

平成 21 年 5 月 30 日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18390398
 研究課題名（和文） 遺伝子発現解析に基づいた悪性神経膠腫の治療反応性予測モデルの実用化に関する研究
 研究課題名（英文） Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas
 研究代表者
 高橋 潤 (TAKAHASHI JUN)
 財団法人田附興風会・医学研究所 第5研究部・研究主幹
 研究者番号：80252435

研究成果の概要：

遺伝子発現プロファイリングの結果、神経膠腫の予後を予測する 58 遺伝子群を同定し、予後予測（補助療法感受性予測）するためのアルゴリズムを作成した。既知の 1p19q 染色体の LOH の有無及びMGMTの発現とは独立した予後因子としてこの 58 遺伝子プロファイルは有用であった。更に、臨床応用を容易にするために、PCR アレイを操作性の簡便な real time PCR に転換し、これに基づいたアルゴリズムも作成した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	7,800,000	0	7,800,000
2007年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2008年度	2,400,000	720,000	3,120,000
年度			
年度			
総計	15,100,000	2,190,000	17,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学

キーワード：遺伝子発現プロファイリング、予後予測、神経膠腫

1. 研究開始当初の背景

悪性腫瘍の個々の患者の治療予後を的確に推定することは個別化治療実現の第一歩として重要である。これまでに多くのがんを対象に遺伝子発現プロファイル解析がなされ、がんの治療予後予測モデルの作成が試みられてきたが、悪性神経膠腫においては臨床的な実用レベルの研究報告はなされていない。その原因としては、神経膠腫を対象として遺伝子発現プロファイリングを達成することの困難

さがある。通常、遺伝子発現プロファイリングでは数千から2万程度の遺伝子について発現レベルを測定し、その膨大なデータを駆使して有意義な情報を抽出しなければならず、これに見合う十分な症例数の確保が難しい。特に神経膠腫は発生頻度が毎年10万人に3人程度というまれな腫瘍であるため、過去の発現プロファイル解析は症例数が不十分であることが多く再現性の高い結果を導けなかったものと推測される。本研究で我々がベースに

した発現プロファイル解析は、我々の行ってきた臨床試験に併行してサンプリングした100例以上の悪性神経膠腫を対象として行ったもので、治療統一性が高く質の高いコホートを対象としている点が特色である。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫の治療予後予測モデルの実用化を目的として、補助療法感受性スコアを測定するアレイパネルの作成を行う。

我々はこれまでに100例以上の悪性神経膠腫を対象に、ATAC-PCR法を基盤としたPCRアレイを用いて3456遺伝子の発現パターンを調べ治療予後と遺伝子発現の関係を調べてきた。その結果、治療予後に関係する遺伝子上位50~60遺伝子の発現レベルに基づいた予後予測モデルの良好な予測性能をプレリミナリーに確認した。これらの遺伝子セットの中には悪性神経膠腫の悪性性格の形成に強く関わっていることが証明された遺伝子が含まれる。これらの遺伝子を中心とし機能遺伝子の発現を測定する専用アレイパネルを作成、その発現レベルから補助療法感受性スコアを算出するアルゴリズムを構築する。

次に、2つめは補助療法抵抗性が強い群に対する新しい治療標的候補の同定である。これまでに我々が発現プロファイル解析から同定した予後関連遺伝子上位遺伝子から、特に近年治療標的としての解析が盛んに行われているkinase群を中心にタンパクレベルでの発現測定を加えて、悪性性格への関与を調べる。

3. 研究の方法

1) 予後予測及び補助療法感受性予測アレイの作成：170例の神経膠腫サンプルにおいて3456遺伝子の発現についてPCRアレイを用いて遺伝子発現プロファイリングを作成し、臨床経過との相関を統計学的に検討する。臨床的予後・後療法の感受性を予測するために50~60の遺伝子よりなる遺伝子群を同定する。更に新たな30例の神経膠腫サンプルに対してこの遺伝子群の発現を調べ、有用性の再確認を行う。

2) 染色体欠失、MGMT発現と遺伝子発現プロファイリングとの相関性の検討：予後や補助療法感受性と相関があると従来報告のある1p・19q欠失及びMGMT遺伝子発現について、170症例を用いて欠失の有無・発現の有無を調べる。染色体欠失、MGMT発現、58遺伝子群発現プロファイルの独立性・相関性を検討することで更に予後予測精度をあげることができると考えている。

3) 遺伝子群の蛋白レベルの確認：絞り込んだ遺伝子群はRNAレベルの発現に基づい

て同定されたものであるが、これらの遺伝子発現について免疫染色を行い、蛋白レベルの発現を確認すると共に発現部位・細胞の同定を行う。この確認により、さらに58遺伝子群を20~30遺伝子群に絞り込むことが可能と考えている。

4) 新規分子標的治療の開発：絞り込んだ20~30遺伝子の中には神経膠腫の増大や治療感受性に密接に関わる遺伝子が存在している可能性が高い。これらを標的とした新たな治療法を開発を考える。

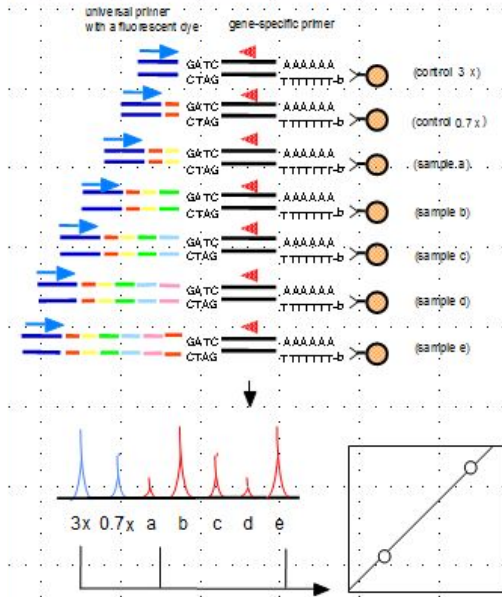
5) PCRアレイからreal time PCRへの転換：PCRアレイによる上記の遺伝子プロファイリングを、臨床の現場での実用性を上げるために、real time PCRによる遺伝子発現プロファイリングに転換し、これによるグリオーマ予後分類を行うことを試みた。

4. 研究成果

1) 予後予測及び補助療法感受性予測アレイの作成：170例の神経膠腫サンプルにおいて3456遺伝子の発現についてPCRアレイを用いて遺伝子発現プロファイリングを作成し、臨床経過との相関を統計学的に検討した。その結果、臨床的予後・後療法の感受性を予測するための58遺伝子群を同定した。更に新たな30例の神経膠腫サンプルに対してこの58遺伝子群の発現を調べ、有用性の再確認を行った。

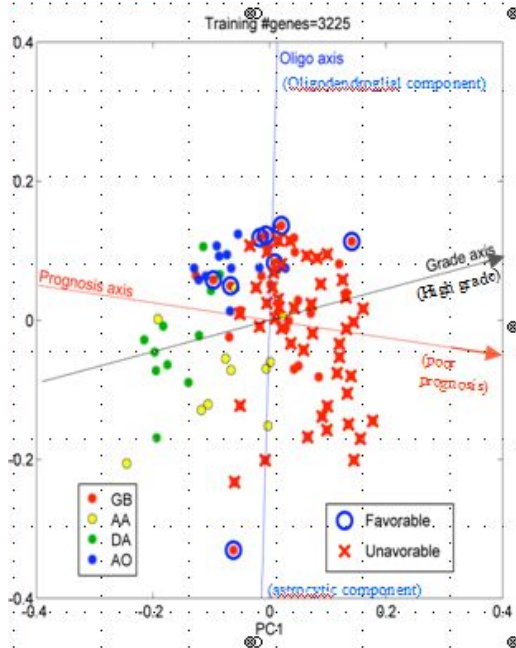
★ATAC-PCRを用いたPCRアレイ：

RNAをトリゾールで組織から抽出し、ビオチン負荷したプライマーを用いてcDNAを合成。Mbo-1を用いて処理し、それぞれ長さの異なるアダプターを付加し、ビーズを用いて回収した後にPCRをかけ、それぞれのサンプルを3730で評価をした。ATAC-PCRの優れた点はRNA量が少量で良く、また、質の劣化したRNAからも発現が評価できるという点であった。



★主成分分析とアルゴリズムの作成：

152例の glioma を ATAC-PCR で解析した結果で、110 症例で主成分分析を行い、その 2 つの主成分から求まる 2 次元平面図を示す。



この結果を基に遺伝子発現と progression free survival を単変量 cox 解析で遺伝子を選択し PCA から求まる式の結果で一番結果の良かった組み合わせの 58 遺伝子を用いて algorithm を作成した。

PC1 score(ATAC-PCR)

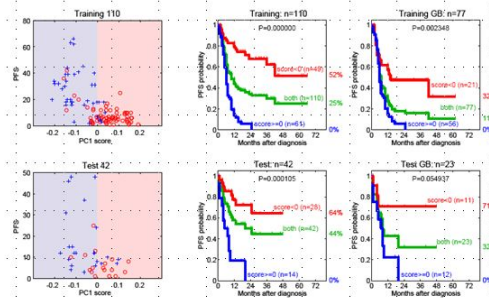
$$F(s) = \sum_{i=1}^n a_i (\log x(s)_i - \log m(s)) = \sum_{i=1}^n a_i \log x(s)_i + k(s)$$

Gene expression value (ATAC-PCR) is used for $\log x(s)_i$.
Factor loading score is used for a_i .
Median of gene expression (>3000 genes) is used for $\log m(s)$.

ATAC-PCR では、発現値の対数から約 3500 の遺伝子発現量の対数の中央値を引き、FL をかけて合計した。

このアルゴリズムから求まる値で 0 を閾値にして再発期間で Kaplan-Meier を作成した。それぞれの glioma で予後良好群、不良群を分けられ、また、GB 症例にても同様に 2 群に分けることが出来た。

Correlations between PC1 score & PFS, K-M estimates of PFS ratio



2) 染色体欠失、MGMT 発現と遺伝子発現プロファイリングとの相関性の検討：予後や補助療法感受性と相関があると従来報告のある 1p・19q 欠失及びMGMT 遺伝子発現について、上記同一 170 症例を用いて欠失の有無・発現の有無を調べた。解析では 58 遺伝子の発現パターンは上記の染色体欠失・MGMT 発現パターンとは独立のものであり、新たな予後予測・補助療法感受性予測のための方法として悪性神経腫瘍治療に有用である可能性が示唆された。

3) 58 遺伝子群の蛋白レベルの確認：タンパク質レベルで、同定した遺伝子群が腫瘍組織に発現していることが確認された。但し、発現量は定量的ではなく、たんぱく質発現量の差から新たな結果を得ることはできなかった。但し、58 遺伝子群はいずれも腫瘍組織内で蛋白レベルの発現を有し、これまでの文献

報告と合せ有力な分子標的治療のターゲットとして提示することが出来た。

4) PCR アレイから real time PCR への転換、real time PCR に基づいたアルゴリズムの作成: 臨床の現場でより簡便に行える real time PCR を用いて遺伝子発現プロファイリングを行えるようにシステムを転換した。また、これまでの 58 群遺伝子を用いて real time PCR 基盤のアルゴリズムを作成した。さらに、その予後予測の有用性を確認すると共に新しい腫瘍サンプルのテストセットを用いて再評価した。

★real time PCR 法

SYBR green を用いたインターカレーター法を用いた。mRNA から生成した cDNA に、その遺伝子発現に一致したプライマーを作成し、プライマーと反応して合成される二本鎖 DNA が色素により発光するため、合成された遺伝子の分だけシグナルが増加し、それを分光蛍光光度計で評価した。

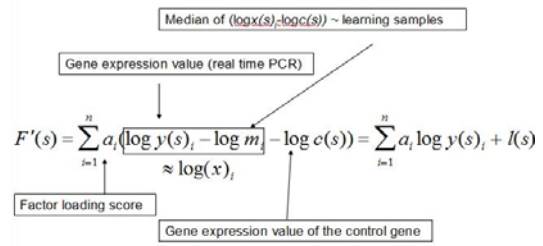
検量線法で用いた遺伝子の一覧を下記に提示した。右側の水色の部分が、ATAC-PCR で glioma に反応させた際に、反応が安定していた遺伝子群である。今回、real time PCR で反応させた際に、最も反応の安定していた UBL5 を standard primer として使用することとした。

1	IGFBP2	22	IFITM3	42	BC079676	59	NACA
2	VMP1	23	PPIB	43	GM2A	60	RPL35
3	MSN	24	TMSB4X	44	S100A10	61	TCEB2
4	TIMP1	25	ALDOC	45	PDE8B	62	PSMA6
5	LGALS1	26	ZYX	46	BRSK2	63	RPLP1
6	HMP19	27	ATP1A3	47	SYN1	64	RPS14
7	CHGB	28	ABCC8	49	CPLX2	65	RAC1
8	CD63	29	IGFBP3	50	MRCL3	66	UBL5
9	NES	30	TUB	51	TMSB10	67	NCKAP1
10	CLIC1	31	IFB3	52	JPH4	68	HADHA
11	INA	32	FLNA	53	FAIM2	69	DYNLL1
12	TNC	33	UPAR	54	DKFZp761P2314	70	RPLP2
13	TAGLN2	34	UPP1	55	PLEKHA4		
14	HES6	35	LAMB2	56	GPX1		
15	VEGF	36	KIAA0927 protein	57	SOD2		
16	VIM	37	AEBP1	58	RHOC		
17	LDHA	38	EST				
19	RPIP8	39	RTN1				
20	SOG3	40	HMOX1				
21	GDAP1L1	41	FN14				

検量線法を用いて発現量を調べた際のアルゴリズムを下に提示した。発現値の対数から基準となる遺伝子の反応値の対数を引き、次にその求まる値の中央値を引いた後に因

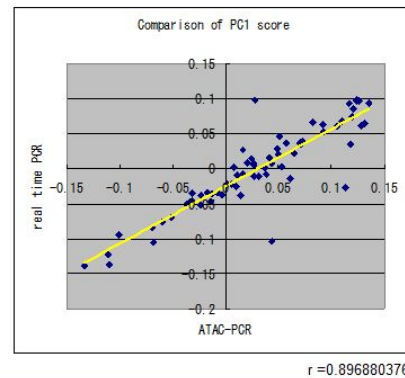
子負荷をかけて、合計した数値を示している。

PC1 score(Real time PCR, for standard curve method)



※ The factor loading score of this, is the same value of ATAC-PCR.

下記の図は、同一サンプル間で、ATAC-PCR と real time PCR との相関で調べたものであるが、相関係数で 0.896 と非常に高い正の相関が得られた。



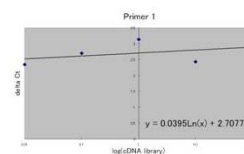
次に delta delta Ct 法を示す。これは検量線法に類似した発現量の求め方であり、標的の相対定量を求める際に、この方法ではプレート上で、検量線を用いずに測定することが可能である。これに変更するには、デルタ CT 値と反応値の対数変換後のグラフで、近似曲線を求めた際に傾きの絶対値が 0.1 より小さい事が条件となる。

ΔΔC^T method

The comparative Ct method is similar to the standard curve method.

ΔΔC^T calculation for the relative quantitation of target is use without running standard curves on the same plate.

The absolute value of the slope of log input amount vs. ΔC^T should be <0.1.



上記に基づいて、今回使用した primer から、ddCt に変更可能なもので、反応が glioma に対して安定したものを選ぶと、下の 30 個となった。

1	IGFBP2	0.083	16	IFITM3	0.0031
2	WMP1	0.0662	17	PPIB	-0.063
3	MSN	-0.0201	18	ALDOC	0.0909
4	TIMP1	0.0748	19	ZYX	-0.0151
5	LGALS1	-0.0124	20	UPAR	0.0505
6	CD63	-0.0253	21	LAMB2	-0.0698
7	NES	-0.034	22	RTN1	0.036
8	CLIC1	0.0455	23	HMOX1	0.0365
9	TNC	0.0898	24	GM2A	-0.0646
10	TAGLN2	0.003	25	S100A10	0.0706
11	HES6	-0.0512	26	BRSK2	0.0539
12	VEGF	0.0743	27	MRCL3	0.0596
13	VIM	0.013	28	GPX1	-0.0803
14	LDHA	-0.0104	29	SOD2	-0.057
15	RFPFB	-0.0763	30	RHOC	0.0435
S	UBL5				

実際の dd Ct での発現量値の求め方を表した。 $\Delta\Delta Ct$ で、 ΔCt (control sample)は Human cDNA library に対する反応となるので、遺伝子ごとに一定の値となる。

$\Delta\Delta Ct$ method

$$\Delta Ct = (\text{target Ct}) - (\text{internal control Ct})$$

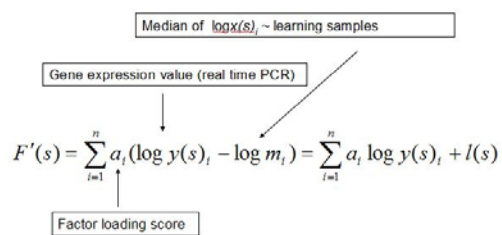
$$\Delta\Delta Ct \equiv \Delta Ct(\text{target sample}) - \Delta Ct(\text{control sample})$$

$$= ((\text{sample target Ct}) - (\text{sample internal control Ct})) - ((\text{control sample target Ct}) - (\text{control sample internal control Ct}))$$

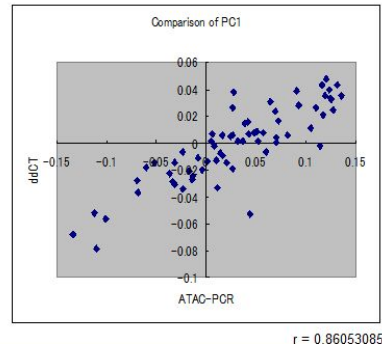
$$\text{Value} = 2^{-\Delta\Delta Ct}$$

ddCt での PC1 を以下に示すが、求まる発現量から、それぞれの発現量の中央値で補正し、因子負荷をかけて合計し算出した。

PC1 score(Real time PCR, for ddCt)

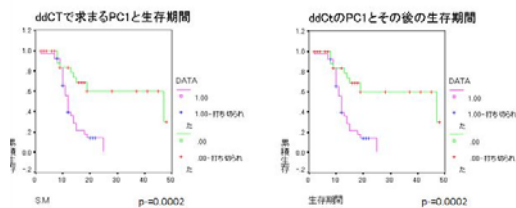


上述した ATAC PCR で求められた PC1 と比較しているが、相関係数は 0.8605 とやや検量線法には劣るものの、良い正の相関が得られた。



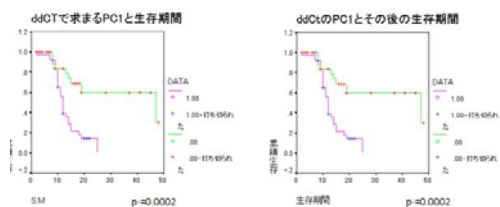
ここから求められた値で、まず、生存期間で、0 を閾値に二群に分けて Kaplan-Meier (KM) 曲線を求めた。予後良好群、不良群に良く分かれており、また、収集した 2008 年 5 月の時点の生存期間でも良い有意な結果が得られた。

Kaplan-Meier Estimates of Overall Survival, According to PC 1 score of ddCt method.(Training set; n=67)



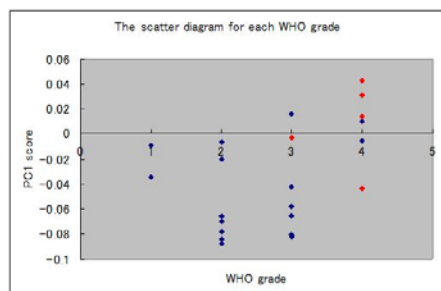
次に、求まる値で同様に 0 を閾値にして、腫瘍増大期間で KM 曲線を調べたが、やはり、予後不良群、良好群を分けられ、経過を経ても同様に良い有意な結果が得られているのが示された。

Kaplan-Meier Estimates of Overall Survival, According to PC 1 score of ddCt method.(Training set; n=67)



Test set の臨床経過を各 WHO grade ごとに散布図を作成した。赤いマーカーが死亡例を示す。

The scatter diagram for each WHO grade (test set; n=22)



Grade4 の赤い症例で PC1 がマイナスのものは、生存期間 15 ヶ月と GB としては生存期間が長く、PC1 スコアは生存期間を予測する有用な方法であることが確認された。

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 2 件)

- (1) Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas.
Shirahata M, Oba S, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Ishii S, Takahashi JA, Kato K.
Cancer Sci. 2009 100(1):165-72. 査読有
- (2) Gene expression-based molecular diagnostic system for malignant gliomas is superior to histological diagnosis.
Shirahata M, Iwao-Koizumi K, Saito S, Ueno N, Oda M, Hashimoto N, Takahashi JA, Kato K.
Clin Cancer Res. 2007 13(24):7341-56. 査読有

[学会発表] (計 8 件)

- (1) 白畑充章、橋本信夫、高橋潤、加藤菊也 : 臨床に役立つグリオーマの遺伝子解析 第 11 回癌治療増感研究シンポジウム 2009. 2. 14-15、奈良
- (2) Shirahata, M, Takahashi JA, Kato K : Using gene expression profiling to identify a prognostic molecular spectrum in gliomas. AACR Annual Meeting 2008. 4. 12-15、San Diego, U. S. A.
- (3) 白畑充章、橋本信夫、高橋潤、加藤菊也 : Clinical application of molecular diagnostics using gene expression

profiling. 第 26 回日本脳腫瘍学会 2008. 11. 30-12. 2、松山

- (4) 白畑充章、橋本信夫、高橋潤、加藤菊也 : 悪性グリオーマに対するテモダール併用放射線治療後の pseudoprogession についての検討 第 67 回日本脳神経外科学会 2008. 10. 1-3、盛岡
- (5) 白畑充章、橋本信夫、高橋潤、加藤菊也 : 遺伝子発現に基づいた anaplastic oligodendroglioma / glioblastoma 診断モデル 第 26 回日本脳腫瘍病理学会 2008. 5. 23-24、東京
- (6) 白畑充章、橋本信夫、高橋潤、加藤菊也 : Glioma における遺伝子発現プロファイルの臨床的有用性について 第 25 回日本脳腫瘍学会 2007. 12. 9-11、東京
- (7) 白畑充章、橋本信夫、高橋潤、加藤菊也 : 遺伝子発現に基づいた anaplastic oligodendroglioma / glioblastoma 診断モデル 第 66 回日本脳神経外科学会 2007. 10. 3-5、東京
- (8) Shirahata, M, Takahashi JA, Kato K : Gene expression-based predictor for gliomas classified primary glioblastomas into prognostically distinct subgroups. 第 66 回日本癌学会 2007. 10. 3-5、横浜

6. 研究組織

- (1) 研究代表者
高橋 潤 (TAKAHASHI JUN)
財団法人田附興風会・医学研究所 第 5 研究部・研究主幹
研究者番号 : 80252435
- (2) 研究分担者
加藤 菊也 (KATO KIKUYA)
大阪府立成人病センター・研究所・所長
研究者番号 : 60194809

橋本 信夫 (HASHIMOTO NOBUO)
京都大学・医学研究科・教授
研究者番号 : 40135570