

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K09003

研究課題名(和文) グリオーマにおけるHRM法を用いた高感度TERT遺伝子変異検出法の確立

研究課題名(英文) Establishment of highly-sensitive TERT mutation assay in glioma

研究代表者

安達 淳一 (ADACHI, JUNICHI)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：70291143

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：TERT遺伝子プロモーター領域の点突然変異は、成人神経膠腫において高頻度で見られることから、診断上重要な分子マーカーである。しかしながら、TERTプロモーター領域はGC含量が高く、通常のDNAシーケンス法では感度が低いため、Droplet Digital PCR (ddPCR) 法を用いてTERT遺伝子変異解析を行った。グリオーマの凍結及びパラフィン包埋組織由来のDNAに対して、変異型と野生型プローブの存在下でddPCR増幅を行い、両者のDNAのコピー数を定量解析した。結果、両アレルのコピー数が競合なく検出された。以上から、ddPCR法は本遺伝子変異解析に対しては極めて有用な方法であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ddPCR法はサンプル内にPCR増幅される遺伝子があれば必ず増幅検出されるため、0.01%の変異DNAでも検出が可能な高感度な遺伝子変異検出法であり再現性も高い。特に変異のホットスポットが判明しているTERT遺伝子変異の解析に対しては極めて有用な方法である。

研究成果の概要(英文)：It is important to accurately detect TERT promoter mutations in glioma. Sanger DNA sequencing is the currently standard method for analyzing TERT mutations. In this report, we described a novel droplet digital PCR (ddPCR) assay to evaluate TERT hot spot mutations in fresh frozen and formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) specimens of glioma and verified the difference in results from the Sanger DNA sequencing results. We obtained the mutant allele fraction for TERT mutations of in a single ddPCR run in all cases, including the microdissected FFPE sections. On the contrary, up to twice the DNA sequences were required from fresh frozen tissue to obtain the results, consistent with ddPCR assay. When FFPE specimens were used, more time was required to evaluate TERT mutations through DNA sequencing. DdPCR is an effective and sensitive assay compared to the conventional standard Sanger DNA sequencing.

研究分野：脳神経外科

キーワード：Glioma TERT ddPCR

1. 研究開始当初の背景

TERT (Teromerase reverse transcriptase) 遺伝子は、逆転写酵素であるテロメラーゼの触媒サブユニットである。そのプロモーター領域の変異は、*TERT* 発現を亢進させて染色体のテロメアの維持、細胞の不死化に関わっている事が知られている。そして、*TERT* 遺伝子プロモーターの変異が、グリオーマの診断や予後を規定する分子マーカーとしての知見が集積しており、本遺伝子変異の解析は病理学的かつ臨床的に極めて重要である。しかしながら、現時点で本遺伝子変異の検出には、再現性が低く偽陰性が多い DNA Sanger シークエンス法によらざる得ないのが現状である。

2. 研究の目的

グリオーマにおける重要な分子マーカーである *TERT* 遺伝子プロモーターの変異を短時間かつ再現性良く高感度に解析可能な検出方法の開発を目的とする。

3. 研究の方法

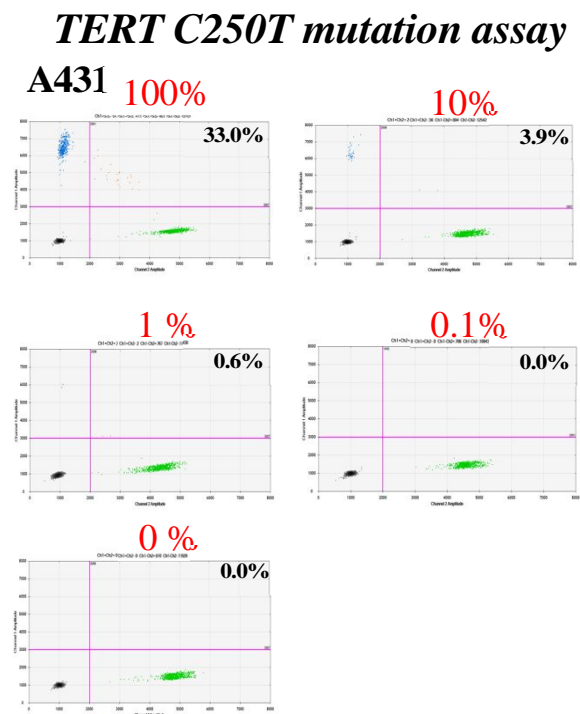
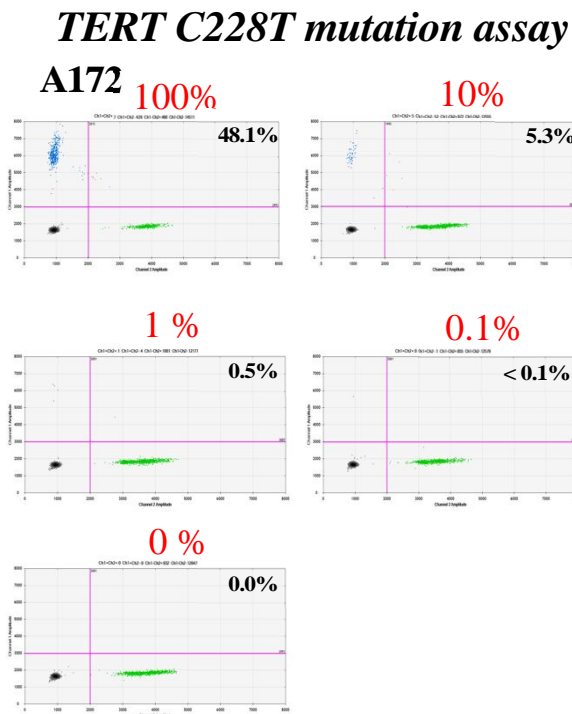
- (1) グリオーマ凍結組織からは Dneasy Blood&Tissue kit で、パラフィン包埋組織からは Maxwell RSC instrument を用いて高品質の腫瘍由来 DNA を抽出、精細する。
- (2) まず、最適化した HRM (High resolution melting: 高解像能融解曲線分析)法の確立を目指す。即ち、飽和型インターカレート色素の存在下で *TERT* 遺伝子プロモーターの変異領域を LightCycler480 システム (ロシュ・ダイアグノスティクス) を用いて PCR 増幅する。その後、引き続き融解曲線分析を高解像度で行い、野生型と変異型との Difference プロットの自動タイピングを行う。この時に GC 含量の多い変異領域を確実に増幅できる試薬及び PCR 条件の設定の最適化を行う。
- (3) 以上の HRM 法での解析方法確立が困難な場合、次に droplet digital PCR での解析方法の確立を目指す。

4. 研究成果

まずは、上記「研究の方法」(2)の HRM での変異検出方法の確立を目指したが、達成にいたらなかったため、(3)の droplet digital PCR 法での解析を行うこととした。

1) droplet digital PCR (ddPCR) の最適化

A172 (TERT C228T 変異あり)、A431 (TERT C250T 変異あり)、および末梢血細胞 (TERT 野生型)からの DNA に対して ddPCR アッセイを実行した。TERT 変異遺伝子の検出可能な最小画分を評価するために、細胞株からの変異 TERT DNA の段階希釈を、正常な末梢血細胞 DNA と混合して、100%から 0% (100%、10%、1%、0.1%、および 0%)とした。結果は、2次元 ddPCR プロットとして表示した。野生型 PCR 産物の蛍光強度は X 軸 (HEX) に表示され、変異型 PCR 産物の蛍光強度は Y 軸 (FAM) に表示した。次に、野生型を示す HEX 強度に 2000 の閾値を設定し、変異を示す FAM 強度に 3000 の閾値を設定した。これにより、droplet のクラスターが分離された。図 1 に示すように、TERT C228T 変異は A172 細胞のみの DNA の 48.1%に存在し、TERT C250T 変異は A431 細胞のみの DNA の 33.0%に存在し、これらの変異は末梢血のみの DNA では検出されなかった。



2) グリオーマサンプルに対する ddPCR 法による TERT 遺伝子検出方法の評価

以上の最適化された ddPCR アッセイ法を使用して、9 つの神経膠腫サンプル (5 つの新鮮な冷凍標本と 4 つの FFPE 標本) の TERT プロモーター変異を分析した。すべてのケースで、1 回の ddPCR 法にて信頼性あるデータが得られた。また、それぞれのケースで標準的な SangerDNA シークエンス法との検出度の比較を行った (表 1, 括弧内は変異アレルの%)。

表 1 神経膠腫サンプルに対する ddPCR 法及び Sanger DNA シークエンス法との比較

Case No.	Sample status	Pathological diagnosis	<i>TERT</i> mutation assay results			
			ddPCR	Sanger DNA sequencing ^a		
				First	Second	Third
1	Fresh frozen	Glioblastoma, <i>IDH</i> -wildtype	C228T (46.1%)	C228T	/	/
2	Fresh frozen	Glioblastoma, <i>IDH</i> -wildtype	C228T (42.4%)	NE	C228T	/
3	Fresh frozen	Oligodendroglioma, <i>IDH</i> -mutant and 1p/19q-codeleted	C228T (55.7%)	C228T	/	/
4	Fresh	Glioblastoma,	C250T (59.2%)	C250T	/	/

	frozen	<i>IDH</i> -wildtype				
5	Fresh	Anaplastic	No mutation	NE	NE	No
	frozen	astrocytoma, <i>IDH</i> -wildtype				mutation
6	FFPE	Glioblastoma, <i>IDH</i> -wildtype	C228T (51.3%)	C228T	/	/
7	FFPE	Glioblastoma, <i>IDH</i> -wildtype	C250T (37.8%)	NE	NE	C250T
8	FFPE	DMG, H3 K27M-mutant	No mutation	NE	NE	No
9	FFPE	Mixed anaplastic OA, dual-genotype	C228T(31.4%) ^b	NA	NA	NA

FFPE formalin-fixed paraffin-embedded, *DMG* diffuse midline glioma, *OA* oligoastrocytoma, *NE* not evaluable, *NA* not amplified

^a In case the result of the first sequencing was different from that of ddPCR, Sanger DNA sequencing was performed up to three times (from First to Third) until the results of the two methods matched.

^b The oligodendroglial but not the astrocytic portion displayed *TERT* C228T mutation.

以上から、*TERT* 遺伝子の C228T および C250T プロモーター変異を特異的に検出するための ddPCR アッセイの有効性を示し得て、本研究の目的は達せられたと判断した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Miyake Y, Adachi J, Suzuki T, Mishima K, Araki R, Mizuno R, Nishikawa R	4. 巻 141
2. 論文標題 TERT promoter methylation is significantly associated with TERT upregulation and disease progression in pituitary adenomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 131-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11060-018-03016-8	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 Shirahata M, Adachi J, et al	4. 巻 136
2. 論文標題 Novel, improved grading system(s) for IDH-mutant astrocytic gliomas	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Acta Neuropathologica	6. 最初と最後の頁 153 ~ 166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00401-018-1849-4	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 Adachi J, Shirahata M, Suzuki T, Mishima K, Uchida E, Sasaki A, Nishikawa R	4. 巻 -
2. 論文標題 Droplet digital PCR assay for detecting TERT promoter mutations in patients with glioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology, in press, 2021.	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 3件）

1. 発表者名 三宅勇平, 安達淳一, 鈴木智成, 三島一彦, 荒木隆一郎, 佐々木惇, 西川 亮
2. 発表標題 下垂体腺腫の腫瘍増大に関わるTERT遺伝子プロモーターメチル化の意義
3. 学会等名 第37回 日本脳腫瘍病理学会 学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi J, Miyake Y, Suzuki T, Mishima K, Araki R, Nishikawa R
2. 発表標題 TERTTERT promoter methylation is significantly associated with TERTupregulation and tumor progression in pituitary adenomas
3. 学会等名 14th European Association of Neuro-Oncology annual meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Adachi J, Shirahata M, Suzuki T, Mishima K, Nishikawa R
2. 発表標題 MGMT methylation cutoff value in quantitative analysis related to prognosis of newly diagnosed glioblastoma
3. 学会等名 24th Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達淳一、白畑充章、鈴木智成、三島一彦、藤巻高光、西川 亮
2. 発表標題 高MGMTプロモーターメチル化膠芽腫の再発後の経過と予後の解析
3. 学会等名 第37回 日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安達淳一、白畑充章、鈴木智成、三島 一彦、藤巻高光、西川 亮
2. 発表標題 膠芽腫の予後を規定する MGMTメチル化定量解析 法におけるメチル化カット オフ値の設定
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Adachi J, Suzuki T, Mishima K, Nishikawa R
2. 発表標題 Liquid biopsy using cell free DNA from the cerebrospinal fluid (CSF) in glioma
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 安達淳一、白畑充章、鈴木智成、三島一彦、藤巻高光、西川 亮
2. 発表標題 グリオーマにおける高感度TERT遺伝子変異検出法の確立
3. 学会等名 日本脳神経外科学会 第79回学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安達淳一、白畑充章、鈴木智成、三島一彦、藤巻高光、西川 亮
2. 発表標題 グリオーマにおける Droplet Digital PCR 法を用いた高感度TERT遺伝子変異解析
3. 学会等名 第38回 日本脳腫瘍学会 学術総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究 分担 者	西川 亮	埼玉医科大学・医学部・教授	
	(Nishikawa Ryo)		
	(90237678)	(32409)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------