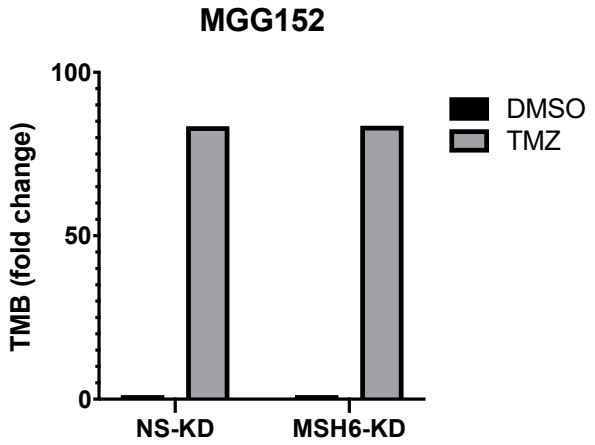
64　神経膠腫に対するDNA高変異発現と免疫応答機序の解明	立石　健祐

【目的】神経膠腫（グリオーマ）のアルキル化剤治療後に生じる DNA 高変異状態と悪性転化の機序解明を図ること、また DNA 高変異状態を呈したグリオーマに対する治療標的の探求を図ることを研究目的に掲げた。

【方法】本研究期間では DNA 高変異モデルの作製と樹立細胞に対する薬剤感受性試験を中心とした検討を図った。具体的にはアルキル化剤である temozolomide（TMZ）を独自に樹立した IDH1 変異グリオーマ細胞株に投与することで外因的な DNA 高変異モデルの樹立を試みた。また DNA 高変異状態が腫瘍形成促進に及ぼす影響を検証した。さらにはエクソームシークエンスにより変異パターンを解析するとともに、ドライバー遺伝子候補を検討した。加えて high-throughput drug screening（HTS）を行い、コントロールモデルとの対比を通じて治療薬剤候補を探求した。その他内因性 DNA 高変異グリオーマ（YMG6R）に対して経時的に採取した腫瘍から細胞株樹立を行いドライバー遺伝子異常の同定と DNA 高変異がどのように変化するか検討した。

【結果】独自に樹立した内因性 IDH1 変異グリオーマ MGG152 細胞を用いて mismatch repair 遺伝子の一つである MSH6 のノックダウンを図った。この細胞とコントロール細胞に対し TMZ を長期間にわたり連続投与した。Whole exome sequencing（WES）を用いて変異状態を検討したところ、コントロール細胞と比較して tumor mutational burden がおおよそ 80 倍と上昇しており、またアルキル化剤投与後に特有の塩基置換パターンが確認されたことから TMZ 誘発性に DNA hypermutation phenotype（HM）が発生した可能性が強く示唆された。次に MGG152 細胞に対し同様の条件で TMZ を投与後、DNA を採取した。WES 解析の結果 MMR 変異が内因性に発生しており、また HM の存在が確認された。これらのペア腫瘍細胞モデルはいずれも *in vitro* 培養下で安定して増殖可能となった。これにより DNA 高変異状態の及ぼす生物学的特徴を検証可能な IDH1 変異グリオーマ細胞株の樹立を世界に先駆けて成功した。その結果、DNA 高変異状態への移行プロセスを研究レベルでモニタリング可能となった。これらの細胞に対して HTS を行い、複数の化合物を候補薬剤として見出しており、現在さらなる解析を進めている。またコントロール細胞と TMZ 長期投与後 HM を呈した MGG152 細胞をマウス脳内に定位的に移植し生存分析を行ったが、両群間で予後に有意な差は認められなかった。加えて内因性 DNA 高変異グリオーマモデル（YMG6R）から細胞株を作製した。経時的に得られた再発検体と細胞株をそれぞれ検討したところ、HM は可逆的な変化を示した。このことからも HM 自体がグリオーマの悪性化促進に及ぼす影響は乏しいことが判明した。

temozolomide 誘発性 DNA hypermutation phenotype



64. 神経膠腫に対する DNA 高変異発現と免疫応答機序の解明

立石　健祐

横浜市立大学 大学院医学研究科 脳神経外科学

Key words：*IDH* 変異神経膠腫，DNA 高変異，治療標的分子，悪性転化

緒　言

神経膠腫（グリオーマ）は難治性脳腫瘍であり革新的な治療法の開発が急務となっている。グリオーマの代表的な遺伝子異常として IDH 変異が挙げられる。IDH 変異（主に IDH1R132H）は低悪性度グリオーマの約 9 割に存在する。一方原発性の膠芽腫（グリオブラストーマ）では 9 割が IDH 野生型で、残りは低悪性度 IDH 変異グリオーマが悪性転化することで二次的にグリオブラストーマ様の表現型となったものである。このような背景を基にグリオーマは現在 IDH 野生型、IDH 変異型に分子分類化されている。高悪性度グリオーマに対する現在の標準治療は外科治療、放射線治療とアルキル化剤テモゾロミド（TMZ）を用いた化学療法の併用である。TMZ は DNA 修復に関わるミスマッチ修復機構（MMR）の消耗を通じて細胞毒性を発揮する。これに対し、特に IDH 変異グリオーマでは、TMZ の長期投与により高率に MMR 関連遺伝子変異が細胞内に生じることが知られている。この結果 MMR を通じた DNA 修復が妨げられ、腫瘍細胞 DNA 内に変異が蓄積し（DNA hypermutation phenotype (HM)）、更には悪性転化が生じると考えられている。すなわち本来治療薬であるはずの TMZ により、DNA 修復障害を通じて悪性転化を惹起することが IDH 変異グリオーマに対する現行の治療上の課題として挙げられる。これに対して FDA が HM を呈する腫瘍や MMR 欠損腫瘍に対して免疫チェックポイント阻害剤を承認したように、TMZ 投与後に HM を呈した再発 IDH 変異グリオーマに対する免疫チェックポイント阻害剤を用いた治療が新たな治療法として期待されてきた。しかしながら近年の報告によるとその効果は限定的であることが判明している［1］。重要な点として HM が IDH 変異型でなぜ高率に生じるのか機序は不明なままであり、逆にこの分子機序が明らかになれば、独創的な治療法の開発につながることが期待される。特に DNA 修復機構や免疫応答機序に関しては IDH 変異による直接的な影響［2］とともに、HM を通じて大きく変化していることが予想されることから、この機序を応用した強力な治療法が見いだされる可能性がある。研究代表者らはこれまでに世界最大規模の患者由来 IDH1 変異グリオーマ細胞株（patient-derived xenograft：PDX）の樹立に成功しており［3，4］、また最近では、内因性の DNA 高変異状態を呈する腫瘍を由来とした IDH1 変異グリオーマ細胞株の樹立に成功した［5］。本研究では内因性、外因性に HM を呈したグリオーマ細胞株を用いて HM に関連する遺伝子異常パターンを検証した。またコントロールと比較して HM が腫瘍形成促進に寄与するか検討した。さらには全エクソームシークエンス（whole exome sequencing：WES）を通じて変異パターンを解析するとともに、ドライバー遺伝子候補を検討した。加えて high throughput drug screening（HTS）を行い、コントロールモデルとの対比を通じて治療薬剤候補を探求した。その他内因性 DNA 高変異グリオーマ（YMG6R）に対して、経時的に採取した腫瘍から細胞株樹立を行い、ドライバー遺伝子異常の同定と DNA 高変異がどのように変化するか検討した。

方　法

1．外因性 IDH1 変異 DNA 高変異状態神経膠腫モデルの作製（ミスマッチ修復遺伝子抑制モデル）

我々が初発の臨床検体から独自に樹立した IDH1 変異グリオーマ細胞株である MGG152 を用いて［4］、MMR 遺伝子の一つである *MSH6* を knockdown した上で DMSO または TMZ（200 μM）を 4 ヶ月間長期投与した［6］。治療後の細胞を用いて生存分析を行うとともに DNA を採取後、WES を施行した。遺伝子異常と DNA 高変異状態発現の

関連付けを図った。

2. 外因性 IDH1 変異 DNA 高変異状態神経膠腫モデルの作製（ミスマッチ修復遺伝子保持モデル）

MGG152（TMZ 未治療）に対して non-silencing（NS）gene を knockdown した後 DMSO または TMZ（200 μM）を 1 と同様のプロトコールにて 4 ヶ月間投与した。DNA を採取後、WES を施行した。

3. 内因性 DNA 高変異グリオーマモデル（YMG6R）の樹立

悪性転化後、研究機関内の附属病院にて採取したグリオーマ（YMG6R）から初代培養細胞、PDX を作製するとともに次世代シークエンス法によりドライバー遺伝子異常の同定を図った。

4. 標的薬の探索

2 で作製した DMSO もしくは TMZ 治療細胞に対して DNA 高変異 IDH1 変異グリオーマ細胞とコントロール細胞に対して 1,280 化合物を用いて HTS を行い、有効な化合物の探索を図った。

結　果

MGG152 細胞に対し MSH6 knockdown（MGG152-MSH6）及び non-silencing gene knockdown（MGG152-NS, コントロール）細胞を作製した（図 1）[6]。MGG152-MSH6 細胞に対し TMZ の感受性を検討したところコントロールと比較して TMZ 抵抗性が確認された。これらの細胞（2 種）に対し DMSO、TMZ 200 μM の 4 ヶ月間に及ぶ連続投与を行った。

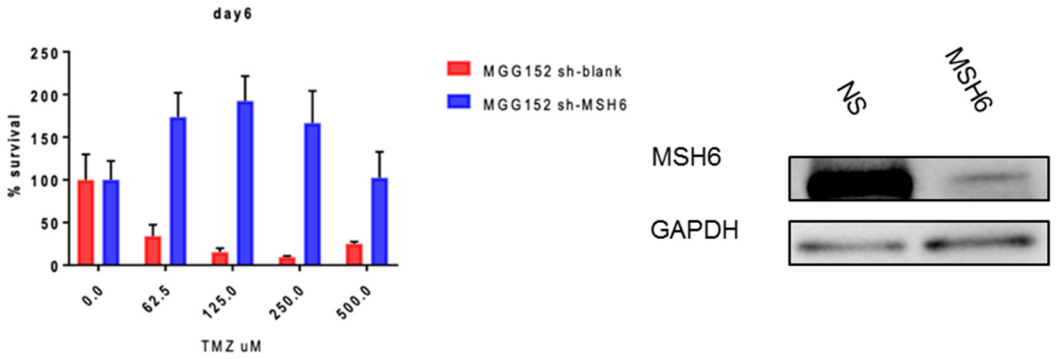


図 1.　mismatch repair gene 抑制後の TMZ 感受性試験
MSH6 knockdown 細胞の樹立（左）と TMZ 耐性の存在を確認（右）。

4 種類の細胞株から DNA を抽出後、全エキソン解析を施行した。その結果、MGG152-MSH6 細胞ではコントロールと比較して TMZ 治療細胞における追加 single nucleotide variant（SNV）は 10,330 箇所、tumor mutational burden（TMB）はコントロールと比較して 83.7 倍の上昇を認めた。遺伝子変異パターンは G>A 変異が 48.89%、C>T 変異が 48.27%と 97%以上が G : C>A : T 変異パターンであり、TMZ 誘発性 DNA 高変異を示唆する結果であった。なお MMR 遺伝子（*MSH6*、*MSH2*、*MLSH1*、*PMS2*）の変異は検出されなかった。Clinical Significance（CLNSIG）で pathogenic（もしくは likely pathogenic）と位置づけられた変異として *SCN5A*、*PPTN11*、*CYP4F22*、*PRKCG*、*COL1A2*、*ARHGEF10*、*ACVRL1*、*F9* の 8 種類が挙げられ、そのいずれも G : C>A : T 変異パターンを呈していた。なお microsatellite instability（MSI）の存在は指摘されなかった。

次に MGG152-NS 細胞でも同様の解析を行った。コントロールと比較して TMZ 治療細胞における追加 single nucleotide variant（SNV）は 12,024 箇所、tumor mutational burden（TMB）はコントロールと比較して 83.5 倍に上昇していた。遺伝子変異パターンは G>A 変異が 45.63%、C>T 変異が 49.54%と 95%以上が同様の G : C>A : T 変異パターンであり、こちらも TMZ 誘発性 DNA 高変異を示唆する結果であった。MSI は同様に指摘されなかった。なお MMR 遺伝子である *MSH2*、*PMS2* の missense 変異（いずれも C>T）を認めた（表 1）。CLNSIG で pathogenic

（もしくは likely pathogenic）と位置づけられた変異として *SLC22A5*、*PEX7*、*ABHD12* の 3 種類が検出され、上記と同様にそのいずれも G : C>A : T 変異パターンであった。

表 1. 遺伝子変異数と変異パターン

		NS-DMSO vs. -TMZ		MSH6-DMSO vs. -TMZ	
REF	ALT	SNV number	Frequency	SNV number	Frequency
C	A	81	0.67365269	29	0.28073572
G	A	5487	45.6337325	5051	48.8964182
T	A	9	0.0748503	7	0.06776379
A	C	23	0.1912841	12	0.11616651
G	C	6	0.0499002	11	0.10648596
T	C	158	1.31403859	93	0.90029042
A	G	150	1.24750499	75	0.72604066
C	G	7	0.0582169	6	0.05808325
T	G	32	0.2661344	16	0.15488867
A	T	21	0.1746507	15	0.14520813
C	T	5957	49.5425815	4987	48.2768635
G	T	93	0.77345309	28	0.27105518
	Total	12024	100	10330	100

TMB NS-DMSO vs. NS-TMZ: 83.5mt/Mb (TMB high)
MSH6-DMSO. MSH6-TMZ: 83.7mt/Mb (TMB high)

MGG152 細胞に対し non-silencing gene、MSH6 gene を抑制後 DMSO あるいは TMZ 投与後に施行した全エキソン解析結果。

HM が腫瘍形成能に及ぼす影響を探索すべく 4 ヶ月間の DMSO もしくは TMZ 治療後の MGG152-MSH6 細胞 10^5 個を免疫不全マウス（SCID Beige）の大脳基底核へ定位的に移植した。生存曲線を用いて比較検討を行ったものの、両群間に明らかな有意差は認めなかった。

HM を呈した細胞に対する新規治療アプローチの探索を図るため、ドラッグスクリーニングを施行した。具体的には MGG152-MSH6 細胞を DMSO もしくは TMZ（200 μM）を 4 ヶ月投与した。それぞれの細胞（3×10^4/each well）を 1,280 化合物（5 μM、Tocris max2.0、Tocris）を添加した 96 well plate に散布した。72 時間後、CellTiter-Glo を用いて cell viability assay を行い、DMSO コントロール細胞と比較して、cell viability 値が 80%以上（不応）で TMZ 治療細胞の cell viability が 20%以下（高感受性）の細胞をピックアップした。その結果 27／1280（2.1%）の化合物が標的候補として抽出された。現在 MGG152-NS 細胞に対しても同様の解析を進めており、再現性のある化合物を特定した上で更に検討を進める予定である。免疫応答に関連する薬剤についても検討を図っている。

YMG6R（anaplastic oligodendroglioma, IDH1 mutant）から再発 （YMG6R3T）、再再発 （YMG6R4T）検体を採取し，がんゲノムパネルを用いた解析 （MGH-SNaPshot）を施行した。その結果、YMG6R4T では YMG6R3T と比較して変異数が著明に低下していた。一方ドライバー変異と考えられる PIK3CA（E542K）変異は YMG6R3T、YMG6R4T のいずれからも検出された。更にこれらの細胞から PDX を樹立し、同様の解析を行ったところ YMG6R4T 由来の PDX では oligodendroglioma 形成に必須の *IDH1*、*TERT* 変異以外には *PIK3CA* 変異のみが検出された。一方 YMG6R3T では *PIK3CA* 変異以外に G : C>A : T 変異パターンを呈する複数の変異が検出され、これらのうち約半数の変異は患者検体と共有していた。

考　察

IDH 変異は低悪性度グリオーマに最も高頻度に認められる遺伝子異常であり、DNA、ヒストンのメチル化を誘導することで腫瘍発生の初期段階における重要な役割を果たす。グリオーマに対する第一選択の治療薬は TMZ であるが、特に IDH 変異グリオーマに対し TMZ は治療効果をもたらす反面、“DNA 高変異状態（HM）を引き起こし、悪性転化を誘導する”とされている。しかしながらその詳細な機序の解明には至っていない。これに対して本研究成果として、モデルの樹立を通じて IDH1 変異グリオーマに対する HM への移行プロセスの評価が世界に先駆けて研究レベルで可能となった。また HM を呈した IDH1 変異グリオーマに対する、新規治療法の開発を行う研究基盤が確立された。

本研究では、独自に樹立した MGG152 細胞を用いて、最初に MMR 遺伝子である *MSH6* をノックダウンし、その後 TMZ の長期投与を図った。その結果 DNA レベルでの HM が認められた。次に比較検討を図るため non-silencing（NS) gene を knockdown し、TMZ を長期投与したところ、こちらも同様に HM が生じた。なお、前者では他の MMR 変異は検出されず、後者では MMR 遺伝子の MSH2, PMS2 に変異が新たに出現していた。このことは TMZ による MMR 変異（恐らく G : C>A : T 置換）が起点となり、そこに TMZ による刺激が継続的に加わることで急激な HM 化が生じた可能性が示唆された。今後 TMZ 治療中に経時的に DNA を採取し WES による解析を行うことで HM に対する理解が更に深まり、また HM 発生を抑制する治療法の開発につながることも期待される。一方で HM 化が腫瘍形成促進に寄与するとした仮説は MGG152-MSH6 細胞を用いた今回の検討では立証されなかった。確証実験として今後 MGG152-NS 細胞を用いて同様の実験を予定している。なお内因性 HM 細胞である YMG6R を用いた検討では、変異数は時系列で減少していたことからも、HM 細胞は経時的に淘汰されうる、言い換えれば変異の大多数はパッセンジャー変異である可能性が疑われた。一方で PIK3CAE542K のようなドライバー遺伝子異常が HM に伴い出現することで急激な腫瘍形成促進・悪性化につながる可能性が示唆された。このことからも HM に伴い生じたドライバー変異こそが重要な分子標的治療候補であることが考えられ、このような遺伝子異常を非侵襲的に評価でき、更には分子標的治療が発展することで IDH 変異グリオーマの治療にパラダイムシフトが生じる可能性がある。一方 HTS の結果から複数の治療候補剤が同定された。今後これらの候補薬剤が HM そのものに対する治療標的かを含め更なる検討が必要である。今後本研究を更に進めることで IDH 変異グリオーマに対する新たな知見を創出することを目指したい。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、横浜市立大学大学院医学研究科の山本哲哉教授、国立がん研究センター研究所脳腫瘍連携研究分野の市村幸一分野長、ハーバード大学脳神経外科の脇本浩明助教授である。

文　献

1） Touat M, Li YY, Boynton AN, Spurr LF, Iorgulescu JB, Bohrson CL, et al. Mechanisms and therapeutic implications of hypermutation in gliomas. Nature. 2020;580(7804):517-23. Epub 2020/04/24. doi: 10.1038/s41586-020-2209-9. PubMed PMID: 32322066.

2） Sulkowski PL, Corso CD, Robinson ND, Scanlon SE, Purshouse KR, Bai H, et al. 2-Hydroxyglutarate produced by neomorphic IDH mutations suppresses homologous recombination and induces PARP inhibitor sensitivity. Sci Transl Med. 2017;9(375). Epub 2017/02/06. doi: 10.1126/scitranslmed.aal2463. PubMed PMID: 28148839; PubMed Central PMCID: PMCPMC5435119.

3） Tateishi K, Wakimoto H, Iafrate AJ, Tanaka S, Loebel F, Lelic N, et al. Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD+ Depletion. Cancer cell. 2015;28(6):773-84. doi: 10.1016/j.ccell.2015.11.006. PubMed PMID: 26678339; PubMed Central PMCID: PMC4684594.

4) Wakimoto H, Tanaka S, Curry WT, Loebel F, Zhao D, Tateishi K, et al. Targetable signaling pathway mutations are associated with malignant phenotype in IDH-mutant gliomas. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2014;20(11):2898-909. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-13-3052. PubMed PMID: 24714777; PubMed Central PMCID: PMC4070445.

5) Tateishi K, Nakamura T, Juratli TA, Williams EA, Matsushita Y, Miyake S, et al. PI3K/AKT/mTOR Pathway Alterations Promote Malignant Progression and Xenograft Formation in Oligodendroglial Tumors. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 2019;25(14):4375-87. Epub 2019/04/13. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-18-4144. PubMed PMID: 30975663; PubMed Central PMCID: PMCPMC6924174.

6) Tateishi K, Higuchi F, Miller JJ, Koerner MVA, Lelic N, Shankar GM, et al. The Alkylating Chemotherapeutic Temozolomide Induces Metabolic Stress in IDH1-Mutant Cancers and Potentiates NAD(+) Depletion-Mediated Cytotoxicity. Cancer Res. 2017;77(15):4102-15. Epub 2017/06/20. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-16-2263. PubMed PMID: 28625978; PubMed Central PMCID: PMCPMC5783559.