

16-14 「放射線・化学療法が有効な悪性神経膠腫の遺伝子学的特徴の解析と新規治療法の開発」に関する研究

主任研究者 国立がんセンター中央病院脳神経外科医長 渋井壮一郎

研究成果の要旨

本研究は癌の中でも最も予後の悪い膠芽腫(Glioblastoma)を含む悪性神経膠腫について Microarray を用いた網羅的な腫瘍細胞の遺伝子発現の解析を行うことにより、化学療法や放射線治療が有効な症例の遺伝子学的特徴を特定し、悪性神経膠腫に対する新規治療法を開発することを目的とする。

初期治療効果および再発までの期間をもとに Microarray による遺伝子発現について検討した。放射線治療とニドランによる初期治療に抵抗性を示し腫瘍増大が認められた膠芽腫2症例および6ヶ月以内に再発・腫瘍増大を認めた膠芽腫3症例は、1年以上再発を認めない膠芽腫5症例に比べ、EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)や Cyclin D2 などの100の遺伝子の発現亢進が認められた。特にEGFRの発現は、予後良好群に比べ、それぞれ平均36.2倍・8.0倍に発現が亢進していた。ヒトの膠芽腫組織においてもEGFR遺伝子の発現が増殖能の獲得や放射線・化学療法の感受性および再発までの期間に影響を与えていることが示唆された。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
渋井壮一郎 *1	国立がんセンター中央病院 脳神経外科医長	放射線・化学療法が有効な悪性神経膠腫の遺伝子学的特徴の解析と新規治療法の開発
西川 亮 *1	埼玉医科大学 脳神経外科教授	同上
永根 基雄 *1	杏林大学 脳神経外科講師	同上
藤堂 具紀 *1	東京大学大学院脳神経医学専攻講師	同上
北中 千史 *1	山形大学医学部器官機能統御学講座 腫瘍分子医科学分野教授	同上
村垣 善浩 *1	東京女子医科大学大学院 先端生命医科学研究所 先端工学外 科学分野助手	同上

*1：平成16年4月1日～平成17年3月31日

総括研究報告

1 研究目的

悪性脳腫瘍の中で最も多い膠芽腫(Glioblastoma)の5年生存率は10%以下であり、手術・放射線化学療法の進歩にもかかわらず、あらゆる癌の中でも最も予後の悪い腫瘍である。本研究においては、Microarrayを用いて網羅的な腫瘍細胞の遺伝子発現の解析を行い、ニトロソウレア等の化学療法や放射線治療が有効な症例の遺伝子学的特徴を特定する。これらの解析から得られた悪性神経腫瘍の遺伝子学的特徴を他の癌腫で得られたMicroarrayのデータと比較検討することにより、他の癌腫で投与された抗癌剤の中で悪性神経腫瘍にも有効と考えられる抗癌剤を見だし、悪性神経腫瘍に対する新規治療法を開発することを目的とする。

さらに Single-nucleotide- polymorphism (SNP)についても検討し、悪性神経腫瘍の発生要因や放射線・化学療法の効果・副作用との関連についても検討する。特に脳腫瘍に対する放射線治療は、照射後6ヶ月から1年で発生する放射線壊死が治療上問題となるが、血液DNAのSNPを解析することにより放射線壊死発生の危険要因となる遺伝子学的特徴を明らかにすることにより、放射線壊死発生の危険性を予測し、さらに予防する手がかりを探索することを目的とする。

現在 Microarray を用いた様々な癌の遺伝子プロファイルの大規模な構築が国内のいくつかの施設で進行中であるが、脳腫瘍は分類が複雑なため、いずれの研究においても脳腫瘍は含まれていない。したがって、星細胞腫・悪性星細胞腫・乏突起膠腫・膠芽腫を含む神経腫瘍についても、症例数の多い今回の共同研究施設から腫瘍検体を集め、Microarrayを用いて腫瘍の遺伝子学的特徴を解析し、脳腫瘍の遺伝子プロファイルデータベース構築の基礎を固める。

2 研究成果

これまでに40例の悪性神経腫瘍症例の凍結腫瘍組織および腫瘍組織の含まれていなかった腫瘍周辺組織からRNAを抽出し、31例のMicroarray解析を行った。組織は膠芽腫 Glioblastoma:GBM)が12例、悪性星細胞腫 (Anaplastic Astrocytoma:AA)が6例、星細胞腫 (Astrocytoma grade II)が2例、乏突起膠腫系腫瘍 (Anaplastic Oligodendroglioma:A0A,

Oligodendroglioma:Oli, Oligoastrocytoma:OA)が6例、放射線壊死周囲組織が1例、腫瘍が含まれていなかった

腫瘍周辺脳組織が3例であった。

悪性神経腫瘍に対しては、腫瘍摘出後に、脳浮腫領域を含む腫瘍部への局所照射 60Gy と ACNU (ニドラン) による化学療法が国内における標準治療となっている。腫瘍摘出後に評価病変を有する症例について、再発までの期間をもとに Microarray による遺伝子発現について検討した。放射線治療とニドランによる初期治療に抵抗性を示し腫瘍増大が認められた膠芽腫2症例および6ヶ月以内に再発・腫瘍増大を認めた膠芽腫3症例は、1年以上再発を認めない膠芽腫5症例に比べ、EGFR(Epidermal Growth Factor Receptor)や Cyclin D2 などの遺伝子の他に、血管新生因子・浸潤能関連遺伝子・細胞周期促進因子など100の遺伝子の発現亢進が認められた。特にEGFRの発現は、予後良好群に比べ、それぞれ平均36.2倍・8.0倍に発現が亢進していた。

GBM 症例の約40%ではp53の変異を伴わず、EGFR 遺伝子の増幅と過剰発現が認められる。特にEGFRの細胞外ドメインの一部であるアミノ酸の6番目から273番目までが欠損したdelta EGFRと呼ばれる変異型遺伝子が、EGFR 遺伝子が増幅している症例で見いだされた。我々は、EGFR 遺伝子の下流のシグナル伝達経路について細胞株を用いて研究を行い、これらの細胞株をヌードマウスに移植したマウス脳内モデルにおいても検証を行ってきた。GBMに特徴的なdelta EGFRという遺伝子は、細胞外ドメインの一部を欠くために、delta EGFRを発現した細胞株においては、EGFなどのligandがなくとも、恒常的な自己リン酸化によってtyrosine kinaseドメインが恒常的に活性化され、その結果無血清培地においても増殖を続け、さらにヌードマウス脳内においては急速な腫瘍増大をおこすことを明らかにした。また親株と比較して化学療法剤(ニトロソウレア・シスプラチン)に抵抗性であることが判明した。その詳細なシグナル伝達経路はEGFRの持続的な活性により、PI 3-Kの亢進がおき、さらにAktのリン酸化がおきていることが明らかになった。さらに、Aktのリン酸化によりp27の発現が抑制され、その結果として、CDK2- Cyclin A/Cyclin Dの活性が常時維持され、RB蛋白の高リン酸化(活性化)が起き、細胞の旺盛な増殖につながる事が明かとなった。

Microarray解析の結果から、ヒトのGBM膠芽腫組織においてもEGFR遺伝子が増殖能の獲得や放射線・化学療法の感受性および再発までの期間に影響を与えていることが示唆された。非小細胞性肺癌に対する治療として、EGFRのシグナル伝達を抑制するイレッサ(Gefitinib)の効果が報告されているが、GBMに対しても放射線とGefitinib

による治療が再発を抑制する可能性があると考えられる。

乏突起膠腫系腫瘍(Oligo, OA, AOA)において、腫瘍細胞の染色体 1p の欠失している症例は抗癌剤に対して感受性をもつことが報告され、ニドラン・プロカルバジン・ビンクリスチンによる治療が効果を上げているが、化学療法感受性群の遺伝子は未解明である。現在 Microarray による解析をすすめているが、今後乏突起膠腫系腫瘍の遺伝子プロファイルと治療効果のデータを蓄積することにより化学療法感受性群の遺伝子を明らかにできる可能性がある。

平成17年度にはさらに解析症例を100例以上追加することを目標とし、Microarray による悪性神経腫瘍の網羅的な遺伝子プロファイルを蓄積し、放射線・抗癌剤の効果を腫瘍画像所見と神経学的推移などの臨床経過を見ながら、放射線・抗癌剤が有効・無効症例の遺伝子学的特徴を検討していく予定である。蓄積された脳腫瘍の遺伝子プロファイルは、日本における脳腫瘍遺伝子プロファイルデータベースとして活用し、抗癌剤に対して感受性をもつ他の臓器癌の遺伝子学的特徴と比較検討することにより、当研究期間内に新規薬剤・診断薬の開発をすすめていく予定である。

3 倫理面への配慮

本研究は、臨床検体提供者が決して不利益を被る事の無いように計画段階から倫理面を考慮し、腫瘍検体の提供に当たり、各研究者の施設の倫理委員会に申請し承諾を得た。研究に当たり「脳腫瘍のゲノム・プロテオーム解析とその臨床応用を目指す多施設共同研究」として国立がんセンター倫理委員会に申請を行った。遺伝子解析について手術・腫瘍摘出前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを取得し、連結可能な臨床検体の匿名化を行い、放射線・化学療法の効果判定を含め、患者のプライバシーが第三者に知り得ることがないように注意した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Shibui S, A randomized controlled trial on malignant brain tumors. The activities of Japan Clinical Oncology Group (JCOG)-Brain Tumor Study Group (BTSG). *Neurol med chirur* 44: 220-221, 2004
2. Mukasa A, Nishikawa R, et al., Selective expression of a subset of neuronal genes in oligodendroglioma with chromosome 1p loss. *Brain Pathology* 14:34-42, 2004
3. Inagawa H, Nishikawa R, et al., Cytologic features of chordoid meningioma. A case report. *Acta Cytologica* 48:397-401, 2004
4. Nishikawa R, Narita Y, et al., Immunohistochemical analysis of the mutant epidermal growth factor receptor, Δ EGFR, in glioblastoma. *Brain Tumor Pathology*, 21:53-56, 2004
5. Todo T, Rabkin SD, Development of oncolytic replication-competent herpes simplex virus vectors: the G207 paradigm. In Curiel DT, Douglas JT (eds) : *Cancer Gene Therapy*. Totowa, NJ, Humana Press : 199-210, 2004.
6. Shibahara J, Todo T, et al., M Papillary neuroepithelial tumor of the pineal region. A case report. *Acta Neuropathol* 108 : 337-340, 2004.
7. Nabeyama K, Todo T, et al., Beneficial effects of costimulatory blockade with anti-inducible costimulator antibody in conjunction with CTLA4Ig on prevention of islet xenograft rejection from rat to mouse. *Transplantation* 78:1590-1596, 2004.
8. Nakano K, Todo T, et al., Enhanced efficacy of conditionally replicating herpes simplex virus (G207) combined with 5-fluorouracil and surgical resection in peritoneal cancer dissemination models. *J Gene Med* 2005.
9. Kamada K, Todo T, et al: Functional identification of the primary motor area by corticospinal tractography. *Neurosurgery* 56:98-109; discussion 198-109, 2005.
10. Sunayama J, Kitanaka C, et al. Physical and functional interaction between BH3-only protein Hrk and mitochondrial pore-forming protein p32.

- Cell Death Differ., 11: 771-781, 2004
11. Hata N, Muragaki Y, et al., Intraoperative Tumor Segmentation and Volume Measurement in MRI-Guided Glioma Surgery for Tumor Resection Rate Control. Acad Radiol. 12:116-122, 2005
 12. Muragaki Y, et al., Advanced information-guided surgery by integration of data from different modality. Computer Assisted Radiology and Surgery: international congress series 1268: 693-696, 2004
 13. Omori S, Muragaki Y, et al., Robotic Laser Surgery with $\lambda = 2.8 \mu\text{m}$ Microlaser in Neurosurgery, Journal of Robotics and Mechatronics, Vol.16 No.2, 122-128, 2004
 14. Yamane F, Muragaki Y, et al., Preoperative mapping for patients with supplementary motor area epilepsy: multimodality brain mapping. Psychiatry Clin Neurosci. 58(3):S16-21, 2004
- 112-118, 2004
10. 村垣善浩, 他, 機能マッピングと術中 MRI 併用によるグリオーマ機能部位同定. 吉井與志彦編 脳腫瘍の外科, メディカ出版, 大阪, 161 - 164, 2004

日本語論文

1. 渋谷壮一郎, EBM に基づく悪性神経腫瘍の化学療法. 脳神経外科速報 14:777-782, 2004
2. 渋谷壮一郎, 野村和弘, 脳腫瘍の疫学と統計. 脳神経外科学体系 6 脳腫瘍 I p13-27, 2004. 中山書店. 東京
3. 嘉山孝正, 渋谷壮一郎, テント上グリオーマの手術ステージ分類と手術方針. Jpn J Neurosurg 13: 448-453, 2004
4. 三島一彦, 西川亮, 廣瀬隆則, 松谷雅生. 頭蓋内胚細胞性腫瘍における増殖因子受容体 c-Met 発現の検討. 日本内分泌学会雑誌 80(Supple):87-91, 2004
5. 熊切敦, 永根基雄, 他, 腫瘍に類似した multiple sclerosis (Balo 病) の一例 (Tumefactive Balo concentric multiple sclerosis. A case report). Neuro-Oncology (Tokyo) 14 (1): 85-89, 2004
6. 永根基雄, 脳腫瘍の分子生物学. 脳腫瘍 I, 脳神経外科学大系 6, 第 1 版, 山浦晶編, 東京, 64-89, 2004
7. 北中 千史. がんと非アポトーシス型プログラム細胞死. 実験医学, 22: 1590-1597, 2004
8. 村垣善浩, 他, 術中 MRI・ナビゲーション (3D 画像医学の進歩) 日本臨床 62(4) 697-706, 2004
9. 村垣善浩, 他, 摘出量最大化のための Glioma 手術戦略 (グリオーマ手術の進歩). 高倉公朋 (編), 脳神経外科の最新医療, 先端医療技術研究所, 東京,