

令和 6 年 5 月 17 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K18389

研究課題名（和文）悪性髄膜腫のCDKN2A遺伝子欠失を標的とした新規治療の開発

研究課題名（英文）Novel treatment targeting CDKN2A gene deletion in malignant meningioma

研究代表者

阿知波 孝宗 (Achiha, Takamune)

大阪大学・大学院医学系研究科・招へい教員

研究者番号：00771908

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）：WHO分類2021で悪性髄膜腫の診断基準に新たに組み込まれたTERTおよびCDKN2A遺伝子の異常は、悪性髄膜腫の再発性に強く関与するとされている。当施設の髄膜腫臨床検体を用いたTERTおよびCDKN2A関連遺伝子の異常/発現解析を行い、TERT-p変異、TERT遺伝子発現を認める症例で難治性の臨床経過を辿ることが示された。CDKN2A関連遺伝子（p16INKaやp14ARF、CDK4/6、MDM2）の発現について、髄膜腫の再発性との相関は見出せなかった。再発性に関与すると報告のあるCDKN2Aの点変異p.Ala148Thrの解析を行ったが、我々のcohortでは変異例は認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により悪性髄膜腫におけるTERTおよびCDKN2A関連遺伝子の異常/発現について新たな知見を得ることができた。TERTおよびCDKN2A遺伝子の異常は研究期間中にWHO分類2021に新たに取り込まれ、悪性髄膜腫におけるkey oncogenic geneと考えられている。未だに有効な化学療法や放射線治療が存在しない悪性髄膜腫において今後治療標的としての研究が益々活発化すると考えられる。得られた知見を活用し、悪性髄膜腫において新規分子標的治療を確立するための更なる研究が必要である。

研究成果の概要（英文）：Abnormalities in the TERT and CDKN2A genes, which were newly included in the diagnostic criteria for malignant meningiomas in the WHO Classification 2021, are reported to be strongly involved in the recurrence of malignant meningiomas. We conducted an abnormality/expression analysis of TERT and CDKN2A-related genes using clinical meningioma samples from our facility, and showed that cases with TERT-p mutations and TERT gene expression have an intractable clinical course. No correlation was found between the expression of CDKN2A-related genes (p16INKa, p14ARF, CDK4/6, and MDM2) and meningioma recurrence. We analyzed the CDKN2A point mutation p.Ala148Thr, which has been reported to be involved in relapse, but no mutations were observed in our cohort.

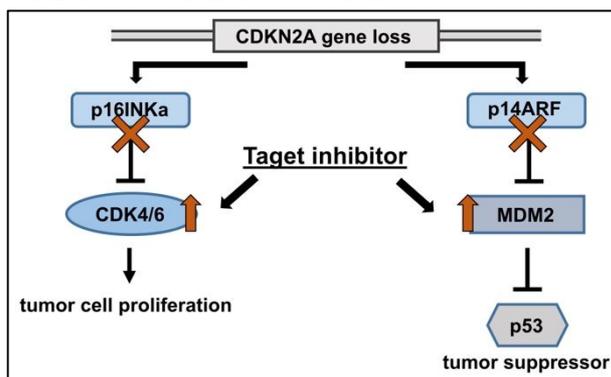
研究分野：脳神経外科学

キーワード：悪性髄膜腫 CDKN2A TERT 分子標的治療

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

髄膜腫は一般的に良性腫瘍として扱われているが、20-30%の頻度で浸潤・再発性の強い悪性群が存在する。これらの症例では、手術摘出に加えて化学療法、放射線治療が必要と考えられるが、生物学的に本腫瘍のこれらの治療に対する感受性が低く、多くのがんで分子標的薬や免疫療法などの新規治療の開発が進む一方、悪性髄膜腫では未だに有効な化学療法や放射線治療が存在しないことは大きな問題である。本研究で着目したサイクリン依存性キナーゼ阻害 2A (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A: CDKN2A) 遺伝子のがん抑制遺伝子として知られ、多くのがんでその異常が指摘されている。悪性髄膜腫においても CDKN2A 遺伝子の欠失が認められることが以前より知られており、近年における大規模解析においても、CDKN2A 遺伝子の欠失は悪性髄膜腫において高い頻度で認められることが確認されている<sup>1)</sup>。実際に、本研究期間中に CDKN2A 遺伝子の異常は髄膜腫において、病理組織学的な悪性度とは独立した予後不良因子であることが明らかになっている<sup>2,3)</sup>。悪性髄膜腫において CDKN2A 遺伝子の欠失により、その下流の制御標的である細胞周期の調整因子サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) 4/6 や、p53 がん抑制遺伝子を抑制的に制御する MDM2 の発現が上昇していると予想され、このようなシグナル伝達異常が、悪性髄膜腫の高い再発性に関わっていると推測される。この仮説に基づけば、CDK4/6 や MDM2 が悪性髄膜腫の治療標的となる可能性が十分にある(右図)。



髄膜腫において CDK4/6 や MDM2 を標的とした治療開発は報告がない (PubMed:2018 年 10 月時点)。また、CDK4/6 や MDM2、及びその上流の制御因子で CDKN2A 遺伝子によりコードされる p16INKa や p14ARF の発現量とその関係性について、詳細な解析を行なった報告は髄膜腫では少なく、CDK4/6 や MDM2 が実際に治療ターゲットとなりうるかは未だ明らかになっていない。

### 2. 研究の目的

本研究は、悪性髄膜腫の分子遺伝学的異常を標的とした新たな分子標的治療を目指し、基礎的検証により悪性髄膜腫における新規治療へとつなげることを目的とする。特にサイクリン依存性キナーゼ阻害 2A 遺伝子 (cyclin-dependent kinase inhibitor 2A: CDKN2A) が悪性髄膜腫における key oncogenic event と考えており、CDKN2A 遺伝子の欠失によって生じる下流の細胞増殖制御因子、サイクリン依存性キナーゼ (cyclin-dependent kinase: CDK) 4/6、MDM2 発現と臨床的再発性の関係について、髄膜腫臨床検体と臨床情報を用いた解析により明らかにする。in vitro/vivo の阻害薬実験により、CDK4/6・MDM2 を治療ターゲットとした阻害薬の有用性を検証し、悪性髄膜腫における新規治療の開発を目指す。

### 3. 研究の方法

1) 髄膜腫臨床検体を用いた TERT 遺伝子異常/発現解析, CDKN2A 関連遺伝子の発現解析  
当研究室で以前より研究対象としているテロメラーゼ逆転写酵素 (telomerase reverse transcriptase: TERT) 遺伝子プロモーター (TERT-p) の点変異は髄膜腫の再発性に関与していることが知られており<sup>4)</sup>、CDKN2A 遺伝子の欠失と共に、WHO 分類 2021 の悪性髄膜腫の診断基準に組み込まれた。TERT 遺伝子異常/発現および CDKN2A 関連遺伝子 (CDKN2A 遺伝子よりコードされる p16INKa や p14ARF、その下流の CDK4/6 や MDM2) の発現について、髄膜腫の手術切除検体 (凍結保存検体、ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体) より腫瘍の DNA および RNA を抽出し、TERT 遺伝子の点変異はサンガーシーケンス法により、TERT/CDKN2A 関連遺伝子の発現は RT-qPCR により半定量的に解析し、各因子と臨床情報の関係性について検討を行った。RT-qPCR 解析に用いる RNA は品質が重要であり、特に凍結保存検体試料の品質管理を目的として Agilent2100 バイオアナライザで RNA Integrity Number (RIN) を確認の後、解析に用いた。

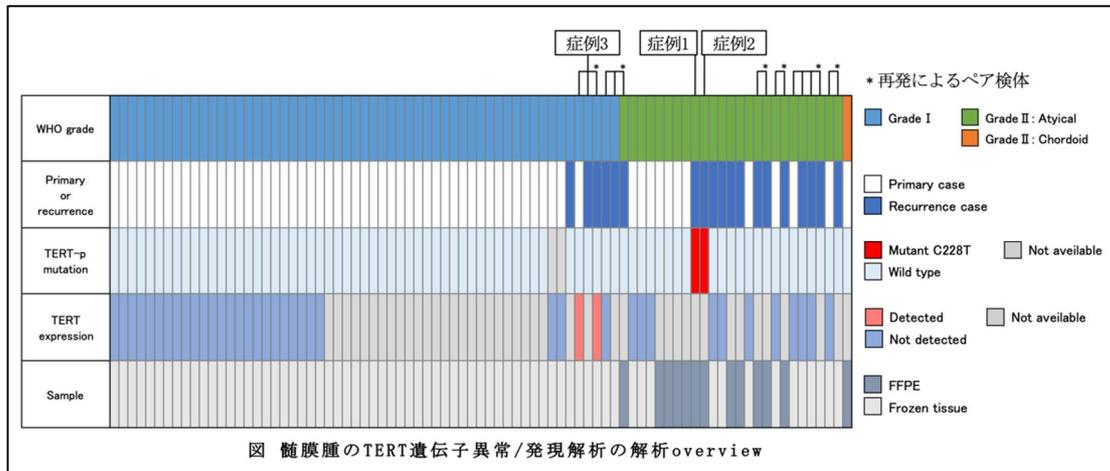
2) 髄膜腫臨床検体を用いた CDKN2A 遺伝子の点変異 p.A1a148Thr の解析

研究期間中に、CDKN2A 遺伝子の点変異 p.A1a148Thr が髄膜腫の再発性について関連性があることが報告された<sup>3)</sup>。再発髄膜腫の手術検体抽出 DNA により、CDKN2A 遺伝子の点変異 (NM\_000077, exon2, c.G442A, p.A1a148Thr) について、サンガーシーケンス法により解析し、臨床情報の関係性について検討を行った。

### 4. 研究成果

1) 髄膜腫臨床検体を用いた TERT 遺伝子異常/発現解析, CDKN2A 関連遺伝子の発現解析

TERT-p 遺伝子の点変異については、当施設で手術を行った髄膜腫 71 例 (80 検体) [WHO grade 51 例 (54 検体) WHO grade 20 例 (26 検体)] を用いて解析を行い、WHO grade において 2 例 (10%) (図 症例 1&2) 認め、いずれも臨床経過は再発を繰り返す難治性の症例であった。TERT 遺伝子発現は凍結保存検体が利用可能であった 38 例 (41 検体) [WHO grade I 29 例 (30 検体) WHO grade II 9 例 (11 検体)] で解析し、WHO grade において 1 例 (図 症例 3) のみ認めた。当症例は TERT-p 遺伝子の点変異は伴っていなかった (上記の TERT-p 変異を認めた 2 例では凍結保存検体が利用できなかったため、TERT 遺伝子発現については解析されていない)。TERT-p 遺伝子の点変異によらない、融合遺伝子などの別の機序により TERT 遺伝子発現が亢進していると考えられた。興味深いことに TERT 遺伝子発現を認めたこの症例は、WHO grade でありながら再発を繰り返す難治例であり、髄膜腫において TERT 遺伝子発現自体が再発性に関与する可能性が示唆された。

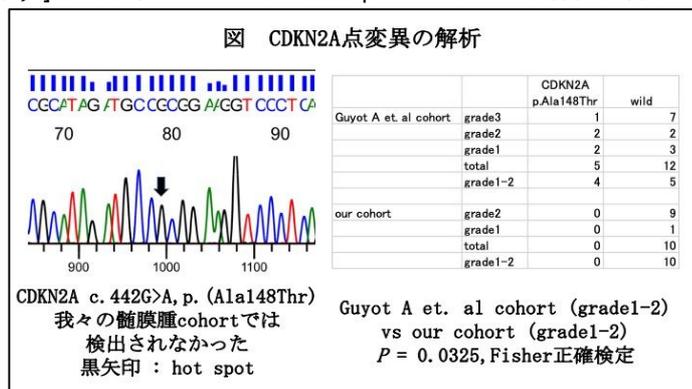


CDKN2A 関連遺伝子の発現は凍結保存検体が利用可能であった 36 例 (40 検体) [WHO grade I 27 例 (29 検体) WHO grade II 9 例 (11 検体)] で解析した。p16INKa や p14ARF、その下流の CDK4/6 や MDM2 の遺伝子発現について、髄膜腫の再発性との相関性は見出せなかった。p16INKa や p14ARF は CDKN2A の欠失により発現が低下するはずだが、そのような症例は認めなかった。我々の解析症例には WHO Grade の髄膜腫が含まれておらず、最近の報告<sup>2,3)</sup>からは CDKN2A の欠失は WHO grade では高い頻度 (51-73%) で認めるが、grade I では認めにくい (各々 0%/11-27%)。今回の解析症例に CDKN2A の欠失症例が含まれていなかった可能性がある (CDKN2A 遺伝子の欠失を MLPA 法で解析が行えなかったため未確認)。

## 2) 髄膜腫臨床検体を用いた CDKN2A の点変異 p.A1a148Thr の解析

当施設で手術を行った髄膜腫 19 例 (28 検体: 同一症例再発時検体含む) [WHO grade I 1 例 (1 検体) WHO grade II 19 例 (27 検体)] を用い、CDKN2A の点変異 p.A1a148Thr の解析を行った。

この点変異の頻度は Anne Guyot らの cohort では WHO grade I/II の再発髄膜腫で 40% 程と報告されているが、我々の cohort では全例で点変異は認めず、cohort 間で変異の頻度に有意差を認めた (図 CDKN2A 点変異の解析、 $P = 0.0325$ )。これには人種差などの理由によって、CDKN2A の点変異 p.A1a148Thr の発生に差がある可能性があり、症例数を増やして更なる検討が必要と考えられた。



## [引用文献]

1. Sahm F et al., DNA methylation-based classification and grading system for meningioma: a multicentre, retrospective analysis, *Lancet Oncol.* 2017 May;18(5):682-694.
2. Sievers P et al., CDKN2A/B homozygous deletion is associated with early recurrence in meningiomas, *Acta Neuropathol.* 2020 Sep;140(3):409-413.
3. Guyot A et al., Analysis of CDKN2A gene alterations in recurrent and non-recurrent meningioma, *J Neurooncol.* 2019 Dec;145(3):449-459.
4. Sahm F et al., TERT Promoter Mutations and Risk of Recurrence in Meningioma, *J Natl Cancer Inst.* 2015 Dec 13;108(5):d1v377.

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 Achiha T, Kijima N, Kodama Y, Kagawa N, Kinoshita M, Fujimoto Y, Nonaka M, Fukai J, Inoue A, Nishida N, Yamanaka T, Harada A, Mori K, Tsuyuguchi N, Uda T, Ishibashi K, Tomogane Y, Sakamoto D, Shofuda T, Yoshioka E, Kanematsu D, Mano M, Luu B, Taylor MD, Kanemura Y, Kishima H	4. 巻 15
2. 論文標題 Activated leukocyte cell adhesion molecule expression correlates with the WNT subgroup in medulloblastoma and is involved in regulating tumor cell proliferation and invasion	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0243272
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0243272	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 阿知波孝宗、木嶋教行、中川智義、平山龍一、木下学、香川尚己、貴島晴彦
2. 発表標題 髄膜癌腫症xenograft modelを用いた腫瘍細胞環境間での遺伝子発現差解析
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 阿知波孝宗、有田英之、梅原徹、横田千里、木下学、香川尚己、貴島晴彦
2. 発表標題 髄膜腫におけるTERTプロモーター変異とTERT遺伝子発現の検索と臨床的意義
3. 学会等名 第78回日本脳神経外科学会総会
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
---------	---------