

主論文の要旨

***H3F3A* mutant allele specific imbalance in an
aggressive subtype of diffuse midline glioma,
H3 K27M-mutant**

びまん性正中部神経膠腫の予後不良因子である
H3F3A 遺伝子領域の染色体構造異常

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：齋藤 竜太 教授)

前田 紗知

【緒言】

悪性脳腫瘍は未だ根治が難しく、さまざまながん種の中でも最も予後不良な腫瘍の一つである。そのため多くの大規模分子解析研究が進められ、ビッグデータが得られつつある。近年、脳腫瘍の発生、悪性化には多彩なゲノム異常、エピゲノム異常が関与していることが明らかになった。これらのゲノム異常、エピゲノム異常の中で、腫瘍の性質を決定する特に重要な分子異常もいくつか同定されつつある。

びまん性正中線神経膠腫(diffuse midline glioma, H3 K27M-mutant: DMG)は、悪性脳腫瘍の中でも主に小児や若年成人に発症する、極めて予後不良な脳腫瘍である。近年の分子解析研究から、DMGに特徴的に見られる遺伝子異常として*H3F3A* 遺伝子変異が報告されている。*H3F3A* 遺伝子変異はさまざまなエピゲノム異常を引き起こすことで、腫瘍形成に寄与することが明らかになっているが、DMGの明確な予後不良マーカーは未だ見つかっていない。

本研究は、DMGの中で*H3F3A* 遺伝子の変異アレル頻度が高い一群について詳細な分子生物学的検討を行い、DMGの新たな予後不良マーカーの発見に繋げることを目的としている。

【対象及び方法】

Droplet digital PCR 法を用いた遺伝子変異解析

本研究で対象とした DMG は、比較的発生頻度の低い腫瘍である。さらに DMG は脳幹部等の重要な役割を担う部分に発生するため、手術が行えず検体が得られない、もしくは微量の検体しか得ることができない症例も多い。そのため、少量検体からでも*H3F3A* 遺伝子変異を同定することが可能な droplet digital PCR 法(ddPCR 法)による高感度*H3F3A* 遺伝子変異解析法を確立した。確立した ddPCR 法により、2017年から2019年の間に遺伝子変異解析を実施した約300例の脳腫瘍症例の中で、15例の DMG 症例を同定した。

FISH 法および全ゲノム解析による染色体構造解析

DdPCR 解析の結果、15例の DMG 症例のうち4症例で、他の11症例とは異なる*H3F3A* 遺伝子変異パターンを示すことが明らかになった。これらの症例では、*H3F3A* 遺伝子座を有する1番染色体の染色体構造異常を有する可能性があると考えられたため、*H3F3A* 遺伝子領域の fluorescence in situ hybridization (FISH) 解析および全ゲノム解析によるコピー数解析を行った。特に、1番染色体上の一塩基多型(single nucleotide polymorphisms: SNPs)についても同様に解析することで、染色体構造異常を明らかにした。

染色体構造異常群のエピゲノム異常解析と予後解析

DMGでは*H3F3A* 遺伝子変異により、H3K27me3 修飾異常が誘導されていることが明らかになっており、腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが示唆されている。染色体構造異常を呈する4症例の腫瘍検体を用いて免疫組織化学染色およびウエスタ

ンブロット法による蛋白質発現の検討を行うことで、ヒストン修飾異常パターンを他の症例群と比較した。またこれら 4 症例の予後解析を行った。

【結果】

DdPCR 法で同定された特徴的な *H3F3A* 遺伝子変異パターン

H3F3A 遺伝子変異は他のがん遺伝子と同様に、通常は 2 本の対立遺伝子のうち、1 本の変異が起こるヘテロ接合型変異である。しかし 15 例の DMG 症例のうち、4 症例で *H3F3A* 遺伝子変異の変異アレル頻度が 50%を超えることを同定した。近年さまざまながん種で、がん遺伝子の変異型対立遺伝子数が野生型対立遺伝子数よりも優位となる染色体構造異常である mutant allele specific imbalance (MASI) が予後不良因子であることが報告されており、これら 4 症例の全ゲノム解析を行った。

全ゲノム解析で同定された特徴的な染色体構造異常

全ゲノム解析によるコピー数解析および SNPs 変異アレル頻度解析の結果と、ddPCR 解析による *H3F3A* 遺伝子変異の変異アレル頻度を用いて染色体構造を決定した結果、全例で *H3F3A* 遺伝子領域周辺の染色体構造異常を認めることが分かった。2 例では 1 番染色体長腕が 3 本に増幅し、そのうち 1 例は 3 本全てが *H3F3A* K27M 変異型、もう 1 例は 2 本が変異型で 1 本が野生型であった。1 例では 1 番染色体数は 2 本であるが、2 本ともが変異型であった。残りの 1 例では、1 本の 1 番染色体長腕に部分欠失を認め、*H3F3A* 遺伝子領域については変異型を有する長腕のみが残存していた。いずれの症例においても、本来は 1:1 であるはずの *H3F3A* 遺伝子変異型対立遺伝子数と野生型対立遺伝子数のバランスが崩れており、*H3F3A* 遺伝子変異型対立遺伝子が優位になっていた。また、1 番染色体短腕および 1 番染色体長腕のプローブを用いた FISH 解析でも、これらの症例は同様の結果であることを確認した。

染色体構造異常群はエピゲノム異常が増強し、予後不良

次にこれらの症例のエピゲノム変化を蛍光免疫染色およびウエスタンブロット法により調べると、*H3F3A* 遺伝子変異の MASI を認める症例は変異アレル頻度が 50% よりも低い症例(低 *H3F3A* K27M 変異アレル頻度群)と比べて *H3F3A* 変異型遺伝子から産生される H3 K27M 蛋白質発現が有意に高くなっており、また遺伝子発現抑制型ヒストン修飾である H3K27me3 レベルが減少していた。さらに、*H3F3A* K27M の MASI を認める症例は、低 *H3F3A* K27M 変異アレル頻度群と比較して全生存期間および無増悪生存期間いずれも有意に短く ($P = 0.01, 0.03$)、予後不良であることが明らかになった。このことは、*H3F3A* 遺伝子変異の MASI が DMG の悪性性質の獲得に強く関与していることを示唆する重要な結果である。

【考察】

DdPCR 法での遺伝子変異解析により DMG と診断された 15 例のうち、4 例で *H3F3A*

遺伝子の変異アレル頻度が 50%を超えていた。これは他がん種で報告されている染色体構造異常である mutant allele specific imbalance (MASI) であると考えられる。MASI はドライバー遺伝子の変異量を増やすことで腫瘍増殖を促進する要因になると考えられており、例えば大腸がんの *KRAS* 遺伝子変異の MASI は予後と関連していることも報告されている。本研究においても、*H3F3A* K27M 変異の MASI を認める症例は低 *H3F3A* K27M 変異アレル頻度群と比べて、H3 K27M 蛋白質発現が高くなっており、有意に予後不良であることが明らかになった。*H3F3A* 遺伝子領域の染色体構造異常により、腫瘍細胞内の *H3F3A* 変異型対立遺伝子数が増加することが、腫瘍細胞の増殖に寄与していると考えられた。さらに、*H3F3A* 変異型対立遺伝子の増加だけでなく、*H3F3A* 野生型対立遺伝子が欠失することで、腫瘍細胞の増殖抑制効果が減少している可能性も考えられる。*H3F3A* 遺伝子の野生型対立遺伝子の欠失が DMG の予後にもたらす影響についても、今後検討していく必要がある。

【結語】

本研究において *H3F3A* K27M 変異の MASI を初めて同定し、MASI が DMG の予後不良因子であることを明らかにした。MASI が DMG の予後不良に関わるメカニズムを解析することで、DMG が悪性性質を獲得するメカニズムの解明に繋がる可能性がある。