

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18405

研究課題名（和文）神経膠腫におけるMRIテクスチャー解析及び髄液DNAによる術前分子診断の探索

研究課題名（英文）Using MRI texture analysis and cerebrospinal DNA fluid in glioblastoma for preoperative molecular diagnostics

研究代表者

笹尾 亮太（Sasao, Ryota）

慶應義塾大学・医学部（信濃町）・助教

研究者番号：60837201

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）：Mazdaによる解析では diffusion weighted imageのHorzl\_Fraction、135dr\_shrtREMPの併用で陽性的中率90%、感度42.9%で予想可能で、SYNAPSE VINCENTによる解析ではApparent diffusion coefficientのmean ADC valueと ADCentropyの併用で、陽性的中率81.2%、感度61.9%での予測が可能であった。liquid biopsyによる神経膠腫分子診断は、倫理面から腰椎穿刺での採取は難しく、適切な症例が十分に確保できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

MGMTメチル化の有無は、膠芽腫をはじめ神経膠腫のアルキル化剤反応性に深く関与しており、特にGrade 3以上の悪性神経膠腫では、術中（摘出後）にBCNU wafer（手術摘出腔留置用のアルキル化剤徐放剤）を留置するかどうかの判断材料となる。BCNU waferは、感染や炎症などの有害事象の原因となることもあり、術前にその効果が予測できれば、不要なリスクを避けることができる（効率的留置）。現状では術前にMGMTメチル化の有無を判断することは困難であり、神経膠腫の分子診断が術前に高い精度で可能となれば、不要な侵襲をなくすことができ、画期的な変革になると予想される。

研究成果の概要（英文）：In the analysis by Mazda, it was predictable with a positive predictive value of 90% and a sensitivity of 42.9% when the diffusion weighted image Horzl\_Fraction and 135dr\_shrtREMP were used together. In the analysis by SYNAPSE VINCENT, it was possible to predict with a positive predictive value of 81.2% and a sensitivity of 61.9% by using the mean ADC value of Apparent diffusion coefficient and the ADC entropy together. Molecular diagnosis of glioma by liquid biopsy was difficult to collect by lumbar puncture from the ethical point of view, and it was not possible to secure sufficient appropriate cases.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 MRIテクスチャー解析 髄液DNA 術前分子診断

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

神経膠腫はその浸潤性の性格や、機能温存のため摘出困難な部位に発生することがあることなどから、手術により全摘、根治とすることが困難な疾患である。そのため、術後化学放射線治療を要するが、ほとんどの症例で再発は必至である。治療成績の向上に向け世界的に様々な治療法が検討されているが、分子診断に基づく個別化治療の必要性が認識されつつある。現時点で神経膠腫の治療選択に最も関わる分子異常は、1p19q codeletion (1p/19q codeletion, 染色体1番短腕、19番長腕の全長の同時欠失)とO-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase (MGMT) 遺伝子のプロモーターメチル化の有無である: 1p19q codeletionはWHO分類でGrade 2, 3に分類される神経膠腫における予後因子であり、かつPCV (procarbazine, CCNU, vincristine) 療法やテモゾロミドなどの化学療法の効果予測因子である、MGMT 遺伝子のプロモーターメチル化は膠芽腫(Grade 4)のアルキル化剤効果予測因子である。特に1p19q codeletionは最新のWHO分類(2016)において、乏突起膠腫の定義が1p19q codeletionを持つ神経膠腫となったことから、病理分類並びに治療法選択に関わる因子として重要である。

申請者らは、神経膠腫における分子診断の重要性をいち早く認識し、comparative genomic hybridization (CGH) 法やMGMTメチル化特異的PCRなどによる分子生物学的解析結果に基づいた個別化治療を先駆的に取り入れてきた(Hirose Y et al. Neurosurgery 2011; Sasaki H et al. J Neurooncol 2015など)。しかし、これらの遺伝子異常は手術で摘出された腫瘍組織から解析されるため、術後に初めて判明する。ここで、多くの他臓器癌が内視鏡や局所麻酔下生検により比較的簡易に組織採取が可能なことと異なり、脳腫瘍では、組織採取のためにも多くの場合で開頭(=比較的大きな侵襲)が必要である。また、多くの脳腫瘍では、手術摘出率や残存腫瘍体積が患者の予後と関連するため、開頭するのであれば可及的摘出をせざるを得ない状況であり、分子診断(術後に初めて判明する)に関わらず一律に(リスクを伴う)可及的摘出が行われることが多い。従って、もし術前に腫瘍の分子診断が予測できれば、分子診断に沿った個別化治療を効果的に実行するために極めて有用である。

このような目的のため、申請者らは2つのアプローチを試みている: 1) 術前画像からの神経膠腫分子診断の予測、2) 髄液 circulating cell free DNAからの神経膠腫分子診断の予測、である。1)に関連して、日常的に撮影されるCT, MRI画像で判断可能な複数の画像所見の組み合わせによる、1p/19q codeletion予測スコアシステムを報告した(Kanazawa T et al. Neurosurg Rev 2018)。さらに、定量的な判断を行うため、血流豊富な髄膜腫瘍であるhemangiopericytoma(血管周皮腫)とangiomatous meningioma(血管腫様髄膜腫)の鑑別に(市販のソフトウェアを用いた)MRIテクスチャー解析が有用であることを報告した(Kanazawa T et al. World Neurosurg 2018)。また、パイロットスタディーとして、数例において、digital PCRを用いた髄液 circulating cell free DNAから、Sanger sequencingが可能であることを確認済である。1mlの髄液でIDH変異、MGMTメチル化アッセイなどが可能な量と質を有する circulating DNA がとれている。

### 2. 研究の目的

本研究では、1) MRIテクスチャー解析による、膠芽腫におけるMGMT遺伝子プロモーター領域メチル化の(有無の)予測方法の確立、2) 髄液 circulating cell free DNAによる神経膠腫分子診断の予測可能性についての検討を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1)MRIテクスチャー解析による、膠芽腫におけるMGMT遺伝子プロモーター領域メチル化の(有無の)予測方法の確立

当院で摘出術が施行され、術前のT2, ADC map両イメージが利用可能な初発の膠芽腫48例を対象とする。MGMTメチル化特異的PCRにより、プロモーター領域のメチル化を検索する。得られた結果と、市販の画像解析ソフトウェア(SYNAPSE VINCENT, Fuji film corp.)とweb上フリーで利用可能な画像解析ソフトウェア(Mazda)を用いた様々な定量的テクスチャー解析(ADC mapのentropy, skewnessなど)の結果とで相関を検討し、最も相関の高いテクスチャー条件を探索する。

遺伝子解析の共同研究機関である藤田医科大学医学部脳神経外科で摘出術が施行された初発の膠芽腫を対象とし、SYNAPSE VINCENT及びMazdaの結果のvalidationを行う。

、により、MGMTメチル化の予測に最も有用なテクスチャー条件を決定し、新規の症例を対象としたproof of concept臨床試験を行う(倫理申請が必要)。膠芽腫が疑われる患者10名を対象として、テクスチャー解析結果に基づく、意図的なBCNU waferの留置(あるいは非留置)を行い、有効性と有害事象を観察する。

(2)髄液 circulating cell free DNAによる神経膠腫分子診断の予測可能性についての検討

術前に髄膜播種が疑われる神経膠腫症例あるいは水頭症併発例を対象として、10症例において、髄液 circulating cell free DNAによる神経膠腫分子診断の可能性を検討する。髄膜播種が

疑われる症例では、腰椎穿刺（播種の有無検索目的。ただし脳圧亢進例は除く）により、また水頭症併発例は脳室穿刺時に髄液を採取する。Maxwell circulating DNA 抽出用キット(Promega) を用いて circulating DNA を抽出し、IDH1 変異、TERT 変異、MGMT プロモーターメチル化、1p/19q code1 の検査を行い、腫瘍組織から抽出した DNA での解析結果と比較検討する。digital PCR を使用することで、微量の遺伝子変異を検出する精度が向上しており、また定量的な測定が可能である。

#### 4 . 研究成果

画像による診断は、神経膠腫における MGMT プロモーター領域のメチル化の予測を目的とし、web 上フリーで利用可能な画像解析ソフトウェア(Mazda)と市販の画像解析ソフトウェア(SYNAPSE VINCENT, Fuji film corp.)とでそれぞれ解析した。対象として、初発膠芽腫のうち、当院で摘出術が施行され、術前の MRI 画像が利用可能なもの 48 例とした。解析の結果、Mazda によるテクスチャー解析では diffusion weighted image (DWI) の Horzl\_Fraction、135dr\_shrtREMP を併用することで陽性的中率 90%、感度 42.9%で予想可能であり、SYNAPSE VINCENT を用いた解析では Apparent diffusion coefficient(ADC)の mean ADC value と ADCentrophy を併用することで、陽性的中率 81.2%、感度 61.9%での予測が可能であった。いずれのソフトでも比較的高い陽性的中率と感度で予想可能であった。SYNAPSE VINCENT において DWI が評価可能なデータとして検出されなかったため、DWI を用いた解析と比較は適わなかったが、他のモダリティと比較して、ADC(DWI)が有用であることが示唆された。liquid biopsy による髄液 circulating cell free DNA を用いた神経膠腫分子診断は、必ずしも治療に必要ななく、侵襲を加えることになることから、倫理面から腰椎穿刺での採取は難しく、術中に採取することが望ましい状況にあるため、適切な症例が十分に確保できなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------