

シングルセルレベル NGS 解析を用いた IDH 変異神経膠腫の薬物治療抵抗性の解明

名古屋大学大学院

医学系研究科脳神経外科 特任助教 青木 恒介

1. 研究の背景・目的

WHO グレードⅡ/Ⅲの低悪性度神経膠腫は神経膠腫のおよそ3割を占め、比較的若年者に発生する。当初は緩徐な増殖を示すが、5~10年という長い期間で腫瘍悪性化を引き起こし、多くは致死的となる疾患である¹。低悪性度神経膠腫の8割は *IDH1* 変異が腫瘍発生に関与し、乏突起膠腫系と星細胞腫系の系譜に分かれ、特有の遺伝子変化を獲得しながら、時間空間的に指向性を持って悪性転化・進展する^{2,3}。低悪性度神経膠腫に対する化学療法や放射線治療などの治療は腫瘍縮小効果を示すが、経過中次第に抵抗性を示すようになる。上述のように、低悪性度神経膠腫の8割において *IDH1* 変異が腫瘍発生に関与をしていることが知られている。現在 *IDH1* 変異神経膠腫に対して6つの変異 *IDH1* 阻害剤の臨床試験が進行中であるが、多くの試験において感受性を示す腫瘍と抵抗性を示す腫瘍が混在している⁴。これらの腫瘍が治療抵抗性をいかに獲得してくるのかは不明な部分が多い。本課題では、*IDH1* 変異神経膠腫において腫瘍発生~悪性転化~腫瘍死という時間軸におけるゲノムとエピゲノムの変化が、治療抵抗性にいかにかかわっているのかを明らかにすることを目指す。

2. 研究の対象ならびに方法

IDH1 変異神経膠腫細胞株に変異 *IDH1* 阻害薬投与した際の D-2-ヒドロキシグルタル酸 (D2HG) を比色定量法にて測定を行なった (DMSO, 1nM, 10nM, 100nM 各濃度 n=3)。変異 *IDH1* 阻害薬もしくは DMSO 投与の細胞株に対し、RNA シークエンスを行い (n=3)、2群間の発現パターンを tSNE 解析で行い、有意に発現変化した経路解析を Gene Set Enrichment

Analysis (GSEA)解析で行なった。また、変異 IDH1 阻害薬投与による細胞の形態的变化や、増殖能の変化を評価した (DMSO, 1nM, 10nM, 100nM 各濃度 n=3)。

3. 研究結果

我々は、*IDH1* 変異神経膠腫細胞株に対する新規分子標的薬である変異 IDH1 阻害剤に注目し、*IDH1* 変異神経膠腫の変異 IDH1 阻害薬への反応および治療抵抗性について検討を行なった。*IDH1* 変異神経膠腫細胞株に変異 IDH1 阻害薬投与し D-2-ヒドロキシグルタル酸 (D2HG) を測定したところ、濃度依存性に D2HG が低下した (図 1)。変異 IDH1 阻害薬もしくは DMSO 投与の細胞株に対し RNA シークエンスを行い、明らかに遺伝子発現パターンが変化していた (図 2)。続いて GSEA 解析を行なったところ、様々な癌腫において DNA およびヒストンのメチル化によって発現が抑制されている遺伝子が、変異 IDH1 阻害薬投与群で有意に高発現となっていた (図 3)。その一方で、阻害薬投与による細胞の形態的变化や、増殖能の変化を検討したところ、明らかな形態的变化や増殖能の変化は認めなかった。

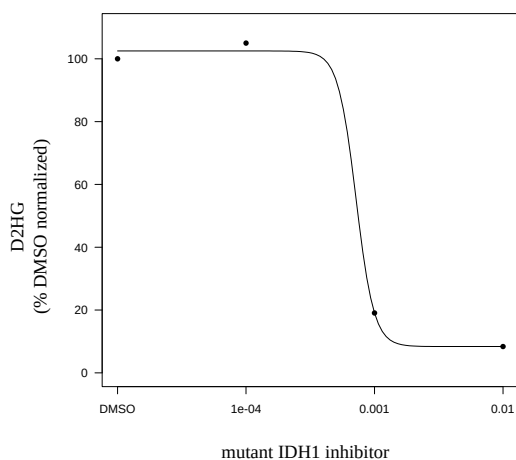


図 1. 変異 IDH1 阻害薬と D2HG

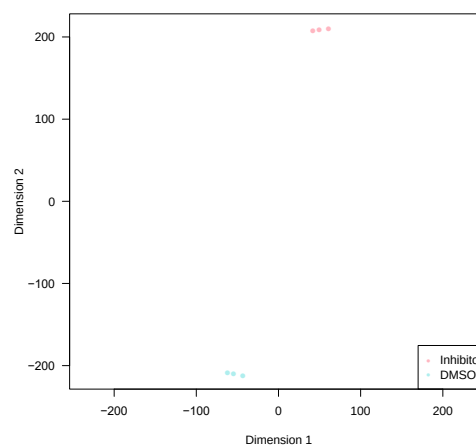


図 2. 変異 IDH1 阻害薬と遺伝子発現

RNA expression (IDH inhibitor vs DMSO)

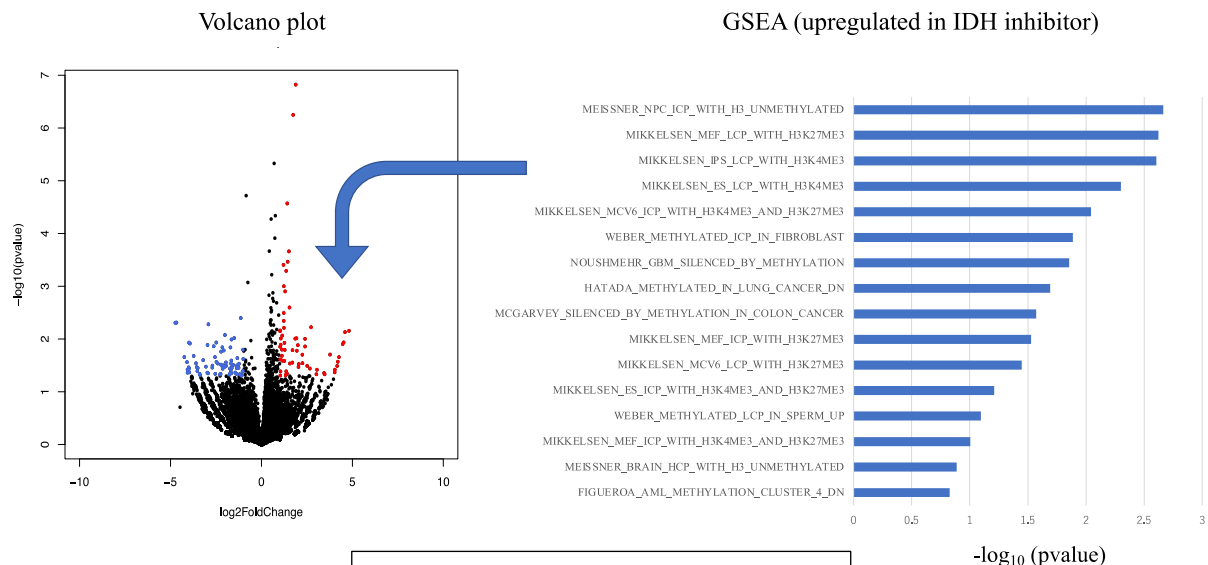


図3. 変異 IDH1 阻害薬と GSEA

4. 考察

変異 IDH1 阻害薬により D2HG の発現が抑制され、通常 D2HG による広範なメチル化により発現抑制されている遺伝子群が高発現となった一方で、増殖能など表現型には明らかな変化を認めなかった。当初の計画では、DNA バーコードライブラリを用いた治療によるサブクローン変化の追跡を予定していたが、入手可能な細胞株は阻害薬投与の有無による増殖能変化を示さなかったため、サブクローン変化追跡には不向きと判断された。現在、ゲノムおよびエピゲノムの変化と治療抵抗性の関係を明らかにするために、CRISPR/Cas9 を用いた遺伝子機能と治療抵抗性のゲノムワイドな探索実験の準備を進めている。

5. 文献

1. Louis, D.N. *WHO classification of tumours of the central nervous system*, (International Agency For Research On Cancer, Lyon, 2016).
2. Suzuki, H., *et al.* Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nat Genet* **47**, 458–468 (2015).
3. Cancer Genome Atlas Research, N., *et al.* Comprehensive, Integrative Genomic Analysis of Diffuse Lower-Grade Gliomas. *N Engl J Med* **372**, 2481–2498 (2015).

4. Mellinghoff, I.K., *et al.* Ivosidenib in Isocitrate Dehydrogenase 1. *J Clin Oncol* **38**, 3398-3406 (2020).

6. 論文発表 なし