

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10369

研究課題名(和文) 髄液中腫瘍由来free DNAによる小児～若年者脳幹グリオーマの遺伝子異常の検索

研究課題名(英文) Detecting genetic alterations in the glioma-related molecular markers using cell free DNA from the cerebrospinal fluid

研究代表者

安達 淳一 (ADACHI, JUNICHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70291143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ患者の脳脊髄液に対して、Maxwell rapid sample concentrator システムを用いて腫瘍由来のcirculating cell free (ccf) DNAを抽出した。その結果、1mlの脳脊髄液から50ng以上のccfDNAが得られることが判明した。そして、このDNAを鋳型として、real-time PCR/高解像能融解曲線分析法でIDH1, H3F3A, BRAF遺伝子の点突然変異のスクリーニングが可能であり、Sanger DNA シークエンス法での変異の同定が確認できた。また、MGMT遺伝子プロモーターメチル化の定量的解析も可能であることがわかった。

研究成果の概要(英文)：Using cerebrospinal fluid of glioma patients, tumor-derived circulating cell free (ccf) DNA was extracted. It was found that more than 50 ng of ccf DNA can be obtained from 1 ml of cerebrospinal fluid. Using this DNA as a template, it was possible to screen point mutations of IDH1, H3F3A, BRAF genes by real-time PCR / high resolution melting curve analysis method. Moreover, it was also found that quantitative analysis of MGMT gene promoter methylation is also possible.

研究分野：Molecular oncology

キーワード：DNA glioma pediatric CSF

1. 研究開始当初の背景

小児～若年にみられる固形腫瘍の中で脳腫瘍は最多を占め、その半数以上はグリオーマであり、成人と比較して脳幹に発生するグリオーマが多いことが特徴である。脳幹グリオーマの60-80%は主に橋に主座をおき、周囲に浸潤性に発育するタイプ (diffuse intrinsic pontine glioma: DIPG) である。腫瘍部位から、手術による組織採取が行われることは、リスクを伴うため稀であり、診断は臨床所見や画像所見に基づいて行われる。従って、脳幹グリオーマの治療開始時点において、腫瘍に見られる遺伝子異常についての情報を得ることは一般に困難である。

2. 研究の目的

最近、固形癌を有する患者の血清中に腫瘍由来の free DNA が検出されることが報告された。この DNA は腫瘍の壊死やアポトーシスに陥った組織から溶出した腫瘍 DNA が体循環内へと入るものとされている。グリオーマの場合は、血清中で検出可能な腫瘍由来 DNA は質、量とも解析に不適であるものの、脳脊髄液中に存在する腫瘍由来 DNA であれば、量的にも問題なく、かつ遺伝子プロモーターのメチル化や247塩基ほどの長鎖のPCR増幅も可能であるとされている。そこで、我々は、一般に手術が困難とされる脳幹グリオーマに対して、脳脊髄液中の腫瘍由来の free DNA における遺伝子異常が、本疾患の分子診断マーカー、治療効果予測因子、臨床的予後因子として有用であることの確立を目的に本研究を行った。

3. 研究の方法

臨床症状と画像診断で脳幹グリオーマが疑われ、インフォームドコンセントが取得で

きた患者を対象とする。腰椎穿刺にて脳脊髄液を3ml採取する。腫瘍由来 free DNA を QIAamp DNA blood mini kit (Qiagen 社) を用いて採取し精製する。この free DNA をテンプレートとして以下の解析を行う。

1) *MGMT* 遺伝子プロモーターのメチル化について腫瘍由来 free DNA に bisulfite 処置を施した後に、飽和型インターカレート色素の存在下で *MGMT* 遺伝子プロモーター領域を LightCycler480 システム (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて PCR 増幅する。その後、引き続き融解曲線データを微分プロットに変換してピークとして表示する Tm calling アルゴリズムにより解析して、非メチル化とメチル化 DNA の割合を算出する。本法は定量的な *MGMT* メチル化解析法であり、カットオフ値4.0%以上のメチル化を認める場合にメチル化陽性と判定する。

2) *IDH1* 遺伝子、ヒストン *H3F3A* 遺伝子、*BRAF* 遺伝子コドン600の一塩基変異の有無について腫瘍由来 free DNA に対して、解析対象遺伝子の hot spot であるコドンを含んで PCR 増幅する。DNA インターカレート色素を含む LightCycler HRM マスターミックス (ロシュ) を使用し、反応液量20 μ l として PCR 反応を進める。

LightCycler480 システムの元、real-time PCR/高解像能融解曲線分析法 High Resolution Melting (HRM) 法にて遺伝子変異のスクリーニングを行い、DNA シークエンス法にて変異を確定する。

4. 研究成果

1ml の脳脊髄液から10ng以上のccfDNAが得られることが判明し、real-time PCR/高解像能融解曲線分析法での解析が可能であった。*IDH1*, *H3F3A*, *BRAF* 遺伝子異常について、髄液由来 ccfDNA と摘出された腫瘍から

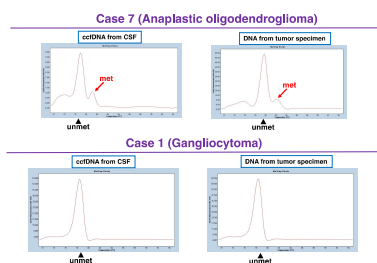
抽出した DNA における解析結果が全例で一致した。MGMT 遺伝子プロモーターメチル化の状態を解析した 2 例でもメチル化につき定量的な解析が可能であった。

IDH1^{R132} status in ccfDNA and tumor specimen

Case	Age / Gender	Tumor Location	Histology	IDH1 ^{R132} status		
				ccfDNA from CSF	ccfDNA from serum	tumor specimen
1	26 / M	Third ventricle	Ganglioglioma	WT		WT
2	78 / F	Lt. frontal	Glioblastoma	WT		WT
3	73 / F	Lt. frontal	Anaplastic oligodendroglioma	mutated	WT	mutated
4	72 / F	Rt. temporal	Glioblastoma	WT	WT	WT
5	63 / M	Lt. temporal	Anaplastic oligodendroglioma	mutated		mutated
6	58 / M	Lt. frontal	Anaplastic astrocytoma	WT		WT
7	47 / M	Lt. frontal	Anaplastic oligodendroglioma	mutated	WT	mutated

WV: VllcType

• Representative cases (Methylation-sensitive HRM for MGMT)



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 7 件)

Ellingson BM, Abrey LE, Nelson SJ, Kaufmann TJ, Garcia J, Chinot O, Saran F, Nishikawa R, Henriksson R, Mason WP, Wick W, Butowski N, Ligon KL, Gerstner ER, Colman H, de Groot J, Chang RY, Pope WB, reardon D, Barchelor T, Prados M, Galanis E, Wen PY, Cloughesy TF. Validation of post-operative contrast enhancing tumor volume as an independent prognostic factor for overall survival in newly diagnosed glioblastoma. *Neuro Oncol* Apr 5, 2018 査読有

Huang T, Kim CK, Alvarez AA, Pangen RP, Wan X, Song X, Shi T, Yang Y, Norbinski CM, Lu S, Stupp R, Kessler JA, Nishikawa R, Nakano I, Sulman EP, Lu X, James CD, Yin XM, Hu B, Cheng SY. MST4 phosphorylation of ATG4B regulates autophagic activity, tumorigenicity, and radioresistance in glioblastoma. *Cancer Cell* 32:840-855, 2017. 査読有

Nomura M, Mukasa A, Nagae G, Yamamoto

S, Tatsuno K, Ueda H, Fukuda S, Umeda T, Suzuki T, Otani R, Kobayashi K, Maruyama T, Tanaka S, Takayanagi S, Nejo T, Takahashi S, Ichimura K, Nakamura T, Muragaki Y, Narita Y, Nagane M, Ueki K, Nishikawa R, Shibahara J, Aburatani H, Saito N. Distinct molecular profile of diffuse cerebellar gliomas. *Acta Neuropathol* 134(6):941-956, 2017. 査読有

Adachi J, Watanabe K, Suzuki T, Mishima K, Kobayashi Y, Miyake Y, Fujimaki T, Nishikawa R. Detecting alterations in the glioma-related molecular markers using cell free DNA from the cerebrospinal fluid. *Neuro-Oncol* 19:22-23, 2017. 査読有

Adachi J, Watanabe K, Totake K, Suzuki T, Mishima K, Ishida J, Fujimaki T, Nishikawa R. Establishment of a rapid and efficient genetic analysis system of gliomas. *Neuro-Oncol* 17:138, 2015. 査読有

安達淳一、西川 亮。術中迅速変異型 IDH1 遺伝子検出のグリオーマ手術への応用。 *埼玉医科大学雑誌* 40 (1): 32-35, 2013. 査読無

Adachi J, Yanagisawa Y, Suzuki T, Fukuoka K, Shirahata M, Mishima K and Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT promoter methylation in pediatric glioma patients. *Child Nerv Syst* 9(29): 1758, 2013. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

Adachi J, Watanabe K, Suzuki T, Mishima K, Kobayashi Y, Miyake Y, Fujimaki T, Nishikawa R. Detecting alterations in the glioma-related molecular markers using cell free DNA from the cerebrospinal fluid.

5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies. Zurich, Switzerland. 2017.5

安達淳一、渡邊こずえ、三宅勇平、小林裕介、鈴木智成、三島一彦、佐々木 惇、藤巻高光、西川 亮。髄液中の circulating cell free DNA を用いたグリオーマの Liquid Biopsy の可能性。第 35 回日本脳腫瘍病理学会学術総会。2017 年 5 月。

安達淳一、渡邊こずえ、鈴木智成、三島一彦、藤巻高光、三宅勇平、西川 亮。グリオーマ患者髄液中の cell free DNA

を用いたグリオーマ関連分子マーカーの解析。第34回日本脳腫瘍学会学術総会。2016年12月。

安達 淳一、渡邊 こずえ、鈴木 智成、三島 一彦、藤巻 高光、西川 亮。

グリオーマ患者髄液中の cell free DNA を用いた IDH1 遺伝子変異の検出。日本脳神経外科学会 第75回学術総会。2016年9月

Adachi J, Watanabe K, Suzuki T, Mishima K, Fujimaki T, Nishikawa R. Mutation analysis of the isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) gene using cell free DNA from the cerebrospinal fluid (CSF) of glioma patients. 12th Meeting of the European Association of Neuro-Oncology. Mannheim, Germany. 2016.10.

安達淳一、渡邊こずえ、遠竹恭子、鈴木智成、三島一彦、藤巻高光、佐々木惇、西川 亮。小児 Oligodendroglioma における Glioma 分子マーカーの解析。第34回 日本脳腫瘍病理学会学術集会。2016年5月。

安達淳一、渡邊こずえ、遠竹恭子、鈴木智成、三島一彦、石田穰治、藤巻高光、佐々木惇、西川 亮。グリオーマにおける効率かつ迅速な遺伝子解析体制の確立。日本脳神経外科学会第74回学術総会。2015年10月。

〔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〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者
安達 淳一 (ADACHI, Jun-ichi)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：70291143

(2)研究分担者
西川 亮 (NISHIKAWA, Ryo)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号：90237678

(3)連携研究者
()

研究者番号：

(4)研究協力者
()