



低悪性度神経膠腫における 遺伝子異常の全体図の解明

SeqCap EZ カスタムパネルによる
大規模な低悪性度神経膠腫の網羅的解析

鈴木啓道、青木恒介、小川誠司
京都大学医学研究科 腫瘍生物学講座

がんはゲノムの異常による病気と考えられ、遺伝子異常の蓄積により発生すると考えられています。更には、異常が蓄積する過程において異なった特徴をもった腫瘍集団（サブクローン）が複数発生することから、tumor heterogeneity（腫瘍内多様性）を有すると考えられています。各サブクローンはそれぞれ異なった特徴（治療抵抗性や増殖率など）を持つため、様々な環境や治療の影響の中で生き残った腫瘍がセレクションを受け増殖する clonal evolution が起こります。これが腫瘍の進展・悪性化・治療抵抗性の獲得に大きく関与しているとされています。がん治療を発展させるためにはこのような遺伝子変異の全貌とクローン進化を解明することが必要と考えられています。

低悪性度神経膠腫は脳原発悪性腫瘍と診断される患者さん全体の2割程度を占める神経膠腫（glioma）で、緩徐に進行しますが、診断時にはすでに周囲の神経細胞間に浸潤しているケースが多いという特徴をもちます。このため、完治させることが極めて困難で、初回治療の数年から数十年後に悪性度のより高い腫瘍として再発し、死に至る患者さんの多い病気です。再発時には有効な治療はほとんどなく、新しい治療の開発が期待されています。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。

私たちは332例の低悪性度神経膠腫に対し、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析を行いました。さらに、同一患者さんからの初発/再発検体を用いた経時的検体の解析や複数の局所的検体を採取するマルチサンプリング解析を実施しました。これらの解析により、低悪性度神経膠腫における遺伝子変異の全体図と発生・進展におけるクローン進化の過程が解明でき、2015年に米国科学雑誌 Nature Genetics に報告しております。本紙ではその概要について紹介いたします。

材料と方法

対象

World Health Organization (WHO)分類に基づく病理所見でグレードIIまたはIIIに分類されるグリオーマ(diffuse astrocytoma, oligodendroglioma, oligoastrocytoma, anaplastic astrocytoma, anaplastic oligodendroglioma, anaplastic oligoastrocytoma)を対象とし、国内5大学での332例の手術検体からDNAを抽出しました。この内10例は初発/再発時の経時的検体の解析を行い、4例においてマルチサンプリングを行いました。

シークエンシングとターゲット領域

全エクソン領域を対象としたエクソームシークエンシングを52例(経時的検体すべてとマルチサンプリング検体を含む)に対して行い、332例全例を効率よく解析するためのターゲットとして変異頻度の高い遺伝子とそれに関連する遺伝子の計187遺伝子に標的を絞りました。SeqCap EZ Choiceによるターゲットエンリッチメントは12検体のライブラリを混合するプレプール法で実施し、シークエンシングにはIllumina社HiSeq2000または2500を使用しました。

シークエンスデータ解析

データ解析には東京大学医科学研究所のスーパーコンピュータを使用しました。Burrows-Wheeler Aligner(BWA)を用いてヒトゲノム(hg19)にマッピングを行い、EBCall(Empirical Bayesian mutation Calling)を用いて変異コールを行いました¹。

コピー数解析

Affymetrix社のGeneChip Human Mapping 250K NspIを用いて常染色体およびX染色体のコピー数異常を調べました。コピー数異常の同定は当研究室で開発されたCNAGを使用して行いました²。

統計学的解析

遺伝子異常の生じる順序の解析にはBradley-Terry model、クローン構造解析にはPyClone³、系統樹作成はMEGA⁴を用いて行いました。これら解析の詳細は原文をご参照ください。

結果および考察

シークエンシング結果

1検体あたり約127Mリードのシークエンシング生データを取得してエクソーム領域を平均depth130で解析したところ、1検体につき平均で25個の全エクソン領域上の遺伝子変異が確認できました。一方で、ターゲットシークエンシングではエクソームシークエンスの約1/26量にあたるデータ量(1検体あたり約4.93Mリード)で、ターゲット領域を平均depth178で解析することができました。

遺伝子変異の全体図

遺伝子変異パターンによると低悪性度神経膠腫は、①IDH1/IDH2遺伝子変異、②TP53遺伝子変異、③1p/19q co-deletionの有無によって極めて明確に3グループにわかれることが明らかとなりました(図1、表1)。

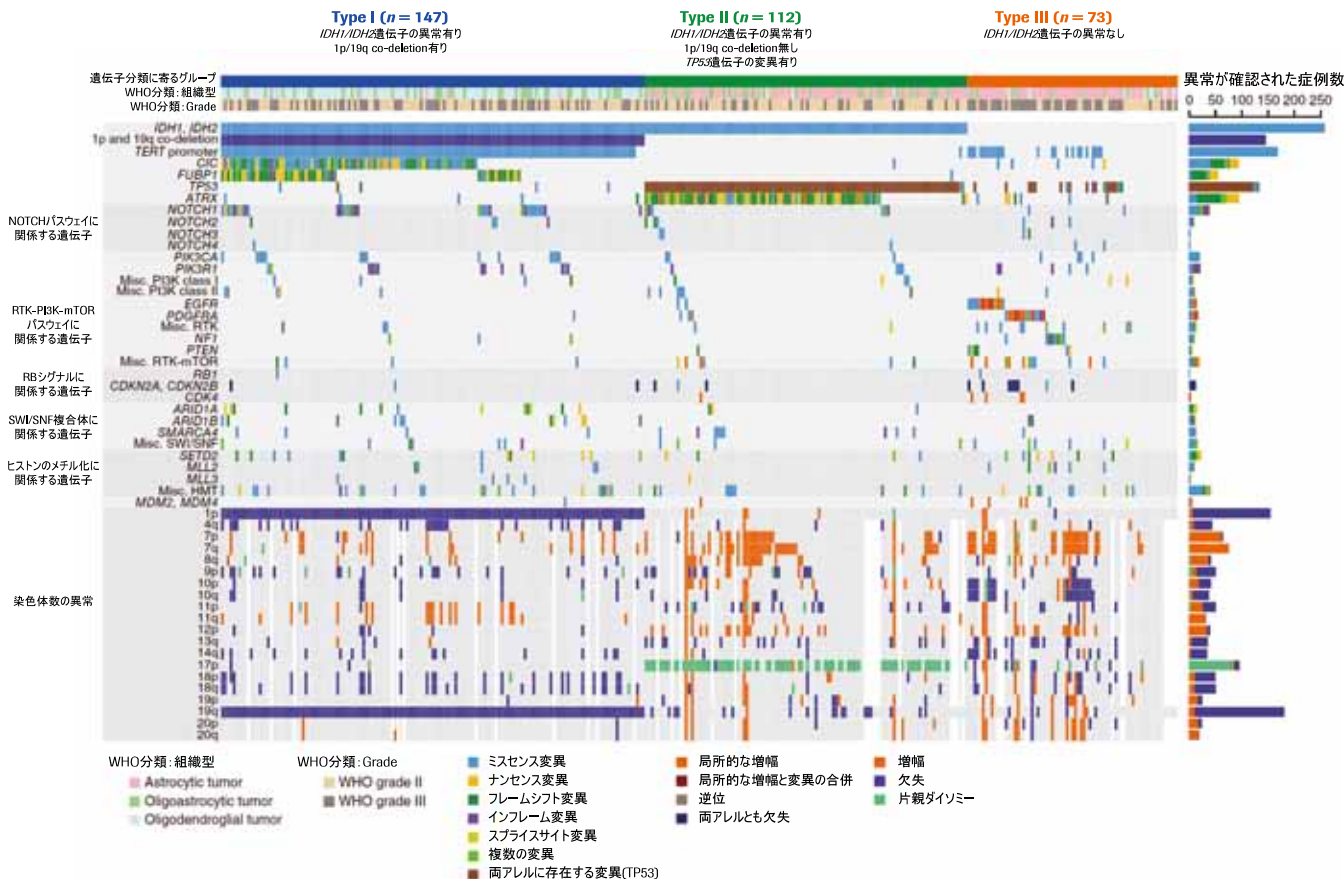


図1: 低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の全貌。合計332例の解析結果

Type I	IDH1/IDH2 変異有 1p/19q co-deletion 有
Type II	IDH1/IDH2 変異有 1p/19q co-deletion 無 TP53 変異有
Type III	IDH1/IDH2 変異無

表1: 遺伝子変異パターンによる低悪性度神経膠腫の分類

従来の解析では IDH1/IDH2 変異をもつ低悪性度神経膠腫の約 4 ~ 24% の症例で、TP53 遺伝子の異常も 1p/19q co-deletion のどちらも同定されませんでした。今回の実験では詳細なデータ解析により、これまでの方法では同定することが困難だった TP53 遺伝子の異常（構造異常、イントロン領域の長い deletion など）を見つけることができました。さらに 1p/19q co-deletion には 1p のセントロメア側と 19q のテロメア側の一部分のみが欠失する亜型が存在することがわかりました。

その結果、IDH1/IDH2 の変異を有する低悪性度神経膠腫は、ほぼ全例 (99.6%、258/259 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、1p/19q co-deletion を認めない IDH 変異腫瘍における TP53 遺伝子の異常は、ほとんどの症例 (98.2%、110/112 例) で両アレル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。多くのがんにおいて TP53 遺伝子の異常が認められていますが、極めて高頻度に両アレルともに異常が起ることは、低悪性度神経膠腫のひとつの特徴と言えます。

この遺伝子異常による分類は、様々な他の解析結果（共存しやすい（排他的な）遺伝子変異の関係性による解析、DNA メチル化パターンによる分類、遺伝子発現パターンによる分類：これらは本紙では紹介しませんので、原文をご参照ください）とも強い相関を示し、腫瘍の特徴を非常によく反映したものであることが明らかとなり、いわゆる“低悪性度神経膠腫”は、あたかも 3 種類の異なる腫瘍のように分類されました。さらに、この遺伝子異常による分類は、従来の病理学的分類よりも患者さんの生存期間を正確に予測し、臨床経過についても特徴を反映することがわかりました。

遺伝子変異の起こる順番

腫瘍は遺伝子異常が蓄積しながら進化・進展すると言われています。このため、各検体の変異アレル頻度を正確に測定して各遺伝子変異を持つ腫瘍細胞の割合を比較することにより、それぞれの遺伝子異常がどのような順番で起きているのか調べました。その結果、IDH1/IDH2 の異常は初期に起こることがわかり、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示されました。同様に、1p/19q co-deletion、TERT promoter 変異、TP53 遺伝子変異も初期に起こることがわかりました。一方、CIC、FUBP1、NOTCH1 などの遺伝子異常はそれよりも後に生じていました。

1 人の患者さんにおける初発 / 再発検体や、マルチサンプリング検体による解析でも同様の順番での遺伝子変異が生じていることがわかり、低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の発生する順番には規則性（ヒエラルキー）が存在することが認められました。このような情報は、今後の治療開発においてどの遺伝子を標的とするか、その標的に対してどのくらいの効果が望めるか、ということを推測するために非常に有用となります。

腫瘍内多様性

個々の腫瘍検体のいくつかの局所的な場所をマルチサンプリングして解析した結果によると、すべての場所で確認できる共通の遺伝子異常は同定された全遺伝子異常のわずか 10% 程度しかなく、逆に一か所でしか確認できない遺伝子異常は全体の 60% にもなり、低悪性度神経膠腫はとても強い多様性をもつ腫瘍であることがわかりました。

図 2 はその代表例です。この検体では IDH1、TERT promoter の変異と 1p/19q co-deletion がまず起こり、腫瘍が発生していました。そしてその後すぐに、まったく別々の 3 つの独立した腫瘍細胞が、それぞれ異なった遺伝子異常を獲得して進展し、それぞれが独自に順番に遺伝子異常を蓄積して、次々と空間的に連続して拡大していることがわかりました。図の上部にあたる腫瘍部分では、別々に進展していった腫瘍が混在していました。また、この検体では異なった場所に 5 種類の CIC 遺伝子の異常が起きていました（パラレル変異：同一遺伝子の異常であるが変異部位が異なる変異）。

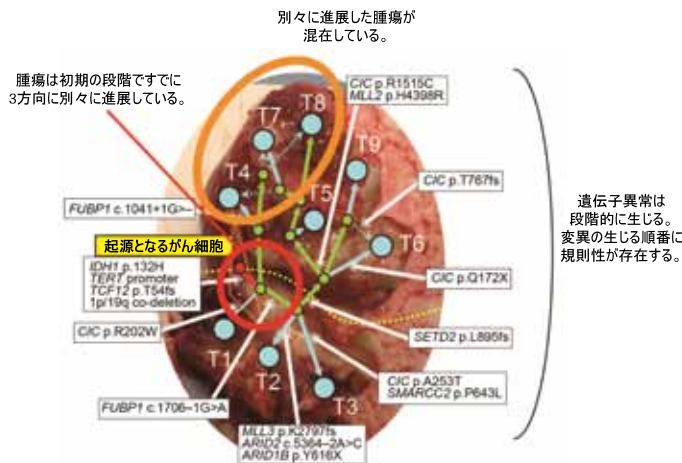


図2: 低悪性度神経膠腫における腫瘍の進展形式と多様性
実際のサンプリング場所を水色の丸で示しています (T1~T9)。
起源となるがん細胞発生推定場所を赤丸、腫瘍の進展上での分岐地点を緑丸でそれぞれ示しています。

マルチサンプリング解析により、低悪性度神経膠腫で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ことが示されました。遺伝子変異が段階的に連続的な空間で進展するうえ、パラレル変異が頻発する、という低悪性度神経膠腫のとても複雑なこうした特徴は、この腫瘍の治療を難しくしているひとつの原因であると思われます。

まとめ

本研究では網羅的遺伝子解析を行い、低悪性度神経膠腫に生じ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。ターゲットシーケンシングを行うことにより、低コストでありながら十分な変異の同定が可能でした。この方法では、The Cancer Genome Atlas の低悪性度神経膠腫 425 例での解析結果と比較すると、頻度の高い driver 変異の同定は同程度に可能であり、一方、アレル頻度の低い driver 変異はとても感度よく同定できました。

本研究は大規模な検体数を扱う世界で初めての低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の全体図の報告です。低悪性度神経膠腫は従来の病理分類とは異なり、遺伝子異常により極めて明確に 3 グループに分類され、この分類は腫瘍の特徴や臨床経過を反映したものであることがわかりました。これは今後の基礎実験すべての礎となる結果であり、新規治療の開発に貢献する結果であると考えています。また、低悪性度神経膠腫は非常に強い腫瘍内多様性を有しており、今後の治療を考えるうえでとても重要な所見であると思われます。低悪性度神経膠腫では腫瘍が発生した後、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し、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。

原文

1. Suzuki H, Aoki K, Chiba K, Sato Y, Shiozawa Y, Shiraishi Y, Shimamura T, Niida A, Motomura K, Ohka F, Yamamoto T, Tanahashi K, Ranjit M, Wakabayashi T, Yoshizato T, Kataoka K, Yoshida K, Nagata Y, Sato-Otsubo A, Tanaka H, Sanada M, Kondo Y, Nakamura H, Mizoguchi M, Abe T, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Miyano S, Natsume A, Ogawa S. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* **47**, 458–68 (2015)

参考文献

1. Shiraishi, Y. et al. An empirical Bayesian framework for somatic mutation detection from cancer genome sequencing data. *Nucleic Acids Res* **41**, e89 (2013).
2. Nannya, Y. et al. A robust algorithm for copy number detection using high-density oligonucleotide single nucleotide polymorphism genotyping arrays. *Cancer Res* **65**, 6071-9 (2005).
3. Shah, S.P. et al. The clonal and mutational evolution spectrum of primary triple-negative breast cancers. *Nature* **486**, 395-9 (2012).
4. Tamura, K. et al. MEGA6: Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0. *Mol Biol Evol* **30**, 2725-9 (2013).

おわりに

本研究で使用したターゲットシーケンシング用のカスタムプローブデザイン「Human Lower Grade Glioma Panel」は、SeqCap EZ Choice Library のご注文の際にリファレンス番号 0200118936 をご指定いただくことで利用していただくことができます。



本資料に記載の情報・説明・仕様等は予告なく変更されることがございます。

本製品はライフサイエンス分野の研究のみを目的としています。

For life science research only. Not for use in diagnostic procedures.

NIMBLEGEN, and SEQCAP are trademarks of Roche.

All other product names and trademarks are the property of their respective owners.

ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社
シーケンシングソリューション
〒105-0014 東京都港区芝2丁目6番1号
TEL. 03-5443-5287

© 2015 Roche Diagnostics All rights reserved.

1056.LS.CMS.1000.SEQ02-010A