

## 論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 大谷亮平

### 【序文】

脊索腫は、頭蓋底斜台部に好発するまれな腫瘍であり、胎生組織である脊索の遺残から発生する。病理学的には核分裂像は少なく、ゆっくりと発育するが、周囲の骨組織を浸潤、破壊して増大し、再発を繰り返しながら臨床的に悪性の経過を辿る。治療としては、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、多くは再発を免れず、新たな治療が求められているのが現状である。

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、*Brachyury* 遺伝子に着目した。*Brachyury* 遺伝子は 6q27 に存在し、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。中胚葉から脊索で特異的に高発現しているが、脊索の遺残から発生する脊索腫においても高発現している。*Brachyury* が脊索腫の悪性度にも関わっていることを示唆する報告もあることから、我々は *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* 発現レベルを亢進させる要因を同定すべく、以下の3つに関して検討を行った。

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

### 【方法】

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。手術日から、再発もしくは再増大が確認されるまでの期間を Progression-free survival (PFS) とし、臨床的悪性度の指標とした。*Brachyury* 発現は、凍結腫瘍検体から抽出した RNA を用いて、quantitative real-time RT-PCR により解析を行った。*Brachyury* 遺伝子のコピー数解析は、腫瘍および血液の DNA を用いて、TaqMan Copy Number Assay (Applied Biosystems) により、real-time PCR にて解析を行った。SNP の遺伝子型解析は、ダイレクトシーケンス法にて遺伝子型を同定した。*Brachyury* 遺伝子発現に関連する因子の解析は、*Brachyury* 高発現例4例、低発現例4例を用いて、マイクロアレイにより網羅的発現解析を行った。

## 【結果】

まず、頭蓋底脊索腫の PFS に影響を及ぼす要因に関して検討を行った。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* 発現レベルを挙げた。各因子に関して cut-off 値を設定して 2 群に分け、各群の 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 Cox 比例ハザードモデルを用いて上記 6 因子に関する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。*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。

次に、*Brachyury* 発現レベルを亢進させる要因に関して検討を行った。1 つ目の仮説として、*Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅が発現亢進に関与しているという仮説の下、腫瘍検体および血液検体の DNA を用いて、*Brachyury* 遺伝子のコピー数解析を行った。腫瘍 DNA における解析では、27 例中 12 例の 44% において *Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅を認めるのに対し、血液 DNA では全て正常の 2 コピーであり、両者の間には有意差を認めた ( $p=5 \times 10^{-5}$ )。一部の脊索腫において、体細胞性コピー数増幅を認めることが確認された。続いて、*Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅が発現上昇に関わっているかを確認するべく、コピー数増幅と発現との相関を解析すると、両者の間で正の相関を認めた (相関係数=0.61,  $p=0.0002$ )。さらに、*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* 発現を比較すると、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 ( $p=0.0083$ )。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一部に認め、*Brachyury* 発現の亢進に関わっていることが示唆された。

2 つ目の仮説として、*Brachyury* 遺伝子内の SNP rs2305089 における遺伝子型が、*Brachyury* 発現に影響を及ぼしているという仮説の下、検討を行った。過去の報告では、この SNP が A アリルのホモ接合型である群が、G/A 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→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を根拠として、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。この SNP に関して、我々の検体 19 患者 27 検体の内、再発検体を除いた 19 患者 19 検体に関して解析を行った。結果は、G/G 型；10 例 (56%)、G/A 型；8 例 (44%)、A/A 型；1 例 (6%) であり、各遺伝子型における *Brachyury* 発現に差はなかった ( $p=0.69$ )。遺伝子型と *Brachyury* 発現の関連は否定的であった。脊索腫発生リスクに関しても、日本人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 ( $p=0.76$ )。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。

3 つ目の仮説として、*Brachyury* 発現を亢進させる転写制御因子が存在するという仮説の

下、*Brachyury* 発現に関連する因子を検討した。マイクロアレイによる 23,157 種の遺伝子の網羅的発現解析を行い、*Brachyury* 高発現群において、低発現群と比較し 2 倍以上の発現を認めるもの、かつ両群での発現の平均値の差の検定 (Student's t-test) で  $p$  値 $<0.05$  を満たすものを、有意な遺伝子として抽出した。*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 上で分類を行い、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 ( $p=0.03$ )。*Brachyury* 高発現群において、PI3K/Akt pathway の関連が示唆された。

PI3K/Akt pathway は、リン酸化カスケードにより活性化され、多くの癌種で生存、増殖に関わっていることが知られている。続いて、*Brachyury* 発現と PI3K/Akt pathway の活性化状態の関連を検討した。この pathway の活性化を反映する指標として、リン酸化 S6 リボソーム蛋白の発現を用いた。*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 ( $p=0.014$ )。*Brachyury* 高発現群において、PI3K/Akt pathway が有意に活性化されていることが示唆された。さらに、*Brachyury* 発現と PI3K/Akt pathway との直接の関連を検討すべく、*Brachyury* とリン酸化 S6 蛋白の蛍光二重染色を行った。*Brachyury* の発現分布とリン酸化 S6 蛋白の発現分布は、概ね一致しているものと思われた。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。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。

#### 【考察】

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 *Brachyury* 遺伝子の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。*Brachyury* 遺伝子のコピー数増幅に関する他の報告としては、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。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。*Brachyury* が、どのように悪性度と相関しているかは明らかではないが、Epithelial-Mesenchymal Transition (EMT) との関連を示唆する報告がある。発生の場面における中胚葉の形成には、EMT が重要な役割を果たしている。一方、癌における EMT は、細胞接着能を低下させることで転移、浸潤を促進することが知られている。*Brachyury* は EMT を介することで、発生の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。しかし、本研究でのマイクロアレイによる発現解析では、EMT の重要な指標の 1 つである E-cadherin の発現に関して、*Brachyury* 高発現群と低発現群

の間で有意差は認めなかった ( $p=0.49$ )。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が、さらなる検討が必要であると思われる。

本研究にて、*Brachyury* 発現が高い群で、PI3K/Akt pathway に属する遺伝子の発現との相関が示唆され、さらにこの pathway が有意に活性化し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が過去にあり、有望なシグナル伝達 pathway として注目に値すると思われた。*Brachyury* と PI3K/Akt pathway がどのように関連しているかは明らかではなく、今後細胞生物学的な方法を用いた検証が必要である。

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* は正常組織には発現していないため、*Brachyury* に対する標的治療は脊索腫特異的なものとなり得る。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* 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り、脊索腫への応用が期待される。関連する pathway として、PI3K/Akt/mTOR pathway に対する標的治療は、現時点でテムシロリムスとエベロリムスがある。エベロリムスに関しては、脊索腫に対してイマチニブとエベロリムスの併用を行う 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。

#### 【結語】

頭蓋底脊索腫において、*Brachyury* 遺伝子の発現は独立した予後因子であり、*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* 発現に影響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。