

機関番号：32653

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21791379

研究課題名 (和文) 小児脳腫瘍に対する、遺伝学・新悪性度分類の構築

研究課題名 (英文) Organization of genetics, the new grade for the pediatric brain tumor

研究代表者

藍原 康雄 (AIHARA YASUO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50287372

研究成果の概要 (和文)：本研究では本邦における小児脳腫瘍症例の腫瘍組織を用いて、予後に相関すると考えられている遺伝子の発現レベルを検討し、臨床像や治療効果と比較対照することにより、初発時から再発等に対するリスク分類を行い、より適切な集学的治療法を確立させることを目的とする。さらに、患者の薬剤代謝関連遺伝子の SNP 解析を行い、現在化学療法で用いられている抗腫瘍薬の効果や副作用発症頻度を予測するオーダーメイド医療の基礎データを収集することを第二の目的とする。

研究成果の概要 (英文)： We analyzed the oncocyte (27 cases in total) which we delivered from 8 onset medulloblastoma dissemination cases, glioma 5 case, ependymoma 14 case this time. The gene expression levels were different in each malignant tumor. SUFU, ERBB2, PCNA developed the disseminated meningioma as compared with a on-disseminated medulloblastoma high. The results were similar for the onset clinical manifestations. It developed high, and PDGFRa and G-CSFR resembled a gliomatous gene expression pattern in the gene expression pattern of the ependymoma in all gliomas case and showed the tendency that was different from the expression patterns of the medulloblastoma.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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

キーワード: (1) 悪性脳腫瘍 (2) 小児 (3) 予後 (4) 悪性度分類 (5) 遺伝子検査
(6) 化学療法 (7) 放射線療法 (8) 播種

1. 研究開始当初の背景

小児期悪性腫瘍のなかで脳腫瘍は白血病に次いで二番目に発症率が高い疾患であり、死亡率は第1位を占めている。最近欧米では、脳腫瘍の予後を規定する因子に関して、DNAマイクロアレイ等の技術を用いた研究が進展し、播種・転移など予後に相関するいくつかの遺伝子が明らかになったが、我が国の症例に関しては未だ解析がなされていない。小児髄芽腫は造血細胞移植による大量化学療法を含めた集学的な治療の導入により、播種・転移・再発などにより予後不良と考えられていた患児でも救命できる症例が出ているが、再発例も多く、また、白血病のようにリスク分類されていないため、施設により異なった治療方針が採られていると考えられる。本研究では本邦における小児脳腫瘍症例の腫瘍組織を用いて、予後に相関すると考えられている遺伝子の発現レベルを検討し、臨床像や治療効果と比較対照することにより、初発時から再発等に対するリスク分類を行い、より適切な集学的治療法を確立させることを目的とする。さらに、患者の薬剤代謝関連遺伝子のSNP解析を行い、現在化学療法で用いられている抗腫瘍薬の効果や副作用発症頻度を予測するオーダーメイド医療の基礎データを収集することを第二の目的とする。

2. 研究の目的

髄芽腫の発症や予後に関係する遺伝子異常には腫瘍細胞における3つのシグナル伝達経路が知られている。発症に関係する遺伝子異常として Wnt pathway、Sonic Hedgehog (SHH) pathway、播種・転移に関係

するものとして、ErbB2、PDGFRなどを介したRAS/MAPK pathwayがあり、それぞれの系統に属する遺伝子の異常が髄芽腫の発症や転移に深く関係していると考えられている。我が国の小児脳腫瘍患者を対象として、これらの予後に関係する遺伝子を網羅的に分析し、臨床データと細かく比較している研究報告は未だ存在しない。また、臨床的には転移・播種に関しては1969年に発表されたChangの分類が使用されているが、腫瘍組織の生物学的悪性度は含まれておらず、特に初発時に播種・転移の像がなく低リスク群に診断されても、早期に播種・再発が認められる例があることから、白血病や神経芽細胞腫のような疾患と同様な腫瘍細胞の生物学的な特徴に基づいた新たなリスク分類が必要と考えられる。治療効果や再発リスクに関して、より精度の高い予測が実現すれば、予後に応じた集学的加療を行うことが可能になると考えられる。我々は既に日本人小児脳腫瘍症例の腫瘍組織を用いて、予後不良因子の遺伝子発現レベルをrealtimePCR法により検討し、初発時より播種・転移像が認められた例ではPDGFRAやErbB2などの発現増強の可能性が高いことを確認しつつある。今後、東京女子医科大学病院脳神経外科センターでの膨大な小児脳腫瘍症例から、多数の小児悪性脳腫瘍症例を対象とした検討でデータを収集することが臨床像と相関の強い遺伝子の同定に必要と考えられる。

髄芽腫の播種・転移に関してはTobeyら(文献10)報告よりPDGFR、SPARC、PCNAなどの遺伝子発現が重要と考えられるようになったが、我々はその遺伝子発現を定量PCR法により検討し、より正確な発現比較を検討

している。また、初診時の髄芽腫の播種像は一様ではなく、症例により小脳や脊髄に腫瘍性に散在するものや、Gd 造影 MRI で髄膜全体に薄く見られるものなどがある。播種の仕方と遺伝子発現とは密接に関係していると考えられるが、それらを検討した報告はない。発症に関係する Wnt、SHH pathway に関しては多くの報告があるが、同様に臨床データと細かく比較した予後比較の報告は認められない。さらに、我々は髄芽腫の予後不良因子として知られている ErbB2、p53、c-myc、予後良好因子として知られている TrkC、アポトーシスに関係するとされる G-CSFR 遺伝子発現を定量し、初発時の腫瘍進展形式や抗腫瘍薬による治療効果と比較する。これらのことにより、現在、大まかに決められている大量化学療法の適応や放射線照射量の決定などに応用し、より確実な髄芽腫等の小児悪性脳腫瘍に対する集学的治療の基本データとなると考えられる。H16 年より研究者本人は、種々の Housekeeping gene の経時的動態を認識することにより、複雑な病態生理をシンプルな切り口によって、分子レベルで血管平滑筋細胞の持続的攣縮への関与の一端を明らかにすることに努めてきた。これにより Housekeeping gene もまた、常に完全なコントロールターゲットではないということを系統だって証明することとなり、あらゆる病態解明のためにはどの種の Housekeeping gene が最も最適かを突き止めることに成功した。今回新たなステップとして、小児悪性脳腫瘍の悪性度分類のための分子レベルでの原因遺伝子解析を、これまでの自己データを基盤に推進する。現時点では、小児悪性脳腫瘍に関しては、機能レベルの点ばかりでなく薬剤的効果についても明らかでない部分が多い。最終的目標は、今回の臨床研究結果を用いて、分子標的薬の応用も含めて小児悪

性脳腫瘍の治療に、新たな一石を投じることにある。

3. 研究の方法

(1) ; 腫瘍組織より RNA の抽出と定量 PCR 反応

①House keeping gene mRNA の定量 :

小児悪性脳腫瘍 {髄芽腫、原始神経外胚性腫瘍 (PNET) など} の摘出術時に得られた脳腫瘍組織 (100~500mg) より Qiagen 社製、RNA 抽出キット (RNeasy) を用いて総 RNA を抽出し、得られた総 RNA より 1 μ g を用い cDNA を合成し、Stratagene 社製のサーマルサイクラー (Mx3000P) を用いて RNA を定量する。尚、コントロールとして BD バイオサイエンス社の小脳組織より得られた RNA を用いる。各遺伝子の発現量は、選出された最適な House keeping gene 遺伝子発現量と比較し、適宜、補正する。プライマーとして用いる遺伝子は TrkC、p53、c-myc、ErbB2、 β -catenin、Sufu、PDGFR、PCNA、SPARC、G-CSFR 等である。東京女子医科大学脳神経外科では年間約 100 症例を超える小児悪性脳腫瘍の手術件数があり、内 10 症例前後の悪性脳腫瘍患児に対して、術後後療法として造血幹細胞移植などの強力な化学療法を含めた集学的治療を行っている現状がある。

(2) 髄芽腫、悪性神経膠腫、悪性上衣腫、悪性奇形腫、悪性胚細胞腫の mRNA の定量 :

①臨床データとの比較

初発時の造影 MRI 像や臨床症状を播種の有無、転移性腫瘍形成に有無などにより細かく分類し、各因子の発現と比較する。各因子と密接に関係がある症状を検討する。治療成績・予後などと比較検討し治療法やその成績と関係する因子を検討し、リスク分類を行う。上記の文献の内容と定量 PCR で得られた結果を比較検討し、総合的な予後因子を予想する。

② 髄芽腫以外の上記小児悪性脳腫瘍

各々特異な組織分布を示し、特に脳内分布でも特徴が見られ機能的にも多様性を有している。しかし、病理組織学的診断が同じであっても、再発率や予後が異なることは珍しくなく、その原因遺伝子の各々が独自の働きをしていることがこれまで示唆されている。もはや形態学である組織病理診断のみでの悪性度分類、それに伴う予後規定には限界の印象が強く、研究者本人がこれまで既に研究実績を残している研究手法を用いて、原因遺伝子の発現量を RT-PCR にて定量し、Western blotting 法により蛋白レベルでの変化の裏づけを施行、既存の他疾患に応用されている、候補分子標的薬効果の検討までを目標とする。

4. 研究成果

今回は、初発髄芽腫播種 8 症例、神経膠腫 5 症例、上衣腫 14 症例から摘出した、腫瘍細胞（計 27 症例）の解析をおこなった。各悪性腫瘍において遺伝子発現量は異なった。播種性髄膜腫は非播種性髄芽腫に比較して SUFU, ERBB2, PCNA が高発現していた。その結果は、初発臨床症状的には類似していた。全ての神経膠腫症例において PDGFR α と G-CSFR は高発現していた。上衣腫の遺伝子発現パターンは神経膠腫の遺伝子発現パターンに類似しており、髄芽腫の発現パターンとは異なる傾向を認めた。

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 24 件）全論文査読あり

- ① Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Kiyotani C, Maebayashi K, Sakauchi M, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y.: High-dose

chemotherapy followed by autologous and allogeneic peripheral blood stem cell transplantation for recurrent disseminated trilateral retinoblastoma. **Childs Nerv Syst.** 2011 Jun; 27(6): 1019-24. Epub 2011 Mar 19.

- ② Tsuruta T, Aihara Y, Kanno H, Funase M, Murayama T, Osawa M, Fujii H, Kubo O, Okada Y.: Shared molecular targets in pediatric gliomas and ependymomas. **Pediatr Blood Cancer.** 2011 Feb 4. doi: 10.1002/pbc.23009. [Epub ahead of print]
- ③ Aihara Y, Kawamata T, Mitsuyama T, Hori T, Okada Y.: Novel method for controlling cerebrospinal fluid flow and intracranial pressure by use of a tandem shunt valve system. **Pediatr Neurosurg.** 2010; 46(1): 12-8. Epub 2010 May 5.
- ④ Kawamata T, Hori T, Amano K, Aihara Y, Kubo O, Okada Y.: [Clinical standard of neurosurgical disorder (15) parasellar tumor including craniopharyngioma]. **No Shinkei Geka.** 2010 Feb; 38(2): 185-93. Review. Japanese. No abstract available.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藍原康雄 (AIHARA YASUO)

東京女子医科大学・医学部・助教

研究者番号：50287372