

令和元年6月24日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K16652

研究課題名（和文）神経膠腫におけるデジタルPCR法を用いたLiquid biopsyの確立

研究課題名（英文）Liquid biopsy with digital PCR in gliomas

研究代表者

赤木 洋二郎 (Akagi, Yojiro)

九州大学・大学病院・助教

研究者番号：10570773

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,800,000円

研究成果の概要（和文）： 神経膠腫患者において、髄液検体から採取したcell free DNAに関してdigital PCR法を用いた解析を行ったところ、予後予測および治療反応性予測に有用とされるIDH1遺伝子変異、H3F3A遺伝子変異およびTERT promotor変異を高率に検出および定量することができた。本研究では神経膠腫において腫瘍摘出を必要としない低侵襲な診断法（髄液を用いたliquid biopsy）の基礎が確立された。現在当施設において本研究の成果をさらに発展させる目的で「Liquid biopsyによる脳腫瘍新規診断バイオマーカーの探索」に関する臨床研究を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマの診断や治療においては、腫瘍細胞が持つ遺伝子の変異を特定することが近年非常に重要視されている。従来は手術で摘出した腫瘍組織を用いて遺伝子変異を検出していたが、当施設ではデジタルPCR法という手法で脳脊髄液のみを用いて代表的な神経膠腫の遺伝子変異の検出に成功した。これにより、手術前に針で腰から採取した髄液で診断をつけたり、治療後の評価を行ったりといったことが可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）： In glioma patients, analysis of cell free DNA collected from cerebrospinal fluid samples using digital PCR method enabled us to detect and quantify IDH1 gene mutation, H3F3A gene mutation and TERT promoter mutation at a high rate, which are useful for prognosis and treatment response prediction. Our study established the basis of minimally invasive diagnostic method (liquid biopsy based on CSF) in gliomas that does not require tumor removal by surgery. For the purpose of further developing the results of this research, the clinical trial “Exploration of new diagnostic biomarkers for brain tumors with liquid biopsy” is being conducted at our facility.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：liquid biopsy 神経膠腫 IDH1変異 H3F3A変異 TERT promotor変異 digital PCR

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、神経膠腫の診断や治療方針決定において腫瘍細胞に特有の遺伝子変異を特定することが重要視されている。脳腫瘍の病理診断に関する最新の WHO 分類(2016)においても、神経膠腫の診断分類は従来の病理所見に分子遺伝学的所見を統合したものとなっている。我々はこれまで Isocitrate dehydrogenase 1/2(IDH1/2)、H3 histone Family 3A(H3F3A)、BRAF 遺伝子、TERT promotor などの変異の検出法について研究してきた。腫瘍サンプルの DNA を用いた High Resolution Melting 法(HRM 法)と数学的な解析により、従来法である DNA シーケンシングよりも簡便で高感度かつ特異的な点突然変異検出を可能にした。しかし、いずれの手法も手術により脳腫瘍サンプルを得る必要があり、患者に対する侵襲度が非常に高い。またその摘出手術の機会は通常は一回のみであるため、術前診断や術後の治療経過中の経時的な病勢評価には使用できないという課題も残されていた。患者の血液や髄液、尿などから腫瘍特有の遺伝子変異を検出する Liquid biopsy は低侵襲かつ頻回に検査が可能な手法で、既に他癌腫では盛んに研究されており、神経膠腫においてもこの手法の応用が有望な検査法になる可能性が指摘されていた。

2. 研究の目的

本研究では、神経膠腫患者において Liquid biopsy による術前診断および治療効果判定の手法を確立することを目的とした。具体的には、神経膠腫患者の脳脊髄液に微量存在すると考えられる腫瘍由来 DNA が有する遺伝子変異、すなわち IDH1 遺伝子変異、H3F3A 遺伝子変異(特に H3K27M 変異)、BRAF 遺伝子変異、TERT promotor 変異などを検出・定量することを旨とした。

3. 研究の方法

計 24 症例の神経膠腫患者の髄液を遠心して細胞を除去した後、QIAamp Circulating Nucleic Acid Kit を用いて腫瘍細胞遊離 DNA(cell-free DNA; cfDNA)を抽出し、QuantoStudio 3D Digital PCR システムを用いて digital polymerase chain reaction(dPCR)法を行った。IDH1 遺伝子変異、H3F3A 遺伝子変異、BRAF 遺伝子変異、TERT promotor 変異に関して解析を行った。本研究を行うにあたり、「Liquid biopsy (リキッドバイオプシー)による脳腫瘍新規診断バイオマーカーの探索」という臨床試験を計画し、当施設の臨床試験倫理審査委員会において審査・承認を受けた。通常の摘出腫瘍サンプルを用いた病理診断の後、腫瘍サンプルから得た DNA について、HRM 法で遺伝子変異解析を行い遺伝子診断を確定させた。それらの 24 症例の患者の内、Anaplastic astrocytoma(AA)、IDH-mutant 1 例、AA、IDH-wildtype 3 例、Diffuse astrocytoma(DA)、IDH-wildtype 1 例、Anaplastic Oligodendroglioma(AO)、IDH-mutant 4 例、Diffuse midline glioma(DMG)、H3K27M-mutant 3 例、Glioblastoma(GBM)、IDH-mutant 3 例、GBM、IDH-wildtype 4 例においては腫瘍摘出術の最中に手術野より髄液を採取できた。また、その他の 5 症例(GBM、IDH-mutant 2 例、AA、IDH-mutant 1 例、AO、IDH-mutant 2 例)については手術前に腰椎穿刺により髄液を採取した。それぞれの髄液検体から得られた遺伝子解析結果と腫瘍サンプルから得た解析結果を比較した。

4. 研究成果

図 1 に示した通り、digital PCR 法で髄液検体から抽出した cfDNA より IDH1 変異を検出することができた(図中の青色のクラスター)。H3F3A 変異、TERT promotor 変異についても同様に検出された。検出率は IDH1 変異 13 症例中 13 症例、TERT promotor 変異 7 例中 5 例、H3K27M 変異 3 例中 2 例であった(感度 91.3%)。偽陽性例は 1 例も見られなかった(特異度 100%)

さらに、これらの髄液中の cfDNA より検出された変異陽性の遺伝子のコピー数を定量することが可能であった(図 2)。今後、これらの変異遺伝子コピー数を経時的に評価する、あるいは多数の症例を集積して評価することにより、病勢と変異遺伝子の相関について解析することが可能であることが示された。

また IDH 変異陽性例の内 1 例は、MRI 画像所見で腫瘍再発がない時点では髄液から腫瘍由来 DNA が検出できなかったものの、MRI にて再発・播種を認めた時点では腫瘍由来 DNA が検出されており、腫瘍の病勢と髄液中の腫瘍由来 DNA 量が相関する可能性も示唆された。

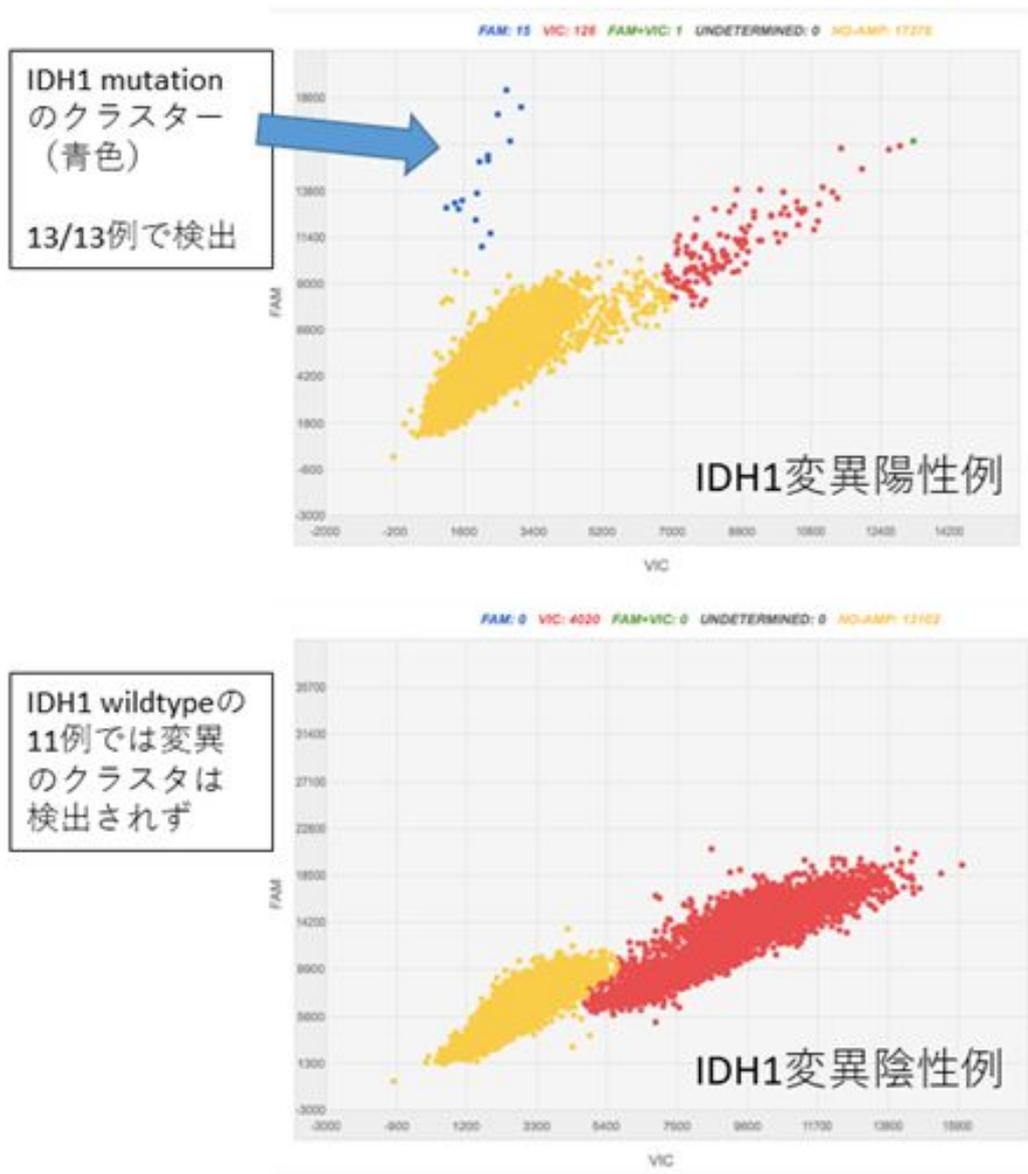
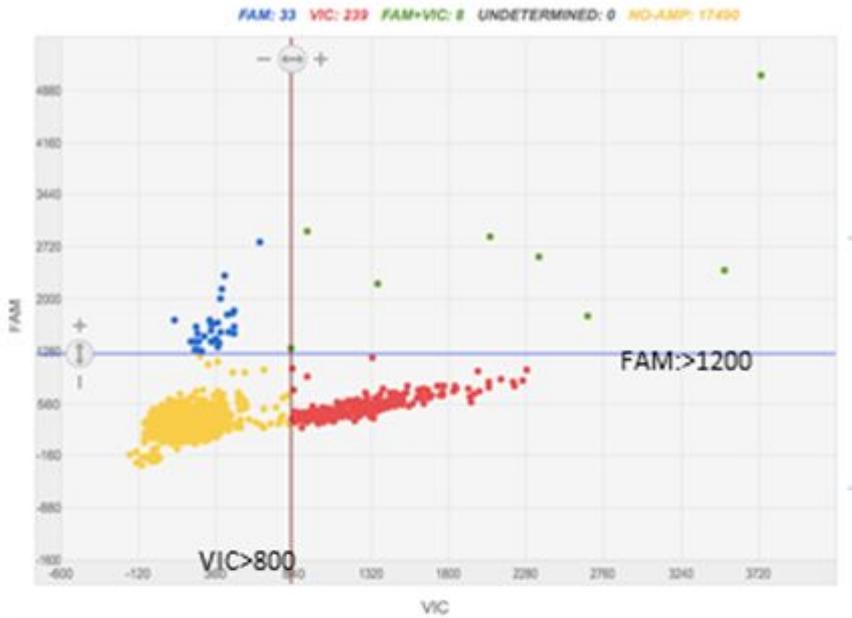
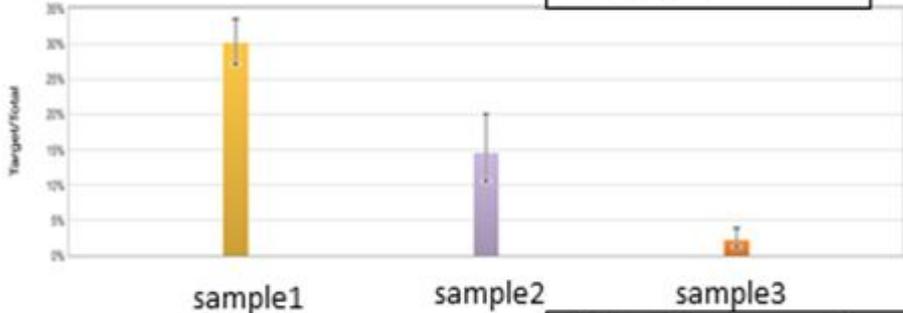


図 1 : 髄液由来 cfDNA を用いた digital PCR 法による IDH1 変異検出

Threshold :
 FAM:>1200
 VIC:>800に設定した場合



相対定量 : FAM/VIC



絶対定量 : コピー数/μl

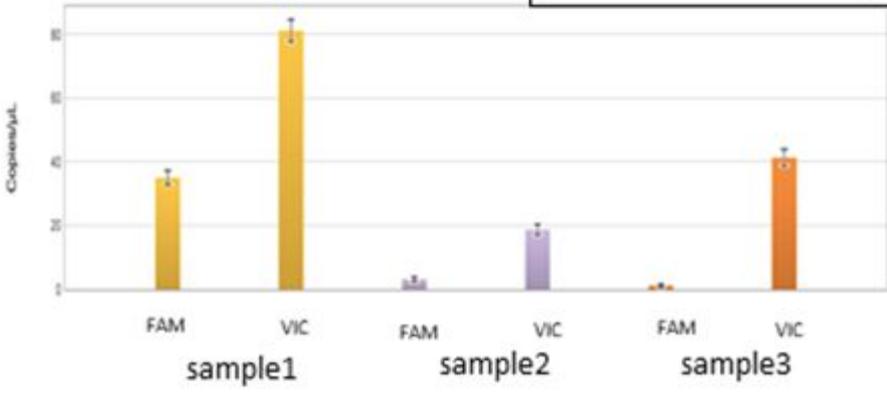


図 2 : 髄液由来 cfDNA より検出した TERT promotor 変異のコピー数定量

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Reclassification of 400 consecutive glioma cases based on the revised 2016WHO classification.

Akagi Y, Yoshimoto K, Hata N, Kuga D, Hatae R, Amemiya T, Sangatsuda Y, Suzuki SO, Iwaki T, Mizoguchi M, Iihara K.

Brain Tumor Pathology. 2018 Apr;35(2):81-89.

〔学会発表〕(計 3 件)

赤木 洋二郎、吉本 幸司、三月田 祐平、雨宮 健生、波多江 龍亮、空閑 太亮、秦 暢宏、溝口 昌弘、飯原 弘二

神経膠腫患者の血液・髄液検体を用いた digital PCR による IDH1 変異検出 (liquid biopsy) に関する報告

日本脳神経外科学会 第 76 回学術総会、一般口演 (2017 年)

赤木 洋二郎、吉本 幸司、三月田 祐平、雨宮 健生、波多江 龍亮、空閑 太亮、秦 暢宏、溝口 昌弘、飯原 弘二

神経膠腫患者の髄液を用いた digital PCR による IDH1 R132H 変異検出と定量

日本脳腫瘍学会 第 35 回学術集会、ポスター (2017 年)

藤岡 寛、赤木 洋二郎、秦 暢宏、雨宮 健生、三月田 祐平、空閑 太亮、溝口 昌弘、飯原 弘二

髄液を用いた分子診断による脳腫瘍の非侵襲的鑑別法

第 11 回 福岡県医学会総会、ポスター (2018 年)

〔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:

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:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者 該当なし

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号 (8 桁):

(2)研究協力者

研究協力者氏名：三月田 祐平

ローマ字氏名：Sangatsuda Yuhei

研究協力者氏名：雨宮 健生

ローマ字氏名：Amemiya Takeo

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。