

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K15529

研究課題名(和文)Liquid Biopsyによるグリオーマの時間的・空間的多様性の解明

研究課題名(英文)Elucidation of temporo-spatial heterogeneity of glioma by Liquid Biopsy

研究代表者

溝口 昌弘(MIZOGUCHI, Masahiro)

九州大学・医学研究院・共同研究員

研究者番号：50380621

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ症例を対象に、血液・髄液中cell free DNA(cfDNA)、microRNA(miRNA)解析によるLiquid Biopsyに着手した。第一に血中miRNAの網羅的発現解析によりグリオーマ症例において多くのmiRNA発現が上昇していることが明らかとなり、髄液中でも解析可能な特異的miRNAを同定した。第二にcfDNA解析に着手した。まず、TaqMan法を用いたIDH1の変異解析を行ったが、cfDNAは微量であり正確な評価は困難で大半が解析不能であった。次にdigital PCRを導入し、髄液中cfDNAの解析によりIDH1遺伝子の変異解析が可能であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We started Liquid Biopsy by circulating cell free DNA (cfDNA) and microRNA (miRNA) analysis in body fluids for glioma cases. Firstly, global expression analysis of blood miRNA revealed that expression of many miRNA is elevated in glioma cases, and some specific miRNAs could be analyzed also in cerebrospinal fluid. Secondly, cfDNA analysis was undertaken. First, mutation analysis of IDH1 was carried out using the TaqMan method, but due to the small amount of cfDNA, it was difficult to accurately evaluate the mutation, and most of the cases were not analyzable. Next, we introduced digital PCR, and it was clarified that mutation analysis of IDH1 gene is possible by analysis of cfDNA in cerebrospinal fluid.

研究分野：neurooncology

キーワード：glioma liquid biopsy cell free DNA microRNA digital PCR

### 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、がんゲノム研究は世界的大規模ゲノムプロジェクトにより、がんにおけるゲノム異常の全体像が明らかとなりつつある時代を迎えていた。その結果を受け、脳腫瘍（グリオーマ）においても遺伝子異常にもとづく診断、治療法が考慮されるべき時代となった。我々は 1990 年代よりグリオーマにおける遺伝子解析に着手し、個別化治療確立を目指し、早期より脳腫瘍幹細胞、microRNA (miRNA)、エクソソームに注目し研究を継続していた。当時遺伝子異常に基づく治療戦略構築における最大の障壁が腫瘍における多様性/不均一性(heterogeneity)であり、空間的多様性、時間的多様性の同定、解明の重要性が認識されつつあった。

体液中循環 cell-freeDNA(cfDNA)、miRNA は、活動性を持つ腫瘍細胞が分泌するもの、腫瘍の壊死、アポトーシスに伴い放出されるものが網羅的に含まれている可能性があり、腫瘍全体の腫瘍活動性、治療反応性のモニタリングも理論上可能となる。

非侵襲的なモニタが確立できれば臨床上的有用性は非常に高く、最適な治療戦略構築に繋がると確信していた。当時は遺伝子解析技術の飛躍的進歩に伴い微量核酸の解析が可能となり体液中の核酸(cfDNA、miRNA など)の解析による Liquid Biopsy の実用化が期待されていた。

### 2. 研究の目的

本研究は当教室における豊富な臨床症例を対象に体液中の cfDNA、miRNA 解析による Liquid Biopsy を確立することを目的とした。新たな視点からのグリオーマの時間的・空間的多様性獲得の機序解明、さらには臨床上有用な新規バイオマーカー、治療標的同定に繋がる解析法を確立することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1)実践的遺伝子解析法の確立：従来の LOH 解析に加え、重要なドライバー遺伝子として同定された IDH1/2、BRAF、H3F3A 遺伝子変異を同定する臨床上有用な high resolution melting (HRM)法を導入し、臨床上有用な解析法を確立し、解析標本の遺伝子背景を明らかにした。

(2)血中 miRNA 発現解析：分子病理学的背景を明確にし、同症例より血液、髄液サンプルを採取し、エクソソーム分画より分泌型 microRNA を抽出した。東レ 3D-Gene miRNA Olig chip を用いた microRNA の網羅的発現解析を行った。

(3)血中 cfDNA の抽出、解析：血漿、血清を用い、2つの抽出キット(Qiagen 社、Promega 社)を使用し、比較する。

(4)TaqMan 法を用いた cfDNA 解析：IDH1 に対

し変異特異的 TaqMan プローブを作成し cfDNA 解析をおこなった。

(5)Digital PCR 法を用いた cfDNA 解析：QuantoStudio 3D digital PCR system を用いて血液、髄液中 cfDNA に対する IDH1 遺伝子変異解析を行った。

### 4. 研究成果

(1)実践的遺伝子解析法の確立：九州大学および関連施設において手術が施行されたグリオーマ症例 64 例に対し、従来の 1p, 19q, 10p, 10q に対する LOH 解析に加え、HRM 法による IDH1/2、BRAF(V600E)、H3F3A 変異の解析を施行した。Direct sequencing との比較により HRM 法が同等の精度を有し、かつ簡便な臨床上有用な方法であることを確定した。2016 年改訂 WHO 分類に導入された分子診断に基づく、九州大学独自の分子病理学的診断セットを確立した。

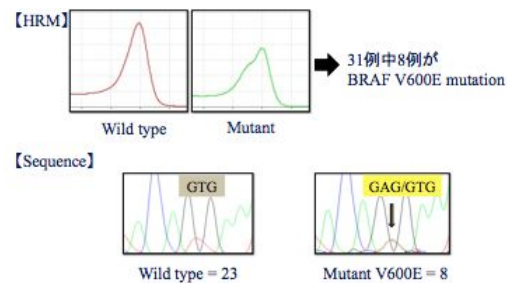


図 1: BRAF V600E 変異に関する direct sequencing と HRM 法の比較

(2)血中 microRNA 発現解析：分子病理学背景を加味し、5 例の血液と 3 例の髄液よりエクソソームを分離し、分泌型 microRNA を抽出し、東レ 3D-Gene miRNA Olig chip を用いた網羅的発現解析を行った。グリオーマ症例では、正常例と比較し、多数の microRNA で発現が上昇しており、髄液中でもその上昇を同定できる microRNA(miR-4530, -4294, -4534)を同定した。

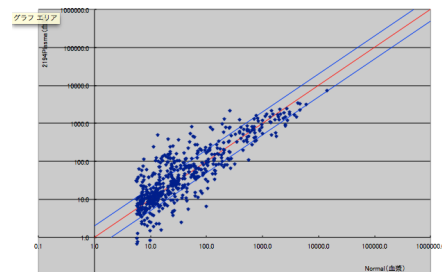


図 2: 血液中 microRNA 網羅的発現解析 (GBM 症例 vs 正常)

(3)血中 cfDNA の抽出、解析：血漿、血清に対し、2つの抽出キット(Qiagen 社、Promega 社)を用いて抽出した。同等の cfDNA が抽出できることが明らかとなり、Promega 社の The

Maxwell RSC ccfDNA Plasma Kit がより高度な濃縮が可能であった。また、血漿がより純度が高い DNA の抽出が可能であった。しかし、いずれの方法でも血液から得られる cfDNA は微量であり、通常の PCR 法による解析は不可能であった。

(4) TaqMan 法を用いた cfDNA 解析：第一に TaqMan Mutation Detection Assay を用いた IDH1 変異検出を試みた。R132H に hybridize する probe : IDH1\_28746\_mu (Cat.#4465804) と IDH1 wild type のに hybridize する probe : IDH1\_rf (Cat.#4465807) を用いたそれぞれの real time PCR を行い、Ct 値の差  $Ct = Ct(\text{mutant allele assay}) - Ct(\text{gene reference assay})$  をもって変異同定を行った。9 例のグリオーマ症例において 2 例で IDH1 の変異の有無を同定することができたが、微量 cfDNA における TaqMan 法の限界も明らかとなった。

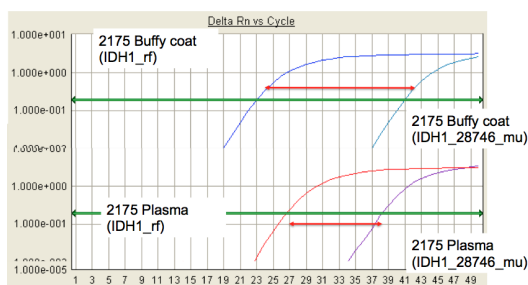


図 3: IDH1 変異症例に血中 cfDNA の TaqMan 法による変異同定

(5) Digital PCR 法を用いた cfDNA 解析: IDH1 R132H 変異陽性の退形成性乏突起膠腫 2 例 (#2185, #2209)、IDH 野生型の膠芽腫 2 例 (#2190, #2270) を対象として、血液サンプル、髄液サンプルを対象に digital PCR を用いた IDH1 変異検出法の確立を図った。血漿および髄液から QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit (Qiagen 社) を用いて cfDNA を抽出し、Quantostudio 3D digital PCR system にて IDH1 変異の解析を行ったところ、髄液サンプルではいずれも IDH1 変異の検出が可能であった(図 4 の青色のドットのクラスター)。

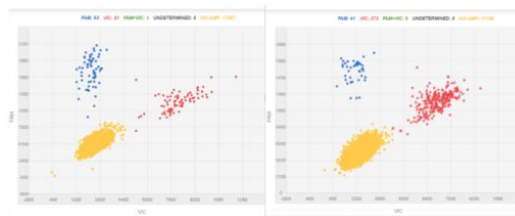


図 4: IDH1 R132H 変異症例(#2185, #2209) : digital PCR による血漿 cfDNA の IDH1 変異同定

IDH1 野生型では、血漿、髄液サンプルの解析ではいずれも変異型のクラスターは認めず、本解析の高い特異度が明らかとなった。しかし、IDH1 変異症例の血漿 cfDNA の解析では、現段階では変異クラスターを同定できていない。

#### 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 7 件)

Hata N, Hatae R, Yoshimoto K, Murata H, Kuga D, Akagi Y, Sangatsuda Y, Suzuki SO, Iwaki T, Mizoguchi M, Iihara K.

Insular primary glioblastomas with IDH mutations: Clinical and biological specificities. *Neuropathology*. 査読有 2017 Jun;37(3):200-206. DOI: 10.1111/neup.12362.

Hatae R, Hata N, Suzuki SO, Yoshimoto K, Kuga D, Murata H, Akagi Y, Sangatsuda Y, Iwaki T, Mizoguchi M, Iihara K. A comprehensive analysis identifies BRAF hotspot mutations associated with gliomas with peculiar epithelial morphology. *Neuropathology*. 査読有 2017 Jun 37(3):191-199. DOI: 10.1111/neup.12347

Yoshimoto K, Hatae R, Sangatsuda Y, Suzuki SO, Hata N, Akagi Y, Kuga D, Hideki M, Yamashita K, Togao O, Hiwatashi A, Iwaki T, Mizoguchi M, Iihara K. Prevalence and clinicopathological features of H3.3 G34-mutant high-grade

gliomas: a retrospective study of 411 consecutive glioma cases in a single institution. Brain Tumor Pathol. 査読有 2017 Apr; DOI:10.1007/s10014-017-0287-7.

Hata N, Yoshimoto K, Hatae R, Kuga D, Akagi Y, Sangatsuda Y, Suzuki SO, Shono T, Mizoguchi M, Iihara K. Add-on bevacizumab can prevent early clinical deterioration and prolong survival in newly diagnosed partially resected glioblastoma patients with a poor performance status. Onco Targets Ther. 査読有 2017 Jan; 10:429-437. DOI:10.2147/OTT.S125587

Hata N, Yoshimoto K, Hatae R, Kuga D, Akagi Y, Suzuki SO, Iwaki T, Shono T, Mizoguchi M, Iihara K. Deferred radiotherapy and upfront procarbazine-ACNU-vincristine administration for 1p19q codeleted oligodendroglial tumors are associated with favorable outcome without compromising patient performance, regardless of WHO grade. Onco Targets Ther. 査読有 2016 Nov;9:7123-7131. DOI: 10.2147/OTT.S115911

分子病理学に基づくグリオーマ分類、溝口昌弘、脳神経外科ジャーナル、査読有 2015;24(6):366-377. DOI: <http://doi.org/10.7887/jcns.24.366>

Murata H, Yoshimoto K, Hatae R, Akagi Y, Mizoguchi M, Hata N, Kuga D, Nakamizo A, Amano T, Sayama T, Iihara K. Detection of proneural/mesenchymal marker expression in glioblastoma:

temporospatial dynamics and association with chromatin-modifying gene expression. J Neurooncol. 査読有 2015 Oct;125(1):33-41. DOI:10.1007/s11060-015-1886-y

〔学会発表〕(計9件)  
空閑太亮、秦暢宏、吉本幸司、波多江龍亮、赤木洋二郎、溝口昌弘、佐山徹郎、飯原弘二、IDHmutant, 1p19qcodeleted oligodendroglioma の長期予後に関する検討、第34回脳腫瘍学会、2016年12月28日、甲府富士屋ホテル、山梨・甲府

吉本幸司、空閑太亮、波多江龍亮、赤木洋二郎、三月田祐平、秦暢宏、溝口昌弘、飯原弘二、グリオーマ 400例における 1p/19q 共欠失の解析、第34回脳腫瘍学会、2016年12月27日、甲府富士屋ホテル、山梨・甲府

秦暢宏、吉本幸司、溝口昌弘、波多江龍亮、赤木洋二郎、三月田祐平、空閑太亮、庄野禎久、飯原弘二、初発神経膠芽腫に対する Bevacizumab 併用用法の治療成績、第34回脳腫瘍学会、2016年12月27日、甲府富士屋ホテル、山梨・甲府

秦暢宏、吉本幸司、空閑太亮、波多江龍亮、赤木洋二郎、鈴木諭、岩城徹、溝口昌弘、飯原弘二、1p19q co-deletion を有する oligodendroglioma に対する PAV 療法：分子診断による治療層別化の長期成績、第34回脳腫瘍病理学会、2016年5月27日、東京コンファレンスセンター有明、東京・有明

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀樹、空閑太亮、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二、pGBM における IDH/TERT promoter/ch10 LOH の解析、第33回日本脳

腫瘍学会学術集会、2015年12月7日、グランドプリンスホテル京都、京都

溝口昌弘、ペバシズマブ時代における悪性神経膠腫の診断と治療、日本脳神経外科学会第74回学術総会、2015年10月15日、ロイトン札幌、北海道・札幌

波多江龍亮、秦暢宏、赤木洋二郎、村田秀樹、空閑太亮、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二

IDH/TERT 変異解析による、グリオーマの分子病理学的層別化：255症例の検討

第74回脳神経外科学会学術総会、2015年10月14日、ロイトン札幌、北海道・札幌

波多江龍亮、秦暢宏、鈴木諭、赤木洋二郎、村田秀樹、天野敏之、吉本幸司、溝口昌弘、飯原弘二、神経膠芽腫症例におけるBRAF 遺伝子点突然変異解析、第33回脳腫瘍病理学会、2015年5月30日、JR ホテルクレメント高松、香川・高松

溝口昌弘、吉本幸司、村田秀樹、波多江龍亮、赤木洋次郎、天野敏之、飯原弘二、シンポジウム グリオーマの病理と分子解析：グリオーマ診断における分子病理学の役割、第33回日本脳腫瘍病理学会、2015年5月29日、JR ホテルクレメント高松、香川・高松

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

溝口 昌弘 (MIZOGUCHI, Masahiro)  
九州大学大学院・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：50380621

(2) 研究分担者

佐山 徹郎 (SAYAMA, Tetsuro)  
九州大学大学院・医学研究院・講師  
研究者番号：30346788

吉本 幸司 (YOSHIMOTO, Koji)  
九州大学大学院・大学病院・講師  
研究者番号：70444784

天野 敏之 (AMANO, Toshiyuki)  
九州大学大学院・医学研究院・共同研究員  
研究者番号：70448413

橋口 公章 (HASHIGUCHI, Kimiaki)  
九州大学大学院・大学病院・講師  
研究者番号：80448422

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者 なし