

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 23 日現在

機関番号：21601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24791514

研究課題名(和文) 髄膜腫の悪性サブグループの発生メカニズムを解明する

研究課題名(英文) Epigenetic subclassification and molecular biological research on malignant subgroups of meningiomas

研究代表者

岸田 悠吾 (KISHIDA, YUGO)

福島県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00467292

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：組織学的に良性の髄膜腫にも早期再発や悪性転化をきたす症例が少なからず経験されることから、組織所見とは独立した観点から髄膜腫を再分類し、悪性性格をもつサブグループを同定した。髄膜腫には一部の遺伝子群にDNAメチル化の集積を示す患者群が存在し、複数遺伝子のメチル化レベルが、腫瘍再発の予測マーカーとなりうることを示された。一方これらの遺伝子をもつ機能を検討したが再現性のある結果は得られず、髄膜腫が悪性性格をもつにいたるにはより複雑な要素が関連するものと考えられた。将来にわたる基礎研究のため研究開始とともに設立した脳腫瘍バンクでは髄膜腫を中心に250例を超える頭蓋内腫瘍検体を収集するに至っている。

研究成果の概要(英文)：Some populations of meningiomas show malignant clinical behavior in despite of benign histological diagnosis. In this study, novel diagnostic criteria other than histological classification to determine malignant subgroup of meningiomas is presented. A subgroup of meningiomas is characterized by aberrant hypermethylation of the subset of genes in the early stage of tumorigenesis, and our findings highlight the possibility of speculating potential malignancy of meningiomas by assessing methylation status. On the other hand, molecular biological studies about function of hypermethylated genes didn't show reproducible results. Fukushima medical university brain tumor tissue bank established for basic research has collected over 250 cases of intracranial tumors.

研究分野：脳腫瘍のエピジェネティクス

キーワード：髄膜腫 DNAメチル化 悪性転化

1. 研究開始当初の背景

髄膜腫は頭蓋内原発腫瘍として最多の腫瘍であり、その大部分が病理組織学的には良性と診断される。しかし組織学的良性の髄膜腫にも強い組織浸潤や早期再発などをきたす症例が少なからず経験され、臨床上、しばしば組織診断との乖離が問題となる。一部の髄膜腫が良性の組織所見にも関わらず臨床的悪性性格を呈する原因について分子生物学的観点から研究した報告は乏しく、またそのような患者群を同定するための予測診断マーカーも確立されていない。

我々は基盤研究において髄膜腫の網羅的DNAメチル化解析を行い、特定の遺伝子群におけるDNAメチル化が、腫瘍の再発傾向と強い関連を示すという結果を得た。このことから、組織所見とは独立した因子としてDNAメチル化が髄膜腫の悪性サブグループを同定する診断マーカーになりうると考えた。また、DNAメチル化が髄膜腫の形質変化や臨床的悪性性格の原因となる可能性についても検証するため、本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究における第一の目的は、悪性経過を辿る髄膜腫サブグループを同定する、組織所見とは独立した予測診断システムを確立することである。基盤研究の結果を踏まえ、DNAメチル化に基づいた予測診断システムの構築を図る。

第二の目的は、メチル化が集積する特定の遺伝子群について、その蛋白発現状態を検証しかつ人為的に操作することで、それら遺伝子群の機能的意義を評価し、髄膜腫の形質変化や治療反応性に与える影響を研究することである。さらに、将来にわたる継続的な基礎研究のために、福島県立医科大学脳神経外科内に髄膜腫を中心とする脳腫瘍バンクを設立し、凍結検体の収集保存を開始することも副次的な目的とした。

3. 研究の方法

30例の髄膜腫に対してメチル化マイクロアレイを行った基盤研究の解析結果では、DNAメチル化と高い再発頻度に関連がみられる特定の遺伝子群が同定された。100を超える遺伝子を含むその遺伝子群について、過去に腫瘍との関連を示唆されている遺伝子や多くの遺伝子間のハブとして働くような遺伝子から優先的に選択しながら、pyrosequencing法にて実際のメチル化レベルを定量化する。本研究では、マイクロアレイによる解析結果と定量的結果がよく相関し再現性が確認された複数の遺伝子を抽出して、それらの遺伝子のDNAメチル化定量値に基づいた、易再発性を予測するためのスコアリングシステムを構築する。このスコアリングシステムの精度を基盤研究で用いたものと同数以上のvalidation setにて検証する。

スコアリングシステムでマーカーとして抽出したメチル化遺伝子について、臨床検体や悪性髄膜腫細胞株を用いてwestern blotting等によりその蛋白発現状態を検証するとともに、強制発現或いは強制ノックダウンモデルを作成して遺伝子の機能的意義を研究する。特に、放射線照射や薬剤への反応性など、臨床に応用可能な形質変化がみられるかを重点的に評価する。

脳腫瘍バンクについては、福島県立医科大学倫理委員会に申請し、患者本人、もしくは患者に意思決定能力がない場合に限り家人に同意を得たうえで、髄膜腫を中心に頭蓋内腫瘍検体を凍結保存する。

4. 研究成果

統計手法を用いて、再発傾向の強い髄膜腫群においてDNAの過メチル化を示す113遺伝子を同定した。この内pyrosequencing法にてマイクロアレイ結果とよく相関し安定してメチル化定量ができる5遺伝子(*IGF2BP1*, *HOXA6*, *HOXA9*, *PENK*, *UPK3A*)をマーカーとして抽出し、

メチル化定量値に基づくスコアリングシステムを構築し(図1)、再発との関連を示すカットオフ値を決定した。スコアリングシステムを基盤研究で用いた症例とは別の32例に適用すると、有意差をもって再発頻度との関連を示した(図2)。また悪性転化症例においては、悪性化以前からこれら遺伝子のメチル化レベルが高いことが示され

Gene	HOXA6	HOXA9	UPK3A	IGF2BP1	PENK	Total score : 5-15 points
Methylation ≥30 %	3	3	3	3	3	
≥15 %	2	2	2	2	2	
<15 %	1	1	1	1	1	

た。

図1 DNAメチル化定量値に基づくスコア

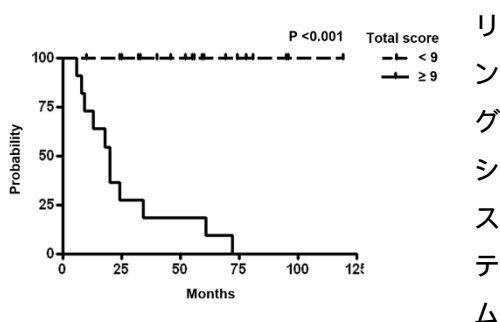
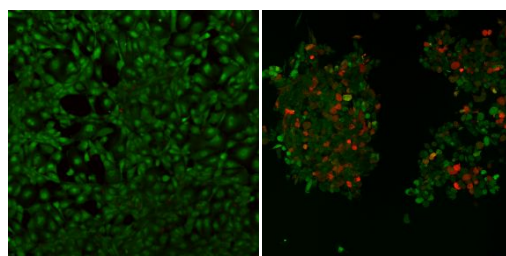


図2 Validation setにおけるスコアリングシステム妥当性の検証

スコアリングシステムでマーカーとして用いた5遺伝子のうち、特に *IGF2BP1*、*HOXA6*、*HOXA9* に着目し、その機能的意義の検証を行った。まず蛍光タンパク質 (cfSGFP2) 融合ベクターと発現抑制用の shRNA レトロウィルスベクターを作成し、2種の悪性髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee、HKBMM) に対し上記3遺伝子の強制発現及び発現抑制モデルの作成を行い、安定した細胞の作成に成功した *IGF2BP1* 遺伝子で研究をすすめた。*IGF2BP1* の強制発現及び発現抑制は細胞増殖能には影響を与えなかった。一方で、悪性髄膜腫細胞株 (HKBMM) で作成した *IGF2BP1* 発現抑制モデルにおいて、放射線耐性が低下し、線量

8Gy 照射 24-48 時間後に著明な細胞死が生じる結果が得られた(図3)。非常に興味深い結果であり再現性の確認実験を繰り返したが、結果が安定せず、標的遺伝子 (*IGF2BP1*) のノックダウン以外の影響による形質変化が出ている可能性が疑われた。細胞株の再取得や別の悪性髄膜腫細胞株 (IOMM-Lee, KT21MG1) の使用、ゲノム切断法によるノックダウン細胞株の作成などを続けたが、放射線感受性に関し、安定して再現性のみられる細胞株は得られず、期間中に結果の証明に至らなかった。

脳腫瘍バンクでは、研究期間終了時まで



に髄膜腫を中心に250例を超える頭蓋内腫瘍の臨床検体が収集され、さらに基礎研究を進めるために凍結保存している。

図3 HKBMM細胞における放射線感受性の変化(8Gy照射48時間後)

左: 野生株、右: *IGF2BP1* ノックダウン細胞株

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1件)
Yugo Kishida, Atsushi Natsume, Yutaka Kondo, Ichiro Takeuchi, Byonggu An, Yasuyuki Okamoto, Keiko Shinjo, Kiyoshi Saito, Hitoshi Ando, Fumiharu Ohka, Yoshitaka Sekido, Toshihiko Wakabayashi. Epigenetic subclassification of meningiomas based on genome-wide DNA methylation analyses. *Carcinogenesis* vol.33 no.2 436-441, 2012

〔学会発表〕(計 1 件)

岸田 悠吾. DNA メチル化からみた髄膜腫の再分類と、その臨床応用. 神経皮膚症候群調査研究班班会議. 2012/12/7. 東京

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

岸田 悠吾 (KISHIDA, Yugo)

福島県立医科大学・脳神経外科学・講師

研究者番号：00467292

(2)研究分担者

和田 郁夫 (WADA, Ikuo)

福島県立医科大学・細胞科学・教授

研究者番号：40182969

井上 直和 (INOUE, Naokazu)

福島県立医科大学・細胞科学・准教授

研究者番号：50379096

(3)連携研究者

()

研究者番号：