

令和 6 年 5 月 8 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09363

研究課題名（和文）膠芽腫の再発形式に関する幹細胞マーカー発現変化の解明

研究課題名（英文）Analysis of changes in expression of stem cell markers related to recurrent patterns of glioblastoma

研究代表者

園田 順彦（Sonoda, Yukihiko）

山形大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90302140

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：膠芽腫が予後不良な原因として放射線化学療法抵抗性が挙げられる。我々はがん幹細胞マーカーCD133の発現が腫瘍の再発形式に強く関与していることを明らかにしてきた。本研究ではCD133が再発腫瘍において初発腫瘍より発現が上昇しているかを検討した。結果としてCD133の発現は必ずしも再発腫瘍において上昇は認められなかった。次にTERT遺伝子のプロモータ変異に着目し研究を行った。結果、TERT変異陽性例では画像上造影周囲のFLAIR領域のADC値が低値であり、組織学的にも腫瘍細胞の密度が高いことを確認した。以上より、膠芽腫においてはTERT変異の有無により腫瘍細胞の浸潤度が異なることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は通常MRIの造影領域を摘出するのが標準的な手術法となっているが、再発は通常周囲のFLAIR高信号領域から生ずることが多い。したがってFLAIR高信号領域の摘出が近年注目を浴びている。FLAIR高信号領域は造影領域の数倍存在しており、その領域を摘出は通常困難である。今回の解析においてFLAIR高信号領域は腫瘍細胞の浸潤を示す、ADC値がFLAIR内でもバラつきがあり、特にTERTプロモータ変異のある症例では広範囲かつ高密度に腫瘍細胞が存在し、野生型ではその領域が限局していることが明らかとなった。本解析は今後の手術計画をするうえで有用な情報になり得る可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma has the poorest prognosis of adult brain tumors. The reasons for the poor prognosis of glioblastoma include the resistance to radiation chemotherapy. The presence of tumor stem cells is known to be a cause of resistance to chemoradiotherapy. In this study, we first examined whether the expression of tumor stem cell marker, CD133 was higher in recurrent tumors than in primary tumors. However, the expression of CD133 was not necessarily increased in recurrent tumors. So, we focused on the promoter mutation of the TERT gene, which is related to tumor invasiveness and recurrence. The ADC value of the FLAIR area around the contrast-enhanced lesion was low in TERT mutation-positive cases, suggesting higher infiltration into the tumor periphery. In addition, the density of tumor cells was higher in TERT mutation cases. These results suggest that the degree of tumor cell invasion in glioblastoma varies depending on the presence or absence of TERT mutation.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：Glioblastoma TERT FLAIR

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は脳腫瘍の中でもっとも悪性であり、手術による摘出と後療法として放射線化学療法を行っても全生存期間中央値は18か月程度である。

膠芽腫の予後不良な原因としては、手術に完全な摘出が困難なことから、放射線化学療法に抵抗性があることが知られている。

放射線化学療法抵抗性の一因として腫瘍幹細胞の存在が知られている。我々は以前より腫瘍幹細胞マーカーCD133の発現が膠芽腫の再発形式に強く関与していることを明らかにしてきた (Shibahara I, Sonoda Y et al. Neurooncol. 2013, Yamaki T, Sonoda Y et al. J Neurooncol. 2020)。しかしながら膠芽腫の再発に本当に腫瘍幹細胞の発現が関与しているかは明らかではなく、他の因子は関与している可能性も否定できない。

### 2. 研究の目的

膠芽腫の再発に関与している分子マーカーを明らかにし、特に腫瘍幹細胞が再発にどの程度関与しているかを明らかにする目的で以下の研究を行った。

### 3. 研究の方法

方法1) 膠芽腫の再発組織における幹細胞マーカーCD133の発現

膠芽腫再発において、放射線化学療法耐性を獲得した腫瘍幹細胞が増加しているのか否かを再発組織のCD133の発現率を免疫染色法を用いて解析した。

方法2) TERT 遺伝子のプロモータ領域の変異と膠芽腫の再発形式・浸潤性

153例の膠芽腫症例より臨床情報、画像情報、腫瘍組織から得られたDNAを解析した。IDH変異例、H3F3A変異例7例を除外し147例の膠芽腫、IDH野生型のみを解析対象とした。92例にTERT遺伝子のプロモータ領域の変異を認めた。分子マーカーとしてBRAF、TP53遺伝子異常、CD133、ATRXの免疫染色MGMT遺伝子のプロモータ領域のメチル化の有無、コピー数変化を解析した

方法3) IDH野生型膠芽腫におけるTERT遺伝子プロモータ領域変異とFLAIR高信号領域のADC値との関係

114例の膠芽腫、IDH野生型のMRI画像より造影領域周囲のFLAIR高信号領域のADC値を測定した。併せて、造影領域の体積、FLAIR高信号領域の体積も測定した。これらの結果とTERT遺伝子プロモータ領域変異の関係を検討した。

### 4. 研究成果

結果1) 膠芽腫の再発組織における幹細胞マーカーCD133の発現

再発膠芽腫組織においてCD133の発現の上昇は認められなかった。

結果2) TERT 遺伝子のプロモータ領域の変異と膠芽腫の再発形式・浸潤性

TERT 遺伝子プロモータ領域変異例は野生型例に比較し、有意に無増悪生存期間および全生存期間が短かった。また画像上、TERT変異例は多発例、遠隔再発例が有意に高頻度に認められた。分子生物学的にはTERT変異はEGFR増幅、CDKN2A欠失、PTEN欠失と正の相関を認めmPDGFR増幅、CDK4ゲイン、TP53欠失に負の相関を認めた。TERT変異例は多発発生・遠隔再・予後不良に有意に関係していた。TERT野生型はIDH野生型膠芽腫の中で独立した分子生物学的異常パターンを持つ可能性が示唆された。以上の結果を(Kikuchi Z, Sonoda Y. Neurooncol Adv. 2020)に発表した。

結果3) IDH野生型膠芽腫におけるTERT遺伝子プロモータ領域変異とFLAIR高信号領域のADC値との関係

TERT遺伝子プロモータ領域変異は77例に認めた。造影領域の体積とFLAIR高信号領域の体積は2群間で差を認めなかった。一方、FLAIR高信号領域のADC値はTERT遺伝子プロモータ領域変異群が、野生型群より有意に低値であった。また、FLAIR高信号領域より摘出した組織の細胞密度、ADC値と相関していた。膠芽腫の造影領域周囲のFLAIR高信号領域は通常の画像からの判別は困難であるが、ADC値を測定すると、細胞密度は差があることが明らかとなった。ADC値はTERT遺伝子のプロモータ領域の変異と相関しており、TERT変異例はより浸潤性が強く予後不良である一員と考えられた。

以上の結果を(Kamimura S, Sonoda Y. et al. Surg Neurol. Int.2024)。に発表した。

本研究の総括)

膠芽腫の再発は、ほとんどが造影領域周囲のFLAIR高信号領域からの再発であり、そこに浸潤し

た腫瘍細胞が放射線化学療法に抵抗性があることが原因と考えられる。今回の解析では、もともと TERT 遺伝子プロモータ変異型の腫瘍は FLAIR 高信号領域に腫瘍細胞が多く浸潤していることが明らかとなったが、腫瘍幹細胞がより多く浸潤していることは証明できなかった。化学放射線治療後に生存している細胞は腫瘍幹細胞が多い可能性は否定できないが、細胞の量としては微量であり、再発腫瘍として画像上認識される大きさになると幹細胞性が失われる可能性も示唆された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Kamimura S, Mitobe Y, Nakamura K, Matsuda K, Kanemura Y, Kanoto M, Futakuchi M, Sonoda Y.	4. 巻 15
2. 論文標題 Association of ADC of hyperintense lesions on FLAIR images with TERT promoter mutation status in glioblastoma IDH wild type	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Surg Neurol Int.	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.25259/SNI_63_2024.	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 MATSUDA Kenichiro, KOKUBO Yasuaki, KANEMURA Yonehiro, KANOTO Masafumi, SONODA Yukihiko	4. 巻 62
2. 論文標題 Preoperative Apparent Diffusion Coefficient of Peritumoral Lesion Associate with Recurrence in Patients with Glioblastoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neurologia medico-chirurgica	6. 最初と最後の頁 28 ~ 34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmc.oa.2021-0182	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 SANO Kenshi, MATSUDA Ken-ichiro, KAWANAMI Kanako, KANEMURA Yonehiro, OHE Rintaro, SONODA Yukihiko	4. 巻 8
2. 論文標題 Malignant Progression of an IDH Mutant Brainstem Glioma in Adult	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 NMC Case Report Journal	6. 最初と最後の頁 301 ~ 307
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.2176/nmccrj.cr.2020-0151	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 Kikuchi Z, Shibahara I, Yamaki T, Yoshioka E, Shofuda T, Ohe R, Matsuda KI, Saito R, Kanamori M, Kanemura Y, Kumabe T, Tominaga T, Sonoda Y.	4. 巻 2
2. 論文標題 TERT promoter mutation associated with multifocal phenotype and poor prognosis in patients with IDH wild-type glioblastoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Neurooncol Adv.	6. 最初と最後の頁 114
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/oaajnl/vdaa114.	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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yukihiko Sonoda
2. 発表標題 DNA methylation of the TERT promoter associated with overall survival in GBM patients without TERT promoter mutation
3. 学会等名 International conference of brain tumor reserach and therapy (招待講演)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 松田憲一朗 大江倫太郎 二口充 金村米博 園田順彦
2. 発表標題 膠芽腫のTERT変異によるFLAIR高信号域のADCと病理組織像との関連
3. 学会等名 第21回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 松田憲一朗 大江倫太郎 二口充 金村米博 園田順彦
2. 発表標題 膠芽腫のTERT変異によるFLAIR高信号域のADCと病理組織像との関連
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第80回学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 菊池善彰 柴原一陽 山木哲 吉岡絵麻 正札智子 大江倫太郎 松田憲一朗 齋藤竜太 金森政之 金村米博 隈部俊宏 富永悌二 園田順彦
2. 発表標題 膠芽腫におけるTERTp変異の臨床的意義
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 園田順彦
2. 発表標題 WHO2017以後の悪性神経膠腫患者の正確な診断と予後予測
3. 学会等名 第25回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池善彰 金村米博 山木哲 松田憲一朗 金森政之 大江倫太郎 富永悌二 園田順彦
2. 発表標題 TERTp野生型膠芽腫の臨床像
3. 学会等名 第38回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 菊池善彰 山木哲 柴原一陽 松田憲一朗 金村米博 大江倫太郎 金森政之 隈部俊宏 富永悌二 園田順彦
2. 発表標題 膠芽腫におけるTERTp変異の臨床的意義
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会 第79回学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 園田順彦
2. 発表標題 悪性脳腫瘍と手術療法のフォアフロント
3. 学会等名 日本脳神経外科学会総会 第82回学術集会（招待講演）
4. 発表年 2024年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 神経膠腫患者の予後の診断補助方法、及び、神経膠腫患者の予後診断キット	発明者 園田順彦	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2021-176623	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------