

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20004

研究課題名(和文)脳腫瘍における術中オールインワン変異解析システムの開発

研究課題名(英文)development of intraoperative all-in-one system analyzing gene mutation in brain tumor

研究代表者

近藤 五郎 (KONDO, GORO)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号：50773446

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)：脳腫瘍の分子診断は重要であるが、その診断時期は治療方針や経過に大きく影響する。術中診断がされることで早くから適切な後療法が可能となるため、その技術確立を目指した。i-Density は Q プローブを対象 DNA に水素結合させ、加熱により denature させ発光させるシステムで、変異により denature 温度が変化することを利用して、腫瘍を遺伝子診断する。所要時間は約90分と短く、プローブ開発により、各腫瘍の遺伝子診断が可能になる。本研究では、gliom において重要な IDH1 R130 および H3F3A のプローブを確立させ、IDH2 R172 について候補を絞り込んだ。

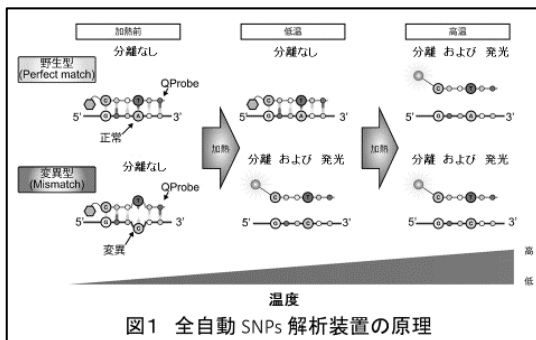
研究成果の概要(英文)：Although molecular diagnosis of brain tumor is important, its timing influences the treatment plan and course. Intraoperative diagnosis will make us quickly choose and start appropriate after treatment. Therefore, we aimed to establish the technology. i-density makes Q probe and objective DNA hydrogen bond each other. After this i-density makes that complex denature by heating and emission. Utilizing the fact that the denaturing temperature differs according to the mutation, genetic diagnosis is performed. It takes only about 90 minutes. Development of the new probe will make us able to do genetic diagnosis among each tumor. In our study, we established the probe against IDH1 R130, which is important for glioma, and H3F3A. In addition, we chose the candidate for the one against IDH2 R172.

研究分野：脳腫瘍

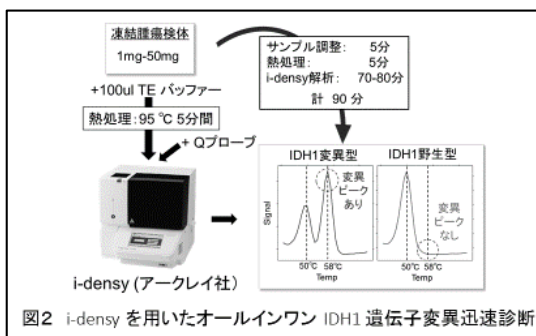
キーワード：脳腫瘍 術中診断 分子診断

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の次世代ゲノム解析が精力的に行われてきた結果、予後予測や病型分類に有用な遺伝子変異が同定された。名古屋大学の鈴木・夏目らによる研究では、757例のWHOグレード2~3の神経膠腫における網羅的遺伝子解析の結果、IDH1/2変異と1p/19q co-deletionを用いた予後と治療効果を反映する分類が提唱され、遺伝子診断の重要性が明らかになった (Suzuki H, Natsume A, Wakabayashi T, et al. Nature Genetics, 2015)。これにより、新しいWHO脳腫瘍病理診断にこれら遺伝子異常が診断に盛り込まれるのは不可避となった。



神経膠腫において重要な遺伝子異常はIDH1/2遺伝子変異と1p/19q LOH有無である。そこで我々は直接腫瘍組織からSNPを90分以内という短時間で検出する術中迅速SNPs解析装置(図2)を用いて実験を行い、5%以上の腫瘍細胞が含まれていればIDH1 R132H変異を高精度に検出できる(図1)ことを確立した(Kurimoto M, Kondo G, Natsume A, et al. Cancer Investigation, 2015)。脳腫瘍におけるIDH1/2遺伝子変異はhotspot変異でありIDH1 R132とIDH2 R172の2か所のみが生じるため、これら該当箇所のみを調べれば変異有無の判断は可能であった。



またわれわれが提唱した遺伝子異常に基づく神経膠腫の分類においてIDH1/2遺伝子変異解析に次いで予後予測に有用な遺伝子マーカーは1p/19q LOHである。染色体異常の同定についても、次の方法で全自動SNPs解析装置を使用可能と考えられた。

まず術前に血液検体からのDNAに対し、

サンガーシーケンスを行うことにより、染色体1p,19qの各領域における、germline hetero SNPを確認する。そのhetero SNPに対するプローブを用いて解析し、hetero SNPにおける不均衡の有無を確認することで各染色体の異常を同定する。本装置はQプローブの発光輝度を測定することで半定量的に変異を同定できるため、hetero SNPの輝度の差を用いて染色体コピー数異常の同定が可能である。

さらに多くの脳腫瘍において、様々なドライバー遺伝子のhotspot変異が報告されていた。低悪性度神経膠腫におけるTERTプロモーター、pilocytic astrocytomaにおけるBRAF、小児神経膠腫におけるH3F3A、神経膠芽腫におけるEGFR、PIK3CA、PDGFRAや髄芽腫と頭蓋咽頭腫におけるCTNNB1など、遺伝子変異から疾患を同定することが可能であった。術中迅速SNPs装置による術中脳腫瘍の診断を確立することにより、ほとんどの悪性脳腫瘍に対し術中診断が可能になると見込まれた。そして我々の検証の結果、脳腫瘍組織における遺伝子変異の迅速診断技術が確立されたため、関心領域の適切なプローブ設計によりさまざまな脳腫瘍における術中迅速遺伝子診断の可能性が提示された。

2. 研究の目的

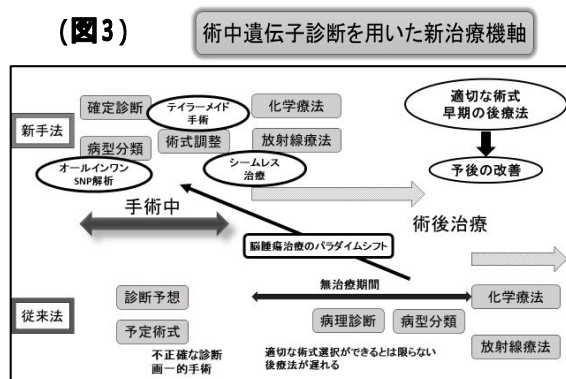
われわれが提唱した遺伝子異常に基づく神経膠腫の病型分類に必要な遺伝子変異を手術中の短い時間でまとめて診断する技術を確認する。われわれは既にIDH1変異に対して技術を確認したが、同時に必要とされるIDH2、次に有用と考えられる1p/19q LOHに対する全自動SNPs迅速診断で使用可能なプローブを作成し、神経膠腫における術中病型診断を可能にする。さらにTERT、PIK3CA、EGFR、BRAF、PDGFRA、CTNNB1、H3F3Aなどのhotspot変異をもつ遺伝子変異に対してもプローブ開発を行い、ほとんどの原発性脳腫瘍に対応できる術中オールインワン診断システムを構築し、臨床的有用性を実証する。万が一、1p/19q LOH検出でheteroSNP法が困難であった場合、マイクロサテライトマーカーからQプローブの作成を試みる。これらを疾患ごとのセットとし、検査会社と連携し、保険収載が可能になるよう活動をする。

また、われわれのこれまでの研究成果から神経膠腫に対し遺伝子異常を用いた分類をすることでより正確な予後予測が可能となった。これを速やかに現場医療に還元させる必要があった。術中の遺伝子変異診断はこれまで時間がかかること、手技の煩雑さ、またハイスループットであるため、個々の腫瘍の解析には不向きであった。しかし、我々が実証した装置の使用と適切なプローブ開発を行えば、摘出組織を簡単な前処理のみで、病

型診断に必要なすべての遺伝子変異情報について、手術中の短時間オールインワン解析が可能になると考えられた。

本研究の完遂により、神経膠腫の遺伝子異常による分類を手術臨床に応用する画期的な技術が提供されることが見込まれた。また今回ターゲットとした遺伝子変異や染色体異常はいずれも診断的価値が高く他の脳腫瘍にも応用できることが予測された。これまでの脳腫瘍手術は術前画像診断と術中迅速病理診断を基に疾患を推測していたが、これらの手法には限界があり術中と術後の診断がかわる症例が認められることが知られていた。本技術の確立により術中に詳細な病型診断が可能になることが予想されたため、速やかに予後・患者ニーズに即した術式を設定できるようになると考えられた。特に神経膠腫においては手術摘出度が予後因子であることから、術式の術中調整が可能になることで、各病型患者におけるニーズに対応したテーラーメイド手術を提供できると思われた。時間と手間のかかる従来型の病理診断や遺伝子解析結果を待たなくとも、適切な後療法が早期に開始できるため、無治療期間が少なくなり、生命予後の改善が見込めると予測した。特に髄芽腫では予後改善のために術後早期の放射線治療を求められる一方、予後良好な WNT 型 (CTNNB1 変異) では放射線を避けるべきとされ、術中に遺伝子診断をすることで、有害な治療を減らすことができると考えていた。(図 3)

(図 3)



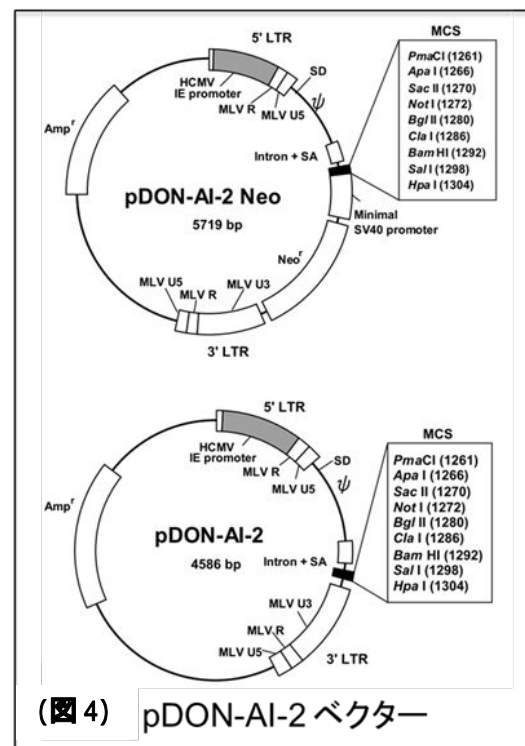
3. 研究の方法

IDH2 R172 に対するプローブを設計し IDH1/2 遺伝子の迅速診断技術を完成させようとした。次いで血液検体由来の DNA に対するサンガーシーケンスを併用することで、同装置における 1p/19q LOH の迅速診断技術を開発し、神経膠腫の病型診断に必要な情報を網羅することを目指した。これらすべてに同じ腫瘍組織における通常シーケンスの結果を照合、また実際に術中解析を施行し、病理診断と合わせて検証した。そして mid line glioma にみられる H3F3A 変異に対して強制発現細胞株を樹立し、条件検討を行った後に迅速診断技術を開発した。他に診断的価値の高い TERT、

BRAF などの遺伝子変異に対して強制発現細胞株を樹立し、条件検討を行った後に迅速診断技術を開発する予定であった。以上の解析を組み合わせて脳腫瘍における超短時間オールインワン術中遺伝子変異診断技術の完成とすることを目指した。

4. 研究成果

臨床検体を用いた IDH2 遺伝子変異、1p/19q LOH の迅速診断技術の確立を目指し、計画に沿って下記 (1) ~ (2) を行った。また当初は計画外であったが、mid line glioma で変異がみられる H3F3A 遺伝子についても、その臨床的有用性を鑑み、プローブ開発計画に組み込んだ。これについては既に以下のように変異細胞株を作成した。



(図 4) pDON-AI-2 ベクター

高効率遺伝子導入用レトロウイルスベクターである pDON-AI-2 DNA を使用して、標的遺伝子変異の強制発現ベクターを作成した。レトロウイルスゲノムからパッケージングシグナルと両端の LTR 配列を残し、それぞれの shRNA が挿入された組換えレトロウイルスベクターは、標的細胞の染色体に確実に目的遺伝子を挿入できるため、長期安定遺伝子発現が期待できた (図 4)。また pDON-AI DNA は従来のベクターとは異なり、5' 側 LTR の U3 領域に LTR よりもプロモーター活性の強い HCMV の IE プロモーターを有するため、ベクター RNA ゲノムの転写効率が高く、そのため高力価の組換えレトロウイルスを得られた。このベクターを用いて安定発現細胞株を作成し、タンパク質を回収しウエスタンブロットティング法により H3F3A の発現を確認した。

(1) i-Densy を用いた IDH1/2 などの迅速診断技術確立: Q プローブを対象 DNA に水素結合させ、加熱により denature され発光。対象 DNA に遺伝子変異を認める場合、1 塩基の変化により denature 温度が変化するため、温度差から遺伝子変異が判断可能である。本研究ではまず、IDH1 R132 のプローブを作成した。次いで H3F3A に対するプローブもあわせて設計、確立した。また IDH2 R172 については、標的配列についていくつかの候補部位を絞り込み、現在それぞれに対するプローブを作成中である。なお、既に完成したプローブについて、腫瘍検体を i-Densy で解析し実証した。これらはすべて臨床検体を用い、手術と並行して解析した。

(2) 従来シーケンス法による確認: 上記解析の対象となった同一腫瘍組織検体を用いて、同定された異常を再確認した。QIAGEN を使用して腫瘍 DNA を採取、IDH1/2 遺伝子および各染色体の hetero SNP に対して作成した NotI 配列付きプライマーを用いて PCR を行い対象領域のアンプリコンを作成。HiSeq2500 を用いた解析系の条件検討を行い、適切な結果が得られることを確認した。現在、解析対象となる検体について検討中である。

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)

1. Koyama H, Ikenuma H, Toda H, Kondo G, Hirano M, Kato M, Abe J, Yamada T, Wakabayashi T, Ito K, Natsume A, Suzuki M. Synthesis of PET probe O6-[(3-[11C]methyl)benzyl]guanine by Pd0-mediated rapid C-[11C]methylation toward imaging DNA repair protein O6-methylguanine-DNA methyltransferase in glioblastoma. Bioorg Med Chem Lett. 2017 May 1;27(9):1892-1896. (査読あり)
2. Yamamichi A, Kasama T, Ohka F, Suzuki H, Kato A, Motomura K, Hirano M, Ranjit M, Chalise L, Kurimoto M, Kondo G, Aoki K, Kaji N, Tokeshi M, Matsubara T, Senga T, Kaneko MK, Suzuki H, Hara M, Wakabayashi T, Baba Y, Kato Y, Natsume A.

An immuno-wall microdevice exhibits rapid and sensitive detection of IDH1-R132H mutation specific to grade II and III gliomas.

Sci Technol Adv Mater. 2016 Oct

4;17(1):618-625. (査読あり)

[学会発表](計0件)

[図書](計0件)

6. 研究組織

研究代表者

近藤 五郎 (Goro Kondo)

名古屋大学・医学部附属病院・病院助教

研究者番号: 50773446