様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科研費 KAKENHI

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

令和　元 年　６ 月　７ 日現在

機関番号：１７１０２
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2016～2018
課題番号：１６Ｋ１０７７９

研究課題名（和文）グリオーマの分子病理学的診断のための、統合的解析プラットフォームの構築

研究課題名（英文）Development of comprehensive platform for molecular diagnosis of glioma

研究代表者
秦　暢宏（Hata, Nobuhiro）

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：１０５９６０３４

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　3,700,000円

研究成果の概要（和文）：高解像度融解曲線解析：HRM法を応用した独自のグリオーマの遺伝子解析法（PLoS One. 2016 Aug 16;11(8):e0160489.）を確立した。このシステムから、HRMと従来のシークエンス解析、LOH解析、並びにMGMTメチル化解析を統合したプラットフォームを構築し、当施設の研究室内で一元的にグリオーマの分子診断を可能とするシステムを確立した。また、アーカイブ検体を用いて詳細な遺伝子解析を行い、分子診断と臨床像との関係や治療成績との相関について、数多くの論文発表を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義
アーカイブ検体を用いて詳細な遺伝子解析を行い、分子診断と臨床像との関係や治療成績との相関を分析することで、分子診断の意義を報告した。

統合的な解析プラットフォームの構築により、WHO2016分類における分子診断に必須となる遺伝子解析を網羅することが可能となったため、九州大学病院の先進医療：抗悪性腫瘍剤治療における薬剤耐性遺伝子検査、として申請し、2018年8月より稼働している。本先進医療を受けた患者は現在までに約40名に達しており、正確な分子診断に基づいた治療方針を提示することが可能となった。

研究成果の概要（英文）： We developed an original genetic analysis method by modifying high resolution melting (HRM) （PLoS One. 2016 Aug 16;11(8):e0160489.）, and established comprehensive platform of HRM, conventional sequencing, LOH and MGMT methylation analyses, that enables systematic molecular diagnosis of glioma in our lab.
Further,we analyzed molecular findings using archival samples and published numerous articles regarding the correlation of molecular diagnoses with clinical characteristics and outcome.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：glioma　genetic analysis　molecular diagnosis　WHO2016　glioblastoma　diffuse glioma

１．　研究開始当初の背景

グリオーマにおいては、近年の大規模遺伝子解析の成果により、その発生および悪性化の分子メカニズムが解明しつつある。系統特異的な遺伝子変異（mutation）と染色体欠失（deletion もしくは LOH）が判明しており、その組み合わせによる分子病理診断が確立している。

九州大学および関連病院では、神経膠腫は全例で遺伝子解析を行い、分子病理診断に基づいた治療戦略を導入している。一例として、IDH 変異と 1p/19q 染色体欠失を有する腫瘍は、化学療法の感受性が高いため、化学療法単独での治療を先行しており、実際に長期生存が得られることを示してきた。このような分子病理学的アプローチは、グリオーマの治療に不可欠となりつつあり、将来的に形態病理診断を凌駕することが確実視されている。

遺伝子解析については、一般に免疫染色やシークエンス解析が用いられるが、前者は判定の不明瞭性、後者は手法が煩雑であるといった問題点があり、現時点では臨床に普及していない。近年、遺伝子変異を検出する方法として、高解像度融解曲線分析（HRM）法が開発された。本法は、単一行程（PCR）のみで、遺伝子変異の判定が可能であり、迅速かつ簡便であることが利点である。

申請者は HRM 法の新規解析法を開発し、グリオーマの臨床検体を用いた際の、遺伝子変異の明確な判定基準(HRM-MI)を独自に確立した。HRM-MI による解析は、その簡便かつ迅速な行程、および判定の明瞭性といった利点から、臨床現場への導入に適している。これらの利点を活かした、より臨床に即したプラットフォームの構築が必要である。

２．研究の目的

本研究の目的は、グリオーマの分子診断に必要な遺伝子解析に関して、統合的な解析プラットフォームを構築することである。

１）　遺伝子点変異：現時点で IDH、BRAF での検出は可能となっているが、その他の TERT,H3F3A,ATRX,TP53 といった遺伝子の変異に対しては、HRM 法のプライマーや反応条件を調整して、検出法を確立する。

２）　染色体欠失：HRM での解析手法は確立しておらず、新規に開発する。原理としては、SNP(スニップ：一塩基多型)を含んだプライマーを設計し、腫瘍と正常 DNA での HRM 波形の比較により、欠失を判定する。
解析結果の判定を自動化するソフトウエアや、遺伝子変異解析に特化した HRM 法のプラットフォームの開発を進めることで、将来的な臨床現場への導入を目指す。

３．研究の方法

①グリオーマに関連する遺伝子点変異、染色体欠失を網羅的に解析可能とする。
既に IDH1/2、BRAF 遺伝子の変異解析法は確立しており、その他にこの数年での新規知見を鑑み、TERT,H3F3A,ATRX といった遺伝子の変異の解析を試みる。各遺伝子における PCR 条件や融解曲線などは異なるため、各々の解析アルゴリズムを調整して統合する必要がある。そのため、各遺伝子での実験行程や温度設定を微調整した実験を繰り返して、統合化に最適な条件を模索する。染色体欠失に対しても、同様のアプローチでの統合的解析の開発を目指す。

②自動解析プラットフォームを構築する。
我々は、HRM 法における IDH mutation の判定基準を独自に開発している。従来の HRM では、融解曲線の波形パターン分類により変異判定を行っていたが、我々の手法は融解曲線を独自の微分学的数式で解析することで、判定結果を数値化した。このような判定手法をプログラミングに組み込んだソフトウエアを開発することで、オートメーション化が達成できると考えられる。また従来の HRM 解析は、一般的な定量的 PCR マシンを流用して施行されているが、臨床応用を普及させるためには、臨床腫瘍サンプルからの遺伝子変異解析に特化した安価な機器の開発を目指す。

４．研究成果

HRM 法を応用した独自のグリオーマの遺伝子解析法を確立した（PLoS One. 2016 Aug 16;11(8):e0160489.）。この方法を用いて、HRM と従来のシークエンス解析、LOH 解析、並びに MGMT メチル化解析を統合したプラットフォームを構築し、当施設の研究室内で一元的にグリオーマの分子診断を可能とするシステムを確立した。

また、アーカイブ検体を用いて詳細な遺伝子解析を行い、分子診断と臨床像との関係や治療成績を詳細に分析することで、グリオーマにおける新規知見を多数獲得した。主な成果として下記のものが挙げられる。
１）1p19q codeletion と化学療法の感受性および予後との相関について詳細に解析し、化学療法先行治療の有効性を報告した（Onco Targets Ther. 9:7123-7131. 2016)。
２）BRAF V600E 変異を有する悪性神経膠腫は、病理学的に上皮性の特徴を有する特異的な疾患群であることを報告した(Neuropathology. 37(3):191-199, 2017)。
３）IDH 変異を有する膠芽腫は、放射線画像および臨床経過が特異的であることを報告した（Neuropathology. 37(3):200-206, 2017)。
４）H3.3 G34 変異を有する神経膠腫は小児に部位特異的に発生する腫瘍であることを報告した（Brain Tumor Pathol. 34: 103-112, 2017)。
５）頭蓋咽頭腫は HRM 法による BRAF V600E 変異検出により、組織像の異なる亜型に分類可能であることを報告した（Neuropathology 38: 3-10, 2018)。
６）TERT 変異を有する IDH 変異のない膠芽腫は、特殊な撮像により画像的に予測可能であることを報告した（Diagn Interv Imaging. S2211-5684(19)30067-1, 2019）

解析プラットフォーム確立と、臨床検体の解析経験を踏まえて、神経膠腫の分子診断を実臨床に導入することが可能となったため、九州大学病院における先進医療として神経膠腫の分子診断を登録した。2018 年 8 月から稼働しており、既に 40 例で先進医療としての分子診断を行っており、その所見に基づいた治療方針を患者に提示した上で、治療選択を行っている。

５．主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計　8　件）

1. Yamashita K, Hatae R, Hiwatashi A, Togao O, Kikuchi K, Momosaka D, Yamashita Y, **Kuga D**, **Hata N**, Yoshimoto K, Suzuki SO, Iwaki T, Iihara K, Honda H.
Predicting TERT promoter mutation using MR images in patients with wild-type IDH1 glioblastoma.
Diagn Interv Imaging. S2211-5684(19)30067-1, 2019 doi: 10.1016/j.diii.2019.02.010.

2. Akagi Y, **Yoshimoto K**, **Hata N**, **Kuga D**, Hatae R, Amemiya T, Sangatsuda Y, Suzuki SO, Iwaki T, Mizoguchi M, Iihara K.
Reclassification of 400 consecutive glioma cases based on the revised 2016WHO classification
Brain Tumor Pathology. 35(2):81-89, 2018 doi: 10.1007/s10014-018-0313-4.

3. **Yoshimoto K**, Hatae R, Suzuki SO, **Hata N**, **Kuga D**, Akagi Y, Amemiya T, Sangatsuda Y, Mukae N, Mizoguchi M, Iwaki T, Iihara K.
High-resolution melting and immunohistochemical analysis efficiently detects mutually exclusive genetic alterations of adamantinomatous and papillary craniopharyngiomas.
Neuropathology 38: 3-10, 2018 doi: 10.1111/neup.12408.

4. **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. 34: 103-112, 2017

5. **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. 37(3):200-206, 2017 doi: 10.1111/neup.12362.

6. 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. 37(3):191-199, 2017 doi: 10.1111/neup.12347.

7. **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. 9:7123-7131. 2016

8. Hatae R, <u>Hata N</u>, **Yoshimoto K**, **Kuga D**, Akagi Y, Murata H, Suzuki SO, Mizoguchi M, ihara K.
Precise Detection of IDH1/2 and BRAF Hotspot Mutations in Clinical Glioma Tissues by a Differential Calculus Analysis of High-Resolution Melting Data.
PLoS One. 11(8):e0160489. 2016

〔学会発表〕(計 5 件)

1. <u>Hata N</u>, Mizoguchi M, Akagi Y, Suzuki SO, **Kuga D**, Amemiya T, Hatae R, **Yoshimoto K**, Iwaki T, Iihara K.
The correlation between 1p19q and TERT promoter mutation status in IDH-mutant gliomas
36th Annual Meeting of the Japan Society of Brain Tumor Pathology: Sep. 25th, 2018

2. <u>秦 暢宏</u>、吉本幸司、空閑太亮、赤木洋二郎、 山下孝二、栂尾理、樋渡昭雄、河村陽一郎、溝口昌弘、飯原弘二
WHO2016 分子診断と画像所見の相関～術前に分子診断予測は可能か？
第 41 回 日本脳神経 CI 学会総会（新潟） 2018 年 3 月 3 日

3. <u>秦 暢宏</u>、波多江龍亮、吉本幸司、空閑大亮、雨宮健生、赤木洋二郎、三月田祐平、溝口昌弘、飯原弘二
高解像度融解曲線の２階微分解析による、グリオーマ点変異の高精度判定：HRM-MI 法,
第 18 回日本分子脳神経外科学会(山梨), 2017 年 8 月 26 日

4. <u>秦 暢宏</u>、波多江龍亮、吉本幸司、空閑大亮、赤木洋二郎、三月田祐平、鈴木諭、岩城徹、溝口昌弘、飯原弘二
改良 HRM 解析法による、高精度なグリオーマ分子診断法の開発
第 35 回日本脳腫瘍病理学会(栃木), 2017 年 5 月 20 日

5. <u>秦 暢宏</u>、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 先行治療：分子診断による治療層別化の長期成績
第 34 回日本脳腫瘍病理学会：2016/5/27 東京 （シンポジウム）

〔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：http://www.ns.med.kyushu-u.ac.jp//

６．研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：吉本 幸司

ローマ字氏名：Yoshimoto Koji

所属研究機関名：鹿児島大学大学院医歯学総合研究科神経病学

部局名：脳神経外科

職名：教授

研究者番号（8 桁）：70444784

研究分担者氏名：空閑　太亮

ローマ字氏名：Kuga Daisuke

所属研究機関名：九州大学

部局名：大学病院

職名：助教

研究者番号（8桁）：40759932

※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。