

平成 30 年 5 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19991

研究課題名(和文) 神経膠腫におけるマイクロRNA解析を用いたメチオニン取り込み機序の探索

研究課題名(英文) Exploration of methionine uptake mechanism on glioma through microRNA analysis

研究代表者

山口 秀 (YAMAGUCHI, Shigeru)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：70399939

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：メチオニンPETで集積を認める神経膠腫において、その集積メカニズムをマイクロRNAの解析等の遺伝子解析を用いて試みた。同時に神経膠腫において認められている遺伝子異常と、臨床的な情報、例えば手術における術中診断の蛍光発光、MRIなどの画像所見や予後との関連について遺伝子発現解析を介して調べた。結果として、メチオニン集積のメカニズムに関与する遺伝子の同定には至らなかったものの、術中蛍光診断に強く関与することが示唆されるPEPT2と、BRAF遺伝子異常を有する神経膠腫において予後に関与する可能性のあるCDKN2Aの同定に至った。

研究成果の概要(英文)：Gliomas usually show high uptake of methionine in Positron Emission Tomography, but the mechanism of methionine uptake remain unknown. We explored these mechanism through gene expression analysis including microRNA. At the same time, we also investigated the correlation between various somatic mutations of gliomas and clinical information, such as intraoperative fluorescence status of photodynamic diagnosis, MRI appearance, and prognosis using gene expression analysis. In result, we could not identify the specific molecule in methionine uptake of glioma, but we could identify potentially important two molecules in gliomas; 1) PEPT2, which may have important role in the intratumoral fluorescence in glioma photodynamic diagnosis using 5-ALA, and 2) CDKN2A, which may be one of the key gene of the prognosis on glioma with BRAF somatic mutation.

研究分野：脳腫瘍学

キーワード：gene expression analysis

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は最も頻度の高い脳腫瘍の一つであるが、いまだに全悪性腫瘍の中で最も予後不良の一つでもある。従来、組織形態により病理分類や悪性度診断が行われていたが、直近の網羅的遺伝子解析の結果から、個々の遺伝子体細胞変異に基づいたより客観的な診断、いわゆる「分子生物学的診断」へと移行することは自明となっている。特に、IDHとTERTプロモーター領域の遺伝子変異と染色体1p/19q共欠失の状態により、成人神経膠腫が明瞭に分類可能であることが示されている。ところで、神経膠腫に対する診断において、実臨床では術前診断であるMRIなどの画像診断に加え、核医学検査、特にPositron Emission Tomography (PET) による代謝情報の診断や、手術中に行う5-アミノレブリン酸を用いた術中蛍光診断が重要である。本来はこれらの日常臨床で得られる臨床情報と、分子生物学的な診断情報が結びつけられるべきであるが、その橋渡しが行われているとは言い難く、発達が著しい分子生物学的情報が臨床応用に生かされている状況ではなかった。

2. 研究の目的

遺伝子変異に基づいた分子診断と、PET所見や術中蛍光診断などの代謝画像診断などの臨床情報を合わせて検討した網羅的遺伝子解析の報告は皆無であった。我々は、その解析の糸口としてマイクロRNAに注目した。マイクロRNAの発現解析はその短い塩基配列のため、発現が安定しており変性の影響を受けにくく、網羅的解析においてはtotal RNAより安価で安定した結果が得られやすいという利点があった。本研究では、マイクロRNAの発現解析とメチオニンを中心とした画像から得られる情報、さらには手術で得られる術中蛍光診断に基づいた臨床情報を、遺伝子変異による診断分類に基づいて統合解析することにより、臨床上有意義な分子生物学的バイオマーカーの発見につなげ、個別化医療への基盤確立への足掛かりとすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 北海道大学脳神経外科教室に-80度で保存されている腫瘍の新鮮凍結検体から、術前にメチオニンPETが施行された手術検体を選び、RNAを抽出した。3D-Gene® (東レ)を用い、マイクロアレイ解析を行った。得られた結果をクラスタリング解析し、メチオニンの取り込みに着目したsupervised analysis (教師つき分析)を行った。

(2) IDH、TERT以外にも神経膠腫において同定された遺伝子異常につき、保存検体から抽出したDNAを用いて、direct sequencing法(サンガー法)にて遺伝子変異解析を行った。

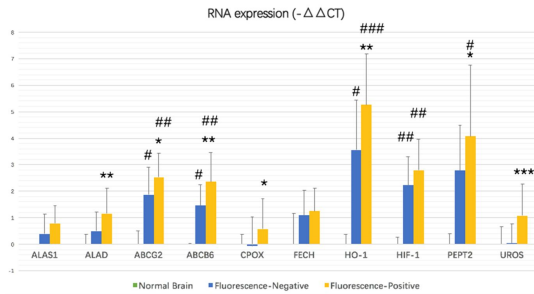
(3) 手術の際、術中蛍光診断を施行した神経膠腫の新鮮凍結検体を選び、(1)と同様にRNAを抽出した。投与された5アミノレブリン酸から蛍光発光物質であるプロトポルフィリンIX (PpIX)に至るpathwayに注目し、その関連分子の遺伝子発現解析を定量PCR法、タンパク発現解析を免疫染色やWestern blot法にて施行した。

(4) 上記(2)により同定されたBRAF遺伝子変異神経膠腫において、RAS-RAF-MEK-ERK MAPキナーゼ pathwayに注目した遺伝子発現・タンパク発現解析を行い、その臨床と対比させた。

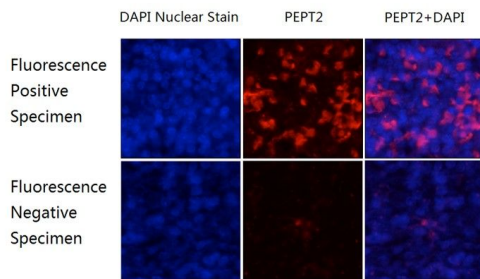
4. 研究成果

(1) メチオニンPETを術前に施行した13例の神経膠腫と市販されている正常脳から抽出した2例の計15例のRNAを用いて、マイクロRNA解析を施行した。1症例あたり2565のマイクロRNAの発現に関して発現状態を調査、正常脳と腫瘍の間で発現の差が確認されたマイクロRNAを491まで絞りこんでunsupervised clusteringを施行した。しかしながら、メチオニンPETの取り込み状態では有意なclusterは形成されないことが判明した。続いてメチオニンPETの取り込み状態を教師として与えたclustering(supervised clustering)も行ったが、これでも有意なclusteringを行うことができず、マイクロRNAの発現からメチオニンの取り込みを規定する因子の吊り上げに関しては難しいことが判明した。

(2) 術中蛍光診断を行った症例における腫瘍発光の有無においてはマイクロRNAの発現形式が異なる傾向を示した。マイクロアレイを施行できた症例が少なかったため、包括的な解析は不可能で、代替案として5-ALAから細胞内で蛍光発光物質であるPpIXへの生合成経路に存在する分子に注目し、その発現量を調べた。

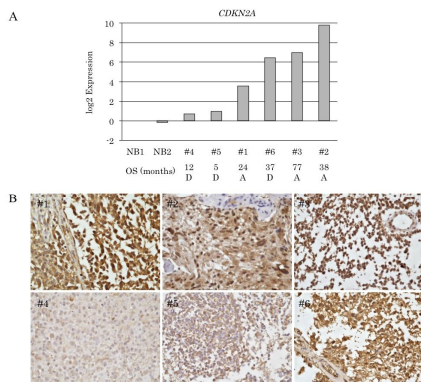


上図は蛍光発光の程度によって2群に分けた神経膠腫検体から抽出したRNAを用いて、遺伝子発現の違いを調べた結果である。腫瘍での蛍光発光陰性(青)の症例群と蛍光発光陽性(黄色)の群において遺伝子発現が異なることが示されているが、この中で我々は、特にPEPT2に注目した。PEPT2は細胞内に5-ALAを取り込む際に重要なタンパクであり、この高発現が蛍光発光に強く関与している可能性が示唆された。これはタンパク発現を調べるために行った免疫染色においても、矛盾しない結果が得られた(下図)



すなわち、上段の蛍光発光を認めた腫瘍においては、PEPT2の高発現が確認される結果であった。この結果を踏まえ、今後PEPT2の機能解析を計画している。

(3) 神経膠腫の遺伝子変異解析を行った結果、213例の成人高悪性度神経膠腫の中で6例のBRAFの遺伝子変異を有する症例が同定された。この遺伝子異常はcodon600に起きる hotspot mutationでありバリン(V)がグルタミン酸(E)に代わる点変異である。全症例のうち2.8%の頻度であった。



がん遺伝子であるBRAF遺伝子の活性化により亢進するRAS-RAF-MEK-ERK MAPキナーゼ pathwayに注目し、その遺伝子発現解析を施行したところ、その一つであるCDKN2Aの遺伝子発現が症例により大きく異なることが判明した(前図上)。この発現の差は免疫染色でのタンパク発現解析でも示すことが出来た(前図下)。CDKN2Aが低発現であった2例は他の4例と比較して明らかに予後が不良であり(両症例とも全生存12か月未満)、CDKN2Aの発現がBRAF遺伝子変異を有する神経膠腫の予後に強く影響している可能性が示唆される結果であった。現在、この結果を踏まえ、更なる詳細な解析を行うべく、DNA methylation arrayを行って、その遺伝子発現に影響する因子の同定を行っている。

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)

山口 秀, PETの脳腫瘍への応用、脳神経外科、査読無、Vol. 45、No. 11、2017、pp. 1015-1024

[学会発表](計 3 件)

山口 秀、平田 健司、伊師 雪友、茂木 洋晃、小林 浩之、寺坂 俊介、寶金 清博、MRIとメチオニンPET所見から神経膠腫の病理診断や予後予測は可能か?、第35回日本脳腫瘍学会、2017/11/27、JRホテルクレメント高松・サンポール高松(香川県高松市)

伊師 雪友、山口 秀、吉田 道春、茂木 洋晃、小林 浩之、寺坂 俊介、寶金 清博、BRAF V600変異を有する成人高悪性度神経膠腫の臨床病理学的検討、第18回日本分子脳神経外科学会、2017/8/26、甲府富士屋ホテル(山梨県甲府市)

Yukitomo Ishi, Shigeru Yamaguchi, Michiharu Yoshida, Hiroaki Motegi, Hiroyuki Kobayashi, Shunsuke Terasaka, Kiyohiro Houkin,

Clinicopathological Analysis of Adult High-Grade Gliomas Harboring BRAF V600E Mutation., The meeting of the Asian Society of Neuro-Oncology, 2017/10/29, Grand Front Osaka (Osaka, Osaka-shi)

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山口 秀 (YAMAGUCHI, Shigeru)
北海道大学・大学病院・助教
研究者番号：70399939

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

伊師 雪友 (ISHI, Yuki tomo)
北海道大学・医学院・大学院生

侯 崇显 (KO, Suken)
北海道大学・医学院・大学院生