

Impact of genetic analyses on glioblastoma subclassification

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/17309

【総説】

遺伝子解析が膠芽腫亜分類に与えたインパクト

Impact of genetic analyses on glioblastoma subclassification

金沢大学大学院医学系研究科 脳・脊髄機能制御学
(脳神経外科学)

林 裕

1. はじめに

膠芽腫 (GBM, Glioblastoma) は脳内に発生する最も頻度の高い腫瘍のひとつであり、かつ最も悪性度の高い腫瘍である。予後は極めて不良であり、手術による摘出に加え、放射線治療や化学療法などの補助療法を行っても、多くの患者は1年以内に死亡する。

GBMを中心とする星細胞系腫瘍の組織分類および悪性度分類が患者の予後、各種補助療法に対する治療抵抗性を予測する目的でなされてきた。代表的なものとして、古くは1926年のBaileyとCushingによる脳腫瘍分類があげられる。これは当時考えられていた神経系細胞の分化段階を系統的に脳腫瘍に対応させたものであり、このコンセプトは基本的には現時点でも有用

である(図1)。現在最も広く用いられている組織および悪性度分類はWHOによるものであり、1979年に最初の分類が提示され、最近では2007年に新たに改訂された。WHO分類は腫瘍細胞の形態学的特徴(顕微鏡下)と免疫組織学的特徴に基づいている。悪性度は、grade Iからgrade IVに分けられ、grade IVが最も悪性度が高い。WHO分類下で、GBMは星細胞系腫瘍(astrocytic tumours)に分類され、悪性度はgrade IVに相当する。

1980年代に入ると、1986年の聴神経腫瘍における22番染色体のRFLP解析²⁾に代表されるように、分子生物学に基づく遺伝子解析が脳腫瘍学へ応用されるようになった。また同時期に、各種がん遺伝子やがん抑制遺伝子の詳細が報告されるになり、それに伴い、GBMに特徴的な遺伝子をターゲットとした遺伝子

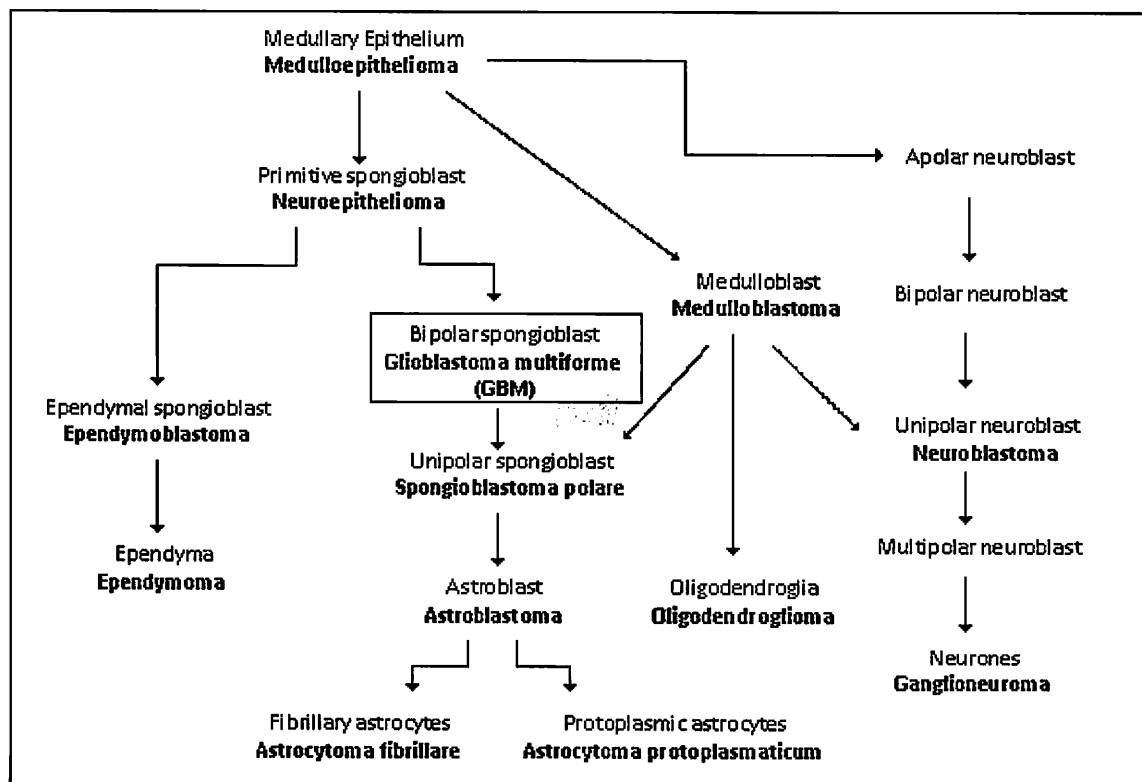


図1. BaileyとCushingによる脳腫瘍分類 (1926年)(文献1より引用)。(文献1より引用、一部改編)

各脳腫瘍は神経系細胞の分化に対応して分類される(腫瘍は太字)。例えば、GBMは双極膠芽細胞(bipolar spongioblast)に由来する腫瘍として分類されている。

約80年前に提示されたこの脳腫瘍分類は、現在では使用されていない腫瘍名も含まれるが、近年提示された神経幹細胞と神経系腫瘍幹細胞からの分化に対応するGBM亜分類と概念的には極めて近い。

解析が行われるようになった。そして、その結果をGBMの亜分類に反映させる試みがなされるようになった。このことは従来の組織学的および免疫組織学的手法では区別することが不可能であったGBMのサブタイプを明らかにし、サブタイプ別の発生過程や、それに基づく予後および治療抵抗性の相違を明らかにすることにつながっていった。

本稿ではGBMの亜分類において、近年の遺伝子解析がもたらした知見と、その重要性、および最近の新たな展開について述べていきたい。

2. Secondary GBMおよびPrimary GBM再考

1980年代後半よりGBMにおける様々な遺伝子異常が報告されるようになった。なかでも10番染色体、17番染色体短腕のLoss of heterozygosity (LOH)およびEpidermal growth factor receptor (EGFR)遺伝子増幅がGBMに高頻度に認められる遺伝子異常として報告された。1993年、von Deimlingらは、これらの遺伝子異常の背景を踏まえ、従来の組織学的および免疫組織学的手法では区別困難なGBMを2群のサブタイプに分けることができると報告した³⁾。すなわち、17番染色体短腕のLOH (LOH17p)を有するEGFR遺伝子増幅 (EGFR amp)を有しない群 (type 1 GBM)とLOH17pを有さず、EGFR ampを有する群 (type 2 GBM)の2群が存在することを報告した。10番染色体のLOH (LOH10)に関しては両群で有意差はなく高頻度に認められた。同時にtype 1 GBMはtype 2 GBMに比べ、若年者に多い

という臨床的特徴が示された。以前よりGBMの予後を左右する重要な因子のひとつに年齢 (若年者ほど予後が良い) が挙げられており、彼らの報告は、遺伝子解析による亜分類がGBMの予後を予測する可能性を示すこととなった。また、LOH17pは後に同部位に位置するTP53の点突然変異を意味することとなる。

この亜分類が報告された背景には、遺伝子異常とは別に以下の臨床的特徴があった。GBMをWHO分類に示されたように星細胞系腫瘍の最も悪性度の高い腫瘍形態として考えたとき、それは前段階の星細胞性腫瘍からのプログレッションの結果発生する腫瘍と考えることができる。実際、若年時に良性の星細胞腫瘍と診断された患者が後にGBMとして再発をきたす例 (secondary GBM, 図2) が経験されていた。しかし、臨床的には大多数のGBMは良性の星細胞腫瘍の前段階を経ず、新たな (*de novo*) 腫瘍 (primary GBM) として出現する。このような臨床的背景より、以前より、組織学的には区別不能なGBMの中には異なる群が存在することが示唆されていた。

1996年、Watanabeらは前述した臨床的に異なる発生過程をたどる2群のGBMにおいてEGFRの発現とTP53の点突然変異を調べたところ、両群において明らかな相違が確認された。すなわち、secondary GBMにおいてはTP53点突然変異を有するがEGFRの過剰発現を認めないのに対し、primary GBMではTP53点突然変異がなく、EGFRの過剰発現を認めた⁴⁾。EGFRの過剰発現は後に遺伝子解析によりEGFR ampとして認識されること

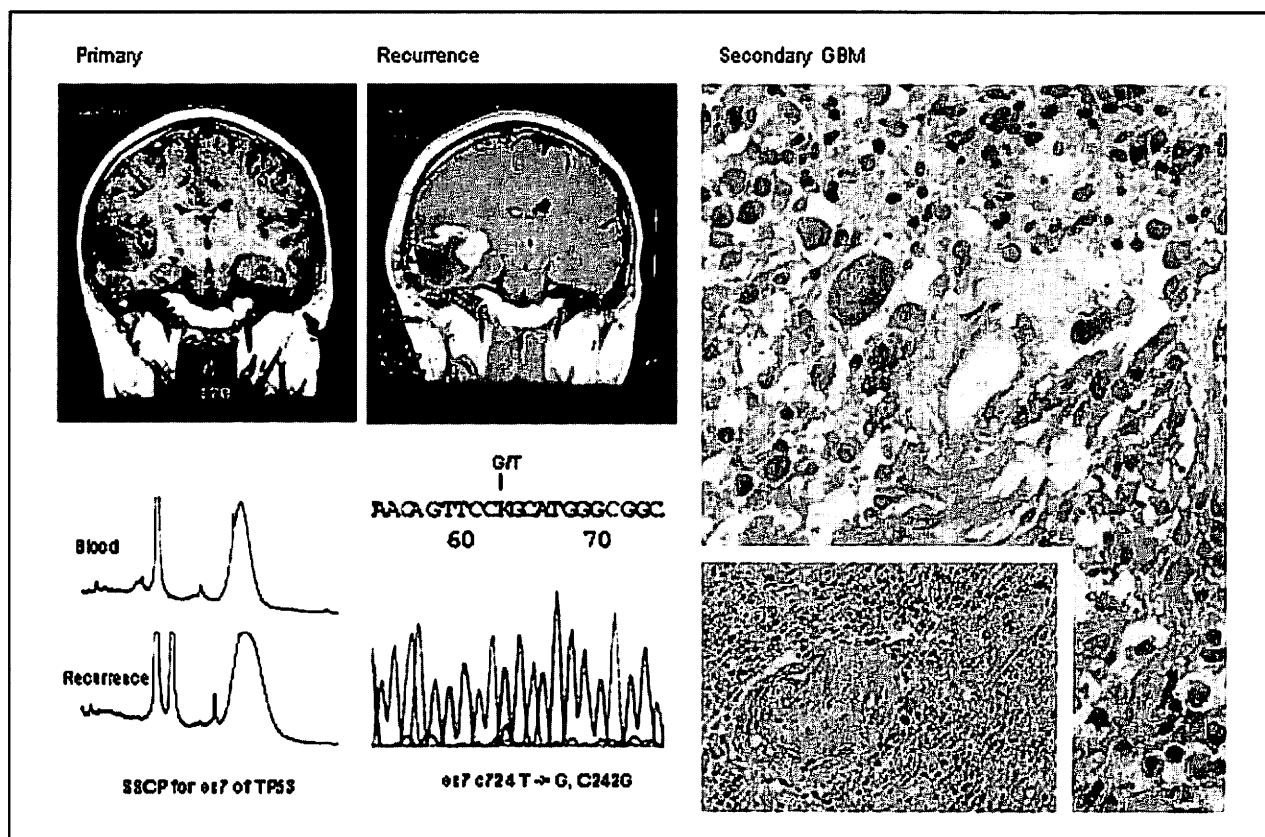


図2. 典型的なsecondary GBM. 左上のMRI像は再発時に造影効果を伴う腫瘍に変化したことを示す。右半分の組織像は再発時のもので、典型的なGBMの組織像を示す。左下は遺伝子解析の結果で、本腫瘍がTP53の点突然変異を有することを示している。また、本腫瘍ではEGFR ampは認めなかった (data not shown)。

となる。

以上の2編の報告はそれまで組織学および免疫組織学には区別不能であったGBMが遺伝子的背景および臨床的背景により、すくなくとも2群に分類されることをあらためて示し、GBMの腫瘍発生を考える上で、また、それまでは漠然と捉えられてきたGBM内での予後および各種治療に対する抵抗性の違いを説明する上で、極めて重要な問題を提示することとなった。

その後、*EGFR* ampや*TP53*点突然変異以外に、細胞周期、アポトーシス、あるいは神経細胞分化などの様々なシグナル伝達経路に介在する遺伝子異常がGBMの亜分類と関連付けられて報告されるようになる。代表的なものとして、癌抑制遺伝子*PTEN*の変異や細胞周期の調節に関連する*p16^{INK4a}*、*RB1*などの遺伝子異常が挙げられる。また、これらの遺伝子異常の間には、*EGFR* ampと*p16^{INK4a}*の相対的欠失は同時に存在する傾向や、*p16^{INK4a}*と*RB1*変異が互いに相補的に存在するなどの遺伝子異常における相互関係での特徴も見いだされた⁵⁴⁾。このような遺伝子異常の相互の関連性はGBMの亜分類においてゲノム全体を捉えて解析することの必要性を提示することとなった。

以上のように、遺伝子解析に基づくGBMの亜分類は、従来のsecondary GBMおよびprimary GBMという臨床的概念に新たな意味を与えることとなった (図3)。

3. ポストゲノム時代のGBM亜分類

限られた遺伝子をターゲットとした解析により、GBMには少なくとも2群のサブタイプが存在することが明らかになったが、次の段階として、その亜分類がGBMの予後や治療抵抗性などどのように関わってくるかが問題となってきた。*TP53*の異常を有する群 (主にsecondary GBM) やLOH1p, LOH19qを有する群においては予後が優位に良いとする報告などもみられ、遺伝子解析に基づくGBMの亜分類の臨床的意義が少しずつ示されるようになってきたが、以前として議論が続く。結論には至っていない。このことは、限られた遺伝子をターゲットとする従来の解析方法では、それ以外の遺伝子異常の関与を評価できないこと、また遺伝子本体の異常に加えて、プロモーターのメチレーションなどのエピジェネティックな修飾による遺伝子発現の変化など無視できない因子が存在することなどが原因として考

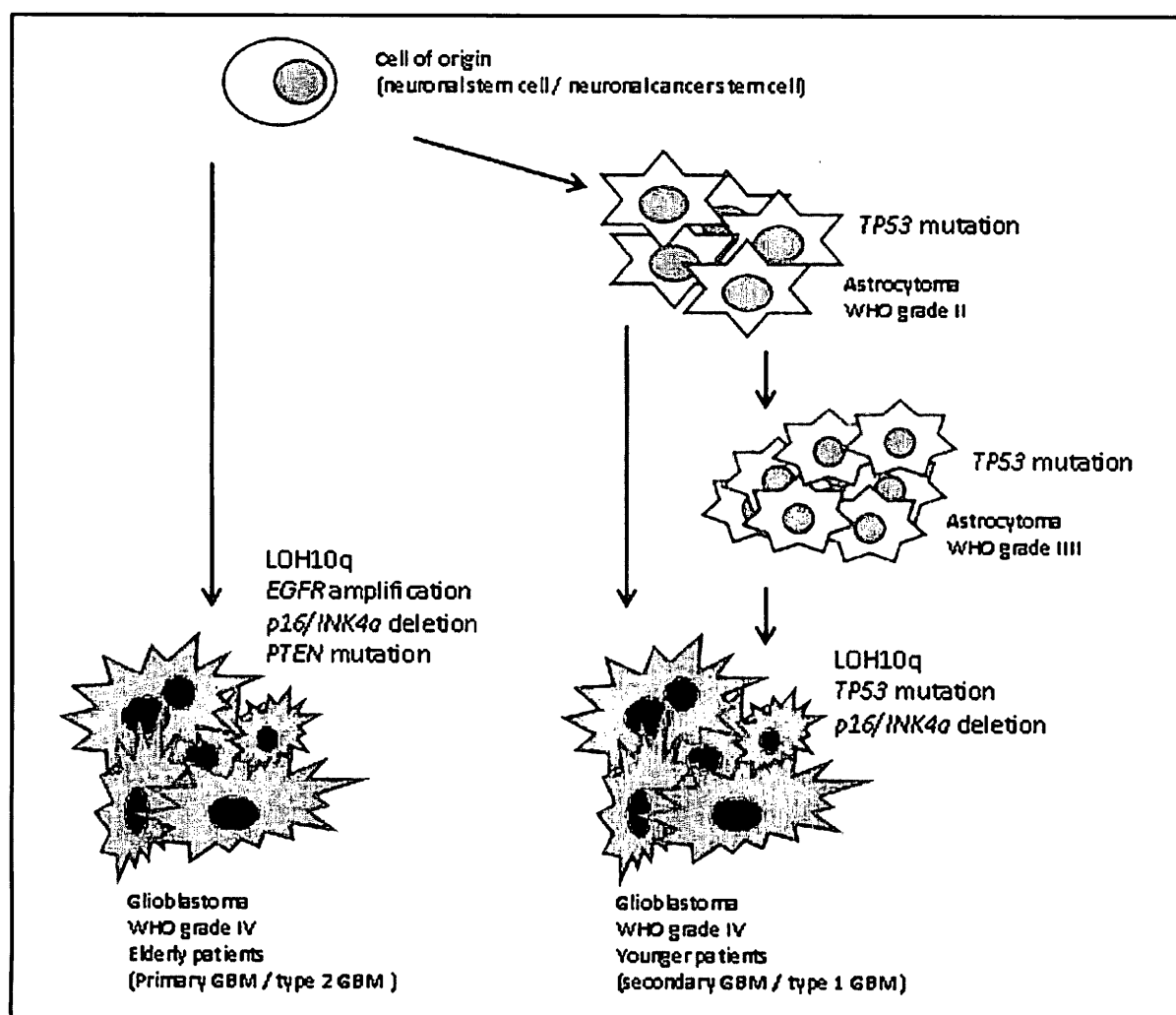


図3. Genetic pathway to GBM. 遺伝子解析により2群に分けられたGBMの発生過程のモデル図を示す。組織学および免疫組織学には区別困難なGBMは良性の星細胞腫 (astrocytoma) からプロGRESSIONしたsecondary GBMと*de novo*に発生するprimary GBMに分けることができ、それぞれに特徴的な遺伝子異常を有する。遺伝子異常の特徴から、それぞれをtype 1 GBMおよびtype 2 GBMに分類することもある。

えられる。これらの問題点を解決する方法として、近年DNAマイクロアレイによる解析がGBMの亜分類にも応用されるようになってきた。この技術は、ヒトの全ゲノム解読に並行して、一度に数万個の核酸の濃度を測定する方法として開発・発展し、サンプルがmRNA由来であれば各遺伝子の発現量を、ゲノムDNA由来であればゲノムコピー数を一度に測定することを可能にした。GBMにおいてもこの技術を利用した、クラスター解析によるclass discoveryが試みられるようになった。2006年、Maherらはマイクロアレイを用い、ゲノムコピー数の変化を抽出し、unsupervised クラスター解析を行った結果、secondary GBMとprimary GBMは、明らかに異なるクラスに分類されることをあらためて報告した⁹⁾。更には、secondary GBM群の中にも、異なるサブタイプが存在し、その相違はGBMに至るブロッグレーションに必要な時間に反映されることを示した。これらの結果は、従来の遺伝子解析のように特定の遺伝子をターゲットとして解析するものではないが、結果として、従来と同様なGBMの亜分類が導かれたことの意味は大きい。また、同時期、Tsoらはマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルから、やはりsecondary GBMとprimary GBMが異なるサブタイプに分類されることを示した。secondary GBMにおいては主に、細胞周期に関連する遺伝子群の発現が有意に高かったが、一方、primary GBMにおいては細胞外マトリックスのシグナル伝達経路に関連する遺伝子群の発現が高かった¹⁰⁾。このことはsecondary GBMにおけるTP53異常が関連するシグナル伝達系のひとつとして細胞周期と密接に結びついており、また、EGFR ampに代表されるprimary GBMにおける異常が膜蛋白を介するシグナル伝達経路に関連していること考慮すると、従来の亜分類を支持する結果として理解される。

マイクロアレイによる遺伝子発現プロファイルの解析結果は従来のGBMの亜分類を支持するのみならず、GBM治療におけるターゲットの検討にも影響を与えた。すなわち、臨床的にはGBMの約5%がsecondary GBMであり、大部分のGBMはprimary GBMに属することより、当面の目標としてprimary GBMにおいて特徴的な因子を治療のターゲットとして設定することは、十分に理論的・現実的な戦略であると考えられる。例えば、primary GBMの特徴のひとつにEGFR ampがあるが、近年、このEGFRをターゲットとしたEGFRキナーゼインヒビター (erlotinib) による分子標的療法がGBM治療の可能性として報告された¹¹⁾。また、ほかにもGBMの生物学的特徴である周辺への腫瘍細胞の浸潤能に関連する代表的な因子であるMMPは前述したTsoらの報告でもprimary GBMにおいて有意な高発現を示しており、これらの因子もGBM治療のターゲットとして期待されている¹²⁾。

class discoveryを目的としたマイクロアレイによるゲノム解析および遺伝子発現解析は、前述したように従来の亜分類を支持する一方、GBMにおける新たな亜分類の可能性を提示することとなった。PhillipsらはGBMを遺伝子発現パターンに基づき、新たな3つのサブタイプに分類した¹³⁾。それぞれのサブタイプの特徴は神経幹細胞 (neural stem cell, NSC) からの神経発生段階に対応したものであり、サブタイプに応じてGBMの予後が異なることを示した。彼らの提示した亜分類は従来のものと重なる部分もあるが、基本的には異なるコンセプトに基づく亜分類と考えられる。すなわち、現在まで未解決の問題として残されているGBMのcell of originに深く関わるものであり、

NSCあるいは神経系腫瘍幹細胞 (neural cancer stem cell, NCSC) の研究へとつながっていくことになる。

4. これからのGBM亜分類

—NSCおよびNCSCと新たな脳腫瘍モデルの重要性—

1997年、BonnetとDickによって、AMLにおける腫瘍幹細胞 (cancer stem cell, CSC) の存在が示されて以来¹⁴⁾、自己複製能と分化能を有するCSCの定義が広く受け入れられるようになった。近年、様々なデータが、GBMを含めた脳腫瘍においても、NCSCを含むNSCが腫瘍のcell of originである可能性を示している。前述したように、Phillipsらの提示するNSCからの細胞の発生分化段階に対応したGBMの亜分類は、GBMの発生に関与するNSCおよびNCSCへの関心を更に高めることとなった。また、このコンセプトは古くはBaileyとCushingによる脳腫瘍分類に通ずるものであり、歴史的な脳腫瘍分類に新たな意義を与えることとなった。

これからのGBMの亜分類の方向性を検討する上で、遺伝子解析に基づく亜分類とNSCおよびNCSCに由来する腫瘍細胞の分化・発生に基づく亜分類の間での関連性を示すことが重要な課題と考えられる。例えば、PTEN変異はprimary GBMにおいて比較的高頻度に認められる異常であるが、近年、PTENがNSCの自己複製プログラムに関わっていることが示された¹⁵⁾。すなわちPTEN変異に伴う、NSCの自己複製プログラムの異常が、どの段階で、どのように腫瘍発生に関与しているかを明らかにすることがGBMの亜分類に新たな意味を与えることとなると考えられる。

各種遺伝子の変異およびNCSCを含むNSCがどのようにGBMの発生に関わってくるかを明らかにすることは、結果としてGBMの適切な亜分類を定義することを意味する。臨床材料から得られた従来の知見が、実際どのような生物学的意味を持つかを確かめることは、亜分類に基づく予後や治療抵抗性を類推し、更には新たな治療法の開発につながってくる。そのための極めて重要な手段がマウスあるいはラットなどの実験動物での脳腫瘍モデルを用いた生体内での検討と考えられる。ヒトGBMから誘導された、いくつかのGBM細胞株は*in vitro*の実験系ではある程度有用であるが、継代を経て確立された細胞株自体の性格が*in vivo*のGBMを十分に反映していないことが多く、その実験知見が生体内でも同様な知見として治療に反映されることは比較的稀である。また化学物質や遺伝子操作を用いた生体内脳腫瘍モデルの報告は散見されるが、ヒトのGBMに対応する適切な生体内GBMモデルに関しては、確立されたものの報告はほとんどないのが現状である。今後、GBMの研究を進める上で、形態学的にヒトGBMに類似し、かつ生物学的にはGBM亜分類に関係する遺伝子群の異常とNCSCを含むNSCへの関与を有する脳腫瘍モデルの開発が待たれるところである。我々の教室でもプロジェクトの一つとして脳腫瘍モデルの開発に取り組んでいる。

5. おわりに

1980年代後半から脳腫瘍の病態を理解する上での重要な手段として遺伝子解析が導入された。GBMに対する遺伝子解析は、その亜分類に新たな展開をもたらすこととなった。GBM亜分類に基づく予後評価と放射線・化学療法に対する治療抵抗性の予測は、適切な治療法の確立のための重要な第一歩である。近

年、マイクロアレイ技術の発展、NSCおよびNCSCの研究により、GBM亜分類は更に新たな局面に向かいつつある。今後の知見を踏まえたGBMの亜分類が意味のある診療情報として患者の利益に繋がる日も近いと考えられる。

文 献

- 1) Bailey P, Cushing H. A classification of the tumors of the glioma group on a histogenetic basis with a correlated study of prognosis. Lippincot JB: Philadelphia, 1926
- 2) Seizinger BR, Martuza RL, Gusella JF. Loss of genes on chromosome 22 in tumorigenesis of human acoustic neuroma. *Nature* 322: 644-647, 1986
- 3) von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D, et al. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol* 3: 19-26, 1993
- 4) Watanabe K, Tachibana O, Sato K, et al. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutation are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastoma. *Brain Pathol* 6: 217-224, 1996
- 5) Ueki K, Ono Y, Henson JW, et al. CDKN2/p16 or RB Alterations Occur in the Majority of Glioblastomas Are Inversely Correlated. *Cancer Res* 56: 150-153, 1996
- 6) Hayashi Y, Ueki K, Waha A, et al. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 7: 871-875, 1997
- 7) Duerr EM, Rollbrocker B, Hayashi Y, et al. PTEN mutations in gliomas and glioneuronal tumors. *Oncogene* 16: 2259-2264, 1998
- 8) Watanabe T, Hirota Y, Arakawa Y, et al. Frequent LOH at chromosome 12q22-23 and Apaf-1 inactivation in glioma. *Brain Pathol* 13: 431-439, 2003
- 9) Maher EA, Brennan C, Wen PY, et al. Marked genomic differences characterize primary and secondary glioblastoma subtypes and identify two distinct molecular and clinical secondary glioblastoma entities. *Cancer Res* 66: 11502-11513, 2006
- 10) Tso C-L, Freije WA, Day A, et al. Distinct transcription profiles of primary and secondary glioblastoma subgroups. *Cancer Res* 66: 159-167, 2006
- 11) Mellinghoff IK, Wang MY, Vivanco I, et al. Molecular determinants of the response of glioblastomas to EGFR kinase inhibitors. *N Engl J Med* 353: 2012-2024, 2005
- 12) Nakada M, Yamada A, Takino T, et al. Suppression of membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MMP)-mediated MMP-2 activation and tumor invasion by testican 3 and its splicing variant gene product, N-Tes. *Cancer Res* 61: 8896-8902, 2001
- 13) Phillips HS, Kharbanda S, Chen R, et al. Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell* 9: 157-173, 2006
- 14) Bonnet H, Godlee R. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* 3: 730-737, 1997
- 15) Groszer M, Erickson R, Scripture-Adams DD, et al. PTEN negatively regulates neural stem cell self-renewal by modulating G0-G1 cell cycle entry. *Proc Natl Acad Sci USA* 103: 111-116, 2006