

## 次世代シーケンサーにより悪性脳腫瘍幹細胞に対する Sonic Hedgehog 阻害剤の効果予測バイオマーカー探索

名古屋大学大学院医学系研究科・脳神経外科・准教授 夏目敦至  
京都大学大学院医学研究科・病理遺伝学・教授 小川誠司  
名古屋市立大学医学部・ゲノム制御学・教授 近藤豊

Naoko Takebe MD PhD

Senior Investigator, Investigational Drug Branch, Cancer Evaluation Program,  
Division of Cancer Treatment and Diagnosis, National Cancer Institute, NIH

Mickey Milliams, PhD

Director Molecular Characterization and Clinical Assay Development Laboratory  
Interim Scientific Director of the Advanced Technology Program SAIC-Frederick,  
Inc.

### 1. 研究の概要

成人に発症する脳腫瘍の約半数を占める神経膠腫は、病理学的に低悪性度と高悪性度に低悪性度は緩徐に進行するが数年から十数年の経過を経てより高悪性度の腫瘍として再発する。段階的に悪性化する腫瘍であるため腫瘍内多様性及び単一細胞クローンがどのように進展していくかの過程を解明することは今後の治療の発展につながると考えられる。

今年度の研究成果として、低悪性度神経膠腫は時間的・空間的に多様性を有する腫瘍であり、その遺伝子変異には変異の生じる順番が存在すること、腫瘍が生じた後に一部のサブクローンがヒエラルキーを有する driver 変異を順番に獲得し多様性を形成しながら進展していくことが明らかになった (Nature Genetics, in press)。

### 2. 研究の背景と目的

低悪性度神経膠腫瘍 (LGG) の遺伝子異常はいまだ十分に解明されていない。我々は低悪性度神経膠腫瘍における遺伝子異常の全貌を明らかにするため High throughput sequencing を行った。同時に、我々は 4 患者の multisampling 腫瘍と 10 患者の初発/再発腫瘍に対し、次世代シーケンスである Whole exome sequencing (WES) を行った。確認された変異について deep sequencing を行い正確なアレル頻度を測定し、統計的な解析手法である PyClone analysis を行うことにより subclone を同定し腫瘍内多様性を明らかにすることを目的とした。また、同定された subclone を用いクローンの動態の解析を試みた。

### 3. 成果

52 例の whole exome sequencing (WES) と 283 例の target sequencing を行った。TCGA

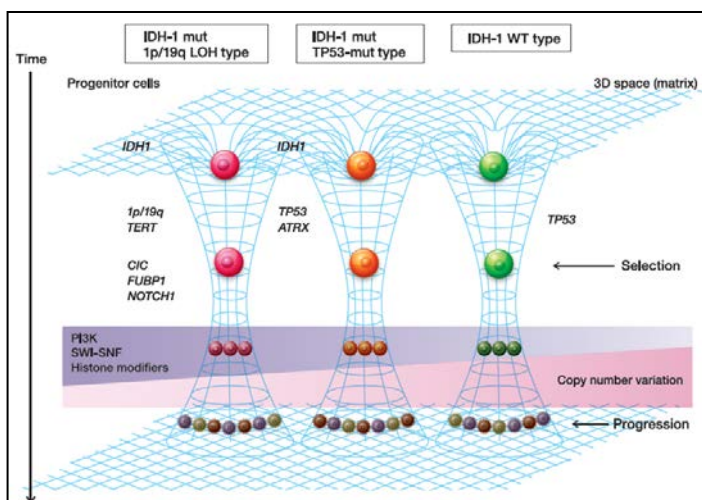
から 425 例の WES data を使用し合計 760 例の LGG に対し遺伝子解析を行った。

LGG において既知の遺伝子変異に加え新たに RTK-mTOR pathway ,NOTCH pathway, SWI/SNF complex および histone methyltransferase (HMT) の変異が有意に認められた。LGG は *IDH1/2* の変異と 1p19q LOH によって特徴的な 3 type に分類される。Type I (*IDH* mut / 1p19q LOH) は *TERT* promoter (98%), *CIC* (59%), *FUBP1* (31%) 変異を有しコピー数異常は 4q / -18 といった deletion を起こす。Type II (*IDH* mut / 1p19q intact) では 97% に *TP53* の biallelic inactivation を認めた。*ATRX* (77%) の変異も高頻度であり 8q/10p などに copy 数 gain を起こしやすい。Type III (*IDH* wt) は *EGFR*, *PTEN*, *CDKN2A/2B* などの変異の頻度が高く GBM-like pattern を有する。これらの変異は高い排他性を有し各 Type ごとに特徴的な遺伝子変異パターンをとる (図)。各遺伝子における変異アレル頻度から Bradley-Terry model を用いて変異の生じる順番を検討する規則性が認められる。*IDH1/2*, *TERT*, 1p19q LOH, *TP53*, *ATRX* 変異は腫瘍発生早期に生じると考えられ、その後 NOTCH pathway, SWI/SNF complex, HMT の変異が生じる。

multisampling 検体において各部位で変異パターンは異なり腫瘍内多様性が確認された。Phylogenetic tree を描くと *IDH1*, 1p19q LOH, *TERT* promoter, *TP53*, *ATRX* 変異はいずれも truncal mutation として存在し腫瘍の発生に重要な変異と考えられた。一方 *FUBP1*, *CIC*, *NOTCH1* 及び Histone methyltransferase などの変異は分岐を形成した。また同一遺伝子であっても同一患者内で異なる変異パターンを有する parallel mutation が認められた。そのためこれらの driver 変異は clonal evolution を引き起こし腫瘍の進展を引き起こしていると考えられた。

経時的検体において同様の解析を行うと *IDH1*, 1p19q LOH, *TERT* promoter はいずれも truncal mutation であった。一方、*TP53*, *ATRX* に parallel mutation を認め分岐を形成する症例があり *IDH1* より後に発生すると考えられた。multisampling 検体と同様に *FUBP1*, *CIC*, *NOTCH1* には parallel mutation を認め clonal evolution を引き起こしていると考えられた。

今回、我々の解析により LGG において新たな遺伝子変異が明らかとなった。遺伝子変異



異パターンは極めて排他性の強い 3 type に分類され、各 Type において遺伝子変異はヒエラルキーを有する。LGG は決まった順番で変異が発生し、その driver 変異を獲得することにより clonal evolution を引き起こして進展していくことが明らかとなった。

LGG は時間的・空間的に多様性

を有する腫瘍であり、その遺伝子変異には変異の生じる順番が存在すること、腫瘍が生じた後に一部の subclone がヒエラルキーを有する driver 変異を順番に獲得し多様性を形成しながら進展していくことが明らかになった。