

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 25 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20015

研究課題名(和文) 膠芽腫に対するBevacizumab治療における血中バイオマーカーの同定

研究課題名(英文) Detection of blood biomarker in the patients' with Bevacizumab treated glioblastomas

研究代表者

空閑 太亮 (Kuga, Daisuke)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：40759932

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,500,000円

研究成果の概要(和文)：Bevacizumabにて治療が行われた膠芽腫において、治療効果の予測や判定を血液中で行うことを目的とした。膠芽腫患者の血液中から腫瘍由来のDNAを採取し、標的遺伝子の同定を試みた。しかし、結果として、標的遺伝子の同定はできず、negative control群でも同定できなかったことから、血液中には腫瘍由来のDNAは存在しない可能性が高いと判断した。代替として髄液で同様の実験を行い、こちらでは標的遺伝子の同定が可能であった。liquid biopsyの材料としては髄液が妥当であると判断し、今後は実験を進めていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to predict the clinical course, efficacy of treatment in the patients with Bevacizumab treated glioblastoma analyzing the cell free DNA from tumor cell in the patients' blood. However, we were not able to detect any mutation of target gene in the patients' blood, indicating cell free DNA was not released into the blood. Then we used the patients' CSF as alternative candidate. We were able to some genes which originated from tumor cell in the patients' CSF. These results imply that CSF may be a good candidate for liquid biopsy in the patients with GBM.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：glioblastoma liquid biopsy

### 1. 研究開始当初の背景

VEGF に対するモノクローナル抗体である Bevacizumab は、膠芽腫に対する有効性が期待されていたが、近年発表された初発膠芽腫に対する2つの Phase III 臨床試験では、Bevacizumab 投与群において全生存期間(OS)の有意な延長は認めていない。しかしながら、個々の患者については、Bevacizumab の抗腫瘍効果が非常に高い患者も多数存在することから、Bevacizumab レスポンダー群を選別するためのバイオマーカーを同定・確立することが急務となっている。

一方で、膠芽腫は時間的/空間的に多様性に富む(heterogeneity)腫瘍であり、従来から行われている手術摘出標本の一部からの断片的な情報解だけでは治療経過に伴う腫瘍細胞や腫瘍細胞周囲の微小環境の変化を捉えることはできなかった。本研究ではその手法を発展させ、膠芽腫患者の血中の生体分子(各種成長因子やサイトカインなど)を解析する方法を用いて、膠芽腫の多様性を克服し、Bevacizumab 治療の有効性をリアルタイムにモニターすることができる強力なバイオマーカーの同定を目指す。本研究では採取が容易である血液を用いることで治療経過の全期間にわたり腫瘍特異的な変化を追跡することができ、臨床上有用な新たなバイオマーカーの同定に繋がる重要な研究となる。

### 2. 研究の目的

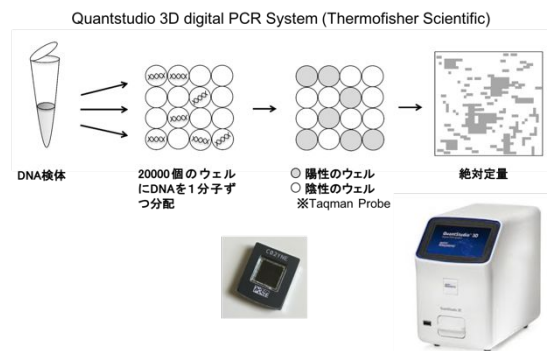
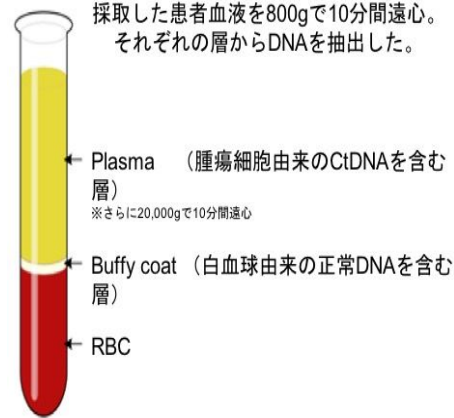
Bevacizumab は VEGF(血管内皮細胞増殖因子)に対する分子標的薬であり、近年、膠芽腫に対して広く使用されている。一方で、Bevacizumab の効果は個々の患者によって大きく異なっており、治療効果が高い患者層を選別することは、患者の利益になるだけでなく、医療経済の観点からも極めて重要である。そのため、Bevacizumab 治療におけるバイオマーカーの同定/確立が急務であるが、未だ有用なバイオマーカーは存在しない。本研究は、Bevacizumab 投与中の患者において、血液中のバイオマーカーを確立することを目指す。血中バイオマーカーの同定により、治療効果の予測や判定が迅速となり、膠芽腫治療において大きな意味を持つことになる。

### 3. 研究の方法

九州大学脳神経外科にて初回手術が行われた神経膠腫患者を対象とした。対象患者の血液を手術前、手術後、Bevacizumab 投与前、投与後のスケジュールに沿って採取することとした。また、コントロール群として、Bevacizumab 非投与群患者の血液サンプル、膠芽腫以外の神経膠腫の血液サンプルを採取した。採取した血液を遠心分離し、plasma 層、buffy coat 層より DNA を採取した。採取した DNA については Digital PCR 法を用いて、対象と

なる遺伝子が存在するかどうかの確認を行った。

また、脳脊髄液の採取が可能であった患者においては、手術中に脳脊髄液を採取した。検体からの DNA 採取および Digital PCR については血液サンプルと同様の実験を行った。



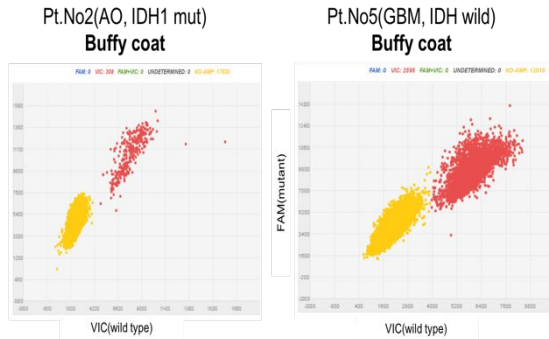
### 4. 研究成果

まずは、神経膠腫患者において、腫瘍由来の Cell free DNA が本当に血液中に放出されているかどうかの確認の実験を行った。

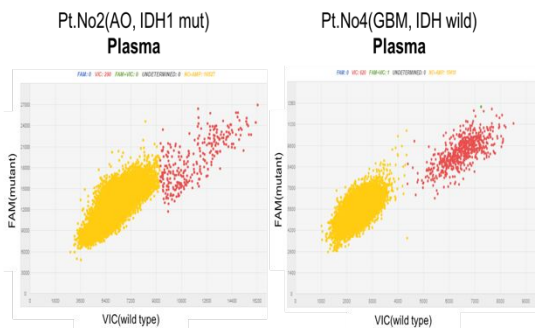
標的とする遺伝子として、神経膠腫患者に高頻度に見られる遺伝子変異である IDH1 を対象遺伝子とした。

変異型 IDH1 を持つ腫瘍3例、野生型 IDH1 を持つ腫瘍4例の手術前採血を遠心分離し、buffy coat 層、plasma 層からそれぞれ、DNA を抽出した。得られた DNA はごく少量であり、通常の PCR 法やリアルタイム PCR 法では検出が困難と考えられたため、今回はデジタル PCR 法を用いた。プライマーは市販化されているものを私用した。

まず、buffy coat から得られた DNA を元に変異型 IDH1 の同定を行ったところ、変異がある腫瘍においても、変異がない腫瘍においても、変異型 IDH1 の増幅は認められなかった。



これらは negative control であり、正常細胞の結果を反映しているものと考えられた。次に、serum から得られた DNA を元に変異型 IDH1 の同定を行った。



上図のように、変異型 IDH1 腫瘍においても野生型 IDH1 腫瘍と同様に変異型 IDH1 の同定ができなかった。

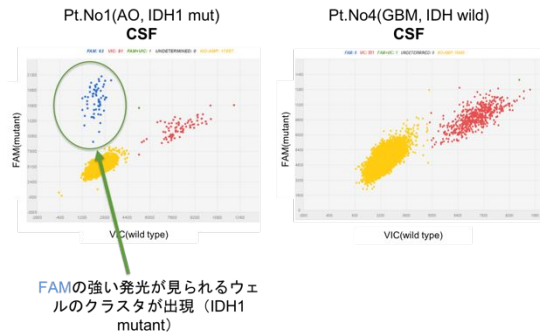
これらの結果から血清中には変異型 IDH1 は存在せず、少なくとも本腫瘍においては、腫瘍細胞由来の cell free DNA は血液中には放出されていない可能性が高いと判断した。これらの結果を検証する目的で、さらに複数の変異型 IDH1 腫瘍で同様の実験を行ったが、やはり血液中では変異型 IDH1 は同定できず、最終的には神経膠腫においては血液中には腫瘍由来の cell free DNA は存在しないと判断した。

次に我々は、liquid biopsy の材料として、脳脊髄液に注目した。脳は常に脳脊髄液が周囲を循環している環境下にある。また、脳腫瘍の終末期には脳脊髄液を介して髄腔内播種を認めることが多いことから、脳脊髄液中には腫瘍細胞あるいはそれらから放出された cell free DNA が存在する可能性が高いと考えた。

髄液の採取に関しては、脳腫瘍患者は頭蓋内圧亢進状態にあることが多く、腰椎穿刺の施行は難しいと考え、手術中に採取することとした。手術中の採取の問題点としては、術中の血液の混入が考えられるため、血液が混入しないように細心の注意を払った。

採取した髄液から、血液と同様に DNA を抽出

し、それをテンプレートとして変異型 IDH1 の同定を試みた。



髄液中では、変異型 IDH 腫瘍では IDH 変異が同定され、野生型 IDH 腫瘍においては変異が見られず、腫瘍と髄液とで結果が一致した。これらの結果から、髄液中には腫瘍由来の DNA が存在する可能性が示唆された。髄液は liquid biopsy の材料として有望と思われたが、いくつかの問題点がある。

- 1 髄液の採取には採血よりも侵襲性が高く、高度の頭蓋内圧亢進患者においては、禁忌となること
- 2 上記の理由により繰り返しの採取が困難であること
- 3 手術中の採取（腰椎穿刺）においても、血液の混入の可能性が常にあり、結果に影響を及ぼす可能性があること。

上記のような問題点が今後の課題と思われたが、引き続き、髄液を使用した実験を継続していきたい。

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0件)

〔学会発表〕(計2件)

第35回 日本脳腫瘍学会

課題名: 神経膠腫患者の髄液を用いた digital PCR による IDH1 R132H 変異検出と定量  
発表者: 赤木 洋二郎、吉本 幸司、三月田 祐平、雨宮 健生、波多江 龍亮、空閑 太亮、秦 暢宏、溝口 昌弘、飯原 弘二  
2017年12月 浜松

第76回 日本脳神経外科学会学術集会

課題名：神経膠腫患者の血液・髄液検体を用いた digital PCR による IDH1 変異検出 (liquid biopsy)

発表者：赤木 洋二郎、吉本 幸司、三月田 祐平、雨宮 健生、波多江 龍亮、空閑 太亮、秦 暢宏、溝口 昌弘、飯原 弘二

2010年10月 東京

〔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

空閑 太亮 (KUGA, Daisuke)

九州大学大学病院 助教

研究者番号：40759932

(2)研究分担者 なし

( )

研究者番号：

(3)連携研究者 なし

( )

研究者番号：

(4)研究協力者 なし

( )