慶應義塾大学学術情報リポジトリ
Keio Associated Repository of Academic resouces

Title	頭蓋底脊索腫の分子生物学的解析と予後因子の検討
Sub Title	Molecular risk factors of skull base chordomas
Author	北村, 洋平(Kitamura, Yohei)
Publisher	
Publication year	2014
Jtitle	科学研究費補助金研究成果報告書 (2013.)
JaLC DOI	
Abstract	脊索腫は脊索の遺残組織から発生し頭蓋底に好発する難治性の腫瘍です。今回私達は比較ゲノムハイブリダイゼーション法を用いた染色体解析を行い、経過との比較を行いました。また、近年脊索腫の進行において重要な役割を果たしているとされるT遺伝子とその産物であるbrachyuryタンパク質についても調べ、経過との比較を行いました。染色体1番短腕の欠失と1番長腕, 2番短腕の過剰がある症例、brachyuryの発現のある症例、T遺伝子のコピー数増加のある症例などは、再発までの期間が短く予後が悪いことが明らかになりました。今回の結果によりbrachyuryが分子標的治療の標的として有望である事がわかりました。 Chordoma is an invasive tumor that develops from notochordal remnants and frequently occurs in skull base. T gene and its product (brachyury) have been recently suggested to play an important role in chordoma progression. We analyzed skull base chordomas for chromosomal copy number aberrations by comparative genomic hybridization, brachyury expression by immunohistochemistry, and T gene copy number by fluorescence in situ hybridization. Statistical analyses demonstrated that losses on chromosome 1p and gains on 1q, 2p, expression of brachyury, and gain of T gene were significantly associated with shorter progression free survival. Our results suggest that brachyury-negative chordomas are biologically distinct from brachyury-positive chordomas, and T/brachyury might be one of the best molecular therapeutic targets of chordoma.
Notes	研究種目：若手研究(B) 研究期間：2012～2013 課題番号：24791519 研究分野：医歯薬学 科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学
Genre	Research Paper
URL	https://koara.lib.keio.ac.jp/xoonips/modules/xoonips/detail.php?koara_id=KAKEN_24791519seika

慶應義塾大学学術情報リポジトリ(KOARA)に掲載されているコンテンツの著作権は、それぞれの著作者、学会または出版社/発行者に帰属し、その権利は著作権法によって保護されています。引用にあたっては、著作権法を遵守してご利用ください。

The copyrights of content available on the KeiO Associated Repository of Academic resources (KOARA) belong to the respective authors, academic societies, or publishers/issuers, and these rights are protected by the Japanese Copyright Act. When quoting the content, please follow the Japanese copyright act.

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ５ 月 ２９ 日現在

機関番号：３２６１２
研究種目：若手研究(B)
研究期間：2012～2013
課題番号：２４７９１５１９

研究課題名（和文）頭蓋底脊索腫の分子生物学的解析と予後因子の検討

研究課題名（英文）Molecular risk factors of skull base chordomas

研究代表者
北村　洋平（Kitamura, Yohei）

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：３０４４５３８２

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,200,000円、（間接経費）　960,000円

研究成果の概要（和文）：脊索腫は脊索の遺残組織から発生し頭蓋底に好発する難治性の腫瘍です。今回私達は比較ゲノムハイブリダイゼーション法を用いた染色体解析を行い、経過との比較を行いました。また、近年脊索腫の進行において重要な役割を果たしているとされるT遺伝子とその産物であるbrachyuryタンパク質についても調べ、経過との比較を行いました。染色体1番短腕の欠失と1番長腕，2番短腕の過剰がある症例、brachyuryの発現のある症例、T遺伝子のコピー数増加のある症例などは、再発までの期間が短く予後が悪いことが明らかになりました。今回の結果によりbrachyuryが分子標的治療の標的として有望である事がわかりました。

研究成果の概要（英文）：Chordoma is an invasive tumor that develops from notochordal remnants and frequently occurs in skull base. T gene and its product (brachyury) have been recently suggested to play an important role in chordoma progression. We analyzed skull base chordomas for chromosomal copy number aberrations by comparative genomic hybridization, brachyury expression by immunohistochemistry, and T gene copy number by fluorescence in situ hybridization. Statistical analyses demonstrated that losses on chromosome 1p and gains on 1q, 2p, expression of brachyury, and gain of T gene were significantly associated with shorter progression free survival. Our results suggest that brachyury-negative chordomas are biologically distinct from brachyury-positive chordomas, and T/brachyury might be one of the best molecular therapeutic targets of chordoma.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：頭蓋底　脊索腫　brachyury　T遺伝子　2番染色体

１．研究開始当初の背景

脊索腫は胎児期の脊索遺残組織から発生し、頭蓋底や椎体、仙骨部に好発する難治性の腫瘍である。頭蓋底脊索腫は、頻度としては頭蓋内腫瘍の 0.5%であるが、高い確率で再発し、腫瘍死に至る事が多い。頭蓋底という手術で到達が困難な部位に生じ、骨の内部に浸潤性に発育するため全摘が困難である点が治療を一層困難にしている。

治療は、手術による可及的摘出以外に、放射線治療(陽子線、重粒子線、定位放射線治療など)が行われるようになってきているものの、効果は限定的である。分子標的薬(イマチニブなど)も検討されたが、明らかな有用性は示されていない。頭蓋底脊索腫の分子生物学的研究の報告は極めて少ない。それは、この腫瘍の頻度が少なく、まとまった症例数を集めることが困難である点が主な原因であると考えられる。

一方、脳腫瘍の一つである神経膠腫の分野において分子生物学的解析が進み、治療効果や予後がある種の染色体異常と相関することが証明された。とくに退形成性乏突起細胞腫における染色体１番短腕と１９番長腕の共欠失（1p/19q loss）が化学療法感受性や生命予後と相関することが報告され、治療法選択や個別化治療などに臨床応用されている。

我々は、脊索腫において、このような治療法選択や予後判定に有用な染色体・遺伝子異常の特定するため本研究を計画した。文献上、すでに数例から 10 数例レベルでの遺伝子解析の報告はいくつか存在し、1 番染色体や、7 番染色体の異常の頻度が高く、また 9 番染色体短腕の欠失が予後と関連するという報告もあるが、いずれも症例数は少なく、単変量解析のみの報告で、独立した予後因子の報告は存在しなかった。

また、近年、6q27 にコードされている *T* 遺伝子とその産物である brachyury タンパク質が脊索腫の発生や進行において重要な役割を果たしていることが明らかになってきた。*In vitro* の研究では、*T* 遺伝子の抑制によって脊索腫の増殖が止まったり、逆に過剰に発現させる事で増殖が進む事が報告されている。しかし、これまでにこれらの異常と実際の臨床的な予後などを比較した報告はなかった。

２．研究の目的

我々の施設では、歴史的に脳腫瘍の中でも脊索腫など頭蓋底腫瘍の手術を得意としており、これまでに手術によって切除された頭蓋底脊索腫の腫瘍標本が多数存在した。それらの標本を用いて頭蓋底脊索腫の分子生物学的解析を行い、複数の症例に共通して認めた異常について、統計学的に予後との比較を行い、関連する因子の探索を行うことを計画した。

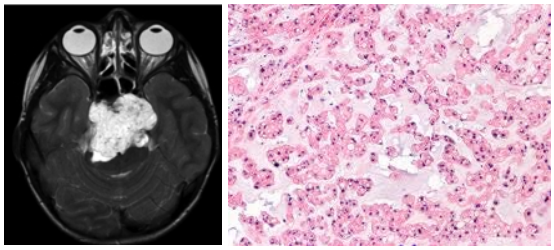
具体的には、comparative genomic hybridization(CGH)法により、全染色体を網羅的に解析した。*T* 遺伝子の増幅と brachyury タンパク質の発現について、fluorescence in situ hybridization(FISH) 法と immunohistochemistry(IHC)法にて解析を行った。これらの結果と予後との関係を統計学的手法にて解析し、予後と関連する因子の特定を試みた。

3、研究の方法

当院の手術で摘出された頭蓋底脊索腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。

この研究は当施設の倫理委員会での承認を受けて行った。

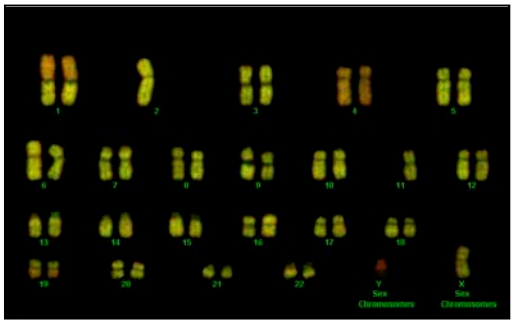
診断は病理専門医とともに組織形態学的に行い、軟骨肉腫との鑑別が難しい症例では上皮マーカーの免疫染色(pankeratin, EMA)を追加した。



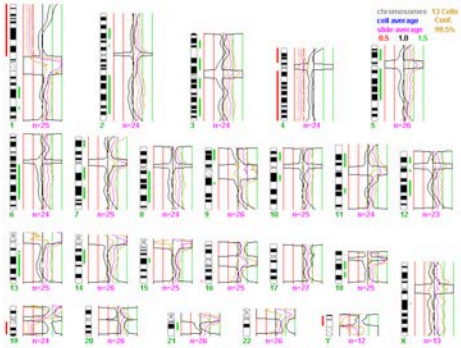
（↑一般的な脊索腫の MRI 画像所見と病理組織所見）

(1) CGH 法

パラフィン包埋切片を薄切し、連続する HE 標本から、病理医が腫瘍と診断した範囲の細胞からのみ DNA を抽出した。DNA を Degenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction (DOP-PCR)法にて DNA を非特異的かつ均一に増幅させた。腫瘍 DNA を FITC で、正常 DNA を rhodamine で標識し、スライドグラス上に展開された正常リンパ球の metaphase spread に競合的に hybridize し、gain と loss を判定した。解析には、CGH 解析用ソフトウェア（CytoVision）を使用した。



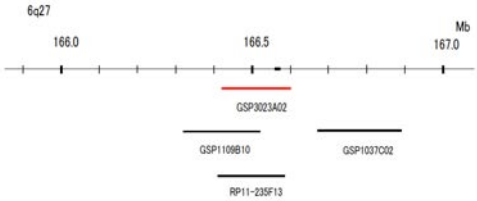
（↑　過去の CGH の結果の一例：腫瘍 DNA が緑色で、正常 DNA が赤色で描出されている）



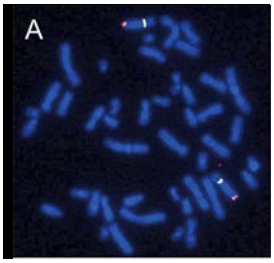
（↑　過去の CGH 解析結果の一例：染色体図の右側の線の部分が gain、左側が loss を示す）

(2) FISH 法

Texas-red で標識された *T* (brachyury) 遺伝子を含む BAC clone から作られた probe と FITC で標識された 6 番染色体の centromere 近傍の配列への probe を、前処理した薄切標本上に hybridize させた。蛍光顕微鏡でシグナルをカウントし、*T* 遺伝子のシグナルが 4 個以上、もしくは centromere との比が 2 以上で陽性と判定した。



（↑　*T*(brachyury)の位置を示す schema）



（↑　FISH プローベのテスト：*T* 遺伝子の位置が赤色で、セントロメアが緑色で描出されている）

(3) brachyury の免疫染色

薄切切片をクエン酸 buffer に入れ microwave で antigen retrieval を 20 分間行い、抗 brachyury 抗体を使って、一晩 incubate を行った。過去の文献に従い、核が強く、びまん性に染色されている標本を陽性と判定した。

(4)統計学的解析

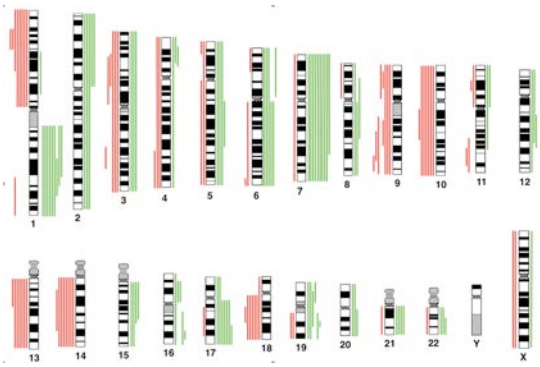
無増悪生存期間 (Progression free survival: PFS)とそれぞれの因子との関係を Kaplan-Meier 法と log-rank 検定で評価した。CGH の結果については 5 例以上で認められた異常について解析を行った。単変量解析で有為であったものについては、cox ハザードモデルを使用した多変量解析を追加した。

４．研究成果

我々が解析を行った症例の平均年齢は 43.6 歳で、再発は 37 例中 19 例に認められた。再発までの期間の中央値は 20 ヶ月であった。

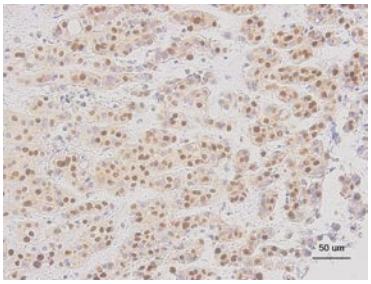
全摘されたのは 8 例で、放射線治療は 17 例に施行された。腫瘍の増殖能を示す MIB-1 値は平均 4.2 %であった。log-rank 検定の結果、MIB-1 高値の症例、全摘でない症例、放射線未治療の症例、女性の症例は有意に PFS が短いという結果が得られた。

CGH の結果、24 例で染色体異常を認め、log-rank 検定の結果、染色体 1 番短腕 (1p) の欠失と 1 番長腕 (1q) , 2 番短腕 (2p) の過剰がある症例では PFS が有意に短いという結果が得られた。



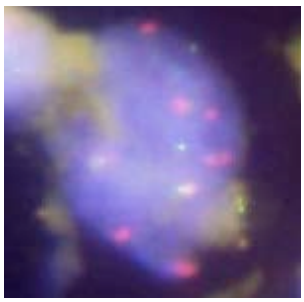
（↑　頭蓋底脊索腫の CGH 結果のまとめ：右側の緑色の線が gain の症例を、左側の赤色の線が loss の症例を示す）

brachyury の免疫染色は 30 例で陽性で、log-rank 検定で陽性の症例は PFS が有意に短かった。

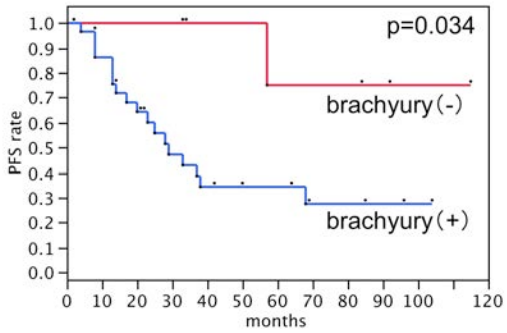


（↑　brachyury の IHC の結果の一例：核が強くびまん性に染色されている）

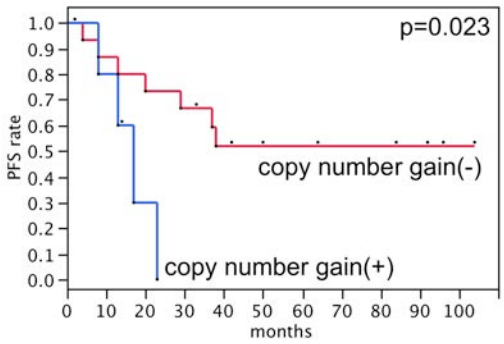
T 遺伝子の FISH では、27%の症例でコピー数の増加を認め、log-rank 検定でコピー数増加のある症例は有意に PFS が短かった。



（↑　FISH の結果の一例：赤で描出されている *T* 遺伝子のシグナルが多数認められる）



（↑　brachyury の IHC の陽・陰性で分けた時の PFS の kaplan-meier 曲線：brachyury の発現のある症例は PFS が短い傾向がある）



（↑　*T* 遺伝子の copy number gain の有無で分けた時の PFS の kaplan-meier 曲線：T 遺伝子の copy number gain のある症例は PFS が短い傾向がある）

単変量解析で有意であった項目について cox ハザードモデルを用いた多変量解析を追加すると、brachyury の発現と放射線未治療の症例で PFS と関連する傾向が認められた（ハザード比：それぞれ 5.480、2.675、p 値：それぞれ 0.055、0.063）。また、*T* 遺伝子の増幅を含めた解析では、2p の過剰と放射線未治療の症例は有意に PFS が短かった（ハザード比：それぞれ 18.98、5.775, p = 0.030 and 0.043、p 値：それぞれ 0.030、0.043）。

今回我々は 2p の過剰が予後不良因子であるとの報告を行ったが、近年同じことが慢性リンパ性白血病で報告されている。また、近年 *in vitro* の研究で、T 遺伝子が脊索腫の進行において重要な役割を担い、腫瘍遺伝子として振る舞うとする報告が相次いる。今回我々は臨床的な側面から brachyury の発現が負の予後因子であることを示した。また、brachyury は今後分子標的治療の最適な標的の一つとなりうると考えられた。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　1　件）

(1) Kitamura Y, Sasaki H, Kimura T, Miwa T, Takahashi S, Kawase T, Yoshida K、Molecular and Clinical Risk Factors for Recurrence of Skull Base Chordomas: Gain on Chromosome 2p, Expression of Brachyury, and Lack of Irradiation Negatively Correlate With Patient Prognosis、Journal of Neuropathology and Experimental Neurology、査読有、72 巻、2013 年、814-821 頁、DOI: 10.1097/NEN.0b013e3182a065d0

〔学会発表〕（計　2　件）

(1) 北村洋平、佐々木光、木村徳宏、三輪点、高橋里史、河瀬斌、吉田一成、頭蓋底脊索腫の分子生物学的特徴と予後因子の検討、日本頭蓋底外科学会、2013 年 6 月 26 日、名古屋東急ホテル（名古屋）

(2) 北村洋平、佐々木光、木村徳宏、三輪点、高橋里史、河瀬斌、吉田一成、頭蓋底脊索腫の分子生物学的解析と予後因子の検討、日本脳神経外科学会総会、2012 年 10 月 17 日、グランキューブ大阪（大阪）

〔図書〕（計　0　件）

〔産業財産権〕
○出願状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況（計　0　件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

６．研究組織

(1)研究代表者
北村　洋平（Kitamura, Yohei）
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号：30445382