

論文の内容の要旨

論文題目 小児悪性腫瘍における *Isocitrate dehydrogenase (IDH) 1* および *IDH 2* の解析

氏名 大木 健太郎

要旨

ほとんどのがん細胞にあてはまる特徴として、増殖シグナルの自律性、増殖抑制シグナルの回避、アポトーシスの回避、無制限自律増殖能、血管新生、浸潤と転移の他に、近年細胞代謝の変化が新たに注目されてきた。細胞増殖や血管新生には、十分なエネルギーが必要であるが、エネルギー代謝において重要な役割を果たしているものに解糖系と TCA cycle がある。正常細胞においては、有酸素環境下で解糖系と TCA cycle の両方でエネルギーが産生され、低酸素環境下では解糖系がエネルギー産生の中心となるが、がん細胞においては、有酸素環境、低酸素環境のいずれにおいても解糖系が中心で、TCA cycle は抑制されている。近年、TCA cycle に関わる酵素の 1 つである *isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)* や *IDH2* の変異が様々な腫瘍で報告され、腫瘍の発症に関わる可能性が示されている。低悪性度神経膠腫や 2 次性神経膠芽腫の 70% 以上に *IDH1* の変異が、5% 未満に *IDH2* の変異が報告され、腫瘍発症のメカニズムとして IDH-dependent pathway が提唱されている。成人急性骨髄性白血病や骨髄異形成症候群、骨髄増殖性疾患において、*IDH1* および *IDH2* の変異の頻度は 4~15% で、変異症例では *IDH1* および *IDH2* 以外に遺伝子変異や染色体異常が少ないこと、*FLT3/ITD*、*NPM* 変異症例に多く予後不良であることが報告されている。報告されている変異は全て heterozygous の体細胞変異であり、*IDH1* および *IDH2* の活性化部位とその近傍に変異が集中している。他の腫瘍に関しては小児急性骨髄性白血病を含めて *IDH1* および *IDH2* の変異は非常に稀であることが報告されているが、小児悪性腫瘍における *IDH1* や *IDH2* 変異の頻度や種類、予後との関連についてまだほとんど解明されていない。*IDH* の変異による造腫瘍性のメカニズムとして、通常の isocitrate (ICT) から α -ketoglutarate (α -KG) への反応が機能喪失し、低酸素状態で細胞の生存を高める Hif1- α の代謝が阻害され、造腫瘍性に関わる可能性や、

変異 *IDH* により α -KG から 2-Hydroxyglutarate(2-HG)への反応が機能獲得されることにより、エピジェネティックな変化による造腫瘍性を示す可能性が示唆されているが、*IDH1* や *IDH2* 変異による腫瘍発生のメカニズムは未解明である。

私は、小児骨髄性腫瘍 199 検体、小児固形腫瘍 407 検体の計 606 検体を用いて *IDH1* および *IDH2* の全コーディングエクソンについて変異解析を行い、新規に見いだされた変異により生じる変異 *IDH1/2* 蛋白の機能や腫瘍発生のメカニズムを明らかにするために、変異 *IDH1/2* 蛋白の酵素活性の測定と、TCA cycle や解糖系に関わる酵素と 2-HG のメタボローム解析を行った。また、AML サンプルで *IDH1/2* 変異との関連が示唆されている *NPM1* と小児 AML の予後因子である *c-KIT* の変異解析、*FLT3-ITD* の検索を行った。*IDH* 変異症例においては、SNP アレイ解析も行った。

IDH1 および *IDH2* の変異解析の結果、認められた変異は全てこれまでの報告と同様に heterozygous な変異であった。AML の 1 例で既知のミスセンス変異である *IDH2* R140Q 変異が認められた。同症例で *NPM1* や *c-KIT* の変異、*FLT3-ITD* は認められなかった。小児固形腫瘍では、既知の変異は認められず、7 つの新規変異が得られた。得られた変異と腫瘍との関連性について推測するソフトである Mutation taster による検討で、1 種類は SNP が疑われ、7 種類は腫瘍との関連が推測された。*IDH1/2* 変異の頻度は、AML 初発時検体で *IDH2* 変異が 0.9%(1/111)、神経芽腫新鮮腫瘍で *IDH1* 変異が 1.6%(2/124)、*IDH2* 変異が 0.8%(1/124)、横紋筋肉腫細胞株で *IDH2* 変異が 8.3%(1/12)、ユーイング肉腫新鮮腫瘍で *IDH2* 変異が 1.8%(1/55)、未分化神経外胚葉性腫瘍の新鮮腫瘍で *IDH1* 変異が 4.5%(1/22)、脳腫瘍細胞株で *IDH2* 変異が 11%(1/9)で認められた。小児悪性腫瘍における *IDH1/2* 変異の頻度は成人に比べ、その頻度は低いと考えられた。神経芽腫の 1 症例で、*IDH1* にコドン 143 のアミノ酸がストップコドンとなるフレームシフト変異が認められ、横紋筋肉腫の細胞株 1 株で、*IDH2* にコドン 160 のアミノ酸がストップコドンとなるフレームシフト変異が認められた。フレームシフト変異により生じる変異 *IDH1/2* 蛋白は、いずれも活性化部位が失われる短縮型 *IDH* 蛋白となり、機能喪失型変異であると推測された。

IDH2 変異が認められた AML 症例は、12 才の男児で予後良好因子である t(8;21)を伴っていたが、通常の寛解導入療法後 CR に入った後、11 ヶ月後に再発し、その後の治療にも関わらず永眠された。SNP

アレイ解析によるアレルコピー数の解析で 7q、9q、16q、17q の欠失や 12q、17q、22q の増幅等の複数の染色体異常を有しており、既知の予後不良因子である *FLT3/ITD*、*NPM*、*c-KIT* 変異は認められなかったにも関わらず、予後不良な経過を辿った。*FLT3-ITD* や *c-KIT*、*NPM* 変異を認めない t(8;21) を有する小児 AML において、*IDH2* 変異が予後不良因子となっている可能性が考えられた。*IDH1* のフレームシフト変異を認めた神経芽腫症例は、9 才の男児で原発部位は縦隔であり、診断時に多数の転移が認められていた。化学療法や腫瘍切除術を行ったが、転移巣が残存し、治療反応性は不良であった。患児の SNP アレイ解析の結果で既知の予後不良因子である *MYCN* の増幅や 1p、11q の LOH は認めなかったが、これまで報告のない 10p の LOH や 22q の gain など複数の染色体のコピー数の異常を認めた。腫瘍性疾患をもつ家族歴はなかった。*IDH1* のフレームシフト変異は、児の末梢血でも認められ、生殖細胞変異であることが判明した。その後両親と姉 3 人において変異解析を行い、母から受け継がれた変異であることが示された。患児と父親、母親の尿中 2-HG 蛋白量のメタボローム解析を行ったところ、生殖細胞変異を認めた神経芽腫症例と母親の尿中 2-HG 蛋白量は、変異を有していない父親と有意差は認められず、新規のフレームシフト変異は機能獲得型変異ではないことが確認された。

今回、新規に見いだされたミスセンス変異について、変異 *IDH1/2* 蛋白の機能解析として、蛋白活性の測定とメタボローム解析を行った。*IDH2* 野生株と I142L、R140Q、R172K 変異体について *IDH* 蛋白活性を測定した。*IDH2* 蛋白の発現量を Western blotting で測定したところ、新規 *IDH2* I142L 変異体と野生株、既知の R140Q、R172K 変異体の *IDH2* 蛋白発現量は同等であった。新規の *IDH2* I142L 変異体は ICT から α -KG への反応については、既知の R140Q や R172K 変異体に比べると活性は高いが、野生株に比べて *IDH2* の蛋白活性が有意に低下しており、機能喪失型変異であることが示された。次に α -KG から 2-HG への反応については、新規の *IDH2* I142L 変異体は野生株に比べて *IDH2* 蛋白活性の亢進は認められず、酵素活性は有意に低下しており、機能獲得型変異ではないことが示された。*IDH1* 野生株と R132H、I154V、S389C 変異体、*IDH2* 野生株と V8A、P23R、I142L、R140Q、R172K 変異について、メタボローム解析で 2HG 蛋白量を測定し、 α KG から 2HG への反応について、*IDH1/2* 新規変異蛋白の機能の亢進がみられるか検討したところ、既知の *IDH1* R132H 変異体と *IDH2* R140Q、*IDH2*

R172K 変異体は野生株に比べて有意に 2HG 蛋白量が多かったが、新規 IDH1/2 変異体は野生株と有意差は認められず、新規変異は α -KG から 2-HG への反応の機能獲得がないことが示された。次に *IDH1* 野生株と R132H、I154V、S389C 変異体、*IDH2* 野生株と V8A、P23R、I142L、R140Q、R172K 変異について、メタボローム解析を用いて、細胞のエネルギー代謝で重要な働きを示す TCA cycle や解糖系に関わる酵素を測定したところ、既知の *IDH2* R140Q と R172K 変異体は野生株に比べて TCA cycle の抑制と解糖系の亢進が認められたが、新規 IDH1/2 変異体はがん細胞の特徴である TCA cycle の抑制と解糖系の亢進は認められなかった。

今回の私の検討で、小児悪性腫瘍における *IDH1* および *IDH2* 変異の頻度は低悪性度神経膠腫や成人 AML などのこれまでの報告に比べて低いことが分かったが、少なくとも一部の症例では、*IDH* 変異が見られることが分かった。*IDH* 変異症例の詳細な検討や小児固形腫瘍で見いだされた新規変異の機能解析を行うことにより *IDH* 変異による腫瘍細胞の代謝変化や腫瘍発生に関わるメカニズムの解明に重要な示唆を得ることができた。