

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 5 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25861257

研究課題名(和文) 乏突起膠腫のエピジェネティックな腫瘍制御因子解析と新規分子診断マーカーの確立

研究課題名(英文) Genetic and epigenetic analysis of oligodendroglioma and establishment of novel diagnostic biomarker

研究代表者

田中 将太 (Tanaka, Shota)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80643725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：乏突起膠腫において染色体1p, 19qのヘテロ接合性の消失は治療反応性や予後を予測する重要なバイオマーカーだが、統一された検査法はなく、サロゲートマーカーとしてmyelin transcription factor 1-like (MYT1L)に着目し、免疫染色で判定可能な抗体の開発研究を企画した。作成済の複数のポリクローナル抗体および市販抗MYT1L抗体はMYT1L強制発現細胞をウェスタンブロット・免疫染色で認識したが、ヒト腫瘍検体を用いた検証でqRT-PCRによるMYT1L発現量との相関はなかった。WHO脳腫瘍分類の2016年改訂で必須となった1p/19q共欠失の判定法の標準化が急務である。

研究成果の概要(英文)：Loss of heterozygosity of chromosome 1p and 19q (LOH1p/19q) is an important predictive and prognostic biomarker in oligodendroglioma. Its testing is problematic in that the methodology varies among institutions and has not been fully standardized. Therefore, we sought to investigate myelin transcription factor 1-like (MYT1L) as a potential surrogate marker on immunohistochemistry. Three polyclonal antibodies previously established as well as two commercial anti-MYT1L antibodies were able to recognize cells forcibly expressing MYT1L, but MYT1L positivity on western blot or immunohistochemistry using any of the above antibodies did not significantly correlate with its expression level on quantitative RT-PCR. Now that testing for LOH1p/19q is mandatory as a molecular diagnosis of the updated WHO classification, its standardization is urgently warranted.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：乏突起膠腫 腫瘍制御因子解析 染色体共欠失

1. 研究開始当初の背景

乏突起膠腫は、最も多い原発性脳腫瘍である神経膠腫の5-6%を占める。大多数(60-80%)に1番染色体短腕(1p)と19番染色体長腕(19q)におけるヘテロ接合性の消失(loss of heterozygosity; LOH)を認め、この染色体異常を伴うものは伴わないものに比べ治療反応性が良く、予後良好であることが知られている¹。一方、他種の神経膠腫である星細胞腫では、乏突起膠腫と異なり1p/19q LOHは稀であるが、実際両者の様相を呈する乏突起神経星細胞腫も存在し、神経病理学者間でも上記三者で病理学的診断の不一致を見ることも少なくない。したがって、むしろ1p/19q LOHの有無によって分類すべきという主張もあり、米国では実際にその分類に基づく第III相臨床試験が進行中である(NCT00887146, NCT00626990)。以上のように乏突起膠腫の診断・治療に欠かすことのできない1p/19q LOHであるが、染色体転座に伴う欠失であることが近年報告された²。しかし残念ながら、こうした染色体レベルの異常から腫瘍発生までの分子生物学的メカニズムの詳細は、未だ解明されていない。

我々は先に、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析で1p/19q LOHを認める乏突起膠腫の遺伝子発現プロファイル調べ、神経細胞に特異的な遺伝子群が高発現していることを報告したが(図1)^{3,4}、最近になり同様の知見が相次いで発表されている⁵。一方、神経系の細胞分化において神経細胞と乏突起膠細胞は相互に高い関連性を持っていることが知られるようになった。例えば神経細胞で発現するASXL1/MESH1は乏突起膠細胞の分化に必要であるし⁶、乏突起膠細胞に特異的なOlig2陽性の前駆細胞が神経細胞に分化しうることも報告された⁷。以上より、乏突起膠腫の起源は乏突起膠細胞および神経細胞の双方に分化しうる機能を持った前駆細胞であるという仮説が立てられている。

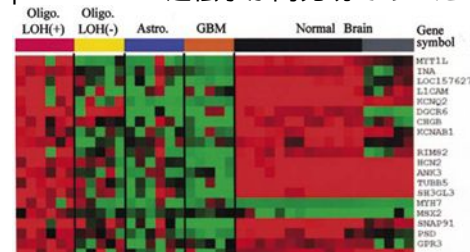
こうした知見を鑑み、乏突起膠腫に特徴的な遺伝子発現、ここでは高発現している神経細胞特異の遺伝子群を探求することが、1p/19q LOHを伴う乏突起神経膠腫の腫瘍発生メカニズムの解明の糸口になるのではないかと、我々は考えた。その中でも特に、myelin transcription factor 1-like(MYT1L)(図2)は神経細胞の分化・増殖への関与が示唆される転写因子で、ヒト線維芽細胞にMYT1Lを含む3つの転写因子を加えることで神経細胞に分化転換可能であることが近年証明され^{8,9}、非常に興味深い。

また、神経膠腫においてプロモーター領域のCpGアイランドに広範なメチル化が見られるサブタイプ(CpG island hypermethylation phenotype; CIMP)は予後良好であることが知られており¹⁰、乏突起膠腫ではCIMPと1p/19q LOHとの間に相関が見られる¹¹。我々の神経膠腫に対する網羅的メチル化解析で

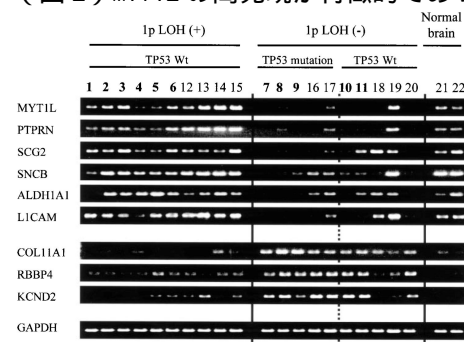
もCIMPの中に乏突起膠腫のクラスターがあり、さらに正常脳と比べて乏突起膠腫クラスターでhypermethylationとなるプローブのうちヒストン関連遺伝子がenrichしていた。DNAのゲノムワイドなメチル化にはisocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)遺伝子変異の影響が大きいと考えられるが、これに加え、MYT1Lを含めたMYT1ファミリーもヒストン脱アセチル化酵素を介し転写制御に関与するという近年の報告¹²を踏まえると、乏突起膠腫の発生におけるエピジェネティックなプロファイル変化に関与している可能性がある。

MYT1Lを初めとした神経細胞特異的な遺伝子群の高発現と患者予後との相関の検証を手始めに、乏突起膠腫における染色体転座に関連する遺伝子異常とMYT1Lとの関係を解析し、また腫瘍発生におけるIDH1及びMYT1Lの関与をメチル化解析・ゲノム解析との統合解析のなかで探究する。診断のみならず治療に役立つ重要な知見がもたらされるものと、大いに期待している。

(図1) LOHのある乏突起膠腫にて proneuronal 遺伝子が高発現であった



(図2) MYT1Lの高発現が特徴的であった



【文献】

- 1) Cairncross G et al. J Clin Oncol 2006;24(18):2707-2714.
- 2) Jenkins et al. Cancer Res 2006;66:9852-9861.
- 3) Mukasa A et al. Oncogene 2002;21(25):3961-3968.
- 4) Mukasa A et al. Brain Pathol 2004;14(1):34-42.
- 5) Ducray A et al. Mol Cancer 2008;7:41.
- 6) Parras CM et al. J Neurosci 2007;27(16):4233-4242.
- 7) Lu QR et al. Cell 2002;109(1):75-86.
- 8) Pang ZP et al. Nature 2011;476:220-224.
- 9) Ambasadhan et al. Cell Stem Cell 2011;9:113-118.
- 10) Noshmeh H et al. Cancer Cell 2010;17:510-522.
- 11) van den Bent MJ et al. Clin Cancer Res 2011;17:7148-7155.
- 12) Romm E et al. J Neurochem 2005;93:1444-1453.

2. 研究の目的

乏突起膠腫で染色体の LOH を伴うタイプは治療反応性で予後良好である。我々がマイクロアレイによる遺伝子発現解析で同定した、そのサブタイプで特異的に高発現する遺伝子群は、腫瘍の生物学的特性を反映し、LOH 以上に鋭敏なバイオマーカーたり得る。免疫染色法でより簡便な乏突起膠腫の予後予測を可能にし、臨床応用したい。

その遺伝子群の中で神経前駆細胞の分化・増殖に關与する MYT1L は、ヒストン關連タンパクを介しエピジェネティックな転写制御を行い、乏突起膠腫の発生や性質決定への寄与が示唆される。我々が現在進める神経膠腫全般のメチル化プロファイルの網羅的解析、次世代シーケンサーを用いたゲノム解析との統合解析を行い、検証する。

3. 研究の方法

1p/19qLOH より簡便な予後マーカーを確立すべく、LOH を有する乏突起膠腫にて特異的に高発現を示す遺伝子群、特に MYT1L に着目し、その免疫染色法を確立する。複数の抗体を比較し、最も特異性の高い抗体を選択し、それを用いた免疫組織化学染色を確立する。その後、多数の臨床検体の免疫染色を行い、臨床データと合わせ患者予後との相関を検証する。また既存のデータから得られる 1p/19q LOH の有無と予後との相関性と比較し、どちらがより有用な予後予測マーカーとなりうるか統計学的検討を加える。

MYT1L の免疫染色の有用性が示された場合、乏突起膠腫に頻発することが知られる遺伝子異常 (CIC, FUBP1) を我々の検体で検査し、MYT1L 発現との関連性を検証する。また、MYT1L により発現調節される遺伝子群を、候補遺伝子のプロモーター領域の解析および、遺伝子導入あるいはノックダウンによる遺伝子発現の変化やプロモーター活性の測定で検討する。さらに乏突起膠腫のゲノムワイドな DNA メチル化解析を行い MYT1L 発現との相関を検討する。最終的には遺伝子導入やノックダウンの方法で、MYT1L の神経前駆細胞、腫瘍細胞の増殖・分化に及ぼす影響を探究する。

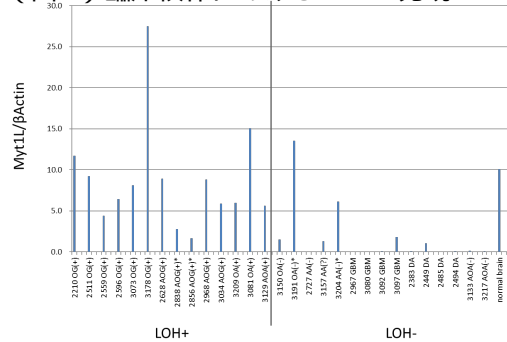
4. 研究成果

乏突起膠腫において染色体 1p,19q LOH は治療反応性や患者予後を予測するうえで重要なバイオマーカーであるが、その確実な判定は必ずしも容易でない。そこでそれに替わるバイオマーカー分子として我々はマイクロアレイによる先行研究から MYT1L に着目し、免疫染色にて容易に判定できる抗体の開発研究を企画した。

まず、患者腫瘍検体における MYT1L の発現を quantitative real-time PCR にて検証した。発現には大きなばらつきがあるものの、LOH 1p/19q を有する腫瘍における発現は LOH を有しない腫瘍に比べて有意に高かった (図

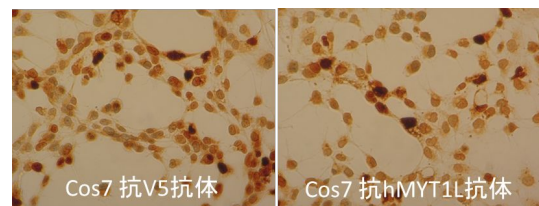
3)。これは、先行する研究におけるマイクロアレイ遺伝子発現解析の結果に合致するものであった。

(図3) 臨床検体における MYT1L 発現

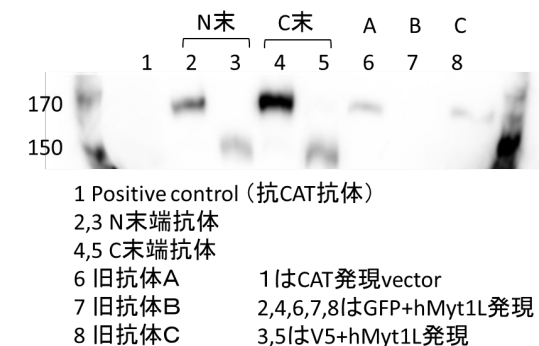


次に、MYT1L を強制発現させた細胞を作成し、先行研究で作成したいくつかのポリクローナル抗体が正常に認識することを確認した。まず、Cos7 および 293T 細胞に MYT1L をトランスフェクションさせた vector を作成した。タグには GFP または V5 を用いた。抗体には、先行する研究で作成済みの、異なる抗原部位に対する 3 種の抗ウサギポリクローナル抗体 (A 抗体・B 抗体・C 抗体) を用いた。V5・MYT1L をトランスフェクションした Cos7 細胞に対する免疫染色では、抗タグタンパク抗体、抗 MYT1L 抗体とも核に局在するシグナルが観察された (図 4)。GFP・MYT1L をトランスフェクションした 293T 細胞に対する Western blotting では、A 抗体・C 抗体で MYT1L のバンドが観察された (図 5)。

(図4) V5+MYT1L をトランスフェクションした Cos7 細胞に対する免疫染色



(図5) MYT1L を強制発現させた 293T 細胞に対する Western blotting



MYT1L 強制発現細胞を A 抗体・C 抗体が正

常に認識しうる事が確認されたため、腫瘍検体を用いて同様に免疫染色および Western blotting を行い、qRT-PCR の結果と照合した。qRT-PCR 上の MYT1L 発現量をもとに高発現グループ 3 検体と低発現グループ 3 検体を抽出。Western blotting に関しては、どの抗体を用いても、また高発現グループに対しても低発現グループに対しても、293T 強制発現細胞と同じ部位にバンドを認めなかった。免疫染色に関しては、A 抗体のみで染色されたものの、低発現グループでも強度の染色が見られ、MYT1L 染色性は発現量に相関していなかった。

引き続き市販の抗 MYT1L 抗体でも同様の検証を行った。N 末端抗体でウェスタンブロットのバンドを認めたが qRT-PCR での発現量と相関せず、免疫染色で高発現群を染色することはできたが、低発現群でも染色が見られた。以上の結果から、作成したポリクローナル抗体を用いても市販の抗 MYT1L 抗体を用いても、Western blotting でのバンドの有無と qRT-PCR 上の MYT1L 発現量、あるいは免疫染色での染色性と qRT-PCR 上の MYT1L 発現量の間に、有意な相関は見られなかった。

MYT1L 以外に、先行研究にて神経系中間系線維 INA も LOH1p/19q と関連していたため、INA の発現を qRT-PCR にて解析した。LOH のない群に比べてある群で有意に発現が高く、MYT1L 発現との相関が見られた。ただし、正常脳と比較した INA の発現の差は LOH のある群でも小さく、MYT1L と同程度であった。

WHO 脳腫瘍分類が 2016 年に改訂となり、分子病理診断として IDH 遺伝子変異と LOH1p/19q の有無の検索が求められることとなった。INA など LOH1p/19q のサロゲートマーカーとなりうる分子の探索は引き続き重要であるが、WHO 分類に LOH 検査が必須になる以上、LOH1p/19q のより正確な判定法・標準化に関する研究も必要不可欠であると思われる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 15 件)

1. Tanaka S, Batchelor TT, Louis DN, Curry WT, Dietrich J. Emerging diagnostic and therapeutic avenues in patients with glioblastoma - no longer a deal end? *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10(1):14-26. (査読有)
2. Chen S, Tanaka S, Giannini C, Morris J, Yan E, Buckner J, Lachance DH, Parney IF. Gliomatosis cerebri: clinical characteristics, management, and outcomes. *J Neurooncol* 2013;112(2):267-75. (査読有)
3. Tanaka S, Meyer FB, Buckner JC, Uhm JH, Yan ES, Parney IF. Presentation, management, and outcome in elderly patients with newly-diagnosed glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 2013;118(4):786-98. (査読有)
4. Tanaka S and Parney IF. Response to Editorial: Glioblastoma in the elderly. *J Neurosurg* 2013;118(4):783-785. (査読有)
5. Tanaka S, Pollock BE, Stafford SL, Link MJ. Stereotactic radiosurgery for trigeminal pain secondary to benign skull base tumors. *World Neurosurg* 2013;80(3-4):371-377. (査読有)
6. Tanaka S, Chi AS, Wen PY, Louis DN, Iafrate AJ, Batchelor TT. Update on glioma treatments in the United States. *Jpn J Neurosurg (Tokyo)* 2013;22(8):590-596. (Jpn) (査読有)
7. Tanaka S. Updates on glioma treatments in the United States. *Clin Neurosci* 2013;31:1151-1153. (Jpn) (査読無)
8. Tanaka S, Shin M, Mukasa A, Hanakita S, Saito K, Koga T, Saito N. Stereotactic radiosurgery for intracranial gliomas. *Neurosurg Clin N Am* 2013;24(4):605-612. (査読有)
9. Fukushima Y, Oya S, Nakatomi H, Shibahara J, Hanakita S, Tanaka S, Shin M, Kawai K, Fukayama M, Saito N. Retreatment relating factors in partially removed meningiomas and significance of dural attachment. *J Neurosurg* 2013;119(6):1373-1379. (査読有)
10. Wakimoto H, Tanaka S, Curry WT, Loebel F, Zhao D, Tateishi K, Chen J, Klofas LK, Lelic N, Kim JC, Dias-Santagata D, Ellisen LW, Borger DR, Fendt SM, Vander Heiden MG, Batchelor TT, Iafrate AJ, Cahill DP, Chi AS. Targetable signaling pathway mutations are associated with malignant phenotype in IDH-mutant gliomas. *Clin Cancer Res* 2014;20(11):2898-909. (査読有)
11. Tanaka S, Saito N. BRAF gene alteration in low-grade glioma. *Clin Neurosci* 2014;32(9):1060-1061. (Jpn) (査読無)
12. Desy NM, Lipinski LJ, Tanaka S, Amrami KK, Rock MG, Spinner RJ. Recurrent intraneural ganglion cysts: Pathoanatomic patterns and treatment implications. *Clin Anatomy* 2015 Nov;28(8):1058-69. (査読有)
13. Hana T*, Tanaka S*, Shin M, Mukasa A, Kugasawa K, Saito N. Neuroendoscopic ventriculo-cisternostomy with stent placement for trapped temporal horn after resection of glioblastoma. *World Neurosurg* 2015 Dec;84(6):2078.e5-8. (*Equal contribution) (査読有)
14. Tanaka S, Saito N. Cerebellar tumors. *Journal of Clinical and Experimental Medicine* 2015;255.10:993-998. (Jpn) (査読無)

15. Tateishi K, Wakimoto H, Iafrate AJ, Tanaka S, Loebel F, Lelic N, Wiederschain D, Bedel O, Deng G, Zhang B, He T, Shi X, Gerszten RE, Zhang Y, Yeh JR, Curry WT, Zhao D, Sundaram S, Nigim F, Koerner MV, Ho Q, Fisher DE, Roider EM, Kemeny LV, Samuels Y, Flaherty KT, Batchelor TT, Chi AS, Cahill DP. Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD+ Depletion. *Cancer Cell* 2015 Dec 14;28(6):773-84. (査読有)

[学会発表](計 18 件)

1. Tanaka S, Batchelor TT, Iafrate AJ, Dias-Santagata D, Borger DR, Ellison LW, Yang D, Louis DN, Cahill DP, Chi AS. Association of PIK3CA-activating mutations with more disseminated disease at presentation and earlier recurrence in glioblastoma. *American Society of Clinical Oncology 49th Annual Meeting*, 2013.6.2; Chicago.
2. 田中將太, Luk S, Chang C, Ho QH, Iafrate JA, Cahill DP, Martuza RL, RabkinSD, Chi AS, 脇本浩明. 分子標的療法前後のペア腫瘍検体を用いたグリオーマ幹細胞モデル. 第 72 回日本脳神経外科学会総会, 2013.10.17, 横浜.
3. Tanaka S, Luk S, Chang C, Iafrate AJ, Cahill DP, Martuza RL, Rabkin SD, Chi AS, Wakimoto H. Establishment of genetically distinct brain tumors stem cells from glioblastoma before and after molecular targeted therapy. *World Federation of Neuro-Oncology 4th Quadrennial Meeting in conjunction with Society for Neuro-Oncology 18th Annual Scientific Meeting*. 2013.11.23; San Francisco.
4. 田中將太, Batchelor TT, Iafrate AJ, Dias-Santagata D, Borger DR, Ellison LW, Yang D, Louis DN, Cahill DP, Chi AS. PIK3CA 遺伝子変異は膠芽腫において初発時の腫瘍進展度と早期再発に相関する. 第 31 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2013.12.8, 宮崎.
5. 田中將太. 膠芽腫における PI3K 経路とその阻害薬. 第 21 回メイヨーニューロサイエンスフォーラム 2014.3.15 大阪. (招聘)
6. 田中將太, Luk S, Chang C, Ho QH, Iafrate JA, Cahill DP, Martuza RL, RabkinSD, Chi AS, 脇本浩明. 分子標的療法前後のペア腫瘍検体を用いたグリオーマ幹細胞モデル 第 29 回日本脳神経外科学会国際学会フォーラム 2014.7.25 東京.
7. 田中將太, 武笠晃丈, 上松右二, 深井順也, 齊藤延人, 脳腫瘍全国統計調査委員会. 成人頭蓋内上衣腫における積極的腫瘍摘出の重要性 (脳腫瘍全国統計調査のデータより). 第 19 回脳腫瘍の外科学会, 2014.9.12, 東京. (シンポジウム)
8. 田中將太. 海外留学体験記: アメリカでの臨床専門研修. 第 73 回日本脳神経外科学会総会, 2014.10.10, 東京. (招聘)
9. 田中將太, 武笠晃丈, 上松右二, 深井順也, 齊藤延人, 脳腫瘍全国統計調査委員会. 日本における成人頭蓋内上衣腫の臨床像と治療成績 (脳腫瘍全国統計調査・希少疾患調査研究). 第 73 回日本脳神経外科学会総会, 2014.10.11, 東京.
10. 田中將太. グリオーマにおける分子標的療法 ~ 現状と展望. 大鵬薬品, 2014.10.15, つくば. (招聘)
11. Tanaka S, Mukasa A, Uematsu Y, Fukai J, Saito N, The Committee of Brain Tumor Registry of Japan. Multi-center retrospective cohort study of adult intracranial ependymoma: Brain Tumor Registry of Japan 2001-2004. *Society for Neuro-Oncology 19th Annual Scientific Meeting*. 2014.11.14; Miami.
12. 田中將太, 佐藤伊織, 武笠晃丈, 成田善孝, 上別府圭子, 齊藤延人. 脳腫瘍患者を対象とした MDASI-BT 日本語版の信頼性・妥当性の評価研究. 第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会, 2014.11.30, 浦安.
13. 田中將太, 武笠晃丈, 上松右二, 深井順也, 齊藤延人, 脳腫瘍全国統計調査委員会. 脳腫瘍全国統計調査データからみる成人頭蓋内上衣腫の治療戦略. 第 48 回ニューロオンコロジーの会, 2015.2.7, 東京.
14. Tanaka S, Sato I, Armstrong TS, Cleeland CS, Mendoza TR, Mukasa A, Narita Y, Kamibeppu K, Saito N. Validation study of the Japanese version of M.D. Anderson Symptom Inventory Brain Tumor Module (MDASI-BT). *American Society of Clinical Oncology 51st Annual Meeting*, 2015.5.29; Chicago.
15. 田中將太, 武笠晃丈, 上松右二, 深井順也, 齊藤延人, 日本脳神経外科学会. 脳腫瘍全国統計調査データからみる成人の再発頭蓋内上衣腫の治療戦略. 第 74 回日本脳神経外科学会総会, 2015.10.15, 札幌.
16. 田中將太, 辛正廣, 武笠晃丈, 齊藤延人. 新型 Brain Access System を用いた脳室内腫瘍に対する低侵襲脳神経外科手術. 第 22 回神経内視鏡学会総会, 2015.11.6, 宮島.
17. Tanaka S, Sato I, Takahashi M, Armstrong TS, Cleeland CS, Mendoza TR, Mukasa A, Narita Y, Kamibeppu K, Saito N. Validation study of the Japanese version of M.D. Anderson Symptom

Inventory Brain Tumor Module
(MDASI-BT). Society for
Neuro-Oncology 20th Annual Scientific
Meeting. 2015.11. 21; San Antonio.

18. 田中將太,佐藤伊織,高橋雅道,Armstrong
TS,Cleeland CS,Mendoza TR,武笠晃丈,
成田善孝,上別府圭子,齊藤延人.脳腫
瘍患者を対象とした MDASI-BT 日本語版
の信頼性・妥当性の評価研究.第33回日
本脳腫瘍学会学術集会,2015.12.6,京都.

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

田中 將太 (SHOTA TANAKA)
東京大学・医学部附属病院・助教
研究者番号:80643725

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし