

令和2年2月5日

小児、若年成人に多い難治性の脳腫瘍の予後不良マーカーの発見 ～ 全ゲノム解析による染色体異常の解析により、新たな治療法の確立へ ～

名古屋大学大学院医学系研究科脳神経外科学の 前田 紗知 大学院生、大岡 史治 助教、夏目 敦至 准教授らは、小児や若年成人に多い難治性の脳腫瘍である H3 K27M 変異型びまん性正中中部神経膠腫^{※1} (diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant) の全ゲノム解析を行い、特徴的な染色体構造異常を発見しました。

難治性脳腫瘍である神経膠腫^{※2} は小児期や若年成人期には脳幹部や脊髄等中枢神経の中心部に発生することが多く、手術も困難であり予後は極めて不良です。このタイプの神経膠腫では *H3F3A* 遺伝子の K27M 変異を認めることが多く、H3 K27M 変異型びまん性正中中部神経膠腫 (diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant : 以下 DMG) と名付けられました。近年、DMG の分子研究は進みつつあり、様々な遺伝子異常、エピゲノム^{※3} 異常が見つっていますが、明確な予後不良の因子は見つかっていません。本研究では、特徴的な *H3F3A* 遺伝子変異^{※4} パターンを示す 4 症例の DMG に対して全ゲノム解析を行ったところ、*H3F3A* 遺伝子領域周辺の染色体構造に異常があることを発見しました。これらの腫瘍はそれぞれ異なるタイプの染色体の構造異常を示しましたが、いずれの症例でも変異型 *H3F3A* 遺伝子をもつ染色体数と野生型 *H3F3A* 遺伝子をもつ染色体数のバランスが崩れており、変異型 *H3F3A* 遺伝子をもつ染色体が優位になっていました。これらの腫瘍では変異型 H3F3A タンパク質 (H3 K27M タンパク質) の発現量が増加しており、特定のエピゲノム異常が、より強く誘導されていました。また、この染色体構造の異常を有する腫瘍は増殖が早く、予後不良であることが明らかになりました。これらにより、今回の研究で *H3F3A* 遺伝子領域の染色体異常が DMG の予後不良の因子であることを初めて同定しました。この染色体異常が予後不良に関わるメカニズムを詳細に解明することで、DMG が悪性性質を獲得するメカニズムの解明につながる可能性があります。

本研究は、英科学誌「Acta Neuropathologica Communications」電子版 (2020 年 2 月 5 日付 (日本時間 10 時)) に掲載されました。

ポイント

- 脳腫瘍の中で最も多い腫瘍の一つである神経膠腫は、脳や脊髄の様々な場所にできる予後の悪い腫瘍です。小児や若年成人では重要な生命機能を司る脳幹部等、中枢神経の中心部にできることも多く、びまん性正中線神経膠腫と呼ばれ、*H3F3A* 遺伝子に変異することがわかっています。その他の遺伝子異常の解析研究も進んでいるものの、予後不良因子は見つかっていません。
- 特徴的な *H3F3A* 遺伝子変異パターンを示すびまん性正中線神経膠腫の全ゲノム解析を行った結果、*H3F3A* 遺伝子変異に加えて同遺伝子部位の染色体構造異常も発見しました。これらの症例では *H3F3A* 遺伝子変異によるエピゲノム変化がより強く誘導されており、予後が不良であることもわかりました。
- 本研究で小児や若年成人の予後の不良な脳腫瘍であるびまん性正中線神経膠腫の悪性性質に関わる染色体異常を初めて見つけました。今後、本腫瘍の有用な予後不良マーカーになると考えられます。

1. 背景

予後の不良な脳腫瘍である神経膠腫は小児期や若年成人期には脳幹部等の中枢神経の中心部位に発生することが多く、手術も困難であり、極めて難治性の脳腫瘍です。脳幹部等の中枢神経の中心部位は、重要な生命機能を司っているため、本腫瘍は組織を採取することも困難であり、少数、少量の腫瘍検体で研究を進めなければならない点が大きな問題となり、未だ予後不良の因子は同定されていません。この因子を見つめることができれば、その悪性性質に関わるメカニズムを解明することで腫瘍が形成する仕組みの解明、新規治療法の発見につながることを期待されていました。

2. 研究成果

当研究グループと宮崎大学脳神経外科にて計 15 例の *H3F3A* 遺伝子変異を示す H3 K27M 変異型びまん性正中線神経膠腫 (diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant; DMG) 症例を同定しており、その症例の遺伝子を解析しました。15 症例の腫瘍の DNA を用いて変異アレル^{※5} 数を定量的に解析することができるドロップレットデジタル PCR(ddPCR)解析を行ったところ、4 例で *H3F3A K27M* 変異型アレル数が野生型アレル数よりも多くなっていることがわかりました。*H3F3A K27M* 変異は通常腫瘍細胞では 2 本のアレルのうち、1 本のアレルのみに見られることがわかっているため (通常、腫瘍組織から得られる全アレル中、変異アレルの頻度は 50%以下)、この現象は *H3F3A* 遺伝子がある染色体の 1 番染色体の染色体構造に異常がある可能性があると考え、これら 4 症例の全ゲノム解析を行いました。全ゲノム解析により染色体のコピー数解析と、1 番染色体上の大多数の人にみられる一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs) ^{※6} の変異アレル頻度解析を行い、ddPCR 解析による *H3F3A K27M* 変異アレル頻度^{※5} を用いて、染色体構造解析を行いました。ヒトの染色体は 1 番から 22 番の常染色体と性染色体 (X 染色体、Y 染色体) がそれぞれ 2 本ずつあり、さらにそれぞれの染色体は短腕と長腕に分かれています (*H3F3A* 遺伝子は 1 番染色体長腕にあります)。2 症例では 1 番染色体の短腕が 1 本、1 番染色体長腕が 3 本になっていることがわかりました。さらに、1 番染色体上の SNPs の変異アレル頻

度を解析し、*H3F3A K27M* 変異のアレル頻度を組み合わせて解析を進めたところ、3本の1番染色体長腕は、1例では3本ともに *H3F3A K27M* 変異型となっていること、1例では2本が *H3F3A K27M* 変異型、1本は *H3F3A* 野生型であることが明らかになりました。1症例では1番染色体の染色体数には異常はありませんでしたが、SNPsの変異

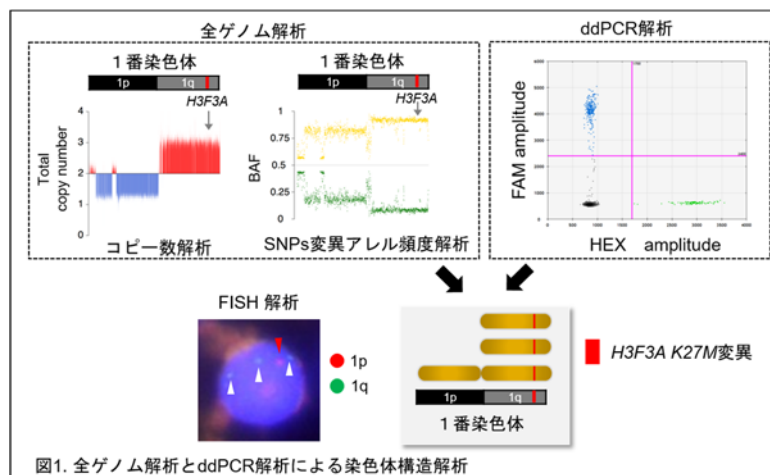


図1. 全ゲノム解析とddPCR解析による染色体構造解析

アレル頻度、*H3F3A K27M* 変異アレル頻度から2本の1番染色体はいずれも *H3F3A K27M* 変異であることがわかりました。また、1症例では1番染色体長腕の *H3F3A* 遺伝子領域周辺の部分欠損があり、残存している1番染色体長腕上に *H3F3A K27M* 変異があることもわかりました。1番染色体短腕、長腕のプローブを用いた FISH 解析^{※7}でも、これらの症例は同様の結果であることがわかりました (図 1)。4 症例ともに *H3F3A K27M* 変異アレルの増加もしくは野生型アレルの欠失によって、その不均衡がおこり *H3F3A K27M* 変異アレル数が優位になっていることがわかりました。これらの4症例では、その他の症例 (低 *H3F3A K27M* 変異アレル頻度群) と比較して、変異型 *H3F3A* タンパク質 (*H3 K27M*) の発現が増加していること、エピゲノム機構の一つであるヒストン修飾^{※3}の *H3K27me3* レベルが減少していることが明らかになりました。近年、

様々ながんで、特に重要な役割を果たしているがん遺伝子では、変異型アレルの増幅もしくは野生型アレルの欠失により不均衡が生じて変異型アレルが優位になる Mutant Allele Specific Imbalance (MASI)^{※8} という現象が同定されています。特に、*KRAS* という遺伝子の変異では膵臓がんや大腸がんにおいて、その MASI が予後不良因子であることが報告されています。本研究でも *H3F3A K27M* 変異に MASI がある4症例はそれ以外の症例 (低 *H3F3A K27M* 変異アレル頻度群) と比較して不良な経過をたどることが明らかになりました

(図 2)。本研究では、これまでに報告されていない *H3F3A K27M* 遺伝子変異の MASI を同定し、MASI を有する症例は予後不良であることが明らかになりました。

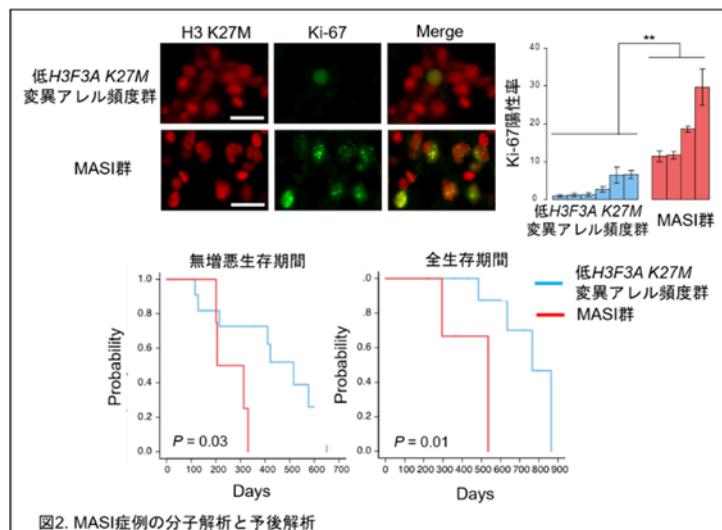


図2. MASI症例の分子解析と予後解析

3. 今後の展開

今後は本研究で同定した *H3F3A K27M* 変異の MASI が DMG の悪性性質に関わるメカニズムの解明を目指します。極めて予後の不良な DMG では、未だ有効性が証明された標準治療は確立されていません。MASI が誘導する分子異常を詳細に解明することで新規治療標的を同定し、新規治療

法の開発につなげます。

4. 用語説明

※1. H3 K27M 変異型びまん性正中線神経膠腫 (Diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant)

小児期から若年成人期に発症することが多い脳腫瘍であり、脳幹部、視床部、脊髄等中枢神経の正中部位に発生する神経膠腫です。発生部位が深部領域であること、重要な機能を司る部位であることから、摘出術は困難であり、組織診断のための組織採取も困難であることが多いです。WHO 分類ではグレード IV に分類され、有効性が証明された化学療法はなく、放射線治療単独で治療されることも多く予後は極めて不良です。近年本腫瘍では後述する *H3F3A K27M* 変異を有することが多いことが同定され、遺伝子解析研究やエピゲノム解析研究が進んでいますが、未だ予後不良因子は同定されていません。

※2. 神経膠腫

脳に原発する原発性脳腫瘍の中で最も多くみられる腫瘍であり、様々な悪性度を示す腫瘍が含まれます。悪性度は WHO 分類で形態学的な特徴により規定されており、WHO グレード IV が最も悪性度の高い腫瘍になります。近年は上記の形態学的な WHO グレーディングに加えて、特定の遺伝子異常の有無が悪性度に大きく関与することが明らかになりました。

※3. エピゲノム

エピゲノムとは DNA の塩基を変換することなく、その遺伝子の発現を調節する機構です。エピゲノム機構は DNA メチル化、ヒストン修飾（ヒストンテールのメチル化、アセチル化等）、クロマチン構造変化等に関わっていることが発見されています。臓器の発生等において重要な役割を果たしていることがわかっていますが、大腸がん等の多くのがん腫で、エピゲノム異常ががんの形成に重要な役割を果たしていることが明らかになりつつあります。

※4. *H3F3A* 遺伝子変異

H3F3A 遺伝子はヒストン H3.3 をコードする遺伝子であり、神経膠腫で初めてその遺伝子変異が同定されました。遺伝子変異部位により *K27M* 変異と *G34R/V* 変異に分けられ、*K27M* 変異はびまん性正中線神経膠腫に多く見られることがわかり、*G34R/V* 変異は若年成人の正中線以外の部位の神経膠腫に多く見られることが明らかになっています。*K27M* 変異の場合、ヒストンテールの 27 番目のリシン(K)がメチオニン(M)に置換されることで遺伝子抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 修飾が減少することが明らかになりました。

※5. アレル (対立遺伝子)

アレルは対立遺伝子と呼ばれ、同じ遺伝子座を占める遺伝子に複数の種類がある場合にその個々の遺伝子を意味します。染色体は 2 本ずつ存在し、多くのがん遺伝子の遺伝子変異は 2 本の染色体のうち 1 本のみにもみられることがわかっています。この場合残りの一本には野生型遺伝子がみられるため、遺伝子変異型アレルの割合（変異型アレル頻度）は 50%になります。

※6. 一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs)

ある生物種集団のゲノムを構成する塩基（アデニン、グアニン、シトシン、チミン）の配列中にその 1 塩基が変異した多様性がみられ、その変異が集団内の 1%以上の頻度で見られる時に一塩基多型 (Single Nucleotide Polymorphism: SNPs) と呼びます。近年ではこの一塩基多型が疾患のか

かりやすさや薬への応答性に関係していることが分かってきています。

※7. FISH (Fluorescence in situ hybridization)解析

蛍光物質や酵素などで標識した特定遺伝子の断片 DNA(プローブ)を染色体に相補的に結合 (ハイブリダイゼーション) させ、蛍光シグナルを測定することで、その領域の増減や染色体中の位置の変化等を調べる解析方法です。染色体の数的異常や構造異常の解析に使用されます。

※8. Mutant Allele Specific Imbalance (MASI)

がん遺伝子は2本の染色体のうち、1本にその遺伝子変異が入ることで悪性性質を獲得しがん化すると考えられています。そのため、多くのがん遺伝子では、がん細胞には1本の遺伝子変異型アレルと、1本の野生型アレルが見られると考えられていますが、近年様々ながん腫でこのバランスが崩れていることが明らかになりました。遺伝子変異型アレルの増幅もしくは、野生型アレルの欠失により 1:1 のバランスが崩れ遺伝子変異型アレル数が優位になること (Mutant Allele Specific Imbalance: MASI) で、特に膵臓がんや大腸がんにおける *KRAS* 遺伝子の場合では予後不良になることが報告されました。*H3F3A K27M* 変異の MASI は未だ発見されていません。

5. 発表雑誌

掲雑誌名 : Acta Neuropathologica Communications (英国時間 2 月 5 日午前 1 時付の電子版)

論文タイトル : *H3F3A* mutant allele specific imbalance in an aggressive subtype of diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant

著者 : Sachi Maeda¹, Fumiharu Ohka^{1*}, Yusuke Okuno², Kosuke Aoki¹, Kazuya Motomura¹, Kazuhito Takeuchi¹, Hironao Kusakari³, Nobuyuki Yanagisawa³, Shinya Sato⁴, Junya Yamaguchi¹, Kuniaki Tanahashi¹, Masaki Hirano¹, Akira Kato¹, Hiroyuki Shimizu¹, Yotaro Kitano¹, Shintaro Yamazaki¹, Shinji Yamashita⁵, Hideo Takeshima⁵, Keiko Shinjo⁶, Yutaka Kondo⁶, Toshihiko Wakabayashi¹, Atsushi Natsume^{1*}.

所属 : 1.Department of Neurosurgery, Nagoya University Graduate School of Medicine, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan

2.Medical Genomics Center, Nagoya University Hospital, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan

3.Department of Pathology, St. Marianna University School of Medicine Yokohama City Seibu Hospital, 1197-1 Yasashi-cho, Asahi-ku, Yokohama, 241-0811, Japan.

4.Molecular Pathology and Genetics Division, Kanagawa Cancer Center Research Institute, 2-3-2 Nakao, Asahi-ku, Yokohama 241-8515, Japan

5.Department of Neurosurgery, Division of Clinical Neuroscience, Faculty of Medicine, University of Miyazaki, 5200, Kiyotake-cho, Kihara, Miyazaki, 889-1601, Japan.

6.Division of Cancer Biology, Nagoya University Graduate School of Medicine, Nagoya, Japan, 65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550, Japan

DOI : <https://doi.org/10.1186/s40478-020-0882-4>

English ver.

https://www.med.nagoya-u.ac.jp/medical_E/research/pdf/Act_Neu_Com_200205en.pdf