

## 論文の内容の要旨

論文題目 小脳神経膠腫の網羅的分子プロファイル解析

氏名 野村 昌志

近年の神経膠腫 (glioma) の網羅的ゲノム解析研究により、神経膠腫発生に関わる多くの遺伝子変異が明らかになった。またこれらの変異プロファイルは神経膠腫の発生部位や年齢により異なっていることもわかってきた。代表例は小児神経膠腫の遺伝子解析で発見された *H3F3A* 遺伝子の変異で、その K27M 変異は小児から青壮年の正中部 (視床、脳幹、脊髄) 神経膠腫に、G34R/V 変異は思春期の脳神経膠腫に高頻度みられる。このような腫瘍発生の鍵となる遺伝子変異は腫瘍の生物学的特徴を規定するとともに、治療標的となりうるため明らかにすることは重要である。一方、小脳に発生するびまん性神経膠腫 (diffuse cerebellar glioma, DCG) は全びまん性神経膠腫の 1-3%程度と比較的稀であることもあり、これまで詳細な分子レベルの解析がなされていなかった。そこで今回 DCG の分子プロファイルを明らかにすることを目的とした。

解析対象は成人症例で、画像上病変が小脳に限局しており、病理診断上 WHO (World Health Organization) グレード II-IV のびまん性神経膠腫とした。東京大学医学部附属病院に加えて 6 施設より検体提供を受け、27 症例の腫瘍検体を集め、これらの検体から DNA、RNA を抽出して解析に使用した。特に同一患者から血液検体を得られた 17 症例に対しては次世代シーケンサーを用いたオミックス解析を行った。

主な解析内容を以下に示す。

- サンガーシーケンス : 神経膠腫に代表的なホットスポット変異の同定
- 全エクソームシーケンス : 網羅的変異解析、染色体コピー数解析
- RNA シーケンス : 発現解析、融合遺伝子解析
- メチル化アレイ : DNA メチル化解析

発現解析、DNA メチル化解析に関しては、各部位から発生した神経膠腫の公共データも併せて使用した。

対象となった 27 症例の内訳は WHO グレード IV が 19 症例、III が 5 症例、II が 3 症例であった。まずサンガーシーケンスにて一般的に神経膠腫に高頻度見られるホットスポット変異が DCG に存在するかを調べた。大脳の低分化型びまん性神経膠腫 (WHO グレード II-III) の 50-80% に見られる *IDH1* または *IDH2* の変異は全例で見られなかった。大脳の膠芽腫 (WHO グレード IV の神経膠腫, glioblastoma, GBM) の 60-80% に見られる *TERT* プロモーター変異は 1 症例 (1/27, 3.7%) に認めるのみであった。青壮年の正中部に発生する神経膠腫に高頻度見られる *H3F3A K27M* 変異は 3 症例 (3/27, 11.1%) に見られたが、正中部の神経膠腫と比べると低頻度であった。この結果からも、DCG は別部位の神経膠腫と異なった分子異常を有している可能性が示唆された。そこでまず DCG のゲノム異常を明らかにすべく、全エクソームシーケンスによる網羅的変異解析、染色体コピー数解析、RNA シーケンスによる融合遺伝子解析を行った。特徴的であった所見としてクロマチン制御に関連する遺伝子の変異を高頻度認めた。*H3K27* トリメチル化に抑制的に働く *H3F3A K27M* 変異は 3 症例の DCG に見られたが、それらと相互排他的に *SETD2* の機能喪失型変異が 4 症例 (4/17, 23.5%) に見られた。*SETD2* は *H3K36* トリメチル化酵素をコードする遺伝子であり、この遺伝子の変異により *H3K36* トリメチル化が低下し転写制御異常をもたらす事が腎癌などの研究で明らかになっている。一方で成人神経膠腫においてはこの変異は低頻度とされている。今回 *H3K36* トリメチル化に対する免疫染色を行ったところ *SETD2* 変異症例では野生型症例と比べて *H3K36* トリメチル化の低下が見られた。このようにヒストンメチル化の異常が DCG の発生に寄与している可能性が考えられた。もう一つの特徴的な所見として *p53* 関連遺伝子の異常を高頻度認めた。*TP53* 変異は大脳 GBM の 30% 程度で見られるが DCG では 9 症例 (9/17, 52.9%) と高頻度であった。また、*PPM1D* の C 末端ドメインの短縮型変異は *p53* 抑制的に作用し、神経膠腫においては脳幹部に限局してみられることが知られているが、この変異が 2 症例 (2/17, 11.8%) に見られた。さらに融合遺伝子解析により、*PPM1D* の C 末端ドメインの喪失をもたらす新規の転座を 1 症例 (1/17, 5.9%) に発見した。これらを合わせると 12 症例 (12/17, 70.6%) で *p53* 抑制的な変化をきたしていることが明らかとなった。一方、大脳神経膠腫で高頻度見られる *EGFR*、*PIK3CA*、*RBI*、*PTEN* などの変異や染色体 7 番の増幅や 10 番の喪失は低頻度であった。

DNA メチル化解析は今回取得した DCG のデータを Sturm らの 210 症例のデータと統合してク

ラスタリング解析を行った。Sturm らは神経膠腫のメチル化プロファイルを 6 グループに分けたが、興味深いことに DCG はこのうち 2 つのグループのみに限局してクラスタリングされた。つまり、DCG のうち *H3F3A K27M* 変異を有する症例は、同変異を持つ正中部神経膠腫と同様に“K27”グループに分類され、残りの DCG は全て“RTK I (PDGFRA)”グループに分類された。このように DCG は *K27M* 変異の有無に応じた 2 つのメチル化グループに分かれることが明らかになったが、この 2 グループ間で予後を比較したところ、*K27M* 変異を有する DCG は有意に予後が悪いことが明らかになった。これは脳幹部の神経膠腫に関しても *K27M* 変異を有する症例の予後が悪いことと一致していた。

“RTK I (PDGFRA)”グループは一般に *PDGFRA* の染色体コピー数増幅や発現上昇がみられるグループとして知られている。また“K27”グループに属する脳幹神経膠腫も *PDGFRA* 発現が高いとの報告である。今回 DCG と大脳 GBM で RNA シークエンスによる発現データを比較したところ DCG では“K27”グループの症例、“RTK I (PDGFRA)”グループの症例ともに *PDGFRA* 関連遺伝子群が亢進していることが明らかになり、これらの遺伝子群が DCG の発生に重要な役割を果たしていることが示唆された。

さらに DCG と大脳神経膠腫の間でプロモーター領域のメチル化と遺伝子発現が連動して変化している遺伝子を探索したところ、神経系の正常分化に関与する転写因子遺伝子である *SOX10* や *FOXP1* において有意差が見られた。DCG では *SOX10* の低メチル化・高発現、*FOXP1* の高メチル化・低発現を認めた。DCG で亢進していた *SOX10* はオリゴデンドロサイトへの分化及び *PDGFRA* 制御に重要な転写因子遺伝子とされており、上述の発現データから得られた所見とも合っていた。また *FOXP1* に関しては、そのメチル化状態が *H3F3A K27M* を有する正中部神経膠腫と、G34R/V 変異を有する大脳神経膠腫の間で大きく異なっているということを Sturm らが過去に報告している。一般に癌化に伴い新たに蓄積するプロモーターのメチル化はその起源細胞においてポリコーム複合体を介した H3K27 トリメチル化により抑制された領域に多く、発現の高い遺伝子には少ないとされており、分化に重要な遺伝子のメチル化状態は起源細胞の状態を反映していると考えられている。これらの転写因子遺伝子のメチル化は神経膠腫発生部位やドライバー遺伝子ごとに違いが見られ、DCG は正中部の *H3F3A K27M* 変異を有する症例と似たパターンを示し、起源細胞に近い可能性が示唆された。

さらに *SOX10* プロモーターが低メチル化の群において、高メチル化の群と比較してメチル化の低い領域を遺伝子全体から抽出し、これらの領域に濃縮している配列を調べたところ *SOX* に特長的な配列 (モチーフ) が最も濃縮していた。これにより *DCG* を含めて *SOX10* の亢進している症例において、*SOX* がゲノムワイドの遺伝子制御に関与している可能性が示唆された。

米国主導の大規模ゲノム解析プロジェクトである TCGA (The Cancer Genome Atlas) プロジェクトにおける神経膠腫のゲノム解析により多くの分子異常が明らかになったが、この中で使用されたサンプルのほとんどは脳の神経膠腫であった。今回、*DCG* を対象に網羅的分子解析を行い明らかとなった分子異常は、これらと異なった点が多く見られた。クロマチン制御に影響を及ぼす *H3F3A K27M* 変異や *SETD2* 変異、*p53* 抑制をもたらす *TP53* 変異や *PPM1D* 異常が高頻度見られた。また *PDGFRA* に関連した遺伝子群のメチル化変化や発現亢進も特徴的であり、*DCG* の発生に重要な役割を果たしていると考えられた。さらに各部位で発生した神経膠腫間において神経系分化に重要な転写因子遺伝子のメチル化に差が見られ、神経膠腫の細胞起源を探索する上で手がかりとなる所見と考えられた。また、部位ごとの細胞起源の違いが神経膠腫発生過程の分子変化の違いと関係している可能性が考えられた。今回明らかとなった *DCG* に特徴的な分子異常の中に、神経膠腫や他癌腫で創薬開発が進んでいるものも含まれており、今後小脳神経膠腫特異的な分子異常を標的とした治療戦略が有効となる可能性が示唆された。