

令和元年8月30日現在

機関番号：13802

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K10329

研究課題名(和文) 神経膠腫の悪性転化原因変異のエキソーム解析と血中分泌小胞分析による鑑別法の開発

研究課題名(英文) Exome analysis of glioma malignant transformation mutation and development of differentiation method by blood secretory vesicle analysis

研究代表者

蓑島 伸生 (Minoshima, Shinsei)

浜松医科大学・光先端医学教育研究センター・教授

研究者番号：90181966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：本研究は、低悪性度グリオーマの悪性転化に係わる遺伝子変化を見出すことを目的とした。主解析対象は、予後良好マーカーIDH1変異陽性で悪性転化した症例とした。本症例の悪性転化前/後の腫瘍検体および血液の全エキソーム配列解析を行った。事前検討により検体の腫瘍均質性が低いことが想定されたため、検出力が高いFPVD法で解析し、非同義塩基変化/悪性転化後検体特異的/COSMIC癌変異情報を指標に64遺伝子94変異を得た。脳腫瘍の高頻度変異遺伝子のうち、TP53およびPDGFRAの変異を悪性転化後検体にて見出した。また、血中分泌膜小胞に内包される遺伝子と蛋白について基礎研究を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

収集した脳腫瘍検体および血液検体について、IDH1,2変異を事前スクリーニングした。全100検体のうち、23検体にIDH1遺伝子R132変異を、1検体にIDH2遺伝子R172変異を見出した。今回の解析では、既に悪性転化を起こしている検体のみを主解析対象としたが、十分な知見を得るには更に多くの同様症例の解析が必要となる。残りの検体についても、今後の転化の状況により、解析を行う必要が生じる。悪性転化のみならず脳腫瘍のマーカー変異についての血液中の分泌膜小胞からの同定がなれば、侵襲度の低い鑑別検査法の確立に役立つ。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to find out the genetic changes associated with malignant transformation of low-grade glioma. The main analysis target was a case in which malignancy was transformed with a favorable prognosis marker IDH1 mutation. Whole exome sequencing was performed on the pre / post malignant tumor samples and blood of this case. Since it was assumed that the tumor homogeneity of the sample was low by the preliminary examination, it was analyzed by the high power FPVD method, and 64 gene 94 mutations were extracted based on non-synonymous base change / post malignant transformation sample specific / COSMIC cancer mutation information as index. Among high-frequency mutation genes of brain tumors, mutations of TP53 and PDGFRA were found in samples after malignant transformation. We also conducted basic research on genes and proteins contained in blood secretory membrane vesicles.

研究分野：ゲノム医科学・遺伝学

キーワード：低悪性度グリオーマ グリオブラストーマ 悪性転化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

成人に発症する星細胞腫 (diffuse astrocytoma) や乏突起神経膠腫 (oligodendroglioma) などの WHO grade の神経膠腫 (グリオーマ) は、悪性グリオーマに対して、Low grade glioma (低悪性度グリオーマ; LGG) と呼ばれている。悪性グリオーマに比し緩徐に進行するが、完治させることは困難な脳腫瘍で、5年生存率は星細胞腫で66.5%、乏突起神経膠腫で82.0%と報告されている。手術での可及的摘出+放射線治療が一般に施行されているが、経過中、最も問題となるのが悪性転化で、より悪性度の高い膠芽腫 (グリオブラストーマ) となると予後は極めて不良となってしまふ (1年生存率 51.6%、5年生存率 7.8%)。

LGGの悪性転化高リスク特性として、組織型が astrocytoma、患者年齢 40歳以上、KPS70未満、最大腫瘍径 6cm以上、腫瘍が正中を超えるもの、術前に神経学的異常のあるものなど宿主側の状態、腫瘍の大きさの他に、遺伝子情報として 1p/19q co-deletionがない、IDH遺伝子 (IDH1、IDH2) に変異がないなどがある。

また、脳腫瘍は悪性度により治療戦略が大きく変わる。例えば、良好因子のうち 1p/19q co-deletion に関しては、グレード2の乏突起神経膠腫の場合でも、1p/19q co-deletionがある場合は、グレード3の退形成乏突起神経膠腫に準じて、摘出+放射線療法に加え、積極的に化学療法を行う傾向にある。この処置で残った腫瘍の消失や縮小が期待でき、また、再発した腫瘍の場合でも、化学療法の再開がしばしば有効とされる。

我々は、医学研究「脳腫瘍の遺伝子検索」(浜松医科大学倫理委員会承認番号 23-41) にて、脳腫瘍サンプルを収集、保存し、IDH1遺伝子変異の有無、1p/19q co-deletionの有無など予後に関わる遺伝子変異の検索を施行している。IDH遺伝子は、星細胞腫や乏突起神経膠腫の約70%に変異が見出されることが報告されており、これらの変異は予後良好因子であるとされている。現在までに、複数のLGG、膠芽腫などのサンプルが集まっているが、その中で当初LGG (星細胞腫 WHO grade) であり IDH1 変異が見出されていたにも関わらず、後に悪性転化し膠芽腫となった症例があり、その悪性転化前/後の腫瘍サンプルが保存できている。

2. 研究の目的

低悪性度グリオーマは、管理は困難ではあるものの、進行は比較的緩徐であるが、悪性転化が起きて、より悪性度の高い膠芽腫 (グリオブラストーマ) になると予後は極めて不良となる。本申請では、対象症例の全エクソン解析をおこない、グリオーマの悪性転化の機序を追究することを目的とする。解析対象は、保存している当初低悪性度グリオーマであり IDH1 変異が見出されていたにも関わらず、後に悪性転化しグリオブラストーマとなった症例についての「同一患者での悪性転化の前と後の両方の腫瘍サンプル」とすることで効率的に、関与する新規遺伝子変異を同定する。また、その変異について血液中の分泌膜小胞 (エクソソーム) からの同定を試みることで悪性度に関する、侵襲度の低い鑑別検査法の確立を目指す。

3. 研究の方法

本研究の主対象となる悪性転化の前後の検体が揃っているものは複数あるが、当初に解析を行う症例は既に選定済みである。この症例に関する悪性転化前・後・血液由来ゲノムの3検体について解析を行い候補遺伝子変異情報を抽出する。解析の進捗に応じて、他の同種検体も対象に加える。また、次年度以降に複数の低悪性度およびグリオブラストーマ検体を解析し、これを用いて、低悪性度グリオーマ特異的である擬陽性などを差し引き、悪性転化に特異的な遺伝子変異を選定する。

1) ゲノム DNA の処理: 腫瘍からのゲノム DNA を抽出する。ゲノム DNA はコバリスを用いて断片化した後、アダプター付加反応を行う。

2) エクソンキャプチャ (ポストプール法を用いる): SureSelect XT キットを用いて、断片化されたゲノムを、エクソンのみを対象とするビオチン化ベイトライブラリとハイブリダイズさせる。ストレプトアビジン磁気ビーズと反応させ、AMPureXP 精製をおこない、キャプチャされたエクソン部分の DNA のみを回収する。

3) 次世代 DNA シーケンシング: サイズ確認と定量後、MiSeq あるいは NextSeq 次世代シーケンサーで解析する。

4) 変異抽出: CLC ジェノミクスワークベンチ (データ解析ソフト) を用いて、アセンブリを行ったのち、塩基変化を抽出する。本過程は以下の解析段階から成る。1次解析: 生データを配列データに変換 (この段階は MiSeq 搭載の純正ソフトウェアで行う) 2次解析: 配列データを参照ゲノム塩基配列データへマッピング、3次解析: 変位解析や転写物解析。複数サンプル間の比較解析。初年度は、悪性転化前・後・血液サンプル間の比較解析による候補遺伝子の抽出を行う。

5) 血液からのエクソソームの抽出と、内包されるタンパク成分および RNA の検出についての基礎検討を行う。エクソソームの精製は、超遠心法あるいは専用試薬の使用により行う。後者では、インビトロジェン社の Total Exosome RNA and Protein Isolation Kit などの使用を予定している。エクソソームを構成・内包される蛋白に関しては、質量分析計を用いたプロテオ

ーム解析により、差異を検出し、マーカー蛋白を選定する。また、RNA 成分を精製した後、配列解析により由来を同定し、特に対象変異遺伝子由来の RNA が含まれるか検討する。評価は、悪性転化に関わることが明らかになった遺伝子についての検出のみならず、腫瘍のステージによるエクソソーム自身の分泌量の変化や、ステージに応じたエクソソーム内包蛋白や RNA に関する特異性について行う。

4 . 研究成果

本研究は、低悪性度グリオーマの悪性転化に係わる遺伝子変化を見出すことを目的とした。

研究開始前に収集済みの検体に前年度迄に新規に収集した 31 患者検体を加え、さらに今年度新たに 5 患者から脳腫瘍検体および血液検体を収集した。この中には、IDH1,2 変異についての抗体による病理情報が無いものが含まれるため、事前変異スクリーニングを行った。全 100 検体のうち、23 検体に IDH1 遺伝子 R132 変異を、1 検体に IDH2 遺伝子 R172 変異を見出した。

主解析対象は、予後良好マーカー IDH1 変異陽性で悪性転化した症例(悪性転化検体)とした。本症例の悪性転化前/後の腫瘍検体および血液の次世代シーケンサー解析により全エキソン配列情報を取得した。事前検討により悪性転化前検体の腫瘍均質性が低いことが想定されたため、CLC ゲノミクスワークベンチ解析ソフトと検出力が高い FPVD 法で解析した。

全 20,950 個の塩基変化が検出された。これは、非同義塩基変化 1,825 個、悪性転化後の検体特異的な 260 個、COSMIC 癌体細胞突然変異情報陽性 64 遺伝子 94 個であった。脳腫瘍の高頻度変異遺伝子のうち、TP53 および PDGFRA のみ、悪性転化後検体にて変異を見出した。他遺伝子の非同義塩基変化については、アミノ酸保存性や、GO 情報により評価すると共に、別の悪性転化が疑われる同一患者について、同様に、悪性転化前/後の検体および血液について、次世代シーケンサー解析を行った。

血中分泌膜小胞に内包される遺伝子と蛋白の抽出・解析について基礎研究を行った。本計画以前に既収集済みの血液検体は、抗凝固剤添加の凍結保存全血であり、精製用試料として不適当なため、一昨年度収集分より、検体獲得時に血漿成分と単核球を分離し収集した。本試料を用い、その変異についての血液中の分泌膜小胞からの同定により悪性度に関する、侵襲度の低い鑑別検査法の確立に役立てる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名： 大坪 正史

ローマ字氏名： OHTSUBO Masafumi

所属研究機関名： 浜松医科大学

部局名： 光先端医学教育研究センター

職名： 助教

研究者番号(8桁): 10327653

研究分担者氏名： 足立 直樹

ローマ字氏名： ADACHI Naoki

所属研究機関名： 浜松医科大学

部局名： 光先端医学教育研究センター

職名： 技術職員

研究者番号(8桁): 70300853

研究分担者氏名： 徳山 勤

ローマ字氏名： TOKUYAMA Tsutomu

所属研究機関名： 浜松医科大学

部局名： 医学部附属病院

職名： 講師

研究者番号(8桁): 90313957

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。