss の影響は乏突起膠腫における 1p/19q 共欠失の影響とは異なると考えられる。後天的な 19q 欠失により、幹細胞集団が減少し、他の染色体上の複数の遺伝子と相互作用してグリオーマの攻撃性が高まり、その結果、星細胞腫の予後が良くなり、形態的にも変化したのではないかと考えられた。もし 19q 欠失が本当に後天的なものであれば、19q 欠失の腫瘍細胞が主要な集団に取って代わるための何らかの利点があるはずだが、そのプロセスのメカニズムは我々のデータからは推測できなかった。

症例 7 と 8 の発現パターンは 19q 欠失星細胞腫のそれに近かったが、これらの症例では 19q は無傷であった。症例 7 の腫瘍細胞は、神経細胞マーカーである tubulin に陽性であったが、組織学的には乏突起膠腫様の形態も neuropil-like island も観察されなかった。症例 8 の腫瘍細胞は乏突起膠腫様の形態と neuropil-like island を持つ集団を少数含んでいた。症例 7 と 8 で観察された 19q-loss 星細胞腫の部分的な特徴は、これらの発現パターンと関連している可能性がある。

図3



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Otani Ryohei, Uzuka Takeo, Higuchi Fumi, Matsuda Hadzki, Nomura Masashi, Tanaka Shota, Mukasa Akitake, Ichimura Koichi, Kim Phyo, Ueki Keisuke	4. 巻 109
2. 論文標題 IDH-mutated astrocytomas with 19q-loss constitute a subgroup that confers better prognosis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2327 ~ 2335
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.13635	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 大谷亮平、宇塚岳夫、樋口美未、松田葉月、野村昌志、田中将太、武笠晃丈、金彪、植木敬介
2. 発表標題 19q-lossを伴うastrocytomaは、なぜ予後良好なのか 網羅的発現解析による機序の解明
3. 学会等名 第37回 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Ryohei Otani, Takeo Uzuka, Fumi Higuchi, Hadzki Matsuda, Masashi Nomura, Shota Tanaka, Akitake Mukasa, Koichi Ichimura, Phyo Kim, and Keisuke Ueki
2. 発表標題 The subgroup harboring 19q-loss in Anaplastic astrocytoma showed oligodendroglial morphology and good prognosis
3. 学会等名 The 19th International Congress of Neuropathology（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷亮平、宇塚岳夫、樋口美未、松田葉月、野村昌志、田中将太、武笠晃丈、市村幸一、金彪、植木敬介
2. 発表標題 IDH 変異を伴うアストロサイトーマには19-loss を伴う予後良好な群が存在する
3. 学会等名 第36回 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 大谷亮平、宇塚岳夫、樋口芙未、松田葉月、田中将太、金彪、武笠晃丈、植木敬介
2. 発表標題 19q-lossを伴うastrocytomaが予後良好である機序の解明
3. 学会等名 第38回 日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷亮平、宇塚岳夫、樋口芙未、松田葉月、田中将太、金彪、武笠晃丈、植木敬介
2. 発表標題 19q-lossを伴うアストロサイトーマの網羅的発現解析
3. 学会等名 第79回 日本脳神経外科学会 総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Ryohei Otani Takeo Uzuka Fumi Higuchi Hadzki Matsuda Masashi Nomura Shota Tanaka Akitake Mukasa Phyto Kim and Keisuke Ueki
2. 発表標題 Effects of 19q-loss in IDH-mutated astrocytomas on better prognosis and oligodendroglioma-like morphology
3. 学会等名 2020 Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大谷亮平、宇塚岳夫、樋口芙未、松田葉月、田中将太、金彪、武笠晃丈、植木敬介
2. 発表標題 19q-lossを伴うIDH変異型astrocytomaの網羅的発現解析
3. 学会等名 第38回 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2020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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------