

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：33916

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K20029

研究課題名（和文）PCR法でのグリオーマ遺伝子診断ならびにグリオーマ悪性化因子の同定

研究課題名（英文）Diagnosis of glioma by PCR method and identification of malignance factor of glioma

研究代表者

中江 俊介（Nakae, Shunsuke）

藤田保健衛生大学・医学部・助教

研究者番号：20622971

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）：本研究はIDH遺伝子に変異を認めるグリオーマの再発形式を大きく5つの再発形式に分類し、中でもp53の遺伝子変異を持つグリオーマの多くが局所再発に加え頭蓋内遠隔再発の形式をとることを明らかにした。そして頭蓋内遠隔再発の形式を認める症例では画像解析にて初発病変と再発病変の間に神経線維の介在を示し、次世代シーケンサーによる解析では第8染色体のq腕のコピー数増加（特に8q22～24領域でhigh copy gain）を示すことを報告した。現在は同領域に存在する遺伝子のc-Mycならびに同じWntシグナル伝達経路について検討中である。

研究成果の概要（英文）：In this study, we classified the recurrence pattern of IDH mutant gliomas into five patterns, and clarified that IDH mutant gliomas with mutation of p53 take remote recurrence and local recurrence. In the case of the intracranial remote recurrence pattern, we showed that intervention of nerve fibers between the initial and recurrent lesions in the image analysis, and an increase of the copy number variations in Q arm of the eighth chromosome in the analysis by the next generation sequencer (especially high copy gain in 8q22-24 region). Based on the above, now we are being investigating the C-MYC and the Wnt signaling pathway.

研究分野：脳神経外科学

キーワード：グリオーマ 頭蓋内遠隔再発 +8q

1. 研究開始当初の背景

2016年のWHO分類の改訂まで、グリオーマは病理学的所見により基づき診断をされていたが、臨床経過が一致しない症例もあり遺伝子的分類が重要視されつつあった。1998年に Cairncross らが 1p19q の共欠失を持つグリオーマは予後不良であることを報告し (Cairncross JG et al. J Natl Cancer Inst. 1998)、2008年に Parsons らが *isohydrogennase 1 (IDH1)* の変異をもつグリオーマは変異を持たないグリオーマに対して有意に予後が良好であることを示し (Parsons DW et al. Science 2008)、この2つが予後予測マーカーとして優れていることが後に続く多数の研究によって示されてきた。申請者の研究グループはグリオーマ摘出組織に対してCGH法を行いコピー数異常による遺伝学的分類を報告し (Hirose Y et al. Neurosurgery 2011)、さらにそこに *IDH1* 変異を組み合わせることによって、より臨床経過に見合った報告が可能になることを報告した (Hirose y et al. Brain tumor Pathol. 2013)。しかし、CGH法は施行可能な施設が限定的であるという問題が生じる。そこでコピー数に依存せずにPCR法単独でCGH法で得られた分類と同等の分類が可能となれば他施設で迅速かつ簡便にグリオーマの分類が可能になり臨床上有用性が高いと考えた。また申請者の研究グループはPCR法にて *IDH1/2* 及び *p53* 遺伝子の変異解析を行うことで病理所見に基づく分類と同等の結果が出るという研究結果を得ており (図1)、更に *IDH1/2* 及び *p53* の変異解析を基に *IDH* 変異をもつグリオーマの約90%が以下に示すコピー数異常をきたすことも明らかにした。その分類とコピー数の異常は以下のとおりである

- A. *IDH* mutant gliomas without *p53* mutation (-1p/19q): Good prognosis
- B. *IDH* mutant gliomas with *p53* mutation (+7q, +8q, -9p, -11p): Intermediate prognosis
- C. *IDH* wild type gliomas: Poor prognosis

図1のように本分類でも病理学的分類と比較して明確に予後を予測することは可能であるが、今後の課題は最も予後の良いと考えられるA群においても自験例では約28%に再発例が認められているという点であり、A群での再発を変異解析にて予測することができれば、よりこの遺伝子診断の精度は向上する。なお-1p/19qのグリオーマの予後不良因子は現在解明されていない。またB群は再発までの経過は数年要するが、自験例では再発はほぼ必発であるため、その再発及び悪性化に関わる因子を同定することを目的とする。図2に当時申請者らが提唱した遺伝学的分類を示す。

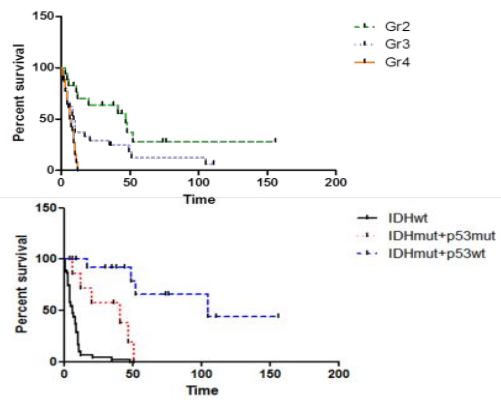


図1 病理所見に基づくグリオーマの分類(上)とPCRによるグリオーマの遺伝学的分類(下)の生存曲線の比較を示す。

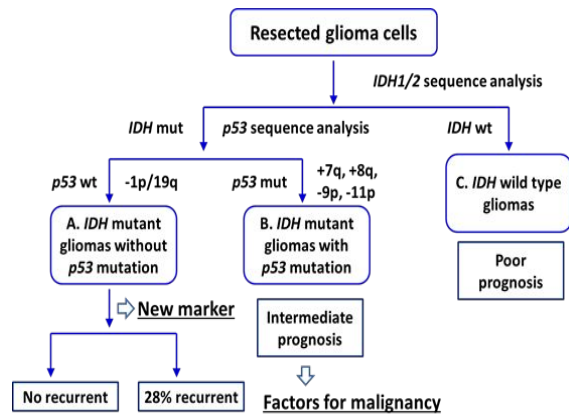


図2 申請者らが提唱するPCRによるグリオーマの遺伝学的分類、各群のコピー数異常及び予後を要約し、本研究において明らかにしようとすることを下線で示す。

2. 研究の目的

申請者の研究グループはこれまでグリオーマ摘出組織に対し Comparative genomic hybridization (CGH) 法を行いコピー数異常による遺伝学的分類を報告し、その分類をより簡便に臨床応用するために申請者は poly chain reaction (PCR) 法単独での遺伝学的分類を目指しそれを可能にした (Nakae S et al. PLoS One 2015)。本研究では申請者が報告したPCR法単独でのグリオーマの遺伝子診断についてさらに精度をあげるために次世代シーケンサーによる解析を行いさらにもう1つの遺伝子変異マーカーを発見すること、ならびに特定の遺伝子群のグリオーマに対しマイクロアレイを行い、コピー数異常を解析し、またその領域に含まれる遺伝子を解析することにより悪性化に関与する因子を同定することを目的とする。具体的にはA群の再発例に共通して認められる遺伝子変異を明確にする。また *IDH* 及び *p53* 変異をもつB群のグリオーマの初回手術例及び再発例をマイクロアレイで解析、比較検討することにより悪性化に関する因子を検索し臨床応用するための基盤となる研究を行う。

3. 研究の方法

グリオーマの遺伝学的特徴を臨床応用へと発展させるために本研究計画では以下の研

究項目を予定している。

- (1) *IDH* 変異と-1p/19q をもつ A 群のグリオーマ再発例に共通の遺伝子変異部位を特定する。
- (2) 共通の変異部位を同定後、PCR 法（サンガー法）にて同様の変異解析を行う。
- (3) *IDH* 及び *p53* 変異をもつ B 群のグリオーマの悪性化に関する因子を検索する。

(1) -1p/19q のグリオーマの再発例に共通の遺伝子変異部位を同定する

これまでに-1p/19q をもつグリオーマの中で予後を分類する遺伝子は認められていない。上述したように-1p/19q をもつグリオーマは予後不良であると考えられているが、-1p/19q をもつグリオーマの中には頻度は高くないが（自験例で 28%）再発をきたす症例を認めている。再発までの期間は平均 56 か月であり B 群の 29 ヶ月、C 群の 7.5 ヶ月と比較すると経過は長いものの、手術による摘出率、術後療法の有無に関係なく再発する例としない例が存在するため、申請者のグループは今後その再発の有無を分ける遺伝子変異の同定を試る。

次世代シーケンサーを用いた全エクソーム及びプロモーター領域の変異検索

本学におけるグリオーマ手術標本のうち新鮮凍結組織として利用可能な-1p/19q をもつグリオーマを解析対象とする。-1p/19q をもつグリオーマを再発例、非再発例に分類し、次世代シーケンサーにより全エクソン及びプロモーター領域の変異を検索する。入手可能であれば各症例の血液または毛髪 DNA も解析し、もとより所持していた変異を除外する。（ただし家族歴の少ない疾患ではあるがもともと所有していた変異が原因となっている可能性も考慮する必要はある）。以上の手法により再発した-1p/19q を示もつグリオーマに共通して認められ、再発していない例で認められない変異を検索する

(2) 再発した-1p/19q をもつグリオーマで共通して認められる変異部位の同定後、サンガー法による同定部位の変異解析

申請者のグループは *IDH1/2* 及び *p53* DNA binding domain(exon5-8)をサンガー法により変異解析を行い、摘出したグリオーマを迅速に分類することを可能にした。次世代シーケンサーによって候補となる変異部位が見つかった場合これを新たなマーカーとし、サンガー法により解析可能かどうかを解析する。解析に使用した-1p/19q をもつグリオーマの新鮮凍結組織 20 例に加え、FFPE でしか存在しない-1p/19q をもつグリオーマでも追加の変異解析を施行し、マーカーとして利用可能かどうかを確認する。

(3) *IDH* 及び *p53* 変異をもつグリオーマ（B 群）の悪性化に関する因子を検索

*IDH* 及び *p53* 変異をもつグリオーマ（B 群）は病理学的所見、術後療法の有無に関わらず再発の傾向がある（自験例では 2014 年の手術を除くと 100%）。この群の特性としては比較的良性のものが悪性化していく形態のものが多い。よって悪性化因子を検索することができれば将来的にそれを予防することや、再発の徴候をより早期に発見するなど臨床応用が可能になるかもしれない。現在のところ、再発に関与し治療のターゲットのなるような遺伝子は解明されていない。申請者の行った CGH 法の解析によれば手術回数が増加するに従い、+8q, -9p, -11p などのコピー数異常がみられる傾向にある。

OncoScan array による悪性因子の検索

OncoScan array は 2013 年に Affymetrix 社から発売された FFPE でも解析可能なコピー数異常を検索するマイクロアレイである。CGH 法によるコピー数解析では数 Mbb 以上の loss または gain でないと検索できないのに対し OncoScan array では 100~300kbp という密度で羅列的にコピー数解析を行うことが可能であり、そのコピー数、その領域に含まれる遺伝子もリストアップすることが可能である。

*IDH* 及び *p53* 変異をもつグリオーマの初回手術例、2 回目手術例を OncoScan array により解析し、それぞれの症例の進行の速さ、治療抵抗などを含めた予後、CGH 法の解析結果などを照らし合わせるにより悪性化に関する因子を検索する。

#### 4. 研究成果

(1) 申請者らはまず PCR 法単独での簡易型分類として *IDH* 変異をもつが *p53* 変異をもたない A 群（ほとんどは 1p/19 共欠失をもつ）と *IDH* 及び *p53* 変異をもつ B 群（多くは +7q, +8q, -9p, -11p をもつ）に分類し、本研究課題としてそれぞれのタイプの悪性化因子、再発因子の同定を目標とした。そのために我々はまず術前及び再発時の CT 画像、MRI 画像、更に腫瘍代謝物を定量できる MR spectroscopy を用いて、画像所見からこれらの分類が可能かどうか検討した。症例は 2005 年から 2015 年に当施設で初回手術を行った成人の天幕上のグリオーマの患者の術前 CT 検査、MRI 検査および MR spectroscopy の結果の解析と、摘出した組織を Sanger 法にて *IDH*, *TP53* の変異解析を行った。その結果、石灰化、側頭葉病変および脂質 13（脂質 13 / 総コリン比）は、A 群と B 群を識別するために統計学的に有意なパラメーターであることを報告した（Nakae S. et al. J Neuro-oncol. 2017）。

(2) 更に 2001 年から 2016 年にかけて当施設にて摘出術を行った 66 例の *IDH* 変異型グリ

オーマ患者の MRI 画像を検討したところ、申請者らはグリオーマの再発病変は5つのパターンに分類が可能であり、これら中でも *IDH* 及び *p53* 変異をもつ B 群のグリオーマでのみ頭蓋内遠隔転移の再発が起こることを報告した。また、頭蓋内遠隔の再発形式を認める症例では MRI 検査の拡散テンソル画像にて初発病変と再発病変の間に神経線維束の介在を認め、次世代シーケンサーによる解析では +8q (特に 8q22~24 領域で high copy gain) が認められることを報告した (Nakae S et al. Oncotarget. 2017)。

(3) 現在申請者は、神経線維に沿って発症する頭蓋内遠隔再発と 8q22~24 領域に存在する遺伝子の *c-Myc* が関連しているのではないかと仮説をたて、*c-Myc* ならびに同じ Wnt シグナル伝達経路で悪性腫瘍との関連性が報告されている *CTHRC1* の免疫染色を行うなど、頭蓋内遠隔再発へ関与する因子について検討中である。また、A 群および B 群のグリオーマの利用可能な新鮮凍結組織を用いて RNA シーケンスを行った。現在はこれらの結果から悪性化因子と考えられる変化や再発の徴候と考えられる因子など解析中である。

#### 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 4 件)

(1) Nakae S et al. Prediction of genetic subgroups in adult supra tentorial gliomas by pre- and intraoperative parameters. J Neurooncol. 2017, 131, 403-412 DOI: 10.1007/s11060-016-2313-8. 査読有

(2) Nakae S et al. Remote intracranial recurrence of *IDH* mutant gliomas is associated with *TP53* mutations and an 8q gain. Oncotarget, 2017, 8, 84729-84742, DOI: 10.18632/oncotarget.20951. 査読有

(3) Nakae S et al. Atypical intraosseous meningioma with growth hormone deficiency and hyperparathyroidism after craniospinal irradiation. Child's Nervous System, 2017, 33, 2077-2078, 10.1007/s00381-017-3587-7. 査読有

(4) Nakae S et al. Novel Application of Time-Spatial Labeling Inversion Pulse Magnetic Resonance Imaging for Diagnosis of External Hydrocephalus. World Neurosurgery, 2018, 109, 197-201, DOI: 10.1016/j.wneu.2017.09.175. 査読有

[学会発表](計 4 件)

(1) Shunsuke Nakae, Intracranial remote recurrence in *IDH* mutant gliomas is associated with *TP53* mutations and 8q gain, ASNO 2017, 2017

(2) 中江俊介、*IDH* 変異型グリオーマにおけ

る頭蓋内遠隔転移と *TP53* 変異及び 8q gain との関連性、第 35 回日本脳腫瘍学会学術集会、2017

(3) 中江俊介、*IDH* 変異型グリオーマにおける頭蓋内遠隔転移と *TP53* 変異及び 8q gain との関連性、第 49 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2017

(4) 中江俊介、*IDH* 変異型グリオーマの再発パターンとコピー数異常との関連性の検討、第 40 回日本脳神経 CI 学会総会、2017

[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

中江 俊介 (Nakae Shunsuke)

藤田保健衛生大学・医学部・客員助教

研究者番号：20622971