

機関番号：12601

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20591706

研究課題名 (和文)

悪性神経膠腫の分子標的治療に対する耐性獲得メカニズムの解明と新たな治療戦略の構築
 研究課題名 (英文) The Elucidation of Mechanisms Underlying Resistance to Molecular Targeted Therapy in Malignant Gliomas and Development of Novel Therapeutic Strategy.

研究代表者

武笠 晃文 (MUKASA AKITAKE)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90463869

研究成果の概要 (和文)：

悪性神経膠腫に対する治療抵抗性に関与すると考えられる遺伝子群 Substitute for EGFR* Expression (SE*Es) のなかより、鍵となっている分子を特定し、その機能を明らかにしていくことを目的とした。まず、これらの遺伝子の発現が、実際にヒト悪性神経膠腫、脳腫瘍幹細胞において上昇しているかを確認するため、悪性神経膠腫臨床検体のゲノム遺伝子解析による基本的な分類と脳腫瘍幹細胞株樹立を行い、これらの検体でのゲノムの増幅や遺伝子発現量を調べることにより、重要であると考えられる今後の解析対象となる遺伝子の候補を絞り込むことができた。

研究成果の概要 (英文)：

The aim of this project was to identify key molecules among genes named as Substitute for EGFR* Expression (SE*Es) which are presumed to contribute to the resistance against therapy for malignant glioma, and to clarify their functions. First we categorized clinical specimens of malignant gliomas into basic subclasses based on genetic analyses and established several cell lines of brain tumor stem-like cells. Then to detect whether expressions of SE*E genes are elevated in human malignant gliomas and brain tumor stem-like cells, we investigated genomic amplification and gene expression in these tumor samples and consequently could pick up potentially important candidate genes which are subjected to further analyses.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：脳神経外科学

科研費の分科・細目：脳腫瘍学

キーワード：

①悪性神経膠腫 ②上皮性増殖因子受容体 ③分子標的治療 ④薬剤耐性 ⑤腫瘍幹細胞

1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫は、EGFR の異常な活性化や p53 の変異など限られた数の分子の異常が原因となり形成され、最終的には非常に多様な細胞集団によって構成されることになる。分子標的治療をデザインする上では、果たして、

腫瘍の establishment に必要であったターゲットとされるべきこれらの変異が、この多型性を持った細胞集団の腫瘍増殖および maintenance に依然必要かどうかというのは大切な課題であり、様々な腫瘍にて検討されつつある (Lim KH, Counter CM. Cancer

耐性獲得に関与するというのみでなく、悪性神経膠腫そのものの増殖に本質的に関与している可能性が示唆される。本研究では、以上の様な点をふまえ、これまでに同定した悪性神経膠腫の治療抵抗性に関与すると思われる遺伝子群 SE*Es の *in vivo* での脳腫瘍増殖能への寄与を調べるとともに、その腫瘍原性のメカニズム、および実際の患者の予後との関連について検討することで、新たな予後予測マーカー及び治療のターゲット創造を目標とする。

3. 研究の方法

第1段階として、対象となる遺伝子の発現が、既知の脳腫瘍細胞株、ヒト悪性神経膠腫臨床材料、ヒト正常組織、患者より単離・培養した脳腫瘍前駆細胞様細胞株（脳腫瘍幹細胞）において上昇しているか（もしくは活性化を受けているか）を、定量的PCRや Western blotting などの方法にて確認し、臨床材料においては、実際の患者の治療経過・予後の情報などと照合を行う。

第2段階として、グリオーマ細胞に高発現を認める分子に対しては、その機能阻害を薬剤もしくはノックダウンにて行い、その増殖能、細胞死、細胞周期、足場非依存性増殖能、ヌードマウスにおける腫瘍形成能などを対照群と比較し、遺伝子の細胞内での働きを解析する。また、低発現の分子に関しては発現ベクターによる遺伝子導入を行い同様に機能の解析を行う。

第3段階として、腫瘍増殖能に関連していることが判明した遺伝子に対して、EGFR* との combined targeted therapy を該当する細胞株に対して、*in vitro* 及び *in vivo* で行い、臨床応用への可能性を探る。同時に、機能が明らかでない遺伝子の場合は、その機能解析を行い、脳腫瘍での特に *in vivo* における腫瘍原性のメカニズムの探求を行う。また、研究目的の項で触れた SE*E-1 遺伝子に関しては、これが脳腫瘍幹細胞や神経幹細胞に高発現であることから、これらの細胞内での機能解析により、両者の関連性を探求する。

4. 研究成果

【平成20年度】

本研究は、これまでに同定した悪性神経膠腫に対する分子標的治療を中心とした治療に対する抵抗性に関与する遺伝子群

Substitute for EGFR* Expression (SE*Es) のなかより、脳腫瘍の特に *in vivo* での増殖の鍵となっている分子を特定し、その機能を明らかにしていくことで、新たな治療ターゲットの創造することを目的としている。

まず、これらの遺伝子の発現が、既知の脳腫瘍細胞株、ヒト悪性神経膠腫、脳腫瘍幹細胞

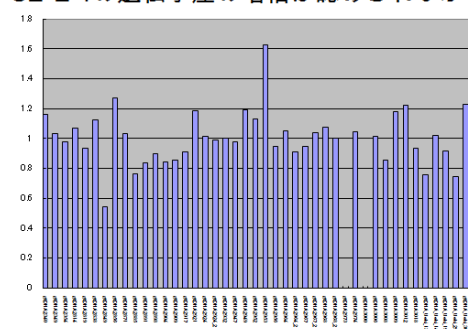
において上昇しているかを、定量的PCRなどの方法にて確認するため、これらの樹立および遺伝子解析による基本的な分類を行った。

臨床検体においては、予後や治療反応性の指標である、IDH 遺伝子の変異、染色体 1p19q の LOH (ヘテロ接合性の喪失)、p53 遺伝子の変異の同定、MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化の解析などを行い、実際の患者の治療経過・予後の情報などの収集するとともに統計解析を実施した。

また、治療抵抗性に注目するにあたり、近年その関与が強く示唆されている脳腫瘍幹細胞における SE*Es 遺伝子の働きが重要であることが予測され、実際 preliminary なデータからは、特定の SE*Es 遺伝子は通常の細胞株では低発現なのに対し、脳腫瘍幹細胞では高発現であることを確認した。そこで、より多くの検体で確認するため臨床手術検体からの脳腫瘍幹細胞の樹立を順次施行した。実際は、報告の多い増殖因子存在下の浮遊培養系を用いると共に、その後のアッセイを容易にするため、接着培養系を用いた脳腫瘍幹細胞の樹立にも努めた。その結果、現在までに今後の解析に有用な脳腫瘍幹細胞株の候補を約 10 株程度手に入れた。

また、SE*Es 遺伝子群の 1 つである SE*E-1 を検討している際に、これ含む染色体の一部が、ヒト悪性神経膠腫において著明に増幅しているという知見をアレイ CGH のデータより得た。そこで、染色体上の本遺伝子の増幅を定量的 PCR 法にて、多数の臨床検体を用いて検証したが、SE*E-1 遺伝子座の増幅は認めず、増幅は近傍の DNA の領域にとどまると考えられた。

SE*E-1の遺伝子座の増幅は認められなかった



SE*E1/LINE1 genomic 定量PCR

【平成21年度】

多形膠芽腫の分子標的治療抵抗性関連遺伝子群から、腫瘍の治療耐性において重要な分子を同定することを目的とし、これら遺伝子の発現をヒト悪性神経膠腫臨床検体において確認するため、遺伝子解析による基本的な腫瘍の分類を、当該年度においても引き続き施行した。

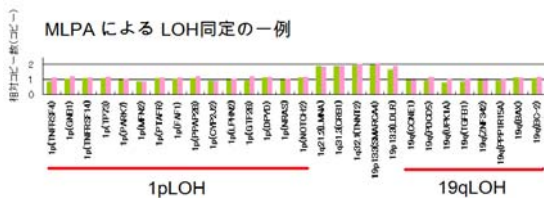
遺伝子の解析は、IDH 遺伝子の変異をダイレクトシーケンスにて、染色体 1p19q の LOH(ヘテロ接合性の喪失)をマイクロサテライト解析にて、p53 遺伝子の変異をシーケンス解析などを行い同定した。

対象は、膠芽腫(GBM) 122 例、退形成星細胞腫(AA) 29 例、びまん性星細胞腫(DA) 27 例、乏突起膠細胞系腫瘍 28 例、毛様細胞性星細胞腫(PA) 4 例の合計 210 例の神経膠腫であった。IDH1 変異の頻度は GBM 15 例(12%)、AA 6 例(21%)、DA 9 例(33%)、乏突起膠細胞系腫瘍 22 例(79%)、PA 0 例(0%)と合計 52 例で認め、1 例の Arg132Cys(C394T)以外の症例においては全て Arg132His(G395A)の置換であった。GBM では二次性膠芽腫に IDH 変異の頻度が 63%と、原発性膠芽腫の 6%と比較して有意に高かった。IDH 遺伝子変異は 1p19qLOH を有する乏突起神経膠腫の 94%と高頻度に認め、両異常に相関が認められた。また、p53 変異を持つ星細胞系腫瘍では特に低悪性度のもので IDH 遺伝子変異を高頻度に認めた。

これらの実験とは別に、手術検体を用いた脳腫瘍幹細胞の樹立も引き続き施行し、脳腫瘍幹細胞株候補を約 10 株以上樹立しており、さらなる性質解析のための検討を行った。これら臨床検体や腫瘍幹細胞は、今後、耐性関連候補遺伝子の発現量を調べる事で、悪性度との相関など非常に有効な基礎データを提供すると考えられる。

【平成 2 2 年度】

従来から行ってきた遺伝子解析による神経膠腫の類型分類を、当該年度においても引き続き施行した。臨床検体においては、IDH 遺伝子、p53 遺伝子の変異、染色体 1p19q の LOH(ヘテロ接合性の喪失)の同定などをするとともに、MGMT 遺伝子プロモーターのメチル化を Methylation-specific PCR(MSP)法により同定し、それぞれの異常と予後との関連を検討した。染色体 LOH に関しては、患者血液が不在のものに関しては、MLPA 法による同定を行った。



対象は昨年度よりさらに 100 例以上追加し、膠芽腫(GBM) 144 例、退形成星細胞腫(AA) 41 例、びまん性星細胞腫(DA) 53 例、乏突起膠細胞系腫瘍 69 例、毛様細胞性星細胞腫(PA) 7 例の合計 314 例の神経膠腫であった。IDH 遺伝子変異の頻度は GBM 17 例(12%)、AA 11 例(27%)、DA 23 例(43%)、乏突起膠細胞系腫瘍 50 例(72%)、PA 0 例(0%)と合計 101 例で認めた。

このうち、IDH2 遺伝子の変異は 5 例(2%)のみであった。

WHO Grade 2 と 3 の神経膠腫においてはMGMT 遺伝子プロモーターメチル化と IDH 遺伝子変異に相関が見られた。

予後との関連を調べ

ると、特に Grade3 の退形成星細胞腫で 1p19qLOH を認めない群にて、IDH 遺伝子変異と無増悪再発期間が有意に相関していた。これら臨床検体と、その遺伝子変異と予後との関連などの臨床データは、今後、耐性関連候補遺伝子の発現量を調べる事で、これら遺伝子の機能解析をする上での非常に有効な基礎データを提供すると考えられる。

5. 主な発表論文等

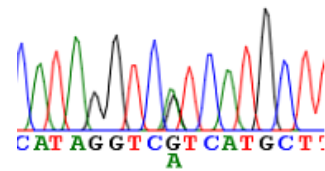
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

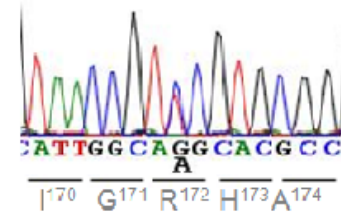
- ① Mukasa A, Wykosky J, Ligon KL, Chin L, Cavenee WK, Furnari F. Mutant EGFR is required for maintenance of glioma growth in vivo, and its ablation leads to escape from receptor dependence. Proc Natl Acad Sci U S A. 査読有. 107 巻. 2010 年. 2616~2621.
- ② Wykosky J, Mukasa A, Furnari F, Cavenee WK. Escape from targeted inhibition: the dark side of kinase inhibitor therapy. Cell Cycle. 査読無. 9 巻. 2010 年. 1611~1662.
- ③ Inda MM, Bonavia R, Mukasa A, Narita Y, Sah DW, Vandenberg S, Brennan C, Johns TG, Bachoo R, Hadwiger P, Tan P, Depinho RA, Cavenee W, Furnari F. Tumor Heterogeneity is an Active Process Maintained by a Mutant EGFR-induced Cytokine Circuit in Glioblastoma. Genes & Development. 査読有. 24 巻. 2010 年. 1731~1745.

[学会発表] (計 7 件)

- ① 武笠晃丈、他: 悪性神経膠腫における変



IDH1 R132H



IDH2 R172K

異型EGF受容体に対する分子標的療法とその治療耐性獲得機構：第28回日本脳腫瘍学会：2010年11月29日：軽井沢プリンスホテル ウエスト（長野県）

- ② 武笠晃丈、他：悪性グリオーマにおけるIDH遺伝子変異と染色体1p19qLOHおよびp53変異の関連とその意義（シンポジウム）：第68回日本脳神経外科学会総会：2010年10月27日：福岡国際会議場（福岡県）
- ③ Mukasa A, et al: Mutant EGFR Signaling is Required for Maintenance of Enhanced In Vivo Glioblastoma Growth and Its Ablation Leads to Escape by Emergence of Receptor-Independent Mechanisms: The 18th International Conference on Brain Tumor Research & Therapy: 2010年5月18日: Travemunde (Germany) .
- ④ 武笠晃丈、他：悪性グリオーマにおけるIDH遺伝子異常の検討：第27回日本脳腫瘍学会：2009年11月8日：全日本ゲートタワーホテル大阪（大阪）
- ⑤ 武笠晃丈、他：悪性神経膠腫における変異型EGF受容体に対する分子標的療法とその治療耐性獲得メカニズムの基礎研究：第68回日本脳神経外科学会総会：2009年10月15日：京王プラザホテル（東京）
- ⑥ 武笠晃丈：神経細胞関連遺伝子群の染色体1p欠失を有するオリゴデンドログリオーマにおける発現：第67回日本脳神経外科学会総会：2008年10月2日：岩手県盛岡市
- ⑦ Mukasa A : The Role of EGFR* Signaling Pathway for Tumor Maintenance and Alternative Pathways in Glioblastoma which Enhance Tumor Growth: The 17th International Conference on Brain Tumor Research & Therapy: June. 10. 2008: Hakodate, Japan.

〔図書〕（計0件）

〔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

東京大学医学部脳神経外科 研究内容

<http://www.h.u-tokyo.ac.jp/neurosurg/kenkyu/kenkyu.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

武笠 晃丈 (MUKASA AKITAKE)

東京大学・医学部附属病院・特任講師

研究者番号：90463869

(2) 研究分担者

田中 実 (TANAKA MINORU)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50332581

(3) 連携研究者

該当者なし