

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09910

研究課題名(和文) 聴神経腫瘍のゲノム解析による腫瘍発生および増大メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of Cancer-Associated Genes using Next-Generation Sequencing in Vestibular Schwannomas

研究代表者

藤田 岳 (Fujita, Takeshi)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：90533711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：聴神経腫瘍は、主に前庭神経のシュワン細胞から発生する神経鞘腫である。ほとんどは良性腫瘍であるが、難聴やめまい症状を引き起こし、増大すると小脳や脳幹を圧迫して死に至ることもある。今回我々は、手術で摘出された聴神経腫瘍の標本からDNAを抽出し、腫瘍の発生や抑制に関わる遺伝子について次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンスを行った。腫瘍はほとんどが内耳道に限局しており、最大径は15mmまでの小さい腫瘍を対象とした。これまでの聴神経腫瘍のゲノム解析の報告でみられている、NF2遺伝子の変異に加えて、SYNE1やその他多くの遺伝子変異が認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

聴神経腫瘍は、小脳橋角部という場所に発生するうちで最も頻度の高い腫瘍である。腫瘍で摘出される聴神経腫瘍は、通常サイズが大きい腫瘍が多いが、今回我々は最大でも15mmの小さな腫瘍を対象に、腫瘍の遺伝子変異について解析を行った。その結果、これまでの報告にみられるMerlin蛋白を制御するNF2遺伝子の変異のみならず、他の多くの遺伝子変異を認めた。このような結果は、聴神経腫瘍の病態解明や今後の治療の開発に役に立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Vestibular schwannoma (VS) is the most common tumor of the cerebellopontine angle. The number of sporadic VS cases has increased rapidly over the last decade. Here, we completed a comprehensive genomic analysis of all the exons in the key tumor suppressor and oncogenes from small (< 15mm) sporadic VS samples. These evaluations identified NF2, SYNE1, IRS2, APC, CIC, SDHC, BRAF, NUMA1, EXT2, HRAS, BCL11B, MAGI1, RNF123, NLRP1, ASXL1, ADAMTS20, TAF1L, XPC, DDB2, and ETS1 as mutated genes and novel missense mutations in the SYNE1 transcript were identified in 20% of the samples.

研究分野：耳鼻咽喉科

キーワード：聴神経腫瘍 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

聴神経腫瘍(VS)は、主に前庭神経のシュワン細胞から発生する神経鞘腫である。ほとんどは良性腫瘍であるが、難聴やめまい症状を引き起こし、増大すると小脳や脳幹を圧迫して死に至ることもある。VSの発生および増大のメカニズムや、聴力障害を引き起こす原因の詳細については未だよく分かっていない。聴神経腫瘍の発生にはNF2遺伝子の異常が最も重要であると考えられている。NF2遺伝子は22番染色体長腕に存在し、腫瘍抑制タンパクであるMerlinをコードする。このMerlinの働きが失われることにより、腫瘍が発生すると考えられている。このMerlinタンパクは、PAK, Rac, mTORC1, PI3K/AKT, Ras/Raf/MEK/ERKなど多くの重要なシグナル伝達系との関わりが報告され、複雑なパスウェイを形成している。神経線維腫症II型(NF2)では生殖細胞にNF2遺伝子変異がみられ、常染色体優性遺伝を呈する症例が多い。一方で孤発性の前庭神経鞘腫でも腫瘍細胞においてNF2遺伝子変異が多くみられるとされている。本邦ではIkeda, HashimotoらによるCGH法、FISH法、PCR-SSCP法を組み合わせた解析で、孤発性前庭神経鞘腫の17例中14例(82%)にNF2遺伝子の異常を認めたと報告されている。これまでの報告では、孤発性前庭神経鞘腫におけるNF2遺伝子の変異率は15~84%とばらつきが大きい。このように全ての症例でNF2遺伝子変異が認められるわけではなく、また症例毎に異なる腫瘍生物学的な特徴が、単一の遺伝子変異のみで説明できるかどうかについては疑問が残る。

またVSの診療において、手術・経過観察・放射線治療が大きな3本の柱である。そこに、抗VEGF抗体であるBevacizumabが、致死的な神経線維腫症II型の両側性VSに対して有効性であるという報告がなされた(Plotkin SR et al., NEJM. 2009)。薬物治療という新たな可能性を示した報告であるが、Bevacizumabは高額な薬価の問題や、長期使用による腎障害などの副作用の観点から、孤発性のVS症例に対して用いるのは現実的とは言えない。

そこで我々は、その他の治療薬物の候補を探る研究を行ってきた(Dilwali S and Fujita T et al Transl Res. 2015) (Kim BG, Fujita T et al, Sci Rep. 2016)。薬物治療の確立のためには腫瘍が発生し、増大するメカニズムの解明が必須である。先述の通り、VSの発生には腫瘍抑制タンパクであるMerlinの機能喪失が重要と言われている。我々はMerlinのパスウェイ解析から、NF- β が多くの分子の中でも重要であることを明らかにした(Dilwali S and Fujita T et al., Mol Oncol. 2015)。

今回、分子機構のさらに上流にある腫瘍のゲノム情報をより詳細に解析することで、腫瘍発生・増殖メカニズムの解明や、治療薬のターゲットとなる遺伝子・分子の発見に繋がるのではないかと考え、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

聴神経腫瘍症例の遺伝子変異を解析するために、手術で摘出した標本からDNAを抽出して腫瘍の増殖や抑制に関わる遺伝子について調べた。

3. 研究の方法

今回我々は、手術で摘出された聴神経腫瘍の標本からDNAを抽出し、409遺伝子のexon領域上で癌および肉腫において高頻度に変異を認める15,992ヶ所に対応するプライマーセットを使用し、次世代シーケンサーを用いてターゲットシーケンシングを行った。対象患者の平均年齢は

61.4 歳(40-73 歳)であり、腫瘍はほとんどが内耳道に局限しており、最大径は 15mm までの小さい腫瘍を対象とした。

得られた遺伝子変異の病原性の推定については、SIFT, PolyPhen2, FATHMM および CScape の手法を用いた。

4 . 研究成果

これまでの聴神経腫瘍のゲノム解析の報告でみられている、NF2 遺伝子の変異に加えて、SYNE1 やその他多くの遺伝子変異が認められた(表)。NF2 遺伝子変異は 40%に認められ、以下の遺伝子にもそれぞれ変異が認められた。SYNE1 (20%), IRS2 (10%), APC (10%), CIC (10%), SDHC (10%), BRAF (10%), NUMA1 (10%), EXT2 (10%), HRAS (10%), BCL11B (10%), MAGI1 (10%), RNF123 (10%), NLRP1 (10%), ASXL1 (10%), ADAMTS20 (10%), TAF1L (10%), XPC (10%), DDB2 (10%), ETS1 (10%)。

その他、聴神経腫瘍が聴力にあたる影響について、MRI を用いた研究を進めており、これは現在データ解析中である。

表 . 聴神経腫瘍の遺伝子バリエーションの病原性について SIFT, PolyPhen2, FATHMM, Cscape を用いて解析した

Gene Symbol	Effect	Sample	Genome position*	cDNA change	Amino acid change	VAF (%)
NF2	Missense	3	chr22:30038274	c.447G>T	p.Lys149Asn	33.2
NF2	Non-sense	6	chr22:30070927	c.1443C>G	p.Tyr481*	36.3
NF2	Non-sense	7,10	chr22:30032794	c.169C>T	p.Arg57*	46.5/61.2
SYNE1	Missense	4	chr6:152774819	c.2929G>A	p.Ala977Thr	45.5
SYNE1	Missense	7	r6:152658141-1526581412362_12363delAGinsG		p.Lys4121Ser	47.7
IRS2	Missense	2	chr13:110434998	c.3403G>A	p.Val1135Ile	46.1
APC	Missense	3	chr5:112177052	c.5761G>A	p.Gly1921Ser	44.4
CIC	Missense	4	chr19:42796489	c.5773C>T	p.Pro1925Ser	50.5
SDHC	Missense	4	chr1:161298236	c.128A>G	p.Asn43Ser	50.2
BRAF	Missense	5	chr7:140500192	c.950C>T	p.Ser317Phe	52.4
NUMA1	Missense	5	chr11:71726642	c.1907C>T	p.Thr636Ile	51.3
EXT2	Missense	5	chr11:44129270	c.107C>T	p.Ala36Val	48.5
HRAS	Missense	5	chr11:532688	c.518C>T	p.Pro173Leu	48.6
BCL11B	Missense	5	chr14:99697747	c.575C>T	p.Ser192Leu	47.1
MAGI1	Missense	5	chr3:65464432	c.592A>G	p.Ser198Gly	48.0
RNF213	Missense	6	chr17:78343382	c.12236A>C	p.Lys4079Thr	51.5
NLRP1	Missense	6	chr17:5462461	c.1555G>A	p.Val519Met	42.8
ASXL1	Missense	7	chr20:31025035	c.4520C>T	p.Ala1507Val	55.7
ADAMTS20	Missense	7	chr12:43826171	c.3032G>A	p.Arg1011Gln	30.1
TAF1L	Missense	7	chr9:32634817	c.761G>T	p.Arg254Leu	46.7
XPC	Missense	8	chr3:14190071	c.2411C>G	p.Ser804Cys	48.0
DDB2	Missense	9	chr11:47256837	c.897T>C	p.Met240Thr	49.0

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 藤田 岳, 土井 勝美	4. 巻 29
2. 論文標題 【聴神経腫瘍診療の未来】聴神経腫瘍の基礎研究と遺伝子解析	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Otology Japan	6. 最初と最後の頁 137-141
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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 藤田 岳、武田紘子、神田知紀、横井 純、上原奈津美、柿木章伸、丹生健一
2. 発表標題 聴神経腫瘍症例における内耳のMRI信号強度
3. 学会等名 第29回日本聴神経腫瘍研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Takeshi Fujita, Katsumi Doi, Akinobu Kakigi, Ken-ichi Nibu
2. 発表標題 The Prevalence of Vestibular Schwannoma in Patients with Sudden Sensorineural Hearing Loss
3. 学会等名 8th Quadrennial International Conference on Vestibular Schwannoma and Other CPA Tumors 2019 (国際学会)
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
---------------------------	-----------------------	----

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