

博士論文

論文題目 成人視床神経膠腫におけるヒストン H3.3 変異

氏 名 相原 功輝

目次

1 序文	3
2 目的	7
3 方法	9
4 結果	23
5 考察	38
6 結論	43
引用文献	45
謝辞	52

1 序文

神経膠腫は脳実質内より発生する最も頻度の高い脳腫瘍で、神経膠細胞から発生すると考えられており、病理学的には星細胞腫、乏突起膠腫などがある¹。悪性度により4段階（グレードIからグレードIV、グレードIVが最も悪性度が高い）に分けられ、星細胞腫には毛様細胞性星細胞腫という小児の視神経や小脳によくみられるグレードIの腫瘍が存在するが、手術で全摘出出来れば治癒可能である。グレードII以上は、浸潤性に発育するのが特徴であり理論的な全摘出は不可能である。グレードIIのびまん性星細胞腫、グレードIIIの退形成性星細胞腫、グレードIVの膠芽腫が存在し、5年生存率はそれぞれ68.3%、33.9%、6.9%である²。通常患者は、頭痛や痙攣、また麻痺、失語などの巣症状で発症し、画像診断により脳腫瘍の診断が下され、手術により最終的な病理診断が決定される。摘出術は、大規模な前向き試験による検討は困難なものの、予後延長効果があることが多くのretrospective studyで示されており³、ナビゲーションシステム、脳神経モニタリングなどの手術支援を用い、また機能を有する場所に存在する腫瘍またはその近傍の腫瘍では覚醒下手術なども行い、可能な限り腫瘍を摘出する。グレードIVの膠芽腫において、術後放射線治療へのアルキル化剤であるテモゾロミドの上乗せ効果がStuppらによって報告され（放射線治療単独

群 12.1 ヶ月、テモゾロミド併用群 14.6 ヶ月)⁴、放射線治療とテモゾロミドが手術後の標準治療として行われている。グレードⅢの星細胞腫に対しても同様の治療が行われることが多い。グレードⅡの星細胞腫に対しては、腫瘍が全摘出された場合の5年生存率は90%以上であり経過観察されることが多いが、摘出度が90%以下の場合には早期に放射線治療を行うことが多い。世界的には、RTOG9802試験の結果によりグレードⅡの神経膠腫のハイリスク症例（40歳以上または、40歳未満で部分摘出または生検症例）に対して、放射線治療にprocarbazine、lomustine(CCNU)、vincristine(PCV)の3剤による化学療法の上乗せ効果が認められた⁵。しかし、CCNUが日本では使用出来ないこと、化学療法の選択肢としてテモゾロミドも有効である可能性があること、また放射線治療の副作用である認知機能障害を考慮する必要もあり、標準治療は国内外で様々な議論があるところである。一方、乏突起膠腫にはグレードⅡの乏突起膠腫、グレードⅢの退形成性乏突起膠腫が存在する。乏突起膠腫は星細胞腫に比べ治療反応性が良く、治療成績も良い。5年生存率は、日本の脳腫瘍全国集計調査報告によれば、グレードⅡの乏突起膠腫で87.8%、グレードⅢの退形成性乏突起膠腫で63.0%である²。

通常神経膠腫は大脳半球に存在し、視床部に存在する頻度は低く、全ての脳腫瘍の1%程度である⁶⁻⁸。腫瘍は脳深部に位置するため、ほとんどの場合手術は

診断目的の生検で、治療成績も通常の大脳半球の神経膠腫に比べて悪い⁹。脳腫瘍全国集計調査では、グレードⅢ、Ⅳの高悪性度神経膠腫において、大脳半球の5年生存率が21.0%（前頭葉）から10.0%（側頭葉）であるのに対し、視床を含む rostral brain stem and basal ganglia は7.7%と低い²。

近年、次世代シーケンサーの登場、シーケンスコストの低下、ターゲットエンリッチメント技術の発達などによりゲノム解析技術が飛躍的に発展した¹⁰。今までは、解析したい各領域に対してプライマーを設計し、PCR（polymerase chain reaction）で増幅し、キャピラリーシーケンサーを用いたサンガー法で塩基配列を決定していたのに対し、全エクソン領域やカスタマイズした解析したい領域をキャプチャー法（ターゲット領域のデータベース登録配列から設計したオリゴDNAまたはRNAとのハイブリダイゼーションによりターゲット領域を含んだDNA断片を回収する方法）やPCR法により濃縮し、次世代シーケンサーによって大量に並列に塩基配列が決定出来るようになった。さらにシーケンスコストは年々低下し、癌領域のみならず様々な疾患について塩基配列異常との関係が報告されている¹¹⁻¹⁴。

脳腫瘍の領域も例外ではなく、2012年に小児膠芽腫において30%以上の症例でヒストンH3のバリエーションであるヒストンH3.3をコードするH3F3A（H3 histone, family 3A）遺伝子に体細胞変異があることが報告された¹⁵。その遺伝子

変異には2つのホットスポットがあり、1つは27番目のリシンがメチオニンに変化する変異、もう1つは34番目のグリシンがアルギニンもしくはバリンに変化する変異であった。様々な悪性度、組織型、年齢の748の神経膠腫検体での検討では、*H3F3A* K27M 変異は膠芽腫に、そして若年者（年齢中央値11歳、5-29歳）に認められることが報告された。また Wu らは¹⁶、78%の小児の脳幹部神経膠腫と22%の非脳幹部小児膠芽腫に、*H3F3A* もしくはヒストン H3.1 をコードする *HIST1H3B* (histone cluster 1, H3b) の K27M 変異を認めると報告した。さらに Sturm らは¹⁷、*H3F3A* K27M、G34R/V 変異を持つ神経膠腫はそれぞれ異なった DNA メチル化プロファイルを持つことを示し、またそれぞれ特徴的な腫瘍発生部位があることも報告した。つまり、*H3F3A* G34R/V 変異を持つ腫瘍は大脳半球に位置するのに対し、*H3F3A* K27M 変異を持つ腫瘍は、脳の正中線上（視床、脳幹、脊髄など）に位置した。

2 目的

脳幹部神経膠腫については *H3F3A* K27M 変異について、その頻度や年齢分布、予後への影響などの報告があるが^{16, 18}、視床神経膠腫については未だそのような報告がない。また、ほとんどが小児例である脳幹部神経膠腫と異なり視床神経膠腫は成人に多い腫瘍であることから¹⁹、成人視床神経膠腫における *H3F3A* K27M 変異の頻度や年齢分布、予後への影響を明らかにすることを目的とし、様々な年齢層の患者腫瘍検体を用いて *H3F3A* K27M 変異の有無を調べ、*H3F3A* K27M 変異による全生存期間の違いをカプラン・マイヤー法により検討した。

さらに視床神経膠腫が如何にして腫瘍形成されるのかを調べる為に、ターゲットシーケンスによる網羅的遺伝子変異解析を行い、各腫瘍がどのような遺伝子変異を有するかを検討した。ターゲットシーケンスのキャプチャー領域を決定した後に *TERT* プロモーター領域の遺伝子変異が報告され^{20, 21}、神経膠腫でも高頻度に認められることが分かった為²²、同部位については追加でサンガーシーケンスにて解析した。

また神経膠腫は *H3F3A* K27M, *G34R/V*, *IDH* 変異などの遺伝子変異によって異なるメチル化プロファイルを持つことが知られており¹⁷、裏を返せば、メチル化プロファイルを見ることで、どのような成り立ちの腫瘍かを推察することが

可能である。アレイ技術を用いた網羅的メチル化解析により各腫瘍がどのようなメチル化プロファイルを持つのかも合わせて検討した。

3 方法

対象患者と検体

1997年4月から2013年3月までに、東京大学医学部附属病院または国立がん研究センター中央病院で治療を受けた16歳以上の視床神経膠腫の患者27名を対象とした。病理診断は各施設の神経病理を専門とする病理医が行い、WHO分類¹に沿って診断を行った。27例の病理診断の内訳は、膠芽腫(glioblastoma, GBM) 15例、退形成性星細胞腫(anaplastic astrocytoma, AA) 9例、びまん性星細胞腫(diffuse astrocytoma, DA) 3例であった(表1)。3例のびまん性星細胞腫の内2例は両側性であったのに対し、ほとんどの高悪性度神経膠腫では片側性であった(左12例、右11例、両側性1例)(図1)。

表 1 症例一覽

Sample ID	Age	Tumor localization	Overall survival (months)	Surgery	Treatment
GBM 1 ^{a,b}	17	Right thalamus	8.9	PR	RT+TMZ
AA 1	19	Bilateral thalamus	30.6	biopsy	RT+ACNU
AA 2 ^{a,b}	20	Left thalamus	9.9	biopsy	RT+TMZ
GBM 2 ^{a,b}	27	Multiple ^d	3.8	PR	RT+TMZ
GBM 3 ^{a,b}	34	Right thalamus	12.6	STR	RT+ACNU
AA 3	37	Right thalamus	26.1	biopsy	RT+TMZ
GBM 4 ^{a,b}	38	Left thalamus	9.8	biopsy	RT+TMZ
AA 4	38	Left thalamus	17.7	biopsy	RT+ACNU
GBM 5 ^{a,b}	39	Right thalamus	10.4	PR	RT+TMZ
AA 5 ^b	41	Left thalamus	20.6	PR	RT+TMZ
AA 6 ^{a,b}	43	Left thalamus	15.6	biopsy	RT+TMZ
GBM 6	45	Left thalamus	30.8	biopsy	RT+ACNU
GBM 7 ^{a,b}	46	Right thalamus	1.6 ^f	GTR	RT+TMZ
AA 7	47	Right thalamus	24.3	biopsy	RT+ACNU
GBM 8	48	Left thalamus	65.8	biopsy	RT+TMZ
GBM 9 ^b	50	Right thalamus	3.9	biopsy	RT+TMZ
GBM10	53	Left thalamus	7.3	biopsy	RT+TMZ
AA 8 ^{a,b,c}	57	Multiple ^e	110.2 ^f	biopsy	RT+ACNU
GBM 11 ^{a,b,c}	62	Left thalamus	19.4	biopsy	RT+TMZ
GBM 12	64	Left thalamus	30.4	STR	RT+TMZ
GBM 13 ^a	71	Left thalamus	3.5	biopsy	RT+TMZ
GBM 14	73	Left thalamus	17.9	biopsy	RT+TMZ
GBM 15	73	Right thalamus	0.7	biopsy	RT+TMZ
AA 9	78	Right thalamus	0.3	biopsy	No therapy
DA 1	28	Bilateral thalamus	21.1	biopsy	
DA 2 ^a	29	Bilateral thalamus	9.2 ^f	biopsy	
DA 3	30	Left thalamus	124.4 ^f	biopsy	

a : specimen subjected to targeted sequence analysis,

b : specimen subjected to global methylation analysis, c : specimen of recurrence

d : right thalamus, left temporal lobe and fourth ventricle

e : right thalamus, left cerebellopontine angle, cerebellum surface and fourth ventricle

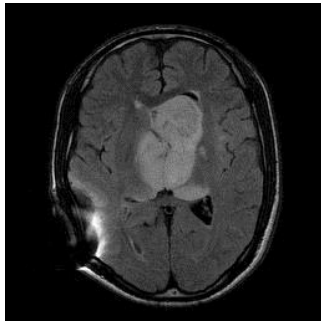
f : still alive at last follow-up

GBM : glioblastoma, AA : anaplastic astrocytoma, DA : diffuse astrocytoma

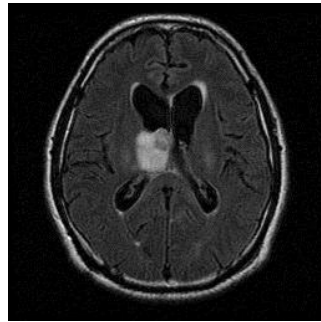
GTR : gross total resection, STR : subtotal resection, PR : partial resection

RT : radiotherapy, TMZ : temozolomide, ACNU : nimustine hydrochloride

図 1 視床神経膠腫症例の画像例。MRI FLAIR 強調画像（軸位像）を提示している。AA1 は両側視床に腫瘍を認め、AA8 は右視床に腫瘍を認める。



AA1



AA8

27 例の内 16 例で使用可能な凍結腫瘍検体が保存されており、その 16 例の内
の 14 例で正常血液検体も使用可能であった。さらに凍結腫瘍検体が存在しない
11 例についても 4 例はホルマリン固定パラフィン包埋組織が使用可能であった。

この研究は、東京大学医学部附属病院、国立がん研究センター中央病院、両
方での倫理委員会にて承認を受けており、各患者より同意文書を取得した。（審
査承認番号 G10028-(2)）

DNA 抽出

AllPrep DNA/RNA Micro kit（Qiagen）を使用し、説明書通りに凍結腫瘍検体よ
りゲノム DNA を抽出した。使用した凍結腫瘍検体は生検術による微小な検体が

多かった為、DNA を抽出した凍結腫瘍検体そのものの病理組織の観察は困難であった。ホルマリン固定パラフィン包埋組織からは、病理学的観察により腫瘍細胞が存在する部分の腫瘍組織を採取し、まずキシレンにて脱パラフィン処理を行い、QIAamp DNA Mini kit (Qiagen) にてゲノム DNA を抽出した。また、血液検体より DNA extraction kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA を抽出した。

H3F3A 遺伝子のサンガーシーケンス

腫瘍 DNA が得られた 20 例について、H3F3A 遺伝子のサンガーシーケンスを行った。K27、G34 領域を含むようにプライマーを設計し (forward 5'-TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA -3', reverse 5'-GGTTTCTTCACCCCTCCAGT -3'; product size : 152 bp)、KOD-plus (Toyobo) を用いターゲット領域を PCR で増幅し、PCR 産物を 2% アガロースゲル電気泳動で確認した。QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen) で PCR 産物の純化を行った後、Big Dye Terminator kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応を行い、ABI 3130xl capillary sequencer (Applied Biosystems) にて両方のストランドの塩基配列解析を行った。

ターゲットシーケンス

腫瘍由来ゲノム DNA と血液（正常）由来ゲノム DNA の両方が存在する 14 例について、Haloplex system（Agilent）を用いて、639 遺伝子のターゲットシーケンスを行った（表 2）。639 遺伝子は、*H3F3A* や *HIST1H3B* の他に、神経膠腫で高頻度に変異が認められる遺伝子（例えば *IDH1/2*（isocitrate dehydrogenase 1/2）、*ATRX*（alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked）、*TP53*（tumor protein p53）、*NF1*（neurofibromin 1）、*EGFR*（epidermal growth factor receptor）、*PDGFRA*（platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide）など）や癌一般に高頻度に変異が認められる遺伝子、クロマチン修飾に関わる遺伝子、ミスマッチ修復遺伝子を含めた。このクロマチン修飾に関わる遺伝子の中には、ヒストン 3 の 27 番目のリシンに修飾を与える H3K27 メチル基転移酵素の遺伝子である *EZH2*（enhancer od zeste 2 polycomb repressive complex 2 subunit）や H3K27 脱メチル化酵素の遺伝子である *KDM6A*（lysine(K)-specific demethylase 6A）、H3K27 アセチル転移酵素の遺伝子である *EP300*（E1A binding protein p300）、*CREBBP*（CREB binding protein）を含めた。

表 2 ターゲットシーケンスで解析した 639 遺伝子

・神経膠腫関連遺伝子（報告のあるクロマチン修飾に関わる遺伝子も含む）

<i>ATRX</i>	<i>CDKN2A</i>	<i>CIC</i>	<i>DAXX</i>	<i>EGFR</i>	<i>FUBP1</i>
<i>H3F3A</i>	<i>HIST1H3B</i>	<i>IDH1</i>	<i>IDH2</i>	<i>NF1</i>	<i>PDGFRA</i>
<i>PIK3CA</i>	<i>PIK3R1</i>	<i>NOTCH1</i>	<i>NOTCH2</i>	<i>PTEN</i>	<i>RB1</i>
<i>TP53</i>	<i>SMARCA4</i>	<i>ARID1A</i>	<i>ARID1B</i>	<i>BAP1</i>	<i>BMI1</i>
<i>BRAF</i>	<i>EZH2</i>	<i>KDM5A</i>	<i>KDM5B</i>	<i>KDM5C</i>	<i>KDM6A</i>
<i>MLL</i>	<i>MLL2</i>	<i>MLL3</i>	<i>MLL4</i>	<i>SETD2</i>	<i>SMARCA2</i>
<i>SMARCA5</i>	<i>SMARCC2</i>	<i>TET2</i>			

・癌関連遺伝子

<i>ABL1</i>	<i>ABL2</i>	<i>ACVR2A</i>	<i>ADAMTS20</i>	<i>AFF1</i>	<i>AFF3</i>
<i>AKAP9</i>	<i>AKT1</i>	<i>AKT2</i>	<i>AKT3</i>	<i>AKTIP</i>	<i>ALK</i>
<i>APC</i>	<i>APE</i>	<i>AR</i>	<i>ARAF</i>	<i>ARFRP1</i>	<i>ARNT</i>
<i>ATF1</i>	<i>ATM</i>	<i>ATR</i>	<i>AURKA</i>	<i>AURKB</i>	<i>AURKC</i>
<i>AXL</i>	<i>BAI3</i>	<i>BARD1</i>	<i>BCL10</i>	<i>BCL11A</i>	<i>BCL11B</i>
<i>BCL2</i>	<i>BCL2A1</i>	<i>BCL2L1</i>	<i>BCL2L2</i>	<i>BCL3</i>	<i>BCL6</i>
<i>BCL9</i>	<i>BCLAF1</i>	<i>BCR</i>	<i>BIRC2</i>	<i>BIRC3</i>	<i>BIRC5</i>
<i>BLM</i>	<i>BLNK</i>	<i>BMPR1A</i>	<i>BMX</i>	<i>BRCA1</i>	<i>BRCA2</i>
<i>BRD3</i>	<i>BRIP1</i>	<i>BTK</i>	<i>BUB1B</i>	<i>CARD11</i>	<i>CASC5</i>
<i>CBL</i>	<i>CCM1</i>	<i>CCM2</i>	<i>CCM3</i>	<i>CCND1</i>	<i>CCND2</i>
<i>CCND3</i>	<i>CCNE1</i>	<i>CD79A</i>	<i>CD79B</i>	<i>CDC42BPA</i>	<i>CDC42BPB</i>
<i>CDC73</i>	<i>CDH1</i>	<i>CDH11</i>	<i>CDH2</i>	<i>CDH20</i>	<i>CDH23</i>
<i>CDH5</i>	<i>CDK12</i>	<i>CDK4</i>	<i>CDK6</i>	<i>CDK8</i>	<i>CDKN2B</i>
<i>CDKN2C</i>	<i>CEBPA</i>	<i>CHEK1</i>	<i>CHEK2</i>	<i>CKS1B</i>	<i>CMPK1</i>
<i>CNTN1</i>	<i>COL1A1</i>	<i>CRBN</i>	<i>CREB1</i>	<i>CRKL</i>	<i>CRLF2</i>
<i>CRTC1</i>	<i>CSF1R</i>	<i>CSMD3</i>	<i>CTNNA1</i>	<i>CTNNB1</i>	<i>CYLD</i>
<i>CYP2C19</i>	<i>CYP2D6</i>	<i>DCC</i>	<i>DDB2</i>	<i>DDIT3</i>	<i>DDR2</i>
<i>DEK</i>	<i>DICER1</i>	<i>DNAH8</i>	<i>DPYD</i>	<i>DST</i>	<i>ELAVL1</i>
<i>EML4</i>	<i>EPHA10</i>	<i>EPHA3</i>	<i>EPHA4</i>	<i>EPHA5</i>	<i>EPHA6</i>
<i>EPHA7</i>	<i>EPHB1</i>	<i>EPHB4</i>	<i>EPHB6</i>	<i>ERBB2</i>	<i>ERBB3</i>
<i>ERBB4</i>	<i>ERC1</i>	<i>ERCC1</i>	<i>ERCC2</i>	<i>ERCC3</i>	<i>ERCC4</i>
<i>ERCC5</i>	<i>ERG</i>	<i>ESR1</i>	<i>ESR2</i>	<i>ETS1</i>	<i>ETV1</i>

<i>ETV4</i>	<i>EXT1</i>	<i>EXT2</i>	<i>FAM123B</i>	<i>FANCA</i>	<i>FANCC</i>
<i>FANCD2</i>	<i>FANCF</i>	<i>FANCG</i>	<i>FAS</i>	<i>FAT3</i>	<i>FBXW7</i>
<i>FGFR1</i>	<i>FGFR2</i>	<i>FGFR3</i>	<i>FGFR4</i>	<i>FH</i>	<i>FLCN</i>
<i>FLI1</i>	<i>FLT1</i>	<i>FLT3</i>	<i>FLT4</i>	<i>FN1</i>	<i>FOXL2</i>
<i>FOXO1</i>	<i>FOXO3</i>	<i>FOXP1</i>	<i>FOXP4</i>	<i>FRK</i>	<i>FZR1</i>
<i>G6PD</i>	<i>GABRA6</i>	<i>GATA1</i>	<i>GATA2</i>	<i>GATA3</i>	<i>GDNF</i>
<i>GNA11</i>	<i>GNAQ</i>	<i>GNAS</i>	<i>GPR124</i>	<i>GRM8</i>	<i>GUCY1A2</i>
<i>HCAR1</i>	<i>HCC1</i>	<i>HDAC5</i>	<i>HIF1A</i>	<i>HIF2A</i>	<i>HLF</i>
<i>HNF1A</i>	<i>HNF1B</i>	<i>HNRPA1L3</i>	<i>HNRPA3</i>	<i>HNRPC</i>	<i>HNRPK</i>
<i>HNRPM</i>	<i>HNRPU</i>	<i>HNRPX</i>	<i>HOOK3</i>	<i>HOXA3</i>	<i>HRAS</i>
<i>HSP90AA1</i>	<i>HSP90AB1</i>	<i>ICK</i>	<i>IGF1R</i>	<i>IGF2</i>	<i>IGF2R</i>
<i>IGFBP3</i>	<i>IKBKB</i>	<i>IKBKE</i>	<i>IKZF1</i>	<i>IL2</i>	<i>IL21R</i>
<i>IL6ST</i>	<i>IL7R</i>	<i>ING4</i>	<i>INHBA</i>	<i>INSR</i>	<i>IRAK2</i>
<i>IRF4</i>	<i>IRS2</i>	<i>ITGA10</i>	<i>ITGA9</i>	<i>ITGB2</i>	<i>ITGB3</i>
<i>ITK</i>	<i>JAK1</i>	<i>JAK2</i>	<i>JAK3</i>	<i>JUN</i>	<i>KDR</i>
<i>KEAP1</i>	<i>KIT</i>	<i>KLF6</i>	<i>KMO</i>	<i>KRAS</i>	<i>LAMP1</i>
<i>LCK</i>	<i>LIFR</i>	<i>LPHN3</i>	<i>LPP</i>	<i>LRP1B</i>	<i>LRP6</i>
<i>LTF</i>	<i>LTK</i>	<i>MAF</i>	<i>MAFB</i>	<i>MAGEA1</i>	<i>MAG11</i>
<i>MALT1</i>	<i>MAML2</i>	<i>MAP2K1</i>	<i>MAP2K2</i>	<i>MAP2K4</i>	<i>MAP3K7</i>
<i>MAPK1</i>	<i>MAPK8</i>	<i>MARK1</i>	<i>MARK4</i>	<i>MAST1</i>	<i>MBD1</i>
<i>MCL1</i>	<i>MDM2</i>	<i>MDM4</i>	<i>MECOM</i>	<i>MED13L</i>	<i>MEN1</i>
<i>MET</i>	<i>MGA</i>	<i>MITF</i>	<i>MLL10</i>	<i>MMP2</i>	<i>MN1</i>
<i>MPG</i>	<i>MPL</i>	<i>MRE11A</i>	<i>MTOR</i>	<i>MTR</i>	<i>MTRR</i>
<i>MUC1</i>	<i>MUSK</i>	<i>MUTYH</i>	<i>MYB</i>	<i>MYC</i>	<i>MYCL1</i>
<i>MYCN</i>	<i>MYD88</i>	<i>MYH11</i>	<i>MYH9</i>	<i>NBN</i>	<i>NCBP1</i>
<i>NCBP2</i>	<i>NCOA1</i>	<i>NCOA2</i>	<i>NCOA4</i>	<i>NF2</i>	<i>NF45</i>
<i>NFE2L2</i>	<i>NFKB1</i>	<i>NFKB2</i>	<i>NIN</i>	<i>NKX2-1</i>	<i>NLRP1</i>
<i>NOTCH4</i>	<i>NPM1</i>	<i>NRAS</i>	<i>NSD1</i>	<i>NTRK1</i>	<i>NTRK2</i>
<i>NTRK3</i>	<i>NUMA1</i>	<i>NUP214</i>	<i>NUP98</i>	<i>OBSCN</i>	<i>PAK3</i>
<i>PALB2</i>	<i>PARP</i>	<i>PARP1</i>	<i>PAX3</i>	<i>PAX5</i>	<i>PAX7</i>
<i>PAX8</i>	<i>PBX1</i>	<i>PDE4DIP</i>	<i>PDGFB</i>	<i>PDGFRB</i>	<i>PER1</i>
<i>PGAP3</i>	<i>PHF6</i>	<i>PHKA2</i>	<i>PHLPP2</i>	<i>PHOX2B</i>	<i>PIK3C2B</i>
<i>PIK3CB</i>	<i>PIK3CD</i>	<i>PIK3CG</i>	<i>PIK3R2</i>	<i>PIM1</i>	<i>PKHD1</i>
<i>PLAG1</i>	<i>PLCG1</i>	<i>PLEKHG5</i>	<i>PML</i>	<i>POT1</i>	<i>POU5F1</i>
<i>POU6F1</i>	<i>PPARG</i>	<i>PPP1R13L</i>	<i>PPP2R1A</i>	<i>PRDM1</i>	<i>PRKARIA</i>

<i>PRKDC</i>	<i>PRPF39</i>	<i>PRPF40A</i>	<i>PRPF40B</i>	<i>PRPF4B</i>	<i>PSIP1</i>
<i>PTCH1</i>	<i>PTCH2</i>	<i>PTGS2</i>	<i>PTPN11</i>	<i>PTPRD</i>	<i>PTPRT</i>
<i>RAD50</i>	<i>RAD51C</i>	<i>RAD51L3</i>	<i>RAF1</i>	<i>RALGDS</i>	<i>RANBP17</i>
<i>RARA</i>	<i>RASAL1</i>	<i>RBMX</i>	<i>RECQL4</i>	<i>REL</i>	<i>RET</i>
<i>RHOH</i>	<i>RICTOR</i>	<i>RNASEL</i>	<i>RNF2</i>	<i>RNF213</i>	<i>ROS1</i>
<i>RPS6KA2</i>	<i>RPS6KC1</i>	<i>RPTOR</i>	<i>RRM1</i>	<i>RSF1</i>	<i>RUNX1</i>
<i>RUNX1T1</i>	<i>SAMD9</i>	<i>SBDS</i>	<i>SDHA</i>	<i>SDHB</i>	<i>SDHC</i>
<i>SDHD</i>	<i>SEPT9</i>	<i>SF1</i>	<i>SF3A1</i>	<i>SF3A2</i>	<i>SF3A3</i>
<i>SF3B1</i>	<i>SF3B14</i>	<i>SF3B2</i>	<i>SF3B3</i>	<i>SF3B4</i>	<i>SF3B5</i>
<i>SFPQ</i>	<i>SFRS18</i>	<i>SFRS2</i>	<i>SFRS2IP</i>	<i>SFRS3</i>	<i>SFRS4</i>
<i>SFRS5</i>	<i>SFRS6</i>	<i>SFRS9</i>	<i>SGK1</i>	<i>SH2D1A</i>	<i>SMAD2</i>
<i>SMAD3</i>	<i>SMAD4</i>	<i>SMC3</i>	<i>SMO</i>	<i>SMUG1</i>	<i>SOCS1</i>
<i>SOX10</i>	<i>SOX11</i>	<i>SOX2</i>	<i>SPEG</i>	<i>SPI1</i>	<i>SPRED2</i>
<i>SRC</i>	<i>SREBP1</i>	<i>SRSF10</i>	<i>SRSF7</i>	<i>SSX1</i>	<i>STAG2</i>
<i>STAT3</i>	<i>STK11</i>	<i>STK36</i>	<i>SUFU</i>	<i>SYK</i>	<i>SYNE1</i>
<i>TAF1</i>	<i>TAF1L</i>	<i>TAL1</i>	<i>TBX22</i>	<i>TCF12</i>	<i>TCF3</i>
<i>TCF7L1</i>	<i>TCF7L2</i>	<i>TCL1A</i>	<i>TFE3</i>	<i>TGFBR2</i>	<i>TGM7</i>
<i>THBS1</i>	<i>TIE1</i>	<i>TIMP3</i>	<i>TLR4</i>	<i>TLX1</i>	<i>TNFAIP3</i>
<i>TNFRSF14</i>	<i>TNK2</i>	<i>TNKS</i>	<i>TNKS2</i>	<i>TOP1</i>	<i>TPR</i>
<i>TRA2A</i>	<i>TRAF3</i>	<i>TRIM24</i>	<i>TRIM27</i>	<i>TRIM33</i>	<i>TRIP11</i>
<i>TRPS1</i>	<i>TRRAP</i>	<i>TSC1</i>	<i>TSC2</i>	<i>TSHR</i>	<i>TTL5</i>
<i>TYK2</i>	<i>U2AF1</i>	<i>U2AF2</i>	<i>UBR5</i>	<i>UGT1A1</i>	<i>UMODL1</i>
<i>USP9X</i>	<i>VEGFA</i>	<i>VEGFR</i>	<i>VHL</i>	<i>WAS</i>	<i>WHSC1</i>
<i>WNK2</i>	<i>WNK3</i>	<i>WNT11</i>	<i>WRN</i>	<i>WT1</i>	<i>XPA</i>
<i>XPC</i>	<i>XPO1</i>	<i>XRCC1</i>	<i>XRCC2</i>	<i>YB1</i>	<i>ZC3H18</i>
<i>ZNF384</i>	<i>ZNF521</i>	<i>ZRSR2</i>	<i>ZSWIM4</i>		

・クロマチン修飾に関わる遺伝子

<i>ABCC2</i>	<i>ACTL6A</i>	<i>ACTL6B</i>	<i>ANTXR1</i>	<i>ARID2</i>	<i>ARID4A</i>
<i>ASH1L</i>	<i>ASH2L</i>	<i>ASXL1</i>	<i>ASXL2</i>	<i>ASXL3</i>	<i>BCOR</i>
<i>BRD7</i>	<i>CBX1</i>	<i>CBX2</i>	<i>CBX3</i>	<i>CBX4</i>	<i>CBX5</i>
<i>CBX6</i>	<i>CBX7</i>	<i>CBX8</i>	<i>CHD1</i>	<i>CHD2</i>	<i>CHD3</i>
<i>CHD4</i>	<i>CHD5</i>	<i>CHD6</i>	<i>CHD7</i>	<i>CHD8</i>	<i>CHD9</i>
<i>CISD3</i>	<i>CPEB1</i>	<i>CREBBP</i>	<i>CXXC1</i>	<i>DNMT1</i>	<i>DNMT3A</i>
<i>DNMT3B</i>	<i>DOT1L</i>	<i>DPF1</i>	<i>DPF2</i>	<i>DPF3</i>	<i>EED</i>

<i>EP300</i>	<i>EP400</i>	<i>EPC1</i>	<i>EYA2</i>	<i>EZH1</i>	<i>HSPG2</i>
<i>KAT6A</i>	<i>KAT6B</i>	<i>KDM1A</i>	<i>KDM5D</i>	<i>L3MBTL2</i>	<i>LRRFIP1</i>
<i>LSD1</i>	<i>NLRP9</i>	<i>PBRM1</i>	<i>PCGF1</i>	<i>PCGF2</i>	<i>PCGF3</i>
<i>PCGF4</i>	<i>PCGF5</i>	<i>PCGF6</i>	<i>PHC1</i>	<i>PHC2</i>	<i>PHC3</i>
<i>PHF1</i>	<i>PHF10</i>	<i>PHF19</i>	<i>PHF2</i>	<i>PKHD1L1</i>	<i>RBBP1</i>
<i>RBBP2</i>	<i>RBBP3</i>	<i>RBBP4</i>	<i>RBBP5</i>	<i>RBBP6</i>	<i>RBBP7</i>
<i>RBBP8</i>	<i>RBBP9</i>	<i>RING1</i>	<i>SCMH1</i>	<i>SCML2</i>	<i>SETD7</i>
<i>SIN3B</i>	<i>SMARCA1</i>	<i>SMARCB1</i>	<i>SMARCC1</i>	<i>SMARCD1</i>	<i>SMARCD2</i>
<i>SMARCD3</i>	<i>SMARCE1</i>	<i>SUZ12</i>	<i>TET1</i>	<i>WDR5</i>	<i>ZNF101</i>

・ミスマッチ修復遺伝子

<i>MLH1</i>	<i>MLH3</i>	<i>MSH2</i>	<i>MSH3</i>	<i>MSH6</i>	<i>PMS1</i>
<i>PMS2</i>	<i>POLE</i>				

上記ターゲット領域を Haloplex system にて濃縮し、説明書通りにシークエン
スライブラリーを調整した。具体的には、まずサンプル DNA を 8 種類の制限
酵素で切断し、Haloplex プローブとハイブリダイズさせ環状構造を形成させた。
ストレプトアビジニン・マグネットビーズでターゲット DNA と Haloplex プロ
ーブのハイブリッドを捕集し、ハイブリダイズしなかった DNA を洗いで除去した。
溶出バッファで Haloplex プローブと環状 1 本鎖 DNA を解離させ回収した。共通
配列部分に対するプライマーで PCR 増幅を行い、PCR 産物を AMPure ビーズで
精製し、シークエンスへと進んだ。

Hiseq2500 (Illumina) の rapid mode で 150bp のペアエンドでシークエンスを行

った。カバレッジの中央値は 348 で、93%のターゲット領域が 10 リード以上読まれていた (表 3)。

表 3 シークエンスデータサマリー

Sample	On target reads	Average depth	Depth \geq x10	Depth \geq x20	Depth \geq x50	Depth \geq x100
GBM1 tumor	9,021,247	310.1	96.7	94.2	85.9	72.7
GBM1 normal	7,753,808	266.7	95.5	92.0	81.5	65.9
AA2 tumor	7,717,687	266.1	96.1	93.0	82.2	65.8
AA2 normal	6,714,634	233.4	95.3	91.2	78.3	60.2
GBM2 tumor	7,835,923	268.5	95.4	91.6	80.8	65.8
GBM2 normal	6,956,276	239.6	94.3	89.6	76.4	60.6
GBM3 tumor	7,130,547	245.7	95.0	91.3	80.2	64.7
GBM3 normal	7,805,924	267.9	96.0	93.3	84.3	70.3
GBM5 tumor	6,977,891	235.9	95.0	91.5	81.5	67.4
GBM5 normal	7,314,983	250.7	95.4	91.6	80.6	65.5
AA6 tumor	11,924,892	402.3	96.6	94.7	89.1	79.8
AA6 normal	8,080,639	277.5	95.1	91.4	80.7	66.2
GBM7 tumor	17,479,036	599.5	97.9	96.6	92.8	86.1
GBM7 normal	12,454,240	421.9	98.2	97.4	94.0	86.7
AA8 tumor	20,572,556	702.0	98.4	97.5	94.7	89.1
AA8 normal	20,675,249	711.4	98.1	97.0	93.5	87.4
GBM12 tumor	7,840,224	266.6	95.3	91.2	79.0	61.7
GBM12 normal	7,631,762	265.8	93.3	89.0	77.2	62.8
GBM13 tumor	7,742,469	265.8	96.1	93.1	83.2	68.1
GBM13 normal	9,368,166	318.1	96.4	94.2	87.4	76.1
GBM15 tumor	6,505,355	220.5	95.1	91.0	77.4	58.5
GBM15 normal	6,918,528	239.0	95.6	91.8	79.7	62.1
DA2 tumor	18,525,767	631.3	98.2	97.4	94.4	87.4
DA2 normal	13,026,938	446.9	96.4	94.0	87.1	77.0

Burrows-Wheeler Aligner algorithm v0.5.9²³にてレファレンスゲノム (hg19) にマッピングを行い、Genome Analysis Toolkit Unified Genotyper v1.6.13²⁴にて変異解析を行った (default setting)。腫瘍特異的な変異を、腫瘍と血液 (正常) の塩基配列を比較することで同定し、AnnoVar (23 October 2012)²⁵にて注釈をつけた。Integrative Genomics Viewer v2.2²⁶で変異を確認し、アーチファクトを除外した。

***TERT* プロモーター領域のサンガーシーケンス**

コーディング領域以外にも高頻度に認められる遺伝子変異として、*TERT* (telomerase reverse transcriptase) プロモーター領域の変異が悪性黒色腫において報告された^{20, 21}。2つのホットスポットがあり、染色体5番1,295,228の塩基のC (cytosine) がT (thymine) に、1,295,250のCがTに置き換わる遺伝子変異であった。変異によってETS (E26 transformation-specific) の結合モチーフが出現し、*TERT* プロモーターの転写活性を上昇させることが報告された^{20, 21}。同変異は、神経膠腫においても膠芽腫、乏突起膠腫で高頻度に認められることが分かり²²、ターゲットシーケンスにその領域が含まれていなかったため、ターゲットシーケンスとは別に、同部位に対するサンガーシーケンスを行った。プライマーは先行論文²²を参考に作製し (forward 5'-

GGCCGATTCGACCTCTCT-3', reverse 5'-AGCACCTCGCGGTAGTGG-3'),

H3F3A と同様の手順でサンガーシーケンスを行った。

メチル化特異的 PCR

EZ DNA Methylation kit (Zymo Research) を用いて 250ng の腫瘍由来ゲノム DNA のバイサルファイト処理を行った²⁷。化学療法として使用されるテモゾロミドの治療効果に影響を与える *MGMT* (*O*⁶-methylguanine methyltransferase) プロモーター領域のメチル化の有無を²⁸、メチル化特異的 PCR を用いて解析した²⁹。

(メチル化 DNA 検出用プライマー

(forward 5'-TTTCGACGTTTCGTAGGTTTTTCGC-3',

reverse 5'-GCACTCTTCCGAAAACGAAACG-3'; product size : 81 bp)、

非メチル化 DNA 検出用プライマー

(forward 5'-TTTGTGTTTTGATGTTTGTAGGTTTTTGT-3',

reverse 5'-AACTCCACACTCTTCCAAAAACAAAACA-3'; product size : 93 bp))

網羅的メチル化解析

Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) を用いて、網羅的メチル化解析を行った。Infinium HumanMethylation450 BeadChip (Illumina) は、19 の研

究施設からなる国際コンソーシアムの専門家が選定した 45 万以上のメチル化サイトを 1 塩基の解像度で検出そして定量が可能であるメチル化アレイである³⁰。RefSeq (Reference Sequence) 遺伝子の 99% をカバーし、遺伝子領域 (プロモーター、5'UTR (untranslated region)、第 1 エクソン、遺伝子内、3'UTR) あたり平均 17CpG サイトを搭載している。全体の 96% の CpG アイランドをカバーしているのみならず、CpG アイランド以外の CpG サイト、ヒト幹細胞で同定された非 CpG サイトのメチル化領域、様々な組織、複数の癌腫で確認された正常細胞と癌細胞間で異なるメチル化を示す領域、遺伝子領域外の CpG サイト、miRNA (microRNA) プロモーター領域も含まれている。実際のアッセイには、図 3 のように Infinium I および II の両アッセイを使用している。Infinium I アッセイでは、CpG 部位 1 ヶ所につき 2 個のビーズタイプ (メチル化状態、非メチル化状態に対して各 1 個) が設計されており、ハイブリダイゼーション後の 1 塩基伸長ステップでメチル化状態が決定される。Infinium II アッセイのデザインでは 1 個のビーズタイプを用いている。メチル化度合いは、0 (非メチル化) から 1 (完全メチル化) の β 値 (intensity of the Methylated allele(M) / (intensity of the Unmethylated allele(U) + intensity of the Methylated allele(M) +100) の式で計算される³⁰) で表される。

500ng の腫瘍 DNA を用いて、14 例の高悪性度視床神経膠腫について上記解析

を行った。14例と解析検体数が少なかったため、また他の膠芽腫とプロファイルと比較するために、公開されている136例のメチル化データ¹⁷ (GSE36278)と合わせて、教師なしクラスタリング (unsupervised clustering) を行った。先行論文を参考に¹⁷、X、Y染色体のプローブを除き、さらに一塩基多型 (dbSNP130common、<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>) から5塩基以内のプローブを除いた上で、各プローブの β 値の標準偏差を計算し、上位8000プローブをクラスタリングに使用した。

統計解析

全生存期間をカプラン・マイヤー法を用いて解析し、ログランク検定にて2群間の生存率の差を検定した。また、Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析も行った。各グループ間での年齢の平均の差は、ウェルチの t 検定を用いて検定した。そして、各グループ間での *MGMT* プロモーター領域のメチル化の割合の差はフィッシャーの正確確率検定を用いて検定した。P 値は 0.05 未満を有意と判定した。上記の検定は、R v2.15.2 (<http://www.cran.r-project.org>) を用いて行った。

4 結果

H3F3A K27M 変異を持つ症例の頻度と特徴

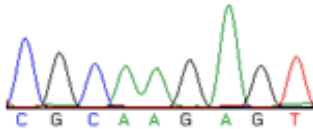
18例の高悪性度視床神経膠腫の内、10例（56%）の症例が *H3F3A K27M* 変異（図2）を有していた。*H3F3A G34* の変異を持つ症例は存在しなかった。注目すべきは、50歳未満の症例では11例中10例（91%）で *H3F3A K27M* の変異を認めたのに対し（年齢中央値38歳、17~46歳）、50歳以上の7症例では1例も *H3F3A K27M* 変異を認めなかった（表4）。*H3F3A K27M* 変異を有する例は、有さない例に比較して有意に年齢が若かった（34.2 vs 61.6歳; $P=0.0003$ ）。また、高悪性度の神経膠腫に変異が認められたのに対して、低悪性度であるびまん性星細胞腫の2例では、年齢がそれぞれ29歳、30歳と50歳未満であったにもかかわらず、*H3F3A K27M* 変異を認めなかった。

図2 *H3F3A* K27M をコードする領域のサンガーシーケンスの結果。例として GBM7 の結果を示す。腫瘍において、AAG (リシン) から ATG (メチオニン) への non-synonymous な遺伝子変異を認めた (赤矢印)。

H3F3A (p.Lys27Met)

GBM7

血液



腫瘍

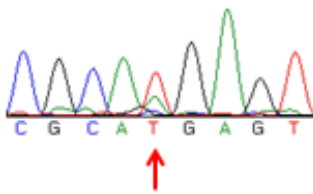


表 4 *H3F3A* の遺伝子変異解析の結果と患者の年齢

Sample ID	Age	<i>H3F3A</i>	<i>MGMT</i> promoter	Overall survival (months)
GBM 1 ^{a,b}	17	K27M	U	8.9
AA 2 ^{a,b}	20	K27M	U	9.9
GBM 2 ^{a,b}	27	K27M	U	3.8
GBM 3 ^{a,b}	34	K27M	U	12.6
AA 3	37	K27M	-	26.1
GBM 4 ^{a,b}	38	K27M	U	9.8
AA 4	38	WT	-	17.7
GBM 5 ^{a,b}	39	K27M	U	10.4
AA 5 ^b	41	K27M	U	20.6
AA 6 ^{a,b}	43	K27M	M	15.6
GBM 7 ^{a,b}	46	K27M	U	1.6 ^f
GBM 9 ^b	50	WT	U	3.9
AA 8 ^{a,b,c}	57	WT	M	110.2 ^f
GBM 11 ^{a,b,c}	62	WT	U	19.4
GBM 12 ^{a,b}	64	WT	M	30.4
GBM 13 ^a	71	WT	-	3.5
GBM 15 ^{a,b}	73	WT	U	0.7
AA 9	78	WT	-	0.3
DA 2 ^a	29	WT	-	9.2 ^f
DA 3	30	WT	-	124.4 ^f

a : specimen subjected to targeted sequence analysis

b : specimen subjected to global methylation analysis

c : specimen of recurrence

f : still alive at last follow-up

GBM : glioblastoma, AA : anaplastic astrocytoma, DA : diffuse astrocytoma

WT : wild-type,

M : methylated, U : unmethylated,

- : not available

ターゲットシーケンスによる遺伝子変異解析

ターゲットシーケンスを行った 14 例の内、症例番号 GBM4、GBM11 はアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の数がそれぞれ 32、165 個とその他の症例に比べて多かった（平均 3.83、0-8 個）（図 3）。GBM4 はミスマッチ修復遺伝子である *MSH2*（MutS homolog 2）の遺伝子変異を認め、また GBM11 はミスマッチ修復遺伝子である *PMS2*（postmeiotic segregation increased 2）と *MLH3*（MutL homolog 3）の遺伝子変異を認め、さらにアルキル化剤であるテモゾロミドによる治療後再発の症例であった。GBM11 の症例では、165 個の遺伝子変異の内 158 個（96%）が G/C から A/T への置換であり（図 4）、テモゾロミド治療後に G/C から A/T の遺伝子変異が異常に蓄積する hypermutator phenotype と考えられた³¹。上記 2 症例は、その他のミスマッチ修復遺伝子の変異が存在しない症例とは遺伝子変異が起こるメカニズムが異なると考えられるため、以下の解析（遺伝子数の集計、変異遺伝子のリスト）から除外した。

図3 ターゲットシーケンスで認められたアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の数をグラフにした。縦軸は、各腫瘍で同定された遺伝子変異の個数。

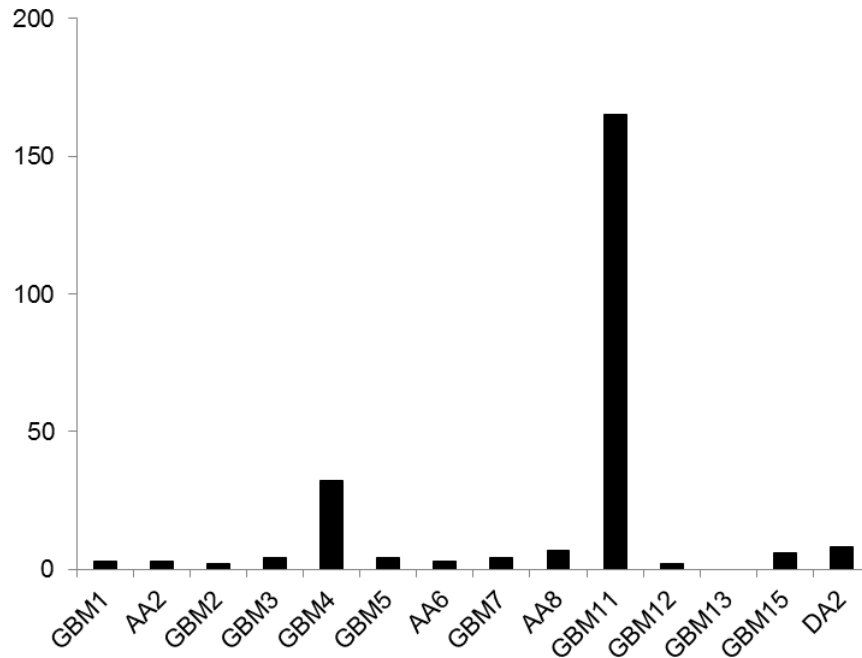
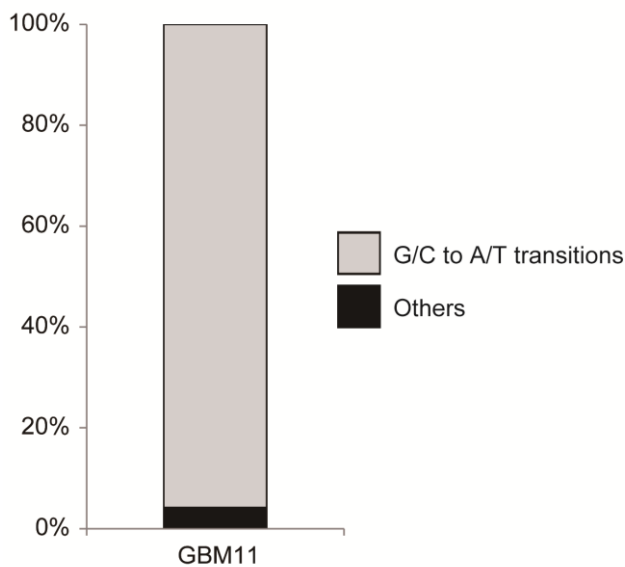


図4 GBM11における、ターゲットシーケンスで認められたアミノ酸置換を伴う遺伝子変異の塩基置換パターンを示した。



以前の報告と同じく¹⁵、*H3F3A* K27M 変異を持つ高悪性度神経膠腫の症例では、*TP53*、*ATRX* (*H3F3A* K27M 症例 2/7 [28.6%] vs *H3F3A* wild-type 症例 0/4 [0%]) や *NF1* (*H3F3A* K27M 症例 3/7 [42.9%] vs *H3F3A* wild-type 症例 0/4 [0%]) の遺伝子変異を有していた。反対に、*H3F3A* wild-type 症例では *EGFR* や *TERT* プロモーター領域の変異 (図 5) を有していた (*H3F3A* K27M 症例 0/7 [0%] vs *H3F3A* wild-type 症例 2/4 [50%]) (図 6、表 5)。*H3F3A*、*TP53*、*ATRX*、*NF1*、*EGFR*、*TERT* プロモーター領域以外に 2 症例以上で共通して存在する遺伝子変異は認めなかったが、我々の症例で 1 例認めた *FGFR1* (fibroblast growth factor receptor 1) 変異 (N546K) は Schwartzentruber らの症例¹⁵でも、変異したアミノ酸の部位は異なるものの存在し (K656E)、両変異はキナーゼ活性を増強させることが知られていることから、*H3F3A* K27M 症例で腫瘍形成の一助になっている可能性が示唆された。

遺伝子変異部位の read 数の平均値は 485 (10-6218)、mutant allele ratio の平均値は 0.50 (0.15-0.95) であった。最も少ない read 数 10 の場合の mutant allele ratio は 0.6 であり、また mutant allele ratio が最低の 0.15 の場合の read 数は 47 であり、図 6、表 5 に記載した遺伝子変異の判定は信頼性の高い範囲で実施できたと考えられた。

図 5 *TERT* プロモーター領域の遺伝子変異の例。サンガーシーケンスにて、GBM12、GBM15 の症例で、Chr5 1,295,228 のシトシンがチミンに置き換わる変異を認めた（赤矢印）。

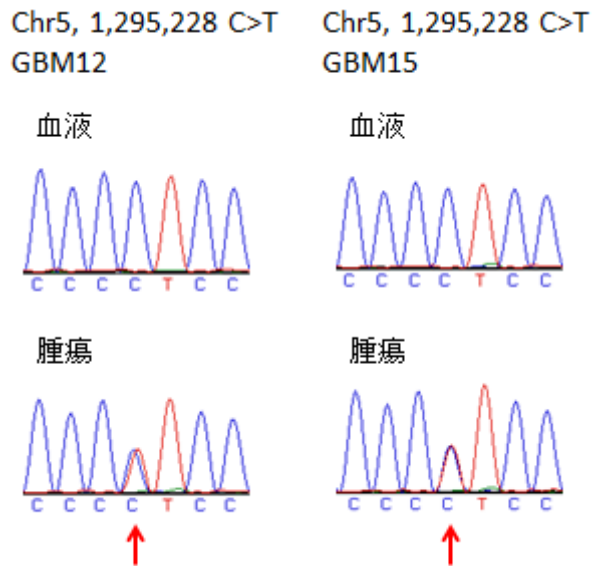


図6 アミノ酸置換を伴う遺伝子変異。各行は遺伝子を各列は症例を表し、変異の種類によりそれぞれ色付けしている。

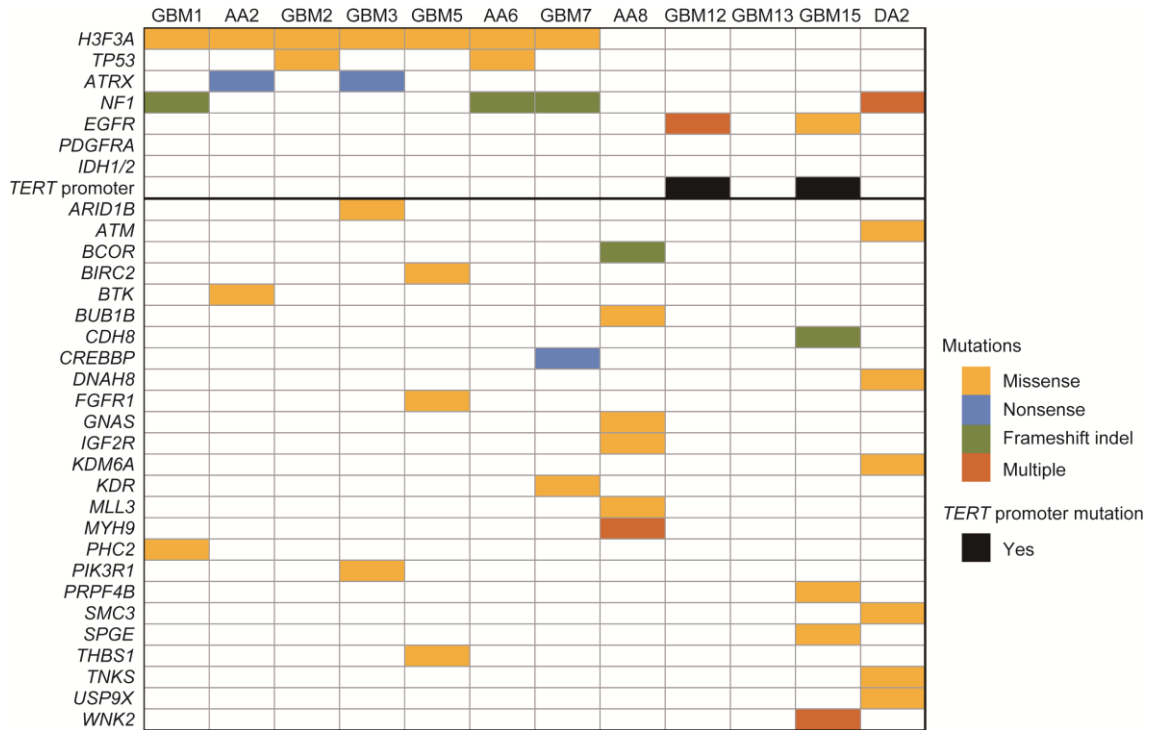


表 5 遺伝子変異リスト

Sample	Chromosome	Position*	Gene	Wild-type allele	Mutant allele	Read depth	Mutant allele ratio	Mutant type	Protein annotation	Transcript accession
GBM1	chr1	33794633	PHC2	A	C	249	0.7	nonsynonymous SNV	p.S754A	NM_198040
	chr1	226252135	H3F3A	A	T	26	0.65	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
	chr17	29553477	NF1	-	C	49	0.42	frameshift insertion	p.T676fs	NM_001042492
AA2	chr1	226252135	H3F3A	A	T	10	0.6	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
	chrX	76938136	ATRX	G	C	84	0.83	stopgain SNV	p.S871X	NM_000489
	chrX	100608968	BTK	A	T	160	0.83	nonsynonymous SNV	p.L547Q	NM_000061
GBM2	chr1	226252135	H3F3A	A	T	26	0.31	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
	chr17	7578457	TP53	C	T	187	0.52	nonsynonymous SNV	p.R26H	NM_001126115
	chr1	226252135	H3F3A	A	T	15	0.53	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
GBM3	chr5	67591125	PIK3R1	T	C	86	0.55	nonsynonymous SNV	p.L210P	NM_001242466
	chr6	157222513	ARID1B	C	T	247	0.6	nonsynonymous SNV	p.P594S	NM_020732
	chrX	76937981	ATRX	T	A	23	0.52	stopgain SNV	p.K923X	NM_000489
GBM5	chr1	226252135	H3F3A	A	T	16	0.75	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
	chr8	38274849	FGFR1	G	T	250	0.33	nonsynonymous SNV	p.N546K	NM_023110
	chr11	102233639	BIRC2	G	C	62	0.84	nonsynonymous SNV	p.L287F	NM_001256166
AA6	chr15	39874777	THBS1	G	A	249	0.63	nonsynonymous SNV	p.G151S	NM_003246
	chr1	226252135	H3F3A	A	T	34	0.68	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
	chr17	7577111	TP53	G	T	100	0.83	nonsynonymous SNV	p.A144D	NM_001126115
GBM7	chr17	29653175	NF1	A	-	136	0.4	frameshift deletion	p.K1725fs	NM_001042492
	chr1	226252135	H3F3A	A	T	54	0.33	nonsynonymous SNV	p.K27M	NM_002107
	chr4	55981143	KDR	T	C	42	0.57	nonsynonymous SNV	p.T186A	NM_002253
GBM7	chr16	3779488	CREBBP	G	A	559	0.21	stopgain SNV	p.Q1816X	NM_001079846
	chr17	29663850	NF1	G	-	219	0.35	frameshift deletion	p.P2094fs	NM_000267

Sample	Chromosome	Position*	Gene	Wild-type allele	Mutant allele	Read depth	Mutant allele ratio	Mutant type	Protein annotation	Transcript accession
AA8	chr6	160500639	IGF2R	G	A	2318	0.34	nonsynonymous SNV	p.V1836I	NM_000876
	chr7	152027705	MLL3	C	T	857	0.41	nonsynonymous SNV	p.G124S	NM_170606
	chr15	40493166	BUB1B	C	A	40	0.18	nonsynonymous SNV	p.Q518K	NM_001211
	chr20	57430301	GNAS	G	A	694	0.29	nonsynonymous SNV	p.A661T	NM_080425
GBM12	chr22	36701989	MYH9	C	G	6218	0.59	nonsynonymous SNV	p.E716Q	NM_002473
	chr22	36702016	MYH9	C	G	6199	0.59	nonsynonymous SNV	p.G707R	NM_002473
	chrX	39932681	BCOR	-	A	666	0.46	frameshift insertion	p.L640fs	NM_001123383
	chr7	55210075	EGFR	T	G	248	0.81	nonsynonymous SNV	p.L62R	NM_201282
GBM15	chr7	55221822	EGFR	C	T	247	0.85	nonsynonymous SNV	p.A289V	NM_201282
	chr2	220336997	SPGE	C	T	250	0.57	nonsynonymous SNV	p.T1295M	NM_005876
	chr6	4044103	PRPF4B	C	G	59	0.9	nonsynonymous SNV	p.S569R	NM_003913
	chr7	55210075	EGFR	T	G	248	0.95	nonsynonymous SNV	p.L62R	NM_201284
DA2	chr9	95947353	WNK2	G	T	13	0.69	stopgain SNV	p.E48X	NM_006648
	chr9	96054670	WNK2	G	A	197	0.55	nonsynonymous SNV	p.V1673I	NM_006648
	chr14	21884030	CHD8	-	T	51	0.34	frameshift insertion	p.Y306fs	NM_020920
	chr6	38879350	DNAH8	C	T	81	0.20	nonsynonymous SNV	p.R3283C	NM_001206927
	chr8	9623749	TNKS	G	T	47	0.15	nonsynonymous SNV	p.G1185V	NM_003747
	chr10	112364014	SMC3	C	A	25	0.20	nonsynonymous SNV	p.A1203E	NM_005445
	chr11	108168089	ATM	C	A	18	0.17	nonsynonymous SNV	p.T1662N	NM_000051
	chr17	29588763	NF1	A	T	364	0.22	stopgain SNV	p.K1517X	NM_000267
	chr17	29667527	NF1	C	-	491	0.46	frameshift deletion	p.S2288fs	NM_000267
	chrX	41057971	USP9X	C	A	52	0.15	nonsynonymous SNV	p.T1524N	NM_001039590
chrX	44949077	KDM6A	G	T	50	0.16	nonsynonymous SNV	p.R1213L	NM_021140	

*position, the genomic positions for each somatic mutations. The genomic positions are coordinates in the February 2009, hg19.

また Wu らは、18%の脳幹部神経膠腫にヒストン H3.1 をコードする *HIST1H3B* K27M 変異を認めたと報告しているが¹⁶、我々のサンプルでは *HIST1H3B* K27M 変異を *H3F3A* wild-type 症例においても認めず、また、グレードⅡからⅢの神経膠腫に高頻度に認められることが知られている³²*IDH1* や *IDH2* の遺伝子変異も認めなかった。さらには、H3K27 を修飾する H3K27 メチル基転移酵素の遺伝子である *EZH2* や H3K27 脱メチル化酵素の遺伝子である *KDM6A*、H3K27 アセチル転移酵素の遺伝子である *EP300*、*CREBBP* に遺伝子変異は認めず、*H3F3A* K27M wild-type 症例は *H3F3A* 変異症例と異なり、H3K27 の修飾異常を介さない腫瘍形成機序であることが示唆された。

***MGMT* プロモーター領域のメチル化解析**

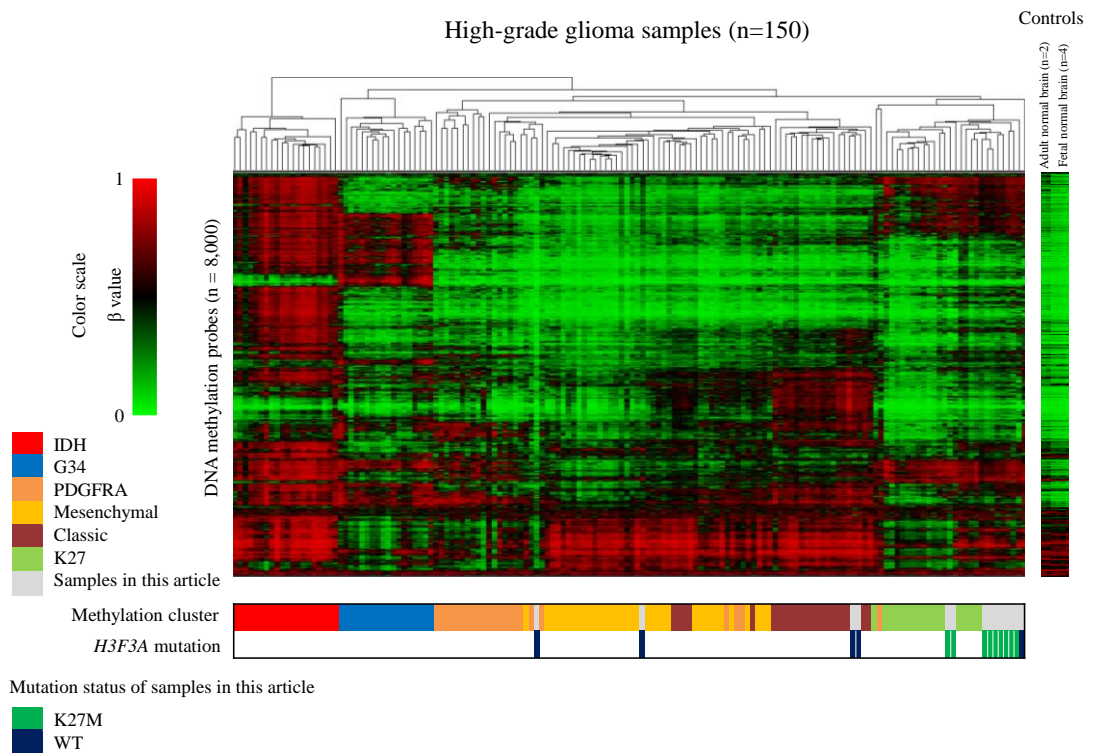
MGMT のプロモーター領域のメチル化はテモゾロミドによる治療効果に影響を与えることが知られており²⁸、14 例の高悪性度神経膠腫について解析を行った。11/14 (79%) の症例で *MGMT* プロモーター領域はメチル化されていなかった (表 4)。特に、*H3F3A* K27M 変異症例では 8/9 (89%) の症例でメチル化されず、様々な部位での高悪性度神経膠腫での割合 (43/75; 57%)³³ と比べて高い傾向にあった (P=0.23)。

網羅的メチル化解析

膠芽腫は、そのメチル化プロファイルにより、6群に分けることができると報告されている¹⁷。つまり、*IDH* 変異、*H3F3A K27* 変異、*G34* 変異を持つ腫瘍は、それぞれ特有のメチル化プロファイルを持つ。そしてその他の膠芽腫は、“classic”、“mesenchymal”、“PDGFRA”の3つのプロファイルに分類される。*H3F3A K27M* 変異例は、9例全例が *H3F3A K27M* 変異腫瘍のカテゴリーである“K27”に分類され、均一で特徴的なメチル化プロファイルを呈した。一方、*H3F3A K27M* 変異を有しない腫瘍は“K27”に分類されず、GBM9は“mesenchymal”に、また GBM12、GBM15は“classic”にというように異なったメチル化プロファイルを呈することが、クラスタリング解析により示唆された（図7）。AA8は、*H3F3A K27M* 変異を有しないが図7の右端に位置し、一見“K27”に分類されているようにも見えるが、実際には“K27”クラスターの外に位置していた。また、“classic”、“mesenchymal”、“PDGFRA”のメチル化プロファイルを持つ膠芽腫は、ほとんどが成人の脳半球に発生する膠芽腫であり、*H3F3A K27M* 変異を有しない腫瘍は、脳半球に発生する膠芽腫に似ていることが示唆された。

AA4は50歳未満だが *H3F3A K27M* 変異を有しない腫瘍でありどのようなメチル化プロファイルか興味を持たれたが、少量のホルマリン固定パラフィン包埋組織しかなく網羅的メチル化解析は行えなかった。

図 7 14 例の視床高悪性度神経膠腫と 136 例の公開されている膠芽腫データを合わせた計 150 例での教師なしクラスタリングの結果。メチル化ヒートマップを示している。各行はプローブ、各列は症例を表し、各症例の分類と本研究症例の *H3F3A* K27M 変異の有無を下方に付けた。



H3F3A K27M 変異の予後に与える影響

16 例の初発高悪性度神経膠腫の全生存期間を解析すると、膠芽腫は 8.9 ヶ月、退形成性星細胞腫は 15.6 ヶ月であった。また、高悪性度神経膠腫全体の全生存期間は 9.9 ヶ月、無増悪生存期間は 5.3 ヶ月であった。

高悪性度神経膠腫において、*H3F3A* K27M 変異例の全生存期間は 10.4 ヶ月（膠芽腫 9.8 ヶ月、退形成性星細胞腫 15.6 ヶ月）、*H3F3A* wild-type 例の全生存期間は 3.5 ヶ月（膠芽腫 3.5 ヶ月、退形成性星細胞腫 0.3 ヶ月）であったが、有意差は認めなかった（ $P=0.80$ ）（図 8）。無増悪生存期間についても同様に有意差を認めなかった（*H3F3A* K27M 変異例 6.0 ヶ月 vs *H3F3A* wild-type 例 1.8 ヶ月； $P=0.44$ ）。

3 つの変数（*H3F3A* K27M 変異、*MGMT* プロモーターメチル化、年齢）にて多変量解析を施行したが、有意なものは認めなかった（*H3F3A* K27M 変異：ハザード比 0.11、95%信頼区間 0.0057-2.2、 $P=0.15$ 、*MGMT* プロモーターメチル化：ハザード比 0.088、95%信頼区間 0.0054-1.4、 $P=0.088$ 、年齢：ハザード比 0.96、95%信頼区間 0.88-1.1、 $P=0.38$ ）。

また、先行研究の脳幹部高悪性度神経膠腫の全生存期間のデータと合わせると¹⁸、視床高悪性度神経膠腫は、*H3F3A* K27M 変異例、*H3F3A* wild-type 例ともに、脳幹部高悪性度神経膠腫 *H3F3A* K27M 変異例と同等の予後の悪さを示した（図 9）。

図 8 高悪性度視床神経膠腫の全生存期間のカプランマイヤー曲線を表している。
H3F3A K27M 変異症例と *H3F3A* wild-type 症例に有意な差は認めなかった。

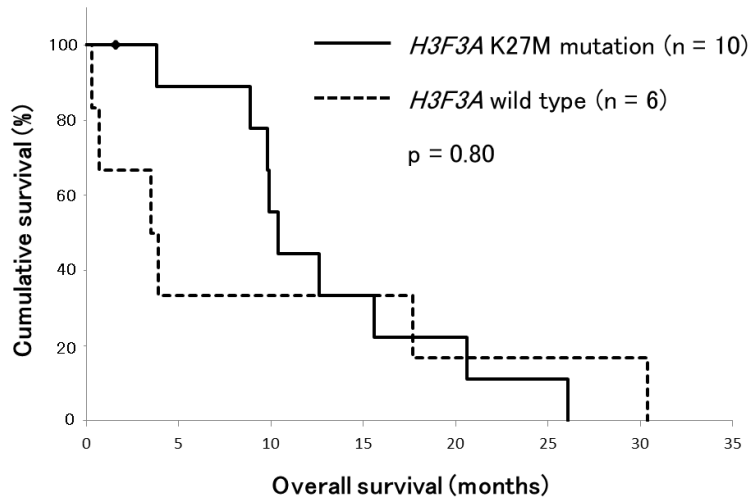
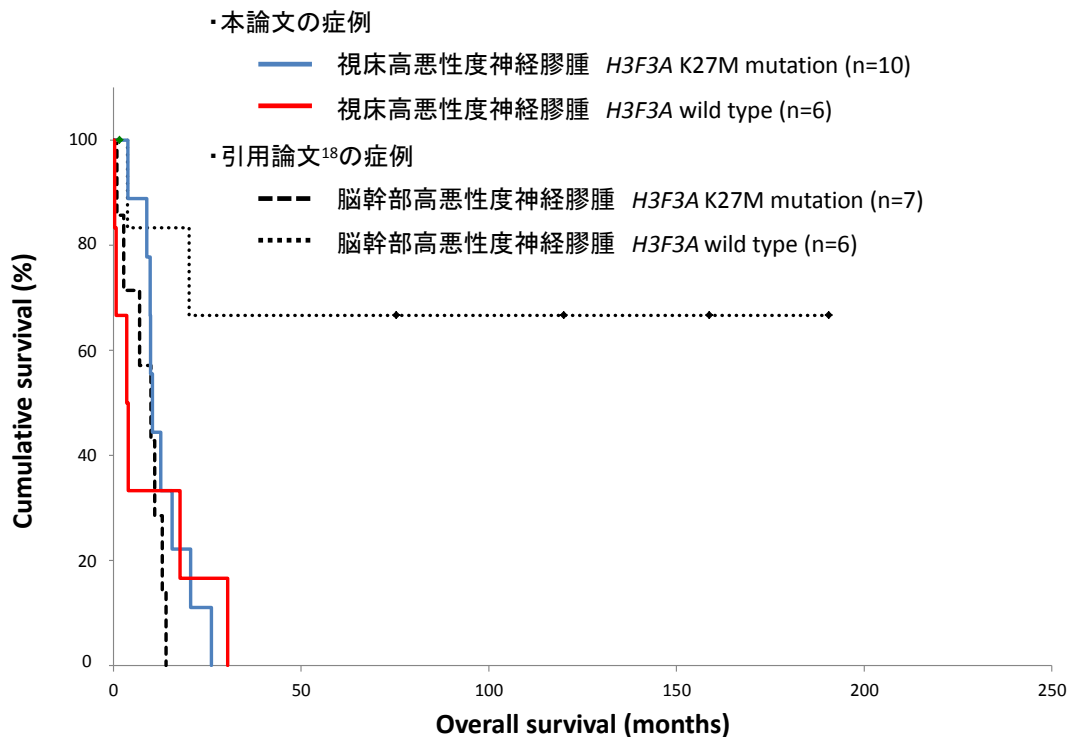


図 9 脳幹部高悪性度神経膠腫の全生存期間との比較。脳幹部高悪性度神経膠腫の *H3F3A* wild-type 症例のみ予後が良く、その他は同様に予後が悪かった。



5 考察

本研究で、高悪性度視床神経膠腫において、*H3F3A K27M* 変異は小児や青年といった若年者だけでなく、青壮年にも高頻度に認められることを示した。これは、先行研究で *H3F3A K27M* 変異、*H3F3A G34R/V* 変異、*IDH* 変異がそれぞれ、5-23 歳（中央値 10.5 歳）、9-42 歳（中央値 18 歳）、13-71 歳（中央値 40 歳）と特徴的な年齢分布を持ち、*H3F3A K27M* 変異が小児から若年者にしか認められないという定説¹⁷を覆す発見であった。

H3F3A K27M 変異が認められなかった症例について、ターゲットシーケンスを行った症例の中で **GBM13** 以外の症例は、他の遺伝子変異が存在するので、解析した検体中に腫瘍細胞は存在したが、*H3F3A K27M* 変異は存在しなかったと考えられた。しかし **GBM13** は他の遺伝子変異が存在せず、腫瘍細胞が存在しなかった可能性も考えられた。また、ホルマリン固定パラフィン包埋組織より DNA を抽出し、サンガーシーケンスで解析した症例については、DNA を抽出する際に病理像を確認している為、真に *H3F3A K27M* 変異が存在しなかった可能性が高い。しかしながら、今回解析した視床神経膠腫の検体は **biopsy** で採取された検体であり、腫瘍内 **heterogeneity** が存在し、**biopsy** で採取された以外の場所に *H3F3A K27M* 変異が存在する可能性は否定出来ない。ただ、視床神経膠腫

は脳深部に位置する腫瘍であり、検体採取方法にも限界が存在した。

H3F3A は、ヒストン H3 のバリエーションである H3.3 をコードしている。H3.3 は、複製非依存的にクロマチンに存在し、活発に転写されている遺伝子や、テロメアや動原体周辺領域などのヘテロクロマチン領域に存在すると言われている³⁴。ヒストン 3 リシン 27 トリメチル化 (H3K27me3) は、ポリコームファミリーの一員で、ヒストンメチル基転移酵素である EZH2 により形成され、転写の抑制と関連している³⁵。*H3F3A* K27M 変異の症例は、H3K27me3 が減少し、H3K27 アセチル化 (H3K27ac) が増加する^{36, 37}。K27M 変異を持つヒストン H3.3 の割合はヒストン H3 全体からするとわずかであるが、ヒストン H3 全体の H3K27me3 を減少させる。それは、K27M が EZH2 の SET ドメインを阻害することで、PRC2 (polycomb repressive complex 2) のメチル基転移活性を弱めるからであると推察されている³⁷。*H3F3A* K27M 変異を持たない高悪性度視床神経膠腫も同様のメカニズムが腫瘍発生に関与している、つまり H3K27 に化学修飾を与える遺伝子の異常が腫瘍発生の原因になっているのではないかと考え、*EZH2*、*KDM6A*、*EP300*、*CREBBP* などを含んだターゲットシーケンスを行ったが、これらの H3K27 に化学修飾を与える遺伝子に変異は認めなかった。

また、ターゲットシーケンスにおいて *TP53* や *ATRX*、*NF1*、*EGFR* ような既知の遺伝子変異以外で、複数検体に認められる遺伝子変異は認めず、新しい腫

瘍形成機序の発見とはならなかった。

遺伝子変異の検出方法については、1,000 genome project や Cancer genome project などで採用され、世界中で使用されている解析ソフトウェアである GATK²⁴ を使用した。腫瘍細胞が解析検体に多く含まれ、大多数の腫瘍細胞に認められる遺伝子変異は検出が容易であるが、解析検体に腫瘍細胞が少なかったり、ある一部分の少数の腫瘍細胞にしか認められないような low allele frequency の変異検出は困難となり、100x の coverage でも mutant allele frequency が 10%程度のもものは検出感度が 50%程度になってしまい注意が必要である³⁸。

さらに、*H3F3A* K27M 変異症例の生物学的な特性を評価するために、その特性が反映されていると考える腫瘍細胞 DNA のメチル化に注目し、網羅的メチル化解析を行うことで、青壮年の *H3F3A* K27M 変異症例も小児例の *H3F3A* K27M 変異症例と同様のメチル化プロファイルを持つことを示した。反対に、50 歳以上の *H3F3A* wild-type 症例では、大脳半球の膠芽腫のメチル化プロファイルに類似した特徴を持っており、遺伝子変異解析の結果とも合わせると、*H3F3A* K27M 変異症例とは異なる腫瘍化メカニズムにより発生したと考えられた。

本研究で解析した視床神経膠腫症例シリーズでの生存期間中央値は膠芽腫で 8.9 ヶ月、退形成性星細胞腫で 15.6 ヶ月と、大脳半球神経膠腫を含めた通常の膠

芽腫や退形成性星細胞腫の生存期間中央値に比較して短かった²。この予後が悪い理由として、以下に述べるような理由がその可能性として考えられた。まず、高い腫瘍摘出率が重要な予後良好因子であることが知られているが³、視床神経膠腫は脳深部に腫瘍が位置し、高い摘出率が望めないことが理由の一つとして考えられた。実際、本研究の症例でも74% (20/27) が **biopsy** であった。また、予後良好因子の一つである **IDH** 変異³⁹ が認められなかったことも視床高悪性度神経膠腫の生存期間中央値が短かった理由として考えられた。さらに、化学療法に用いられるアルキル化剤であるテモゾロミドはその作用機序として、**O-6** 位のグアニン残基をメチル化する。**O-6** メチルグアニンは **DNA** 複製の際に本来のシトシンではなくチミンと対合するため、塩基のミスマッチが生じる。このミスマッチに対し、ミスマッチ修復機構が働いてチミンが取り除かれるが、**O-6** メチルグアニンに付加されたメチル基が除去されないため、ミスマッチ修復機構による不毛な修復が繰り返されることになり、最終的には **DNA** 切断が生じて、細胞死が誘導されると考えられている⁴⁰。**MGMT** は、**O-6** メチルグアニンに付加されたメチル基を除去修復することでテモゾロミドに対する耐性に関わると考えられるが、その遺伝子プロモーター領域のメチル化により **MGMT** の発現が低下することが知られている⁴¹。実際、この理論に一致して、大規模な臨床試験の附随研究においても、テモゾロミド治療後の生存率は **MGMT** プロモーター

領域のメチル化が認められる群で有意に延長することが示されている²⁸。視床高悪性度神経膠腫においては *MGMT* のプロモーター領域がメチル化されている割合が低く、十分な統計学的な評価は困難であったものの、予後が悪い理由の一つであると考えられた。

また、脳幹部神経膠腫では *H3F3A K27M* 変異症例の方が予後不良なため¹⁸、視床高悪性度神経膠腫でも同様の傾向が見られると予想していたが、視床高悪性度神経膠腫では *H3F3A K27M* 変異の有無で予後に差は認めず、多変量解析でも予後に寄与する有意な因子は抽出出来なかった。脳幹部高悪性度神経膠腫の予後と比較してみると、視床高悪性度神経膠腫では *H3F3A K27M* 変異例でも **wild-type** 例でも脳幹部高悪性度神経膠腫 *H3F3A K27M* 変異例と同じく予後不良であった。視床高悪性度神経膠腫 *H3F3A wild-type* 例には、*H3F3A K27M* 変異とは別の予後不良因子が存在する可能性が考えられたが、視床高悪性度神経膠腫には未知の予後不良因子が存在し、*H3F3A K27M* 変異の影響があまりない可能性も考えられた。視床高悪性度神経膠腫 *H3F3A wild-type* 例には、*H3F3A K27M* 変異とは別の予後不良因子が存在する可能性についてはその一つとして、遺伝子変異のある群とない群では予後因子である患者年齢に相違があることが考えられるが、本解析では解析症例数も少なく、予後に関してのより正確な解析のためには、今後の多症例での検討が必要であると考えられる。

6 結論

本研究により、視床高悪性度神経膠腫においては、小児や青年などの若年者だけでなく青壮年にも *H3F3A K27M* 変異が高頻度に存在することが明らかとなった。また、50 歳未満に多い *H3F3A K27M* 変異を持つ視床高悪性度神経膠腫は、その全てが脳幹部の小児膠芽腫と同様の均一なメチル化プロファイルを持っていたのに対し、50 歳以上に多い *H3F3A wild-type* の視床高悪性度神経膠腫は、大脳半球の成人膠芽腫と同様のメチル化プロファイルを持ち、かつ症例間でそのプロファイルは均一ではなかった。遺伝子変異解析の結果とも合わせると、50 歳以上に多い *H3F3A wild-type* の視床高悪性度神経膠腫は、50 歳未満に多い *H3F3A K27M* 変異を持つ視床高悪性度神経膠腫とは腫瘍の成り立ちが異なることが示唆された。

H3F3A wild-type の視床高悪性度神経膠腫に対しては、通常の大脳半球の膠芽腫の治療成績向上、さらには患者の年齢層が高いため、高齢者の治療成績向上へ向けた治療の改善、開発が求められるであろう。これに対して、個別化医療が推進されている現在、今回成人にもその頻度が高いことが明らかとなった *H3F3A K27M* 変異を持つ視床高悪性度神経膠腫に対しては、現在開発されつつある *K27M* をターゲットにした治療の有効性が期待されるため⁴²、成人視床神

経膠腫において *H3F3A* 変異を同定する意義は高く、その特徴的な年齢分布を明らかにした本研究成果は意義深いものと考えられた。

この博士論文は、Koki Aihara et al. *H3F3A* K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro Oncol* (2014) 16 (1): 140-146 をもとに作成した。

引用文献

1. Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK. WHO classification of tumours of the central nervous system. 4th ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2007.
2. Report of Brain Tumor Registry of Japan (1984-2000). *Neurol Med Chir (Tokyo)*.49 Suppl:PS1-96 2009.
3. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg*.115(1):3-8 2011.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med*.352(10):987-96 2005.
5. Shaw EG, Wang M, Coons SW, Brachman DG, Buckner JC, Stelzer KJ, et al. Randomized trial of radiation therapy plus procarbazine, lomustine, and vincristine chemotherapy for supratentorial adult low-grade glioma: initial results of RTOG 9802. *J Clin Oncol*.30(25):3065-70 2012.
6. Cheek WR, Taveras JM. Thalamic tumors. *J Neurosurg*.24(2):505-13 1966.
7. Mc KW, Paine KW. Primary tumours of the thalamus. *Brain*.81(1):41-63 1958.

8. Tovi D, Schisano G, Liljeqvist B. Primary tumors of the region of the thalamus. *J Neurosurg.*18:730-40 1961.
9. Kelly PJ. Stereotactic biopsy and resection of thalamic astrocytomas. *Neurosurgery.*25(2):185-94; discussion 94-5 1989.
10. Reuter JA, Spacek DV, Snyder MP. High-throughput sequencing technologies. *Mol Cell.*58(4):586-97 2015.
11. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular profiling of lung adenocarcinoma. *Nature.*511(7511):543-50 2014.
12. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature.*499(7456):43-9 2013.
13. Cancer Genome Atlas Research N, Kandoth C, Schultz N, Cherniack AD, Akbani R, Liu Y, et al. Integrated genomic characterization of endometrial carcinoma. *Nature.*497(7447):67-73 2013.
14. Mitsui J, Tsuji S. Genomic aspects of sporadic neurodegenerative diseases. *Biochem Biophys Res Commun.*452(2):221-5 2014.
15. Schwartzenuber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature.*482(7384):226-31 2012.

16. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet.*44(3):251-3 2012.
17. Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, et al. Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell.*22(4):425-37 2012.
18. Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol.*124(3):439-47 2012.
19. Gerges N, Fontebasso AM, Albrecht S, Faury D, Jabado N. Pediatric high-grade astrocytomas: a distinct neuro-oncological paradigm. *Genome Med.*5(7):66 2013.
20. Horn S, Figl A, Rachakonda PS, Fischer C, Sucker A, Gast A, et al. TERT promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science.*339(6122):959-61 2013.
21. Huang FW, Hodis E, Xu MJ, Kryukov GV, Chin L, Garraway LA. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science.*339(6122):957-9

2013.

22. Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., et al.

TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. Proc Natl Acad Sci U S A.110(15):6021-6

2013.

23. Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler

transform. Bioinformatics.25(14):1754-60 2009.

24. McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, et

al. The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing

next-generation DNA sequencing data. Genome Res.20(9):1297-303 2010.

25. Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic

variants from high-throughput sequencing data. Nucleic Acids Res.38(16):e164 2010.

26. Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, Guttman M, Lander ES, Getz G,

et al. Integrative genomics viewer. Nat Biotechnol.29(1):24-6 2011.

27. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB.

Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands.

Proc Natl Acad Sci U S A.93(18):9821-6 1996.

28. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, et al.

- MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med.*352(10):997-1003 2005.
29. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res.*59(1):67-70 1999.
30. Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, et al. High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics.*98(4):288-95 2011.
31. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature.*455(7216):1061-8 2008.
32. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med.*360(8):765-73 2009.
33. Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, et al. Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. *Cancer Sci.*103(3):587-92 2012.
34. Goldberg AD, Banaszynski LA, Noh KM, Lewis PW, Elsaesser SJ, Stadler S, et al. Distinct factors control histone variant H3.3 localization at specific genomic regions. *Cell.*140(5):678-91 2010.
35. Vastenhouw NL, Schier AF. Bivalent histone modifications in early

embryogenesis. *Curr Opin Cell Biol.*24(3):374-86 2012.

36. Venneti S, Garimella MT, Sullivan LM, Martinez D, Huse JT, Heguy A, et al.

Evaluation of histone 3 lysine 27 trimethylation (H3K27me3) and enhancer of Zest 2

(EZH2) in pediatric glial and glioneuronal tumors shows decreased H3K27me3 in

H3F3A K27M mutant glioblastomas. *Brain Pathol.*23(5):558-64 2013.

37. Lewis PW, Muller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, et al.

Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric

glioblastoma. *Science.*340(6134):857-61 2013.

38. Spencer DH, Tyagi M, Vallania F, Bredemeyer AJ, Pfeifer JD, Mitra RD, et al.

Performance of common analysis methods for detecting low-frequency single

nucleotide variants in targeted next-generation sequence data. *J Mol Diagn.*16(1):75-88

2014.

39. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, et al. An

integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme.

*Science.*321(5897):1807-12 2008.

40. Fukushima T, Takeshima H, Kataoka H. Anti-glioma therapy with

temozolomide and status of the DNA-repair gene MGMT. *Anticancer*

*Res.*29(11):4845-54 2009.

41. Malley DS, Hamoudi RA, Kocialkowski S, Pearson DM, Collins VP, Ichimura K. A distinct region of the MGMT CpG island critical for transcriptional regulation is preferentially methylated in glioblastoma cells and xenografts. *Acta Neuropathol.*121(5):651-61 2011.
42. Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X, et al. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med.*20(12):1394-6 2014.

謝辞

東京大学先端科学技術研究センター、ゲノムサイエンス分野の油谷浩幸教授を始めとして研究室の皆様には大変お世話になり、感謝申し上げます。また、御指導頂きました東京大学脳神経外科、斉藤延人教授、武笠晃丈講師に感謝申し上げます。貴重な検体を提供して頂きました国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科 成田善孝科長にも感謝申し上げます。

最後に、どんな時も常に支えてくれている妻由季子に深く感謝します。