



平成 27 年 4 月 6 日  
京 都 大 学  
名 古 屋 大 学

## 悪性脳腫瘍（低悪性度神経膠腫）の遺伝子異常の全体図を解明

### -悪性脳腫瘍に関する最大規模のゲノム解析を実施-

#### 概要

低悪性度神経膠腫(WHO grade II/III glioma)は頻度の高い脳原発悪性腫瘍です。進行は比較的ゆっくりですが、脳に染み込むように増殖するため完治させることが極めて困難な病気です。多くの患者さんでは初回治療の数年から数十年後に、より悪性度の高い腫瘍として再発し、死に至る病気であり新しい治療の開発が期待される病気でもあります。そのため、低悪性度神経膠腫においてどのような遺伝子異常が生じているのか、これらの遺伝子異常が腫瘍の発生や悪性化に対してどのような役割をもっているか解明する必要があります。

京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学講座 教授 小川誠司 および 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科学 准教授 夏目 敦至 を中心とした共同研究チームは 300 例以上の低悪性度神経膠腫の遺伝子解析を行い、公開されている約 400 例の症例を合わせて 700 例を超える世界最大規模の網羅的遺伝子解析を行いました。

今回の研究の主な成果は以下の点です。

- ① 700 例以上の低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の全貌を明らかにしました。
- ② 低悪性度神経膠腫は遺伝子異常に基づいて明確に 3 つのサブグループに分けられます。
- ③ それぞれのサブグループにおいて起こりやすい遺伝子異常を同定しました。
- ④ それぞれの遺伝子異常に対し、腫瘍の発生から進展までどの段階で生じているか明らかにしました。
- ⑤ 低悪性度神経膠腫は異なった遺伝子異常をもつ複数の腫瘍細胞群から構成され多様性に富んだ複雑な腫瘍であることが明らかとなりました。

本研究の成果は、米国科学雑誌「Nature Genetics」電子版にて公開されます。

#### 1. 背景

脳腫瘍は脳に発生する悪性腫瘍で根治することが極めて困難な病期です。世界保健機構(WHO, World Health Organization)によって悪性度に基づき Grade I から IV まで分類されております。成人に起こる脳腫瘍のほとんどは神経膠腫(glioma、グリオーマ)という種類の腫瘍です。もっとも悪性度の高い Grade IV glioma は神経膠芽腫 (Glioblastoma) と呼ばれ、治療を行ってもほとんどの患者さんが 2 年以内に死亡します。一方、grade II または grade III の glioma は低悪性度神経膠腫とも呼ばれ、やや若年成人に好発する悪性腫瘍です。腫瘍の進行は比較的穏やかですが正常な脳の細胞に染み込むように増殖していくため完治するのは困難な病気です。多くの患者さんでは数年から数十年たってから、より悪性度の高

い腫瘍として再発しその時にはほとんどの治療が効かなくなってしまう。従来、低悪性度神経膠腫は *TP53* 遺伝子の変異と染色体 1 番の短腕と 19 番の長腕が欠損する 1p/19q co-deletion が高頻度に起こり、互いに排他的（注 1）に存在することがわかっておりました。2009 年に約 80% の低悪性度神経膠腫は *IDH1* または *IDH2* の変異を持つことが明らかにされました。この異常は Glioblastoma にはまれであり、低悪性度神経膠腫の遺伝子異常は Glioblastoma と異なると考えられておりましたが、その全貌についてはまだ明らかにされていませんでした。また、低悪性度神経膠腫は段階的に悪性化していく腫瘍ですが、腫瘍が発生し進行していく中でどのような遺伝子異常が発生していくのかということも解明されておりました。

今回、京都大学大学院医学研究科 腫瘍生物学 教授 小川誠司、名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科学 准教授 夏目敦至を中心とする研究チームは、300 例を超える症例を対象として、最先端の遺伝子解析技術を駆使し低悪性度神経膠腫の網羅的遺伝子解析（注 2）を行ない、遺伝子異常の全体図を明らかにしました。本解析は、低悪性度神経膠腫について行われたものの中では、これまでで最大規模の網羅的解析であり、低悪性度神経膠腫の分子病態の解明に大きな進展をもたらします。

## 2. 研究手法・成果

<次世代シーケンサーとスーパーコンピューターによる遺伝子異常の解明>（注 3）

同じ臓器のがんでも患者さんが異なればその遺伝子異常は異なるということは様々な腫瘍で明らかになっております。そのため、遺伝子異常を解明するには多数の症例が必要となります。今回、国内 5 施設（名古屋大学、熊本大学、九州大学、大分大学、東京女子医科大学）から合計 332 例の低悪性度神経膠腫の DNA を採取し、京都大学にて次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異解析を行いました。そのうち 10 例は同一患者における初発時と再発時検体の解析を詳細に行い、別の 4 例は同一腫瘍内で複数部位を解析するマルチサンプリング（注 4）の手法を用いて詳細に解析しております。これらのデータに加え the Cancer Genome Atlas が公開している 425 例のシーケンスデータも利用しました。

低悪性度神経膠腫における大規模な網羅的遺伝子解析は過去になく、これまでで最大規模の研究成果になります。

<遺伝子異常に基づく低悪性度神経膠腫の分類>

本研究により低悪性度神経膠腫は遺伝子変異パターンにおいて *IDH1/IDH2* および *TP53* 変異、1p/19q co-deletion の有無によって極めて明確に下記の 3 群にわかれることが明らかとなりました（図 1）。私達は変異のパターンにおいて低悪性度神経膠腫を下記の Type I から Type III と名付けました。

- Type I: *IDH1/2* 変異有、1p/19q co-deletion 有
- Type II: *IDH1/2* 変異有、1p/19q co-deletion 無、*TP53* 変異有
- Type III: *IDH1/2* 変異無

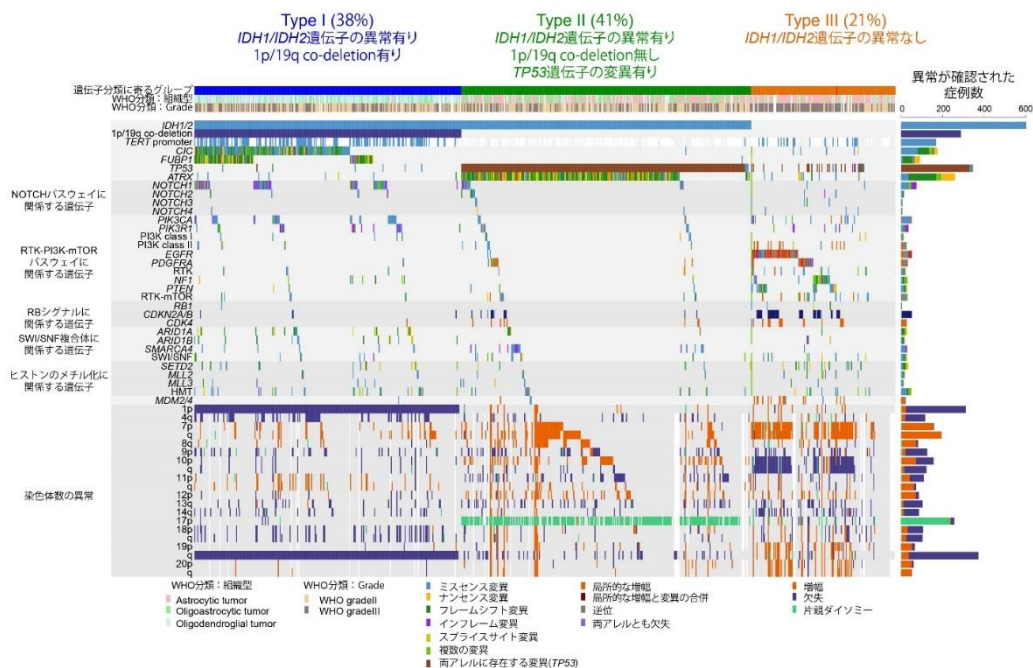


図 1：低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の全貌。合計 757 例の解析結果。

今まで *IDH1/IDH2* 変異をもつ低悪性度神経膠腫の約 4~24%の症例は *TP53* 遺伝子の異常も 1p/19q co-deletion も同定されませんでした。しかしながら詳細にデータを解析することにより 1p/19q co-deletion には亜型が存在することや、従来解析では同定することが困難な *TP53* 遺伝子の異常を見つけることができ、*IDH1/IDH2* の変異を有する低悪性度神経膠腫はほぼ全例 (99.7%、599/601 例) が *TP53* 遺伝子の異常か 1p/19q co-deletion のどちらかを有することが明らかとなりました。さらに、Type II 腫瘍に起こる *TP53* 遺伝子の異常はほとんどの症例 (98.0%、307/313 例) で両アレル (注5) とともに異常が起きており正常な *TP53* 遺伝子が完全に失われているということが明らかとなりました。*IDH1/IDH2* の異常を持たない Type III 腫瘍は Glioblastoma とよく似た変異パターンを示しました。しかしながら Type III 腫瘍の生存期間は Glioblastoma より良い結果となっております (図 2 左図)。また、Type III 腫瘍を発症する患者さんたちの年齢も Glioblastoma と異なりました。Type III の中でもより悪性であり Glioblastoma に近いと考えられる Type IIIb (Type III 腫瘍でかつ病理分類で悪性度が Grade III の症例)のみで比較しても Glioblastoma とは異なった年齢分布でした (図 2 右図)。そのため Type III 腫瘍は Glioblastoma と思われる症例が混ざっている可能性はありますが、Glioblastoma とは異なった集団であり、独立して分類すべきグループということがわかりました。

これらの遺伝子異常に基づく分類は患者さんの生存期間に強く影響しており、治療の現場においても有効な分類であります (図 2 左図)。遺伝子異常による分類は検査を担当する人間によって結果が左右されにくいものであり、患者さん個人の治療を考えるうえでとても有効であり信頼のおける分類になります。

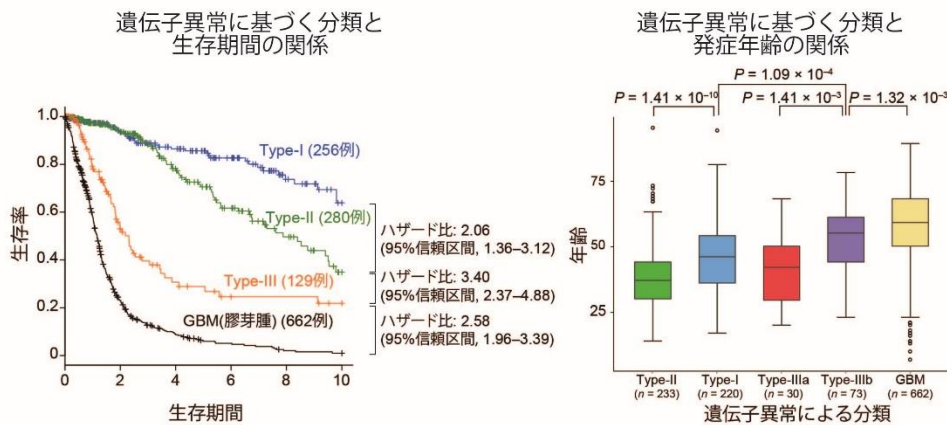


図 2：左.遺伝子異常による分類ごとの患者さんの生存率の推移。右.各タイプにおける患者さんの年齢の分布

遺伝子異常の全貌がわかると低悪性度神経膠腫はあたかもまったく異なった3種類の腫瘍の集合体という印象を与えます。次に、それぞれの遺伝子異常がどのタイプに起こりやすいかを調べました(図3)。遺伝子名の隣に“青”“緑”“オレンジ”のバーで、どのタイプに起こりやすい異常なのか示しております。格子上に2つの異なった遺伝子異常の組み合わせが一緒に起こりやすいかどうかを色付きの丸で示しております。赤い丸ほど一緒に異常が起こりやすく、青いほど一方が存在する時もう片方の異常は存在しにくくなる(排他的であるといいます)関係にあります。すると各タイプに特徴的な異常は同じタイプで特徴的な他の変異と一緒に起こることが多く、他のタイプで特徴的な異常とは一緒に起こりにくいということがわかりました。このように、遺伝子異常による分類は腫瘍の特性をしっかりと示しており、分類された3タイプはそれぞれ特徴の異なった腫瘍であるということがわかりました。

低悪性度神経膠腫における各遺伝子異常の相関関係

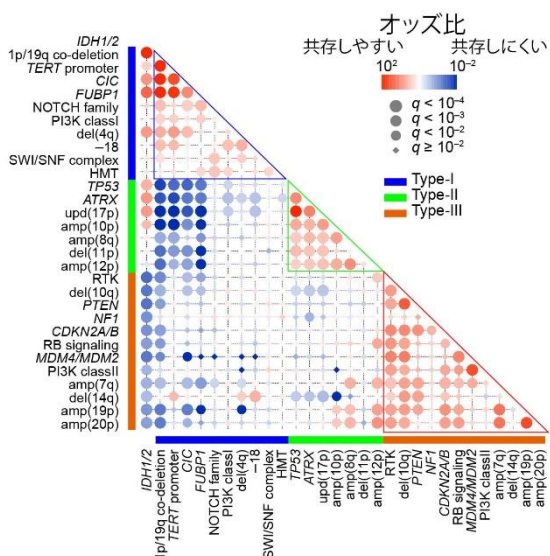


図 3：低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の関係。それぞれの遺伝子の組み合わせで共存しやすさを示している。赤い丸ほど共存しやすい。また、丸が大きいほど信頼性が高い結果である。



<遺伝子異常に基づく分類と DNA メチル化、メッセンジャーRNA 発現パターンの特徴>

DNA メチル化 (注6) やメッセンジャーRNA の発現パターンを解析しました (図4)。DNA メチル化、メッセンジャーRNA の発現のパターンも複数のグループに分かれました。

DNA メチル化は遺伝子異常の分類と極めてよく似た分かれ方をしました。DNA メチル化も3タイプに分かれます。2例を除いて DNA メチル化による分類と遺伝子異常による分類はすべて一致しました。

メッセンジャーRNA の発現パターンは4タイプに分類されました。このうち1つのタイプは Type I から III までのそれぞれがまざったグループでした。それ以外の3タイプは遺伝子異常による分類とほぼ一致しました。

このように遺伝子異常による分類は DNA メチル化・メッセンジャーRNA の発現パターンによる分類と極めてよく似た分類となり、特徴をしっかりと示します。DNA メチル化・メッセンジャーRNA の発現パターンからも低悪性度神経膠腫はそれぞれのタイプでまったく異なる特徴をもつことがわかりました。

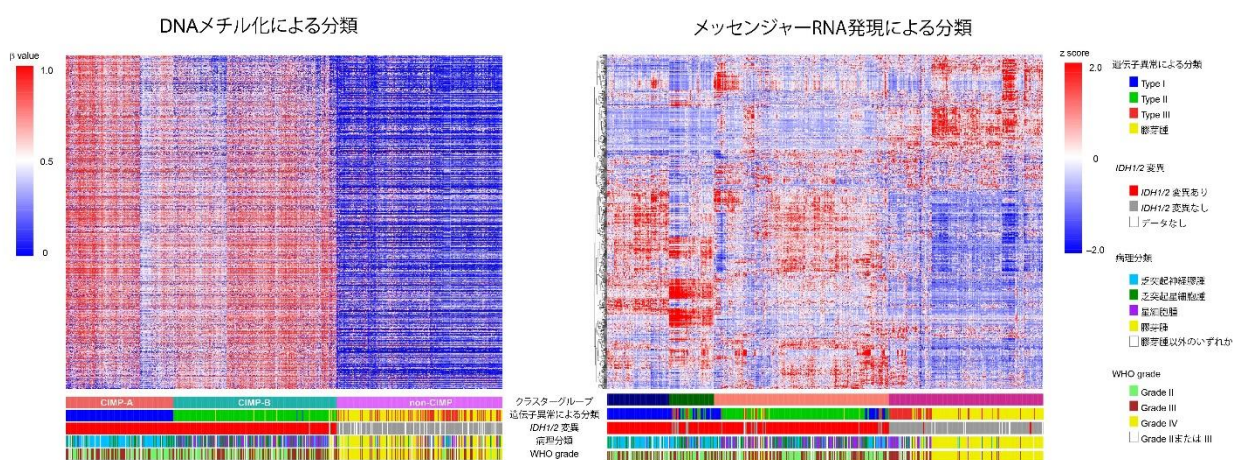


図4: 左.DNA メチル化の分類、右.メッセンジャーRNA の発現による分類。

<低悪性度神経膠腫に生じる各遺伝子変異の起こる時期とその役割>

様々ながんにおいては遺伝子異常の生じる順番に規則性があると考えられております。低悪性度神経膠腫においてそれぞれの遺伝子異常がどのような順番で起きていて、それぞれの遺伝子異常がどのような役割を持っているのか調べました。

まず、それぞれの腫瘍において各遺伝子変異をもつ腫瘍の割合を詳細に調べました。腫瘍は1つの異常細胞から発生し増殖すると考えられております。そのため腫瘍の発生にかかわる遺伝子異常、つまり最初に起こるであろう異常はすべての腫瘍細胞で確認されることになります。一方、遅れて生じる遺伝子異常はある程度増殖した腫瘍細胞のうちのたった一つの腫瘍細胞にのみ起こります。そのため、一部の腫瘍細胞でしか異常を確認できません。このような腫瘍の増殖様式を考慮すると腫瘍の割合を比較することにより各遺伝子変異の起こる時期を推測することができます。私たちはこの手法を用いることによりそれぞれのタイプで生じる遺伝子異常の起こる順番を解明することができました (図5)。Type I と Type II でともに確認される IDH1 および IDH2 の異常は初期の段階で起こり、腫瘍が発生するという段階において重要な役割をもつ遺伝子であることがわかりました。低悪性度神経膠腫にもそれぞれの変異がどの順番で起こっていくかという階層 (ヒエラルキー) が認められました。これらの結果は、同一患者における初発時と再発時の異常の比較、マルチサンプリングによる解析でも同じような順番が存在することが確認されております。

このように遺伝子異常の起こる順番がわかったということは、今後治療開発においてどの遺伝子を標的とするか、その標的に対して治療をするとどのくらいの効果が期待できるかということが推測できとても有用な情報です。

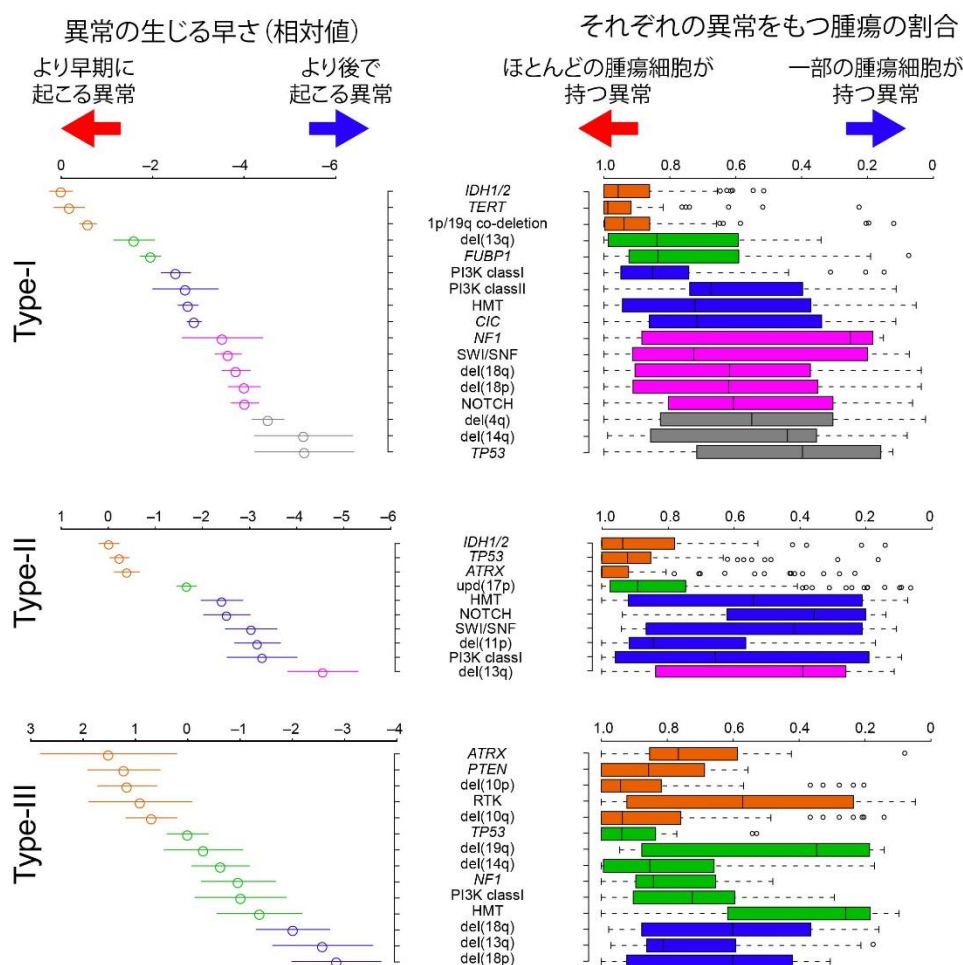


図 5 : タイプごとにおける遺伝子異常の入る順番とその遺伝子異常をもつ腫瘍細胞の割合の分布。

#### <低悪性度神経膠腫の多様性と進展形式の解明>

がんは異なる遺伝子変異をもった腫瘍グループの集合と考えられており、多様性があると考えられております。これらの多様性は治療抵抗性と密接にかかわっていると考えられております。はじめ効いていた治療が効かなくなるのは、このように多様性があるため、治療に抵抗性のある腫瘍細胞が生き残るためと考えられております。マルチサンプリング検体の解析により低悪性度神経膠腫においても強い多様性が認められることがわかりました。図6においてマルチサンプリングで確認されたそれぞれの遺伝子異常を示しております。同じ患者さんの腫瘍でもすべての場所で確認できる遺伝子異常は全体のわずか10%程度でした。他の多くの異常は一部の場所でしか認められませんでした。そのうえ一か所でも確認できない異常は全体の60%にもなります。これは最近報告された肺がん・腎臓がんよりも強い多様性をもっている結果でした。低悪性度神経膠腫はとても複雑な腫瘍であると言えます。

### 各遺伝子異常をもった腫瘍細胞の割合の分布

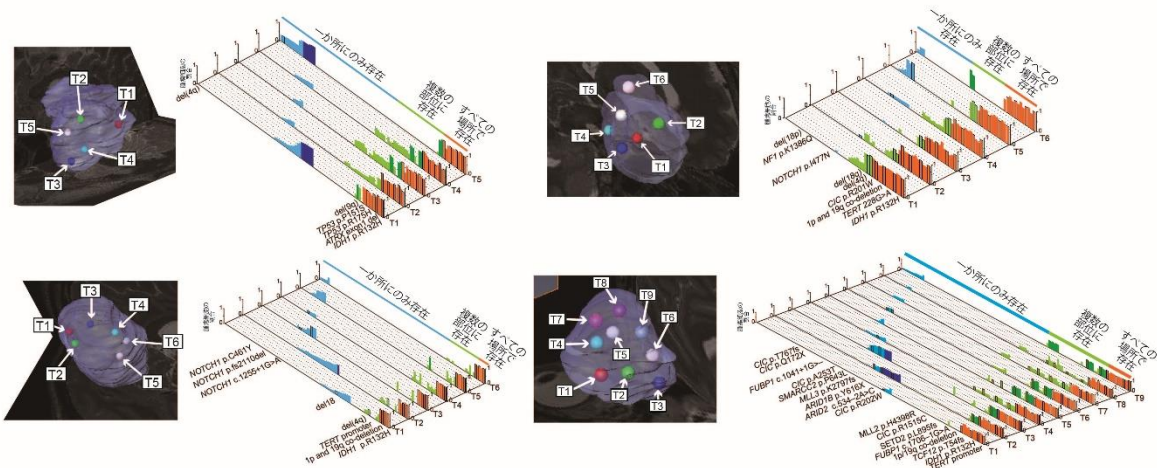


図 6：マルチサンプリング検体の解析における各遺伝子異常の分布

マルチサンプリングの結果を詳細に解析し、各場所での複雑性を評価したあと統合すると一人の患者さんの腫瘍にどのような順番で異常が起こり、どのように腫瘍が広がっていくかということをはっきりとすることができました。代表例を一例示します（図7）。この患者さんでは *IDH1* の異常が起こることにより腫瘍が発生した後、まったく別々に3つの別々の腫瘍細胞が異なる遺伝子異常を獲得して進展しております。順番に遺伝子異常を獲得し外へ外へと広がっていつております。図の腫瘍の上部では別々に進展していった腫瘍が混在しているのがわかりました。また、*CIC* という遺伝子の異常は同じ患者さんでも異なる場所に5種類の異常が起きていることがわかりとても複雑な腫瘍であることがわかりました。

### 低悪性度神経膠腫における腫瘍の進展形式と多様性

(実際の手術検体の上に進展形式を矢印で表示)

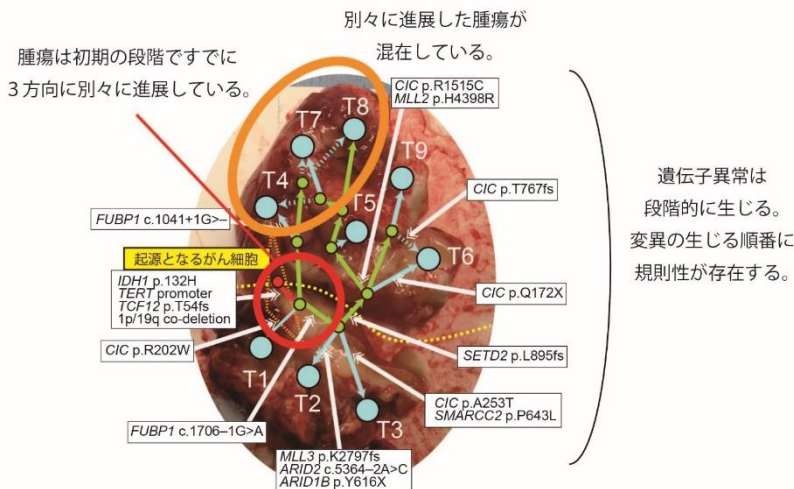


図 7：マルチサンプリング検体の一例



このように低悪性度神経膠腫は腫瘍が発生した後に、腫瘍のあらゆる部位で独立して異なった遺伝子異常が起きており、それぞれの腫瘍細胞が独立して進展つまり悪性化していることが明らかになりました。この結果は治療戦略を考えるうえでとても有用な情報であります。腫瘍の診断において複数の部位から総合的に診断する必要があることがわかり病気の正確な診断の手助けになると考えられます。

### 3. 波及効果

本研究では、世界最大規模の網羅的遺伝子解析を行い、低悪性度神経膠腫に起きている遺伝子異常の全貌を明らかにすることができました。近年、遺伝子解析技術の革新的な進歩により大規模な悪性腫瘍における遺伝子異常の解析が行われております。欧米では多施設共同のもと莫大な費用とマンパワーを使用し成果をあげております。そのような中、我が国からこのような最大規模の網羅的遺伝子解析が発信されることはとても意義深いものです。低悪性度神経膠腫はいまだ治療が困難で有効な治療が見つかっていない疾患であるため新規治療の開発が期待されます。私たちが低悪性度神経膠腫の遺伝子異常の全貌を明らかとし、それぞれの遺伝子異常の役割を解明したことは今後のあらゆる研究の礎となる結果です。今後の研究により低悪性度神経膠腫の新たな分類方法や治療法の開発はもちろん、ゲノム異常に基づいた治療法や薬剤の選択、すなわちオーダーメイド医療の実現がより進むことが期待されこの疾患に苦しむ患者さんたちに利益をもたらすことが期待されます。

本研究は、京都大学大学院医学研究科腫瘍生物学講座 小川誠司教授、名古屋大学大学院医学研究科脳神経外科学 夏目敦至准教授、熊本大学医学部附属病院脳神経外科 中村英夫講師、九州大学大学院医学研究院脳神経外科 溝口昌弘講師、大分大学医学部脳神経外科 阿部竜也准教授、東京女子医科大学脳神経外科 村垣善浩教授、東京大学医科学研究所附属ヒトゲノム解析センター 宮野悟教授らによる共同研究チームによって遂行されました。

### 4. 今後の予定

まだ治療困難ながんはたくさん存在します。これらの病気を治癒させるため、がんの病態解明の研究を続けていきます。

#### <論文タイトルと著者>

Mutational landscape and clonal architecture in grade-II and III gliomas

Hikomichi Suzuki, Kosuke Aoki, Kenichi Chiba, Yusuke Sato, Yusuke Shiozawa, Yuichi Shiraishi, Teppei Shimamura, Atsushi Niida, Kazuya Motomura, Fumiharu Ohka, Takashi Yamamoto, Kuniaki Tanahashi, Melissa Ranjit, Toshihiko Wakabayashi, Tetsuichi Yoshizato, Keisuke Kataoka, Kenichi Yoshida, Yasunobu Nagata, Aiko Sato-Otsubo, Hiroko Tanaka, Masashi Sanada, Yutaka Kondo, Hideo Nakamura, Masahiro Mizoguchi, Tatsuya Abe, Yoshihiro Muragaki, Reiko Watanabe, Ichiro Ito, Satoru Miyano, Atsushi Natsume and Seishi Ogawa



<用語解説>

**注1) 排他的**：2つの遺伝子異常があった時、片側の異常が存在するともう片側の異常が存在することが極めてまれな関係。

**注2) 網羅的解析**：ほぼ完全に調べること。特に今回の場合は、ヒトのゲノム（ゲノムとは DNA のすべての情報を指します）の中でタンパク質の情報を記録している場所をすべて調べたということになります。

**注3) 次世代シーケンサー**：一度に大量の遺伝子配列を読み取ることのできる最新の解析機械。DNA の配列を大量に調べることができる。

**注4) マルチサンプリング**：一人の患者検体から、複数の異なった場所から検体を採取しそれぞれを解析する手法。

**注5) アレル**：対立遺伝子。通常ヒトは父親と母親からそれぞれ1セットのゲノムを受け取る。そのため、各個人はそれぞれの遺伝子の配列を2つ持っている（男性における性染色体を除く）。片側の遺伝子が異常を受けても、もう一方の遺伝子が正常であれば正常なタンパクを作ることができるが2つとも異常となると正常なタンパクを作ることができなくなる。

**注6) DNA メチル化**：ヒトの遺伝子の一部はメチル化を受けており、このメチル化によりその近傍の遺伝子を使用するか使用しないか制御している。