

学内グラント 報告書

平成25年度 学内グラント終了時報告書

小児及び若年者神経膠腫における予後因子としての
ヒストン H3.3 遺伝子変異の解析

研究代表者 安達 淳一 (国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科)

研究分担者 西川 亮*

緒言

神経膠腫の予後を予測する分子マーカーとして現在確立している因子としては、MGMT (*O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase) 遺伝子プロモーターのメチル化の有無、IDH1 (Isocitrate dehydrogenase 1) 遺伝子の変異の有無、染色体 1p/19q の共欠失の有無の3つが挙げられる。すなわち、MGMT プロモーターメチル化の存在、或いは染色体 1p/19q 共欠失の存在は grade 3, 4 神経膠腫で、IDH1 変異の存在は grade 2~4 神経膠腫で予後良好因子と言われている¹⁾。しかしながら、これらの事実は成人神経膠腫に当てはまるものであり、小児や若年者神経膠腫での解析から得られたものではない。小児神経膠腫は、その発生や進展に関与する遺伝子異常は成人神経膠腫とは明らかに異なり、予後予測因子として確立された分子マーカーは現時点では存在しない^{2,3)}。

最近、20歳以下の小児及び若年者の神経膠腫のうち、びまん性脳幹神経膠腫の70%以上、テント上神経膠腫の約30%でヒストンH3.3タンパク質をコードする遺伝子のコドン27か、コドン34のアミノ酸を変化させる変異の存在が確認された^{4,5)}。ヒストンH3.3の機能に変化が生じると、ヌクレオソームの構造や機能が変わり、遺伝子の正常な転写調節が困難になったり、テロメアが不安定となり細胞の不死化に繋がると言われている⁶⁾。Khuong-Quang らはヒストンH3.3遺伝子変異のうち、コドン27のアミノ酸 lysine が methionine に置き換わった (K27M) 症例では予後が不良であったと報告している⁷⁾が、症例数が少ないため予後因子となりうるかどうかは现阶段では判然としない。

そこで、今回、我々は当施設での小児及び若年者

神経膠腫 33 例を用い、ヒストンH3.3 遺伝子のコドン27とコドン34の変異につき解析を行い、臨床データとの関連を比較して、ヒストンH3.3 遺伝子変異が小児及び若年者神経膠腫の予後を予測する分子マーカーになりうる可能性につき検討することとした。

症例、方法

画像診断で神経膠腫が疑われ、インフォームドコンセントが取得できた患者 (20歳未満の小児及び若年者が患者なので、その保護者から取得) を対象とした。当科にて手術で腫瘍組織が得られた初発の小児~若年のテント上下グリオーマ33例を対象とした。内訳は low-grade glioma (LGG) が12例、high-grade glioma (HGG) が21例であった。手術時に採取した腫瘍組織を、UltraClean Tissue & Cell DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories 社) を用いてDNAを採取した。抽出し精製したDNAを、LightCycler480システム (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いた高解像能融解曲線分析法にて、まずヒストンH3.3 遺伝子のコドン27及びコドン34に変異がないかどうかのスクリーニングを行った。高解像能融解曲線分析法の詳細は以下の条件とした。まず、目的のヒストンH3.3 遺伝子のコドン27及びコドン34を夾んでPCRで増幅した。PCRのプライマーは Khuong-Quang ら⁷⁾の報告に基づいてデザインした (表1)。DNAインターカレート色素を含む LightCycler HRM マスターミックス (ロシュ社) を使用し、反応液量20 µlとしてPCR反応を進めた。

PCR サイクルの条件は以下の通りとした。

DNA変成：95℃、3分。

PCR サイクル：94℃、30秒 (DNA変成) / 57℃、30秒 (アニーリング) / 72℃、40秒 (DNA伸長) の条件で30回のサイクル後に72℃、40秒 (最終伸長)。

*国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科

この後に融解曲線へのステップとして95℃ 1分, 50℃ 1分, 72℃ 5秒の後, 95℃へ向かって1℃につき30回連続して蛍光を取得した. ヒストンH3.3遺伝子に変異があると, 変異の無い野生型と比べて2本鎖DNAにミスマッチが生じてDNA融解温度が上昇した. この融解温度の違いをLightCycler480システムが図1のように解析してヒストンH3.3遺伝子変異の有無が検出された. 以上の高解像能融解曲線分析法にて遺伝子変異の存在が推定されるサンプルに対して, 引き続きABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Life Technologies) を用いて直接シーケンス法を行い,

変異の部位と種類を同定した.

結果

LGG例では本遺伝子変異はみられなかった. 3例のHGGにおいてコドン27でのAAG(K) → ATG(M)変異がみられた(表2). これらの3例は摘出術後に照射, 化学療法を行ったが, 全て術後4ヵ月以内に播種再発し全経過7ヵ月以内に死亡した. この経過は, ヒストンH3.3遺伝子変異のみられないHGGと比して明らかに悪かった(表3, 図1).

表 1.

The primers designed to the target sequences of the *histone H3.3* gene

5'-TTGATTTTTCAATGCTGGTAGG -3'(sense)
5'-AAGAGAGAACTTTGTCCCATTTT -3'

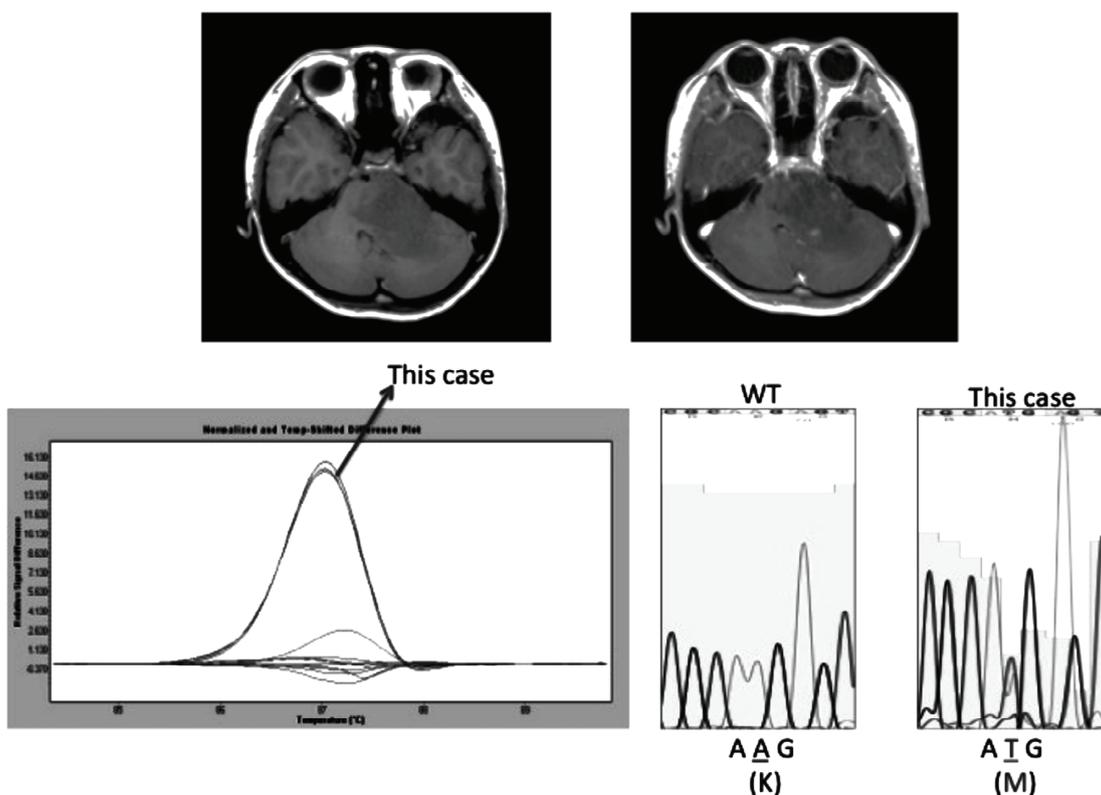


図 1. Anaplastic oligodendroglioma case with K27M mutation in *histone H3.3*. Upper panel show non-enhanced and enhanced axial T1-weighted magnetic resonance images in the left cerebellar hemisphere. The lower left panel shows the positive derivative of the melting curve allowing visualization of this case harboring K27M mutation, multiple curves are present because reactions were performed at least triplicate; the lower right panels show the DNA sequence trace of this tumor and the *histone H3.3* wild-type tumor.

表 2.

Summary of 33 glioma patients in this study

Glioma		Cases	Histone H3.3 mutation (+)
LGG	Pilocytic astrocytoma	6	0
	DIG	1	0
	Diffuse astrocytoma	1	0
	Oligodendroglioma	3	0
	Oligoastrocytoma	1	0
	Ependymoma	0	0
HGG	Anaplastic astrocytoma	3	0
	Anaplastic oligodendroglioma	2	1
	Anaplastic oligoastrocytoma	0	0
	Anaplastic ependymoma	8	0
	High-grade glioma	2	1
	GBM-O	1	0
	GBM	5	1
Total		33	3

DIG Desmoplastic infantile ganglioglioma; *GBM* Glioblastoma; *GBM-O* Glioblastoma with oligodendroglioma component

表 3.

Patient characteristics of newly diagnosed AO, HGG and GBM in our series

Histology	age	Location	Treatment	Outcome	PFS (M)	OS (M)	Histone H3.3
High-grade glioma	1Y	Lt. Temporal	Op, Chem	Alive	9	16	WT
High-grade glioma	9M	Rt. Parietal	Op, RT, Chem	Dissemination → Dead	4	7	K27M
Anaplastic oligodendroglioma	13Y	Lt. Frontal	Op, RT, Chem	Alive	21	49	WT
Anaplastic oligodendroglioma	8Y	Pons ~ Lt. cerebellum	Op, RT	Dissemination → Dead	6	6	K27M
GBM	24Y	Bit. Frontal	Op, RT, Chem	Alive	44	44	WT
GBM	17Y	Rt. Frontal	Op, RT, Chem	Alive	23	23	WT
GBM	11Y	Rt. Thalamus	Op, RT, Chem	Dissemination → Dead	5	7	K27M

PFS Progression free survival; *OS* Overall survival; *WT* Wild-type; *Op* Operation; *RT* Radiation Therapy; *Chem* Chemotherapy

考 察

ヒストンH3.3遺伝子変異が見られたグリオーマは全てHGGであり、この遺伝子異常は小児～若年グリオーマの進展に関与するものと思われた。また、変異を有する腫瘍は予後不良で、本遺伝子変異が小児～若年グリオーマの予後因子としての意義を有する可能性が示唆された。

文 献

- 1) Tabatabai G, et al. Molecular diagnostics of gliomas: the clinical perspective. *Acta Neuropathol* 2010;120:585-92.
- 2) Paugh BS, et al. Integrated molecular genetic profiling of pediatric high-grade gliomas reveals key differences with the adult disease. *J Clin Oncol* 2010;28:3061-8.
- 3) Qu HQ, et al. Genome-wide profiling using single-nucleotide polymorphism arrays identifies novel chromosomal imbalances in pediatric glioblastomas. *Neuro-oncol* 2010;12:153-63.
- 4) Schwartzentruber J, et al. Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* 2012;482:226-31.
- 5) Wu G, et al. Somatic histone H3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012;44:251-3.
- 6) Chi P, et al. Covalent histone modifications-miswritten, misinterpreted and mis-erased in human cancers. *Nature Rev Cancer* 2010;10:457-69.
- 7) Khuong-Quang DA, et al. K27M mutation in histone H3.3 defines clinically and biologically distinct subgroups of pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas. *Acta Neuropathol* 2012;124:439-47.

研究成果リスト

論文

- 1) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients. *J Cancer Res Ther* 2013;9:S30.
- 2) Adachi J, Yanagisawa Y, Suzuki T, Fukuoka K, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT promoter methylation in pediatric glioma patients. *Childs Nerv Syst* 2013;9(29):1758.

- 3) Suzuki T, Wada S, Eguchi H, Adachi J, Mishima K, Matsutani M, Nishikawa R, Nishiyama M. Cadherin 13 overexpression as an important factor related to the absence of tumor fluorescence in 5-aminolevulinic acid-guided resection of glioma. *J Neurosurg* 2013;119(5):1331-9.
- 4) Aoki K, Nishikawa R, Sugiyama K, Nonoguchi N, Kawabata N, Mishima K, Adachi J, Kurisu K, Yamasaki F, Tominaga T, Kumabe T, Ueki K, Higuchi F, Yamamoto T, Ishikawa E, Takeshima H, Yamashita S, Arita K, Hirano H, Yamada S, Matsutani M. A multicenter Phase I/II study of the BCNU implant (Gliadel Wafer) for Japanese patients with malignant gliomas. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2014;54:290-301.

学会発表

- 1) 安達淳一, 遠竹恭子, 三島一彦, 白畑充章, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 福岡講平, 佐々木惇, 西川亮. 変異型IDH1遺伝子迅速解析のグリオーマ術中病理診断への応用, 第31回日本脳腫瘍病理学会, 2013年5月, 東京
- 2) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Shirahata M, Mishima K and Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT promoter methylation in pediatric glioma patients, 41st Annual Meeting of the International Society for Pediatric Neurosurgery, 2013. 9, Mainz, Germany
- 3) 安達淳一, 和田智, 鈴木智成, 福岡講平, 柳澤隆昭, 白畑充章, 三島一彦, 西川亮. ヒストンH3.3遺伝子変異を有する小児グリオーマの臨床像, 日本脳神経外科学会, 第72回学術総会, 2013年10月, 横浜
- 4) Adachi J, Totake K, Shirahata M, Mishima K, Suzuki T, Yanagisawa T, Nishikawa R. Application of rapid IDH1 gene mutation analysis for pathological diagnosis during glioma surgery, 4th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology, 2013. 11, San Francisco, USA
- 5) 安達淳一, 和田智, 鈴木智成, 福岡講平, 柳澤隆昭, 白畑充章, 三島一彦, 西川亮. ヒストンH3.3遺伝子変異を有する小児～若年者グリオーマ例の検討, 第31回日本脳腫瘍学会学術集会, 2013年12月, 宮崎

<特許出願>

なし