

令和 3 年 6 月 27 日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K10874

研究課題名(和文) グリオーマ血清/髄液中DNA高感度解析によるliquid biopsyの確立

研究課題名(英文) Glioma liquid biopsy of serum and cerebrospinal fluid using digital PCR and next-generation sequencer

研究代表者

齊藤 邦昭 (Saito, Kuniaki)

杏林大学・医学部・学内講師

研究者番号：50446564

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：難治性のグリオーマにおいて血清/髄液中cell free DNA (cfDNA)を抽出し、遺伝子変異やDNAメチル化について高感度解析を行い、腫瘍の診断や再発の早期発見、バイオマーカーの検出を目指すことを目的とした。グリオーマ症例のcfDNAを用いて、デジタルPCRによるIDH1変異やTERTプロモーター変異の検出が可能であった。また、初発時、再発時の腫瘍検体について次世代シーケンサーを用いて遺伝子変異解析を行い、腫瘍の時間的多様性やhypermutator phenotype化を確認した。cfDNAの次世代シーケンサーによる解析には、抽出DNAの質を上げる必要があると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

血清/髄液中のcfDNAを高感度解析することで、IDH変異やTERT変異などグリオーマの基本的な変異を検出することが高い感度特異度でできるようになった。グリオーマの非侵襲的な診断法の確立につながり、治療効果の判定や再発の検出としても画像診断より高い精度で行える可能性が示された。腫瘍の経時的な変化に伴う治療方針の最適化を行うことも可能となり、治療困難なグリオーマの予後改善に大きく貢献しうる。さらに、次世代シーケンサーを用いて経時的に解析が可能となれば、腫瘍の時間的多様性の解明から再発/悪性転化の機序の解明につながる可能性も秘めている。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to develop liquid biopsy for glioma using high-sensitive digital PCR. We extracted cell free DNA (cfDNA) from serum and cerebrospinal fluid and analyzed mutation and DNA methylation to achieve less-invasive diagnosis, early detection of recurrence and identification of biomarker. IDH1 mutation and TERT promoter mutation was identified with high sensitivity and specificity from cfDNA of glioma cases. Next generation sequencer (NGS) analysis of tumor DNA identified hypermutator phenotype and temporal heterogeneity of the glioma. Higher quality of tumor-derived circulating DNA was needed for liquid biopsy using NGS.

研究分野：悪性脳腫瘍

キーワード：liquid biopsy グリオーマ digital PCR cancer panel

1. 研究開始当初の背景

グリオーマは原発性脳腫瘍の中で最も頻度が高い腫瘍であるが、予後不良であり未だ満足な治療成績が得られていない。最適な治療のためには腫瘍の遺伝子解析によりバイオマーカーを検出する必要がある。特に、標準治療薬であるテモゾロミドの作用機序に関わり、予後予測因子である **O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)** 遺伝子のメチル化やミスマッチ修復 (**MMR**) 遺伝子変異の解析が重要である。また、テモダール治療に起因する **MMR** 機構の異常により、変異が蓄積して **hypermutator phenotype** となることが報告されており、治療経過中にも腫瘍由来の遺伝子解析モニタリングを行うことが、治療最適化につながるものと考えられる。しかし、手術によるサンプル採取は脳という部位特性から侵襲が高いため、経時的に行うことはできず、部位によっては全く採取できない場合もある。近年、グリオーマにおいて血清や髄液中のバイオマーカー検出が可能となり、非侵襲的な方法として注目されている。血清中腫瘍由来 **DNA** の解析により、**IDH** 変異、**TERT** プロモーター変異、**1p19qLOH**、**MGMT** メチル化などが検出されているが、現時点では臨床応用できるほど信頼性が高いとは言えない状況にある。これらの遺伝子異常が血清や髄液から検出できれば、グリオーマの診断やバイオマーカーの検出、再発の早期検出などにつながる可能性がある。

近年、わずかに含まれる腫瘍由来遺伝子の異常を検出、解析するためにデジタル **PCR** という技術が開発された。デジタル **PCR** はわずかに含まれる変異遺伝子を検出できる次世代の技術であり、変異解析のみならず、メチル化解析も可能である。デジタル **PCR** を用いた血清 **DNA** の **MGMT** メチル化解析により正確な予後予測を行った報告があり、期待がもてる方法である。また、グリオーマ髄液中の腫瘍由来 **DNA** の解析により腫瘍の **heterogeneity** や **hypermutator** 化を検出した報告もある。

2. 研究の目的

本研究では、グリオーマ患者血清および髄液中の腫瘍由来 **DNA** の遺伝子変異や **DNA** メチル化についてデジタル **PCR** を用いた高感度解析を行うことにより、グリオーマ **liquid biopsy** の確立を目指す。デジタル **PCR** による解析が可能であった検体については、次世代シーケンサーを用いた網羅的な遺伝子変異解析により、重要な遺伝子変異や **hypermutator** の検出を行う。さらに、初発時、治療経過中、および再発時に検体を採取して解析を行い、遺伝子変異やメチル化の経時的変化をみることで、診断の補助、治療効果の判定、再発の早期検出を行うと共に腫瘍の時間的多様性を示す。

3. 研究の方法

以下の方法で本研究の実施を計画した。

まず現在保有しているグリオーマ血清検体から **DNA** を採取し、**IDH** 変異や **TERT** プロモーター変異、**MGMT** メチル化などの既知の分子の解析を、デジタル **PCR** による高感度解析にて行う。腫瘍検体 **DNA** との比較を行い、また予後との相関を確認してバイオマーカーとしての確立を行う。さらに、テモゾロミドを用いて治療を行う過程における血清/髄液 **DNA** 中の腫瘍由来遺伝子異常の検出を行い、初発時との比較から腫瘍の時間的多様性を示す。次世代シーケンサーによる網羅的がん関連遺伝子解析を行うことで、さらに詳細な変化を確認し、**hypermutator** 化の同定も行う。これら腫瘍遺伝子の経時的解析をもとに、最適な治療を選択する個別化医療、**precision medicine** の基盤構築を行う。

(1) 血清中 **DNA** を用いた既知の遺伝子変異、**DNA** メチル化解析

現在保有しているグリオーマ血清から **DNA** を抽出し、**IDH** 変異、**TERT** プロモーター変異などの既知のバイオマーカーとなる遺伝子異常の解析を行う。杏林大学共同研究施設が保有する QuantStudio™3D デジタル **PCR** システムを用いて、高感度、高精度の解析が可能である。**IDH1** 変異や **TERT** プロモーター変異に関しては、**Applied Biosystems** 社が提供するプライマー試薬を用いて定量解析を行う。この血清解析結果を、既に全てのグリオーマにおいて解析済みである腫瘍 **DNA** における解析結果と比較する。さらに、臨床情報と照らし合わせて予後との相関を示すことでバイオマーカーとしての有用性を検証する。

また、髄液中の **DNA** に関しても採取・抽出してデジタル **PCR** を用いて同様の解析を行うことで、血清 **DNA** の検出、解析が困難な症例においてもバイオマーカーが得られるようにする。

(2) 治療経過における経時的な変化（時間的多様性）を確認

初発時の腫瘍検体、血清、髄液での解析を行った上で、**prospective** に経過を追っていく。テモゾロミドで治療を行っていく過程において、治療効果の判定、再発の早期同定、また再発した際の腫瘍の遺伝子異常の状態をリアルタイムに解析していく。まずは血清中の腫瘍由来 **DNA** の検出を、デジタル **PCR** を用いて行い、臨床所見や画像所見と対比させて再発の早期同定が可能かどうかを検証する。もともとの腫瘍検体、血清、髄液 **DNA** での遺伝子変異と対比させることで、腫瘍の時間的多様性を同定する。テモゾロミド治療中の **MGMT** メチル化の変化や **MMR** 遺

伝子変異の変化について経時的にフォローしていくことで、治療耐性とどのように関連しているかを明らかにすると共に、遺伝子異常の変化に応じた最適な治療法について検討する。

(3) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析

多数の遺伝子変異の解析を行うため、次世代シーケンサー（本学の共同研究施設に設置されている **Ion torrent** の Ion PGM™ System）を用いた遺伝子変異解析を行う。がん関連遺伝子を網羅的に解析することができる Ion Ampliseq™ Comprehensive Cancer Panel を用いて、**409** 遺伝子、**15,749** 変異の検出を行う。初発時に腫瘍検体もしくは髄液中の腫瘍由来 **DNA** を用いて解析を行い、腫瘍の遺伝子変異の状態を確認しておく。血清中 **DNA** の解析や画像経過で再発が同定された場合、髄液中腫瘍由来 **DNA** を用いて再度 **Cancer Panel** を用いた遺伝子変異解析を行う。初発時と比べ、がん関連遺伝子変異がどのように変化したかを比較することにより、腫瘍の時間的多様性についてさらに詳細な情報を得ることができる。さらには、テモゾロミド治療中に誘発される **hypermulator phenotype** についてもこの解析により検出することができる。

4. 研究成果

(1) 血清/髄液中の DNA 抽出

Qiagen 社の **QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit** を用いてグリオーマの血清/髄液中腫瘍由来 **DNA** 抽出を試みたが、ごく微量しか検出できなかった。遺伝子変異やメチル化解析を行うには十分ではなく、抽出方法を見直すこととした。プロメガ社の自動核酸精製装置 (**Maxwell RSC Instrument**) により抽出を試みたところ、多くの検体で解析可能な **DNA** の抽出ができた。グリオーマのグレード別、初発/再発に分けて血清および髄液中 **cfDNA** の濃度を図 1 に示す。血清中 **cfDNA** は、グレード 1 のグリオーマで平均 0.95ng/μl、グレード 4 で平均 2.23ng/μl で、グレード 4 の検体で有意に抽出量が多かった。また初発例と再発例と比較すると、再発例の検体で有意に抽出量が少なかった。

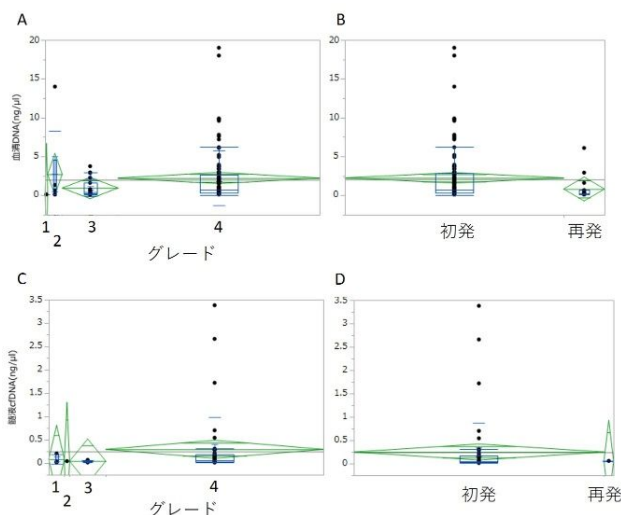


図 1 **cfDNA** の濃度 **A:** グレードごとの血清 **cfDNA** 濃度、**B:** 初発/再発の血清 **cfDNA** 濃度、**C:** グレードごとの髄液 **cfDNA** 濃度、**D:** 初発/再発の髄液 **cfDNA** 濃度

(2) 血清/髄液 DNA のデジタル PCR 解析

デジタル **PCR** で腫瘍から抽出した **DNA**、血清中 **cfDNA**、髄液中 **cfDNA** を用いて **IDH1** 変異、**TERT** プロモーター変異等の解析を行った。腫瘍検体、血清中 **cfDNA** を用いた **IDH1** 変異解析の結果を図 2 に示す。腫瘍検体では、**IDH1** 変異はサンガーシーケンズの解析結果とすべて一致した。血清中 **cfDNA**、髄液中 **cfDNA** 共に腫瘍検体と高い相関を示す結果であり、**IDH1** 変異に関して腫瘍検体と血清 **cfDNA** の解析を比較すると、感度 **83.3%**、特異度 **96.4%**であった。

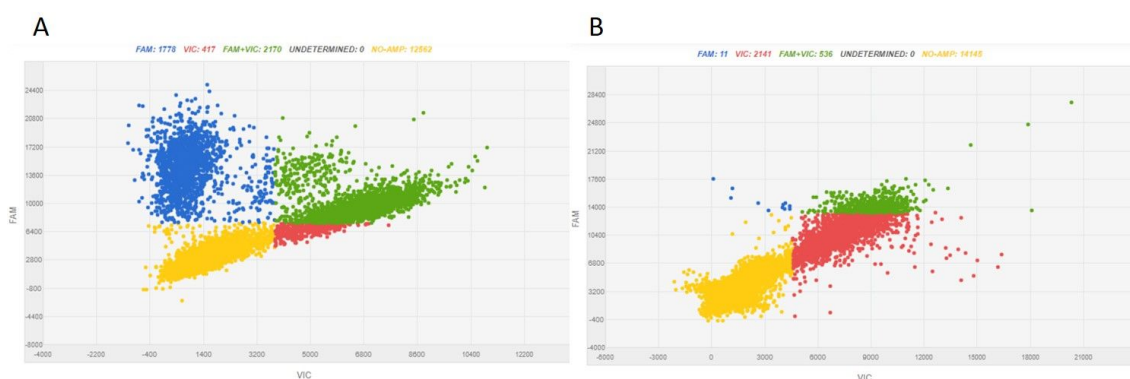


図 2 **A:** 腫瘍検体から抽出した **DNA** で解析した **IDH1** 変異症例、**B:** 血清 **cfDNA** で解析した **IDH1** 変異症例(同一症例)

(3) 治療経過における経時的な変化

テモゾロミドで治療後に再発したグリオーマの初発/再発の腫瘍検体について、テモゾロミド耐性に関与する因子 (**MGMT** メチル化、**MMR** 蛋白の **MSH2**、**MSH6**、**MLH1**、**PMS2**) を解析し、その経時的変化について検証した。**MGMT** メチル化は初発時と再発時で変化がないことが多いが、**MMR** 蛋白は、特に **MGMT** メチル化のある症例で悪性転化して再発した場合において発現の低下がみられた。このような症例で、変異が蓄積して **hypermulator phenotype** として再発する可能性が高いと考えられた。

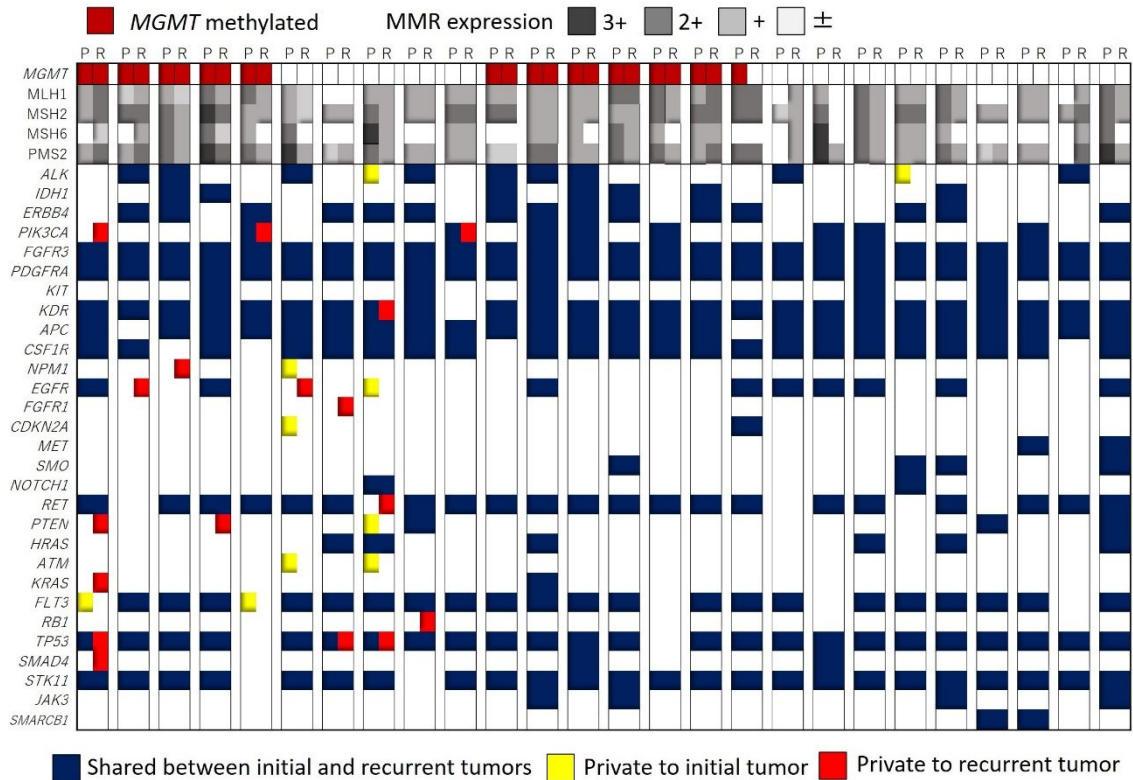


図 3：初発時/再発時の腫瘍検体における MGMT メチル化、MMR 蛋白発現、遺伝子変異解析

(4) 次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析

MMR 蛋白発現低下の原因として、MMR 遺伝子変異の獲得が考えられたため、次世代シーケンサー(Ion Ampliseq Cancer Hotspot Panel および Ion Ampliseq Comprehensive Cancer Panel) を用いて遺伝子変異の変化や hypermutator 化について検証した。Hypermutator phenotype として再発した腫瘍では、MMR 遺伝子変異の獲得がみられており、テモゾロミド治療による変化と考えられた。

血清/髄液中の cfDNA においても初発時/再発時の検体において次世代シーケンサーによる解析を試みたが、DNA 量の問題か安定した解析が行えなかった。腫瘍検体の解析によりコントロールデータが得られたため、今後、初発時、テモゾロミド治療中のフォローアップ、再発時の患者血清や髄液の検体を用いて liquid biopsy を成功させることで、hypermutator phenotype の診断やリスク評価につながると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nomura M, Saito K, Aihara K, Nagae G, Yamamoto S, Tatsuno K, Ueda H, Fukuda S, Umeda T, Tanaka S, Takayanagi S, Otani R, Nejo T, Hana T, Takahashi S, Kitagawa Y, Omata M, Higuchi F, Nakamura T, Muragaki Y, Narita Y, Nagane M, Nishikawa R, Ueki K, Saito N, Aburatani H, Mukasa A	4. 巻 Feb 13;9(1)
2. 論文標題 DNA demethylation is associated with malignant progression of lower-grade gliomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1903
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-38510-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabei Y, Kobayashi K, Saito K, Shimizu S, Suzuki K, Sasaki N, Shiokawa Y, Nagane M.	4. 巻 Jan 1;51(1)
2. 論文標題 Survival in patients with glioblastoma at a first progression does not correlate with isocitrate dehydrogenase (IDH)1 gene mutation status.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Jpnese Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 45-53
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jjco/hyaa162	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Arita H, Matsushita Y, Machida R, Yamasaki K, Hata N, Ohno M, Yamaguchi S, Sasayama T, Tanaka S, Higuchi F, Iuchi T, Saito K, Mizoguchi M, Kishima H, Nakada M, Sonoda Y, Tominaga T, Nagane M, Nishikawa R, Kanemura Y, Kuchiba A, Narita Y, Ichimura K.	4. 巻 Nov 23;8(1)
2. 論文標題 TERT promoter mutation confers favorable prognosis regardless of 1p/19q status in adult diffuse gliomas with IDH1/2 mutations.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Acta Neuropathol Commun.	6. 最初と最後の頁 201
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40478-020-01078-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitahama K, Iijima S, Sumiishi A, Hayashi A, Nagahama K, Saito K, Sasaki N, Kobayashi K, Shimizu S, Nagane M, Shibahara J.	4. 巻 Jan;38(1)
2. 論文標題 Reduced H3K27me3 levels in diffuse gliomas: association with 1p/19q codeletion and difference from H3K27me3 loss in malignant peripheral nerve sheath tumors.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathol.	6. 最初と最後の頁 23-29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00382-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計13件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 6件）

1. 発表者名 齊藤邦昭、清水早紀、小林啓一、佐々木重嘉、山岸夢希、島田大輔、塩川芳昭、永根基雄
2. 発表標題 グリオーマおよびグリオーマ幹細胞におけるIGFBP2メチル化解析
3. 学会等名 第20回日本分子脳神経外科学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齊藤邦昭、小林啓一、清水早紀、野崎江里子、佐々木重嘉、山岸夢希、島田大輔、飯島昌平、塩川芳昭、永根基雄
2. 発表標題 がん遺伝子パネルにより同定した膠芽腫のhypermutator phenotype
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第78回学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Eriko Nozaki, Keiichi Kobayashi, Nobuyoshi Sasaki, Yuki Yamagishi, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Different types of hypermutator phenotype of glioblastoma according to mutation patterns of mismatch repair genes
3. 学会等名 24th Annual meeting and education day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Eriko Nozaki, Keiichi Kobayashi, Satoshi Kume, Tomohiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Detailed analysis of mutation change after treatment in glioblastoma
3. 学会等名 The 36th Annual Meeting of the Japan Society of Brain Tumor Pathology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 齊藤邦昭、清水早紀、野崎江里子、小林啓一、久米賢、千葉知宏、柴原純二、塩川芳昭、永根基雄
2. 発表標題 膠芽腫に対するテモゾロミド治療の現状と薬剤耐性獲得の機序
3. 学会等名 日本脳神経外科学会第77回学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Eriko Nozaki, Keiichi Kobayashi, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Mutation change after temozolomide treatment in primary glioblastoma
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Motoo Nagane, Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Eriko Nozaki, Keiichi Kobayashi, Satoshi Kume, Tomohiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa,
2. 発表標題 Detailed analysis of mutation change after treatment in glioblastoma
3. 学会等名 The 13th Meeting of the European Association of Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Eriko Nozaki, Keiichi Kobayashi, Satoshi Kume, Tomohiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Mechanism of acquired mutation after TMZ treatment
3. 学会等名 23rd Annual Meeting of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Kaori Suzuki, Keiichi Kobayashi, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Prognostic significance of MGMT promoter and mismatch repair system in newly-diagnosed and recurrent malignant gliomas
3. 学会等名 5th Quadrennial Meeting of the World Federation of Neuro-Oncology Societies (WFNOS) (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Kaori Suzuki, Saki Shimizu, Keiichi Kobayashi, Daisuke Shimada, Zentaro Kawaida, Tomohiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Integrated molecular analysis of newly diagnosed and recurrent glioblastoma after temozolomide treatment
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Kaori Suzuki, Saki Shimizu, Keiichi Kobayashi, Daisuke Shimada, Zentaro Kawaida, Kazuhiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Goal-setting of extent of resection on the basis of molecular status in glioma surgery
3. 学会等名 第76回日本脳神経外科学会学術総会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Kaori Suzuki, Keiichi Kobayashi, Daisuke Shimada, Satoshi Kume, Shohei Iijima, Tomohiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Temozolomide-induced mismatch repair insufficiency and hypermethylation of MGMT promoter with hypermutation in malignant glioma
3. 学会等名 22nd Annual Scientific Meeting and Education Day of the Society for Neuro-Oncology (国際学会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Kuniaki Saito, Saki Shimizu, Kaori Suzuki, Keiichi Kobayashi, Daisuke Shimada, Satoshi Kume, Shohei Iijima, Tomohiro Chiba, Junji Shibahara, Yoshiaki Shiokawa, Motoo Nagane
2. 発表標題 Integrated molecular analysis of newly diagnosed and recurrent glioblastoma after temozolomide treatment
3. 学会等名 第35回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------