

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19970

研究課題名(和文) 髄液中マイクロRNAとメタボロミクス融合による新たな脳腫瘍診断・病態解析法の構築

研究課題名(英文) Integrated analysis of metabolomics and genetics using cerebrospinal fluid of glioma patients

研究代表者

中溝 聡 (Nakamizo, Satoshi)

神戸大学・医学研究科・医学研究員

研究者番号：00569238

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：質量分析器にて53例の髄液メタボローム解析を行うと同時に、IDH変異などの遺伝子解析を行い、IDH変異と髄液メタボロームとの関連を検討した。髄液中の2HGの濃度は、平均0.48mMであり、組織別での平均濃度は膠芽0.41mM、退形成星細胞腫0.46 mM、瀰漫性星細胞腫0.71 mMで、組織間での2HGの統計学的な差は認めなかった。IDH変異陰性群での2HG濃度は $0.44 \pm 0.06$ mMであり、IDH変異陽性群での2HG濃度は $0.61 \pm 0.2$ mMであった。P=0.23であり、両群に有意な差は認めなかった。以上の結果よりIDH変異グリオーマのマーカースとして髄液2HGは有用ではないことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Using gas chromatography/mass spectrometry, metabolome analysis of cerebrospinal fluid of 53 patients was performed. And isocitrate dehydrogenase (IDH) mutation of the tumor was examined. The mean concentration of 2-hydroxyglutarate (2HG) in the CSF was 0.48mM. The mean concentration of 2HG in glioblastoma, anaplastic astrocytoma, diffuse astrocytoma, and oligodendroglioma were 0.41mM, 0.46 mM, 0.71 mM, and 0.49 mM, respectively. There was no significant difference among tumor pathology. There were 11 cases with IDH mutation. In IDH mutation group, the mean concentration of 2HG was  $0.61 \pm 0.2$ mM, on the other hand, in IDH wild-type group, the mean concentration of 2HG was  $0.44 \pm 0.06$ mM. There was no significant difference of 2HG concentration between IDH mutation group and IDH wild-type group. These results indicate that 2HG concentration of CSF is not useful biomarker for the glioma patients.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：メタボローム解析 グリオーマ IDH変異 2HG

## 1. 研究開始当初の背景

メタボロミクスは、ゲノミクス、プロテオミクスと同様、オミックス解析の1分野であり、2000年頃から注目され始めた比較的新しい研究分野である。ゲノミクスが遺伝子、プロテオミクスがタンパク質を対象とするのに対して、メタボロミクスは内因性代謝物を対象としている。メタボロミクスが他のオミックスと比べて有利な点は、対象となる代謝物の数が少ないこと、低分子代謝物には種差がないこと、代謝物は最終の表現系なので病態と関連した分子が見つかりやすいことが挙げられる。

腫瘍細胞は大量のグルコースを取り込み、正常細胞とは異なる代謝を働かすことで、腫瘍細胞を維持している。この代謝のリモデリングは腫瘍毎に異なるとされる。脳腫瘍のグリオーマにおいては、TCA回路内のIDH(イソクエン酸脱水素酵素)の変異によりエネルギー代謝の変化が生じ、通常では産生されない2ヒドロキシグルタル酸が腫瘍細胞内に蓄積している。さらに、悪性グリオーマではPI3K-AKT-mTORのシグナルが亢進し、SREBPやHIF1aを動員してWarburg現象を維持している。このように腫瘍特異的な代謝機構により、メタボローム解析は脳腫瘍の診断、予後予測のバイオマーカーとなる可能性がある。

近年になってmiRは細胞から分泌されるエクソソーム(exosome)と呼ばれる脂質二重膜小胞に包まれることでRNaseによる分解を回避し、血清、母乳、唾液、尿など様々な体液に安定して存在していることが明らかになった。(Clin Chem 54, 482-90, 2008, PLoS One 3, e3148, 2008)。エクソソームは多岐に渡る細胞間情報伝達に関与している。最近ではエクソソームは分泌される由来細胞により構成成分が変動し、組織特異的な輸送が行われている可能性が示唆されるようになった。これらの発見はエクソソーム内のmiRが理想的なバイオマーカーとして臨床応用へと導かれる大きな第一歩であると考えられる。

近年、脳腫瘍の中で、グリオーマにおいて、IDH変異が発見され、グリオーマの発生に関与しているとの報告が出された。IDHはクエン酸脱水素酵素であり、変異によって2-ヒドロキシグルタレート(2HG)という通常産生されない代謝物が産生される。この代謝物は癌代謝物と言われ、癌の発生にも関与することが報告されている。IDH変異を有するグリオーマ組織において、2HGは著明に上昇しており、2HGの組織内濃度を測定することでIDHの変異の有無を予測できるバイオマーカーとなる。一方、MRスペクトロスコピー(MRS)によるメタボローム解析でもIDH変異

陽性グリオーマでは2HGの上昇を確認でき、術前診断に有用との報告もある。したがって、2HGはIDH変異陽性グリオーマの非常に湯様なバイオマーカーであると言える。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、脳腫瘍患者の病態や診断に関わるバイオマーカーを髄液中miR解析および髄液メタボローム解析との併用から探索することである。そして、IDH変異により2HGが上昇することが組織学的に確認されているため、髄液中の2HG濃度でIDH変異グリオーマを予測できる有用なバイオマーカーとなりうるかを解析した。

## 3. 研究の方法

1. 脳腫瘍患者の髄液のメタボローム解析  
術前に採取した脳腫瘍患者の髄液を、質量分析器にてメタボローム解析を行う。神戸大学医学部質量分析センターにはガスクロマトグラフィー/質量分析器(GC-MS; GCMS-QP2010 Ultra)および液体クロマトグラフィー/質量分析器(LC-MS; LCMS-2010EV, LCMS-IT-TOF)があり、それぞれで水溶性画分、脂溶性画分のメタボリックプロファイリングを解析することが可能である。コントロールも(1)と同様、水頭症患者あるいは正常人で同意を得られた成人の髄液を用いる。計測された結果は島津製作所製の多変量解析ソフト(Phenomenome Profiler M)、GLサイエンス社製の多変量解析ソフトを用いて主成分解析(PCA)を行う。

2. 患者組織よりDNAを採取し、IDH変異などの遺伝子解析を行う。また、画像所見より腫瘍の特徴をみる。

3. IDH変異により髄液中の2HGが増加しているかを統計学的に解析する。

## 4. 研究成果

### (1) 脳腫瘍患者の髄液採取

53例の脳腫瘍患者の術前髄液を腰椎穿刺にて採取した。内訳は以下の通り。膠芽腫17例、退形成星細胞腫7例、退形成乏突起膠腫2例、退形成上衣腫1例、瀰漫性星細胞腫7例、乏突起膠腫4例、毛様性星細胞腫3例、上衣腫2例。

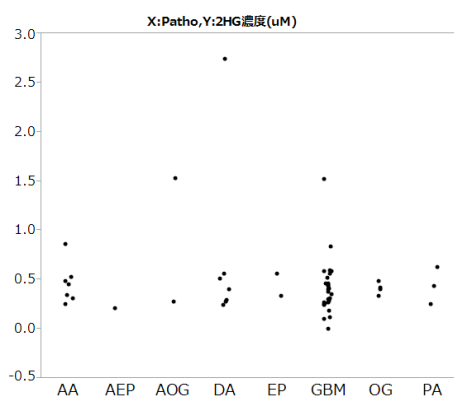
### (2) IDH変異解析

上記脳腫瘍患者の抽出髄液を用いたIDH変異解析では、11例でIDH1の変異を認めた。すべてR132H型の変異であり、IDH2変異は認めなかった。組織別には、膠芽腫1例、退形

成乏突起膠腫 1 例、瀰漫性星細胞腫 5 例、乏突起膠腫 4 例で IDH 変異を認めた。

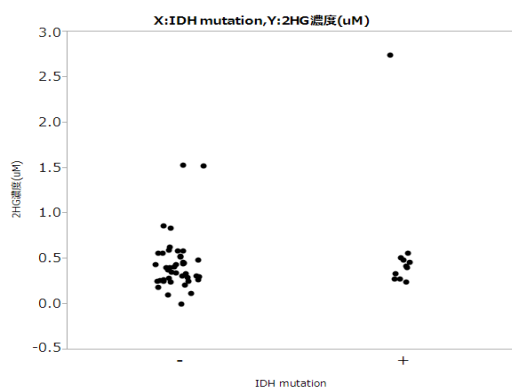
### (3) 組織別 2HG 濃度解析

髄液中の 2HG の濃度を質量分析器で解析すると、1 例は測定感度以下であり、52 例で測定できた。全体の平均 2HG 濃度は 0.48mM であり、組織別での平均濃度は膠芽腫 (GBM)0.41mM、退形成星細胞腫(AA)0.46 mM、退形成乏突起膠腫(AOG)0.90 mM、退形成上衣腫(AEP)0.45 mM、瀰漫性星細胞腫(DA)0.71 mM、乏突起膠腫(OG)0.49 mM、毛様性星細胞腫(PA)0.44 mM、上衣腫(EP)0.45 mMであった。(下図)組織間での 2HG の統計学的な差は認めなかった。



### (4) IDH 変異の有無での髄液 2HG 濃度

次に IDH 変異の有無で 2HG の濃度に差があるかを検討した。IDH 変異陰性群での 2HG 濃度は  $0.44 \pm 0.06$ mM であり、IDH 変異陽性群での 2HG 濃度は  $0.61 \pm 0.2$ mM であった。P=0.23 であり、両群に有意な差は認めなかった。



以上の結果より脳腫瘍のグリオーマ患者髄液中の 2HG 濃度は IDH 変異による上昇は認めず、髄液 2HG が IDH 変異を予測するバイオマーカーにはなれないことが判明した。

組織中の 2HG は IDH 変異陽性グリオーマに

おいては著明に上昇することが確認されているが、髄液中にはそれが反映されない原因として、2HG が積極的に細胞外に分泌され得ないことが考えられる。壊死を伴い、腫瘍組織が崩壊するような腫瘍であれば髄液中にも放出されると思われるが、IDH 変異は比較的良性のグリオーマに多く認められ、腫瘍が崩壊するような壊死は無いことが多い。従って、髄液中での 2HG の上昇は認められなかった可能性がある。また、髄液中の 2HG の安定性も影響していると思われる。すぐに分解される代謝物の可能性があり、今後は 2HG の安定性も検討しなければならない。また、髄液を腰椎穿刺によって採取したが、より脳に近い脳室穿刺で採取した場合は、2HG の濃度が上昇している可能性もあると思われる。いずれにしろ、今回の解析では、術前髄液の 2HG をターゲットとしたメタボローム解析では、IDH 変異を予測するバイオマーカーとしては有用でないことが判明した。

## 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4件)

1. Radiographic occult cerebellar germinoma presenting with progressive ataxia and cranial nerve palsy. Minami N, Tanaka K, Kimura H, Hirose T, Mori T, Maeyama M, Sekiya H, Uenaka T, Nakamizo S, Nagashima H, Mizukawa K, Itoh T, Sasayama T, Kohmura E. *BMC Neurol*. 2016 Jan 12;16:4. doi: 10.1186/s12883-015-0516-9. (査読あり)
2. Tumor-associated macrophages associate with cerebrospinal fluid interleukin-10 and survival in primary central nervous system lymphoma (PCNSL). Sasayama T, Tanaka K, Mizowaki T, Nagashima H, Nakamizo S, Tanaka H, Nishihara M, Mizukawa K, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *Brain Pathol*. 2015 ;26(4):479-87. doi: 10.1111/bpa.12318 (査読あり)
3. STAT3 activation is associated with cerebrospinal fluid interleukin-10 (IL-10) in primary central nervous system diffuse large B cell lymphoma. Mizowaki T, Sasayama T, Tanaka K, Mizukawa K, Takata K, Nakamizo S, Tanaka H, Nagashima H, Nishihara M, Hirose T, Itoh T, Kohmura E. *J Neurooncol*. 2015 ;124(2):165-74. doi: 10.1007/s11060-015-1843-9. (査読あり)
4. A 40-Year-Old Female with Leptomeningeal Lesions. Mizowaki T, Sasayama T, Semba S, Sasaki R, Yasuo K, Nakamizo S, Tanaka K,

Mizukawa K, Uchihashi Y, Kohmura E.  
*Brain Pathol.* 2015 Jul;25(4):509-10. (査読あり)

〔学会発表〕(計 件)

田中 潤、甲村 英二、中溝 聡  
失神発作を伴う右舌咽神経痛に対して神経減  
圧術が有効であった1例  
第17回日本脳神経減圧術学会  
2015.01.17  
東京

森 達也、南 徳明、田中 一寛、木村 英  
仁、前山 昌博、中溝 聡、長嶋 宏明、水  
川 克、篠山 隆司、甲村 英二  
T2\*およびSWIで低信号を呈した小脳原発胚  
細胞腫の1例  
第69回日本脳神経外科近畿支部学術集会  
2015.04.18  
大阪

坂田 純一、谷口 理章、中溝 聡、木村  
英仁、甲村 英二  
髄液漏で発症したプロラクチン産生下垂体腺  
腫の1例  
第70回日本脳神経外科近畿支部学術集会  
2015.09.05  
大阪

藤田祐一、阪上義雄、中溝 聡  
80歳以上のくも膜下出血症例の臨床像と治療  
成績  
日本脳神経外科学会第74回学術総会  
2015年10月15日  
札幌

中村直人、岡田真幸、中溝 聡、阪上義雄  
破裂脳動脈瘤に対するコイル塞栓術後2日目  
に後腹膜血腫を来した1例  
stroke2017 第42回日本脳卒中学会学術集会  
2017年3月17日  
大阪

阪上義雄、中村直人、岡田真幸、中溝 聡  
80歳以上の高齢者頸動脈狭窄症に対する頸動  
脈ステント留置術(CAS)の長期予後  
stroke2017 第42回日本脳卒中学会学術集会  
2017年3月18日  
大阪

中溝 聡、中村直人、岡田真幸、阪上義雄  
破裂脳動脈瘤に対するコイル塞栓術後に親水  
コーティングに関連する脳実質変化を認め  
た1例  
stroke2017 第42回日本脳卒中学会学術集会  
2017年3月18日

大阪

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者  
中溝聡 (NAKAMIZO Satoshi)  
神戸大学, 医学(系)研究科(研究院)  
医学研究員  
研究者番号: 00569238

(2)研究分担者: なし

(3)連携研究者: なし

(4)研究協力者: なし