

公益財団法人 寺岡記念育英会

2022 年度 海外留学滞在費助成事業 研究活動報告書一覧

膠芽腫におけるメチル化プロファイルの腫瘍内不均一性の解明とラディオメチロミクス 岡山大学医学部 脳神経外科学 松本悠司	・・・ 1
関節リウマチなどの炎症性疾患の発症機序や新規治療に関する研究 岡山大学大学院 歯科薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学 浅野 洋介	・・・ 3

※対象者の所属・職位は、本助成事業への応募当時のものです。

(表題)

膠芽腫におけるメチル化プロファイルの腫瘍内不均一性の解明とラディオメチロミクス

(所属) 岡山大学病院医歯薬総合研究科 脳神経外科学

(氏名) 松本 悠司

(概要)

1. 渡航先: University of Pennsylvania, Center For AI And Data Science For Integrated Diagnostics
2. 日程: 2023年4月3日より研究開始。2024年4月現在研究継続中
3. 研究及びその成果の概要

(背景・目的)

膠芽腫は脳腫瘍の中で最も予後不良な疾患であり、新規治療戦略の開発が急務である。近年、手術検体を用いたゲノムワイドメチル化解析の発展に伴い、膠芽腫はメチル化プロファイルにより主に RTK I, RTK II, MES のサブクラスに分類され、メチル化サブクラスごとに適切な治療法が存在することが示唆されている。

膠芽腫の治療抵抗性の主な原因として、腫瘍内の分子生物学的不均一性が挙げられる。しかし、メチル化プロファイルの腫瘍内不均一性については未だ十分に解明されていない。本研究では、1) DNA メチル化サブクラスの腫瘍内不均一性の解析、2) メチル化プロファイルを用いたデコンボリューション解析による腫瘍組織内細胞組成の推定、3) 術前 MRI からメチル化プロファイルを推定するモデル構築(radiomethylomics)を目的とする。

(方法)

解析対象

ペンシルベニア大で手術を受けた成人膠芽腫患者を対象とし、複数の FFPE 検体組織を採取したマルチサンプリングコホートと、1つの FFPE 検体組織を採取したシングルサンプリングコホートから構成される。全ての FFPE 検体組織についてゲノムワイドメチル化解析および DKFZ/Heidelberg CNS tumor classifier を行い、成人膠芽腫と分類されたサンプルのみを対象とした。その結果、マルチサンプリングコホートは 32 患者/113 サンプル、シングルサンプリングコホートは 87 患者/87 サンプルを対象とした。

デコンボリューション解析

メチル化プロファイルを用いて 2 つのデコンボリューション解析 (Deconvolution 1, Deconvolution 2) を施行した。Deconvolution 1 では FFPE 検体組織から RTK_I, RTK_II, MES_TYP, MES_ATYP, Myeloid cells, Lymphoid cells, Endothelial cells, Glia/Neuron の細胞組成を推定できる。Deconvolution 2 では malignant Stem-like cells, malignant Differentiated cells, Immune, Neuron, Glia の細胞組成を推定する。

Radiomethylomics

本研究の対象患者は全て術前マルチパラメトリック MRI を有している。各患者で画像前処理を行い、留学先機関が開発した CaPTK ソフトウェア (<https://cbica.github.io/CaPTk/>) を用いて 6084 個の radiomic feature を定量的に抽出した。Deconvolution 2 で求めた Stem-like 値に応じて 2 つのクラスに分類し、ネステッドクロスバリデーション (外側ループ: 10 folds, 内側ループ: 5 folds) により複数の機械学習アルゴリズム (SVM, XGBoost, LightGBM) で二値分類予測モデルを構築した。モデル構築の際、特徴量選択は RFECV を、ハイパーパラメータチューニングは GridSearchCV もしくは Optuna を用いた。各モデルの性能を評価し、最も高性能であったモデルを選択した。

(成果)

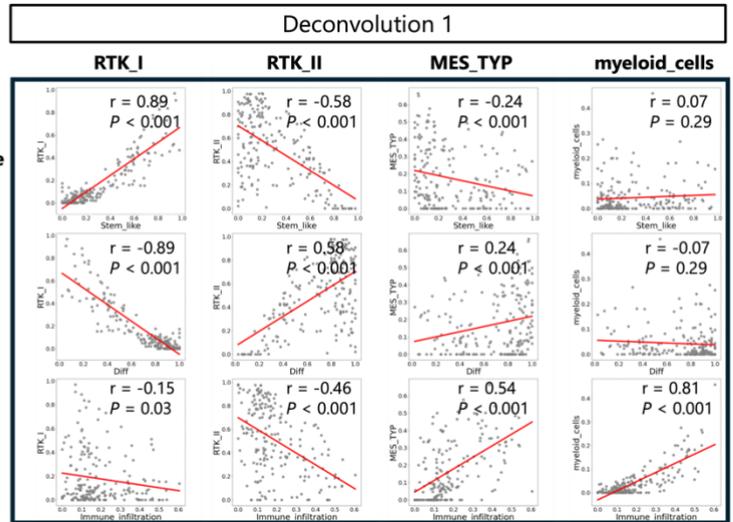
マルチサンプリングコホートにおいて、FFPE 検体組織の DKFZ/Heidelberg CNS tumor classifier では 8 患者

(25%) で患者内組織間のメチル化サブクラスの不均一性を認めた。また、マルチサンプリングコホートにおいて、Deconvolution 1により患者内組織間で RTK_I, RTK_II, MES_TYP サブクラスの腫瘍成分および微小環境成分が不均一に混在していることが示され、MES_TYP サブクラスの腫瘍成分が豊富な検体組織では Myeloid cells 成分も豊富に存在した。Deconvolution 2 では Immune 成分は同様に患者内組織間で不均一な組成を示したが、興味深いことに、Stem-like 成分は患者内組織間でも均一に保たれており、不均一性を認めなかった。

全コホートを用いて Deconvolution 1 と Deconvolution 2 の結果を解析すると、RTK_I 成分は Stem-like 成分と、RTK_II 成分は Differentiated 成分と、MES_TYP 成分は Immune 成分と高い相関を示した (図 1)。また、TCGA データセットも用いた解析でも同様の結果を得られた。Deconvolution 2 の Stem-like 値が 0.28 以上の患者を Stem-like Tumor、0.28 未満の患者を Non-Stem-like Tumor と定義したところ、全コホートを用いた全生存期間解析

図 1

Deconvolution 2



では Stem-like Tumor は有意に予後不良であった (図 2)。TCGA データセットを用いた解析でも、Stem-like Tumor は同様に予後不良であった。全コホートを用いて術前マルチパラメトリック MRI から Stem-like Tumor を分類予測する機械学習モデルを構築したところ、SVM で最良の結果を示し、Mean ROC AUC: 0.71 (95% CI: [0.56, 0.85])、Mean Balanced Accuracy: 0.66 (95% CI: [0.53, 0.78])の結果であった (図 3)。

図 2

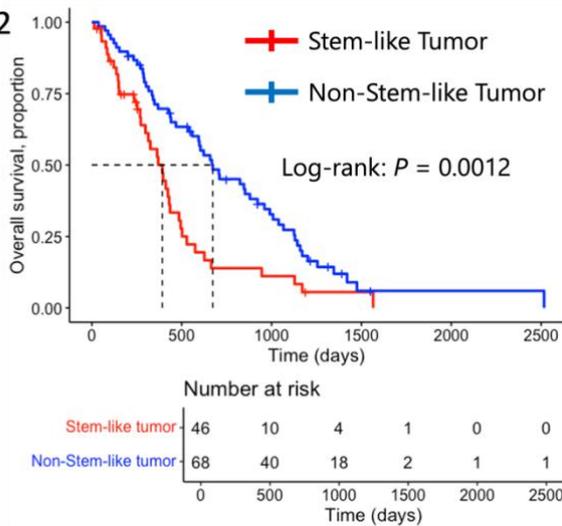
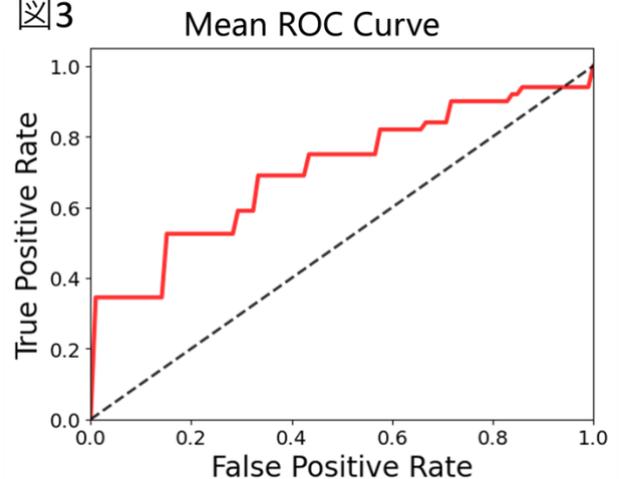


図 3



(まとめと今後の展望)

本研究結果は、膠芽腫の新規治療開発にあたり、メチル化プロファイルと腫瘍微小環境の腫瘍内不均一性を考慮する重要性を示唆している。また、radiomethylomics 解析により、術前画像から非侵襲的に腫瘍の stemness と患者転帰を予測できる可能性を示した。今後は解析症例 (検体) を増加させ、さらに頑健な解析結果を得られるようにしていく予定である。

(表題) 関節リウマチなどの炎症性疾患の発症機序や新規治療に関する研究

(所属) 岡山大学大学院 歯歯薬学総合研究科 腎・免疫・内分泌代謝内科学

(氏名) 浅野 洋介

(概要)

1. 渡航先

University Health Network

2. 日程

2023年4月3日より研究開始、2024年4月現在研究継続中。

3. 研究及びその成果の概要

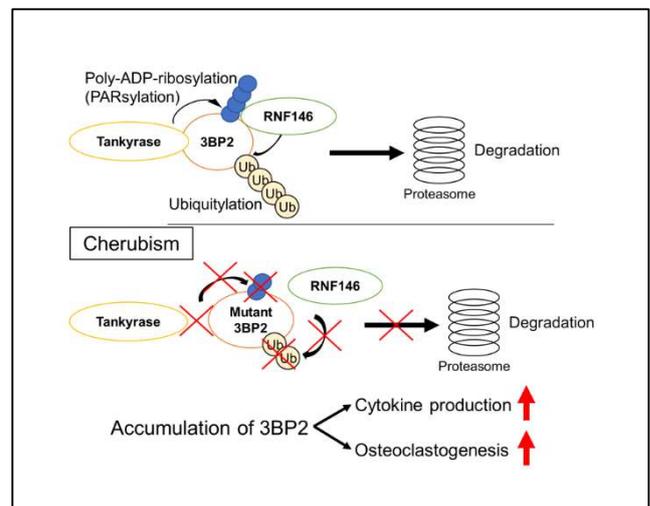
関節リウマチ (RA) は自己免疫や自己炎症に起因して生じ、主に多関節炎を生じる自己免疫性疾患の一つである。これまで長きにわたって不治の病とされていた RA は、生物学的製剤などの新薬の登場によって治療が大きく進歩を遂げたが、一方で多剤耐性の病態も未だ多く存在し、病因も未解明である。本邦での罹患患者数はおよそ 60-100 万人と推定され、難治症例や既存治療に不応の症例も一定数みられ、病因・病態が未だ十分に解明されていない。

これまで遺伝性炎症性骨疾患である Cherubism (本邦では小児慢性特定疾患のケルビズム) 研究から関連した Tankyrase (TNKS) 阻害とその下流シグナル、および炎症や骨代謝への影響について研究を行ってきた。TNKS は poly(ADP-ribose) polymerases (PARP) ファミリーに属するタンパク質で、基質となるタンパク質に poly(ADP-ribosyl)ation とよばれる修飾を加え、下流のシグナル伝達や代謝を制御し細胞増殖や DNA 修復へ寄与することが知られている。PARP 阻害薬は近年乳がんや卵巣がんなど悪性腫瘍治療として臨床応用がされており、TNKS も別の基質蛋白である AXIN を介して細胞分化を調節する Wnt/ β カテニン経路への制御をもたらすため、TNKS 阻害薬は悪性腫瘍治療の標的として研究がされてきた。

渡航先の University Health Network (UHN)、Professor. Robert Rottapel 研究室ではこれまで Cherubism の発症メカニズムや関連分子の研究に取り組んできている。Cherubism はチロシンキナーゼシグナルを伝える 3BP2 の 1 アミノ酸変異で起こることが報告された後も、そのメカニズムは長らく不明であったが、この変異により TNKS が基質である 3BP2 に結合できなくなり、正常に代謝されず 3BP2 の蓄積を生じ、下流の自然免疫系の活性化や破骨細胞異常活性化が生じるという Cherubism の病態を Rottapel 研究室が初めて解明した (Guettler S, et al. Cell. 2011.) (Levaot N, et al. Cell. 2011.) (図 1、Asano Y, et al. Front Immunol. 2023. より引用)。

この TNKS 阻害剤による骨髄マクロファージの刺激で

図 1 : tankyrase と下流のシグナル経路



生じる、TNKS 基質蛋白のアダプター蛋白 3BP2 や AXIN を介した下流の複数のシグナルをコントロールした炎症性サイトカイン産生や破骨細胞異常活性化の制御について検討と報告を行ってきた。これまでに TNKS コンディショナルノックアウトマウスを用いた検討で、TNKS は Toll Like Receptor (TLR) 経路を介して炎症が増強されることを報告してきた (Matsumoto Y, ..., Asano Y, ..., et al. J Clin Invest. 2022.)。この TLR 経路に着目し、リガンドの一つである Lipopolysaccharide (LPS) によるマウス骨髄マクロファージの刺激にて、TNKS の制御によって炎症性サイトカイン産生を制御することが示唆された (Asano Y, et al. Clin Exp Rheumatol. 2023.)。ケルビズムの病態や発症メカニズムの検討から始まった検討から、骨免疫系への影響について、RA の病態形成に関して自然免疫が関与することが近年報告されていることを踏まえ、3BP2 制御にかかわる蛋白 A と RA 発症及び病態形成について、炎症性難治性病態との関連や新規治療標的となる可能性について、疾患モデルマウスを用いて解明することを目的として検討を開始した。

蛋白 A および下流のシグナルと RA の関係を明らかにするため、血清移入関節炎モデルを用いた検討を行った。蛋白 A コンディショナルノックアウトおよびコントロールマウスに対して血清移入関節炎を誘導し、関節炎の程度を比較検討したところ、コントロールマウスと比べてコンディショナルノックアウトマウスの方で関節炎が強く誘導される結果となった (図 2, 3)。関節炎がより強く引き起こされたメカニズムの解明に向けて、今後両者の大腿骨や足関節などの μ CT による骨びらんなどの骨病変の評価や、関節滑膜を用いた炎症性サイトカインの測定、またフローサイトメトリーなどを検討していきたいと考えている。また、蛋白 A の下流に位置する蛋白 B をさらにノックアウトすることで関節炎病態へどのように影響するか、蛋白 A、蛋白 B ノックアウトモデルを用いた関節炎誘導実験を検討していく。

今後は引き続き蛋白 A とその下流のシグナル経路および炎症について、疾患との関わりについての理解を深め、体内分子メカニズムの更なる解明や、関節リウマチや骨粗鬆症をはじめとした骨疾患、および未解明の病態も依然として多く存在する自己免疫性疾患・自己炎症性疾患の病態解明への応用や新規治療ターゲットの発見、および治療法の開発へ寄与されるものと考え、継続して研究を行っていきたい所存である。

図 2 : 関節炎スコア (青 : コントロール、
橙 : コンディショナルノックアウト)

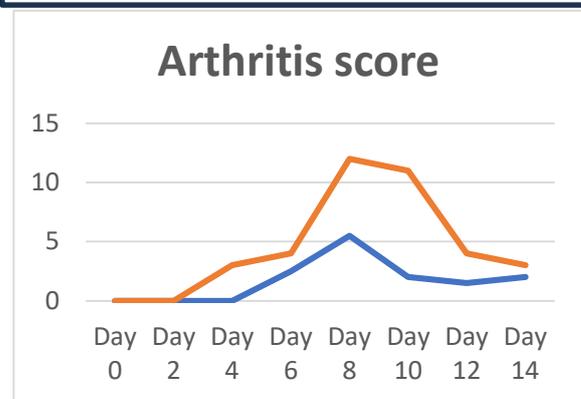


図 3 : 両者の関節炎比較 (ピーク時)

