

博士論文

頭蓋底脊索腫の悪性度に関わる因子の分子遺伝学的解析

大谷 亮平

# 頭蓋底脊索腫の悪性度に関わる因子の分子遺伝学的解析

脳神経外科学

齊藤 延人

大谷 亮平

# 目次

I. 要旨.....	1
II. 序文 .....	2
A. 脊索腫について.....	2
B. 脊索腫における遺伝子解析の現状 .....	4
C. 脊索腫に対する、分子標的薬を用いた新たな治療への試み .....	7
D. Brachyury 遺伝子 .....	8
E. Brachyury 遺伝子内の SNP rs2305089 .....	10
III. 本研究の目的.....	12
IV. 方法 .....	13
A. 対象.....	13
B. PFS .....	18
C. 臨床検体の処理.....	18
D. Total RNA 抽出 .....	19
E. DNA 抽出 .....	20
F. Quantitative real-time RT-PCR .....	21
G. Brachyury 遺伝子コピー数解析.....	26

H.	SNP rs2305089 の遺伝子型解析 .....	29
I.	網羅的遺伝子発現解析 .....	32
J.	免疫染色.....	34
K.	統計解析 .....	36
V.	結果 .....	36
A.	PFS に影響する因子の検討 .....	36
B.	Brachyury 遺伝子の発現に関わる因子の解析 .....	40
1.	Brachyury 遺伝子のコピー数増幅 .....	41
2.	Brachyury 遺伝子内の SNP rs2305089.....	45
3.	<i>Brachyury</i> 発現に関わる転写制御因子の網羅的解析.....	48
4.	PI3K/Akt pathway の活性化.....	59
VI.	考察 .....	64
A.	本研究の意義 .....	64
B.	脊索腫の臨床的予後に相関する因子.....	65
C.	<i>Brachyury</i> 発現と悪性度 .....	67
D.	Brachyury 遺伝子のコピー数増幅 .....	69
E.	Brachyury 遺伝子内の SNP rs2305089.....	71
F.	<i>Brachyury</i> 発現と関連する因子の解析 .....	74

G.	今後の治療への応用の可能性 .....	75
H.	本研究の限界 .....	76
I.	今後の研究 .....	77
VII.	結語 .....	78
VIII.	謝辞 .....	79
IX.	引用文献 .....	80

## 本論文で使用した略語一覧

---

EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FC	fold change
FISH	Fluorescence in situ hybridization
GAPDH	glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
Gd	gadolinium
H-E	hematoxylin-eosin
MRI	magnetic resonance imaging
PCR	polymerase chain reaction
PFS	Progression-free survival
RT-PCR	reverse transcription polymerase chain reaction
SNP	single nucleotide polymorphism

---

## I. 要旨

脊索腫は頭蓋底部に好発し、臨床的に悪性の経過を辿る腫瘍である。標準治療は手術摘出と放射線治療であるが、多くの脊索腫は再発を免れず、新たな補助療法が求められている。腫瘍の起源は胎生組織である脊索の遺残であり、脊索への分化に必須の転写因子である *Brachyury* が、脊索腫にも高発現している。本研究において、この *Brachyury* 発現が臨床的予後と相関し、脊索腫の独立した予後因子であることが示唆された。また、*Brachyury* の発現亢進には、*Brachyury* 遺伝子の体細胞性コピー数増幅の関与が示唆された。さらに、*Brachyury* 発現が高い腫瘍において、PI3K/Akt pathway が活性化されていることが示唆された。*Brachyury* および関連する pathway は、脊索腫に対する新たな治療ターゲットとなり得る可能性がある。

## II. 序文

### A. 脊索腫について

脊索腫は、10万人に0.08人の頻度で発生するまれな腫瘍であり<sup>1</sup>、全年齢層に出現するが50~60歳に発生ピークがある。米国の統計では男性に多いが<sup>2,3</sup>、日本の全国脳腫瘍統計によるとやや女性に多い<sup>4</sup>。発生起源は、胎生期の脊索組織の遺残と考えられている。脊索組織は、発生で体軸の決定などに重要な役割を果たし、発生過程の途中で頭蓋底部の骨や脊椎に置き換わる。脊索の遺残はこれらの組織に認めるため、脊索腫は頭蓋底、脊椎、仙骨部の正中線上に好発し、それぞれ32%、32.8%、29.2%の頻度とされる<sup>5</sup>。病理学的には、一般的に核分裂像は少なくMIB-1 indexも低いため、ゆっくりと発育する。しかし、周囲の骨組織を浸潤、破壊して増大するため全摘出は困難であり、臨床的には再発を繰り返しながら増大を続け、予後不良の経過を辿る。また、再発を繰り返す過程でMIB-1 indexおよび増大速度が上昇し、早期に死に至る症例も存在する。生存期間中央値は6.29年であり、5年生存率、10年生存率、20年生存率はそれぞれ67.6%、39.9%、13.1%と報告されている<sup>5</sup>。自験例の頭蓋底脊索腫の一例を図1に提示する。

脊索腫に対する治療は、手術による可及的摘出後、残存病変に対し放射線治

療を行うのが一般的であるが、積極的に腫瘍摘出後、高線量の放射線治療を行ったとしても、多くの脊索腫は再発を来す<sup>6</sup>。内視鏡技術の発達とともに、経鼻蝶形骨洞手術による摘出可能な範囲は拡がりつつあるが、脊索腫の予後改善のためには新たな補助療法が求められている。今後、分子標的治療薬を含めた新たな治療法の開発が待たれているのが現状である。

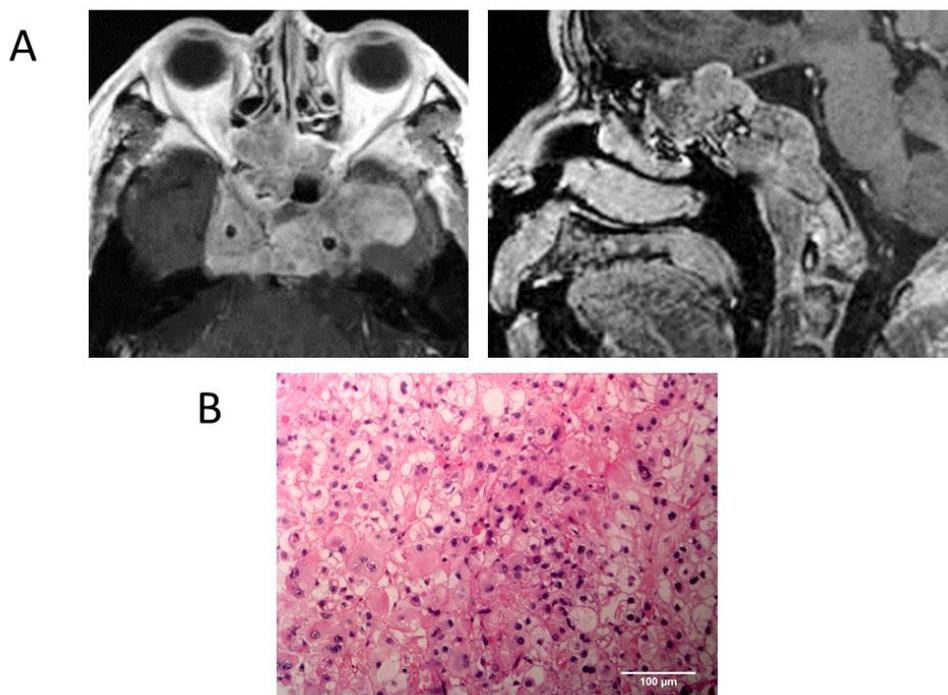


図 1 頭蓋底脊索腫の Gd 造影 T1 強調 MRI 像 (A) と病理組織 H-E 染色像

(B)

今回解析を行った頭蓋底脊索腫の 1 症例。斜台部正中を中心に、上方は前頭蓋底、下方は下位斜台部、側方は両側海綿静脈洞を巻き込み、左では硬膜を超えて頭蓋内に進展する。病理像では、粘液基質を背景に、腫瘍細胞がシート上に

配列している。細胞内の泡様空胞化が特徴的で、担空胞細胞 (physaliferous cell) と呼ばれる。Gd; gadolinium、MRI; magnetic resonance imaging、H-E; hematoxylin-eosin。

## B. 脊索腫における遺伝子解析の現状

新たな治療へ向けて、脊索腫に対する様々な分子遺伝学的解析が行われ、報告されている。染色体の不安定性に関する報告では、3p, 1p の欠失、7q, 20, 5q, 12q のコピー数増幅を認めることが示されており、特に 7q36 増幅の頻度が高かった<sup>7</sup>。7q36 にある *Homeobox HB9 (HLXB9)*、*Sonic hedgehog gene (SHH)* は、脊索においても発現していることが知られている。Le らは、1p と 9p の欠失を報告している<sup>8</sup>。9 番染色体には癌抑制遺伝子の *Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)* が存在する。*CDKN2A* は Rb 蛋白の調整に関わり、欠失により無秩序な細胞増殖を来す。さらに、16 例/20 例 (80%) の孤発性脊索腫において、10q23.3 領域の欠失を報告している。この領域にはがん抑制遺伝子の *Phosphatase and tensin homolog deleted from chromosome (PTEN)* が存在しており、*CDKN2A* と *PTEN* は脊索腫における key regulator であると結論付けている。Stephens らは、11 例中 2 例の脊索腫において、3q, 4q, 7q, 8p, 9p 染色体の間で 147 箇所におよぶ組み換えを認めることから、*Chromothripsis* (染色体破砕) が起こっていると報告している<sup>9</sup>。*Chromothripsis* とは、限局した染色体に

において、数十～数千箇所にも及ぶ崩壊と再編成が一度のイベントで発生する現象であり、長年の遺伝子変異の蓄積によりがん化が起きるという既存の概念とは異なる概念である。がん全体の、少なくとも2~3%に認めると報告されている<sup>9</sup>。

脊索腫に特徴的な遺伝子発現異常に関しても、いくつかの報告がある（表1）。Shalabyらは、脊索腫における *Epidermal growth factor receptor (EGFR)* 高発現を報告している<sup>10</sup>。報告によれば、173例の脊索腫の69%で *EGFR* が高発現しており、38%でコピー数増幅を認めたとしている。その他、*Platelet-derived growth factor receptor beta (PDGFRB)* の高発現<sup>11</sup>、*EGFR*、*c-MET* の高発現<sup>12</sup> が報告されている。これらのチロシンキナーゼ型受容体に関する報告を根拠として、脊索腫に対するチロシンキナーゼ阻害薬を用いた臨床試験が行われている（Ⅱ章C節にて詳述）。Diazらは、仙骨部脊索腫の98%、頭蓋底脊索腫の67%で *Fragile histidine triad (FHIT)* 蛋白発現の欠失か減少を認めると報告している<sup>13</sup>。Palliniらは、頭蓋底脊索腫における *Telomerase reverse transcriptase (TERT)* の発現が、腫瘍の増殖速度と相関することを報告している<sup>14</sup>。

以上のように、脊索腫の *key regulator* の解明へ向けた様々な解析が行われているが、共通した特徴としてコンセンサスが得られているものは、現在のところ

ろ認めていないのが現状である。

染色体異常	
1p, 3p 欠失	Scheil et al. 2001 <sup>7</sup>
7q36 コピー数増幅	
1p, 9p 欠失、10q23 欠失	Le et al. 2011 <sup>8</sup>
Chromothripsis	Stephens et al. 2011 <sup>9</sup>
遺伝子発現異常	
<i>TERT</i> 高発現	Pallini et al. 2003 <sup>14</sup>
<i>EGFR</i> , <i>c-MET</i> 高発現	Weingerger et al. 2005 <sup>12</sup>
miRNA-1 発現低下	Duan et al. 2010 <sup>15</sup>
<i>EGFR</i> 高発現	Shalaby et al. 2011 <sup>10</sup>
<i>PDGFR</i> 高発現	Stacchiotti et al. 2012 <sup>11</sup>
<i>FHIT</i> 蛋白発現欠失	Diaz et al. 2012 <sup>13</sup>

表 1 脊索腫の染色体異常・遺伝子発現異常に関する過去の報告

### C. 脊索腫に対する、分子標的薬を用いた新たな治療への試み

脊索腫に対して従来の化学療法が無効であることは、過去の報告から明らかとなっている<sup>16,17</sup>。脊索腫に対し、分子標的薬を用いた新たな治療へ向けての臨床試験が、ヨーロッパを中心に始まっている。PDGFR 陽性の脊索腫に対して、PDGFR 阻害薬である imatinib を用いた phase II study が、イタリアとスイスで行われている<sup>11</sup>。また、EGFR 陽性の脊索腫に対して、EGFR 阻害薬である lapatinib を用いた phase II study がイタリアで行われている<sup>18</sup>。結果は、PR (partial response)の割合がそれぞれ 2%、0%、SD (stable disease) がそれぞれ 70%、83%であり、現在のところは期待された結果は得られていないようである。他のチロシンキナーゼ阻害薬として、Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) および PDGFR を阻害する sunitinib による phase II study が行われており、44%で SD が少なくとも 16 週間得られていると報告されている<sup>19</sup>。その他 1 例報告ではあるが、EGFR 発現陽性の脊索腫患者に対して、cetuximab と gefitinib の併用投与により PR が得られたという報告もある<sup>20</sup>。治療標的の可能性に関する報告としては、解析した 70 例の脊索腫全例において、Signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3) の活性化を認めることが報告されている<sup>21</sup>。さらに、脊索腫細胞株に対して STAT3 を抑制すると、

細胞増殖も抑制されることが示されている<sup>22</sup>。STAT3は様々ながんで活性化され、悪性化に関わっていることが知られている。

以上のように、分子標的薬を中心として、脊索腫に対する新たな治療法開発への試みが基礎レベルから臨床レベルまで行われている。

#### D. Brachyury 遺伝子

Brachyury 遺伝子 (T 遺伝子とも呼ばれる) は染色体 6q27 に存在し、コードする蛋白である Brachyury は、胎生期において中胚葉の発生および脊索への分化に必須の転写因子である<sup>23</sup>。436 個のアミノ酸からなり、N 末端領域に T-box と呼ばれる DNA 結合領域を持つ<sup>24</sup>。中胚葉から脊索で特異的に高発現しており、脊索の遺残から発生する脊索腫においても、*Brachyury* が特異的に高発現していることが報告されている<sup>25-27</sup>。これを利用して、脊索腫と病理学的に鑑別が困難な軟骨肉腫との鑑別に、*Brachyury* が有用であると報告されている<sup>25</sup>。さらに、*Brachyury* が脊索腫細胞の増殖に直接関わっていることが報告されている<sup>28</sup>。この報告では、脊索腫細胞株を樹立後、shRNA にて *Brachyury* 発現を抑制すると、腫瘍細胞の増殖能も抑制されることが示されている。また、*Brachyury* 発現と臨床的悪性度に関して、2013 年に初めて報告がなされた<sup>29</sup>。

この報告によれば、37例の頭蓋底脊索腫に対し、免疫染色にて *Brachyury* 発現の有無で2群に分けると、*Brachyury* 発現を認める群で有意に無増悪生存期間 (progression-free survival, PFS) が短いとされている。さらに、fluorescence in situ hybridization (FISH)による *Brachyury* 遺伝子のコピー数解析では、コピー数増幅がある群で有意に PFS が短いという結果であった。その他、中胚葉由来の臓器に発生する他のがん腫でも *Brachyury* 発現が確認されており、肺がんにおいては *Brachyury* 発現と悪性度に相関があるとする報告<sup>30,31</sup> や、乳がん<sup>32</sup>、前立腺がん<sup>33</sup>の悪性度との関連の報告もある。

*Brachyury* が、どのような機序で悪性腫瘍の悪性度に関わっているかに関しては明らかではなく、上流や下流の分子経路に関する報告も少ない。脊索腫細胞株において *Brachyury* 発現を抑制し、マイクロアレイ、クロマチン免疫沈降シーケンス (ChIP シーケンス) にて解析した報告によると<sup>34</sup>、*Brachyury* は99種類のターゲット DNA に直接結合し、他の64種の遺伝子の発現に間接的に作用することで、細胞周期や細胞外マトリックスの構成要素を含む伝達経路を調整するとされている。他の下流の経路として、*Brachyury* が epithelial-mesenchymal transition (EMT)を介して悪性度に関わっていることを示唆する報告がある<sup>31</sup>。膀胱がん細胞株を用いて、in vitro で shRNA により *Brachyury* 発現を

抑制した結果、EMTを示唆する所見である *E-cadherin* 遺伝子の発現低下、*Snail*、*Slug* の発現上昇を認めることが示されている。仮説として、*Brachyury* が *E-cadherin* のプロモーター領域に結合し、*E-cadherin* 発現を抑制することが提案されている。*Brachyury* が幹細胞マーカーであるとする報告もある<sup>35</sup>。これによれば、間葉系幹細胞に *Brachyury* が発現しており、骨芽細胞や脂肪細胞に分化すると発現が失われることが示されている。この発現抑制はプロモーター領域の CpG island のメチル化によると報告されている。

以上のように、*Brachyury* 発現は脊索腫や他のがんでも高発現し、悪性度にも関わっていることが示唆する報告がある。

#### E. *Brachyury* 遺伝子内の SNP rs2305089

*Brachyury* 遺伝子内にある single nucleotide polymorphism (SNP) が、脊索腫の発生リスクおよび *Brachyury* 発現に関わっているという報告がある。この報告によると、*Brachyury* 遺伝子内のエクソン 4 にある、SNP rs2305089 における guanine (G) から adenine (A) への変異は、脊索腫発生のリスク因子であるとされている<sup>36</sup>。根拠としては、ヨーロッパ人種の健常コントロール群における SNP rs2305089 の A アリル頻度が 53%であるのに対し、脊索腫患者群では 86%

と有意に高く ( $p=4.6 \times 10^{-12}$ 、オッズ比=5.3、95%信頼区間=3.1-8.9)、A アリルへの変異が脊索腫のリスクファクターであるとされている (図 2)。

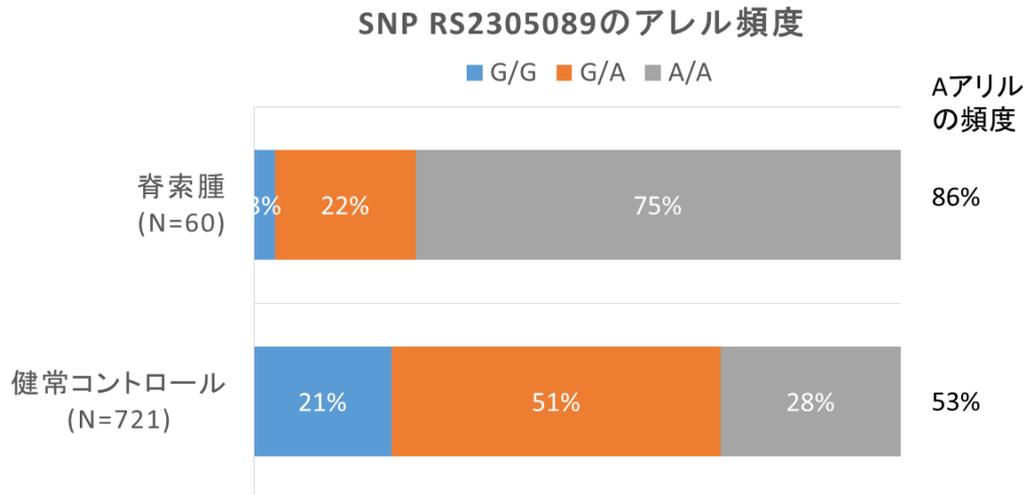


図 2 脊索腫患者と健常コントロールとの SNP rs2305089 の遺伝子型の比較

ヨーロッパ人種の検討にて、脊索腫患者での SNP rs2305089 の A アリル頻度が、健常コントロール群に比べて有意に高いことが報告されている ( $p=4.6 \times 10^{-12}$ 、オッズ比=5.3、95%信頼区間=3.1-8.9)。(論文中のデータ<sup>36</sup>より、グラフを作成)。

また、この SNP の遺伝子型が、*Brachyury* 発現に影響を与えることを示している。遺伝子型が A/A のホモ接合型の群が、A/G のヘテロ接合型の群と比較して有意に *Brachyury* 発現が高いことが示されている ( $p=0.02$ )。この SNP の A アリルへの変異は、GGT (Gly) →GAT (Asp) へのミスセンス変異を生じる。この領域は、転写因子である *Brachyury* が DNA と結合する部位をコードしてい

るため、脊索腫の発生や *Brachyury* 発現に影響を与えている可能性があると考えられている。

### III. 本研究の目的

本研究の目的は、頭蓋底脊索腫の悪性度に関わる因子を分子遺伝学的解析により同定し、治療ターゲットとしての可能性を探ることである。その候補として、脊索腫に特異的に発現し、過去の報告から悪性度への関連も疑われる *Brachyury* 遺伝子に着目した。頭蓋底脊索腫において、*Brachyury* 遺伝子の発現が臨床的悪性度に関わっているという仮説のもと、検討を行った。

続いて、*Brachyury* 発現を亢進させる要因を同定することを目的とした。

*Brachyury* 発現に影響を与えている可能性がある要因として以下の3つを候補として挙げ、それぞれに対して検討を行った。

- *Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅
- *Brachyury* 遺伝子内の SNP の遺伝子型
- *Brachyury* 遺伝子の発現に関与する転写制御因子

最後に、見出された因子が新たな治療ターゲットとして応用できる可能性があるか、検討を行った。

## IV. 方法

### A. 対象

1994年9月から2014年3月の間、当科で腫瘍摘出術を施行され、病理診断にて脊索腫と確定診断された症例の内、凍結腫瘍検体が得られている19患者29検体を対象とした。性別は、男性12患者18検体、女性7患者11検体であった。検体採取時における年齢の平均 $\pm$ SDは、 $52.4\pm 16.4$ であった。初発例は8検体、再発例は21検体であった。治療 modality は、開頭手術は14検体、経鼻経蝶形骨洞的内視鏡下手術は15検体で、ほぼ同数であった。初回手術を起算日として、検体採取時の手術が何回目の手術であるかを手術回数とした。平均 $\pm$ SDは $4.1\pm 3.2$ 回であった。術後3ヶ月以内に放射線治療が行われている検体を、術後放射線治療ありとした。術後放射線治療ありは9検体、治療なしは18検体であった。29検体の内、後述の品質評価にて基準を上回る質と量が得られたRNAとDNAは、それぞれ27検体ずつであり、これらを解析に用いた。解析対象である19患者29検体に関して、解析に用いた臨床的背景の要約を表2に、全情報のリストを表3に提示する。表3では、採取検体が初回手術であるもの以外の検体に関して、臨床経過の中で解析検体がどの位置関係にあるのかを時間

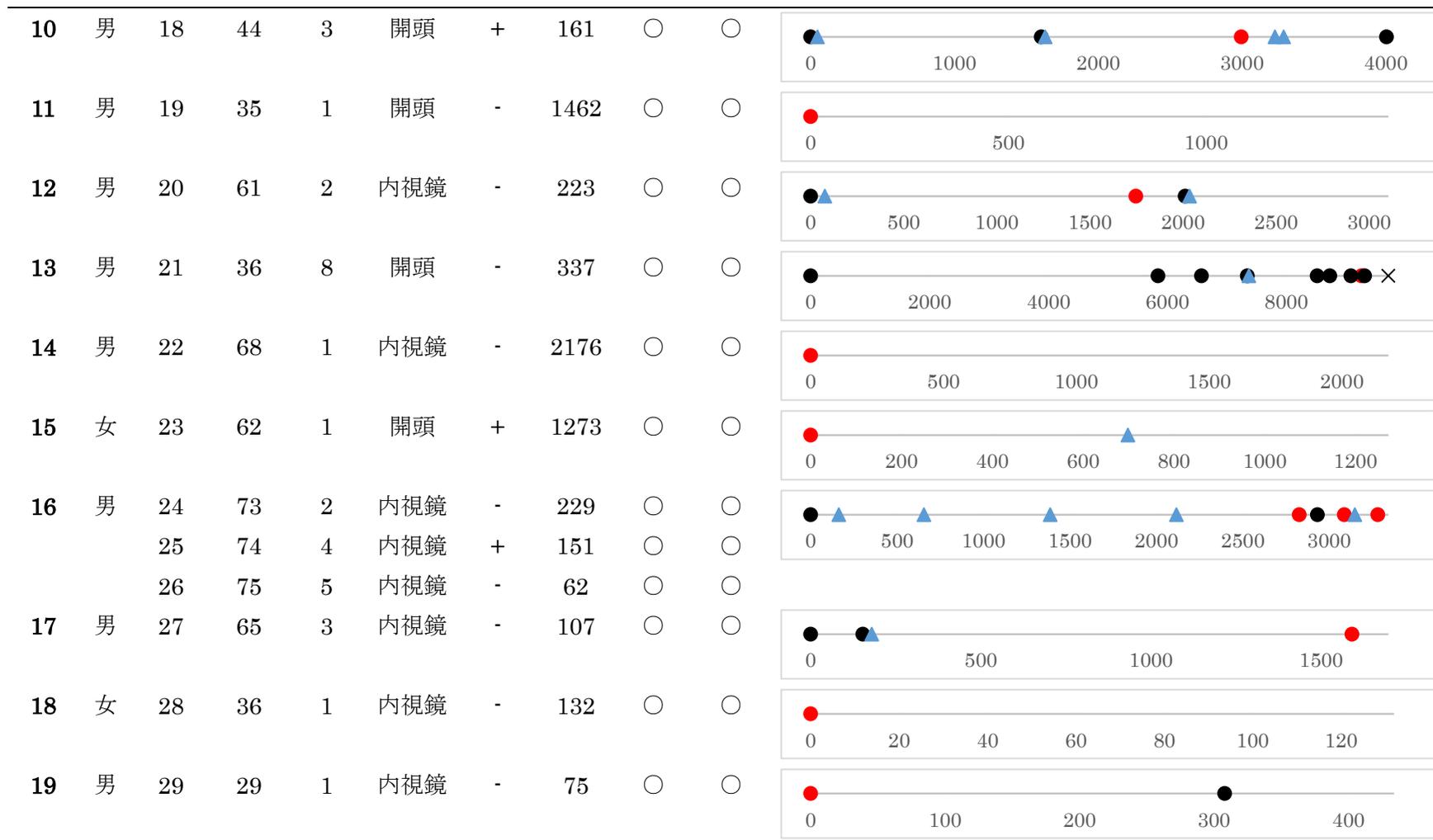
軸で図示した。

なお、本研究は、東京大学大学院医学研究科ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会から承認された「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」研究に基づいて行っている (#G3512)。全ての対象症例の患者から、文書による同意を取得している。

n		29 検体 (19 患者)
対象期間		1994/9～2014/3
性別	男性	18 (12 患者)
	女性	11 (7 患者)
年齢 (平均±SD)		52.4±16.4 (26 歳～77 歳)
初発 or 再発	初発	8
	再発	21
治療 modality	開頭	14
	内視鏡	15
手術回数 (平均±SD)		4.1±3.2 (1～14)
術後放射線治療の有無	+	9
	-	18
使用可能検体	RNA	27
	DNA	27

表 2 解析対象の臨床的背景の要約





### 表 3 解析対象の臨床的背景および臨床経過

解析対象である 19 患者 29 検体に関して、解析に用いた臨床情報を提示する。DNA、RNA は、解析可能な検体を○で示した。臨床経過の中で解析検体がどの位置関係にあるのかを時間軸で明示すべく、横軸を時間軸（日数）、初回手術を起算日として、手術、放射線治療を行った時点をプロットした。解析検体を採取した手術は赤で示した。観察期間を、時間軸の長さとして示した。

## B. PFS

各検体を採取した手術日を起算日として、術後残存病変がない症例では、フォローアップ MRI にて造影病変の出現が最初に確認された日まで、術後残存病変がある場合は、造影病変の拡大が最初に確認された日までの期間を、PFS とした。PFS を臨床的悪性度の指標とした。

本研究では、臨床経過の悪性度を評価する指標として、再発もしくは再増大までの期間である PFS を用いた。Overall survival (OS) に関しては、脊索腫は一般的に臨床経過が長く、最終局面はどの時点まで積極的な治療を続けるかで変わり、年齢や社会的環境にも強く影響を受けるため、OS よりも PFS の方が脊索腫における臨床的悪性度を正確に反映するものと考えた。

## C. 臨床検体の処理

手術中に、診断用の病理標本とは別に可能な範囲で検体を採取し、手術室内で液体窒素に入れて急速凍結した。以後は、実験室内の $-80^{\circ}\text{C}$ フリーザーにて保存した。

#### D. Total RNA 抽出

凍結腫瘍検体をビーズクラッシャー  $\mu$  T-12 (TAITEC, Saitama, Japan) にて破碎し、RNeasy Mini Kit (Qiagen, Netherlands)を用いて、プロトコールに従い total RNA を抽出した。RNA の品質は、分光光度計 Nano Vue Plus (GE Healthcare, England) および Agilent 2100 バイオアナライザー (Agilent technologies, California, USA) を用いて確認した (図 3)。分光光度計の結果は、A260/A230、A260/A280 が共に 1.7 以上、バイオアナライザーの結果は、RNA 品質の定量的指標である RNA integrity number (RIN) を基準にし、RIN が 7.0 以上の検体を解析可能検体とした。一部の RNA では分解が進んでおり RIN も低値であったため、解析から除外した。RNA の分解の原因としては、検体採取の段階において、腫瘍摘出から液体窒素による凍結まで時間がかかったことが可能性として考えられる。

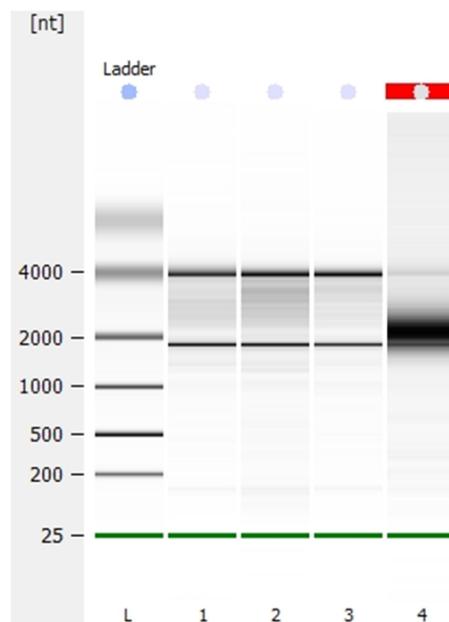


図 3 バイオアナライザーによる RNA 品質の確認

レーン 1～3 の RNA 検体では、18S rRNA と 28S rRNA の 2 本のバンドが検出され、その他のバンドはほとんど認めず、解析可能な RNA と判断した。一方、レーン 4 の RNA 検体では、2 本のバンドは消失し分解産物と思われるスメアが出現しており、分解が進んだ RNA と考えられた。rRNA; ribosomal RNA。nt ; nucleotide。

#### E. DNA 抽出

腫瘍 DNA に関しては、凍結検体を破砕し、QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) を用いて、プロトコールに従って DNA 抽出を行った。血液 DNA に関しては、QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen) を用いてプロトコールに従って DNA 抽出を行った。DNA の品質および濃度は分光光度計にて確認し、A260/A230、A260/A280 が共に 1.6 以上であるものを解析可能検体とした。

## F. Quantitative real-time RT-PCR

Brachyury 遺伝子の発現は、腫瘍検体の RNA より quantitative real-time RT-PCR にて解析を行った。Total RNA 1  $\mu$ g より SuperScript VILO (Invitrogen, California, USA) を用いてランダムプライマーにて逆転写を行い、cDNA を合成した。サイバーグリーンを用いたインターカレーター法にて、real-time RT-PCR を施行した。サイバーグリーンは、Fast SYBR Green Master Mix (Life technologies, California, USA) を使用した。Real-time PCR は、StepOnePlus リアルタイム PCR システム (Applied Biosystems, California, USA) にて施行した。

PCR は triplicate で施行。目的の PCR が特異的に行われていることを、melt curve 解析にて確認した (図 4)。

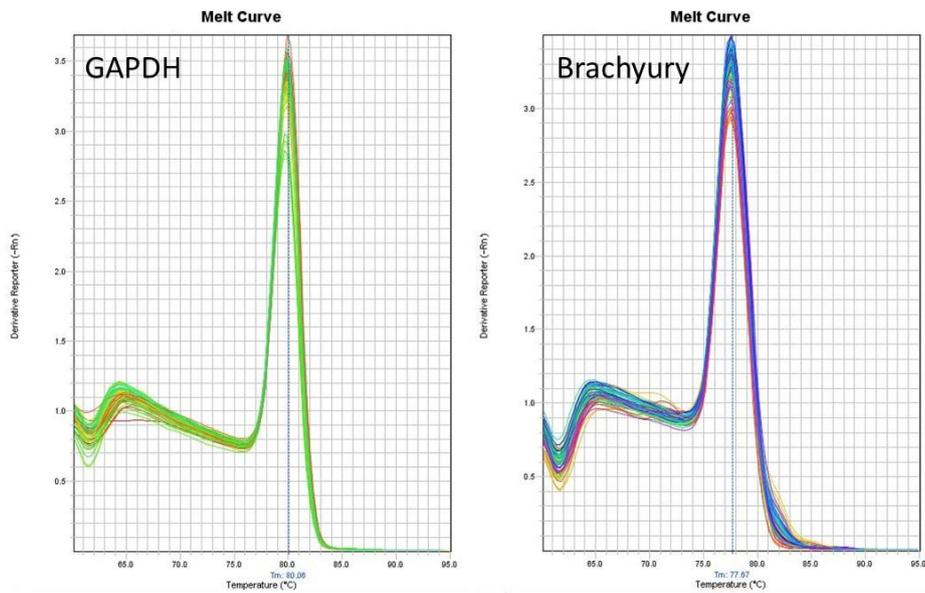


図 4 *GAPDH* および *Brachyury* の melt curve

両結果とも融解温度にてシングルピークを示しており、PCR が特異的に行われていることを確認した。横軸は温度 (°C)、縦軸は蛍光量の一次微分。

解析は、検量線を用いた相対定量法にて行った。検量線作成用の検体は、全検体の cDNA サンプルを等量混合して作成し、段階希釈して用いた。リファレンス遺伝子として、ハウスキーピング遺伝子の *Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)* を使用し、目的遺伝子発現量を *GAPDH* 発現量で除すことで、各遺伝子発現量を補正した。

各検体の発現量は、同時に解析した正常脳における目的遺伝子発現量を基準にして、相対値で表した。正常脳の total RNA は、Clontech Premium RNA

(Takara bio, Shiga, Japan) を使用し、他の検体と同条件で cDNA 合成を行い、  
解析に用いた。

PCR は、以下の条件で行った。

#### 反応液組成

Fast SYBR® Green Master Mix (2X)	10	$\mu$ l
Forward Primer (20 $\mu$ M)	0.4	$\mu$ l
Reverse Primer (20 $\mu$ M)	0.4	$\mu$ l
cDNA template x50	1	$\mu$ l
Nuclease-free water	8.2	$\mu$ l
<b>Total</b>	<b>20</b>	<b><math>\mu</math> l</b>

#### PCR 条件

95°C、5min.	1 cycle
95°C、30sec.	
60°C、30sec.	40 cycle
72°C、30sec.	

*Brachyury* 発現を解析するプライマーは、複数のイントロンを挟む以下の位置に作成した (図 5)。

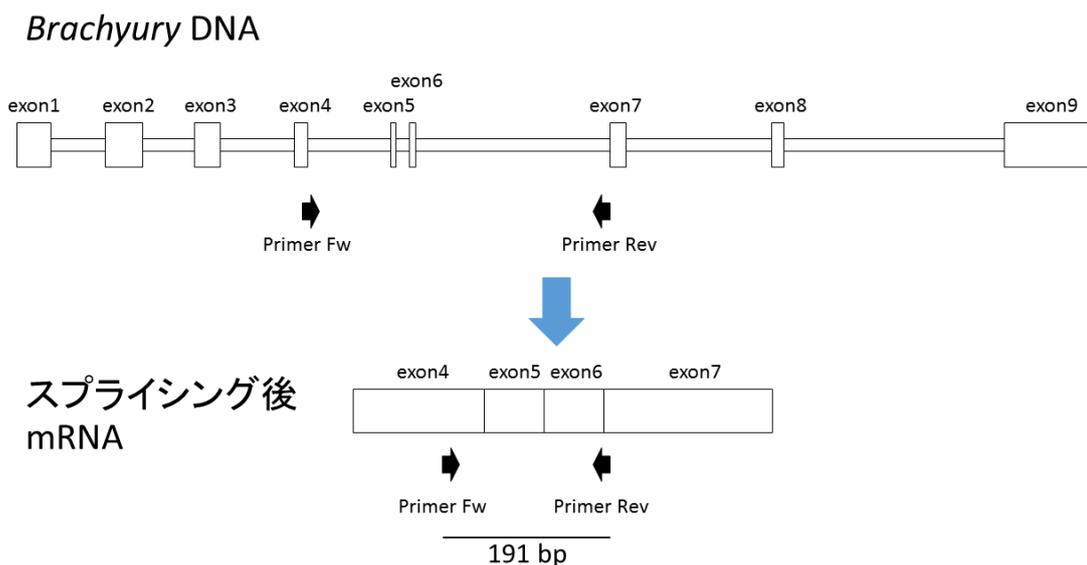


図 5 *Brachyury* 発現解析のための real-time PCR 用プライマーの位置

*Brachyury* 遺伝子上でのプライマーの位置を示す。実際には、スプライシングによりイントロンが取り除かれた *Brachyury* mRNA を逆転写して作成した cDNA に対して PCR を行うので、下図の位置にプライマーがアニーリングする。PCR 産物は 191 base pair となる。

プライマー配列は以下の通りである。

		Primer sequence
<i>Brachyury</i>	Forward	5'-TGAGACCCAGTTCATAGCGG-3'
	Reverse	5'-TGCTGGTTCCAGGAAGAAGC-3'
<i>GAPDH</i>	Forward	5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'
	Reverse	5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'

## G. Brachyury 遺伝子コピー数解析

凍結腫瘍検体および血液検体の DNA を使用した。

TaqMan Copy Number Assays (Applied Biosystems)にて、real-time PCR を用いてコピー数解析を行った。Brachyury 遺伝子をターゲットにしたプローブは、エクソン7の5'側寄りをターゲットとしており (図 6、target1)、市販されている既にデザイン済みのプローブを使用した (Applied Biosystems, product No; Hs02212422\_cn)。各検体における正常コピー数のリファレンスとして、RNaseP probe (Applied Biosystems, product No; 4403326)を使用した。Brachyury 遺伝子のコピー数が正常の2コピーと考えられる negative control 検体として、軟骨肉腫および髄膜腫の患者の血液 DNA を使用した。DNA 30ng に対し、Brachyury 遺伝子と RNaseP のプローブを混合した反応液を triplicate で作成し、multiplex quantitative real-time PCR を行った。反応液の組成および PCR 条件は、以下の通りである。

## 反応液

2 x TaqMan® Genotyping Master Mix	10	μL
TaqMan probe Brachyury gene Copy Number Assay, 20x	1	μL
TaqMan® probe RNaseP Copy Number Reference Assay, 20x	1	μL
Nuclease-free water	7	μL
DNA template (30ng)	1	μL
Total	20	μL

## PCR 条件

95°C、10min.	1 cycle
95°C、15sec.	40 cycle
60°C、1min.	

Real-time PCR の結果、閾値に達するまでのサイクル数として、Ct 値 (threshold cycle) が得られる。各検体の Ct 値を用いて、以下のように  $\Delta\Delta Ct$  法にてコピー数を算出した。各検体の Brachyury 遺伝子の Ct 値と RNaseP の Ct 値の差を  $\Delta Ct$  とした。各検体の  $\Delta Ct$  と、negative control 検体の  $\Delta Ct$  との差を

$\Delta\Delta Ct$  とした。1 回の PCR 増幅サイクルで DNA 量が 2 倍になると仮定して、 $2^{\Delta\Delta Ct}$  を、negative control 検体のコピー数に対する各検体のコピー数とした。

コピー数解析の結果の再現性を確認すべく、Brachyury 遺伝子内の異なる部位をターゲットにしたプローブにて、同一プロトコールでコピー数解析を行った。Brachyury 遺伝子のコピー数解析を同様の方法で行っている論文<sup>37</sup>と、同一の配列の TaqMan プローブを作成して解析に使用した。このプローブは Brachyury 遺伝子のエクソン 6 の 3'側寄りをターゲットにしている (図 6、target2)。

プライマー配列は以下の通りである。

		Primer sequence
コピー数解析用 primer target2	Forward	5'-GTACTCCCAATGTA CGGTTTGTTG-3'
	Reverse	5'-TCAGCAAGTCTAGTCCCGATGAC-3'

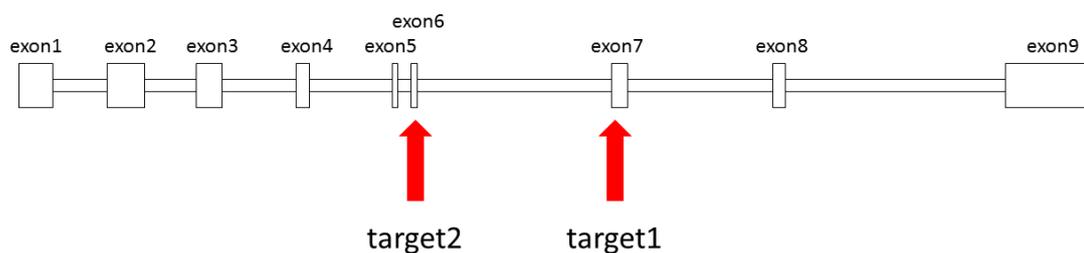


図 6 Brachyury 遺伝子コピー数解析用の 2 種類のプライマーの位置

コピー数解析の再現性を確認するため、2 種類のプライマーにて解析を行った。ターゲット 1 はエクソン 7 上の 5' 側寄りであり、デザイン済みの TaqMan

プローブを購入した。ターゲット 2 は、エクソン 6 上の 3' 側寄りであり、過去の論文を元に作成した。

#### H. SNP rs2305089 の遺伝子型解析

腫瘍検体から抽出した DNA を使用した。過去の報告<sup>38</sup>を元に、Brachyury 遺伝子内のエクソン 4 にある SNP rs2305089 を挟む位置にプライマーをデザインした (図 7)。

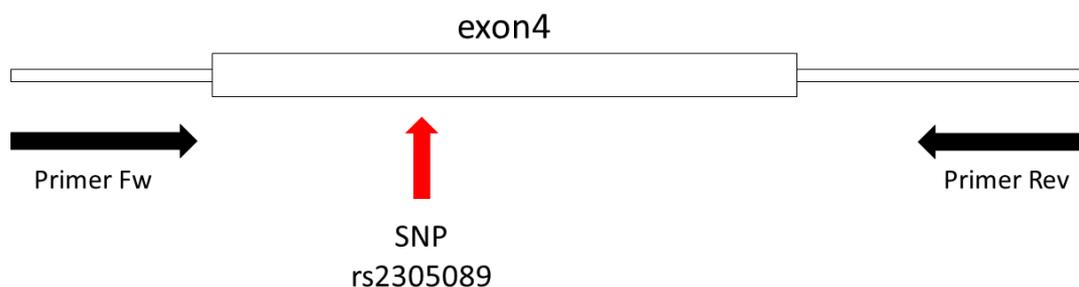


図 7 SNP 解析のための PCR 用プライマーの位置

Brachyury 遺伝子のエクソン 4 にある、SNP rs2305089 を挟む上図の位置にプライマーをデザインし、PCR を行った。

以下のプロトコールにて PCR を施行した。

反応液組成

10x PCR buffer	2	μL
10x dNTPs(2mM)	2	μL
Forward Primer (20 μ M)	1	μL
Reverse Primer (20 μ M)	1	μL
AmpliTaq Gold	0.1	μL
Template DNA (50ng)	1	μL
ddH <sub>2</sub> O	12.9	μL
Total	20	μL

PCR 条件

95°C、10min.	1 cycle
95°C、30sec.	
60°C、30sec.	35 cycle
72°C、30sec.	
72°C、7min.	1 cycle
4°C、∞	1 cycle

1.5%アガロースゲルにて PCR 産物の電気泳動を行い（図 8）、目的のバンドである 236bp のバンドを切り出して、Gel Extraction Kit (QIAGEN)にて精製を行った。

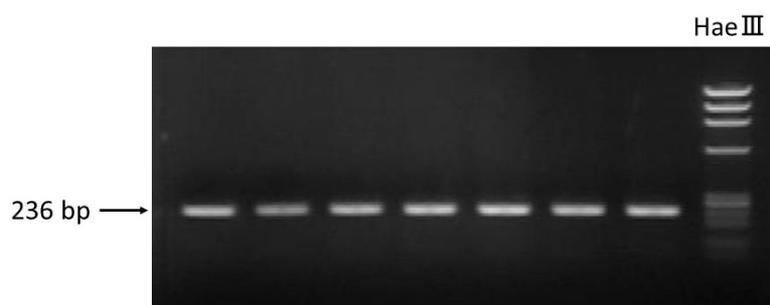


図 8 PCR 産物の電気泳動の一例

SNP 解析のため、SNP rs2305089 を挟むプライマーにて PCR を施行し、PCR 産物を 1.5%アガロースゲルにて電気泳動した。目的の 236bp のバンドのみ得られ、これを切り出してゲルより DNA を抽出した。

精製後の PCR 産物を、FASMAC 社（Kanagawa, Japan）に依頼し Sanger 法にて塩基配列を決定した。シーケンス用のプライマーは、PCR にて使用したものと同一のものを使用した。シーケンス結果は、DNA Dynamo（Blue Tractor Software Ltd, England）を使用して解析を行った。遺伝子型は、波形（クロマトグラム）を確認し、G のピークのみであれば G のホモ接合型、A のピークのみであれば A のホモ接合型、G と A の 2 つのピークが重なっていれば G/A のヘ

テロ接合型と判定した (図 9)。

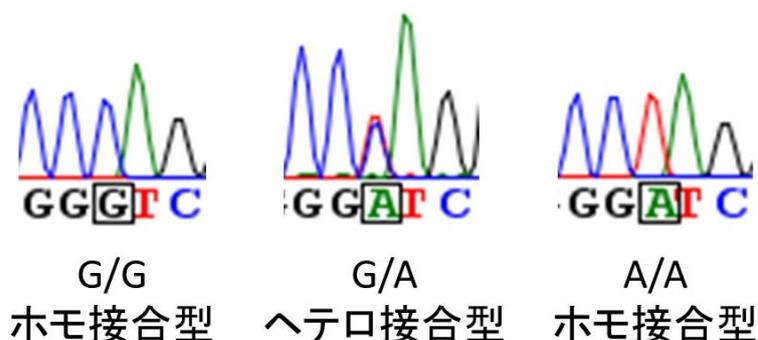


図 9 Sanger シークエンスの結果 (クロマトグラム) による遺伝子型の判定

□に囲まれた塩基が、SNP rs2305089 の位置である。G のピークのみであれば G のホモ接合型、A のピークのみであれば A のホモ接合型、G と A の 2 つのピークが重なっていれば G/A のヘテロ接合型と判定。

健常コントロール群における遺伝子型に関しては、National center for biotechnology information (NCBI) データベースより、HapMap Project における日本人のデータを使用した。

([http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp\\_ref.cgi?rs=2305089](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2305089))。

## I. 網羅的遺伝子発現解析

*Brachyury* 高発現の腫瘍と低発現の腫瘍における遺伝子発現プロファイルを

解析すべく、DNA マイクロアレイにて網羅的遺伝子発現解析を行った。まず、*Brachyury* 発現が高い 4 検体と低い 4 検体をそれぞれ高発現群、低発現群とし、各腫瘍検体の total RNA 計 8 検体を用意した (図 10)。RNA 品質に関しては、分光光度計およびバイオアナライザーにて評価し、A260/A230、A260/A280 が共に 1.7 以上、RIN が 7.0 以上の検体を解析可能検体とした。

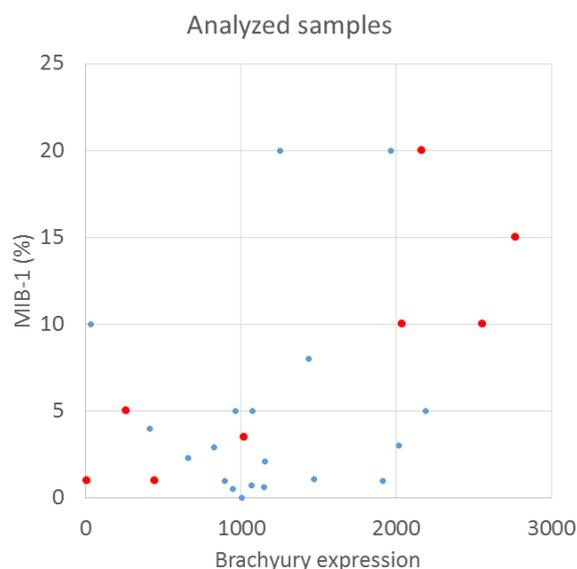


図 10 マイクロアレイ解析を行った検体

赤いプロットが、解析に用いた検体。*Brachyury* 発現が高い 4 検体と低い 4 検体を用いて、解析を行った。横軸が *Brachyury* 発現、縦軸が MIB-1 index (%)。

マイクロアレイ解析は、タカラバイオ株式会社 CDM センター (Mie, Japan)

に依頼し、Affymetrix 社 (California, USA) の GeneChip Human Genome U133 Plus 2.0 Array を用いて解析を行った。これにより、54,613 種のプローブにて 23,157 種の遺伝子の発現を解析した。Total RNA 250ng より開始。GeneChip 解析は、GeneChip 3' IVT Express Kit User Manual に順じて cRNA 合成を行い、cRNA 10ng よりハイブリダイゼーションを行った。1 アレイごとにシグナル値の平均値を 500 に補正したスケーリングデータを用いて、発現量の解析を行った。

## J. 免疫染色

腫瘍検体のパラフィン切片標本を使用し、クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH6.0) 中でマイクロウェーブにて抗原賦活化処理を施行後、各抗原に対する一次抗体を反応させた。引き続き二次抗体を反応させ、DAB 基質溶液にて発色させた。ヘマトキシリンにて核を染色後、観察を行った。使用した抗体、希釈率を表 4 に示す。

MIB-1 index は、最も陽性率が高いと思われる部位を選択し、視野を変えながら視野内の陽性核と陰性核を計 1000 個程度数え、陽性率を判定した。リン酸化 S6 リボソーム蛋白染色では、細胞質が強く染色されるものを陽性細胞と

判定した。Brachyury 染色は、核が強く染色されるものを陽性細胞と判定し

た。

	抗体名	企業名	製品番号	希釈率
<b>MIB-1</b>				
1st	Ki-67 Antibody	Dako, Denmark	M7240	1:200
2nd	Donkey anti-Mouse IgG Antibody	CiteAb, Bath, UK	AP192B	1:500
<b>Phospho-S6 Ribosomal Protein</b>				
1st	Phospho-S6 Ribosomal Protein Antibody	CST, Massachusetts, USA	#2211	1:300
2nd	Donkey anti-Mouse IgG Antibody	CiteAb, Bath, UK	AP192B	1:500
<b>Brachyury</b>				
1st	Anti-Brachyury	Abcam, Cambridge, UK	ab140661	1:600
2nd	Donkey anti-Mouse IgG Antibody	CiteAb, Bath, UK	AP192B	1:500
<b>蛍光二重染色</b>				
1st	Anti-Brachyury	Abcam, Cambridge, UK	ab140661	1:600
	Phospho-S6 Ribosomal Protein Antibody	CST, Massachusetts, USA	#2211	1:300
2nd	Alexa Fluor 488 Donkey Anti-Rabbit IgG Antibody	Life Technologies, California, USA	A21206	1:200
	Alexa Fluor 546 Donkey Anti-Mouse IgG Antibody	Life Technologies, California, USA	A10036	1:200

表 4 免疫染色に使用した抗体一覧

## K. 統計解析

相関係数の *probability*、腫瘍検体と血液検体におけるコピー数の差の検定、マイクロアレイ解析における 2 群の発現の比較には、Student's *t*-test を用いた。多変量解析には、Cox 比例ハザードモデルを用いた。単変量解析による PFS の比較には、log-rank test を用いた。コピー数増幅の有無および遺伝子型による *Brachyury* 発現の差の検定には、Wilcoxon の順位和検定を用いた。脊索腫発生リスク、pathway 解析の *probability*、*Brachyury* 発現とリン酸化 S6 蛋白の陽性率の差の検定に関しては、Fisher's exact test を用いて検定を行った。

統計学的計算には、JMP Pro v.11 (SAS Institute, North Carolina, USA)を使用した。p 値が 0.05 より小さい場合を有意差有りとした。

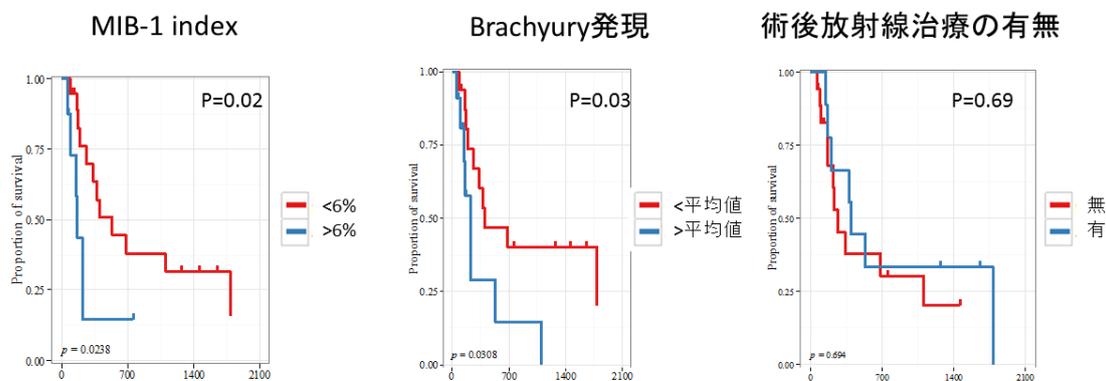
## V. 結果

### A. PFS に影響する因子の検討

PFS に影響を与える可能性がある因子として、年齢、術後放射線治療の有無、既往手術の回数、手術方法、MIB-1 index、*Brachyury* 発現量を挙げた。年齢は、手術時における年齢、手術回数は、検体採取時の手術が初回手術を起点として何回目であるか、手術方法は、開頭手術か内視鏡下手術かとした。次

に、各因子について、連続変数の因子の場合は cut-off 値を設けて 2 群に分けた。年齢に関しては、平均年齢が 52.4 歳であることより、50 歳を cut-off 値とした。手術回数に関しては、平均値に基づき 5 回を cut-off 値とした。MIB-1 index に関しては、6% を cut-off 値とすると 6% より高い群で有意に tumor doubling time が短いという報告<sup>39</sup>に基づき、6% を cut-off 値とした。*Brachyury* 発現に関しては、値は正常脳での発現に対する相対値で表しているが、平均値である 1249 を cut-off 値とした。

各因子により分けられた 2 群の PFS を、Kaplan-Meier 生存曲線にて示した (図 11)。2 群の PFS を log-rank test にて各因子ごとに比較し、単変量解析を行った。有意な差を認めたのは、MIB-1 index、*Brachyury* 発現で分けた場合であり、MIB-1 index が 6% より高い群 ( $p=0.02$ )、*Brachyury* 発現が平均値より高い群 ( $p=0.03$ ) で有意に PFS が短かった。



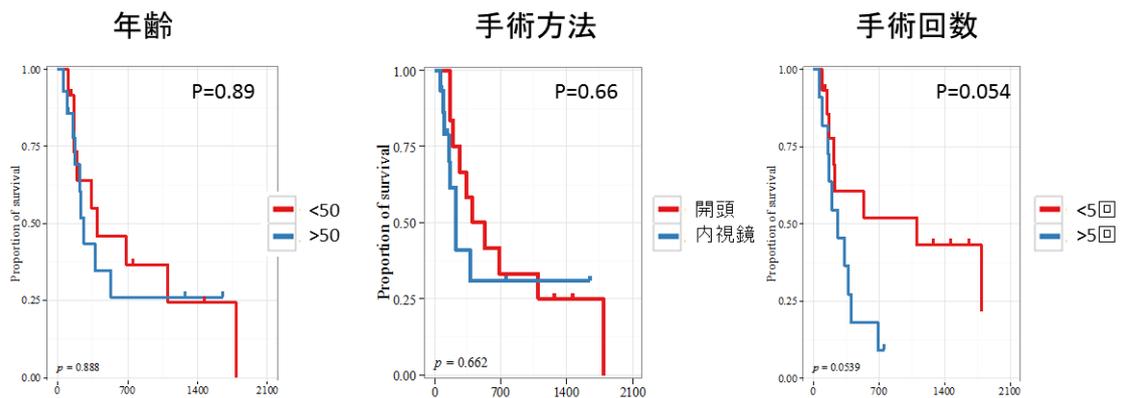


図 11 6つの因子に関する単変量解析の結果

PFSに影響すると思われる6つの因子に関して、全検体を2群に分けた。Cut-off値は、MIB-1 indexは6%、*Brachyury*発現は平均値、年齢は50歳、手術回数は5回とした。分けられた2群のPFSをlog-rank testにて比較すると、有意な差が得られたのは、MIB-1 index ( $p=0.02$ )、*Brachyury*発現 ( $p=0.03$ ) で分けた場合であった。

続いて、交絡因子を除いた上でPFSに対する各因子の影響を解析すべく、

Cox 比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った (表 5)。

Factors	n (%)	ハザード比	95%信頼区間	P-value
Age (>50 歳)	17 (63%)	2.8	0.8-10.5	0.12
術後放射線治療(+)	9 (33%)	1.6	0.5-5.4	0.43
手術回数 (≥5 回)	15 (56%)	14.4	2.8-103.3	0.0009*
手術方法 (開頭)	11 (41%)	2.5	0.5-19.5	0.3
MIB-1 index (≥6%)	12 (44%)	3.8	0.5-41.6	0.22
<i>Brachyury</i> 発現 (>平均値)	8 (30%)	9	1.9-48.1	0.005*

表 5 Cox 比例ハザードモデルを用いた多変量解析の結果

PFS に影響を与えると思われる因子に関してそれぞれ 2 群に分け、多変量解析を行った。独立した予後因子として有意であったのは、手術回数 (p=0.0009) と *Brachyury* 発現 (p=0.005) であり、手術回数が多い群および *Brachyury* 発現が高い群で有意に PFS が短かった。

独立した予後因子として有意であったのは、手術回数と *Brachyury* 発現であり、手術回数が多い群 (p=0.0009、ハザード比 14.4)、*Brachyury* 発現が高い群 (p=0.005、ハザード比 9.0) で、有意に PFS が短かった。手術回数、*Brachyury* 発現が、頭蓋底脊索腫における独立した予後因子であることが示唆された。

単変量解析、多変量解析共に有意な予後因子であった、*Brachyury* 発現で分けた場合の Kaplan-Meier 生存曲線を図 12 に示す。

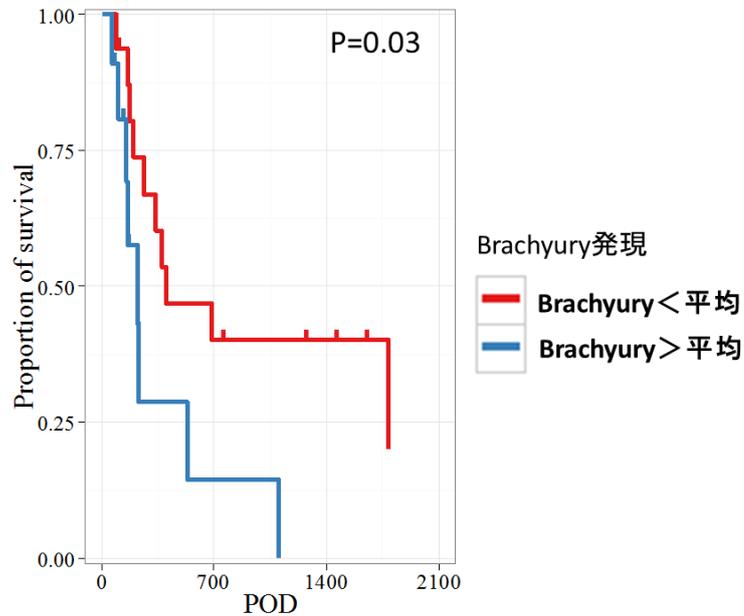


図 12 *Brachyury* 発現と PFS の関係

*Brachyury* 発現の平均値を cut-off 値として 2 群に分け、各群の PFS に関して生存曲線を作成した。*Brachyury* 発現が高い群で、有意に PFS が短かった ( $p=0.03$ , log-rank test)。

## B. *Brachyury* 遺伝子の発現に関わる因子の解析

*Brachyury* 発現が脊索腫の臨床的予後に相関することが確認されたが、続いて *Brachyury* 発現を上昇させる要因が何かを明らかにすべく、解析を進めた。

*Brachyury* 発現に影響を与えている可能性がある要因として以下の 3 つを候補として挙げ、それぞれに対して検討を行った。

- Brachyury 遺伝子のコピー数増幅
- Brachyury 遺伝子内の SNP の遺伝子型
- *Brachyury* 発現に関与する転写制御因子

## 1. Brachyury 遺伝子のコピー数増幅

Brachyury 遺伝子のコピー数を確認すべく、腫瘍検体および対応する血液検体の DNA を用いてコピー数解析を行った。正常の遺伝子は相同染色体を持つためコピー数は 2 コピーであるが、様々ながんにおいて 2 コピー以上ある遺伝子が存在し、コピー数増幅ががん遺伝子の活性化に関わっていることが知られている<sup>40</sup>。

今回、コピー数増幅の定義として、正常の 2 コピーに対し、明らかにコピー数が多いと判断される 2.5 コピー以上を、コピー数増幅ありとした。

この条件において、腫瘍 DNA における Brachyury 遺伝子のコピー数解析では、27 検体中 12 検体の 44%においてコピー数増幅を認めた（平均値±SD=2.6±0.6）。一方血液 DNA では、全て正常の 2 コピーであり、コピー数増幅を認めなかった（平均値±SD=2.0±0.1）。腫瘍検体と血液検体におけるコピー数には、有意差を認めることを確認した（ $p=5 \times 10^{-5}$ , Student's *t*-test）。以上より、今

回解析した脊索腫において、腫瘍細胞のみの異常を意味する体細胞性コピー数増幅を、半数弱に認めることが分かった（図 13）。

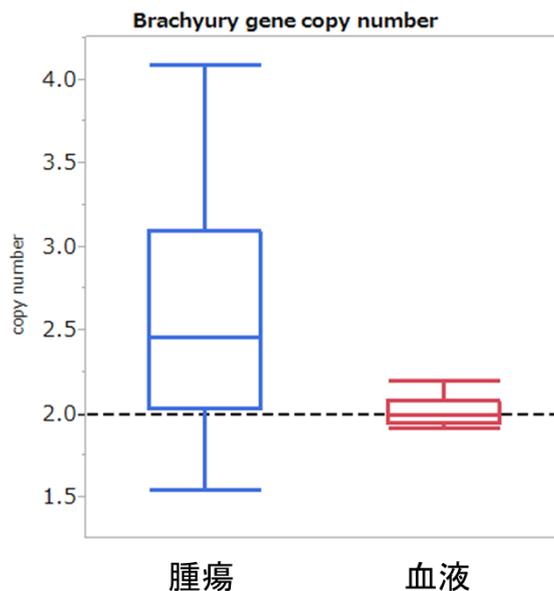


図 13 脊索腫における Brachyury 遺伝子のコピー数解析

腫瘍検体の 44% で、コピー数増幅を認めるのに対し、対応する血液検体では全てコピー数増幅を認めなかった。脊索腫の一部において、体細胞性コピー数増幅を認めることが分かった ( $p=5 \times 10^{-5}$ , Student's *t*-test)。箱ひげ図の箱は、中央値と 4 分位点を、ひげは最大値と最小値を示す。

この結果の再現性を確認する目的で、Brachyury 遺伝子内の別の場所をターゲットにしたプライマーを作成し、同条件にてコピー数解析を行った。2 種類のプライマーによるコピー数をそれぞれ横軸と縦軸に設定し、各検体におけるコピー数の結果をプロットすると、2 つのプライマーによる解析結果には強い

相関を認め（相関係数  $R=0.76$ 、 $p=3.4 \times 10^{-6}$ ）、コピー数解析の結果に再現性があることを確認した（図 14）。

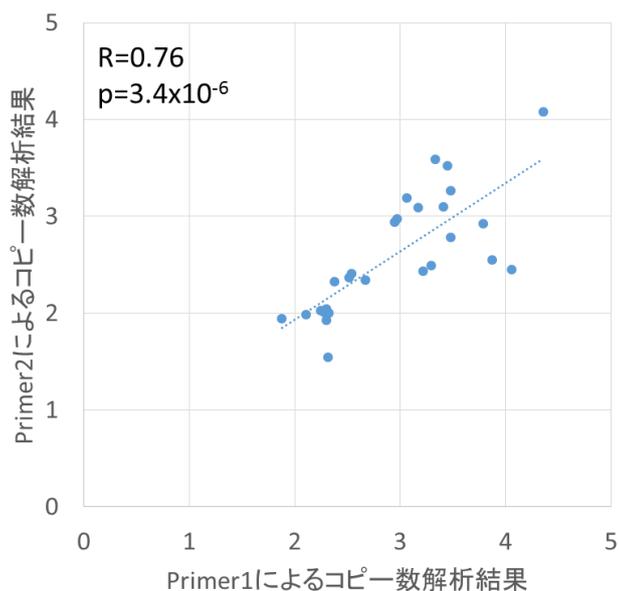


図 14 2種類のプライマーによるコピー数解析結果の比較

横軸を、primer1によるコピー数解析の結果、縦軸を primer2によるコピー数解析の結果とし、全検体の結果をプロットした。2種類のプライマーによる解析結果の間には強い相関を認め（ $R=0.76$ ）、解析結果の再現性が確認された。

続いて、Brachyury 遺伝子のコピー数増幅が *Brachyury* 発現上昇に関わっているかを確認するべく、コピー数増幅と *Brachyury* 発現との関連を検討した。横軸をコピー数、縦軸を *Brachyury* 発現の高さとして全症例をプロットすると、両者の間で正の相関を認めた（相関係数  $R=0.61$ 、 $p=0.0002$ ）。（図 15）

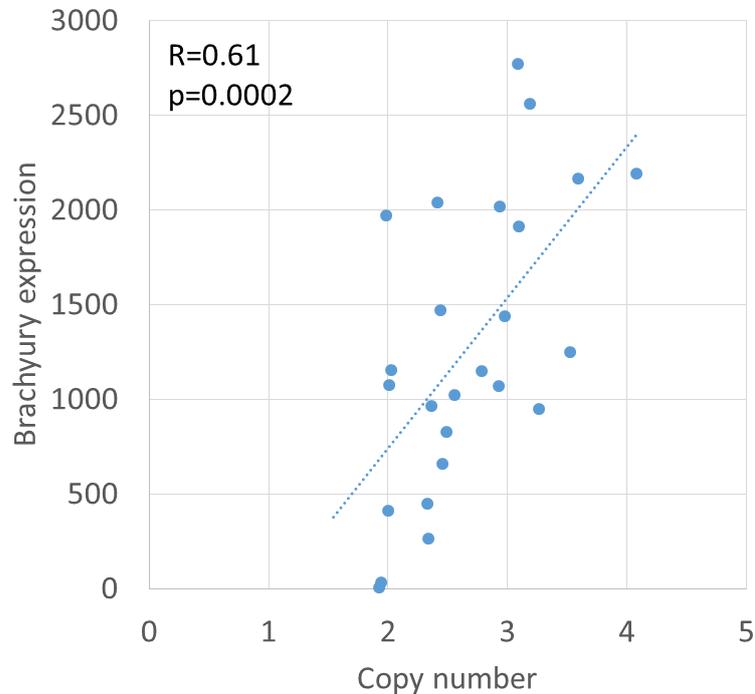


図 15 *Brachyury* 遺伝子のコピー数と発現の関係

横軸を腫瘍 DNA における *Brachyury* 遺伝子のコピー数、縦軸を *Brachyury* 発現とし、全検体の結果をプロットした。両者の間には正の相関を認め ( $R=0.61$ )、コピー数増幅が発現上昇に関与していることが示唆された。

コピー数増幅と発現との関係を統計学的に確認すべく、コピー数 2.5 以上のものをコピー数増幅有りとする定義の下、コピー数増幅の有無で 2 群に分けた。両群の *Brachyury* 発現に対して Wilcoxon 検定を行うと、コピー数増幅がある群はない群に対し、*Brachyury* 発現が有意に高いことを確認した ( $p=0.0083$ ) (図 16)。

以上より、頭蓋底脊索腫において *Brachyury* 遺伝子の体細胞性コピー数増幅を認め、コピー数は *Brachyury* 発現に関与していることが示唆された。

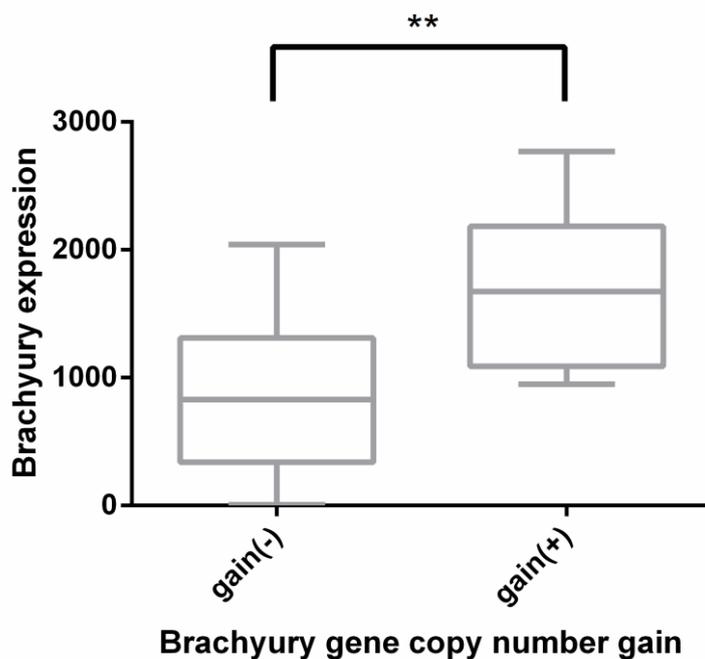


図 16 *Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅の有無と *Brachyury* 発現の関係

*Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅の有無で 2 群に分け、各群における *Brachyury* 発現の中央値と 4 分位点を箱で、最大値と最小値をひげで示した。コピー数増幅がある群で、有意に *Brachyury* 発現が高いことを確認した ( $p=0.0083$ )。

## 2. *Brachyury* 遺伝子内の SNP rs2305089

*Brachyury* 遺伝子内の SNP rs2305089 における遺伝子型が、*Brachyury* 発現に関与しているとする報告がある<sup>36</sup>。この SNP が A アリルのホモ接合型である

群が、ヘテロ接合型である群よりも *Brachyury* 発現が高いと報告されている。

また、この SNP の G アリルから A アリルへの変異が、脊索腫発生のリスクであると報告されている。G→A のアリル頻度が、脊索腫患者でコントロール群と比べ有意に高かったことが根拠となっている<sup>36</sup>。

この SNP rs2305089 に関して、我々の検体を用いて解析を行った。19 患者 27 検体の内、再発検体を除いた 19 患者 19 検体に関して、SNP の遺伝子型をダイレクトシーケンス法にて解析した。結果は、G/G 型；10 例（56%）、G/A 型；8 例（44%）、A/A 型；1 例（6%）であった。

まず、遺伝子型と *Brachyury* 発現の関連に関しては、G/G 型；1241±719、G/A 型；1124±785、A/A 型；1068 で、各遺伝子型における *Brachyury* 発現に差はなく（ $p=0.69$ , Wilcoxon 検定）、遺伝子型と *Brachyury* 発現の関連は否定的であった（図 17）。

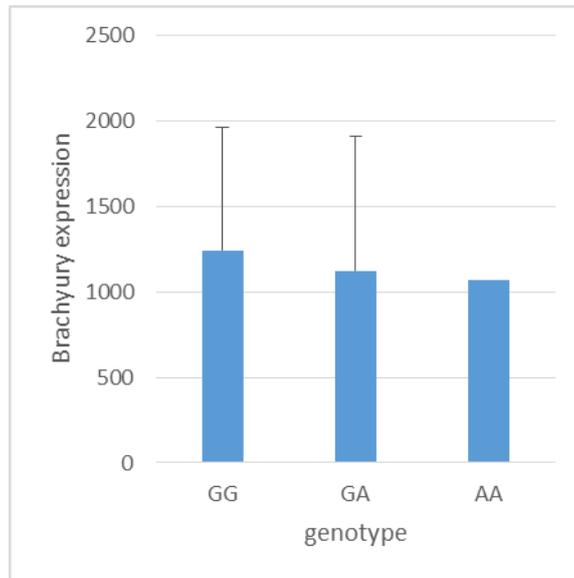


図 17 SNP の遺伝子型と *Brachyury* 発現の関係

各遺伝子型における *Brachyury* 発現の平均値と SD を示す。SNP rs2305089 の遺伝子型と *Brachyury* 発現の間に関連は認めなかった ( $p=0.69$ )。

続いて、遺伝子型と脊索腫発生リスクに関して解析を行った。健常対照群として、NCBI データベースから得た HapMap project のデータにおける健常日本人 172 人のデータを用いた。本研究で解析した脊索腫患者と健常日本人コントロールにおける、SNP rs2305089 の遺伝子型の割合を図 18 に示す。脊索腫発生のリスクファクターとされているのは A アリルを持つ頻度であるので、A アリル頻度を以下のように計算した。

$$A \text{ アリル頻度 (\%)} = A/A \text{ の頻度} + (G/A \text{ の頻度}) \times 1/2$$

健常対照群における同 SNP の A アリル頻度は 31% であるのに対し、我々の

脊索腫群における A アリル頻度は 33%であり、両者の間に有意差は認めなかった ( $p=0.76$ , オッズ比=1.1, 95%信頼区間=0.6-1.99, Fisher's exact test)。少なくとも我々の検討においては、SNP rs2305089 の遺伝子型は脊索腫のリスク因子である可能性は低いと思われた。

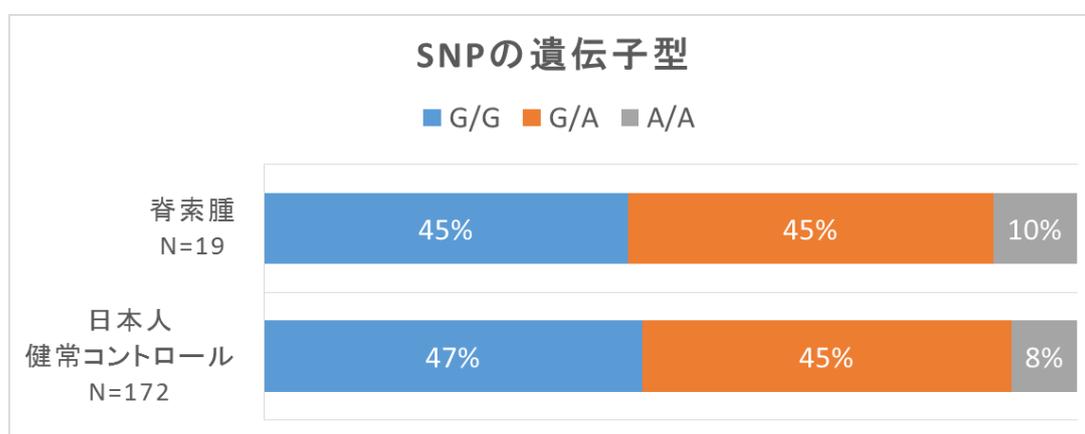


図 18 SNP rs2305089 の遺伝子型の頻度

本研究で解析した脊索腫患者と日本人の健常コントロールにおける、遺伝子型の頻度の比較。健常対照群における同 SNP の A アリル頻度は 31%であるのに対し、我々の脊索腫群における A アリル頻度は 33%であり、両者の間に有意差は認めなかった ( $p=0.76$ , オッズ比=1.1, 95%信頼区間=0.6-1.99)。

### 3. *Brachyury* 発現に関わる転写制御因子の網羅的解析

*Brachyury* 発現にコピー数増幅が関わっていることが示唆されたが、発現に関わる他の因子として何らかの転写制御因子の存在を疑い、マイクロアレイにて網羅的な遺伝子発現解析を行った。まず、*Brachyury* 発現が高い 4 検体と低

い4検体をそれぞれ高発現群、低発現群とし、マイクロアレイにて23,157種の遺伝子に関して各検体での発現解析を行った。

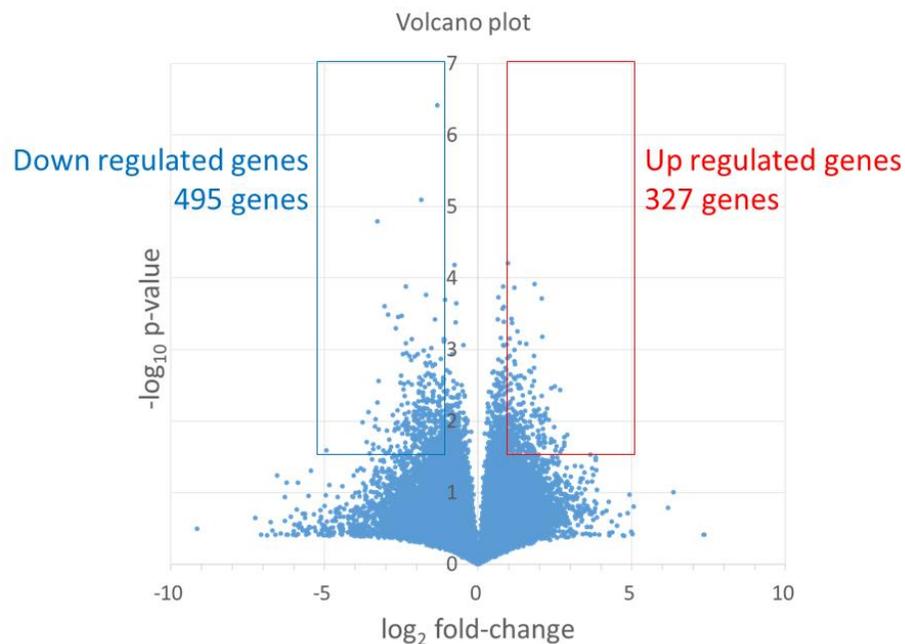
全遺伝子に関して、各群での発現の平均値を算出し、比較を行った。各遺伝子発現における *Brachyury* 低発現群に対する高発現群の比を fold change (FC) とした。また、全遺伝子に関して2群の間で Student's *t*-test を行い、p値を算出した。横軸を  $\log_2(\text{FC})$ 、縦軸を  $-\log_{10}(\text{p-value})$  にとり、全遺伝子プローブにおける結果をプロットした (volcano plot) (図 19)。この図で横軸が正の値の範囲は、*Brachyury* 高発現群において発現が上昇している遺伝子群、負の値の範囲は発現が低下している遺伝子群を意味している。全遺伝子プローブの内、*Brachyury* 高発現群と低発現群での発現の差が有意なものを抽出するため、FCの絶対値が2倍以上かつ  $p < 0.05$  を満たす遺伝子プローブのみを抽出した。抽出された遺伝子プローブには、同一の遺伝子を異なるプローブで検出しているものも含まれるため、ターゲットとする遺伝子が重複しているプローブを除くと、*Brachyury* 高発現群で発現が上昇している遺伝子は327種類、低下している遺伝子は495種類認めた。これらの遺伝子を、属する既知の pathway に基づいて、KEGG pathway database 上で分類を行った

(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)。リストアップされた pathway が有意

であるかは、以下のように p 値を算出して評価した。まず 2×2 の表を作成し、行を抽出された遺伝子とされていない遺伝子の 2 行、列を pathway に属する遺伝子と属さない遺伝子の 2 列に設定して、該当する遺伝子の数を表に埋めた。この 2×2 の表を用いて、Fisher's exact test にて検定を行い、p 値を算出した。

分類される遺伝子数が多い pathway をリストアップすると、発現が上昇している遺伝子群において 8 種の遺伝子 (*BCL2L1*、*CHRM1*、*ITGA3*、*ITGA6*、*LAMA4*、*MDM2*、*NRAS*、*RHEB*) が属する PI3K/Akt pathway が、有意に相関する pathway として最上位に挙げられた (p=0.03)。この pathway は多くの悪性腫瘍において増殖生存シグナルを伝える重要な pathway であり、*Brachyury* 高発現群でこの pathway が重要な働きをしている可能性が示唆された。その他、Pathways in cancer、Cell cycle、Regulation of actin cytoskeleton などが有意な pathway として挙げられた。上位に上がった pathway のみを図 19 に示す。一方、*Brachyury* 高発現群にて発現が低下している遺伝子は 495 種類抽出され、有意な pathway として Calcium signaling pathway、MicroRNAs in cancer、cAMP signaling pathway などが挙げられた (図 19)。抽出された全遺伝子プローブのうち、p<0.01 のものをさらに抽出して表 6、表 7 に提示する。p<0.01 とした時

に、*Brachyury* 高発現群で発現が上昇している遺伝子は 68 種、低下している遺伝子は 87 種認められた。この条件において KEGG pathway database 上で分類を行った場合でも、*Brachyury* 高発現群で発現が上昇している遺伝子で PI3K/Akt pathway に属する遺伝子は 4 種認め (*CHRM1*、*ITGA3*、*MDM2*、*RHEB*)、関連が有意な pathway であることに変わりなかった ( $p=0.006$ )。



### Up regulated genes

KEGG pathway	遺伝子数	p値
PI3K-Akt signaling pathway	8	0.006*
Pathways in cancer	8	0.007*
Cell cycle	6	0.001*
Thyroid hormone signaling pathway	5	0.001*
Regulation of actin cytoskeleton	5	0.035*
MAPK signaling pathway	5	0.075
Proteoglycans in cancer	5	0.032*
Others	285	
<b>total</b>	<b>327</b>	

### Down regulated genes

KEGG pathway	遺伝子数	p値
Metabolic pathways	8	0.07
Pathways in cancer	8	0.44
Calcium signaling pathway	7	0.01*
MAPK signaling pathway	7	0.09
MicroRNAs in cancer	6	0.04*
cAMP signaling pathway	6	0.04*
Dilated cardiomyopathy	6	0.01*
Oxytocin signaling pathway	6	0.01*
Others	441	
<b>total</b>	<b>495</b>	

図 19 マイクロアレイにて解析した全プローブの Fold change と p-value

*Brachyury* 高発現群と低発現群における各遺伝子発現を比較し、横軸を  $\log_2(\text{FC})$ 、縦軸を  $-\log_{10}(\text{p-value})$  として全プローブの結果をプロットした volcano plot 図。横軸が正の値の範囲は、*Brachyury* 高発現群において発現が上昇している遺伝子群、負の値の範囲は発現が低下している遺伝子群を意味する。

### Up-regulated genes

*	Gene Symbol	p 值	FC	KEGG Pathway
	KRT8	0.003684	6.36	Others
	SMPDL3B	0.00329	5.63	Others
	TMEM196	0.00963	4.91	Others
	KIF26B	0.006698	4.73	Others
	SHROOM4	0.00952	4.63	Others
	TMEM165	0.007818	4.55	Others
	PGR	0.008693	4.55	Oocyte meiosis
	HTATIP2	0.00066	4.24	Others
	LINC00858	0.008384	4.21	Others
	KCNAB1	0.000193	4.18	Others
	TAF11	0.009558	4.03	Basal transcription factors
*	ITGA3	0.00842	4	PI3K-Akt signaling pathway
	CTAGE5	0.006755	3.94	Others
	HPS5	0.007136	3.76	Others
	WNK1	0.008493	3.62	Others
	BCL2L15	0.007825	3.62	Others
	GRK6	0.000122	3.56	Chemokine signaling pathway
	C15orf57	0.001219	3.55	Others
	EBF2	0.00704	3.53	Others
	CHRM1	0.004702	3.51	Calcium signaling pathway
	FAM160B1	0.002743	3.51	Others
	RHOBTB3	0.005748	3.37	Others
*	MDM2	0.00846	3.33	PI3K-Akt signaling pathway
	RAVER2	0.003937	3.19	Others
	AKAP13	0.001985	3.17	Others
	SEPT5-GP1BB	0.000832	2.97	Others
	B3GNT5	0.007135	2.87	Metabolic pathways
	STX3	0.002508	2.85	SNARE interactions in vesicular transport
	EFHD2	0.00996	2.79	Others
	KIAA0226	0.004395	2.74	Others
	ATP6V1B2	0.008278	2.73	Metabolic pathways
	HTATIP2	0.009071	2.64	Others
	TNFRSF10A	0.005831	2.63	Cytokine-cytokine receptor interaction

	ILDR2	0.002303	2.63	Others
	PAG1	0.007495	2.62	Others
	DSG2	0.007635	2.58	Arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy
	POMGNT1	0.000809	2.56	Other types of O-glycan biosynthesis
	TFAM	0.003133	2.51	Huntington's disease
	RNF207	0.003444	2.5	Others
*	RHEB	0.005813	2.48	PI3K-Akt signaling pathway
	SPAG9	0.002348	2.46	Others
	MALAT1	0.000561	2.42	Others
	LRRC37A5P	0.00307	2.41	Others
	ZSWIM6	0.008082	2.39	Others
	NIPBL	0.008242	2.34	Others
	RHOBTB3	0.007502	2.32	Others
	FUCA2	0.002583	2.31	Other glycan degradation
	MEAF6	0.001607	2.29	Others
	RRAGC	0.000137	2.28	mTOR signaling pathway
	CACUL1	0.001007	2.28	Others
	FAM169A	0.001455	2.25	Others
	IRAK1	0.002465	2.24	NF-kappa B signaling pathway
*	PPP2R2C	0.007146	2.24	PI3K-Akt signaling pathway
	HP1BP3	0.00857	2.2	Others
	ARL17A	0.004766	2.18	Others
	RAB9B	0.009138	2.17	Measles
	CD151	0.009077	2.16	Others
	CMTM3	0.006659	2.15	Others
	RBMS2	0.000427	2.14	Others
	TES	0.009979	2.14	Others
	PRPF40A	0.000368	2.13	Spliceosome
*	MDM2	0.009349	2.1	PI3K-Akt signaling pathway
	ARL2	0.009996	2.09	Others
	SNRPA1	0.003669	2.09	Spliceosome
	PPFIBP1	0.002995	2.09	Others
	GALE	0.002204	2.07	Metabolic pathways
	MACF1	0.008952	2.07	Others
	DUSP3	0.005389	2.05	MAPK signaling pathway

MALAT1	0.001233	2.05	Others
ATG12	0.000694	2.05	FoxO signaling pathway
C6orf106	0.00567	2.03	Others
COX14	0.008157	2	Others

\*PI3K/Akt signaling pathway

表 6 *Brachyury* 高発現群で発現が上昇している遺伝子プローブ一覧

*Brachyury* 高発現群で発現が上昇している遺伝子プローブの内、 $\log_2(\text{FC}) > 1$  かつ  $P < 0.01$  を満たす遺伝子プローブのみを抽出し、fold change が高い順に並べた。抽出された 68 個の遺伝子プローブの内、PI3K/Akt pathway に属する遺伝子プローブは 5 個 4 種類認め、\*マークにて示した。抽出された遺伝子群と PI3K/Akt pathway への関連は、有意なものであった ( $p=0.03$ )。

### Down-regulated genes

*	Gene Symbol	p 值	FC	KEGG Pathway
	CCDC67	0.007543	0.08	Others
	HPRT1	0.005482	0.1	Purine metabolism
	SLMAP	0.000248	0.12	Others
	CAMK1D	0.000323	0.13	Oxytocin signaling pathway
	CYP4B1	0.008201	0.15	Others
	SDR42E1	0.006998	0.16	Others
	TMCO3	0.000348	0.16	Others
	MCF2	0.000338	0.18	Others
	VWA3B	0.003598	0.18	Others
	KIAA1211	0.004439	0.19	Others
	LOC728061	0.001104	0.2	Others
	C22orf15	0.005608	0.2	Others
	SCN2B	0.002851	0.21	Others
	SYNJ2	0.001223	0.21	Inositol phosphate metabolism
	FHAD1	0.003081	0.23	Others
	PDX1	0.008559	0.23	Insulin secretion
	NTNG1	0.008246	0.23	Axon guidance
	LINC00598	0.008609	0.24	Others
	IGK	0.009763	0.24	Others
	PROSER2	0.001251	0.24	Others
	ZNF469	0.008946	0.24	Others
	VPS13A-AS1	0.00997	0.24	Others
	KRT35	0.007462	0.25	Others
	FKBP7	0.005319	0.26	Others
	TENM3	0.002985	0.26	Others
	LINC00543	0.009692	0.26	Others
	TRIM58	0.003785	0.26	Others
	FKBP7	0.006954	0.26	Others
	DOK5	0.004041	0.26	Others
	PRSS33	0.002446	0.27	Others
	CLIP3	0.006569	0.27	Others
	MYF6	0.008282	0.27	Others
	PDZD2	0.003107	0.27	Others

SYNJ2	8.11E-06	0.28	Metabolic pathways
C15orf41	0.005171	0.28	Others
NRP1	0.002688	0.28	Axon guidance
CREB3L3	0.007276	0.29	PI3K-Akt signaling pathway
ADAMTS13	0.003936	0.29	Others
NEBL	0.006864	0.29	Others
GAREML	0.001025	0.29	Others
IGHA1	0.005102	0.3	Others
GRIA2	0.006715	0.3	cAMP signaling pathway
LMCD1	0.003327	0.3	Others
RHPN1	0.002334	0.31	Others
CAMK1D	0.008185	0.31	Others
C9orf57	0.001669	0.31	Others
PALMD	0.005473	0.31	Others
CACNA2D3	0.00662	0.32	MAPK signaling pathway
CAMK1D	0.004892	0.32	Oxytocin signaling pathway
DDX11L2	0.00787	0.32	Others
IFT140	0.002134	0.32	Others
CD47	0.009381	0.33	ECM-receptor interaction
RALGPS1	0.008952	0.33	Others
PRSS23	0.008012	0.33	Others
MR1	0.005058	0.34	Others
MIR3656	0.001508	0.34	Others
USP6NL-IT1	0.000959	0.35	Others
FARP1	0.002422	0.35	Others
PDE4DIP	0.005416	0.36	Others
PLEKHG4B	0.003873	0.36	Others
SPATA13	0.004503	0.36	Others
LINC00085	0.008329	0.36	Others
SEC16B	0.005336	0.37	Others
TSPYL1	0.003796	0.37	Others
PDLIM5	0.000379	0.38	Others
BNC2	0.009763	0.38	Others
ERG	0.008035	0.39	Transcriptional misregulation in cancer
GPR26	3.82E-07	0.4	Others

CEP41	0.00295	0.4	Others
PARD3	0.006091	0.41	Rap1 signaling pathway
TGM4	0.004554	0.41	Others
NLRP4	0.009963	0.41	Others
PHLDB3	0.008122	0.41	Others
PARD3-AS1	0.005462	0.42	Others
RNF152	0.006156	0.42	Others
H1FO	0.00502	0.43	Others
RFX3	0.009895	0.43	Others
CXorf67	0.009424	0.43	Others
SMARCA2	0.003128	0.43	Others
FBXO28	0.008641	0.44	Others
CARD6	0.007252	0.44	NOD-like receptor signaling pathway
PDLIM5	0.002701	0.45	Others
PLA2G12B	0.00245	0.46	Metabolic pathways
TGOLN2	0.00295	0.46	Others
FMNL1	0.004817	0.46	Others
DDX19A	0.00865	0.46	Others
SMARCA2	0.000777	0.46	Others
IER5L	0.002616	0.46	Others
ASMTL	0.000722	0.47	Others
MYCN	0.008433	0.47	Transcriptional misregulation in cancer
ASMTL	0.000201	0.48	Others
ZNF880	0.008263	0.48	Others
LINC00163	0.006683	0.49	Others

表 7 *Brachyury* 高発現群で、発現が低下している遺伝子プローブ一覧

*Brachyury* 高発現群で発現が低下している遺伝子プローブの内、 $\log_2(\text{FC}) \leq 1$  かつ  $P < 0.01$  を満たす遺伝子プローブのみを抽出し、fold change が低い順に並べた。

#### 4. PI3K/Akt pathway の活性化

今回のマイクロアレイによる網羅的発現解析にて、*Brachyury* 高発現群で PI3K/Akt pathway の関連が示唆された。続いて、この pathway が *Brachyury* 高発現群で有意に活性化しているかを検証した。

PI3K/Akt pathway は多くのがん種で活性化しており、がんの生存、増殖に関わっていることが知られている<sup>41-43</sup>。ホスファチジルイノシトール3キナーゼ (PI3K) は、細胞膜の構成成分であるイノシトールリン脂質をリン酸化する酵素で、産生されたホスファチジルイノシトール3リン酸 (PIP3) に、Akt が結合することでリン酸化され活性化する。活性化された Akt がこの pathway の中心的役割を果たし、mTORをはじめ様々な因子をリン酸化して活性化することで、細胞増殖などに関わる。この pathway の活性化を確認する指標として、リン酸化 S6 リボソーム蛋白の発現を用いた。S6 リボソーム蛋白は、PI3K/Akt pathway のリン酸化カスケードの最下流に位置し、リン酸化により活性化されることで細胞増殖に直接関わる。S6 リボソーム蛋白の活性化は、上流に位置する PI3K/Akt pathway の活性化を反映するものと考えられている<sup>44,45</sup>。リン酸化により活性化された S6 リボソーム蛋白の発現を、免疫染色にて確認した。細胞質が強く染色されるものを陽性とし、染色の有無で2群に分けた (図 20)。

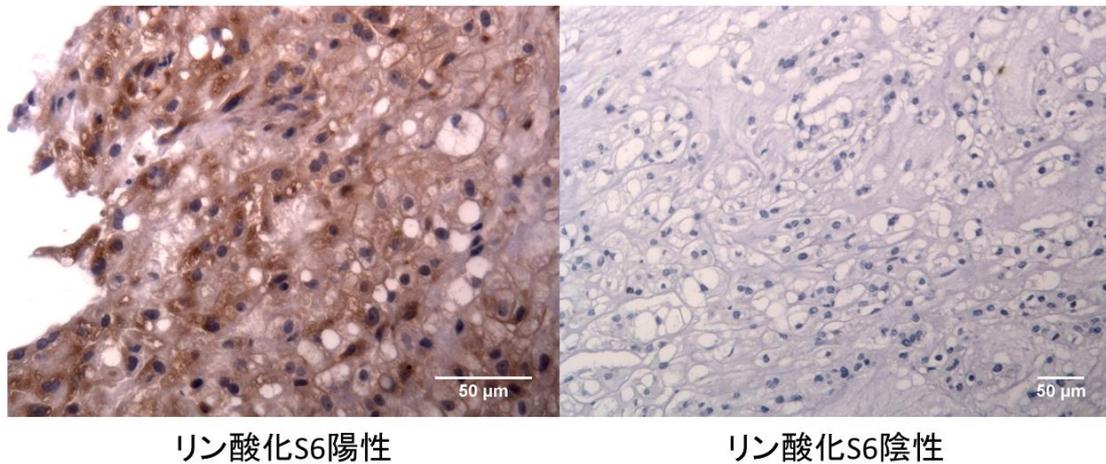


図 20 リン酸化 S6 リボソーム蛋白の免疫染色

PI3K/Akt pathway の活性化の指標として、リン酸化 S6 リボソーム蛋白の免疫染色を行った。陽性と陰性の代表例を示す。細胞質に局在するため、細胞質が染色されるものが陽性である。

*Brachyury* 高発現群と低発現群におけるリン酸化 S6 染色の陽性率は、それぞれ 90%、38%であり、*Brachyury* 高発現群で有意に高かった ( $p=0.014$ 、Fisher's exact test) (図 21)。*Brachyury* 高発現群において、低発現群と比較し有意に PI3K/Akt pathway が活性化されていることが示唆された。

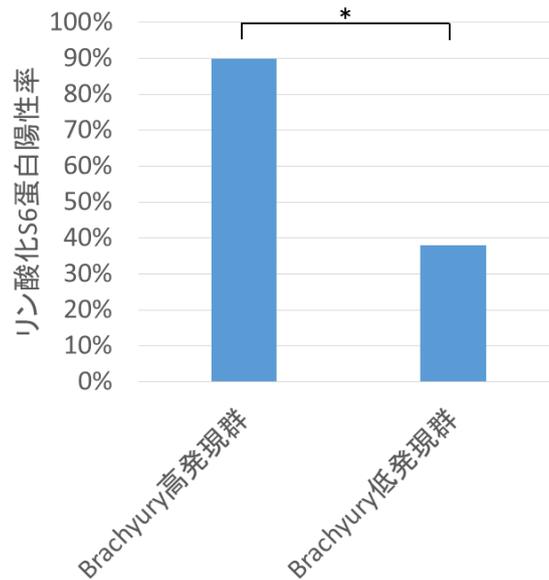


図 21 *Brachyury* 発現とリン酸化 S6 蛋白陽性率

*Brachyury* 高発現群と低発現群におけるリン酸化 S6 染色の陽性率は、それぞれ 90%、38%であり、*Brachyury* 高発現群で有意に高かった ( $p=0.014$ )。

さらに、*Brachyury* と PI3K/Akt pathway が直接関連している可能性を検討すべく、*Brachyury* とリン酸化 S6 蛋白の蛍光二重染色を行った。*Brachyury* が発現している細胞の分布とリン酸化 S6 蛋白が発現している細胞の分布は、概ね一致しているものと思われた (図 22)。一方、強拡大にて個々の細胞を観察すると、*Brachyury* とリン酸化 S6 蛋白が同時に染色される細胞を認めると共に、どちらか一方のみ染色される細胞も多く混在していることが確認された (図 23)。以上より、*Brachyury* 高発現群で PI3K/Akt pathway が活性化されているこ

とが示唆されたが、直接の関連を示すには至らなかった。

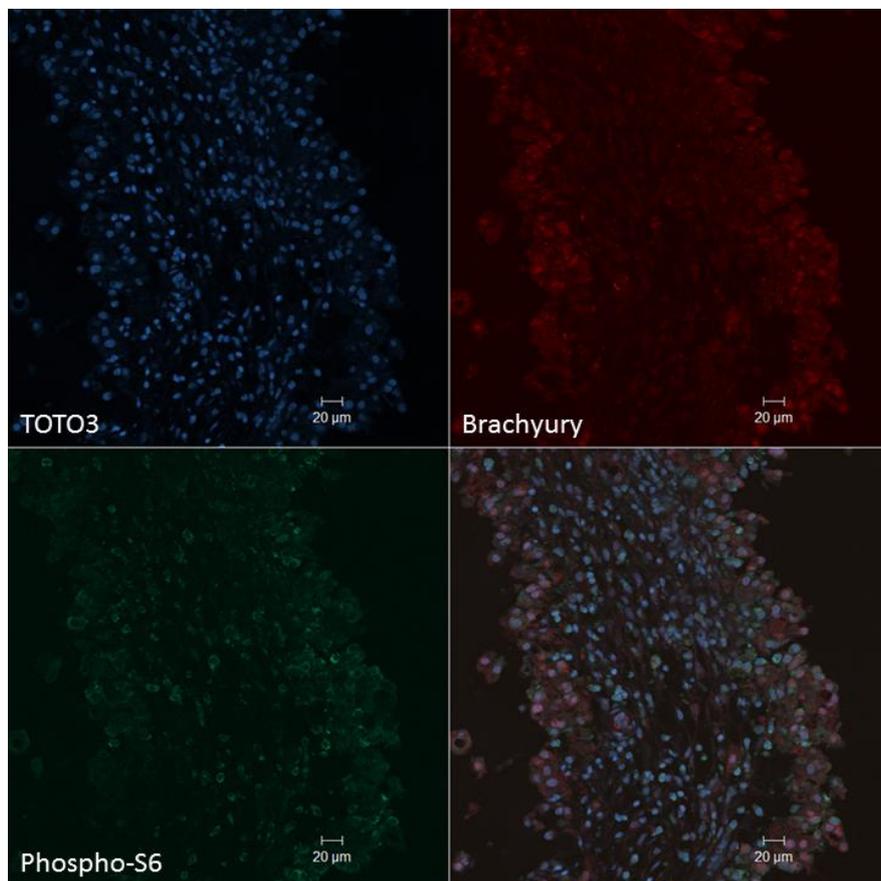


図 22 Brachyury とリン酸化 S6 リボソーム蛋白の二重蛍光染色

Brachyury の発現分布とリン酸化 S6 リボソーム蛋白の発現分布は、概ね一致しているものと思われた。Brachyury は核に局在し、リン酸化 S6 蛋白は細胞質に局在する。

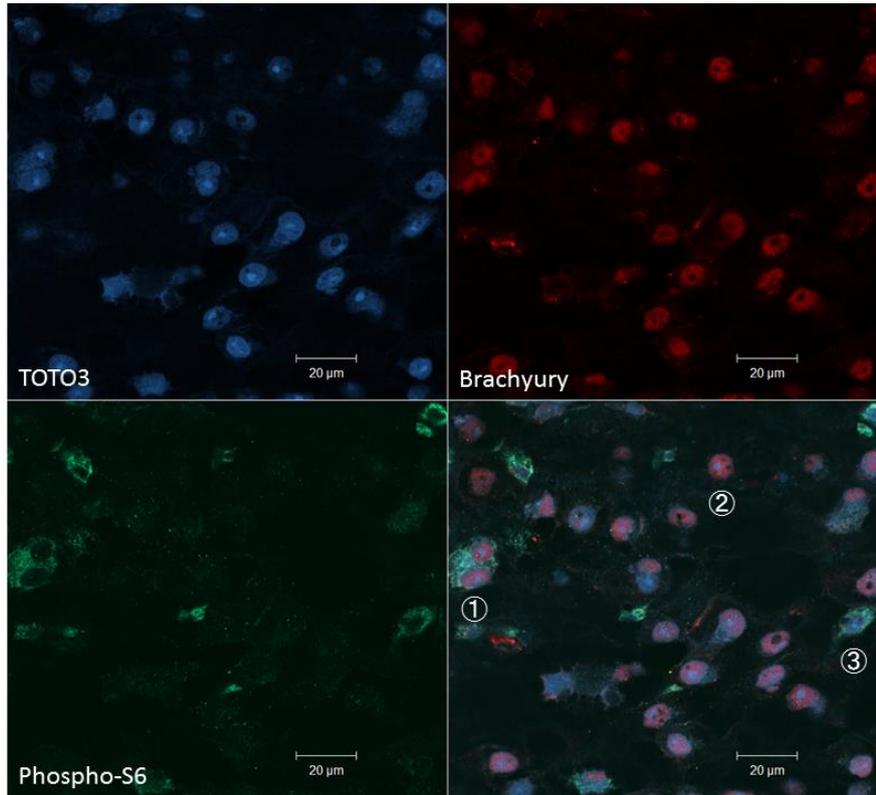


図 23 Brachyury とリン酸化 S6 リボソーム蛋白の二重蛍光染色の拡大

両方が共に発現している細胞もあるが、どちらか一方のみの発現を認める細胞も多く混在している。①；両方の発現を認める細胞。②；Brachyury 発現のみ認める細胞。③；リン酸化 S6 蛋白のみ発現を認める細胞。

## VI. 考察

### A. 本研究の意義

本研究にて、*Brachyury* 遺伝子の発現が脊索腫の臨床的予後と相関し、その発現には体細胞性コピー数増幅が関連していることが示唆された。本研究の特徴は、*Brachyury* 発現を mRNA レベルで定量的に評価した点にある。我々の解析では、*Brachyury* 発現は全検体において正常脳よりも高く、定量的評価により、発現がより高い腫瘍と低い腫瘍とでの比較が可能であった。免疫染色による定性的な評価により、*Brachyury* 発現と脊索腫の悪性度との相関を示す報告が過去にある<sup>29</sup>。この蛋白レベルでの結果を、我々の mRNA レベルでの解析結果は支持すると共に、蛋白レベルで *Brachyury* 陽性とされる腫瘍検体間においても、発現の程度により悪性度が異なることが我々の結果により示唆された。

さらに、PI3K/Akt pathway が *Brachyury* 高発現腫瘍において活性化されていることが示唆された。脊索腫においてこの pathway が活性化しているとする報告は過去にあるが、*Brachyury* 発現との関連は報告されていない。脊索腫において PI3K/Akt pathway が重要な働きをしているとする過去の報告を支持するとともに、*Brachyury* 発現と関連するシグナル伝達経路として、注目に値すると思われた。

*Brachyury* 発現が脊索腫の悪性度に相関すること、また *Brachyury* 発現を亢進させる要因の一部を明らかにしたことは、今後の脊索腫に対する治療ターゲットの可能性を検討する上で、意義があると思われる。

## B. 脊索腫の臨床的予後に相関する因子

多変量解析において、脊索腫の PFS と相関する独立した予後因子となり得るのは、手術回数と *Brachyury* 発現であった。手術回数に関しては、手術回数が多い群で有意に PFS が短く、再発を繰り返している腫瘍において予後が悪いことが確認された。

一方、有意な差がなかったのは、年齢、術後放射線治療の有無、手術方法、MIB-1 index であった。放射線治療に関しては、残存腫瘍がある場合、手術単独よりも術後に放射線治療を加えた群で無増悪生存期間、全生存期間共に延長することが報告されている<sup>46</sup>。我々の結果では有意な差が得られなかったが、この結果に影響を与えている因子として選択バイアスが最も疑われた。今回解析した検体は、全て当科で手術を行ったものであるが、当科は大学病院ということもあり他院からの紹介患者が多い。他院で手術および放射線治療が行われたにも関わらずコントロール不良のものが当科に紹介されてくることが多く、

放射線治療後にコントロール良好なものは紹介されないため、放射線の効果が得られにくい腫瘍が検体に入りやすいという可能性が疑われた。

手術方法も有意な因子ではなかった。頭蓋底部に発生する脊索腫に対し、以前は大きな開頭を置いて大掛かりな腫瘍摘出を行っていたが、当科では 2006 年より内視鏡による経鼻的アプローチを開始しており、現在はほとんどの症例で経鼻的内視鏡下腫瘍摘出が行われている。頭蓋底の骨から広がる脊索腫に対しては、経鼻的手術により脳神経などを介さずに直接腫瘍へのアプローチが可能となり、最適な手法と思われるが、アプローチ可能な範囲に制限があるなどのデメリットもある。また、比較的侵襲が少ないことから、1 回の手術で全摘出を目指す以外に、合併症のリスクが高い部位の腫瘍を意図的に残して手術を多期的に行うなどの戦略も可能となるため、PFS へ影響を与える可能性がある。今回の我々の解析においては、多変量解析により交絡因子を除いた上での両手術法における PFS に、有意差はなかった ( $p=0.83$ )。少なくとも今回解析に用いた検体においては、手術法の違いによる PFS への影響は小さいことを確認した。

### C. *Brachyury* 発現と悪性度

本研究にて、*Brachyury* 発現が高い群で有意に PFS が短いことが明らかとなり、*Brachyury* 遺伝子の発現と臨床的悪性度に相関があることが示唆された。本研究では相関を示すに留まっており、悪性度の高い腫瘍で *Brachyury* 発現が高いのか、*Brachyury* が悪性化をもたらしているのかは明らかとなっていない。しかし、過去の報告に基づいて考察を行うと、*Brachyury* が悪性化をもたらしている可能性も考えられる<sup>30-32,47-51</sup>。*Brachyury* 遺伝子は、脊椎動物の胎生期において中胚葉の発生および脊索への分化に関わる転写因子であり、*Brachyury* 遺伝子を欠失させたマウスにおいて脊索が形成されないことから同定されている<sup>24</sup>。発生の場面における中胚葉の形成には、上皮系細胞から間葉系細胞への転換が重要な役割を果たしており、上皮間葉転換 (EMT) と呼ばれる<sup>49</sup>。EMT は、E-cadherin の発現を抑制することで上皮系細胞の接着能を低下させ、遊走、浸潤能を得ることで間葉系細胞へと変化させるプロセスであり、発生の様々な場面で重要な役割を果たしている<sup>48</sup>。一方、がんにおいては細胞接着能を低下させることで転移、浸潤を促進し、悪性化を亢進させることが知られている<sup>47</sup>。*Brachyury* と EMT との関連に関しては、発生の場面で *Brachyury* が直接 EMT に関わっていることを示す報告はないものの、悪性腫瘍

においては *Brachyury* 遺伝子と EMT との関連を示唆する報告がある<sup>30-32,50,51</sup>。

以上を考え合わせると、*Brachyury* は EMT を介することで、発生場面では脊索の分化に関わる一方、脊索腫においては悪性度に関わっている可能性が考えられた。また、*Brachyury* 高発現群と有意に相関するシグナル伝達経路に

PI3K/Akt pathway が挙げられたが、この pathway の下流の 1 つとして、 $\beta$ -カテニンや Snail の発現促進を介して EMT を促進することが報告されている<sup>52</sup>。

本研究では、*Brachyury* 発現に関連する因子を検討すべく網羅的な遺伝子発現解析を行っており、*Brachyury* 高発現群において、EMT との関連を示唆する発現変化がないか確認した。EMT の最下流に位置し、最も重要な指標の 1 つである E-cadherin の発現に関しては、*Brachyury* 高発現群と低発現群の間で有意差は認めなかった ( $p=0.49$ , Student's *t*-test)。EMT マーカーの 1 つである Snail の発現に関しても両群で有意差はなく ( $p=0.71$ , Student's *t*-test)、今回の解析においては *Brachyury* 発現と EMT との関連を見出すことはできなかった。

*Brachyury* と EMT との関連に関しては、さらなる検討が必要であると思われる。

#### D. *Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅

今回解析した脊索腫において、体細胞性コピー数増幅を一部に認めることを明らかにした。また、コピー数の増幅が *Brachyury* 発現の亢進と関連していることを確認した。

今回行ったコピー数解析の結果は3コピー、4コピーという整数値以外に、その間の値をとるものが多いが、同一組織内でも個々にコピー数が不均一ながん細胞や混入した正常細胞を、混合した状態で解析しているためと考えられる。実際、FISHによるコピー数解析では、腫瘍内での腫瘍細胞のコピー数は均一でなく、増幅の程度にもばらつきがあると報告されている<sup>53</sup>。つまり、今回用いた real-time PCR によるコピー数解析は、使用した腫瘍検体における腫瘍細胞全体のコピー数の平均値を見ているため、整数値以外の値を多く認めるものと考えられる。

体細胞性コピー数増幅は様々ながん種で頻繁に認め、がん遺伝子の活性化に重要な役割を果たしていると考えられている<sup>40</sup>。例えば、乳がんにおける HER2 遺伝子のコピー数増幅は一部の乳がんの悪性度に関連しており、HER2 をターゲットにした分子標的薬の開発にて劇的に予後が改善している。がんにおけるコピー数増幅が、どのような過程で起こるのかは明らかとなっていない

い。

脊索腫におけるコピー数増幅に関しては、いくつかの報告がある。孤発性脊索腫 181 例中 7% で **Brachyury** 遺伝子のコピー数増幅、38% で 6 番染色体の多染色体を認め、合わせると半数近くの頻度で **Brachyury** 遺伝子の増幅をもたらす遺伝子異常を認めたとされている<sup>53</sup>。他の報告でも、20-30% でコピー数増幅を認めると報告されている (表 8)。

	コピー数増幅 の頻度	解析症例 総数	解析方法	引用文献
1	28 %	21	aCGH	Hallor et al. 2008 <sup>54</sup>
2	54 %	170	FISH	Presneau et al. 2011 <sup>53</sup>
	22 %	32	qPCR	
3	12.5 %	16	qPCR	Le et al. 2011 <sup>8</sup>
4	27 %	37	FISH	Kitamura et al. 2013 <sup>29</sup>

表 8 孤発性脊索腫における **Brachyury** 遺伝子のコピー数に関する報告

aCGH; array comparative genomic hybridization、qPCR; quantitative PCR

一方、家族性脊索腫患者の血液 DNA の解析において、**Brachyury** 遺伝子の duplication を germline で認めることが報告されている<sup>55</sup>。この報告と、今回

我々が検討した孤発性脊索腫における体細胞性コピー数増加の結果を考え合わせると、*Brachyury* 遺伝子は脊索腫において、極めて重要な役割を果たしているものと思われた。

#### E. *Brachyury* 遺伝子内の SNP rs2305089

*Brachyury* 遺伝子内のエクソン 4 にある SNP rs2305089 において、G→A への変異は *Brachyury* 発現および脊索腫発生のリスクに関わると報告されている<sup>36</sup>。この変異は、GGT (Gly) →GAT (Asp) へのミスセンス変異を生じるが、この領域は転写因子である *Brachyury* が、DNA と結合する部位をコードしている。

しかし、報告にある SNP の遺伝子型による *Brachyury* 発現の差は、我々の検討では確認できなかった。同一患者で再発前後に採取したペア検体の検討では、再発後に *Brachyury* 発現の変化を来していることを確認しており、germline の SNP が *Brachyury* 発現に与える影響よりも、他の後天的要因の影響が強いのではないかと思われた。

また、ヨーロッパ人種の健常コントロール群における SNP rs2305089 の A アリル頻度に対し、脊索腫患者群の A アリル頻度が有意に高く、A アリルへの変

異が脊索腫のリスクファクターであるとされている<sup>36</sup>。我々の検討では、自験例脊索腫患者における A アリル頻度と日本人コントロール群の A アリル頻度に有意差は認めなかった。少なくとも自験例の日本人においては、ヨーロッパ人と異なり SNP rs2305089 の遺伝子型と脊索腫の発生リスクの間に相関はないものと思われた。同 SNP と脊索腫発生リスクに関する報告は、最初の報告後に 2 つの報告がある。アメリカにおける孤発性脊索腫 103 例の検討では、脊索腫患者において有意に A アリル頻度が高かったものの、オッズ比は 2.8 であり、ヨーロッパ人種でのオッズ比よりも小さかった<sup>37</sup>。中国での頭蓋底脊索腫 65 例の検討では、脊索腫群とコントロール群の間で A アリル頻度に有意差は認めなかったと報告されている( $p=0.77$ )<sup>38</sup>。脊索腫発生と SNP rs2305089 との関連には、人種により差がある可能性があり、我々日本人を含めたアジア人種においては、関連が低いことが示唆された (表 9)。

集団		アリル頻度		オッズ比	95%信頼区間	p 値	引用文献
		A	G				
日本人	脊索腫	33%	67%	1.1	0.60-1.99	0.76	our results
	コントロール	31%	69%				
ヨーロッパ人	脊索腫	86%	14%	5.3	2.69-10.59	$0.5 \times 10^{-6}$	Pillay et al. 2012 <sup>36</sup>
	コントロール	53%	47%				
アメリカ& カナダ人	脊索腫	76%	24%	2.8	1.53-5.14	$0.7 \times 10^{-3}$	Kelley et al. 2014 <sup>37</sup>
	コントロール	53%	47%				
中国人	脊索腫	37%	63%	1.1	0.61-1.94	0.77	Wu et al. 2013 <sup>38</sup>
	コントロール	35%	65%				

表 9 脊索腫発生リスクと SNP rs2305089 遺伝子型の人種間差

最初の報告であるヨーロッパ人種でオッズ比が最も高く、我々の検討の日本人および中国人では関連を認めなかった。アメリカ人とカナダ人による報告でのオッズ比は、その中間の値であった。

## F. *Brachyury* 発現と関連する因子の解析

今回の解析にて、*Brachyury* 発現が高い群で、PI3K/Akt pathway に関連する遺伝子の発現が上昇しており、有意に相関していることが示唆された。さらに免疫染色における検証にて、PI3K/Akt pathway が *Brachyury* 高発現群で有意に活性化していることが確認された。

脊索腫における PI3K/Akt/mTOR pathway の関連に関して、いくつかの報告がある。Presneau らは、50 例の脊索腫に対する免疫染色にてリン酸化 AKT (92%)、リン酸化 TSC2 (96%)、リン酸化 mTOR (27%)、リン酸化 S6 蛋白 (22%)、リン酸化 4E-BP1 (96%) が陽性であったと報告し、PI3K/Akt/mTOR pathway が高率に活性化されており新たな治療標的となり得ることを報告している<sup>56</sup>。Schwab らは、ウェスタンブロットにて PI3K/Akt/mTOR pathway の蛋白が脊索腫において活性化していることを示し、脊索腫細胞株においてこの pathway の阻害剤である PI-103 を用いると、細胞増殖が抑制されることを示している<sup>57</sup>。Tamborini らは、PI3K/Akt pathway と RAS/MAPK pathway が共に活性化していることを報告している<sup>58</sup>。以上のように、脊索腫において PI3K/Akt pathway が活性化していることを示唆する報告があるが、*Brachyury* との関連を示唆するものはない。 *Brachyury* が PI3K/Akt pathway との関連を検討すべく、蛍光二重染色法に

て **Brachyury** とリン酸化 **S6** 蛋白を染色した。両者の発現分布は概ね一致していたが、個々の細胞レベルでは両方を発現しているものやどちらか一方を発現しているものが混在していた。今回の解析結果からは、**Brachyury** と **PI3K/Akt pathway** の直接の関連を示すには至らず、今後細胞生物学的な方法を用いた検証が必要であると思われた。

#### G. 今後の治療への応用の可能性

今回の解析結果が示唆する、今後の新たな治療への可能性としては、**Brachyury** 自体をターゲットとするもの、および **Brachyury** が関連する **pathway** をターゲットとするものが考えられる。**Brachyury** はほとんどの正常組織には発現していない（精巣と脾臓では、極めて低いレベルで発現）ため<sup>30</sup>、**Brachyury** に対する標的治療は正常組織に大きな影響を与えることのない、脊索腫瘍細胞に特異的なものとなり得ると期待される。現時点では、**Brachyury** を標的とする分子標的治療は存在しないが、**Brachyury** 抗原に特異的な T 細胞を用いた免疫治療への可能性を示唆する報告がある。**Palena** らは、**Brachyury** ペプチドを抗原提示細胞である樹状細胞に取り込ませ、その樹状細胞と細胞傷害性 T 細胞を一緒に培養することで、**Brachyury** 抗原に特異的な細胞傷害性 T 細胞

胞の樹立に成功している<sup>59</sup>。さらに、*Brachyury* 発現を認める肺がん細胞株において、この T 細胞による殺細胞効果が示されている<sup>30</sup>。これは、*Brachyury* 発現陽性の肺がんに対し、*Brachyury* 特異的 T 細胞を用いた免疫療法の可能性を示唆する所見であり、脊索腫への応用も期待される。

関連する pathway として、PI3K/Akt/mTOR pathway に対する標的治療は、現時点で temsirolimus と everolimus がある。両者は、細胞内蛋白質である FKBP-12 と複合体を形成し、その複合体が mTOR に結合することで mTOR のキナーゼ活性を阻害する、分子標的薬である。everolimus に関しては、脊索腫に対して imatinib と everolimus の併用を行う phase II study がイタリアで始まったばかりであり、結果が期待される。

#### H. 本研究の限界

本研究における限界の 1 つは、まれな腫瘍であるがゆえに症例数が少ないことである。これは脊索腫に関する他の報告でも同様の問題であり、今後症例を積み重ねていく必要がある。

2 つ目に、採取できる腫瘍検体の少なさが挙げられる。内視鏡下手術において採取可能な検体量は少なく、得られる検体量は全体的に少ない。腫瘍内にお

ける不均一性の考えに基づくと、少量の検体の解析では腫瘍内の一部の特性しか見ていない可能性がある。

3つ目に、今回 *Brachyury* 高発現群との関連が示唆された PI3K/Akt pathway に関して、*Brachyury* とどのような関係にあるのか、上流にあるのか下流にあるのかなどが明らかになっていない。今後、この点に関して細胞生物学的な方法を用いて検証する必要がある。

## I. 今後の研究

今後、手術検体からの脊索腫細胞株樹立を目指し、細胞株を用いて *Brachyury* と PI3K/Akt pathway との関連を明らかにすることが必要である。方法としては、脊索腫細胞株の *Brachyury* 発現を RNA 干渉にて抑制し、コントロールと比較して PI3K/Akt pathway の活性化状態に変化があるかを確認する。さらに、マイクロアレイにて *Brachyury* 発現抑制株に対する網羅的発現解析を追加する。逆に、PI3K/Akt pathway 活性を抑制する試薬を作用させることで、*Brachyury* 発現に変化を認めるかを確認する。以上により、*Brachyury* と PI3K/Akt pathway との関連が明らかにできるものと思われる。

## VII. 結語

頭蓋底脊索腫において、*Brachyury* 遺伝子の発現は臨床的予後と相関し、独立した予後因子であると考えられた。*Brachyury* 発現の亢進には、*Brachyury* 遺伝子の体細胞性コピー数増幅が関与していることが示唆された。*Brachyury* 発現の亢進と関連する他の因子として、PI3K/Akt pathway の活性化が関与していることが示唆された。*Brachyury* および関連する PI3K/Akt pathway は、新たな治療へのターゲットになり得る可能性がある。

## VIII. 謝辞

本研究をまとめるにあたり、ご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教授・齊藤延人先生に深く感謝いたします。研究の方向性や実験計画、論文作成につき具体的にご指導を賜りました東京大学医学部脳神経外科講師・武笠晃丈先生に深く感謝いたします。臨床検体の収集に際して多大なる御尽力、および臨床的な指導を賜りました東京大学医学部脳神経外科講師・辛正廣先生に深く感謝いたします。また、日々の研究現場において、ご支援、ご指導頂いた東京大学脳神経外科脳腫瘍グループの皆様、そして東京大学医学部脳神経外科教室技術補佐員の松浦令子様、小俣麻友様に感謝いたします。

## IX. 引用文献

1. Di Maio S, Rostomily R, Sekhar LN. Current surgical outcomes for cranial base chordomas: cohort study of 95 patients. *Neurosurgery* 2012;70:1355-60; discussion 60.
2. McMaster ML, Goldstein AM, Bromley CM, Ishibe N, Parry DM. Chordoma: incidence and survival patterns in the United States, 1973-1995. *Cancer causes & control : CCC* 2001;12:1-11.
3. Chambers KJ, Lin DT, Meier J, Remenschneider A, Herr M, Gray ST. Incidence and survival patterns of cranial chordoma in the United States. *The Laryngoscope* 2014;124:1097-102.
4. Report of Brain Tumor Registry of Japan (1984-2000). *Neurologia medico-chirurgica* 2009;49 Suppl:PS1-96.
5. Walcott BP, Nahed BV, Mohyeldin A, Coumans J-V, Kahle KT, Ferreira MJ. Chordoma: current concepts, management, and future directions. *The Lancet Oncology* 2012;13:e69-e76.
6. Fagundes MA, Hug EB, Liebsch NJ, Daly W, Efid J, Munzenrider JE. Radiation therapy for chordomas of the base of skull and cervical spine: patterns of failure and outcome after relapse. *International journal of radiation oncology, biology, physics*

1995;33:579-84.

7. Scheil S, Bruderlein S, Liehr T, et al. Genome-wide analysis of sixteen chordomas by comparative genomic hybridization and cytogenetics of the first human chordoma cell line, U-CH1. *Genes, chromosomes & cancer* 2001;32:203-11.
8. Le LP, Nielsen GP, Rosenberg AE, et al. Recurrent chromosomal copy number alterations in sporadic chordomas. *PloS one* 2011;6:e18846.
9. Stephens PJ, Greenman CD, Fu B, et al. Massive genomic rearrangement acquired in a single catastrophic event during cancer development. *Cell* 2011;144:27-40.
10. Shalaby A, Presneau N, Ye H, et al. The role of epidermal growth factor receptor in chordoma pathogenesis: a potential therapeutic target. *The Journal of pathology* 2011;223:336-46.
11. Stacchiotti S, Longhi A, Ferraresi V, et al. Phase II study of imatinib in advanced chordoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2012;30:914-20.
12. Weinberger PM, Yu Z, Kowalski D, et al. Differential expression of epidermal growth factor receptor, c-Met, and HER2/neu in chordoma compared with 17 other malignancies. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 2005;131:707-11.

13. Diaz RJ, Guduk M, Romagnuolo R, et al. High-resolution whole-genome analysis of skull base chordomas implicates FHIT loss in chordoma pathogenesis. *Neoplasia* 2012;14:788-98.
14. Pallini R, Maira G, Pierconti F, et al. Chordoma of the skull base: predictors of tumor recurrence. *Journal of neurosurgery* 2003;98:812-22.
15. Duan Z, Choy E, Nielsen GP, et al. Differential expression of microRNA (miRNA) in chordoma reveals a role for miRNA-1 in Met expression. *Journal of orthopaedic research : official publication of the Orthopaedic Research Society* 2010;28:746-52.
16. York JE, Kaczaraj A, Abi-Said D, et al. Sacral chordoma: 40-year experience at a major cancer center. *Neurosurgery* 1999;44:74-9; discussion 9-80.
17. Azzarelli A, Quagliuolo V, Cerasoli S, et al. Chordoma: natural history and treatment results in 33 cases. *Journal of surgical oncology* 1988;37:185-91.
18. Stacchiotti S, Tamborini E, Lo Vullo S, et al. Phase II study on lapatinib in advanced EGFR-positive chordoma. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 2013;24:1931-6.
19. George S, Merriam P, Maki RG, et al. Multicenter phase II trial of sunitinib in

the treatment of nongastrointestinal stromal tumor sarcomas. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 2009;27:3154-60.

20. Hof H, Welzel T, Debus J. Effectiveness of cetuximab/ gefitinib in the therapy of a sacral chordoma. *Onkologie* 2006;29:572-4.

21. Yang C, Schwab JH, Schoenfeld AJ, et al. A novel target for treatment of chordoma: signal transducers and activators of transcription 3. *Molecular cancer therapeutics* 2009;8:2597-605.

22. Yang C, Hornicek FJ, Wood KB, et al. Blockage of Stat3 with CDDO-Me inhibits tumor cell growth in chordoma. *Spine* 2010;35:1668-75.

23. Nibu Y, Jose-Edwards DS, Di Gregorio A. From notochord formation to hereditary chordoma: the many roles of Brachyury. *BioMed research international* 2013;2013:826435.

24. Herrmann BG, Labeit S, Poustka A, King TR, Lehrach H. Cloning of the T gene required in mesoderm formation in the mouse. *Nature* 1990;343:617-22.

25. Oakley GJ, Fuhrer K, Seethala RR. Brachyury, SOX-9, and podoplanin, new markers in the skull base chordoma vs chondrosarcoma differential: a tissue microarray-

based comparative analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2008;21:1461-9.

26. Jambhekar NA, Rekhi B, Thorat K, Dikshit R, Agrawal M, Puri A. Revisiting chordoma with brachyury, a "new age" marker: analysis of a validation study on 51 cases. *Archives of pathology & laboratory medicine* 2010;134:1181-7.

27. Vujovic S, Henderson S, Presneau N, et al. Brachyury, a crucial regulator of notochordal development, is a novel biomarker for chordomas. *The Journal of pathology* 2006;209:157-65.

28. Hsu W, Mohyeldin A, Shah SR, et al. Generation of chordoma cell line JHC7 and the identification of Brachyury as a novel molecular target. *Journal of neurosurgery* 2011;115:760-9.

29. Kitamura Y, Sasaki H, Kimura T, et al. Molecular and clinical risk factors for recurrence of skull base chordomas: gain on chromosome 2p, expression of brachyury, and lack of irradiation negatively correlate with patient prognosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology* 2013;72:816-23.

30. Roselli M, Fernando RI, Guadagni F, et al. Brachyury, a driver of the epithelial-mesenchymal transition, is overexpressed in human lung tumors: an opportunity for novel

interventions against lung cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2012;18:3868-79.

31. Fernando RI, Litzinger M, Trono P, Hamilton DH, Schlom J, Palena C. The T-box transcription factor Brachyury promotes epithelial-mesenchymal transition in human tumor cells. *The Journal of clinical investigation* 2010;120:533-44.

32. Palena C, Roselli M, Litzinger MT, et al. Overexpression of the EMT driver brachyury in breast carcinomas: association with poor prognosis. *Journal of the National Cancer Institute* 2014;106.

33. Pinto F, Pertega-Gomes N, Pereira MS, et al. T-box transcription factor Brachyury is associated with prostate cancer progression and aggressiveness. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 2014.

34. Nelson AC, Pillay N, Henderson S, et al. An integrated functional genomics approach identifies the regulatory network directed by brachyury (T) in chordoma. *The Journal of pathology* 2012;228:274-85.

35. Dansranjavin T, Krehl S, Mueller T, Mueller LP, Schmoll HJ, Dammann RH. The role of promoter CpG methylation in the epigenetic control of stem cell related genes

during differentiation. *Cell cycle* 2009;8:916-24.

36. Pillay N, Plagnol V, Tarpey PS, et al. A common single-nucleotide variant in T is strongly associated with chordoma. *Nature genetics* 2012;44:1185-7.

37. Kelley MJ, Shi J, Ballew B, et al. Characterization of T gene sequence variants and germline duplications in familial and sporadic chordoma. *Human genetics* 2014;133:1289-97.

38. Wu Z, Wang K, Wang L, et al. The brachyury Gly177Asp SNP is not associated with a risk of skull base chordoma in the Chinese population. *International journal of molecular sciences* 2013;14:21258-65.

39. Holton JL, Steel T, Luxsuwong M, Crockard HA, Revesz T. Skull base chordomas: correlation of tumour doubling time with age, mitosis and Ki67 proliferation index. *Neuropathology and applied neurobiology* 2000;26:497-503.

40. Beroukhi R, Mermel CH, Porter D, et al. The landscape of somatic copy-number alteration across human cancers. *Nature* 2010;463:899-905.

41. LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug resistance updates : reviews and commentaries in antimicrobial and anticancer*

chemotherapy 2008;11:32-50.

42. Morgensztern D, McLeod HL. PI3K/Akt/mTOR pathway as a target for cancer therapy. *Anti-cancer drugs* 2005;16:797-803.

43. Yap TA, Garrett MD, Walton MI, Raynaud F, de Bono JS, Workman P. Targeting the PI3K-AKT-mTOR pathway: progress, pitfalls, and promises. *Current opinion in pharmacology* 2008;8:393-412.

44. Zhang L, Wang H, Xu J, Zhu J, Ding K. Inhibition of cathepsin S induces autophagy and apoptosis in human glioblastoma cell lines through ROS-mediated PI3K/AKT/mTOR/p70S6K and JNK signaling pathways. *Toxicology letters* 2014;228:248-59.

45. Bahrami BF, Ataie-Kachoie P, Pourgholami MH, Morris DL. p70 Ribosomal protein S6 kinase (Rps6kb1): an update. *Journal of clinical pathology* 2014.

46. Amit M, Na'ara S, Binenbaum Y, et al. Treatment and Outcome of Patients with Skull Base Chordoma: A Meta-analysis. *Journal of neurological surgery Part B, Skull base* 2014;75:383-90.

47. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science* 2011;331:1559-64.

48. Lim J, Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions: insights from development. *Development* 2012;139:3471-86.
49. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in development and pathologies. *Current opinion in cell biology* 2003;15:740-6.
50. Imajyo I, Sugiura T, Kobayashi Y, et al. T-box transcription factor Brachyury expression is correlated with epithelial-mesenchymal transition and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *International journal of oncology* 2012;41:1985-95.
51. Shimoda M, Sugiura T, Imajyo I, et al. The T-box transcription factor Brachyury regulates epithelial-mesenchymal transition in association with cancer stem-like cells in adenoid cystic carcinoma cells. *BMC cancer* 2012;12:377.
52. Lee YJ, Han HJ. Troglitazone ameliorates high glucose-induced EMT and dysfunction of SGLTs through PI3K/Akt, GSK-3beta, Snail1, and beta-catenin in renal proximal tubule cells. *American journal of physiology Renal physiology* 2010;298:F1263-75.
53. Presneau N, Shalaby A, Ye H, et al. Role of the transcription factor T (brachyury) in the pathogenesis of sporadic chordoma: a genetic and functional-based study. *The*

Journal of pathology 2011;223:327-35.

54. Hallor KH, Staaf J, Jonsson G, et al. Frequent deletion of the CDKN2A locus in chordoma: analysis of chromosomal imbalances using array comparative genomic hybridisation. British journal of cancer 2008;98:434-42.

55. Yang XR, Ng D, Alcorta DA, et al. T (brachyury) gene duplication confers major susceptibility to familial chordoma. Nature genetics 2009;41:1176-8.

56. Presneau N, Shalaby A, Idowu B, et al. Potential therapeutic targets for chordoma: PI3K/AKT/TSC1/TSC2/mTOR pathway. British journal of cancer 2009;100:1406-14.

57. Schwab J, Antonescu C, Boland P, et al. Combination of PI3K/mTOR inhibition demonstrates efficacy in human chordoma. Anticancer research 2009;29:1867-71.

58. Tamborini E, Viridis E, Negri T, et al. Analysis of receptor tyrosine kinases (RTKs) and downstream pathways in chordomas. Neuro-oncology 2010;12:776-89.

59. Palena C, Plev DE, Tsang KY, et al. The human T-box mesodermal transcription factor Brachyury is a candidate target for T-cell-mediated cancer immunotherapy. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research 2007;13:2471-8.

