

平成 30 年 6 月 17 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2017

課題番号：25290017

研究課題名(和文) グリオーマ好発性トランスジェニックラットの解析

研究課題名(英文) Analysis of transgenic rats prone to brain tumors.

研究代表者

横尾 英明 (YOKOO, HIDEAKI)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40282389

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：膠芽腫はヒト脳腫瘍の中で最も悪性度が高く、頻度も高い腫瘍で、その克服は医学上の大きな課題の1つである。膠芽腫は上皮成長因子受容体(EGFR)シグナル伝達系の異常活性化が腫瘍形成に密接に関連していると考えられており、我々は膠芽腫と分子遺伝学的背景の類似した脳腫瘍を好発する遺伝子改変ラットを開発し、それを用いてさまざまな実験をおこなった。それとともにヒト脳腫瘍の分子遺伝学的解析を進めて、双方の知見を相互的にフィードバックして脳腫瘍に関する新たな知見を得ることを目指し、いくつかの興味ある知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：Glioblastoma is one of common brain tumors and its clinical outcome is usually miserable. Glioblastoma often shows abnormal activation of epidermal growth factor receptor (EGFR) signaling pathway, and the abnormality is believed to be closely linked to tumorigenesis. We developed a novel strain of transgenic rats designed to show constitutional overexpression of v-erbB, a viral homolog of EGFR, and the rat was demonstrated to give rise to brain tumors spontaneously after long-term latency. We performed various experiments using the model rats, together with diversified analyses human brain tumors, and obtained several curious results.

研究分野：病理学

キーワード：脳腫瘍 グリオーマ 疾患モデル動物

1. 研究開始当初の背景

近年、びまん性グリオーマにおける IDH 遺伝子変異や、毛様細胞性星細胞腫、多形黄色星細胞腫、神経節膠腫などにおける BRAF シグナル伝達系の活性化が高頻度に生じていることが報告され、グリオーマの発生過程を解明する上で注目を集めている。しかしこれらはいずれも予後良好群に属し、頻度もやや低い。より高頻度かつ予後不良なのは一次性膠芽腫であり、これこそが悪性グリオーマ克服のための研究の中心であることが改めて浮き彫りになってきたとも言える。現在、膠芽腫の主要な分子遺伝学的異常と目されているのが上皮成長因子受容体(EGFR)シグナル伝達系の異常活性化である。

Ohgaki らは S100 プロモータの制御下に EGFR のウイルスホモログである v-erbB を導入し、EGFR シグナル伝達系がグリア細胞において恒常的に活性化状態にある遺伝子改変ラットを開発した(Ohgaki H, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 65:1111-1117, 2006)。これまでの解析の結果、一定の週齢に達するとほぼ全ての個体に 4 種類のグリオーマが自然発症することが判明した。分子遺伝学的背景がヒトのグリオーマと類似したモデル動物を創出できた意義は大きく、グリオーマ発生と進展の生物学的意義を多角的に解析する上で貴重な動物モデルとして期待されている。

2. 研究の目的

本モデル動物がヒトの悪性グリオーマと分子遺伝学的背景が類似している利点を生かし、腫瘍発生の分子遺伝学的機序の解析、腫瘍形成にかかわると想定される新たな遺伝子変異導入個体の創出と解析、ミクログリアの機能と放射線照射を基軸とした新規の治療戦略の構築などをおこなった。それとともに、近年急速な進歩を示すヒトグリオーマの分子遺伝学的解析を並行的に進めて、それらの知見を相互的にフィードバックして、新たな研究課題の創出を目指した。

3. 研究の方法

本トランスジェニックラットの特徴と有用性は、以下のようにまとめることができる。

- (1)通常の飼育環境下で飼養するだけで、4 種類の悪性および良性のグリオーマを形成する。
- (2)ホモ接合性個体同士の交配で容易に系統維持ができる。
- (3)系統の樹立から 30 世代以上経ても表現型に目立った変化はなく、系統として安定している。
- (4)脳腫瘍形成率(浸透度)がほぼ 100%と極めて高く、しかも形成時期がおおむね一定している。

- (5)ヘテロ接合性個体では腫瘍発生の時期が遅れるが、ほぼ 100%に脳腫瘍が形成される。
- (6)脳腫瘍以外の意図しない有害事象の発生がほとんどない。

このような特徴を踏まえて、以下のような研究を実施した。

- (1)ラットの安定的系統維持と、発生した脳腫瘍の病理組織学的解析
- (2)脳腫瘍内のグリオーマ関連ミクログリアの解析
- (3)p53 ノックアウトラットとの交配実験
- (4)ミクログリアと放射線照射を併用した治療戦略の構築
- (5)ヒト脳腫瘍の病理学と分子遺伝学的解析

4. 研究成果

S100 -v-erbB トランスジェニックラットの系統を維持しつつ、発生した脳腫瘍の検体ならびに遺伝子サンプルの蓄積を通して研究基盤の整備充実を進めた。現在までに 32 世代まで兄妹交配による継代をおこなっているが、表現型に特に大きな変化は認められず、優れた系統の脳腫瘍モデル動物であることが示されている。

得られた脳腫瘍とミクログリア/マクロファージの関連についても解析をおこなった。腫瘍関連マクロファージ(TAM)はヒトグリオーマを含む種々の腫瘍においてその存在が指摘されている。検討には Iba1, CD68, CD163, CD204, Ki-67 に対する抗体を用いた。我々のトランスジェニックラットに発生する malignant glioma は extra-axial position に腫瘍を形成しやすいという特徴があるが、髄内発生の anaplastic oligodendrolioma も含めて非病変部よりも有意に多数の Iba1 陽性細胞の侵入を認め、それらの多くは活性型ミクログリアの形状を有していた。さらに Iba1 陽性細胞数と腫瘍の Ki-67 標識率は有意に正の相関を示した。CD204 は壊死巣や血管増殖の盛んな領域で陽性細胞が出現し、CD68, CD163 は弱陽性の細胞が散在性に認められ、つまり M2 マクロファージマーカーの発現は弱く、この点はヒトグリオーマとはやや異なっていた。これらの結果は、ミクログリアと腫瘍細胞に何らかのシグナル応答の存在を示唆するものであり、ヒトではまだ行われていないミクログリアを介した免疫細胞治療の実験モデルとして本ラットの利用可能性が示唆された。

ヘテロ接合体を創出して発症時期と組織学的特徴を検討したところ、ホモ接合性個体と比較して有意な発症時期の遅延が認められた。また、腫瘍の増殖能を Ki-67 抗原の発現で検討したところ、増殖能もホモ接合性個体を比べて低値を示した。ヘテロ接合体は v-erbB の発現ドースが理論的に半量になっていると考えられ、発現ドースの累積効果が腫瘍形成にかかわるとともに、形成された腫瘍の増殖能に関与することが示唆された。ヒ

ト膠芽腫で EGFR の増幅や過剰発現をする腫瘍が多く存在するが、発現ドースで腫瘍の層別化を行った解析は我々の知る限りなく、ヒト膠芽腫の形成機序を考察するうえでも興味深い結果を得た。

p53 ノックアウトラットとの交配を行い、p53 mut/wt, v-erbB mut/wt という遺伝子型を有する個体を創出して長期観察を試みた。P53 ノックアウトラットはホモ接合性の場合の寿命は数か月程度で、ヘテロ接合性であっても1年未満とされている。死亡する際には種々の悪性腫瘍が全身に形成される。このことが v-erbB の脳腫瘍形成に対して上乗せ効果を発揮するかどうかが目されたが、交配の結果、脳腫瘍を発症して死亡する個体は少数で、それ以前に脳以外の体細胞に悪性腫瘍が形成されて死に至るものが大半を占めた。このことから p53 変異と v-erbB の相乗効果は明らかではなかった。

治療に関する実験もおこなった。本トランスジェニックラットの脳腫瘍の形成が臨床的に明らかになるのが平均 55 週程度であるため、50 週にはミクロレベルの腫瘍が形成されていると仮定し、飼育期間が 50 週に達した個体に対して培養ミクログリアを静注し、その上で頭部に放射線照射をおこなう実験をおこなったところ、ミクログリア静注 + 照射群がその他の群と比較して優位に生存期間が延長した(論文投稿中)。治療抵抗性の高い悪性グリオーマにおいて新たな治療戦略となることが示唆された。

ヒトグリオーマの解析では多くの知見を得た。小児悪性脳腫瘍に BCOR 遺伝子の exon 15 に internal tandem duplication を呈する一群があることを病理学的、分子遺伝学的に明らかにした。

Epithelioid glioblastoma (E-GBM) は新しい WHO 分類に採用された新規組織型であるが、我々の解析の結果、BRAF V600E 変異、TERT promoter 変異、CDKN2A/B の両アレル性欠失が高率に起こることを明らかにし、悪性グリオーマの形成における新たな分子遺伝学的経路の存在を、組織学的特徴とともに見出した。

異型奇形腫様ラブドイド腫瘍 atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) は小児の後頭蓋窩に好発するものが典型であるが、我々はトルコ鞍部に発生する AT/RT の存在を指摘し、それらは成人女性にほぼ限定し、INI1 遺伝子の両側性非対称性変異を特徴とすることを明らかにした。AT/RT に関連して、上衣腫のような一般のグリオーマに二次的に INI1 遺伝子の変異が加わって AT/RT と区別できない組織像を作りうることを見出した。

乏突起膠腫の新たな細胞マーカーとして cyclin D1 と、internexin と共発現する特徴を明らかにした。

IDH1 (R132H) の変異を認識する抗体は免疫染色で IDH1 変異を判定できる抗体として有

用であるが、仮に遺伝子に変異があったとしても蛋白発現が十分でないと判定できない問題があり、恐らくは個々の症例に発現量の違いがあるであろうことを多数の染色例から推定することができた。真に発現量が少ないのか、あるいは検体処理条件で免疫染色が染まらなくなっているのかを見極めたい場合に、野生型 IDH1 を認識する抗体を組み合わせることがその判定の補助になることを見出した。

Olig2 はオリゴデンドロサイトの発生と分化を制御する転写因子で、びまん性グリオーマでは多くの腫瘍細胞の核が陽性となる。この染色性を定量的に評価し、組織学的に乏突起膠腫の場合、Olig2 発現は大多数の腫瘍細胞に見られる一方で、星細胞腫では平均で 50% 未満にとどまることを明らかにした。このようにある程度定量的に評価することで Olig2 の免疫染色により星細胞系、乏突起膠細胞系の腫瘍の鑑別の補助になることが示唆された。

今後の展望として、脳腫瘍の分子遺伝学的研究はこの 5 年間で大きく変貌してきた。我々が主な対象としてきたゲノム解析を中心とした手法から、エピゲノム解析が進み、網羅的なエピゲノム解析を組み合わせた研究の重要性が認識されるようになってきた。もう1つは tumor heterogeneity の問題であり、1つの個体の中に発生した腫瘍も部位ごとに相当な多様性があり、それを踏まえた診断や治療の重要性が認識されるようになった。新たに浮上したこうした課題を踏まえ、個々の腫瘍に対してより高精細な解析を推し進め、それによる緻密な層別化が今後の脳腫瘍研究における研究課題の中心になってくるものと思われる。

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 11 件)

Nobusawa S(2 番目), Yokoo H(18 番目). (他、16 名) CNS high-grade neuroepithelial tumor with BCOR internal tandem duplication: a comparison with its counterparts in the kidney and soft tissue. Brain Pathol (in press)、査読有、doi: 10.1111/bpa.12585.

Nobusawa S(2 番目), Sasaki A(12 番目), Yokoo H(15 番目). (他、12 名) BRAF V600E, TERT promoter mutations and CDKN2A/B homozygous deletions are frequent in epithelioid glioblastomas: A histological and molecular analysis focusing on intratumoral

heterogeneity. Brain Pathol (in press)、
査読有、doi: 10.1111/bpa.12572.

Nobusawa S(2 番目), Yokoo H(14 番目). (他、12 名) Sellar atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT): a clinicopathologically and genetically distinct variant of AT/RT. Am J Surg Pathol, 41(7): 932-940, 2017、査読有、doi: 10.1097/PAS.0000000000000845.

Nobusawa S(6 番目), Ikota H(7 番目), Yokoo H(8 番目). (他、5 名) Concurrent TERT promoter and BRAF V600E mutation in epithelioid glioblastoma and concomitant low-grade astrocytoma. Neuropathology, 37(1): 58-63, 2017、査読有、doi: 10.1111/neup.12365.

Nobusawa S(1 番目), Ikota H(8 番目), Yokoo H(9 番目). (他、6 名) Atypical teratoid/ rhabdoid tumor in the sella turcica of an elderly female with a distinct vascular pattern and genetic alterations. Virchows Arch, 469(6): 711-715, 2016、査読有、DOI: 10.1007/s00428-016-2017-7

Nobusawa S(1 番目), Ikota H(7 番目), Yokoo H(9 番目). (他、6 名) Atypical teratoid/ rhabdoid tumor (AT/RT) arising from ependymoma: a type of AT/RT secondarily developing from other primary central nervous system tumors. J Neuropathol Exp Neurol, 75(2): 167-174, 2016、査読有、DOI: 10.1093/jnen/nlv017

Nobusawa S(2 番目), Ikota H(3 番目), Yokoo H(6 番目). (他、4 名) Coexpression of cyclin D1 and alpha-internexin in oligodendroglial tumors. Brain Tumor Pathol 32(4): 261-267, 2015、査読有、DOI: 10.1007/s10014-015-0228-2

Ikota H(1 番目), Nobusawa S(番目), Yokoo H(7 番目). (他、4 名) Evaluation of IDH1 status in diffusely infiltrating gliomas by immunohistochemistry using anti-mutant and wild type IDH1 antibodies. Brain Tumor Pathol. 32(4): 237-244, 2015、査読有、doi: 10.1007/s10014-015-0222-8.

Nobusawa S(2 番目), Yokoo H(6 番目), Ikota H(8 番目). (他、9 名) Olig2 labeling index is correlated with histological and molecular classifications in low-grade diffuse

gliomas. J Neurooncol. 120: 283-291, 2014、査読有、doi: 10.1007/s11060-014-1568-1.

Nobusawa S(1 番目), Ikota H(7 番目), Yokoo H(8 番目). (他、6 名) Intratumoral heterogeneity of genomic imbalance in a case of epithelioid glioblastoma with BRAF V600E mutation. Brain Pathol. 24: 239-246, 2014、査読有、doi: 10.1111/bpa.12114.

Sasaki A(1 番目), Yokoo H(2 番目). (他、4 名) Characterization of microglia/macrophages in gliomas developed in S100 -v-erbB transgenic rats. Neuropathology. 33: 505-514, 2013、査読有、doi: 10.1111/neup.12015.

〔学会発表〕(計 5 件)

横尾 英明. 新 WHO 分類に基づく脳腫瘍の病理診断を演習形式で学ぼう. 第 106 回日本病理学会、2017

Yokoo H. Practical utility of nestin and Olig2 as immunohistochemical markers for gliomas. 21th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2016

横尾 英明. WHO 脳腫瘍新分類の概要と病理診断に課せられる期待と課題. 第 21 回日本脳腫瘍の外科学会、2016

横尾 英明. The forthcoming WHO brain tumor classification: How should we cope with it? 第 74 回日本医学放射線学会、2015

横尾 英明. Olig2 と脳腫瘍の病理診断 第 72 回日本脳神経外科学会、2013.

〔図書〕(計 4 件)

横尾 英明(分担執筆)他、金原出版、脳腫瘍取扱い規約第 4 版、2018、1-221.

横尾 英明(分担執筆)他、中学医学社、アトラス脳腫瘍病理、2017、1-500.

横尾 英明(分担執筆)他、医学書院、脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第 4 版、2017、1-203.

横尾 英明(分担執筆)他、文光堂、腫瘍病理鑑別診断アトラス 脳腫瘍、2017、1-240.

〔その他〕

ホームページ等

<http://humanpathol.dept.med.gunma-u.ac.jp/index.php>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

横尾 英明 (YOKOO, Hideaki)

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：40282389

(2)研究分担者

伊古田 勇人 (IKOTA, Hayato)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：90420116

信澤 純人 (NOBUSAWA, Sumihito)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：80635318

佐々木 惇 (SASAKI, Atsushi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：80225862

村上 孝 (MURAKAMI, Takashi)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号：00326852

(3)連携研究者

菅原 健一 (SUGAWARA, Kenichi)

琉球大学・医学部・講師

研究者番号：50375573

吉本 由哉 (YOSHIMOTO, Yuya)

群馬大学・重粒子線医学推進機構・助教

研究者番号：80594390

(4)研究協力者

大垣 比呂子 (OHGAKI, Hiroko)