

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：17301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20017

研究課題名(和文)免疫組織化学を応用したMGMT methylation statusの評価

研究課題名(英文)A novel method for estimating MGMT methylation status by using immunohistochemistry

研究代表者

梅野 哲也(UMENO, Tetsuya)

長崎大学・病院(医学系)・医員

研究者番号：00737273

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 1,400,000円

研究成果の概要(和文):MGMTはその発現量が多いほどアルキル化抗癌剤に対する耐性を増す。その発現量はMGMTプロモーターのメチル化の有無を評価することで行われ、悪性神経膠腫の有用な予後予測因子となっている。通常はこれをpyrosequencingを用いて評価するが、施設や費用の面で実用的であるとはいえない。そこで研究代表者はこれに代替する方法として、免疫組織化学を応用した、新しい手法であるhisto endonuclease-linked detection of methylation sites of DNA(HELMET)法(組織切片上でメチル化DNAの局在を証明する方法)を応用し評価を行った。

研究成果の概要(英文):The DNA repair protein MGMT causes resistance of cancer cells to alkylating agents and therefore, is a well-established predictive marker for high grade gliomas. Since MGMT is highly epigenetically regulated, MGMT promoter methylation status is taken as an indicator of MGMT silencing, predicting the outcome of glioma therapy. MGMT promoter methylation is usually determined by pyrosequencing, which is too expensive to perform as general inspection. Here, we apply a new method, named histo endonuclease-linked detection of methylation sites of DNA(HELMET), designed to detect methylation sites of DNA with a specific sequences in a tissue section.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ MGMT

1. 研究開始当初の背景

DNA 修復酵素である O6-methyl guanine methyltransferase(MGMT)は、temozolomide(TMZ)が抗腫瘍効果を発揮するのに必要な DNA 構造を修復し、その後失活(suicide inhibition)するため、MGMT 分子の発現量が多いほど TMZ に対する薬剤耐性が強い。しかし、MGMT 分子に対する免疫組織化学または MGMT mRNA を quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (RT-qPCR)で定量するなどの試みは、治療効果や予後との相関がみられず実用化に至らなかった。原因として、MGMT 分子の発現が化学療法や放射線治療によって upregulate されるものであり、手術摘出標本においてはそれが一定していないためであると考えられた。Hegi らは膠芽腫において MGMT プロモーターのメチル化の有無を調べ、メチル化陽性群とメチル化陰性群の生存期間中央値を比較したところ、それぞれ 12.7 カ月と 21.7 カ月で有意な差を認めた(N Engl J Med.2005 Mar 10;352(10):997-1003)。以上から、現在では MGMT プロモーターのメチル化の有無を methylation-specific polymerase chain reaction (MS-PCR) assay や pyrosequencing によって評価するようになった。また、近年遺伝子解析が進み、特に IDH mutation の有無が予後に強く相関することが明らかとなり(N Engl J Med.2015 June 25;372:2481-98)、今後臨床現場において IDH mutation status の評価は必須となると思われるが、MGMT プロモーターのメチル化の有無はこれと直接関連を認めておらず (IDH mutation と glioma-CpG island methylation phenotype (G-CIMP)の関連、及び G-CIMP と MGMT プロモーターのメチル化との関連は示唆されているが、IDH mutation と MGMT プロモーターのメチル化に相関関係は証明されていない)、MGMT プロモーターのメチル化を評価する臨床的価値はこれまでと変わりはないと考えられる。しかし、MS-PCR や pyrosequencing を行える施設はごく一部であり、多くの施設では未評価のまま診療が行われているのが現状であるため、研究代表者はこれらに代わる方法として、共同研究を行っている長崎大学大学院医歯薬学研究所第三解剖学教室の協力のもと、同教室で開発された histo endo-nuclease-linked detection of methylation sites of DNA(HELMET)法(Koji T, et al: Histochem. Cell Biol.2008 130:917-925)を応用し MGMT プロモーターのメチル化評価を行いたいと考えた。

HELMET 法とは、標的とする DNA のプロモーター領域に存在する CpG を含む特定の塩基配列を認識するイソシゾマー性の制限酵素(これらは同一配列を認識して切断する 2 種類の制限酵素であるが、一方の制限酵素は非メチル化 CpG のみを切断し、他方の制

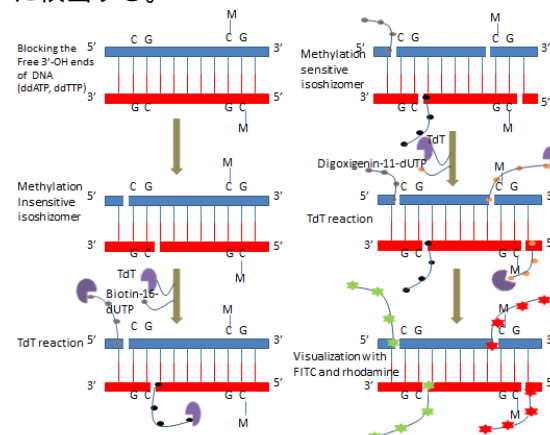
限酵素はメチル化・非メチル化に関係なくこれを切断する。)を組織切片上で連続的に作用させ、切断部位を異なる核酸アナログで標識し分別的な染色を行うことでメチル化 CpG 断端を可視化し、標的とする DNA のメチル化を有する細胞の局在を証明する方法である。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫に対する標準治療薬である temozolomide(TMZ) の治療効果は、O6-methyl guanine methyltransferase (MGMT)の発現状態によって左右される。その評価は、MGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化の有無を methylation specific polymerase chain reaction (MS-PCR) assay や pyrosequencing によって評価する事になされるが、本研究では免疫組織化学を応用した新たな手法 (HELMET 法)を用いて、MGMT プロモーターメチル化の定量的解析を行い、その有用性を検証し臨床における実用化への研究基盤とすることを主たる目的とする。また、HELMET 法で処理した標本を観察することで、悪性神経膠腫における新たな組織学的知見を見出すことを目標とする。

3. 研究の方法

多数の MGMT プロモーターメチル化陽性症例の pyrosequencing 解析結果から、標的とする CpG を含む塩基配列を選択し、これを認識するイソシゾマーを作成しヒト検体を用いて HELMET 法を行う。HELMET 法の概要としては、切片上でまず DNA の 3'-OH 部位を dideoxyATP(ddATP)と dideoxyTTP(ddTTP)を基質として TdT で取り込ませてブロックした後、非メチル化配列のみ切断できる方の制限酵素で切断し、その後切断によりできた 3'-OH 部位を TdT でビオチン-16-UTP で標識する。ジデオキシヌクレオチドでブロック後、今度はメチル化配列も切断できる制限酵素で切断しジデオキシジグキシゲニン-11-dUTP で標識する。最終的に FITC 標識抗ビオチン及び rhodamine 標識抗ジグキシゲニン抗体を用いてシグナルを分別的に検出する。



さらに、特異性の検討として制限酵素を失活させた場合にシグナルが出ないこと、ジデオキシヌクレオチドを取り込ませた後には TdT で標識できないこと、また TdT 反応の際にハプテン化ヌクレオチドを、TTP に置き換えたり TdT を添加しない場合にはシグナルがでない事を確認する。

長崎大学医学部脳神経外科学教室（当教室）に保管されているサンプルを用いて染色を行い、診療録から患者の臨床データ（MGMT プロモーターメチル化の有無や治療内容・転帰など）と照らし合わせて retrospective な視点から本手法の有用性を評価する。また、当教室において今後得られる臨床検体（年間に約 15 例程度の検体が期待される）は逐次 pyrosequencing または MS-PCR で MGMT メチル化の有無を評価していき、同時に行う HELMET 法での定量値との相関関係を prospective に評価し、これにより染色率による定量的または定性的評価（染色強度を段階的に分類し grading を行う）を確立していく。

4. 研究成果

本法は、標的とする DNA のプロモーター領域に存在する CpG を含む特定の塩基配列を認識するイソソマー性の制限酵素を組織切片上で連続的に作用させ切断部位を異なる核酸アナログで標識し分別的な染色を行うことでメチル化 CpG 断端を可視化し、標的とする DNA のメチル化を有する細胞の局在を証明する。そのため、まずは多数の MGMT プロモーターメチル化陽性症例の pyrosequencing 解析結果から、標的となる CpG を含む塩基配列を選択する必要がある。現在は当教室に保管されているサンプルを用いてこれらの作業を行っており、既に候補となり得る CpG 配列に対して HELMET 法を適応し、pyrosequence の結果との整合性の評価を行っている。また、これと同時に悪性神経膠腫症例を蓄積しそれらの MGMT プロモーターのメチル化データの蓄積を行っている。

HELMET 陽性細胞の染色率による定量的・定性的評価法を確立していくことが本研究の最終的な目標であるが、計画当初の予定通り悪性神経膠腫症例は年間 15 例～10 例ペースで蓄積されており、逐次 pyrosequencing により MGMT プロモーターメチル化解析を行いサンプル収集は順調である。MGMT プロモーターメチル化の HELMET 法での定量方法の確立が問題であるが、過去のサンプルから候補に挙げた CpG 配列について HELMET 染色を行いその再現性や臨床病歴及び pyrosequence 結果との整合性の確認を行っているところである。また、本研究が当初計画の通り進まなくなる原因として最も可能性が高いと思われるのは、制限酵素に認識させるメチル化 CpG を含む特定の塩基配列が、全 DNA 中に ubiquitous に存在する場合であ

る。この場合は細胞間でのシグナル強度に差が見いだせずメチル化 DNA を検出できなくなる可能性がある。そのような場合には、in situ PCR 法（Hishikawa, Koji, et al. Saibou 33:196-199,2001.）により DNA を増幅することでシグナル強度の差を作り出すことが可能であるが、その場合高度な手法とある程度の熟練を要するため実用的手法でなくなる可能性がでてくる。現時点ではそのような必要性はでてきていない。

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)

1. 浸潤性グリオーマにおける ASL(Arterial spin labeling) perfusion MRI と DSC(Dynamic susceptibility contrast) perfusion MRI の相違.

梅野哲也、馬場史郎、氏福健太、吉田光一、鎌田健作、森川 実、松尾孝之
第 41 回日本脳神経学会
2018.03.02-03、新潟市

2. 浸潤性グリオーマにおける ASL(Arterial spin labeling) perfusion MRI と DSC(Dynamic susceptibility contrast) perfusion MRI の相違.

梅野哲也、馬場史郎、氏福健太、吉田光一、鎌田健作、森川 実、松尾孝之
日本脳神経外科学会第 76 回学術総会
2017.10.12-14、名古屋市

〔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
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

梅野 哲也 (UMENO, Tetsuya)
長崎大学・病院 (医学系)・医員
研究者番号 : 00737273

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

なし