

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K16643

研究課題名(和文) 神経膠腫に対する術中迅速遺伝子診断技術の確立と、分子標的薬の前臨床的開発

研究課題名(英文) Intraoperative rapid and sensitive detection of genetic alterations in lower-grade gliomas

研究代表者

青木 恒介 (AOKI, KOSUKE)

名古屋大学・医学系研究科・特任助教

研究者番号：10759773

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：低悪性度神経膠腫(LGG)は病理学的診断と共にIDH変異と1p/19q共欠失の有無による遺伝学的分類が採用されている。ATRX変異は1p/19q共欠失と相互排他的であるため、病型分類のサロゲートマーカーとなりうるとされている。今回、遺伝学的背景が明らかな78例のLGGに対し、ATRXに対する免疫染色を行ったところ、ATRX変異をサロゲートマーカーとすると、14%の腫瘍で遺伝学的分類を誤って判断してしまい、ATRX変異単独での病型分類は適切ではないことを報告した(Yamamichi et al, Brain Tumor Pathol, 2018)。今後、更に正確で簡便な遺伝学的診断法が望まれる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

LGGは、その遺伝学的分類により生命予後が大きく異なる。また現在、遺伝学的分類毎の治療法も提唱されており、正確な診断は、患者の正確な予後予測と治療法選択にますます重要性を増してくると思われる。今回、比較的簡便に計測可能なATRXの免疫染色法による分類では、LGGの14%で誤った診断を下してしまうことを明らかにしている。本研究成果は、LGGの正確な遺伝子分類法を考える上で、大きな役割を果たす結果が得られたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：The classification of lower-grade glioma (LGG) are based on not only pathological diagnosis, but also genetic alterations: the presence or absence of IDH mutation and 1p/19q co-deletion. Since the ATRX mutation is mutually exclusive with the 1p/19q co-deletion, it has been suggested that it could serve as a surrogate marker for genotyping of LGG. In this study, we performed immunostaining against ATRX on 78 cases of LGG with a known genetic background. Then the genetic classification was misjudged in 14% of tumors if ATRX mutation was used as a surrogate marker. We reported that ATRX mutation alone was not suitable for genotyping of LGG (Yamamichi et al, Brain Tumor Pathology, 2018). In the future, more accurate and simple genetic diagnostic methods are desired.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：低悪性度神経膠腫 遺伝子診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

低悪性度神経膠腫(LGGs)は緩徐だが浸潤性に進展し、その多くが致死的となる腫瘍である。近年ゲノム解析手法の飛躍的な進歩に伴い、様々な悪性腫瘍にて遺伝子異常の全貌が明らかとなってきた。我々は以前、757例のLGGsにおける網羅的遺伝子解析を行い、*IDH1/2* (*IDH* または *IDH2*) 変異と 1p/19q 共欠失の有無により分けた3群が遺伝学的にも臨床的にも明瞭に異なる群であることを明らかとした (Suzuki H, Aoki K et al, Nature Genetics, 2015) (図1)。

それらの結果を踏まえ、本年改訂されたWHO分類ではこれら遺伝子異常による病型分類が採用された。各群は平均生存期間や化学療法の効果が大きく異なることが知られており、遺伝子診断により、個々の腫瘍に対する層別化医療が今後急速に進んでいくと考えられる。LGGsでは手術摘出度が患者予後に大きく影響するため、手術中に腫瘍の遺伝子型を判断することは治療方針を決定する上で非常に有益である。そこで我々は、目的分子に対する抗体を固定化できるよう加工した紫外線硬化樹脂をマイクロ流路内に組み込んだ遺伝子変異迅速解析装置である immuno-wall

を用いて、手術で摘出した少量の腫瘍組織から *IDH1* R132H 変異を15分という短時間で高精度に検出する手法を確立した (Yamamichi A, Aoki K, et al. Sci. Technol. Adv. Mater., 2016) (図2)。

IDH1/2 変異型腫瘍の内、1p/19q 共欠失を持つ腫瘍はほぼ全例で *TERT* promoter 変異を持ち、1p/19q 共欠失を持たない腫瘍ではその多くが *TP53* 変異と *ATRX* 変異を持つことがわかっている(図1)。これらの変異を持つ腫瘍は、そのタンパク量が著明に増減するため、immuno-wall にてタンパク量を調べることができれば、*IDH1/2* 変異と合わせて術中に高精度のLGGs遺伝子診断を行うことができる。また、我々はLGGs検体724

例を用いて、各群において特定の遺伝子異常をもつ腫瘍では、有意に患者予後が悪いことを明らかとした (Aoki et al. Neuro-Oncology. 2018)。そこで予後不良因子として同定した *PIK3R1* 変異、*CDK4* 増幅などを検出できる immuno-wall が開発できれば、迅速に腫瘍の性質を知ることができ、患者予後をより正確に予測することができる。

現在抗 *CDK4/6* 阻害剤は一部の乳癌に対する治療有効性が示され (Nicholas C et al, NEJM, 2015)、幾つかのPI3K阻害薬では臨床試験が進行中である。*TERT* 阻害剤の開発も国内外で進められている。今回 immuno-wall にて検出を目指す遺伝子異常に対する阻害剤のLGGsへの効果を確認できれば、immuno-wall による遺伝子診断は分子標的薬による個別治療のマーカーになる可能性がある。

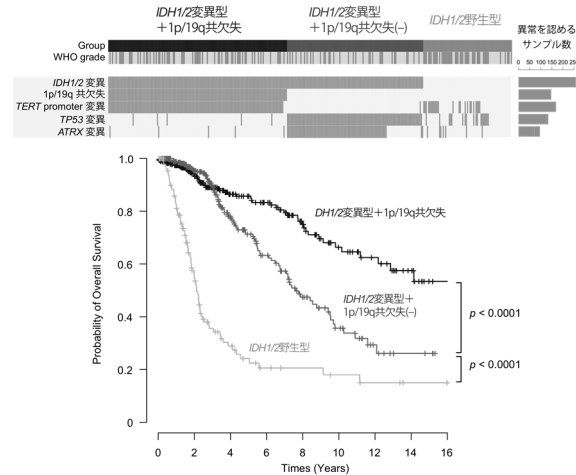


図1 低悪性度神経膠腫の代表的遺伝子異常と各subtypeの生存期間

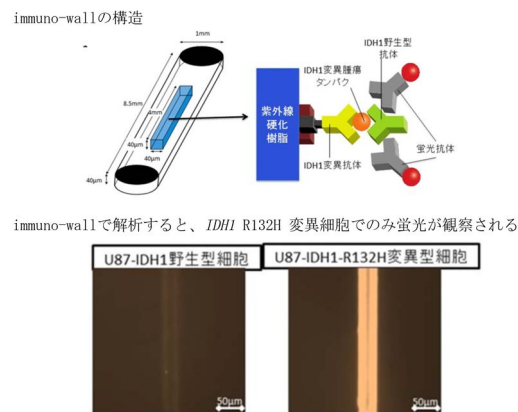


図2 immuno-wallによる *IDH1* R132H 変異同定法の概要

2. 研究の目的

2016年に改訂されたWHO分類において、WHOグレード2~3の成人びまん性神経膠腫 (diffuse lower-grade gliomas、以下LGGs) はIDH1/2変異と1p/19q共欠失の有無により3群へ分けるといふ遺伝子異常に基づく病型分類が採用された。今後は個々のLGGs腫瘍に対し遺伝子解析を正確に行い、それに基づく層別化医療を行うことが求められる。我々は、*IDH1R132H*変異を短時間で検出できる装置 (immuno-wall) を開発し、手術中に摘出した腫瘍検体を用いて変異を高精度に検出できることを報告した。本課題では、IDH1変異の他に病型分類に必要なIDH2、TERT promoter、TP53、ATRX変異や、我々が予後不良因子として同定したCDK4増幅、PI3K1変異などの遺伝子異常を検出するimmuno-wallを開発し、LGGsの病型診断と正確な予後予測に必要な遺伝子異常情報を、手術中一度に短時間で解析できるようにすることが目的である。それにより術中迅速遺伝子診断が可能になり、有効な術式選択と早期の化学・放射線療法による予後改善への道が切り開かれる。また同時に、これらの遺伝子を導入したLGGs細胞株を作成し、阻害剤の効果を検証することで、患者一人一人に対する分子標的薬を含んだ個別化治療を確立していくことを目指す。

3. 研究の方法

IDH2、*TERT* promoter、*TP53*、*ATRX*変異に対するimmuno-wallを作成し、LGGsの遺伝子異常に基づく病型診断を迅速解析する技術を完成させる。次いで予後不良因子として同定された*PI3K1*変異、*CDK4*増幅を検出するimmuno-wallを開発し、より正確な予後予測に必要な情報を網羅する。同一腫瘍組織における通常シーケンスの結果を照合、また実際に術中解析を施行し、病理診断と合わせて検証する。さらにこれらの遺伝子異常を強制発現させたLGGs細胞株を樹立し、阻害剤の効果を検証する。以上の解析によりLGGsにおける術中遺伝子変異診断技術の完成させ、分子標的薬を用いた今後のLGGs患者の個別化治療への礎を築く。

4. 研究成果

低悪性度神経膠腫(LGG)は病理学的診断と共にIDH変異と1p/19q共欠失の有無による遺伝学的分類が採用されている。ATRX変異は1p/19q共欠失と相互排他的であるため、病型分類のサロゲートマーカーとなりうるとされている。今回、遺伝学的背景が明らかな78例のLGGに対し、ATRXに

対する免疫染色を行ったところ、ATRX変異をサロゲートマーカーとすると、14%の腫瘍で遺伝学的分類を誤って判断してしまい、ATRX変異単独での病型分類は適切ではないことを

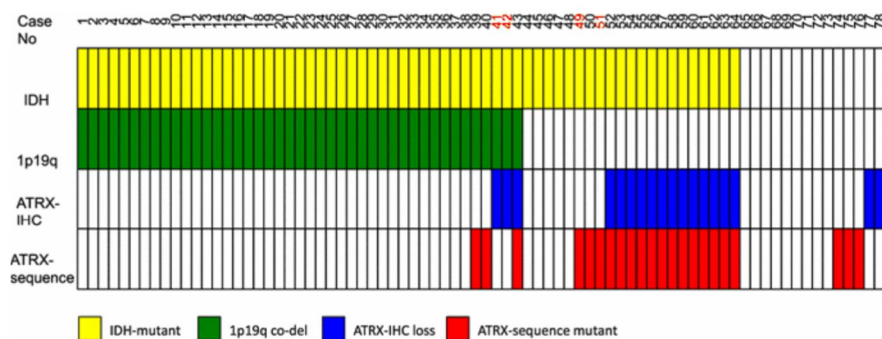


図3. 免疫染色法によるATRX発現量は1p/19q共欠失のサロゲートマーカーとして不十分である

報告した (図3 ; Yamamichi et al, Brain Tumor Pathol, 2018)。現在、適切なLGGsの遺伝学的診断を得るのに必要十分な遺伝子変異を同定し、immuno-wallを作成中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Ranjit Melissa, Hirano Masaki, Aoki Kosuke, Okuno Yusuke, Ohka Fumiharu, Yamamichi Akane, Kato Akira, Maeda Sachi, Motomura Kazuya, Matsuo Keitaro, Enomoto Atsushi, Ino Yasushi, Todo Tomoki, Takahashi Masahide, Wakabayashi Toshihiko, Kato Takuya, Natsume Atsushi | 4. 巻 26 |
| 2. 論文標題 Aberrant Active cis-Regulatory Elements Associated with Downregulation of RET Finger Protein Overcome Chemoresistance in Glioblastoma | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Cell Reports | 6. 最初と最後の頁 2274 ~ 2281 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.celrep.2019.01.109 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------|
| 1. 著者名 Aoki Kosuke, Natsume Atsushi | 4. 巻 36 |
| 2. 論文標題 Overview of DNA methylation in adult diffuse gliomas | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology | 6. 最初と最後の頁 84-91 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-019-00339-w | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Aoki K, Nakamura H, Suzuki H, Matsuo K, Kataoka K, Shimamura T, Motomura K, Ohka F, Shiina S, Yamamoto T, Nagata Y, Yoshizato T, Mizoguchi M, Abe T, Momii Y, Muragaki Y, Watanabe R, Ito I, Sanada M, Yajima H, Morita N, Takeuchi I, Miyano S, Wakabayashi T, Ogawa S, Natsume A | 4. 巻 20 |
| 2. 論文標題 Prognostic relevance of genetic alterations in diffuse lower-grade gliomas | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Neuro-Oncology | 6. 最初と最後の頁 66 ~ 77 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/neuonc/nox132 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Yamamichi Akane, Ohka Fumiharu, Aoki Kosuke, Suzuki Hiromichi, Kato Akira, Hirano Masaki, Motomura Kazuya, Tanahashi Kuniaki, Chalise Lushun, Maeda Sachi, Wakabayashi Toshihiko, Kato Yukinari, Natsume Atsushi | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Immunohistochemical ATRX expression is not a surrogate for 1p19q codeletion | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology | 6. 最初と最後の頁 106-113 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-018-0312-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Shiraki Yukihiko, Mii Shinji, Enomoto Atsushi, Momota Hiroyuki, Han Yi-Peng, Kato Takuya, Ushida Kaori, Kato Akira, Asai Naoya, Murakumo Yoshiki, Aoki Kosuke, Suzuki Hiromichi, Ohka Fumiharu, Wakabayashi Toshihiko, Todo Tomoki, Ogawa Seishi, Natsume Atsushi, Takahashi Masahide | 4. 巻 243 |
| 2. 論文標題 Significance of perivascular tumour cells defined by CD109 expression in progression of glioma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 The Journal of Pathology | 6. 最初と最後の頁 468 ~ 480 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/path.4981 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ohka Fumiharu, Yamamichi Akane, Kurimoto Michihiro, Motomura Kazuya, Tanahashi Kuniaki, Suzuki Hiromichi, Aoki Kosuke, Deguchi Shoichi, Chalise Lushun, Hirano Masaki, Kato Akira, Nishimura Yusuke, Hara Masahito, Kato Yukinari, Wakabayashi Toshihiko, Natsume Atsushi | 4. 巻 34 |
| 2. 論文標題 A novel all-in-one intraoperative genotyping system for IDH1-mutant glioma | 5. 発行年 2017年 |
| 3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology | 6. 最初と最後の頁 91 ~ 97 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-017-0281-0 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 青木恒介 |
| 2. 発表標題 低悪性度神経膠腫における遺伝子異常の全貌 |
| 3. 学会等名 第19回日本分子脳神経外科学会（招待講演） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kosuke Aoki |
| 2. 発表標題 Classification and grading of diffuse astrocytic tumors |
| 3. 学会等名 The 5th International Symposium of Brain Tumor Pathology（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 山道 茜, 大岡 史治, 青木 恒介, 加藤 彰, Melissa Ranjit, Chalise Lushun, 平野 雅規, 棚橋 邦明, 本村 和也, 松原 年生, 鈴木 秀謙, 若林 俊彦, 加藤 幸成, 夏目 敦至 |
| 2. 発表標題 グレードII, IIIグリオーマの分子診断におけるATRX免疫組織染色は 1p/19q共欠失解析のサロゲートとして有用か? |
| 3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 青木恒介、山本高士、山本君代、鈴木啓道、大岡史治、Melissa Ranjit、本村和也、中村英夫、成田善孝、高橋雅道、吉本幸司、初井泰朋、村垣善浩、若林俊彦、波江野洋、夏目敦至 |
| 2. 発表標題 Mathematic model of tumor development and malignant transformation in WHO grade II diffuse glioma |
| 3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会学術総会 |
| 4. 発表年 2017年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 青木恒介、山本高士、山本君代、鈴木啓道、大岡史治、Melissa Ranjit、本村和也、中村英夫、成田善孝、高橋雅道、吉本幸司、初井泰朋、村垣善浩、若林俊彦、波江野洋、夏目敦至 |
| 2. 発表標題 放射線や化学療法がWHO grade IIびまん性神経膠腫の腫瘍進展と悪性転化に与える影響 |
| 3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会 |
| 4. 発表年 2017年 |

〔図書〕 計1件

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 青木恒介、鈴木啓道、大岡史治、夏目敦至、小川誠司 | 4. 発行年 2017年 |
| 2. 出版社 日本臨床 | 5. 総ページ数 305 |
| 3. 書名 がん転移学(上)-がん転移のメカニズムと治療戦略:その基礎と臨床- (19) 中枢神経系腫瘍の分子機構 | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|--|---------------------------|-----------------------|----|
|--|---------------------------|-----------------------|----|