

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462283

研究課題名 (和文) 次世代シーケンスによる膠芽腫の遺伝子変異スクリーニングと予後因子の特定

研究課題名 (英文) Identification of novel prognostic markers for glioblastomas by means of next-generation sequencing-based targeted resequencing

研究代表者

市村 幸一 (ICHIMURA, Koichi)

国立研究開発法人国立がん研究センター・その他部局等・分野長

研究者番号：40231146

交付決定額 (研究期間全体) : (直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要 (和文) : 膠芽腫は最も頻度が高く予後不良の悪性脳腫瘍である。本研究では膠芽腫の予後予測因子を探索する目的でIDH変異、TERT変異、1p/19q codeletion、MGMTメチル化などの分子マーカーを検査するアッセイを確立した。それらを用いて多施設共同研究で集めた453例の膠芽腫を含む951例のグリオーマを調べた結果、IDH変異とTERT変異の組み合わせによる分子分類が予後と高い相関を示すことを発見した。また膠芽腫においてTERT変異とMGMTメチル化の組み合わせにより予後予測が可能であることを示した。さらに93の遺伝子の点突然変異を調べるパネルを作成し、膠芽腫における新たな分子マーカーを探索した。

研究成果の概要 (英文) : Glioblastomas are the most common and malignant brain tumors. For molecular classification of gliomas, we established a series of robust assays to screen IDH mutations, TERT promoter mutations, 1p/19q codeletion and MGMT methylation. Using these assays, a total of 951 adult gliomas including 453 glioblastomas collected through a multi-center collaboration were studied. We found that a molecular classification by a combination of IDH mutation and TERT mutation was strongly associated with prognosis of the glioma patients. In addition, we found that a significant interaction between TERT mutation and MGMT methylation was associated with prognosis of glioblastomas and that the combination of these alterations could serve as a useful prognostic marker. We have also established a Glioma Mutation Screening Panel for 93 genes known to be frequently mutated in gliomas. Using this panel, we are screening glioblastomas for mutations to identify a novel prognostic marker(s).

研究分野：神経腫瘍学

キーワード：脳腫瘍 遺伝子変異 次世代シーケンス 膠芽腫 分子分類 TERT

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠芽腫は最も頻度が高く予後不良の悪性脳腫瘍である。本研究が開始された段階では、膠芽腫のゲノム解析は当研究室を含めて各国で精力的に進められており、様々な遺伝子異常が膠芽腫で高頻度に変異が見られることが明らかになってきていた。TCGAは2008年に91例の膠芽腫における標的シーケンスの結果の中間報告を行い、RTK, PI3K, RB1, p53 経路などの変異が高頻度に見られることを確認したが、従来の報告に新しい知見を加えるには至っておらず、各遺伝子・染色体異常の予後・治療効果予知因子としての意義は不明のままであった。特に当研究室で発見された、単独遺伝子の変異としては膠芽腫で最も多い TERT promoter 領域の変異も当時は知られていなかった。

(2) 膠芽腫の予後予測因子としては MGMT のメチル化がよく知られているが、IDH 変異を有する他の神経膠腫では G-CIMP により MGMT メチル化がもたらされるのに対し、膠芽腫における MGMT メチル化の機序は不明であり、他の遺伝子変異との関連も明らかにされていなかった。

(3) 研究開始後に WHO 脳腫瘍分類の改訂作業が開始され、IDH1/2 変異および 1p/19q codeletion を中心とした分子分類が診断名に取り入れられることが確実にされた。これを踏まえ、これらの変異と予後との関連を明らかにすることが重要な課題となった。

2. 研究の目的

(1) 本研究では膠芽腫の予後因子または治療反応予知因子としての分子マーカーの特定を目的とする。このためにまず IDH1/2 変異など既知の分子マーカーに対し、変異検出の pyrosequencing アッセイなどを開発する。最終的には臨床検査として応用可能な変異検出のアッセイを確立することを目指す。

(2) 上記の変異検出アッセイと、マイクロアレイなどを使ったコピー数解析(アレイ CGH)や MGMT メチル化アッセイなどを行って、遺伝子変異・コピー数異常を臨床情報と比較することにより予後・予知因子を特定する。これらの方法を用いて、膠芽腫を含む多数のグリオーマ検体を収集し、分子分類と予後との関係を明らかにする。

(2) 次世代シーケンス法を使って遺伝子の変異をスクリーニングする新たなシステム(Glioma Mutation Screening Panel, GMSP)を構築し、標準治療(放射線+テモゾロミド)を受けた臨床的に均一な膠芽腫を含むグリオーマに対し、高頻度に見られることが知られている遺伝子変異を効率的に標的シーケンスし、新たな分子マーカーを探索する。

3. 研究の方法

(1) 統計解析の精度を高めるため症例数を当初の計画より大幅に増やすこととし、国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科をはじめとした17施設から多数の成人神経膠腫を集めた。

(2) IDH1/IDH2 の点突然変異を効率よく検出するために pyrosequencing を用いた高感度のアッセイを開発した。変異型と野生型のシーケンスを様々な割合で混合した濃度勾配を作成し、腫瘍細胞含有率の低い組織における測定感度を検討し、Sanger sequencing と比較した。

(3) 上記のアッセイを用いて IDH1/2 変異を多数のグリオーマ検体においてスクリーニングを行った。TERT promoter 変異は Sanger sequencing または pyrosequencing を用いて、1p/19q の codeletion は MLPA またはアレイ CGH を用いて、MGMT のメチル化は当研究室で開発された pyrosequencing assay を用いて調べた。

(4) GMSP については、グリオーマ及びグリオーマの鑑別の対象となる様々な悪性脳腫瘍で変異が知られている93の遺伝子を選択し、Ion AmpliSeq Designer の White Glove pipeline を用いて5442のampliconからなる Ion Torrent 解析用の遺伝子変異パネルを構築した。発見された遺伝子変異の一部は Sanger sequencing により確認し、変異パネルの制度を検討した。

4. 研究成果

(1) Pyrosequencing を用いた IDH1/2 変異の検出法を開発した。本アッセイは従来の検査法に比べ、より高い特異性と感度をもって IDH1 と IDH2 のすべての変異を検出できることが確認された。変異型と野生型の濃度勾配を使った検討においては、Sanger sequencing では変異の検出感度は20%だが、本アッセイにより5%の感度で IDH1/2 変異が検出できることを示した。本成果は論文発表された(発表論文①)。

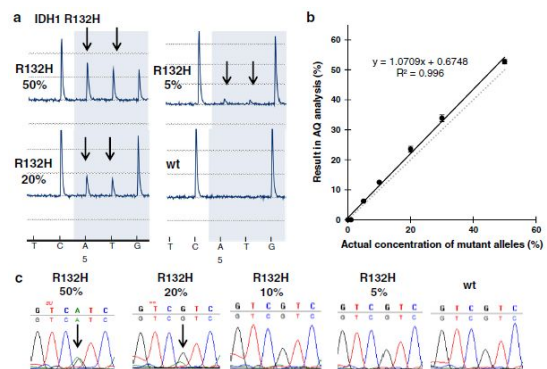


図1. Pyrosequencing と Sanger sequencing による IDH1 変異の検出感度の比較(Arita, Brain Tumor Pathology 2015 より引用)

(2) 14施設から758例のグリオーマを集め、IDH1/2 変異、TERT 変異、1p/19q codeletion、MGMT メチル化を調べた。その結果成人グリオーマは IDH1/2 変異と TERT 変異の有無により予後の異なる4群に分子分類されることが分かった。このうち IDH 変異(+)/TERT 変異(+)(Group A、生存中央値113か月)のほぼす

べてが 1p/19q codeletion を持ち、新 WHO 分類の oligodendroglioma に相当し、最も予後良好だった。IDH 変異 (+)/TERT 変異 (-) (Group B、66 か月) は astrocytoma に相当した。膠芽腫の大多数が IDH 変異 (-)/TERT 変異 (-) (Group C、12 か月) または IDH 変異 (-)/TERT 変異 (+) (Group D、8 か月) に分類され、Group D が最も予後不良であった。さらに膠芽腫は MGMT メチル化の有無により予後の異なるサブグループに分けられた。すなわち MGMT メチル化 (+)/TERT 変異 (+) が最も予後良好であったのに対し、MGMT メチル化 (-)/TERT 変異 (+) は最も予後不良で、膠芽腫においては TERT 変異は MGMT メチル化との関連において重要な予後因子となることを明らかにした。さらに標準治療を受けた初発膠芽腫 193 例を集め、合わせて 453 例の膠芽腫において本所見を確認した。本研究については現在論文を投稿中である。

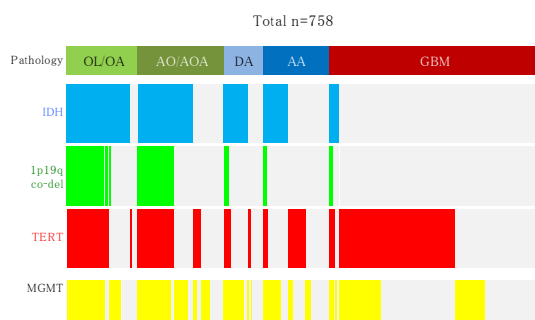


図 2. 758 例のグリオーマを組織型に従って分類し、IDH1/2 変異、TERT 変異、1p/19q codeletion 及び MGMT メチル化の状態を示す。

(3) また Group C の膠芽腫については診断および予後予測因子マーカーを同定するため、GMSP を用いて遺伝子変異スクリーニングを開始した。結果は現在解析中であるが、BRAF 変異、H3F3A K27M または G34R の変異などが比較的高頻度に認められており、Sanger sequencing との整合性も確認された。これらの変異を持つ膠芽腫は典型的な膠芽腫とは異なる生物学的特性を持つことが示唆されており、GMSP により変異を同定することは有意義であると考えられた。

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 1 件)

- ① Arita H, Narita Y, Matsushita Y, Fukushima S, Yoshida A, Takami H, Miyakita Y, Ohno M, Shibui S, Ichimura K. "Development of a robust and sensitive pyrosequencing assay for the detection of IDH1/2 mutations in gliomas." 査読有、Brain Tumor Pathol 32:22-30, 2015、doi:

10.1007/s10014-014-0186-0

〔学会発表〕(計 7 件)

- ① 市村幸一、「グリオーマにおける IDH 変異の意義」シンポジウム、第 74 回日本癌学会学術総会、名古屋国際会議場、名古屋、2015 年 10 月 10 日
- ② 有田英之、市村幸一、他 13 名「成人神経膠腫の分子分類と病理診断、予後との関係～国内大規模多施設共同研究の報告」シンポジウム、第 33 回日本脳腫瘍病理学会 JR ホテルクレメント高松、高松、2015 年 5 月 30 日
- ③ Arita H, Ichimura K, et al (他 18 名). "Molecular classification based on IDH1/2 and TERT promoter well-defines subgroups with different outcome in adult diffuse gliomas: A report from Glioma Molecular Classification Consortium." Symposium, 20th Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology, San Antonio, Texas, USA, November 22, 2015.
- ④ 有田英之、市村幸一、他 41 名「IDH と TERT による成人神経膠腫の分子分類～国内多施設大規模コホートの解析からの追跡報告」第 33 回日本脳腫瘍学会学術集会 口演、グランドプリンスホテル京都、京都、2015 年 12 月 7 日
- ⑤ 有田英之、市村幸一、他 11 名「悪性神経膠腫における TERT プロモーター変異の予後マーカーとしての意義」口演、第 15 回日本分子脳神経外科学会、大手門パルズ、東京、2014 年 9 月 25 日
- ⑥ 有田英之、市村幸一、他 3 名「TERT と IDH 遺伝子変異に基づく成人悪性神経膠腫の分子分類」口演、第 32 回日本脳腫瘍学会学術集会 シェラトン・グランデ・トーキョーベイホテル、2014 年 11 月 30 日
- ⑦ 有田英之、市村幸一、他 28 名「悪性神経膠腫における TERT プロモーター変異と分子分類」口演、日本脳神経外科学会第 73 回学術総会、グランドプリンスホテル新高輪、東京、2013 年 10 月 11 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

http://www.ncc.go.jp/jp/nccri/divisions/brain_tumor/index.html

6. 研究組織

(1) 研究代表者

市村 幸一 (ICHIMURA, Koichi)

国立がん研究センター・脳腫瘍連携研究分野・分野長

研究者番号：40231146

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

牛島 俊和 (USHIJIMA, Toshikazu)

国立がん研究センター・エピゲノム解析分野・分野長

研究者番号：90232818

成田 義孝 (NARITA, Yoshitaka)

国立がん研究センター・脳脊髄腫瘍科・科長

研究者番号：40392344