

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 4 月 24 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23791608

研究課題名（和文） 次世代シーケンサーによるグリオーマ LOH 領域の網羅的解析

研究課題名（英文） Comprehensive analysis of glioma LOH regions using next-generation sequencing

研究代表者

秦 暢宏（HATA NOBUHIRO）

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10596034

研究成果の概要（和文）：

摘出脳腫瘍標本における遺伝子変異解析：

九州大学脳神経外科手術症例のうち、神経膠腫 162 例に対して、capillary sequencer を用いて IDH1/2 変異解析および 1p,19q 10, 17p の LOH 解析を行い、臨床像や予後との関連を検討した。IDH1 に変異を認める primary glioblastoma は特異的な臨床像を呈することが判明し、また grade III の oligodendroglial tumor においては、IDH 変異と 1p/19q LOH の結果から臨床経過が明確に異なる 3 つのタイプに分類できることを示した。

次世代シーケンサーを用いた脳腫瘍幹細胞における網羅的遺伝子変異解析：

九州大学脳神経外科における摘出腫瘍から確立した、神経膠芽腫の腫瘍幹細胞株 4 例を対象に、TruSeq Amplicon Cancer Panel を用いてアンプリコン PCR を行い illumina miSeq にてシーケンスを実施し、CLC Genomics WorkBench を用いてマッピングおよび変異解析を行った。

研究成果の概要（英文）：

Mutation analyses on patient-derived glioma tissues: IDH1/2 mutations and LOH on 1p, 19q, 10, and 17p were analyzed on 162 patient-derived glioma tissues using conventional capillary sequencer. IDH1 mutant primary GBMs showed distinct clinical specificities. By IDH mutation and 1p/19q LOH analyses, grade III oligodendroglial tumors were divided 3 subtypes showing different clinical outcomes.

Comprehensive mutation analysis on glioma cancer stem cells using next-generation sequencer: Four patient-derived GBM sphere cultures were analyzed by amplicon PCR using a TruSeq Amplicon Cancer Panel, followed by next-generation sequencing using a Miseq instrument (Illumina). Bioinformatics analysis was performed using 'CLC Genomics Workbench' software.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医歯薬学

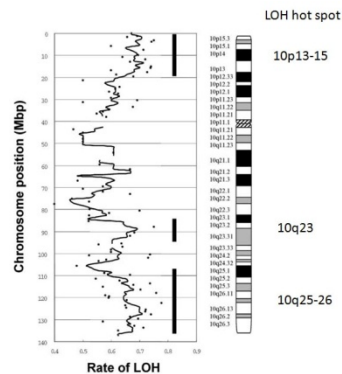
科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科学・脳腫瘍学【7304】

キーワード：脳腫瘍、神経膠腫、next-generation sequencing、LOH

1. 研究開始当初の背景

グリオーマでは、以前から LOH (loss of heterozygosity) と呼ばれる、染色体レベルの粗大な遺伝子欠失が高頻度で起こることが指摘されていたが、グリオーマの発生や悪性化に関わるメカニズム自体は未だに不明のままであった。申請者は以前、グリオーマの悪性化が進行するに従って、LOH 領域が拡大する傾向を指摘し、10p13-15 と 10q23 および 10q25-26 の

3カ所では、より高頻度で LOH が起きる (右図) ことから、各々の領域に別々の腫瘍抑制遺伝子が存在する可能性を示していた。



そのような解析の代表的アプローチとして、網羅的遺伝子解析があった。しかし、大規模研究によるグリオーマゲノムのマイクロアレイ解析結果が報告されていたため (TCGA nature 2008)、従来のマイクロアレイ等では解析できない遺伝子領域にも、解析範囲を広げる必要があった。

近年、ゲノム解析データの蓄積により、non-coding RNA と呼ばれる機能不明な RNA を発現する DNA 配列が、ゲノム上で新たに多数発見された。その中でも micro RNA (miRNA) は、様々な腫瘍で癌遺伝子や癌抑制遺伝子として作用していることが示され、注目されている。よって、今まではゲノム中に埋没していた miRNA がグリオーマに関与している事例が得られ、従来遺伝子以外の領域も含めて解析する必要があることが判明した。そのような膨大な遺伝子解析を効率的に行うために、近年開発され飛躍的な解析能の向上が得ら

れた次世代シーケンサーを活用する方針とした。

2. 研究の目的

グリオーマに対して、次世代シーケンサーによる網羅的解析を行い、分子標的療法のターゲットと成り得る遺伝子を探索する。

3. 研究の方法

摘出脳腫瘍標本における遺伝子変異解析：

九州大学脳神経外科手術症例のうち、神経膠腫 162 例 (primary GBM 59 例、secondary GBM 15 例、Anaplastic astrocytoma 18 例、Anaplastic oligodendroglioma 25 例、Anaplastic oligoastrocytoma 5 例、Diffuse astrocytoma 23 例、Oligodendroglioma 15 例、Oligoastrocytoma 2 例) に対して、capillary sequencer を用いて IDH1/2 変異解析を行い、臨床像や予後および 1p,19q 10, 17p の LOH 解析との関連を検討した。

次世代シーケンサーを用いた脳腫瘍幹細胞における網羅的遺伝子変異解析：

九州大学脳神経外科における摘出腫瘍から確立した、神経膠芽腫の腫瘍幹細胞株 4 例を対象に、TruSeq_Amplicon_Cancer_Panel を用いてアンプリコン PCR を行い illumina miSeq にてシーケンスを実施し、CLC Genomics WorkBench を用いてマッピングおよび変異解析を行った。

4. 研究成果

1) IDH mutant primary GBM の特異性

IDH 変異は、primary GBM においては 6 例に認められるのみであったが、その他の組織型では secondary GBM を含めて、60-90%と高率に認めた。IDH 変異を認めた Primary GBM の臨

床像を検討したところ、4例は臨床経過が長いことや、画像上で異なる増強効果を呈する病変が複数存在することといった特徴があり、悪性転化した際に初発として発見された secondary GBM であると考えられた。残りの2例は若い成人の発症、増強効果が乏しい、前頭葉深部に発生するといった共通点があり、これらが真の IDH mutant primary GBM の特徴であることが示唆された。今後、このような症例を更に蓄積して、網羅的な遺伝子変異解析や遺伝子発現解析などを追加して、詳細に検討する方針である。

2) IDH1/2 mutation 解析による、grade III oligodendroglial tumor の分類

Grade III の oligodendroglial tumor での解析結果から、①IDH 遺伝子変異なし ②IDH 変異のみ ③IDH 変異と 1p/19q LOH を合併するもの の3タイプに分類可能であることがわかった。この3タイプで生存曲線を作成したところ、①→②→③の順に予後が不良であることが判明し、その生存期間には有意差を認めた。(全生存期間中央値 ①: 13.2 カ月、②50.3 カ月、③85.5 カ月) 今後、これらの症例を対象として、網羅的な遺伝子変異解析や遺伝子発現解析などを追加して、詳細に検討する方針である。

3) 次世代シーケンサーを用いた脳腫瘍幹細胞における網羅的遺伝子変異解析

今回の4株においては、新規の遺伝子変異を検出することはできなかった。現在、200例を超える症例のDNAを抽出し、それらのうち100例以上において、RNAも抽出しているため、これらの検体を用いて、今後さらに次世代シーケンサーによる網羅的解析を進める方針である。

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6件)

1. Mizoguchi M, Hata N, Suzuki SO, et. al. (他7名) Pediatric glioblastoma with oligodendrogloma component: Aggressive clinical phenotype with distinct molecular characteristics. *Neuropathology*. 2013 (in press) (査読有り)
2. Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, et. al. (他3名) Clinical implications of microRNAs in human glioblastoma. *Front Oncol*. 2013 (in press) (査読有り)
3. Yoshimoto K, Mizoguchi M, Hata N, et. al. (他3名) Molecular biomarkers of glioblastoma: current targets and clinical implications *Current Biomarker Findings*. 2: 63-76. 2012 (査読有り)
4. Mizoguchi M, Guan Y, Yoshimoto K, Hata N, et. al. (他3名) MicroRNAs in Human Malignant Gliomas. *J Oncol*. 2012 (in press) (査読有り)
5. Ma X, Yoshimoto K, Guan Y, Hata N, Mizoguchi M, et. al. (他6名) Associations between microRNA expression and mesenchymal marker gene expression in glioblastoma. *Neuro Oncol*. 14(9):1153-1162. 2012 (査読有り)
6. Mizoguchi M, Yoshimoto K, Ma X, Guan Y, Hata N, et. al. (他5名) Molecular characteristics of glioblastoma with 1p/19q co-deletion. *Brain Tumor Pathol*. 29(3):148-153. 2012 (査読有り)

〔学会発表〕（計 5 件）

1:HRM 法による IDH1 mutation 解析 第 30 回
日本脳腫瘍病理学会 2012 年 05 月 25 日 名
古屋国際会議場（名古屋）

2: テモダール時代において、PAV 療法は
Oligodendroglial tumor に対する有用な選択
肢となり得るか？日本脳神経外科学会第 71
回学術総会 2012 年 10 月 17 日大阪国際会議
場（大阪）

3: IDH1 /2 変異解析簡便化の試み 第 30 回日
本脳腫瘍学会学術集会 2012 年 11 月 26 日グ
ランドプリンスホテル広島（広島）

4: Long-term outcome of patients with
oligodendroglial tumors treated up-front
with PAV therapy Joint Neurosurgical
Convention 2013 2013 年 01 月 29 日～2013
年 02 月 03 日 Hawaii Waikoloa Village
(Hawaii)

5: 高齢者に対するテモダール放射線同期療
法の治療成績第 26 回日本老年脳神経外科学
会 2013 年 03 月 01 日 東京ステーションコン
ファレンス（東京）

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者 秦 暢宏

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10596034