

博士論文

小脳神経膠腫の網羅的分子プロファイル解析

野村 昌志

目次	頁
1. 要旨.....	4
2. 序文.....	5
3. 方法	
3-1. 対象とした検体.....	10
3-2. サンガーシーケンス.....	13
3-3. 免疫組織染色.....	14
3-4. 全エクソームシーケンス.....	14
3-5. 変異解析・染色体コピー数解析.....	15
3-6. RNA シーケンス.....	16
3-7. 融合遺伝子解析.....	17
3-8. DNA メチル化解析.....	18
3-9. 遺伝子発現マイクロアレイデータの処理.....	21
3-10. モチーフ解析.....	21
3-11. 統計解析.....	22

4. 結果	
4-1. 対象患者の基本情報.....	23
4-2. 全エクソームシーケンスによる網羅的変異解析.....	24
4-3. 染色体コピー数解析.....	33
4-4. DCG にみられた <i>SETD2</i> 変異.....	35
4-5. 新規 <i>PPM1D</i> 融合遺伝子の同定.....	37
4-6. DNA メチル化解析.....	40
4-7. 遺伝子発現プロファイル.....	44
4-8. DNA メチル化、発現データの統合解析.....	46
4-9. モチーフ解析.....	52
5. 考察.....	54
6. 参考文献.....	60
7. 謝辞.....	69

## 1. 要旨

小脳神経膠腫の分子異常を明らかにすべく 27 症例の手術検体を用いて解析を行った。特に 17 症例に対してはオミックス解析を施行した。解析の結果、小脳神経膠腫はクロマチン関連遺伝子 (*SETD2* や *H3F3A*) や p53 関連遺伝子 (*PPM1D* や *TP53*) のゲノム異常、*PDGFRA* と関連した遺伝子群のエピゲノム変化や発現亢進など、他部位の神経膠腫とは異なった分子プロファイルを有していることが明らかになった。また正常神経系細胞の分化と関連した転写因子の制御パターンにおいても他部位に発生した神経膠腫と違いがみられ、特に小脳神経膠腫では *SOX10* の亢進が特徴的であった。このような知見に基づき小脳神経膠腫に特異的な分子異常を標的とした治療が有効である可能性が示唆された。

## 2. 序文

神経膠腫 (glioma) は中枢神経系原発の脳腫瘍としては最も高頻度で、年間 10 万人に 5 人程度の割合で発生する。特に周囲脳組織に浸み込むように発育するびまん性神経膠腫 (diffuse glioma) は、手術による全摘出は不可能である。びまん性神経膠腫は WHO (World Health Organization) グレードにより II から IV に分けられる。後述の分子異常の観点から初発時にグレード II または III の神経膠腫とグレード IV の神経膠腫は別の生物学特性を持った腫瘍と考えられる。WHO グレード IV のの膠芽腫 (glioblastoma, GBM) の予後は、摘出術後、標準治療である放射線照射及びテモゾロマイド投与を行った群で、その全生存期間は 14.6 ヶ月程度と他の臓器の癌腫と比較しても極めて悪性である [60]。WHO グレード II または III の神経膠腫においては星細胞腫 (astrocytoma) 系腫瘍と、乏突起膠腫 (oligodendroglioma) 系腫瘍があるが、これらも年月をかけてグレード IV へと悪性転化していく。そのため、この難治疾患に対してさらなる病態の解明と新規治療の開発が望まれる。

一方、次世代シーケンサーの登場により様々な癌種に対して、精力的に網羅的癌ゲノム解析がなされ、神経膠腫においてもその分子異常の全貌が明らかに

なってきた。2005年より米国主導で行われている TCGA (The Cancer Genome Atlas) プロジェクトにおける成人神経膠腫の分子解析では、GBM のほとんどの症例で RTK (receptor tyrosine kinase) 経路、p53 経路、RB1 経路のそれぞれに遺伝子変異や染色体コピー数変化などの異常が同定された [6, 9]。また *TERT* プロモーターの変異が約 70% の GBM で同定され、これらの症例は *TERT* 発現増加を伴っていた。遺伝子発現や DNA メチル化データによる統合解析では、同じ GBM と病理診断される症例の中でも予後に差がみられるいくつかのサブグループが存在することが明らかになった [11, 67]。一方で、WHO グレード II 及び III の低分化型びまん性神経膠腫の解析では、これらの大半に共通して *IDH1* 変異がみられ、さらに星細胞腫 (astrocytoma) 系腫瘍では *TP53* や *ATRX* の変異が、乏突起膠腫 (oligodendroglioma) 系腫瘍では 1 番染色体短腕及び 19 番染色体長腕のヘテロ接合性消失 (loss of heterozygosity, LOH) や *CIC* や *FUBP1* 等の変異を有することが明らかとなった [10, 70]。*IDH1* はクエン酸回路のイソクエン酸デヒドロゲナーゼの一つをコードする遺伝子であるが、この点突然変異によりイソクエン酸を  $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換できなくなり、代替りの代謝産物として 2-ヒドロキシグルタル酸 (2-HG) が蓄積する [14]。この 2-HG が DNA 脱メチル化酵素

である TET2 やヒストン脱メチル化酵素である KDM に抑制的に働き、glioma CpG island methylator phenotype (G-CIMP) とよばれる特徴的な DNA の高メチル化やヒストンの高メチル化をもたらす癌化を引き起こすと考えられている [35, 41, 66]。

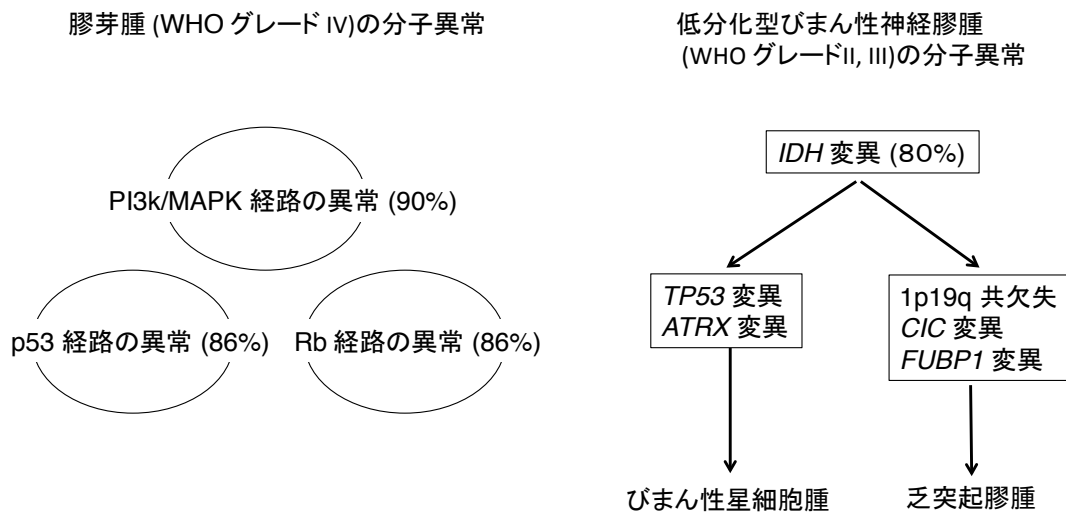


図 1. びまん性神経膠腫の分子異常のまとめ

過去の報告により明らかとなっているびまん性神経膠腫の分子異常を示す。左に膠芽腫 (WHO グレード IV) を、右に低分化型びまん性神経膠腫 (WHO グレード II, III) の分子異常を示す。

これらは主に大脳半球に発生する神経膠腫の分子異常であるが、一方で、神経膠腫の発生部位や発症時年齢によって異なった分子異常が存在し、癌化に関与していることもまた、最近のゲノム解析研究により明らかとなった [61]。代表例は小児神経膠腫の網羅的ゲノム解析により発見された *H3F3A* 変異である。*H3F3A* はヒストン H3.3 をコードする遺伝子で、このヒストンテールの 27 番目のリジンをメチオニンに変換する K27M 変異及び 34 番目のグリシンをアルギニンもしくはバリンに変換する G34R/V 変異が発見された [56]。これらの変異は部位や年齢特異性が非常に強く、K27M 変異は小児から青壮年の脳幹、視床、脊髄といった正中部に発生する神経膠腫に、また G34R/V 変異は思春期の大脳半球に発生する神経膠腫に限局して見られる [2, 21, 57, 62]。また両遺伝子変異は相互排他的で共存することがない。K27M、G34R/V はそれぞれ H3K27 トリメチル化、H3K36 トリメチル化を抑制することによりクロマチンの高次構造を変化させ遺伝子制御異常をもたらし、癌化を引き起こすと考えられている [4, 32]。特に H3 K27M 変異がみられる正中部の神経膠腫に関しては特徴的な一群として、2016 年に改訂された WHO 分類でも“Diffuse midline glioma, H3-K27M mutant” という新たな診断名がつけられることとなった [34]。その他、DNA damage



response 経路の制御と関連する *PPM1D* の変異や *SMAD* シグナル経路の *ALK2* をコードする *ACVR1* の変異も脳幹部に発生する神経膠腫にみられるが、他部位の神経膠腫ではほとんどみられず、*IDH1* 変異は脳以外の神経膠腫では極めて低頻度である [16, 19, 64, 71]。

星細胞腫及び乏突起膠腫とは異なったタイプの神経膠腫である上衣腫 (ependymoma) もまた、部位によって異なった特徴を有する。上衣腫の体細胞変異は他癌腫と比べて少ないが、テント上の上衣腫では高頻度にクロモソリプシス (染色体破砕：少数の染色体中の大規模な破壊と再編成) の結果、*RELA* や *YAP1* の融合遺伝子が作られ癌化をもたらす。また上衣腫のメチル化プロファイルにおいてはテント上、テント下、脊髄においてそれぞれ 3 群、計 9 群に分かれる。[36, 44, 45]。

このような腫瘍間の分子異常の違いは予後や治療に対する感受性の違いとなるため重要である。また治療標的となる分子異常に応じた創薬研究が進歩しており、今後の治療介入の幅が広がる可能性が期待出来るという点からも、腫瘍発生部位ごとの分子プロファイルを明らかにすることは重要と言える。

一方で小脳に発生するびまん性神経膠腫 (diffuse cerebellar glioma, DCG) は比

較的稀であることもあり、これまでに網羅的な分子レベルの解析に関する報告がない。本邦の全国脳腫瘍統計 14 版によると全びまん性神経膠腫のうち約 3.3% で、海外の報告でも 0.9% - 4.0%程度である[1, 12, 24]。

臨床的特徴は比較的若年者に多いこと、後頭蓋窩の体積が小さいため発見時の腫瘍体積が小さいことなどが報告されている。予後に関してはその他の部位の神経膠腫と比べて良いとするもの、悪いとするもの、脳幹への進展が見られる症例に限って悪いとするもの等、様々である。治療に関しても他部位の神経膠腫と同様の方針でなされている[1, 24]。

今回、我々は DCG の分子生物学的特徴を網羅的に探索すべく、その臨床検体を用いて、全エクソームシーケンス、RNA シーケンス、メチル化アレイ等によるオミックス解析を行った。さらに得られたデータを大脳、脳幹、視床等から発生した神経膠腫のデータと比較した。その結果、DCG には様々な点で、別部位に発生する神経膠腫と異なった特徴を有することが明らかとなった。これらの結果は小脳神経膠腫に特異的な分子異常を標的とした治療戦略が有効である可能性を示唆した。

### 3. 方法

#### 3-1. 対象とした検体

本研究は東京大学のヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理審査委員会において承認を得て施行された。（「脳腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」 承認番号 G10028）

臨床検体は東京大学医学部附属病院、杏林大学医学部附属病院、獨協医科大学病院、東京女子医科大学病院、横浜市立大学附属病院、埼玉医科大学国際医療センター、国立がん研究センター中央病院において、手術を施行した患者から得られたものを使用した。東京大学以外のそれぞれ施設においても上述の課題名で研究倫理審査委員会の承認を得た。

使用した DCG 検体は、

- ① 画像上、小脳に限局
- ② 病理診断で WHO グレード II 以上のびまん性神経膠腫
- ③ 初回診断時 20 歳以上

の条件を満たす症例とし、27 症例から検体が得られた。うち 22 症例は-80 度で

凍結保存された検体で、残りの 5 症例はホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin fixed paraffin embedded, FFPE) 検体であった。凍結検体を得られた 22 症例のうち 17 症例からは同一患者の血液 DNA も得られた。DCG と発現データの比較のために、8 症例の脳 GBM の腫瘍検体も使用した。本研究に使用した症例の基本情報及び、解析を行った内容に関して表 1 に示す。

腫瘍及び血液検体からの DNA 抽出には DNeasy Blood and Tissue kit (Qiagen) を、腫瘍検体からの RNA 抽出には RNeasy Mini kit (Qiagen) を用いた。

表 1. 使用サンプル情報

Sample ID	Gender	Age	WHO grade	Histopathology	Location	Overall survival (month)	FF or FFPE	Matched blood sample	Exome seq	RNA seq	Methylation array	Sanger seq
DCG_01	Male	68	IV	Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant (comparable to glioblastoma)	Right cerebellar hemisphere	11.3	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_02	Male	78	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	16.7	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_03	Male	81	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Bilateral cerebellar hemisphere	13.4	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_04	Male	40	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right cerebellar hemisphere	68.7	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_05	Male	29	IV	Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant (comparable to glioblastoma)	Right cerebellar hemisphere	13.7	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_06	Male	77	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	2.5	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_07	Female	64	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right cerebellar hemisphere	51.7	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_08	Male	68	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	15.5*	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_09	Male	79	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	14.8*	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_10	Male	74	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right cerebellar hemisphere	12.5*	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_11	Female	28	IV	Diffuse midline glioma, H3K27M-mutant (comparable to glioblastoma)	Cerebellar vermis	8.0	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_12	Female	44	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	2.2*	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_13	Male	67	II	Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere, Cerebellar peduncle	86.5*	FF	Yes	Yes	No	Yes	Yes
DCG_14	Female	33	II	Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype	Cerebellar vermis	47.1*	FF	Yes	Yes	No	Yes	Yes
DCG_15	Female	66	III	Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	68.6*	FF	Yes	Yes	No	Yes	Yes
DCG_16	Male	75	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Vermis, Left cerebellar hemisphere	14.0*	FF	Yes	Yes	No	Yes	Yes
DCG_17	Female	77	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Bilateral cerebellar hemisphere	53.0*	FF	Yes	Yes	Yes	Yes	Yes
DCG_18	Male	70	III	Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	2.7	FF	No	No	No	No	Yes
DCG_19	Female	30	II	Diffuse astrocytoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	32.2*	FF	No	No	No	No	Yes
DCG_20	Female	61	III	Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	11.5*	FF	No	No	No	No	Yes
DCG_21	Male	40	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right cerebellar hemisphere	2.2*	FF	No	No	No	No	Yes
DCG_22	Male	56	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	6.5	FF	No	No	No	No	Yes
DCG_23	Male	45	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Bilateral cerebellar hemisphere	20.0*	FFPE	No	No	No	No	Yes
DCG_24	Male	40	III	Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	23.5*	FFPE	No	No	No	No	Yes
DCG_25	Female	56	III	Anaplastic astrocytoma, IDH-wildtype	Bilateral cerebellar hemisphere	21.1*	FFPE	No	No	No	No	Yes
DCG_26	Female	67	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left cerebellar hemisphere	30.0	FFPE	No	No	No	No	Yes
DCG_27	Female	29	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right cerebellar hemisphere	11.5*	FFPE	No	No	No	No	Yes
GBM1	Female	35	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left temporal lobe	17.2	FF	No	No	Yes	No	No
GBM2	Female	66	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left frontal lobe	72.2*	FF	No	No	Yes	No	No
GBM3	Female	62	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right parietal lobe	18.0	FF	No	No	Yes	No	No
GBM4	Female	71	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left parietal lobe, multiple	9.2	FF	No	No	Yes	No	No
GBM5	Male	47	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right temporal lobe	41.3	FF	No	No	Yes	No	No
GBM6	Male	64	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Left frontal lobe	7.8	FF	No	No	Yes	No	No
GBM7	Male	66	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Right frontal lobe	14.5	FF	No	No	Yes	No	No
GBM8	Male	58	IV	Glioblastoma, IDH-wildtype	Bilateral frontal lobe	19.6	FF	No	No	Yes	No	No

\*censored FF freshly frozen

### 3-2. サンガーシーケンス

びまん性神経膠腫で高頻度みられる *H3F3A* (K27)、*TERT* プロモーター (C228 及び C250)、*IDH1* (R132)、*IDH2* (R172)、のホットスポット変異の有無を調べるべく、サンガー法によるシーケンスを行った。27 症例の腫瘍 DNA を用いて PCR (polymerase chain reaction) を行った。DNA ポリメラーゼは KOD-Plus-Neo (Toyobo) を用いた。プライマー配列、アニーリング温度、増幅される PCR 断片長を表 2 に示す。PCR 後、電気泳動を行い、目的の大きさの産物が増幅されていることを確認し、これをアガロースゲルから切り出し、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) と反応させ、シーケンスを行った。

表 2. サンガーシーケンスに用いたプライマー配列

Primer	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Annealing temperature (°C)	Estimated size of PCR product (bp)
<i>H3F3A</i>	TCAATGCTGGTAGGTAAG TAAGGA	GGTTTCTTCACCCCTCCAGT	60	152
<i>TERT</i>	CCAGCTCCGCTCCTCCG	GCTGCCTGAACTCGCGCC	60	141
<i>IDH1</i>	CGGTCTTCAGAGAAGCCATT	GCAAAATCACAT TATTGCCAAC	60	129
<i>IDH2</i>	AGCCCATCATCTGCAAAAAC	CTAGGCGAGGAGCTCCAGT	60	150

### 3-3. 免疫組織染色

DCG の FFPE サンプルを使用して H3K36 トリメチル化に対する免疫組織染色を行った。切片は厚さ 4  $\mu\text{m}$  となるよう作成した。脱パラフィン処理後、クエン酸バッファーにて抗原賦活処理を行い、一次抗体にインキュベーションを行った。抗体は H3K36 トリメチル化抗体 (Abcam 社・ab9050、希釈率 1:2000) を使用した。

### 3-4. 全エクソームシーケンス

腫瘍検体に加えて、同一患者からの正常血液検体を得られた 17 症例について、腫瘍及び血液 DNA を用いて全エクソームシーケンスを行った。目的の領域を増幅したライブラリー作成は Agilent SureSelect V6 plus COSMIC (Agilent Technologies) を使用して行った。まず、1  $\mu\text{g}$  の 2 本鎖 DNA を Covaris SS Ultrasonicator を用いて 200 bp 程度になるように断片化し、アダプター配列を両端に付加した。全エクソン領域に設計されたビオチン化プローブとサンプルをハイブリダイズさせた後、ストレプトアビジン磁気ビーズを用いてエクソン領域のみを濃縮した。さらにマルチプレックスシーケンス用にインデックスを

付加し、PCR にて増幅を行った。こうして作成した DNA ライブラリーを HiSeq2000 (Illumina) にて 100 bp ペアエンドリードシーケンスを行った。今回シーケンスを行った検体はいずれも同一フローセル内で行った。得られたリード情報は Burrows-Wheeler Aligner (BWA)及び NovoAlign software (Novocraft Technologies) を用いてヒトリファレンスゲノムである GRCh37/hg19 にマッピングした [23]。

### 3-5. 変異解析・染色体コピー数解析

全エクソームシーケンスにより得られたデータを用いて、体細胞 1 変異、染色体コピー数変化、腫瘍率の検出を行うために、東京大学先端科学技術センター・ゲノムサイエンス分野にて開発したソフトウェア (karkinos: <http://github.com/genome-rcaast/karkinos>) を使用した [26, 65]。このアルゴリズムでは、がんサンプル及び正常サンプルのシーケンスリードをキャプチャーターゲットごとに算出し、がんと正常のリード比を算出しヘテロ SNP (single nucleotide polymorphism) のアリル頻度情報から腫瘍率とコピー数変化を算出する。変異検出では腫瘍率で補正した変異リードの割合が15%以上かつ、正常血液



DNAで検出されない変異を、変異ありとして残した。最終的に残した変異はサ  
ンガーシーケンスやRNAシーケンスのリードでも同変異が検出されるか調  
べた。

### 3-6. RNA シーケンス

DCG14 検体及び大脳 GBM8 検体より抽出した RNA を用いて RNA シーケン  
スを行った。ライブラリー作成は TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit  
(Illumina) を使用して行った。まず、1 $\mu$ g のトータル RNA から、poly T オリゴの  
結合した磁気ビーズを用いて、poly A を持つ mRNA のみを精製し、94 度で 2 分  
間加熱することで小断片化した。次いで SuperScript II (Invitrogen) にて逆転写し、  
cDNA の両端にアダプター配列を付加し、PCR にて増幅させた。こうして得ら  
れたライブラリーを HiSeq2000 にてシーケンスを行った。今回シーケンスを  
行った検体はいずれも同一フローセル内で行った。得られたリードデータは  
BWA (Burrows-Wheeler Aligner) を用いてヒト・トランスクリプトームデータベ  
ースの UCSC gene 及び、GRCh37/hg19 にマッピングし、FPKM (fragments per  
kilobase of exon per million fragments mapped, 全リードを 100 万リードに補正後、

各遺伝子の配列長が 1000 塩基であったと仮定した時のリード数) 値を算出した。

### 3-7. 融合遺伝子解析

RNA シークエンスにより得られたデータを用いて融合遺伝子解析を行った。

各サンプルの Fastq ファイルを融合遺伝子解析用ソフトウェアである、Genomon-fusion (<https://genomon-project.github.io/GenomonPagesR/>) を用いて解析した。

融合遺伝子の候補条件として

- ① 各リードの両側で、それぞれの遺伝子に 12 塩基以上マッチングしている。
- ② 同一ブレイクポイントのリードが想定されるリードが 4 リード以上存在する。
- ③ リードスルーを除外するために、同一染色体内での融合が想定される場合は

10 万塩基以上離れていること。

を全て満たしていることとした。候補となったペアから癌化との関与が疑われるペアを選んだ。

着目した *PPM1D* 融合遺伝子の検証のために、該当症例の RNA を Superscript III (Invitrogen) にて逆転写し、ブレイクポイントを挟むようにプライマーを設計し、PCR を行った。プライマー配列、アニーリング温度、増幅される PCR 断片長を

表 3 に示す。DNA ポリメラーゼは KOD-Plus-Neo を用いた。PCR 後、電気泳動を行い、目的の大きさの産物が増幅されていることを確認し、これをアガロースゲルから切り出し、BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) と反応させ、シーケンスを行った。

表 3. *PPM1D* 融合遺伝子検証のために用いたプライマー配列

Primer	Forward primer sequence	Reverse primer sequence	Annealing temperature (°C)	Estimated size of PCR product (bp)
<i>PPM1D</i> fusion isoform 1	AATGTGCCAGGACCAAGAGG	TCAAGGAGATTCGGTGACA	60	311
<i>PPM1D</i> fusion isoform 2	AATGTGCCAGGACCAAGAGG	TGCTCAAAGTGGCAAGGTCT	60	340
<i>PPM1D</i> fusion isoform 3	AATGTGCCAGGACCAAGAGG	GTTCCCGGCCTCTTTTCCT	60	318

### 3-8. DNA メチル化解析

17 症例の DCG から得られた腫瘍 DNA に対して Infinium MethylationEpic BeadChip (Illumina) を用いて DNA メチル化解析を行った。今回データ取得を行った検体はいずれも同一アレイにて行った。各 CpG サイトプローブの beta 値は下の式により算出した [5]。

メチル化アレルの信号強度 / (非メチル化アレルの信号強度 + メチル化アレルの信号強度 + 100)

この beta 値は 0 (非メチル化) から 1 (メチル化)の幅を持ち、各 CpG サイトプローブのメチル化レベルを反映している。

17症例のDCGから取得したメチル化アレイデータのうち、全エクソームシーケンスで腫瘍率の低かった3症例に関しては正常脳のメチル化データを含めてクラスタリング解析を行ったところ、正常脳と近いメチル化パターンを示したため除外した。クラスタリング解析は14症例のDCGのデータに加え、Sturmらの報告で使用された210例の高悪性度神経膠腫のMethylation450K BeadChip のデータを統合させて行った [62]。このデータのうち、DKFZ (German Cancer Research Center) グループのものはNational Cancer for Biotechnology Information (NCBI) のGene Expression omnibus (GEO, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo>) よりアクセス番号 GSE36278にて、またTCGA (The Cancer Genome Atlas) グループのものは TCGAウェブサイト (<https://tcga-data.nci.nih.gov>) より入手した。染色体X, Yのプローブ及びSNPプローブを除いた後、本研究のMethylationEPIC BeadChipプローブと、使用した公共データのInfinium450K BeadChipプローブの

うち共通プローブを抽出し、その中からXY染色体上プローブ及びSNP近傍のプローブを除いた、300870プローブを使用した。標準偏差で上位8000プローブを抽出し、RパッケージのConsensusClusterPlusを用いてクラスタリング解析を行った。既報と同様にアルゴリズムは非階層型の*k*-means法、計算法はEuclidian法とした。既報と同様に*k*=6を採用した。

プロモーター領域のメチル化解析では18症例のDCGデータ（うち4症例は上述の210症例の公共データにおけるDCG症例のデータ）と上述の210症例の公共データ中で大脳由来であることが明示されている123症例の高悪性度神経膠腫のデータを比較した。プロモーター領域のプローブはUCSC geneとGRCh37/hg19の転写開始点から1500塩基以内のプローブとして定義し、各遺伝子のプロモータープローブのbeta値の平均値を算出することで、1遺伝子1つのbeta値に代表させた。DCG及び大脳高悪性度神経膠腫の2群で、beta値の平均の差及び、ウェルチ *t* 検定の検定値 (*p*値をBenjamini-Hochberg法により多重検定した*q*値) を算出し、volcano plotを作成した。

この解析で得られた、解剖学的領域ごとのプロモーターメチル化の違いを検証すべく、Fontebasso ら (GSE55712)、Zhang ら (GSE50774)、相原ら

(JGAS00000000106) のInfinium Methylation450K BeadChip データ も使用した

[2, 19, 71]。

### 3-9. 遺伝子発現マイクロアレイデータの処理

Sturm らの報告で使用された遺伝子発現マイクロアレイ (Affymetrix U133 plus 2.0 platform) データを GSE36245 にて取得し、ノーマライズ処理をして使用した [62]。それぞれの症例に対応する DNA メチル化データ (GSE36278) を取得し、*SOX10* プロモーターメチル化と発現の相関の有無を検証した。

### 3-10. モチーフ解析

224症例のDNAメチル化データ (本研究で取得したデータに加えて、Strumらのデータを合わせたもの) を*SOX10*プロモーターのメチル化レベル (beta値の平均) で3群に分けた。

*SOX10* promoter hypomethylation 群 :  $\text{beta値} < 0.5$

*SOX10* promoter intermediate methylation 群 :  $0.5 \leq \text{beta値} < 0.7$

*SOX10* promoter hypermethylation 群 :  $0.7 \leq \text{beta値}$

*SOX10* promoter hypomethylation 群において、*SOX10* promoter hypermethylation 群と比較して有意にメチル化が低い非プロモーター領域のプローブ周囲配列に対してモチーフ解析を行うために、この2群間でそれぞれのプローブの beta 値の平均の差とウェルチ *t* 検定の検定値 (*p* 値を Benjamini-Hochberg 法により多重検定した *q* 値) を算出し volcano plot を作成した。より差が大きい領域を抽出して解析すべく、閾値は *q* 値  $< 1 \times 10^{-10}$  かつ平均の差  $< -0.25$  とした。この条件により 1070 プローブが抽出され、これらのプローブ前後 1000 bp の配列に対して HOMER software (v4.9 2-20-2017) を用いてモチーフ解析を行った。

### 3-11. 統計解析

変異遺伝子の頻度はフィッシャー *t* 検定で、生存解析は Kaplan-Meier 法にて全生存期間を算出しログランク法で、発現値はウィルコクソン順位和検定にて検定を行い *p* 値  $< 0.05$  を優位差ありとした。

## 4. 結果

### 4-1. 対象患者の基本情報

DCG 27 症例の腫瘍検体を収集した。全例が成人症例 (年齢中央値 64 歳, 28-81 歳) で WHO グレード IV が 19 症例、III が 5 症例、II が 3 症例であった。まず神経膠腫のドライバー遺伝子として頻度の高い *IDH1*、*IDH2*、*TERT*、*H3F3A* のホットスポット変異の有無を調べるべく、サンガーシーケンスを行った。一般に低分化型びまん性神経膠腫で高頻度の *IDH1* 及び *IDH2* の変異は全例に認めず、GBM で高頻度の *TERT* プロモーター変異は 1 例 (3.7%) に認めるのみであった。*H3F3A* の K27M 変異は 3 例 (11%) に認められたが、脳幹部の神経膠腫と比較して低頻度であった (表 4)。以上からも DCG には異なったドライバー遺伝子変異が存在する可能性が示唆された。



表 4. *H3F3A*、*IDH1*、*IDH2*、*TERT* のホットスポット変異の頻度

	N	Age median (range)	<i>H3F3A</i> K27M	<i>IDH1</i> R132H	<i>IDH2</i> R172K	<i>TERT</i> C228T or 250T
WHO grade IV	19	67 (28-81)	15.8% (3/18)	0% (0/19)	0% (0/19)	5.3% (1/19)
WHO grade III	5	61 (40-70)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)	0% (0/5)
WHO grade II	3	33 (30-67)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)	0% (0/3)
All	27	64 (28-81)	11.1% (3/27)	0% (0/27)	0% (0/27)	3.7% (1/27)

#### 4-2. 全エクソームシーケンスによる網羅的変異解析

腫瘍に加えて正常サンプル (血液) を収集できた 17 症例に対して全エクソームシーケンスを施行した。平均カバレッジは腫瘍 122.3 リード、正常 97.7 リードであった (表 5)。20 リード以上のリードを確保できている領域は腫瘍 96.8%、正常 97.7%であった。全エクソームシーケンスのリード情報にて算出された腫瘍率は平均 61.0% (12.0 – 91.3%) であった (表 6)。

表 5. シークエンスリード情報

Sample ID	Sample type	Total uniquely mapped reads	Mean depth CDS	More than X20 (%) CDS
DCG_01	normal	89461175	107.501	97.166
DCG_01	tumor	80840528	92.466	96.432
DCG_02	normal	94182711	114.051	97.476
DCG_02	tumor	87055008	101.830	96.621
DCG_03	normal	96385351	117.187	97.426
DCG_03	tumor	82464384	96.432	96.601
DCG_04	normal	69116147	82.756	96.404
DCG_04	tumor	108148790	118.565	96.620
DCG_05	normal	67387655	77.958	95.884
DCG_05	tumor	160094302	181.484	98.147
DCG_06	normal	85454324	98.824	96.615
DCG_06	tumor	95290921	109.827	96.806
DCG_07	normal	85696965	99.938	96.555
DCG_07	tumor	105058204	113.855	96.494
DCG_08	normal	91723307	105.062	96.597
DCG_08	tumor	85895192	96.978	96.447
DCG_09	normal	84494836	99.233	96.741
DCG_09	tumor	79651358	95.382	96.265
DCG_10	normal	102437452	121.009	97.333
DCG_10	tumor	81814556	96.585	96.364
DCG_11	normal	71743603	85.349	96.680
DCG_11	tumor	86032373	103.257	96.807
DCG_12	normal	93601004	115.792	95.931
DCG_12	tumor	96829851	115.266	97.125
DCG_13	normal	74294954	89.740	96.602
DCG_13	tumor	102032715	118.248	97.566
DCG_14	normal	89359471	104.534	96.801
DCG_14	tumor	99320978	114.588	97.230
DCG_15	normal	76620373	87.531	96.120
DCG_15	tumor	81821703	96.320	96.012
DCG_16	normal	66848745	77.147	95.521
DCG_16	tumor	86359747	101.005	96.017
DCG_17	normal	70272478	77.613	95.947
DCG_17	tumor	178822283	204.330	97.779

CDS coding sequence

## 6. 腫瘍率

<u>Sample ID</u>	<u>Tumor content ratio</u>
DCG_01	0.200
DCG_02	0.667
DCG_03	0.462
DCG_04	0.730
DCG_05	0.734
DCG_06	0.913
DCG_07	0.500
DCG_08	0.700
DCG_09	0.630
DCG_10	0.876
DCG_11	0.680
DCG_12	0.864
DCG_13	0.120
DCG_14	0.120
DCG_15	0.684
DCG_16	0.684
DCG_17	0.810

全症例の体細胞変異合計は 17,682 個で、そのうち 5,735 個 (32.4%) はアミノ酸置換を伴うものであった。これらの変異を検証すべく、対応する RNA シークエンスのリードを調べた。全エクソームシークエンスで検出されたアミノ酸置換を伴う変異のうち、同ポジションの RNA シークエンスリードが 10 リード以上認められたものが 3021 ポジションであり、そのうち 2647 ポジション (87.6%) で全エクソームシークエンスと同じ変異が RNA シークエンスリードでも確認できた。この検証結果により全エクソームシークエンスデータの信頼性は十分高い

と考えられた。

全エクソームシーケンスを行った 17 症例のうち、2 症例 (DCG\_04 及び DCG\_17) は検出変異数が極めて多く、ミスマッチ修復遺伝子の変異を伴っており、hypermutator と言えた。これら 2 サンプルを除いた 15 サンプルのアミノ酸置換を伴う変異数は合計 818 個 (平均 54.4 個) で、そのうち約 20%が短縮型変異であった (図 2, 3)。

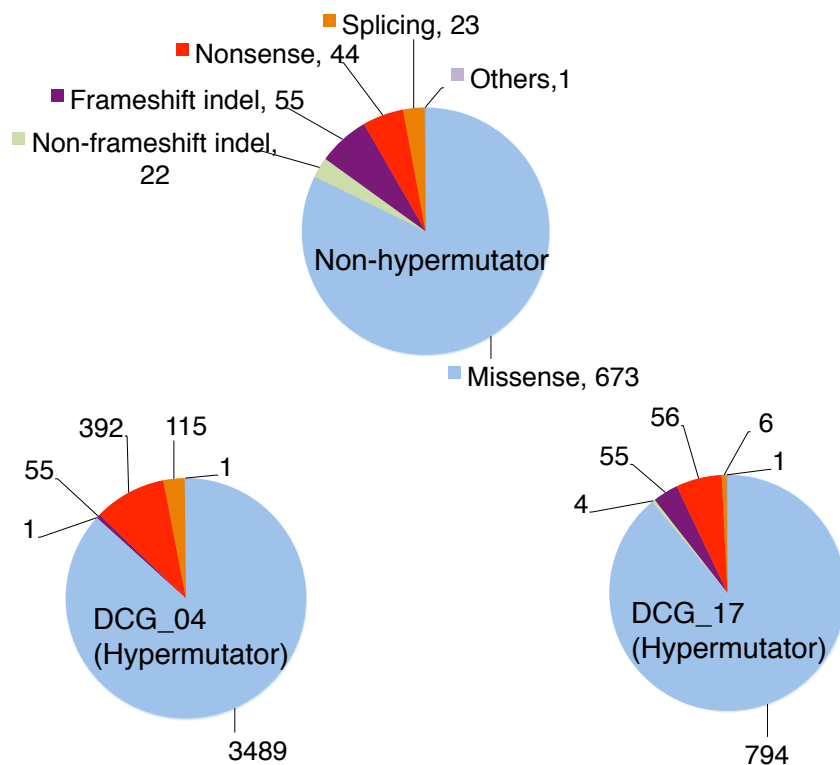


図 2. WES で同定された変異種類の内訳

15 症例の Non-hypermutator, と Hypermutator (DCG\_04 及び 17)に分けて表記。

17 サンプルから検出された、代表的な遺伝子の変異を図 3 に、変異頻度順に上位遺伝子を図 4 に示す。図 3 中の 35 変異はいずれも RNA シーケンスのリード、もしくはサンガーシーケンスのリードのどちらかでも検証できた (図 5)。正中部の神経膠腫で見られる *H3F3A* K27M 変異は 3 症例で認めた。際立っていた所見として、ヒストン H3K36 トリメチル化酵素をコードする *SETD2* の機能喪失型変異を 4 症例で認めた。クロマチン制御異常をもたらす、*H3F3A* 変異を伴う 3 症例と *SETD2* 変異を伴う 4 症例はいずれも相互排他的であり、WHO グレード IV であった。

もう一つの目立った所見として p53 機能喪失関連変異が高頻度で認められた。*TP53* 変異は 9 症例 (58.9%) で、一般的な GBM の *TP53* 変異頻度が 30%程度である点からも高頻度であった [6]。検出された 11 カ所 の *TP53* 変異のうち、10 カ所は変異好発領域であるとともに pathogenic となると考えられている DNA binding domain 内の変異であった (図 6) [63]。また残りの 1 カ所も DNA binding domain より 5'側の splice site 変異であり pathogenic と考えられた。*TP53* 変異を伴っていた 9 症例のうち 4 症例は LOH を伴っており (DCG\_5, 7, 10, 15)、2 症例は 2 カ所の変異を伴っていた (DCG\_4, 17)。PPM1D の C 末端ドメインの短縮型

変異は p53 抑制をもたらす機能獲得型変異であるが、DCG 2 症例にみられた [29, 54] *FGFR1* のチロシンキナーゼドメインの変異は毛様細胞星細胞腫 (pilocytic astrocytoma) や視床、脳幹のびまん性神経膠腫で報告があるが DCG でも 2 症例で認められた (DCG\_1 及び\_15) [19, 25]。いずれの症例も p.K656E 変異がみられ、さらに DCG\_11 は p.V462 変異も見られた。その他 *PDGFRA* の細胞外ドメインの変異を 2 症例に[51]、*BRAF* V600E 変異を 1 症例に認めた。

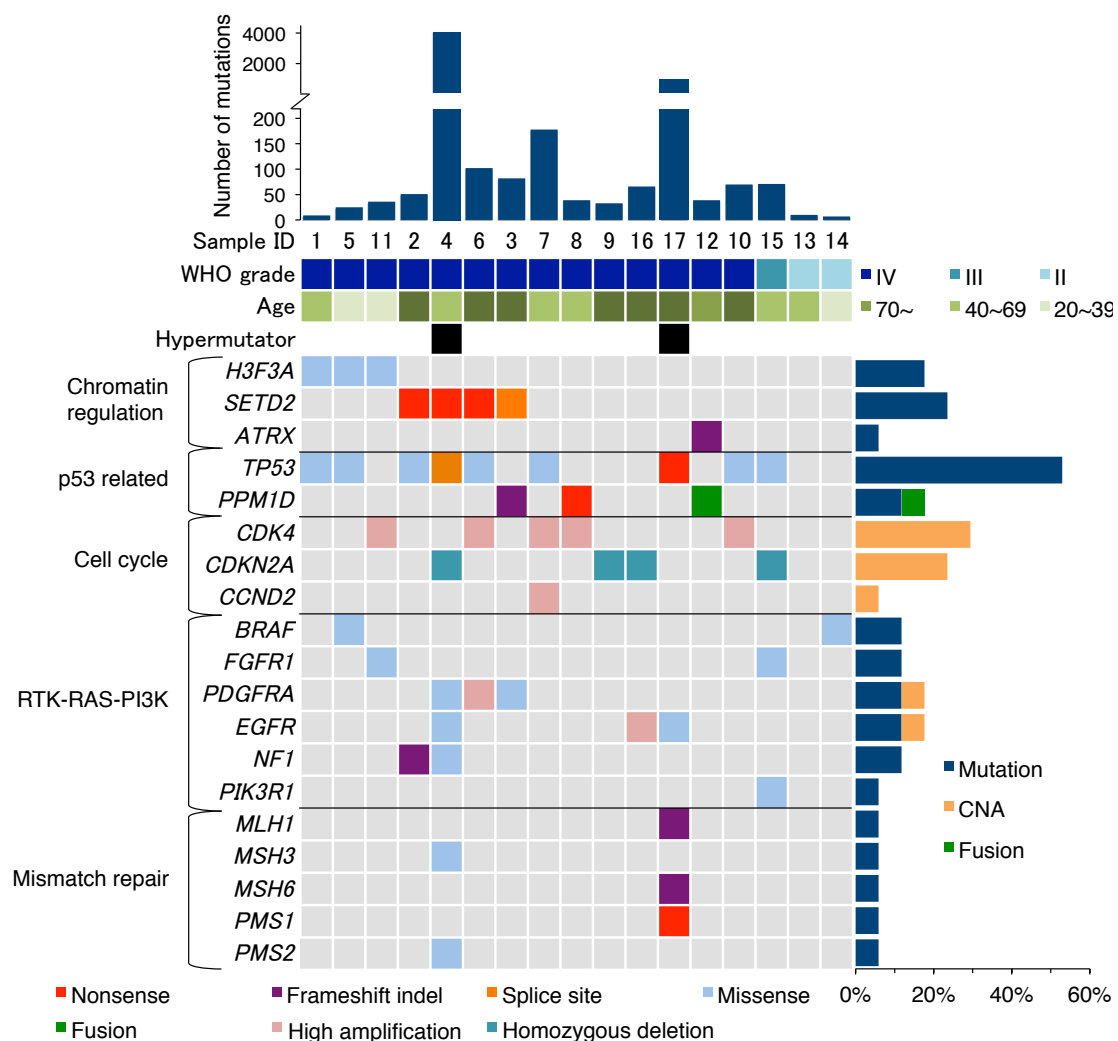


図 3. WES にて検出された遺伝子変異と染色体コピー数異常のサマリー  
 代表的な癌関連遺伝子変異を示す。アミノ酸変化を伴う遺伝子変異の総数、サ  
 ンプル ID、WHO グレード、hypermutator か否かを上に、パスウェイごとの遺伝  
 子名を左に、各遺伝子の変異頻度を右に、変異の種類を下に示す。

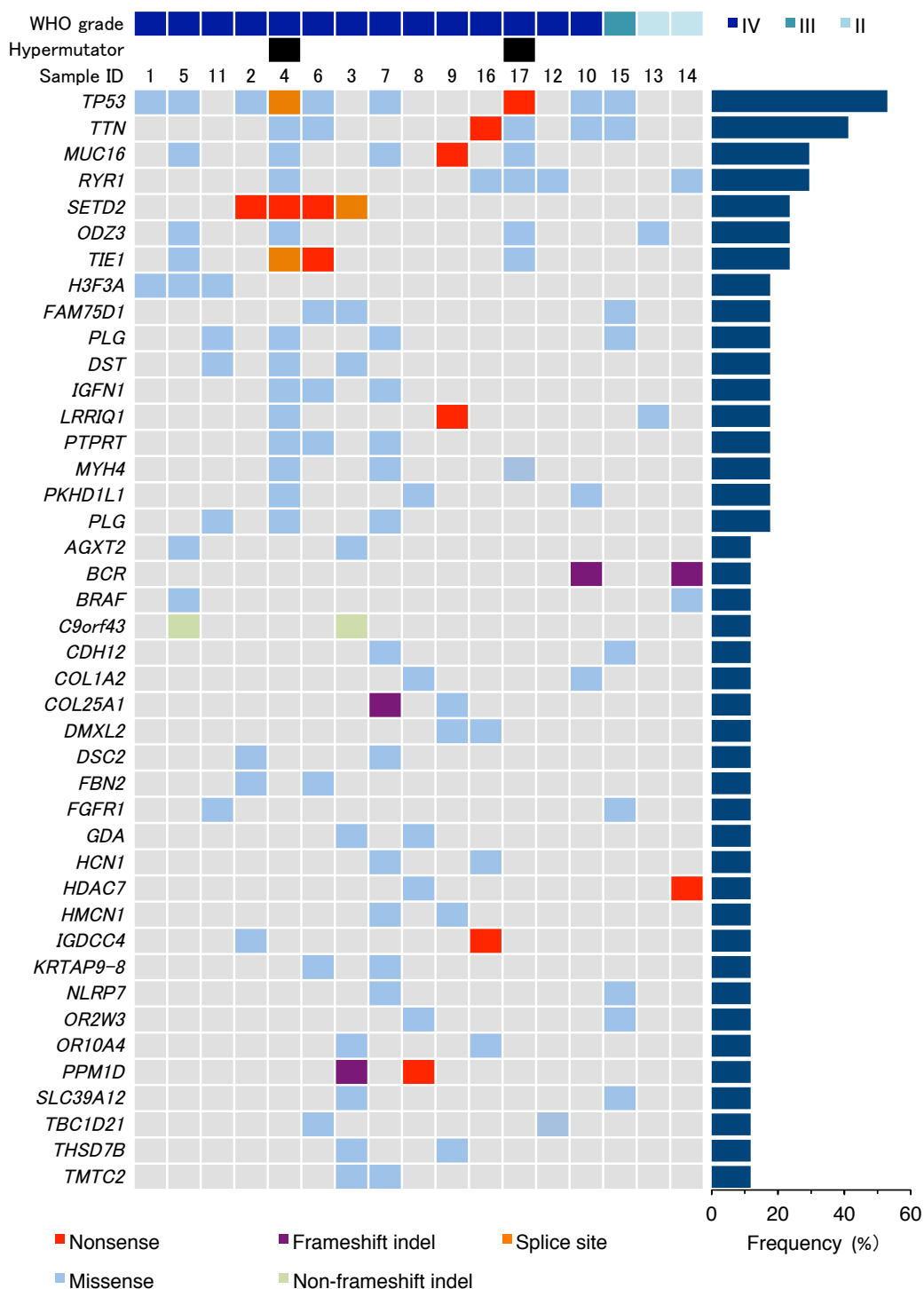
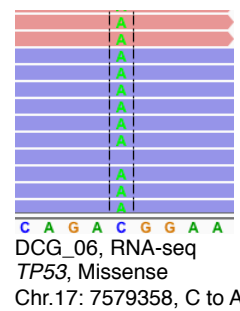
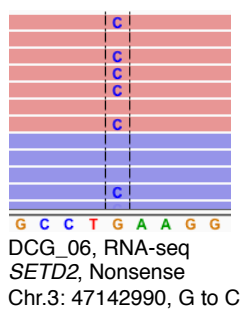
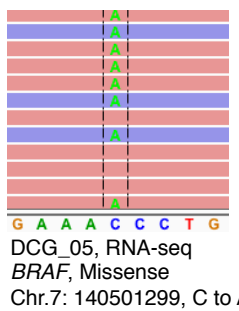
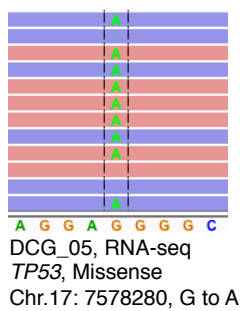
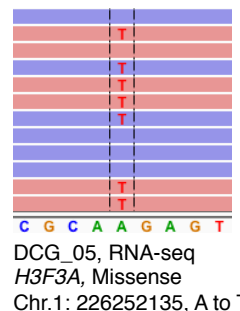
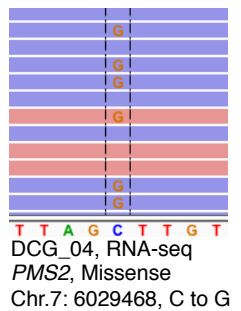
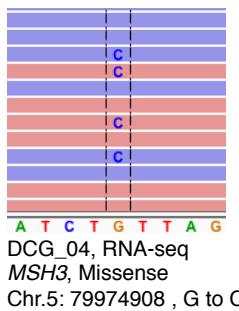
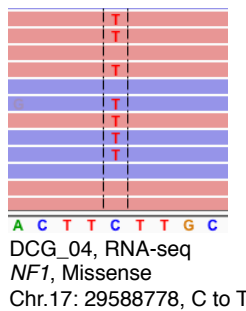
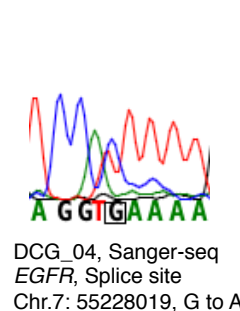
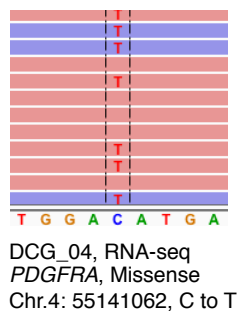
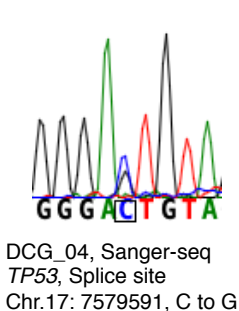
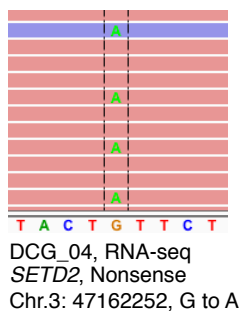
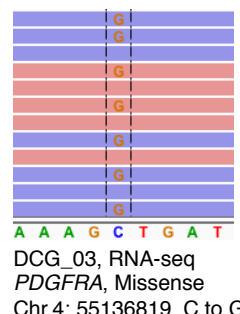
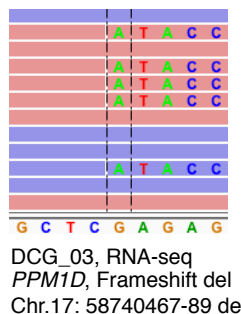
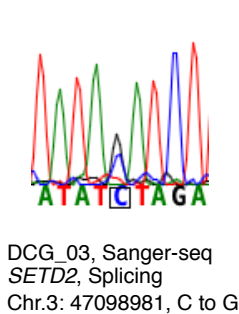
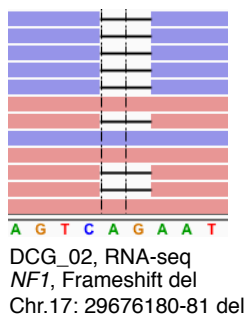
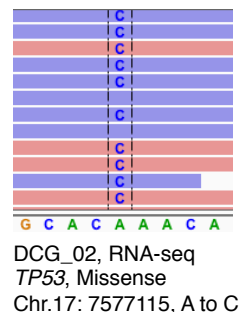
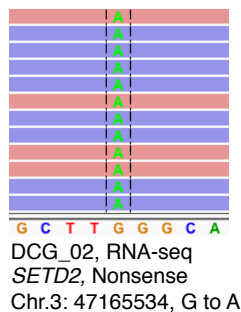
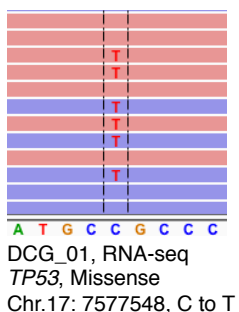
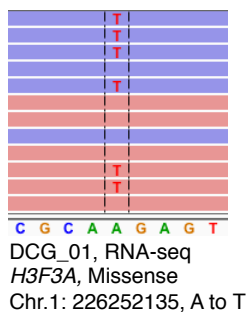
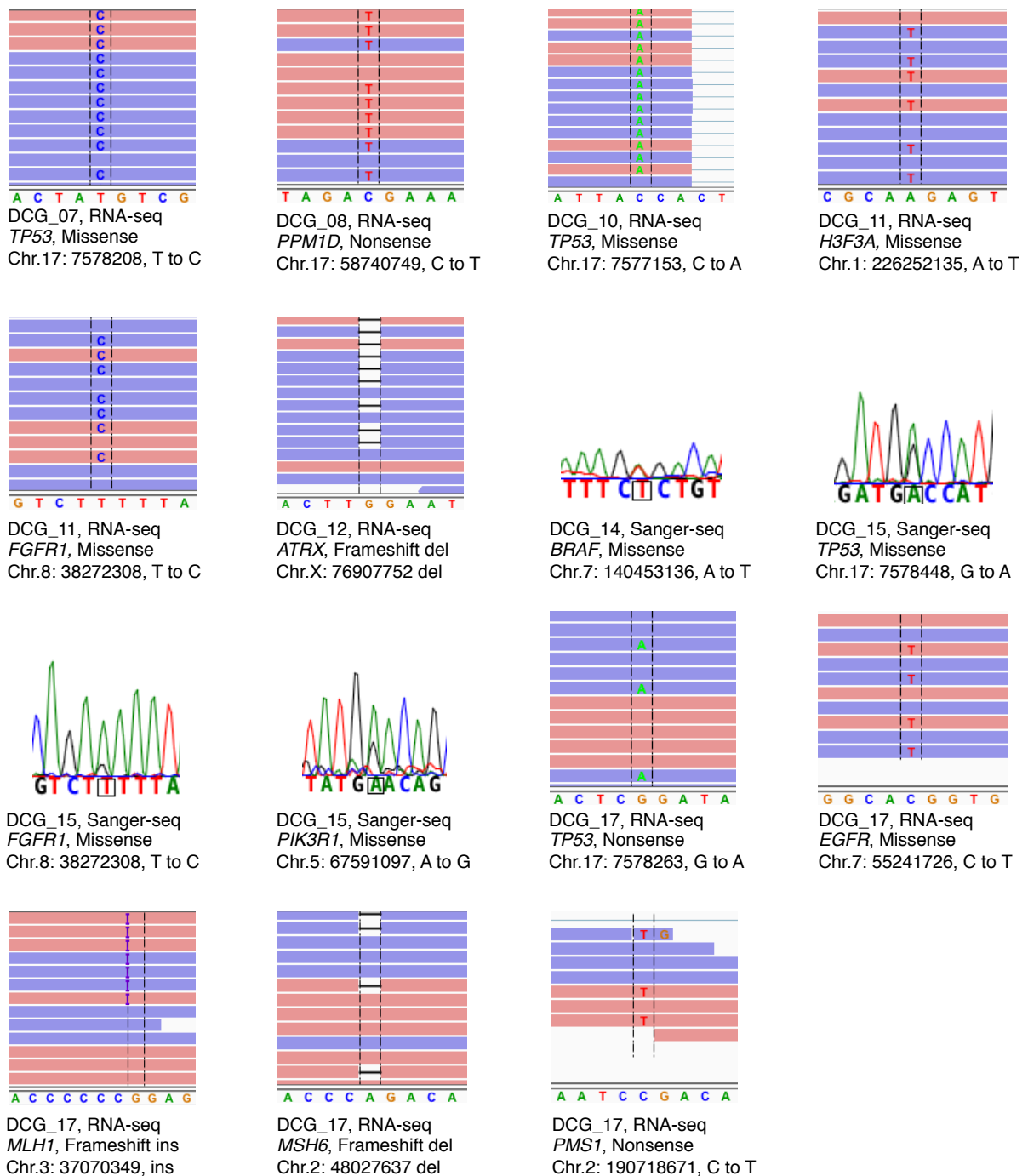


図 3. WES で同定された遺伝子変異

Hypermutator を除いて 2 症例以上で変異を認めた遺伝子を示す。WHO グレード、hypermutator か否か、サンプル ID を上に、右に各遺伝子変異の頻度を、下に変異の種類を示す。

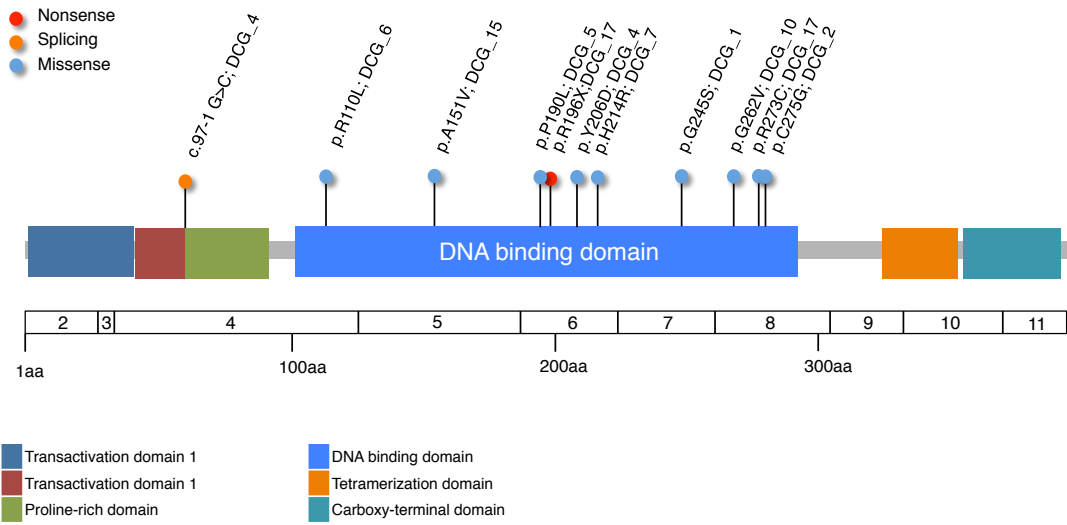






### 図 5. WES により同定された変異の検証

図 3 に表記した全ての変異を RNA シークエンスリード (RNA-seq) もしくはサンガーシークエンス (Sanger-seq) にて検証し得た。サンプル ID、検証を行った方法、変異情報を下に示す。ins insertion, del deletion.



### 図.6 TP53 の体細胞変異

9 症例の DCG でみられた TP53 の変異ポジションを示す。変異の種類をカラーで示す。アミノ酸変化、症例 ID を上に示す。遺伝子ドメインをカラーボックスで示す。

### 4-3. 染色体コピー数解析

全エクソームシーケンスデータを用いて DCG の染色体コピー数を算出した (図 7, 8)。染色体 1 番長腕、5 番短腕、13 番、14 番、17 番短腕、18 番短腕の欠失が高頻度あった。*CDKN2A* のホモ接合性欠失を 4 症例に、*CDK4* の高度増幅を 5 症例に認めた。大脳 GBM に高頻度認める *EGFR* の高度増幅、染色体 10 番の欠失、染色体 7 番の増幅は DCG には低頻度であった。

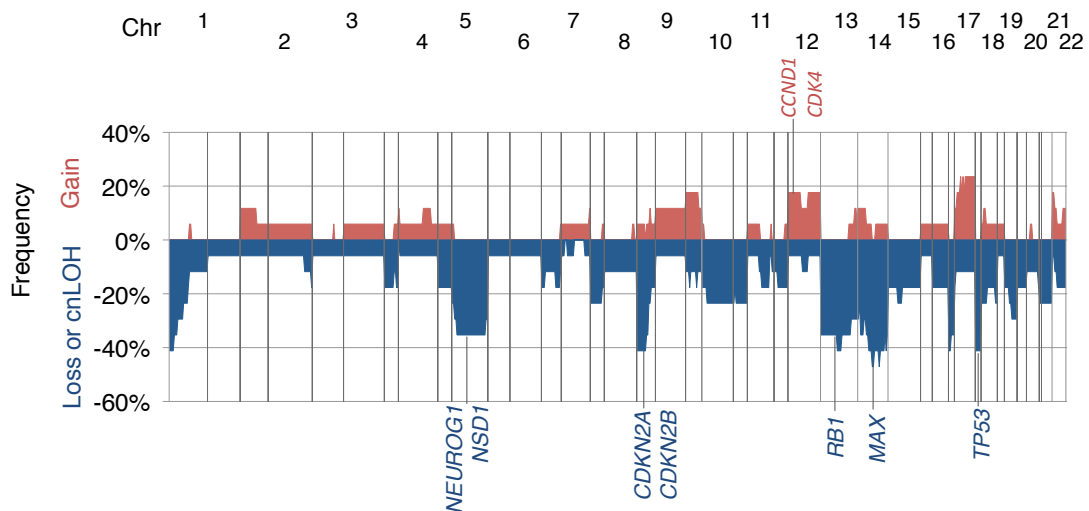


図 7. DCG の染色体コピー数変化の頻度

遺伝子ポジションごとのコピー数変化頻度。横軸に遺伝子ポジションを、縦軸に増幅 (gain) 及び欠失 (loss) の頻度を示す。Copy-neutral LOH (cnLOH) は欠失としてカウントした。Chr chromosome.

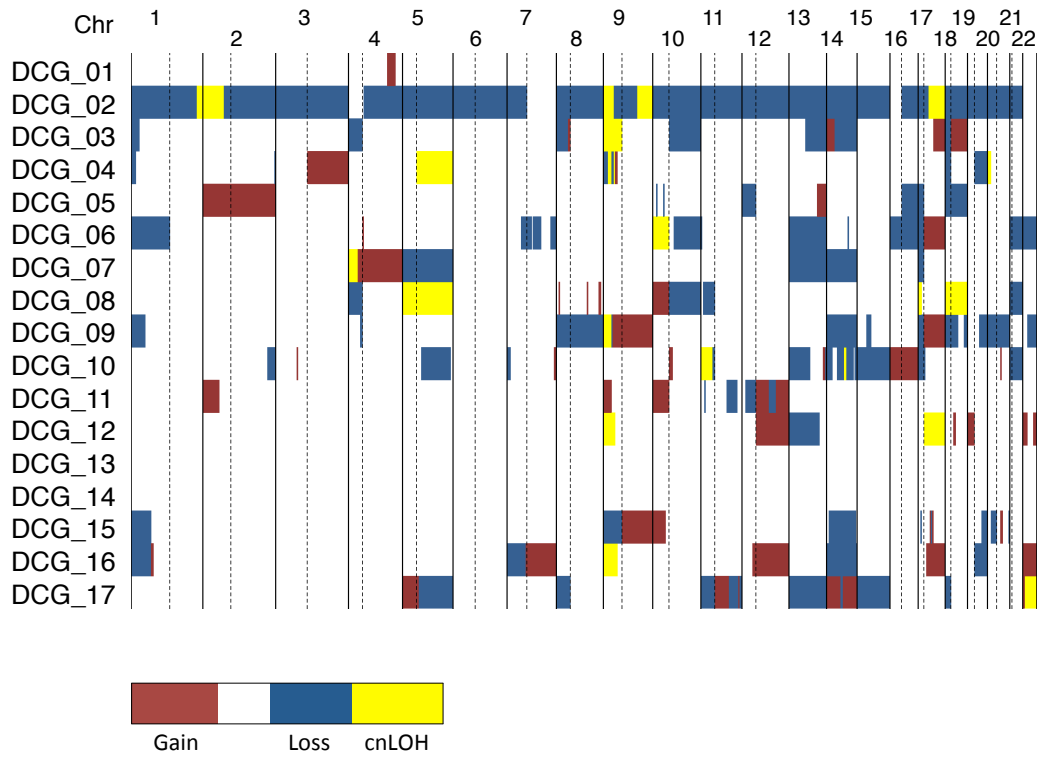


図 8. 症例ごとの染色体コピー数変化

症例ごとの染色体コピー数を色別に示す。縦軸に症例、横軸に染色体のポジションを示す。

#### 4-4. DCG にみられた *SETD2* 変異

全エクソームシーケンスを行った 17 症例の DCG のうち、4 症例 (23.5%) に *SETD2* の機能喪失型の体細胞変異がみられた (図 3, 4, 9a)。このうち 3 症例はナンセンス変異 (p.Q1292X、p.S1658X、p.Q198X) が、1 症例はフレームシフトとなるスプライスサイトの変異 (c.6294-1G>C) がみられた。DCG\_04 は hypermutator であり、p.Q1292X に加えて、3 つのミスセンス変異も伴っていた (p.K118N、p.A152V、p.T371R)。 *SETD2* 変異を有していた DCG はいずれも WHO グレード IV の GBM であった。(14 症例の GBM のうち、4 症例に *SETD2* 変異を認めた。) *SETD2* は H3K36 トリメチル化をもたらす唯一の遺伝子であり腎癌等の複数の癌種において、この遺伝子の変異により H3K36 トリメチル化が低下し、癌化を引き起こすと考えられている [13, 33, 58, 72]。DCG においても *SETD2* 変異症例で H3K36 トリメチル化の低下がみられるか評価すべく、H3K36 トリメチル化に対する免疫組織染色を行った (図 9)。結果、*SETD2* 変異がない症例で腫瘍の核が染色されるのに対して、変異を有する症例では染色性が低下していた。

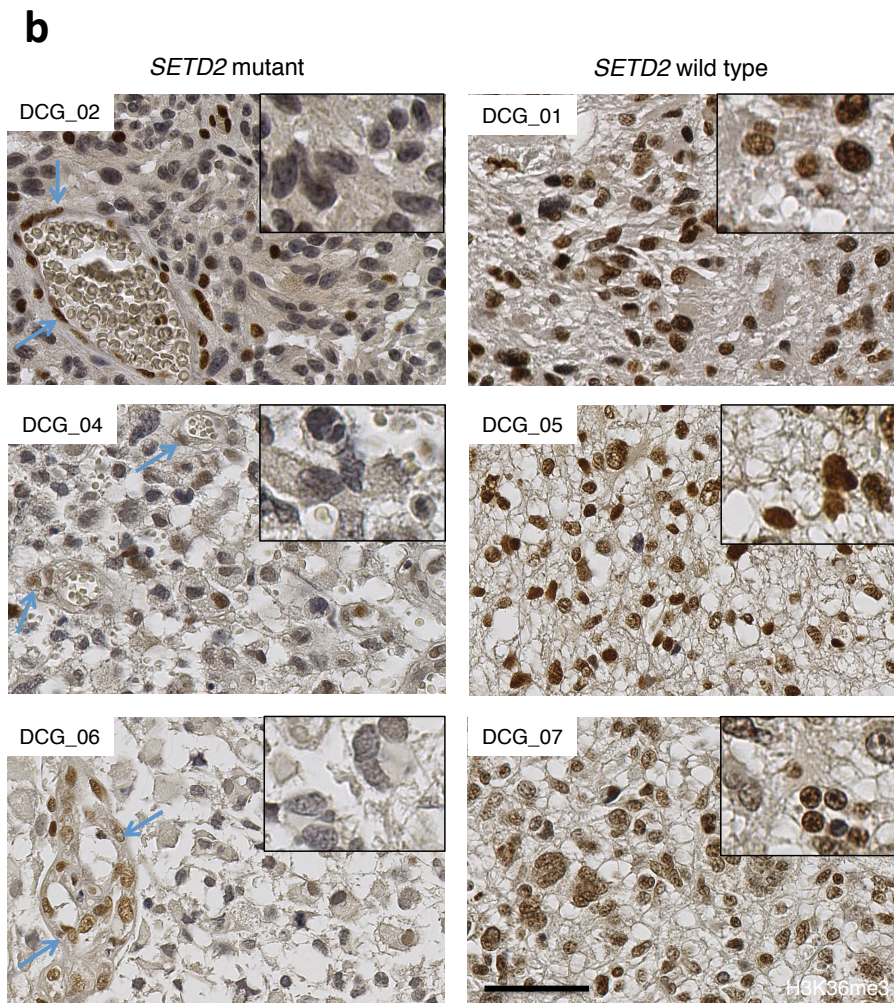
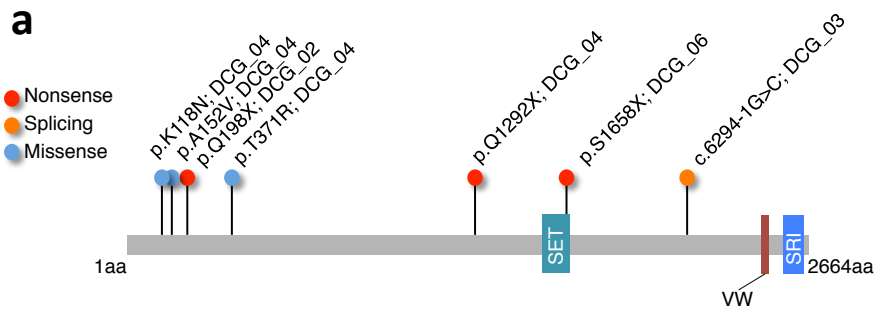


図 9. *SETD2* の体細胞変異

**a.** 4 症例の DCG でみられた *SETD2* の変異ポジションを示す。変異の種類をカラーで示す。アミノ酸変化、症例 ID を上に示す。遺伝子ドメインをカラーボックスで示す。SET SET domain, WW WW domain, SRI SRI domain, aa amino acid. **b.** H3K36 トリメチル化 (H3K36me3) 抗体による免疫染色。左に *SETD2* 変異症例、右に野生型症例を示す。青矢印は内部ポジティブコントロールとして内皮細胞を指す。スケールバーは 50  $\mu$  m を示す。

#### 4-5. 新規 *PPM1D* 融合遺伝子の同定

全エクソームシーケンスで2症例に認めた *PPM1D* C末端ドメインの短縮型変異の他に、RNA シーケンスデータを用いた融合遺伝子解析により、同遺伝子の新規融合遺伝子を同定した (図 10a)。DCG\_12 において、*PPM1D* エクソン 5 にマッピングされた RNA シーケンスのリードの 3'側は同遺伝子のエクソン 6 ではなく、*RPSK6B1* の転写方向と逆向きの配列であった (図 10b)。つまり *PPM1D* のエクソン 5-6 間のイントロンと *RPSK6B1* 内で融合がおき、その結果 *PPM1D* が酵素ドメインを含むエクソン 5 まで転写され、その 3'側に *RPS6KB1* の逆行性転写産物である非翻訳性 RNA が続いていると考えられた (図 10c)。この非翻訳性 RNA には 3つのアイソフォームが存在していたが、いずれもスプライシングアクセプター配列である AG に続いていた。これにより *PPM1D* C末端ドメインの短縮型変異と同機能を果たす転写産物ができると考えられた。これらの転写産物が、特異的に増幅される PCR プライマーを設計し、cDNA を用いて PCR を行ったところ、想定通り DCG\_12 で特異的に増幅が確認された (図 11)。

*PPM1D* の機能獲得型変異 2 症例、融合遺伝子 1 症例、*TP53* 変異 9 症例は相互排他的であり、計 12 症例 (71%) にて p53 抑制的に働く変化がみられた。



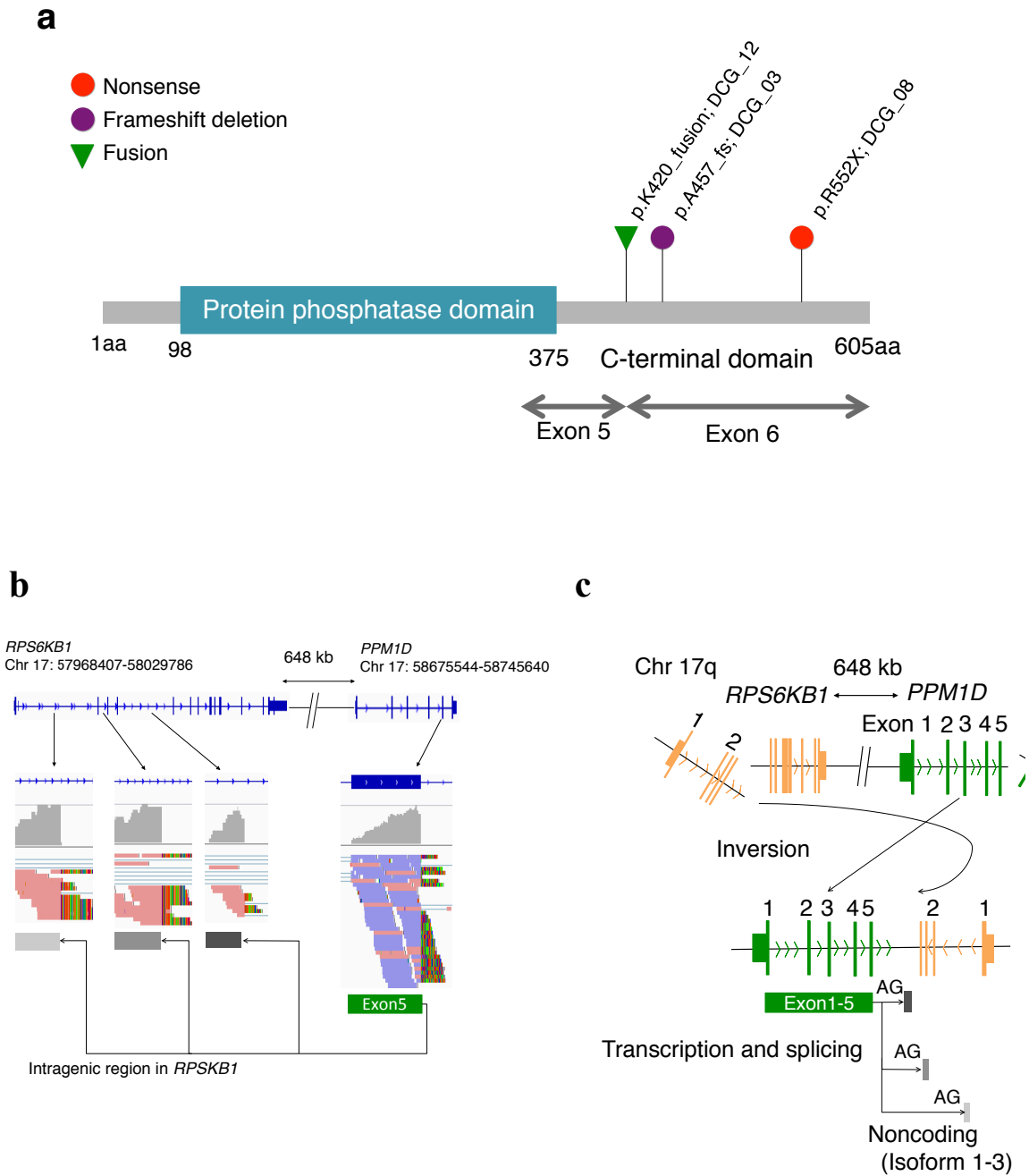


図 10. 機能獲得型 *PPM1D* 変異と新規融合遺伝子

**a.** DCG でみられた *PPM1D* 異常。変異の種類をカラーで示す。アミノ酸変化、症例 ID を上に示す。 **b.** *PPM1D* エクソン 5 にマッピングされたリードの 3'側は、*RPS6KB1* のイントロン領域の転写方向と逆向きの配列。 **c.** *PPM1D* 新規融合遺伝子のシェーマ。*PPM1D* エクソン 5-6 間と *RPS6KB1* が融合している。転写産物は *PPM1D* の酵素ドメインを残し、エクソン 6 を失い、非翻訳 RNA (noncoding) が 5'側に続いている。

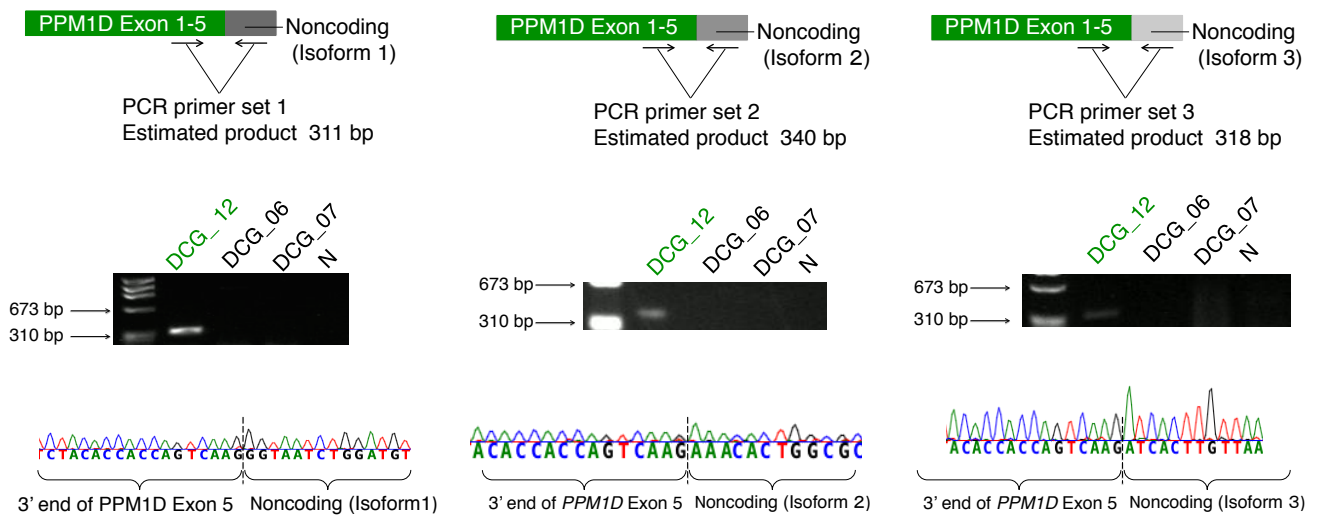


図 11. *PPM1D* 融合遺伝子の PCR による検証

融合遺伝子由来の転写産物 (3つのアイソフォームを含む) が特異的に PCR にて増幅されるようにプライマー (上段) を設計し PCR を施行し、DCG\_12 のみで増幅されることを確認した (中断)。増幅された断片はサンガーシーケンスにて目的の配列であることが確認された (下段)。

#### 4-6. DNA メチル化解析

DCG のエピジェネティックな特徴を抽出すべく、17 症例の腫瘍 DNA を対象に Infinium MethylationEPIC Bead Chip を用いて DNA メチル化データを取得した。このうち 3 症例は全エクソームシーケンス解析で腫瘍率が低く、正常脳と極めて近いプロファイルを示したため、正常脳が多く混在していた影響と判断し除外した。既報の神経膠腫の DNA メチル化データと比較するために、Sturm らの既報の 210 症例のデータと合わせて、クラスタリング解析を行った [62]。

既報と同じ *k*-means 法を使用し、6 グループにわけた (図 12)。結果を図 13 に示す。既報のサンプルは、ほぼ既報通りの 6 グループにわかれた。DCG に関しては *H3F3A* K27M 変異を有する症例はいずれも脳幹や視床のこの変異を有する症例と同様に“K27”グループに分類された。一方で興味深いことに、その他の DCG は全例“RTK I (PDGFRA)”グループに分類された。このように DCG は *H3F3A* K27M 変異の有無で 2 つのメチル化グループに分かれることがわかった。そこでこの変異の有無をサンガーシーケンスで調べた 27 症例において、変異の有無と予後の関係を調べたところ、*H3F3A* K27M 変異を有する症例は優位に予後が悪いことが明らかになった ( $p=0.02$ ) (図 14)。

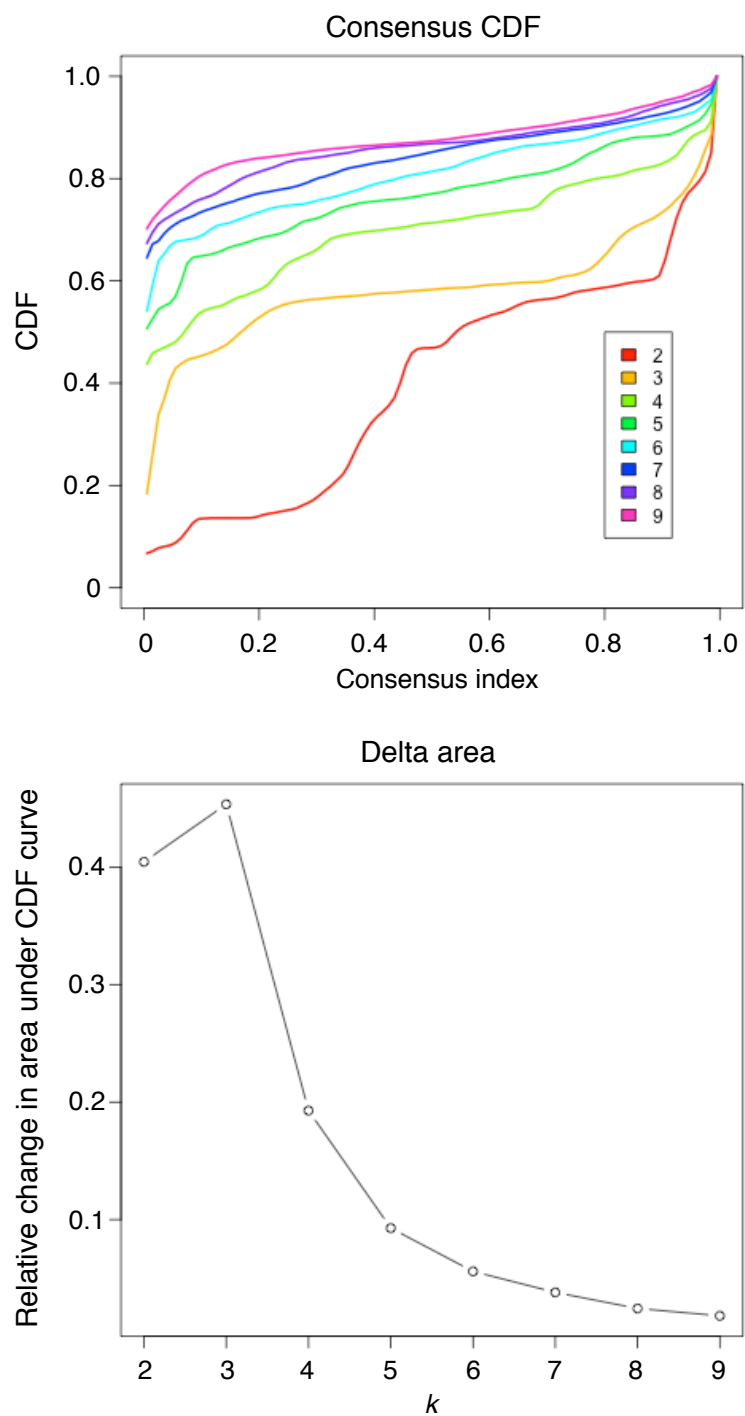


図 12. 224 症例の DNA メチル化データを用いたコンセンサスクラスタリング ( $k$ -means 法)

CDF (consensus cumulative function ) (上) とその変化量 (下)。

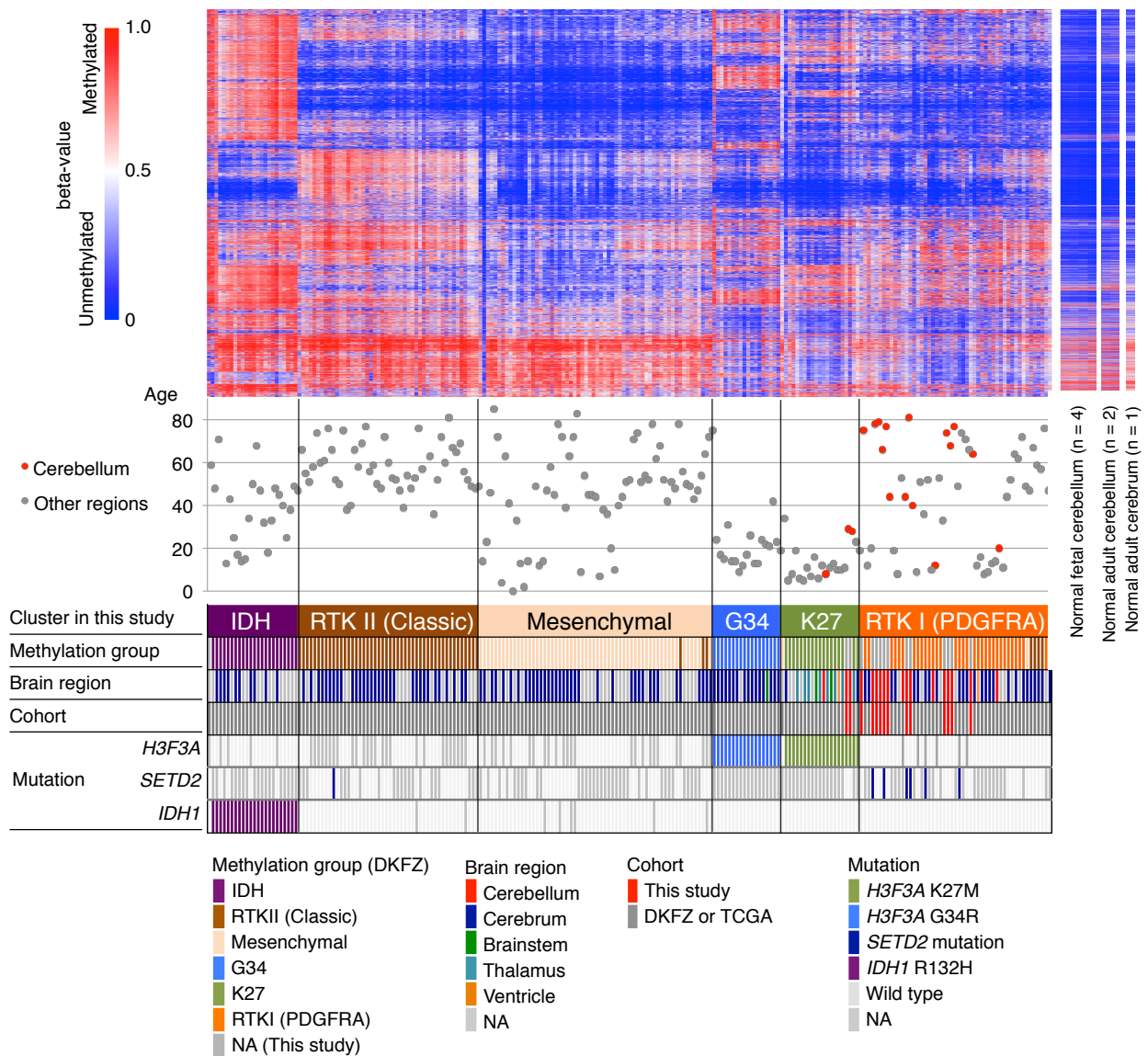


図 13. DNA メチル化クラスタリング

本研究で取得した 14 例の DCG のデータ及び、既報の 210 例の高悪性度神経膠腫のデータを用いたクラスタリング解析。標準偏差で上位 8000 プローブを使用し、*k*-means 法によるコンセンサスクラスタリングを行った。既報と同様に *k*=6 とした。Beta 値をヒートマップにて示す。下段に年齢、既報のメチル化グループ、腫瘍の発生部位、サンプルのコホート、代表遺伝子の変異の有無を示す。右に正常脳のヒートマップを示す。

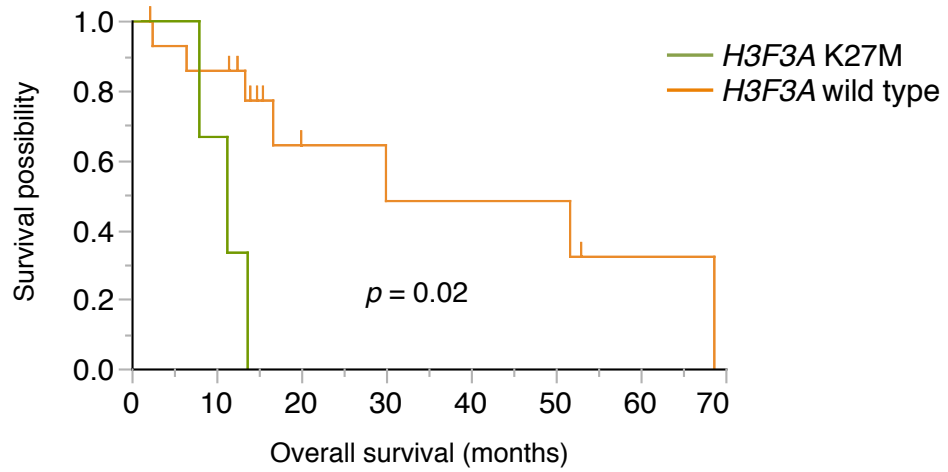


図 14. *H3F3A* K27M 変異の有無による生存期間の比較

*H3F3A* K27M 変異のある群 (3 症例) と無い群 (19 症例) において、 Kaplan-Meier 解析により全生存期間を比較した。

#### 4-7. 遺伝子発現プロファイル

DCG の遺伝子発現プロファイルを探索すべく、DCG 及び大脳 GBM の腫瘍検体を用いて RNA シークエンスを施行し、これらの遺伝子発現プロファイルを比較することとした。上述のごとく DNA メチル化解析で DCG のうち *H3F3A* K27M 変異のない症例はいずれも “RTK I (PDGFRA)” グループに分類された。このグループは一般に *PDGFRA* のコピー数高度増幅や発現上昇が多い群で知られている。今回 GSEA により DCG と大脳 GBM の発現データを比較したところ、“RTK I (PDGFRA)” グループの DCG では、TCGA グループの研究で *PDGFRA* 高度増幅の見られる GBM で上昇している遺伝子セット (“PDGFRA-amplified GBMs”) が上昇していることが明らかになった。また、脳幹部の *H3F3A* K27M 変異がある神経膠腫は *PDGFRA* の亢進がみられるとの報告があるが、“K27” グループの DCG においても、この遺伝子セットは上昇していた。この遺伝子セットには *PDGFRA* の他、*OLIG2*、*NKX2-2*、*SOX5*、*ERBB3* 等、オリゴデンドロサイト前駆細胞分化に関連する遺伝子が多く含まれており、これらの遺伝子は DCG 発生に重要な働きをしていると考えられた [50, 53]。

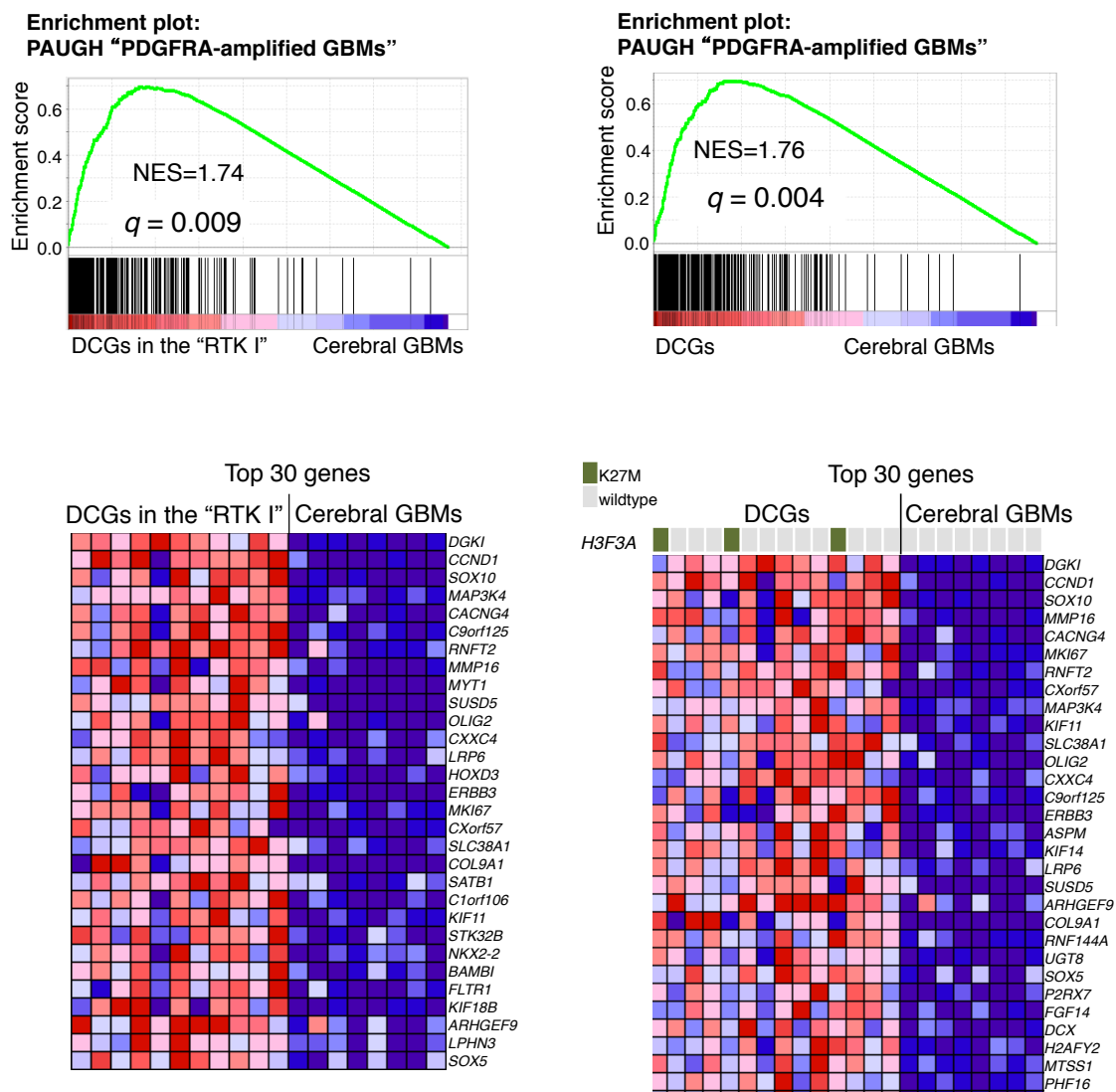


図 15. GSEA による DCG と大脳 GBM の遺伝子発現の比較  
 遺伝子セット “PDGFRA-amplified GBMs” が DCG にて亢進。“RTK I” グループ  
 の DCG と大脳 GBM の比較 (左)。DCG 全症例と大脳 GBM の比較 (右)。



#### 4-8. DNA メチル化、発現データの統合解析

さらに DCG にて DNA メチル化、遺伝子発現が連動して変化している遺伝子を探索することとした。本研究及び前述の Sturm らの既報の中で使用された DCG を合わせた 18 症例と、既報の 123 症例の大脳神経膠腫のプロモーター領域のメチル化 (beta 値) を比較し、volcano plot を作成した (図 16a)。結果、DCG で最もプロモーターのメチル化が低い遺伝子の 1 つとして *SOX10* が挙げられた (図 16a, 表 7)。*SOX10* はオリゴデンドロサイトの分化や *PDGFRA* の制御に重要な転写因子である。プロモーター領域の低メチル化状態と相関して、DCG では *SOX10* の遺伝子発現が大脳 GBM と比較して優位に高かった (図 16b)。また興味深いことに DCG に加えて、脳幹や視床神経膠腫でも *SOX10* プロモーターの低メチル化を認め (図 17)、これは脳幹、視床神経膠腫に関する別の 3 つの公共データにおいても検証された (図 18) [2, 19, 71]。また公共データにおいても *SOX10* プロモーターのメチル化と同遺伝子の発現の逆相関がみられた (図 16c)。一方でニューロン分化に重要な転写因子である *FOXG1* は DCG で大脳神経膠腫と比較して最も高度にプロモーターのメチル化が見られ、発現が抑制されている遺伝子の 1 つであった (図 16a, 16b, 表 7)。*FOXG1* プロモーターの高メチル化は

Sturm らが脳幹や視床の *H3F3A* K27M を有する神経膠腫にも見られる特徴として過去に報告している [62]。また Sturm らは小児大脳神経膠腫で *H3F3A* G34R/V を有する症例で *OLIG1*、*OLIG2* プロモーターの高メチル化を報告しているが、DCG では *OLIG1*、*OLIG2* のプロモーターは低メチル化であった (図 17)。このように神経膠腫発生部位によって、神経系の正常分化に重要な転写因子遺伝子のメチル化に違いがみられたが、DCG では脳幹や視床に発生する神経膠腫と共通のパターンであった。

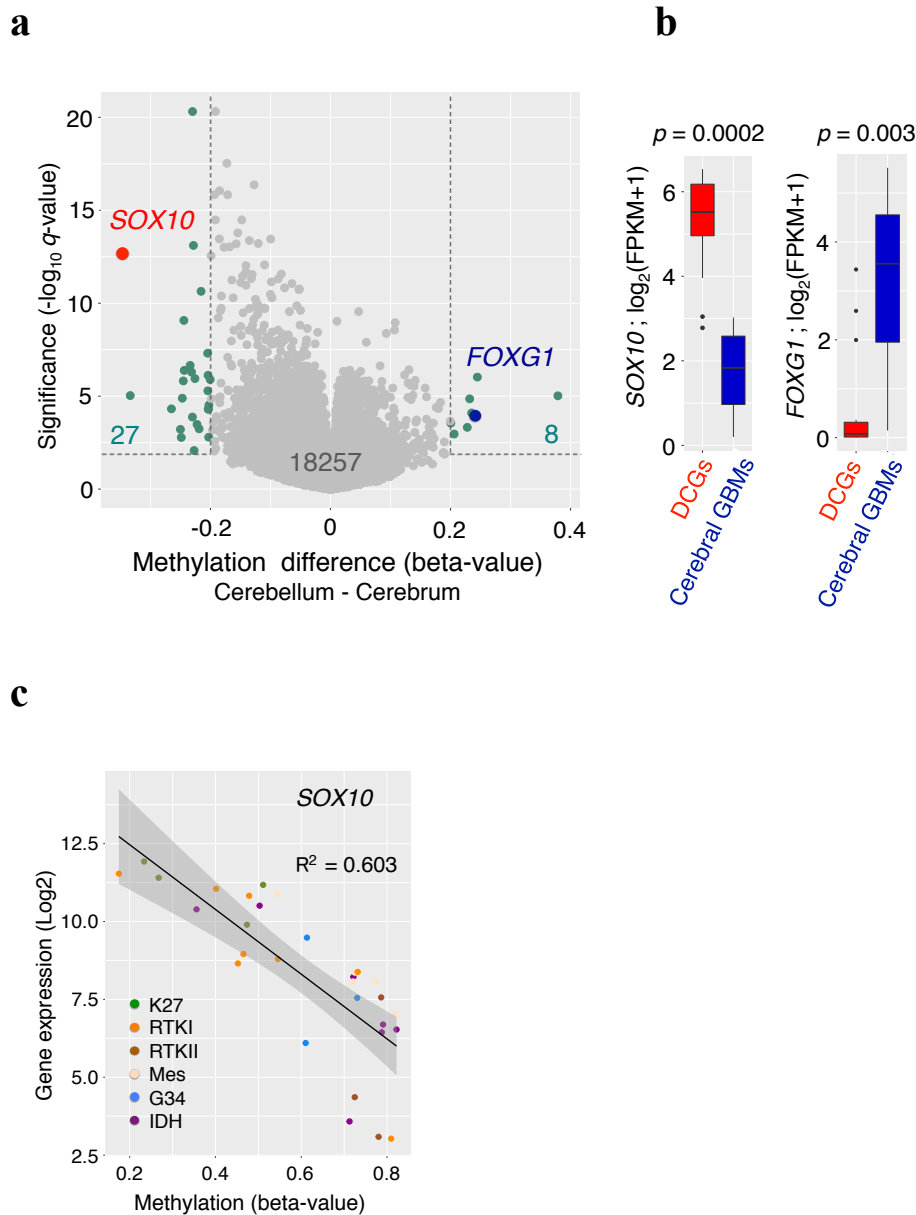


図 16. DCG と大脳高悪性度神経膠腫の比較

**a.** 18 症例の DCG と 123 症例の大脳高悪性度神経膠腫において、プロモーター領域のメチル化に差がみられる遺伝子を抽出した。1つの点は1つの遺伝子を表す。横軸は両群の  $\beta$  値の平均値の差。縦軸の  $q$  値はウェルチの  $t$  検定後、多重検定にて算出。 $q$  値  $< 0.01$  かつ  $\beta$  値の平均の差  $> 0.2$  を優位差のある遺伝子とした。**b.** 14 症例の DCG と 8 症例の GBM において *SOX10* 及び *FOXG1* の RNA シークエンスにおける発現値を比較した。優位差の有無はウィルコクソン  $t$  検定にて行った。**c.** 既報のデータにおいても *SOX10* プロモーターのメチル化と発現に逆相関が見られた。

表 7. DCG と大脳神経膠腫でプロモーターメチル化レベルに有意差を認めた遺伝子

<b>Gene</b>	<b>q-value</b>	<b>Difference (DCGs - cerebral high-grade gliomas)</b>
<i>ADH1B</i>	3.317E-04	-0.222
<i>AK098727</i>	4.130E-07	-0.244
<i>AK308605</i>	8.440E-10	-0.244
<i>B3GNT7</i>	5.170E-06	-0.204
<i>BC037321</i>	4.754E-04	0.228
<i>C12orf64</i>	1.325E-04	-0.230
<i>C14orf177</i>	9.430E-07	0.245
<i>C6orf191</i>	1.510E-06	-0.245
<i>CCDC140</i>	9.290E-06	-0.334
<i>CSTB</i>	1.390E-05	0.232
<i>DKFZp564P0662</i>	9.560E-06	0.379
<i>DMRT2</i>	4.810E-05	-0.265
<i>DNAH14</i>	3.020E-05	-0.203
<i>FBN2</i>	7.790E-14	-0.228
<i>FOXG1</i>	8.000E-05	0.235
<i>GPR22</i>	5.040E-07	-0.232
<i>IRX2</i>	2.300E-11	-0.216
<i>ITGA9</i>	1.280E-06	-0.201
<i>KIF25</i>	7.520E-07	-0.204
<i>LCE4A</i>	2.821E-04	0.200
<i>LOC23117</i>	4.900E-08	-0.205
<i>MAP1S</i>	5.020E-05	-0.203
<i>MLL5</i>	8.423E-03	-0.227
<i>MYOZ2</i>	5.711E-04	-0.219
<i>NUAK1</i>	4.950E-05	-0.204
<i>OR1S2</i>	1.616E-03	-0.203
<i>OR5B3</i>	1.670E-03	-0.249
<i>PAH</i>	1.090E-03	0.206
<i>S100A1</i>	1.290E-05	-0.247
<i>SLC22A10</i>	6.131E-04	-0.250
<i>SOX10</i>	2.690E-13	-0.347
<i>SYN2</i>	4.870E-21	-0.230
<i>TNFAIP1</i>	1.140E-06	-0.226
<i>TTC12</i>	1.243E-04	0.239
<i>UCN3</i>	2.210E-07	-0.234

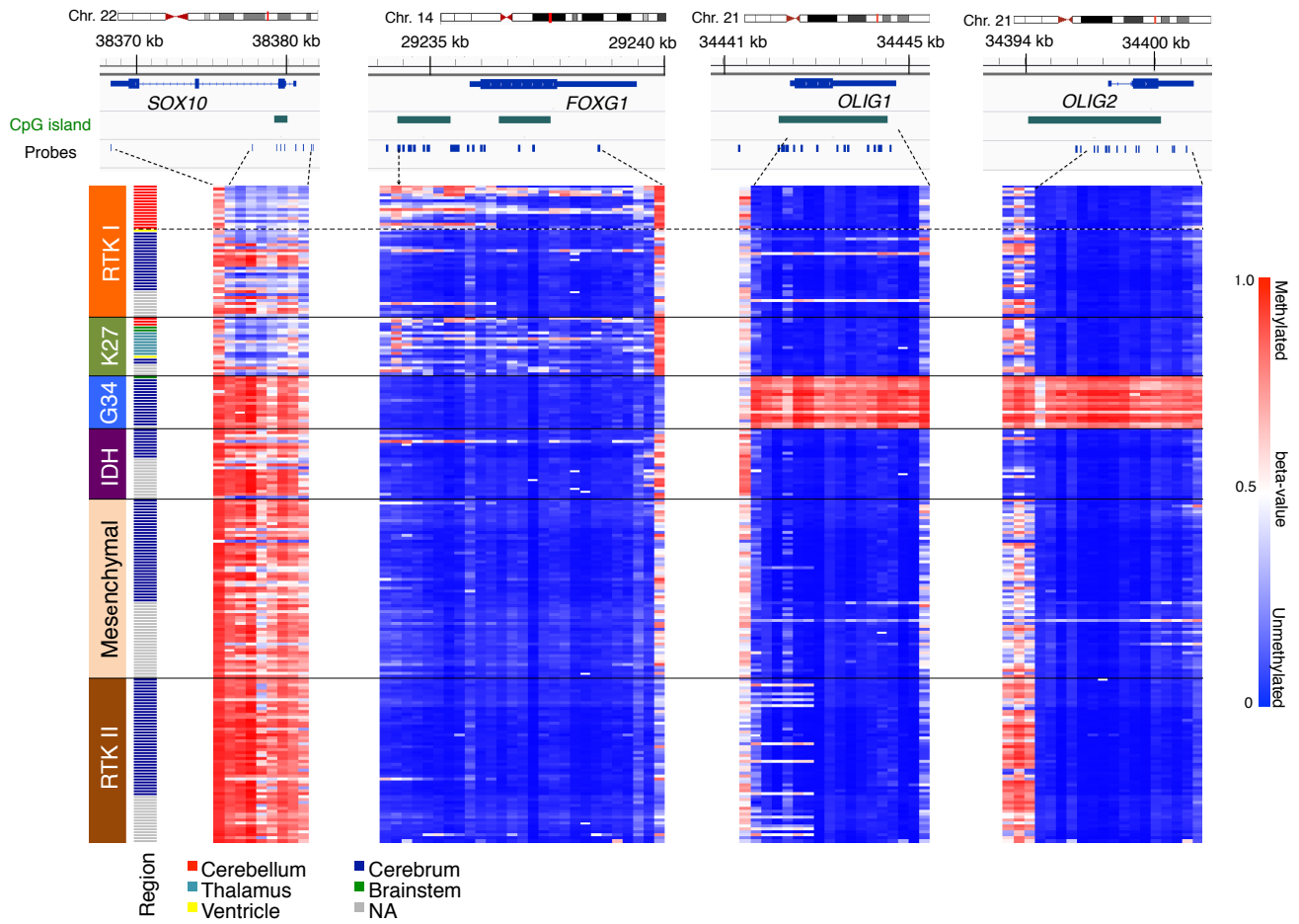


図 17.18 症例の DCG を含む 224 症例の *SOX10*、*FOXG1*、*OLIG1*、*OLIG2* のメチル化レベル

Beta 値をヒートマップにて示す。上に染色体とメチル化アレイプローブの関係を、左に各症例の発生部位、コホート、メチル化グループ、代表遺伝子の変異情報を示す。

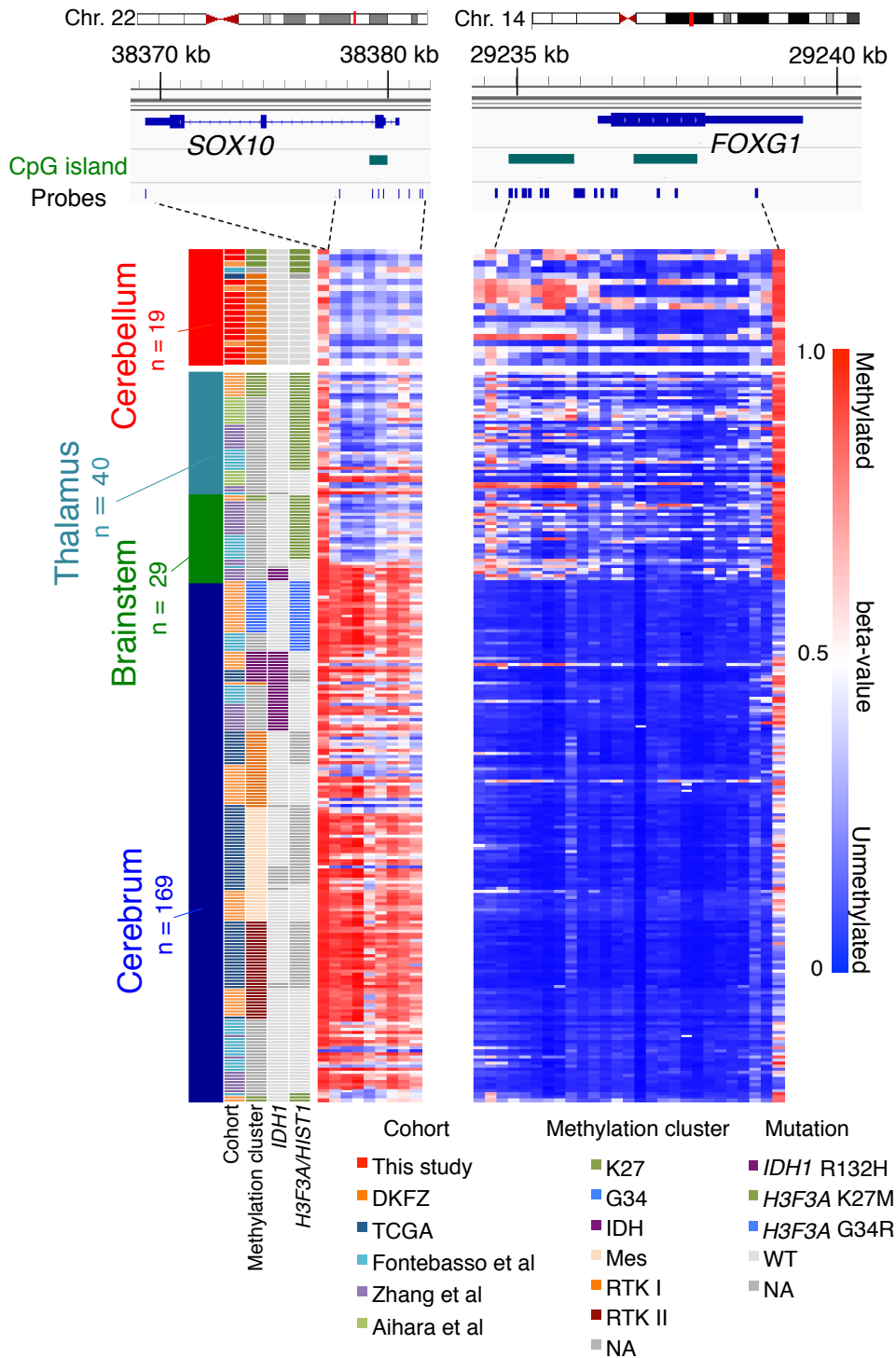
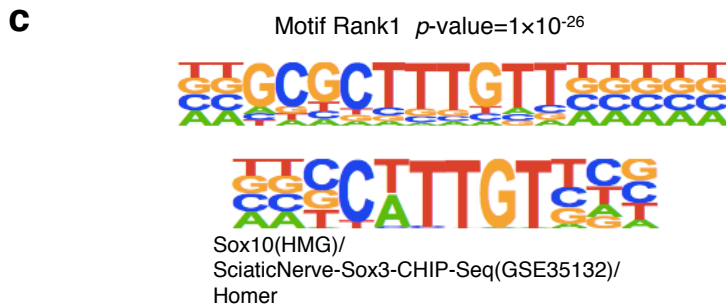
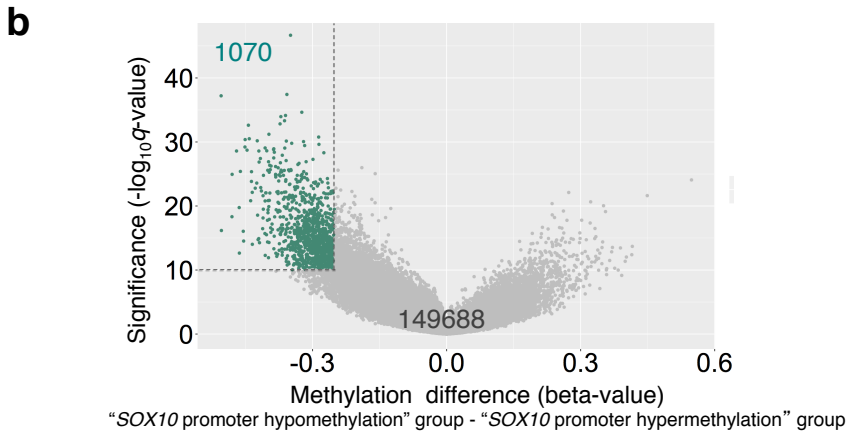
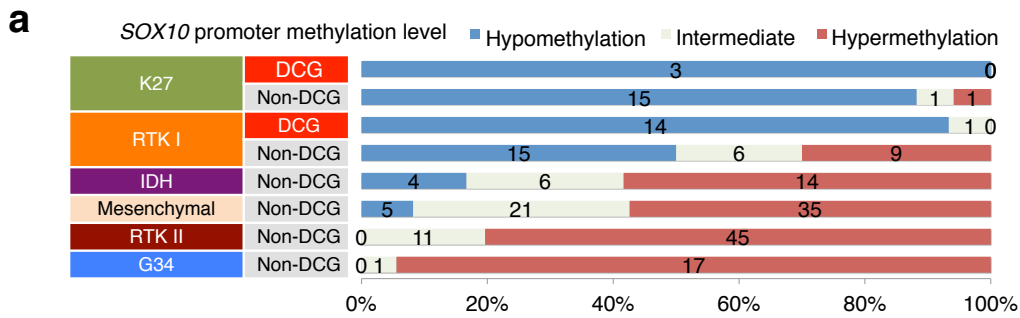


図 18. 部位情報のある 257 症例における、*SOX10* 及び *FOXG1* のメチル化レベル

Beta 値をヒートマップにて示す。上に染色体とメチル化アレイプローブの関係を、左に各症例の発生部位、コホート、メチル化グループ、代表遺伝子の変異情報を示す。

#### 4-9. モチーフ解析

DCG 含めて *SOX10* が亢進している症例に関して、*SOX10* が上流の分子として多くの遺伝子を制御しているか調べた。*SOX10* プロモーターのメチル化レベルにより3つのグループにわけた (図 19a)。*SOX10* プロモーターのメチル化が低いグループ (*SOX10* promoter hypomethylation 群) のほとんどは DCG、“K27”グループにクラスターされた脳幹や視床神経膠腫、“RTK I”グループの脳神経膠腫であった (図 19a)。このグループにおいて *SOX10* プロモーターのメチル化レベルが高いグループ (*SOX10* promoter hypermethylation 群) と比較して、メチル化レベルが低い非プロモーター領域のプロンプを抽出した (図 19b)。非プロモーター領域を対象とした理由として、組織や癌種特異的な転写因子は主にエンハンサーとして知られる制御領域に結合することにより転写を制御することによる [43]。抽出した領域前後の配列に対してモチーフ解析を行ったところ、*SOX10* promoter hypomethylation 群でメチル化が低い領域に “CNTTGTT”配列が濃縮していた (図 19c)。これは *SOX10* 含む *SOX* のモチーフに近い配列であり、*SOX10* promoter hypomethylation 群では多くの領域に *SOX10* が結合して転写制御している可能性が示唆された。



## 図 19. モチーフ解析

**a.** 224 症例の神経膠腫サンプルを *SOX10* プロモーターのメチル化レベルで 3 群に分けた。 **b.** *SOX10* promoter hypomethylation 群と *SOX10* promoter hypermethylation 群において非プロモーター領域のメチル化レベルをを比較した。横軸は両群の beta 値の平均値の差。縦軸の  $q$  値はウェルチの  $t$  検定後、多重検定にて算出。*SOX10* promoter hypomethylation 群において有意にメチル化レベルが低い 1070 プローブが抽出された ( $q$  値  $< 1\times 10^{-10}$ , beta 値の平均値の差  $> 0.25$ ) **c.** **b** で抽出したプローブ前後 1000 bp に最も濃縮していた配列を上段に示す。下段に *SOX10* のコンセンサスモチーフを示す。



## 5. 考察

本研究において DCG を対象に次世代シーケンサーを用いて網羅的解析を行った。結果、TCGA プロジェクト等の大規模解析で明らかとなった神経膠腫の分子プロファイルと多くの点で異なっていた。これは TCGA プロジェクトで解析された検体のほとんどが脳神経膠腫であったことによると言える。例えば *TERT* プロモーター、*PIK3CA*、*PTEN*、*RBI* 等の変異や染色体 7 番の増幅、10 番の欠失、*EGFR* の高度増幅等は脳 GBM で高頻度であるが、今回解析した DCG では低頻度であった [3, 6, 28]。また *IDH1/2* 変異は脳の低分化型びまん性神経膠腫で高頻度であるが、DCG では WHO グレード II、III の症例含めて見られなかった [10, 40]。さらに DCG で特徴的にみられる点も幾つか存在した。全エクソームシーケンス解析では *SETD2* 変異が高頻度みられた。*SETD2* は H3K36 トリメチル化酵素をコードする遺伝子で、この遺伝子の変異は腎癌、一部の白血病、胸膜中皮腫など幾つかの癌種で高頻度に見られる [7, 13, 33, 58, 72]。腎癌の過去の研究から *SETD2* 変異により H3K36 トリメチル化が低下し、クロマチン構造の変化につながり、転写異常を来し癌化を引き起こすと考えられている。神経膠腫における *SETD2* 変異に関して、成人の脳神経膠腫や脳

幹部や視床のような正中部発生の神経膠腫には低頻度であるが、小児大脳半球の高悪性度神経膠腫に関して 15%程度と高頻度であり、同じ H3K36 トリメチル化の低下を来す *H3F3A* G34R/V 変異と相互排他的に存在するとの報告がある [20]。今回の解析では成人の DCG で *SETD2* 変異が高頻度に (17 症例中 4 症例) みられた。DCG の *SETD2* 変異頻度は過去の成人神経膠腫の大規模ゲノム解析における *SETD2* 変異頻度 (TCGA プロジェクトの GBM で 292 症例中 5 症例、低分化型びまん性神経膠腫で 283 症例中 3 症例) と比べて有意に高かった (それぞれ  $p=0.0007$ ,  $p=0.0002$ ) [6, 10]。免疫染色では *SETD2* 変異のある DCG では他癌種同様 H3K36 トリメチル化の低下がみられた [52]。また、これらの症例は *H3F3A* K27M 変異と相互排他的であったことから、DCG の発生に *SETD2* 変異や *H3F3A* 変異などのクロマチン制御異常が強く関与していることが示唆された。最近の研究で *H3F3A* K27M を標的とした治療薬が有効との報告がある [22, 39, 49]。また、腎癌における研究で、*SETD2* 変異による H3K36 トリメチル化の低下症例に *WEE1* 阻害剤が有効であるとの報告がある (H3K36 トリメチル化の低下及び *WEE1* 阻害がリボヌクレオチド・レダクターゼ阻害による dNTP 低下をもたらす、合成致死効果をもたらす) [48]。そういった点からもこのような変異を同定

することは重要である。

DCGにはまた、p53機能異常をもたらす変異も高頻度みられた。*TP53*変異は17症例中、9症例にみられ一般的なGBMの*TP53*変異(約30%)と比べて高頻度であった[6]。この9症例のうちLOHを伴っている症例は4症例であったが、*TP53*変異は野生型アレルと複合体を形成して、正常機能を阻害する“dominant negative oncogene”としても作用すると考えられており、その意味ではいずれの症例も癌化に寄与していると考えられた[38, 63]。また、17症例中3症例に変異を認めた*PPM1D*はserine / threonine protein phosphataseの一種であり、p53、CHK2、H2AX、ATMといったDNA damage response pathwayに関する分子に抑制的に作用する。この遺伝子の染色体コピー数増幅や高発現は乳癌、卵巣癌、髄芽腫などの多くの癌腫の癌化に寄与すると考えられている[8, 37]。また最近の研究で生殖細胞系列変異としてみられる*PPM1D*のC末端ドメイン内の短縮型変異が乳癌、卵巣癌のリスク因子となることが報告された[54]。この変異は*PPM1D*の安定性を増加させ、機能獲得型変異として作用することが示された[29]。さらに、この*PPM1D*C末端ドメインの変異が脳幹部の神経膠腫で体細胞変異としてみられること発見された[71]。その報告では33症例の脳幹神経膠腫

のうち、6 症例の *PPM1D* 変異と 9 症例の *TP53* 変異が相互排他的に見られた。

一方で、57 症例の脳神経膠腫のうち *PPM1D* 変異は 1 症例に認められるのみであった。今回我々の研究でも 17 症例の DCG のうち、3 症例の *PPM1D* 異常と、11 症例の *TP53* 変異は相互排他的に見られた。また *PPM1D* 異常のうち 1 症例は過去に報告のない機能獲得型の融合遺伝子であった。この融合遺伝子はエクソン 5-6 間で、同染色体上の *RPSK6B1* と染色体転座を起こすことで、結果的に *PPM1D* C 末端ドメインの短縮型変異と同様の機能を持った産物を生じると考えられた。この融合遺伝子は、今回 RNA シークエンスデータにより発見されたが、全エクソームシークエンスのみの研究では検出できない異常であった。*PPM1D* の同様の融合遺伝子は脳幹神経膠腫やその他の癌腫にも存在している可能性はあると考えられる。また *PPM1D* 過剰発現や変異に対する治療薬の開発も進められており、神経膠腫においても部位特異的な治療標的となる可能性があると考えられる [17, 30]。

転写因子は細胞分化の過程において重要な役割を果たす。例えば *SOX10* は ES 細胞から神経幹細胞に至るまでポリコム複合体により抑制されているが、オリゴデンドロサイト前駆細胞へ分化する際に抑制がはずれ、オリゴデンドロサ

イト系への分化誘導に重要な役割を果たす [50, 53, 68]。Sturm らは K27M 変異を有する正中部 (脳幹や視床) に発生する神経膠腫において *FOXG1* が、また G34R/V 変異を有する小児大脳神経膠腫においては *OLIG1* 及び *OLIG2* がプロモーター領域のメチル化により特徴的に抑制をうけていることを明らかにした [62]。通常癌化に伴ってプロモーター領域に新たに加わるメチル化は、起源細胞においてポリコーム複合体による H3K27 トリメチル化修飾により抑制をうけている領域に多く、その細胞にとって必須の遺伝子のプロモーター領域にメチル化が加わり抑制されることは一部の遺伝子を除いて稀である [42, 55, 69]。よって、癌化に伴い加わるプロモーター領域のメチル化は起源細胞の性質を反映しているとされている [59]。このような背景から Sturm ら上述のように部位特異的な変異を持つグループごとに、神経系分化に重要な転写因子遺伝子のプロモーター領域のメチル化の差は、これらの細胞起源の違いを反映していると考察した [62]。今回の研究で我々はこれらに加えて *SOX10* のプロモーター領域のメチル化に神経膠腫の部位ごとに著明な差が見出した。また、DCG では *OLIG1+* (低メチル化・高発現)、*OLIG2+* (低メチル化・高発現)、*FOXG1-* (高メチル化・低発現) という点が、正中部の K27M 変異を有する神経膠腫と共通するのみでなく、

*SOX10* プロモーターが脳神経膠腫と異なりメチル化を免れ *SOX10+* (低メチル化・高発現) である点も共通しており、これらの起源細胞に近い可能性が示唆された。ゲノムワイドのメチル化クラスタリングでは DCG は DKFZ グループの提唱した 6 グループのうち、“K27”グループまたは“RTK I (PDGFRA)”グループの 2 グループのみに分かれた [62]。両メチル化グループ共に、*PDGFRA* 発現が亢進していることで知られているが DCG もまた、*PDGFRA* 関連遺伝子群が著明に亢進していた [46, 47, 51, 62]。神経系において、*PDGFRA* は *SOX10* により制御を受け、オリゴデンドロサイト分化時に誘導されることが知られている [18, 53]。上述のように DCG では *SOX10* が亢進しており、その結果として *PDGFRA* 関連遺伝子遺伝子の亢進につながっている可能性が考えられた。*PDGFRA* 増幅を伴う細胞株を用いた実験においてチロシンキナーゼ阻害剤であるレゴラフェニブやダサチニブが有効であったとの報告もあり、今後の臨床応用も期待される[15, 31]。

一方で予後という点では脳幹神経膠腫の過去の報告同様、DCG でも K27M 変異を有する “K27”グループは有意に悪く、この 2 グループを分けることは臨床重要である [27]。

本研究において、これまで詳細な分子プロファイルが明らかとなっていない DCG を対象に網羅的分子解析を行った。結果、クロマチン制御に関連した *H3F3A* や *SETD2* の変異、p53 に関連した *TP53* や *PPM1D* の変異を高頻度認めた。メチル化解析では *H3F3A* 変異の有無により 2 群に分けられ、遺伝子発現においてはいずれの群も *PDGFRA* 関連遺伝子が亢進していた。さらに他部位に発生した神経膠腫のデータと比較することで、神経膠腫の発生部位により異なった転写因子制御を受けていることが示唆され起源細胞の違いによる可能性が考えられた。特に DCG では *SOX10* の亢進が特徴的であった。本研究の結果、DCG は他部位の神経膠腫と異なった分子プロファイルを有することが明らかになったとともに、部位特異的分子異常に対するテーラーメイド治療が有効である可能性が示唆された。

## 6. 参考文献

- 1 Adams H, Chaichana KL, Avendano J, Liu B, Raza SM, Quinones-Hinojosa A Adult cerebellar glioblastoma: understanding survival and prognostic factors using a population-based database from 1973 to 2009. *World neurosurgery* 80: e237-243 (2013)
- 2 Aihara K, Mukasa A, Gotoh K, Saito K, Nagae G, Tsuji S, Tatsuno K, Yamamoto S, Takayanagi S, Narita Y et al H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro-oncology* 16: 140-146 (2014)
- 3 Arita H, Narita Y, Fukushima S, Tateishi K, Matsushita Y, Yoshida A, Miyakita Y, Ohno M, Collins VP, Kawahara N et al Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta neuropathologica* 126: 267-276 (2013)
- 4 Bender S, Tang Y, Lindroth AM, Hovestadt V, Jones DT, Kool M, Zapatka M, Northcott PA, Sturm D, Wang W et al Reduced H3K27me3 and DNA hypomethylation are major drivers of gene expression in K27M mutant pediatric high-grade gliomas. *Cancer cell* 24: 660-672 (2013)
- 5 Bibikova M, Barnes B, Tsan C, Ho V, Klotzle B, Le JM, Delano D, Zhang L, Schroth GP, Gunderson K et al High density DNA methylation array with single CpG site resolution. *Genomics* 98: 288-295 (2011)
- 6 Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Nounshmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH et al The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 155: 462-477 (2013)
- 7 Bueno R, Stawiski EW, Goldstein LD, Durinck S, De Rienzo A, Modrusan Z, Gnad F, Nguyen TT, Jaiswal BS, Chirieac L et al Comprehensive genomic analysis of malignant pleural mesothelioma identifies recurrent mutations, gene fusions and splicing alterations. *Nature genetics* 48: 407-416 (2016)



- 8 Bulavin DV, Demidov ON, Saito S, Kauraniemi P, Phillips C, Amundson SA, Ambrosino C, Sauter G, Nebreda AR, Anderson CW et al Amplification of PPM1D in human tumors abrogates p53 tumor-suppressor activity. *Nature genetics* 31: 210-215 (2002)
- 9 Cancer Genome Atlas Research N Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 455: 1061-1068 (2008)
- 10 Cancer Genome Atlas Research N, Brat DJ, Verhaak RG, Aldape KD, Yung WK, Salama SR, Cooper LA, Rheinbay E, Miller CR, Vitucci M et al Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *The New England journal of medicine* 372: 2481-2498 (2015)
- 11 Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta S et al Molecular Profiling Reveals Biologically Discrete Subsets and Pathways of Progression in Diffuse Glioma. *Cell* 164: 550-563 (2016)
- 12 Committee of Brain Tumor Registry of Japan Brain Tumor Registry of Japan (2005-2008) 14th Edition. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 57: 1-102 (2017)
- 13 Dalglish GL, Furge K, Greenman C, Chen L, Bignell G, Butler A, Davies H, Edkins S, Hardy C, Latimer C et al Systematic sequencing of renal carcinoma reveals inactivation of histone modifying genes. *Nature* 463: 360-363 (2010)
- 14 Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan M et al Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 462: 739-744 (2009)
- 15 Daudigeos-Dubus E, Le Dret L, Lanvers-Kaminsky C, Bawa O, Opolon P, Vievard A, Villa I, Pages M, Bosq J, Vassal G et al Regorafenib: Antitumor Activity upon Mono and Combination Therapy in Preclinical Pediatric Malignancy Models. *PloS one* 10: e0142612 (2015)
- 16 Ellezam B, Theeler BJ, Walbert T, Mammoser AG, Horbinski C, Kleinschmidt-DeMasters BK, Perry A, Puduvalli V, Fuller GN,

- Bruner J Met al Low rate of R132H IDH1 mutation in infratentorial and spinal cord grade II and III diffuse gliomas. *Acta neuropathologica* 124: 449-451 (2012)
- 17 Esfandiari A, Hawthorne TA, Nakjang S, Lunec J Chemical Inhibition of Wild-Type p53-Induced Phosphatase 1 (WIP1/PPM1D) by GSK2830371 Potentiates the Sensitivity to MDM2 Inhibitors in a p53-Dependent Manner. *Molecular cancer therapeutics* 15: 379-391 (2016)
- 18 Finzsch M, Stolt CC, Lommes P, Wegner M Sox9 and Sox10 influence survival and migration of oligodendrocyte precursors in the spinal cord by regulating PDGF receptor alpha expression. *Development* 135: 637-646 (2008)
- 19 Fontebasso AM, Papillon-Cavanagh S, Schwartzentruber J, Nikbakht H, Gerges N, Fiset PO, Bechet D, Faury D, De Jay N, Ramkissoon LA et al Recurrent somatic mutations in ACVR1 in pediatric midline high-grade astrocytoma. *Nature genetics* 46: 462-466 (2014)
- 20 Fontebasso AM, Schwartzentruber J, Khuong-Quang DA, Liu XY, Sturm D, Korshunov A, Jones DT, Witt H, Kool M, Albrecht S et al Mutations in SETD2 and genes affecting histone H3K36 methylation target hemispheric high-grade gliomas. *Acta neuropathologica* 125: 659-669 (2013)
- 21 Gessi M, Gielen GH, Dreschmann V, Waha A, Pietsch T High frequency of H3F3A (K27M) mutations characterizes pediatric and adult high-grade gliomas of the spinal cord. *Acta neuropathologica* 130: 435-437 (2015)
- 22 Hashizume R, Andor N, Ihara Y, Lerner R, Gan H, Chen X, Fang D, Huang X, Tom MW, Ngo V et al Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nature medicine* 20: 1394-1396 (2014)
- 23 Homer N, Nelson SF Improved variant discovery through local re-alignment of short-read next-generation sequencing data using SRMA. *Genome biology* 11: R99 (2010)
- 24 Jeswani S, Nuno M, Folkerts V, Mukherjee D, Black KL, Patil CG

- Comparison of survival between cerebellar and supratentorial glioblastoma patients: surveillance, epidemiology, and end results (SEER) analysis. *Neurosurgery* 73: 240-246; discussion 246; quiz 246 (2013)
- 25 Jones DT, Hutter B, Jager N, Korshunov A, Kool M, Warnatz HJ, Zichner T, Lambert SR, Ryzhova M, Quang DA et al Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nature genetics* 45: 927-932 (2013)
- 26 Kakiuchi M, Nishizawa T, Ueda H, Gotoh K, Tanaka A, Hayashi A, Yamamoto S, Tatsuno K, Katoh H, Watanabe Y et al Recurrent gain-of-function mutations of RHOA in diffuse-type gastric carcinoma. *Nature genetics* 46: 583-587 (2014)
- 27 Khuong-Quang DA, Buczkowicz P, Rakopoulos P, Liu XY, Fontebasso AM, Bouffet E, Bartels U, Albrecht S, Schwartzentruber J, Letourneau L et al K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta neuropathologica* 124: 439-447 (2012)
- 28 Killela PJ, Reitman ZJ, Jiao Y, Bettegowda C, Agrawal N, Diaz LA, Jr., Friedman AH, Friedman H, Gallia GL, Giovannella BC et al TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110: 6021-6026 (2013)
- 29 Kleiblova P, Shaltiel IA, Benada J, Sevcik J, Pechackova S, Pohlreich P, Voest EE, Dundr P, Bartek J, Kleibl Z et al Gain-of-function mutations of PPM1D/Wip1 impair the p53-dependent G1 checkpoint. *The Journal of cell biology* 201: 511-521 (2013)
- 30 Kojima K, Maeda A, Yoshimura M, Nishida Y, Kimura S The pathophysiological significance of PPM1D and therapeutic targeting of PPM1D-mediated signaling by GSK2830371 in mantle cell lymphoma. *Oncotarget* 7: 69625-69637 (2016)
- 31 Koschmann C, Zamler D, MacKay A, Robinson D, Wu YM, Doherty R, Marini B, Tran D, Garton H, Muraszko K et al Characterizing and

- targeting PDGFRA alterations in pediatric high-grade glioma. *Oncotarget* 7: 65696-65706 (2016)
- 32 Lewis PW, Muller MM, Koletsky MS, Cordero F, Lin S, Banaszynski LA, Garcia BA, Muir TW, Becher OJ, Allis CD Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* 340: 857-861 (2013)
- 33 Li J, Duns G, Westers H, Sijmons R, van den Berg A, Kok K SETD2: an epigenetic modifier with tumor suppressor functionality. *Oncotarget* 7: 50719-50734 (2016)
- 34 Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK (2016) World Health Organization histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer, France
- 35 Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A et al IDH mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 483: 474-478 (2012)
- 36 Mack SC, Witt H, Piro RM, Gu L, Zuyderduyn S, Stutz AM, Wang X, Gallo M, Garzia L, Zayne K et al Epigenomic alterations define lethal CIMP-positive ependymomas of infancy. *Nature* 506: 445-450 (2014)
- 37 Mendrzyk F, Radlwimmer B, Joos S, Kokocinski F, Benner A, Stange DE, Neben K, Fiegler H, Carter NP, Reifenberger G et al Genomic and protein expression profiling identifies CDK6 as novel independent prognostic marker in medulloblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 23: 8853-8862 (2005)
- 38 Milner J, Medcalf EA Cotranslation of activated mutant p53 with wild type drives the wild-type p53 protein into the mutant conformation. *Cell* 65: 765-774 (1991)
- 39 Mohammad F, Weissmann S, Leblanc B, Pandey DP, Hojfeldt JW, Comet I, Zheng C, Johansen JV, Rapin N, Porse BT et al EZH2 is a potential therapeutic target for H3K27M-mutant pediatric gliomas. *Nature medicine*: (2017)

- 40 Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, Ide T, Narita Y, Nishikawa R, Ueki K et al Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. *Cancer science* 103: 587-592 (2012)
- 41 Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloski CE, Sulman EP, Bhat KP et al Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer cell* 17: 510-522 (2010)
- 42 Ohm JE, McGarvey KM, Yu X, Cheng L, Schuebel KE, Cope L, Mohammad HP, Chen W, Daniel VC, Yu W et al A stem cell-like chromatin pattern may predispose tumor suppressor genes to DNA hypermethylation and heritable silencing. *Nature genetics* 39: 237-242 (2007)
- 43 Ong CT, Corces VG Enhancer function: new insights into the regulation of tissue-specific gene expression. *Nature reviews Genetics* 12: 283-293 (2011)
- 44 Pajtler KW, Witt H, Sill M, Jones DT, Hovestadt V, Kratochwil F, Wani K, Tatevossian R, Punchihewa C, Johann P et al Molecular Classification of Ependymal Tumors across All CNS Compartments, Histopathological Grades, and Age Groups. *Cancer cell* 27: 728-743 (2015)
- 45 Parker M, Mohankumar KM, Punchihewa C, Weinlich R, Dalton JD, Li Y, Lee R, Tatevossian RG, Phoenix TN, Thiruvengadam R et al C11orf95-RELA fusions drive oncogenic NF-kappaB signalling in ependymoma. *Nature* 506: 451-455 (2014)
- 46 Paugh BS, Broniscer A, Qu C, Miller CP, Zhang J, Tatevossian RG, Olson JM, Geyer JR, Chi SN, da Silva N et al Genome-wide analyses identify recurrent amplifications of receptor tyrosine kinases and cell-cycle regulatory genes in diffuse intrinsic pontine glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 29: 3999-4006 (2011)
- 47 Paugh BS, Qu C, Jones C, Liu Z, Adamowicz-Brice M, Zhang J, Bax DA, Coyle B, Barrow J, Hargrave D et al Integrated molecular genetic

- profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 28: 3061-3068 (2010)
- 48 Pfister SX, Markkanen E, Jiang Y, Sarkar S, Woodcock M, Orlando G, Mavrommati I, Pai CC, Zalmas LP, Drobnitzky Net al Inhibiting WEE1 Selectively Kills Histone H3K36me3-Deficient Cancers by dNTP Starvation. *Cancer cell* 28: 557-568 (2015)
- 49 Piunti A, Hashizume R, Morgan MA, Bartom ET, Horbinski CM, Marshall SA, Rendleman EJ, Ma Q, Takahashi YH, Woodfin ARet al Therapeutic targeting of polycomb and BET bromodomain proteins in diffuse intrinsic pontine gliomas. *Nature medicine:* (2017)
- 50 Pozniak CD, Langseth AJ, Dijkgraaf GJ, Choe Y, Werb Z, Pleasure SJ Sox10 directs neural stem cells toward the oligodendrocyte lineage by decreasing Suppressor of Fused expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107: 21795-21800 (2010)
- 51 Puget S, Philippe C, Bax DA, Job B, Varlet P, Junier MP, Andreiuolo F, Carvalho D, Reis R, Guerrini-Rousseau Let al Mesenchymal transition and PDGFRA amplification/mutation are key distinct oncogenic events in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *PloS one* 7: e30313 (2012)
- 52 Roberti A, Dobay MP, Bisig B, Vallois D, Boechat C, Lanitis E, Bouchindhomme B, Parrens MC, Bossard C, Quintanilla-Martinez Let al Type II enteropathy-associated T-cell lymphoma features a unique genomic profile with highly recurrent SETD2 alterations. *Nature communications* 7: 12602 (2016)
- 53 Rowitch DH, Kriegstein AR Developmental genetics of vertebrate glial-cell specification. *Nature* 468: 214-222 (2010)
- 54 Ruark E, Snape K, Humburg P, Loveday C, Bajrami I, Brough R, Rodrigues DN, Renwick A, Seal S, Ramsay Eet al Mosaic PPM1D mutations are associated with predisposition to breast and ovarian cancer. *Nature* 493: 406-410 (2013)
- 55 Schlesinger Y, Straussman R, Keshet I, Farkash S, Hecht M,

- Zimmerman J, Eden E, Yakhini Z, Ben-Shushan E, Reubinoff BE et al Polycomb-mediated methylation on Lys27 of histone H3 pre-marks genes for de novo methylation in cancer. *Nature genetics* 39: 232-236 (2007)
- 56 Schwartzentruber J, Korshunov A, Liu XY, Jones DT, Pfaff E, Jacob K, Sturm D, Fontebasso AM, Quang DA, Tonjes M et al Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 482: 226-231 (2012)
- 57 Shankar GM, Lelic N, Gill CM, Thorner AR, Van Hummelen P, Wisoff JH, Loeffler JS, Brastianos PK, Shin JH, Borges LF et al BRAF alteration status and the histone H3F3A gene K27M mutation segregate spinal cord astrocytoma histology. *Acta neuropathologica* 131: 147-150 (2016)
- 58 Simon JM, Hacker KE, Singh D, Brannon AR, Parker JS, Weiser M, Ho TH, Kuan PF, Jonasch E, Furey T et al Variation in chromatin accessibility in human kidney cancer links H3K36 methyltransferase loss with widespread RNA processing defects. *Genome research* 24: 241-250 (2014)
- 59 Sproul D, Kitchen RR, Nestor CE, Dixon JM, Sims AH, Harrison DJ, Ramsahoye BH, Meehan RR Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns. *Genome biology* 13: R84 (2012)
- 60 Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U et al Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 352: 987-996 (2005)
- 61 Sturm D, Bender S, Jones DT, Lichter P, Grill J, Becher O, Hawkins C, Majewski J, Jones C, Costello JF et al Paediatric and adult glioblastoma: multifactorial (epi)genomic culprits emerge. *Nature reviews Cancer* 14: 92-107 (2014)
- 62 Sturm D, Witt H, Hovestadt V, Khuong-Quang DA, Jones DT, Konermann C, Pfaff E, Tonjes M, Sill M, Bender S et al Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and

- biological subgroups of glioblastoma. *Cancer cell* 22: 425-437 (2012)
- 63 Takami H, Yoshida A, Fukushima S, Arita H, Matsushita Y, Nakamura T, Ohno M, Miyakita Y, Shibui S, Narita Yet al Revisiting TP53 Mutations and Immunohistochemistry--A Comparative Study in 157 Diffuse Gliomas. *Brain pathology* 25: 256-265 (2015)
- 64 Taylor KR, Mackay A, Truffaux N, Butterfield Y, Morozova O, Philippe C, Castel D, Grasso CS, Vinci M, Carvalho Det al Recurrent activating ACVR1 mutations in diffuse intrinsic pontine glioma. *Nature genetics* 46: 457-461 (2014)
- 65 Totoki Y, Tatsuno K, Covington KR, Ueda H, Creighton CJ, Kato M, Tsuji S, Donehower LA, Slagle BL, Nakamura Het al Trans-ancestry mutational landscape of hepatocellular carcinoma genomes. *Nature genetics* 46: 1267-1273 (2014)
- 66 Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PSet al IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 483: 479-483 (2012)
- 67 Verhaak RG, Hoadley KA, Purdom E, Wang V, Qi Y, Wilkerson MD, Miller CR, Ding L, Golub T, Mesirov JP et al Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer cell* 17: 98-110 (2010)
- 68 Weider M, Wegner M SoxE factors: Transcriptional regulators of neural differentiation and nervous system development. *Seminars in cell & developmental biology* 63: 35-42 (2017)
- 69 Widschwendter M, Fiegl H, Egle D, Mueller-Holzner E, Spizzo G, Marth C, Weisenberger DJ, Campan M, Young J, Jacobs I et al Epigenetic stem cell signature in cancer. *Nature genetics* 39: 157-158 (2007)
- 70 Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinic-Haberle I, Jones S, Riggins GJet al IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine* 360: 765-773 (2009)
- 71 Zhang L, Chen LH, Wan H, Yang R, Wang Z, Feng J, Yang S, Jones S,



Wang S, Zhou W et al Exome sequencing identifies somatic gain-of-function PPM1D mutations in brainstem gliomas. *Nature genetics* 46: 726-730 (2014)

72 Zhu X, He F, Zeng H, Ling S, Chen A, Wang Y, Yan X, Wei W, Pang Y, Cheng H et al Identification of functional cooperative mutations of SETD2 in human acute leukemia. *Nature genetics* 46: 287-293 (2014)

## 7. 謝辞

本研究を遂行する機会並びに御指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学講座・齊藤延人教授に深く感謝いたします。

実験計画、論文作成等におきまして具体的な御指導を賜りました熊本大学大学院生命科学研究部脳神経外科分野・武笠晃丈教授、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・油谷浩幸教授に深く感謝いたします。

技術面のご指導を賜りました、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・永江玄太先生、山本尚吾先生、辰野健二先生、上田宏生先生、福田史郎先生、梅田高呂先生に深く感謝いたします。

臨床検体の収集に多大なるご尽力賜りました埼玉医科大学国際医療センター脳脊髄腫瘍科・西川亮教授、鈴木智成先生、獨協医科大学脳神経外科・植木敬介教授、大谷亮平先生、杏林大学脳神経外科・永根基雄教授、小林啓一先生、東京女子医科大学脳神経外科・村垣善浩教授、丸山隆志先生、国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科・成田善孝先生、横浜市立大学脳神経外科・中村大志先生、国立がん研究センター研究所脳腫瘍連携分野・市村幸一先生、東京大学脳神経外科・田中將太先生、高柳俊作先生、根城堯英先生、高橋慧先生に

深く感謝致します。

病理学のご指導賜りました杏林大学病理学教室柴原純二教授に深く感謝いたします。