

令和元年5月31日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10749

研究課題名（和文）悪性神経膠腫での非侵襲で繰り返し評価可能なバイオマーカーの開発

研究課題名（英文）Noninvasive biomarker for the assessment for glioma subtype and the response to treatment

研究代表者

金森 政之（KANAMORI, MASAYUKI）

東北大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：60420022

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：神経膠腫は予後不良な疾患である。本研究では腫瘍の代謝産物を非侵襲的または迅速な方法で評価し、術前・術中の分子診断、および治療反応性の早期予測に役立つ方法を確立することを目的とした。1H-MR spectroscopy、mass spectrometryにて生体内または組織内の代謝産物を評価する方法を確立し、バイオマーカーとしての有用性を検討した。研究期間中に腫瘍組織から10分で代謝産物の測定が可能となる方法を確立し、またIDH変異型神経膠腫の予後予測および予後の異なるサブタイプの鑑別に有用となる代謝産物を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により術前や術中の遺伝子診断につながる簡便な方法が確立された。また遺伝子異常の予測が可能となる代謝産物が同定された。今後、神経膠腫に限らず、網羅的な代謝産物の解析がすすむことが予測され、代謝産物による予後予測や腫瘍のサブタイプの診断が可能となることを示すことができたことが本研究と意義と考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the metabolic product of tumor by a noninvasive or quick method to help a preoperative or intraoperative diagnosis and early prediction of response to treatment. To this end, we established a rapid method to evaluate the metabolic product in vivo and with 1H-MR spectroscopy and mass spectrometry. We found the metabolic products for prediction of the prognosis and the molecular diagnosis.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：神経膠腫 代謝産物 予後予測 分子診断

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は成人の中樞神経系に原発する腫瘍で予後不良な疾患である。この疾患群は組織診断により WHO 分類で予後良好な Grade I から予後不良な Grade IV に分類される。悪性神経膠腫と呼ばれる退形成性神経膠腫 (WHO grade III)、膠芽腫 (WHO grade IV) では 5 年生存率がそれぞれ 30-60%、10%以下と予後不良な疾患であり、最大限の摘出を行った後、後療法として放射線治療とテモゾロミド、ベバシズマブなどの化学療法がおこなわれる。

治療方針を決定する上で治療反応性予測・予後予測が必要であり、様々なバイオマーカーが確立されている。しかし既存のバイオマーカーは、摘出術で得られた腫瘍検体を解析することで得られる情報である。このため治療の根幹をなす摘出・生検の方針には反映できないこと、後療法、経過観察中の腫瘍の性質の変化については評価できないことが問題である。そこで摘出前・及び経過観察中に、リアルタイム・非侵襲的に予後予測・治療反応性予測が可能となる方法・および新規バイオマーカーの開発が必要と考えた。以上の背景から、臨床の場で汎用されている MRI での評価を着想した。MRI では、解剖学的情報のみならず、¹H-MR spectroscopy (¹H-MRS) と LC モデルを組み合わせることで関心領域の代謝産物の定量が可能となり、術前の腫瘍の質的診断へ応用が可能である。この解析で得られる代謝産物で悪性神経膠腫のバイオマーカーとしての有用性が期待できる分子は 2-ヒドロキシグルタレート (2-HG) とグルタチオンが挙げられる。

2-HG は Grade II, III の神経膠腫の 60-80%に認められる IDH 遺伝子変異に伴い、腫瘍組織で特異的に蓄積する oncometabolite である。IDH 遺伝子変異は神経膠腫に特異的に認められるため、2-HG の定量は術前診断としての意義は高い。¹H-MRS により 2-HG 定量を定量し IDH 遺伝子変異の診断についてはすでに他施設から報告されている。過去の報告で摘出組織内 2-HG 値と腫瘍の悪性化は相関しないことは報告されているが、治療に伴う 2-HG 値の変化について検討した報告はなく、2-HG 値の非侵襲的・経時的な定量は悪性神経膠腫の治療効果を早期に予測できる可能性を考えた。

グルタチオンには 活性酸素種の除去、グルタチオン抱合による有害物質の細胞外への排出の作用を有し、酸化ストレスや有害物質から生体を防御する『生体ストレス応答系』で重要な役割を果たしている。生体ストレス応答系は生理的条件下では酸化ストレス・有害物質などから生体を防御する有用な機構であるが、一方で、肺癌をはじめとした多くの癌腫において、恒常的に活性化し、薬剤・放射線耐性遺伝子の発現などを介して治療抵抗性を獲得することが知られている。現在までのわれわれの研究で、悪性神経膠腫でも予後良好な IDH 遺伝子変異型神経膠腫では生体ストレス応答系・グルタチオン合成が抑制されており、一方で、これらが亢進している症例は予後不良因子であることが判明した。過去の報告でも膠芽腫においてグルタチオン合成経路の亢進が予後不良因子であること、テモゾロミドやベバシズマブの感受性がグルタチオン濃度、合成経路の活性化と相関があることが示唆されている。このことからグルタチオンの定量は悪性神経膠腫の予後予測、治療反応性評価のための有用なバイオマーカーとなると考えた。

2. 研究の目的

悪性神経膠腫は予後不良疾患であり摘出術、放射線・化学療法を組み合わせた集学的治療が必要である。治療方針を決定するにあたり治療反応性予測・予後予測は必須であり、腫瘍組織の DNA 解析で得られる情報に基づきバイオマーカーが同定され、すでに臨

床応用されている。本検討では $^1\text{H-MR spectroscopy}$ から得られるグルタチオンと 2-ヒドロキシグルタレートとの定量を治療開始前・治療中・経過観察中・再発時に測定し、予後予測、治療反応の予測の可能性を明らかにすることを研究当初の目的とした。

3. 研究の方法

(1) 過去に採取され保存されている腫瘍の凍結組織の 2HG・グルタチオン定量値と、既存のバイオマーカーとの関連・治療予後との関連を後方視的に検討

対象：1996 年以降、当科で治療をおこない、経過観察中の悪性神経膠腫の患者を対象として 129 例の凍結標本を用いた。

代謝産物の測定：2HG、グルタチオン、乳酸、N-acetyl-aspartic acid などの代謝産物の測定を LC/MS/MS にておこなった。腫瘍組織 10mg をホモジェナイズした後、80% メタノールに溶解、上清を分離し、LC/MS/MS で解析した。LC/MS/MS は質量分析器 API 5000、カラムは CAPCELL CORE PFP、解析結果はソフトウェア Analyst を用いて解析した。

(2) $^1\text{H-MRS}$ での代謝産物定量の意義を前方視的に検討

対象：当科で治療をおこなう悪性神経膠腫で評価可能な残存病変がある 37 症例

方法と検討項目：

1) $^1\text{H-MRS}$ による 2-HG・グルタチオン定量： $^1\text{H-MRS}$ は 3.0-tesla の MRI システムで撮像した。腫瘍が最大の部分に 12-20mm の volume of interest (VOI) を設定する。 $^1\text{H-MR spectroscopy}$ は point resolved spectroscopic sequence (PRESS) 法で撮像した。スペクトル解析はソフトウェア LCModel version 6.3 (Stephen Provencher, Canada) を用いて自動処理し、水分を基準とした濃度をピークエリアから算出した。

2) $^1\text{H-MRS}$ による 2-HG・グルタチオン定量の臨床的な意義を評価

治療開始前に評価可能な病変がある症例で放射線・化学療法の前後に $^1\text{H-MRS}$ を撮像し、GSH, 2-HG, 乳酸の定量をおこなった。治療反応が良い乏突起膠腫 5 例、治療反応が不良な星細胞腫 11 例、膠芽腫 21 例について縦断的な評価をおこなった。

3) $^1\text{H-MRS}$ での代謝産物測定による腫瘍の分子診断の推定

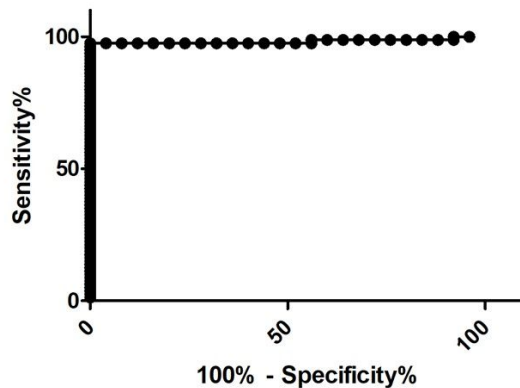
IDH 遺伝子変異、第 1 染色体短腕・第 19 染色体長腕の欠失の有無について $^1\text{H-MRS}$ で得られた代謝産物の濃度によって推定を試みた。

4. 研究成果

(1) 過去に採取され保存されている腫瘍の凍結組織の 2HG・グルタチオン定量値と、既存のバイオマーカーとの関連・治療予後との関連を後方視的に検討

腫瘍組織内の 2HG、グルタチオン、乳酸、N-acetyl-aspartic acid、グルタミン、グルタミン酸、リン脂質について測定系を確立した。この方法を術中遺伝子診断に応用し、腫瘍の 2HG を測定することで、感度 97.5%、特異度 100% の精度で神経膠腫の診断に不可欠な IDH 遺伝子変異が検出できることを報告した (図 1)。

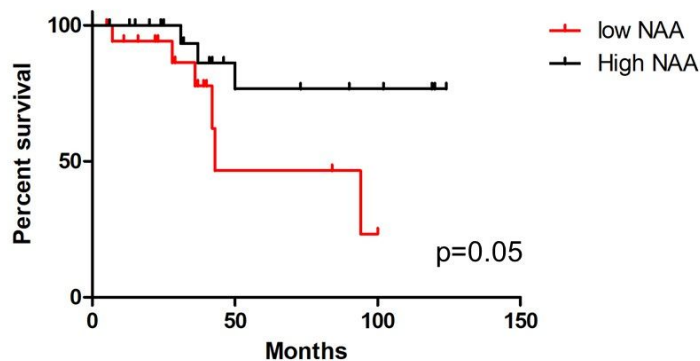
図1. 2-HGによるIDH遺伝子変異診断
(ROC曲線)



下記発表論文より

2HG, グルタチオン、乳酸、N-acetyl-aspartic acid、グルタミン、グルタミン酸、リン脂質と腫瘍の予後の相関を解析した。結果、IDH 遺伝子変異型神経膠腫において N-acetyl-aspartic acid 低下例では予後不良であることが判明した(図2)。この代謝産物は正常の神経細胞に多くふくまれ、脳の破壊の指標となる分子であり、新たなバイオマーカーとなりうることを見出した。

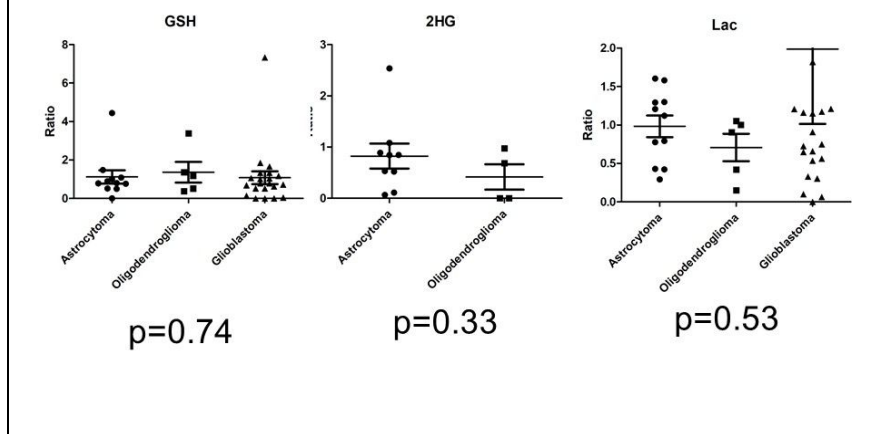
図2. IDH変異型腫瘍における予後
因子としてのN-acetyl-aspartic acid



(2) ¹H-MRS での代謝産物定量の意義を前方視的に検討

当科で加療をおこなった37例について治療前後での代謝産物を¹H-MRSにて測定した。治療反応性良好な乏突起膠腫(Oligodendroglioma)、治療抵抗性星細胞腫(Astrocytoma)・膠芽腫(glioblastoma)でのグルタチオン、乳酸、2HGの治療前後の変化率を示すが3群で差は認めなかった。また治療反応例と抵抗例で上記の代謝産物の変化を確認したが差は認めず、グルタチオン、乳酸、2HGによる早期の治療反応予測はできなかった(図3)。

図3. 治療前後の代謝産物の変化



(3) ¹H-MRS での代謝産物測定による腫瘍の分子診断の推定

術前に遺伝子診断を得ることを目的に ¹H-MRS で得られた代謝産物のパターンを IDH 変異型星細胞腫、乏突起膠腫、膠芽腫で検討した。結果、代謝産物の 1 つにより、IDH 変異型星細胞腫、乏突起膠腫の鑑別が感度 90%、特異度 95% で診断できることを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件) 査読あり

Kanamori M*, Maekawa M, Shibahara I, Saito R, Chonan M, Shimada M, Sonoda Y, Kumabe T, Watanabe M, Mano N, Tominaga T. Rapid detection of mutation in isocitrate dehydrogenase 1 and 2 genes using mass spectrometry. *Brain Tumor Pathol.* 2018;35(2):90-96. doi: 10.1007/s10014-018-0317-0.

〔学会発表〕(計 3 件)

術中迅速診断への mass spectroscopy の応用

金森政之、前川正充、柴原一陽、齋藤竜太、園田順彦、渡辺みか、富永悌二
第 18 回日本分子脳神経外科学会 2017 年 8 月 26 日

術中迅速診断への mass spectroscopy の応用

金森政之、前川正充、柴原一陽、齋藤竜太、園田順彦、渡辺みか、富永悌二
第 35 回日本脳腫瘍病理学会 2017 年 5 月 20 日

リキッドバイオプシー

金森政之、齋藤竜太、富永悌二
第 50 回東北脳腫瘍研究会 2017 年 3 月 25 日

〔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〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：麦倉 俊司

ローマ字氏名：Mugikura Shunji

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：准教授

研究者番号（8桁）：20375017

研究分担者氏名：前川 正充

ローマ字氏名：Masamitsu Maekawa

所属研究機関名：東北大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：70572882

(2)研究協力者 なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。