

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：32607

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2022

課題番号：18K16569

研究課題名（和文）初回播種膠芽腫を用いた全エクソームシーケンスによる播種関連遺伝子の網羅的探索

研究課題名（英文）Identification of genes associated with glioblastoma dissemination using whole genome sequencing

研究代表者

柴原 一陽 (Ichiyo, Shibahara)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：30791016

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：膠芽腫は極めて予後不良の脳原発悪性腫瘍である。播種再発は膠芽腫における治療困難な病態であるが、播種病態を明らかにする臨床検体がないため、これまで解析が進んでいなかった。本研究で、膠芽腫播種病態を明らかにするために、初回播種膠芽腫という稀少検体に注目した全エクソームシーケンスを行った。この稀少病態の遺伝子変異背景を明らかにすることができ、さらに播種病態解明のための新たな研究の立案にも繋がった。今後のマルチオミックス解析により、播種病態に関する分子機構の解明が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膠芽腫は脳原発悪性腫瘍であるため、検体採取が極めて侵襲的である。これまで限られた検体で膠芽腫の病態解明を行わなければならなかった。さらに、播種病態は、腫瘍細胞が中枢神経系に散らばる病態であり、播種状態の検体採取は不可能であった。本研究では、独自の視点から、播種病態の検体採取を可能とし、且つ、その病態解明を試みる初めての研究である。当初は全エクソームシーケンス解析のみで病態解明が可能と考えていたが、マルチオミックス解析が急速に浸透している昨今、この播種病態研究においても同手法は必須である。本研究における独自のサンプリングを駆使し、播種病態解明をできる研究を進めることができている。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma is a primary brain tumor with a dismal prognosis. Dissemination is an untreatable condition in glioblastoma; however, no studies have been conducted on this topic due to the missing of appropriate tumor samples. In this study, we conducted whole exome sequencing using the tumor samples of the initially disseminated glioblastoma. We could elucidate the molecular background of this rare tumor condition and establish successive research proposals to further elucidate the dissemination in the multi-omics ways.

研究分野：脳神経外科

キーワード：膠芽腫 全エクソームシーケンス 播種

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膠芽腫は5年生存率10%未満、全生存期間中央値14か月、と予後不良の脳原発悪性腫瘍である。脳は機能を有するため、胃癌に対する胃全摘の様には拡大摘出はできず、病理学的表現を用いると「断端陽性」の摘出に留まる。それでも、近年の手術手技と放射線化学療法の進歩により局所制御はある程度可能になった。しかしながら、初回病変と離れた部位への再発(播種)を認める症例が少なからずある(図1)。初回再発時に播種を認める頻度は約20%とされ、再発を繰り返し腫瘍進展を認める終末期ではほぼ全例に認めると言っても過言でない。播種は、原発巣と連続しない中枢神経系遠隔部に出現する病変を指し、他癌種における腹膜播種同様に膠芽腫でも治療困難な病態であり、治療撤退の契機となる。

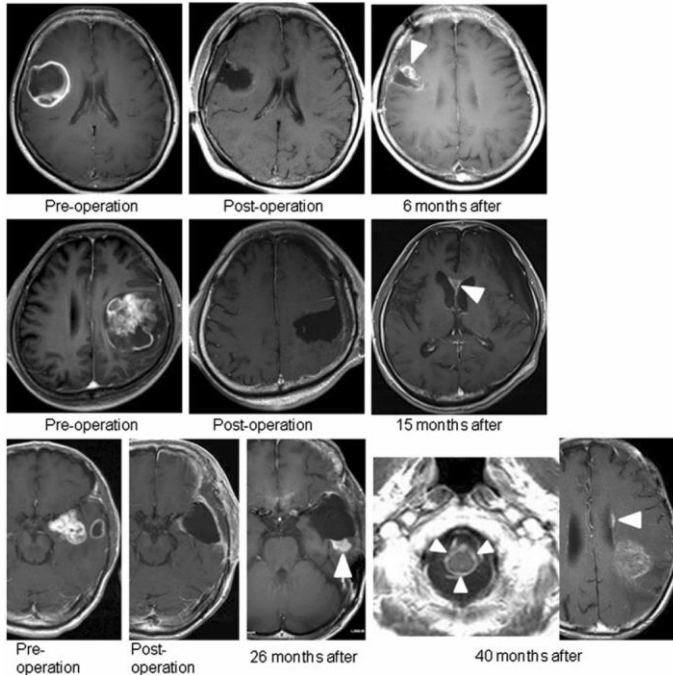


図1 再発形式

上段：局所再発 右前頭葉膠芽腫(左図)を全摘出(中央)したが、摘出腔周囲に再発(右図)

中段：播種再発 左頭頂葉膠芽腫(左図)を全摘出(中央)し、原発巣と連続しない遠隔部に再発(右図)

下段：初回再発は局所(26か月後)だが、終末期(40か月後)には延髄や脳室に播種(右二つ)を認める

(Shibahara et al., Neuro Oncol 2013 の Figure より)

申請者は、これまでこの播種病態に注目しており、神経膠腫の播種再発に関する多数の症例報告や臨床研究を行ってきた。特に、112例の膠芽腫例を解析し、播種再発に9p共欠失と脳腫瘍幹細胞マーカーCD133発現の関与を明らかにした(Shibahara et al., Neuro Oncol 2013)。さらに、86例の退形成性神経膠腫を解析し、IDH遺伝子野生型退形成性神経膠腫は高頻度に播種再発し、脳腫瘍幹細胞マーカーCD133やSOX2が高発現であることも明らかにした(Shibahara et al., Neuro Oncol 2015)。病態把握や播種の予測因子として、ある一定の成果は出せたが、網羅的な解析ではないため治療標的となるような遺伝子変異の解明には至っていないのが現状である。播種に関する研究の経験上、膠芽腫の長期生存を得るためには、この播種こそが新たに治療標的であると考え。故に、播種病態を明らかにし、播種制御が可能となれば、究極的には膠芽腫を局所に抑え込み、局所制御のみを標的とすればよく、膠芽腫予後改善に寄与することができる。

## 2. 研究の目的

近年の手術支援装置、手術手技、そして抗がん剤の進歩で、脳原発悪性腫瘍である膠芽腫の局所制御はある程度可能となった。その結果、遠隔再発すなわち播種再発が顕在化し、これが膠芽腫予後を規定する重要な病態となっている。本研究の目的は、膠芽腫の播種病態に関する基礎的知見を得ることである。申請者は悪性神経膠腫を対象とした解析で、播種に関連する臨床学的因子及びタンパク発現を既に明らかにしている(Shibahara, Neuro Oncol, 2013 and 2015)。しかし、いずれも網羅的解析ではなく、播種病態の機序解明までには至っていない。交絡因子をできる限り排除した上での解析を可能とするため、治療ナイーブな初発膠芽腫で且つ播種を呈している、初回播種膠芽腫という希少症例(図2)を対象とし、全エクソームシーケンスによる網羅的解析を行った。過去約300例の膠芽腫症例のう

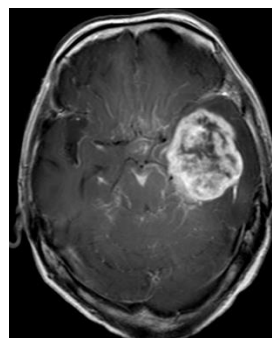


図2 初回播種膠芽腫代表例

造影MRI:左側頭葉内側の造影病変に加え、脳底槽や脳溝に沿って造影効果を伴う筋状の病変が多数認められる

ち、申請時点で初回播種膠芽腫例を少なくとも10例確認しており、その検体を有している。頻度としては膠芽腫全体の5%未満と希少である。

### 3. 研究の方法

凍結検体からのDNAはAllPrep DNA/RNA Kit (QIAGEN)を用いてRNAも同時に抽出した。正常血液を有する症例は血液からもDNAを抽出した。外部委託で、NovaSeq6000、Library prep kitはSureSelect Human V6、Paired End、9Gb/sampleで全エクソームシーケンスを行った。バイオインフォマティクス解析は、国立遺伝学研究所及び東北大学メディカルメガバンク機構のスーパーコンピューターに既にアカウントを有しておりその全エクソームシーケンスのパイプラインを用いて解析した。

### 4. 研究成果

15例の初回播種膠芽腫検体を収集し、全例に対して全エクソームシーケンスを行った。MappingはBWAを用いてreference genomeにmappingし、mutation callはMutect2を用い、Filter=PASSしたもの、non-synonymous変異であること、ToMMo 3.5k JPNv2に掲載されていないものを抽出した。変異解析の結果、膠芽腫における主要変異の内訳は、NF1変異を5例、PTEN変異を5例、TP53変異を3例、EGFR変異を2例、そしてEGFR増幅3例、PTEN欠失8例、CDKN2A欠失11例、CDK4増幅3例、MDM2増幅1例、を認めた。H3F3A変異を1例に認め、現在の分子分類でdiffuse midline glioma, H3K27M-alteredに分類され、膠芽腫でないことがわかった。15例の解析により、初回播種膠芽腫の遺伝子背景を明らかにでき、また症例によって興味深い変異を同定できたものの、この群を特徴づける変異の集積は明らかでなかった。

そこで、さらなる症例数の収集とマルチオミックスでの解析が必要と考え、23例の全エクソームシーケンス、及び20例のRNAシーケンスを行った。さらに、播種後髄液を用いたプロテオミクス解析を進め、臨床経過中に一度も画像上播種を呈さなかった膠芽腫25例のRNAシーケンスも行った。RNAシーケンスより得られたfastqデータは、trimmingの後、STARでmappingを行い、各遺伝子にマッピングされたリード数の計算を行う。そして、コントロールとした臨床経過中一度も播種していないサンプルのデータを用い、DEseq2を用いてdifferentially expression 遺伝子を解析し、プロテオミクス解析の基盤構築も行い、マルチオミクス解析を進めている。引き続きの研究を基盤C研究として進めている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Shibahara Ichiyo, Saito Ryuta, Kanamori Masayuki, Sonoda Yukihiro, Sato Sumito, Hide Takuichiro, Tominaga Teiji, Kumabe Toshihiro	4. 巻 137
2. 論文標題 Role of the parietooccipital fissure and its implications in the pathophysiology of posterior medial temporal gliomas	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 505 ~ 514
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3171/2021.7.JNS21990	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 Shibahara Ichiyo, Miyasaka Kazuhiro, Sekiguchi Akane, Ishiyama Hiromichi, Inukai Madoka, Yasui Yoshie, Watanabe Takashi, Sato Sumito, Hide Takuichiro, Kumabe Toshihiro	4. 巻 86
2. 論文標題 Long-term follow-up after BCNU wafer implantation in patients with newly diagnosed glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Neuroscience	6. 最初と最後の頁 202 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jocn.2021.01.037	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 Shibahara Ichiyo, Shibahara Yukiko, Hagiwara Hiroyuki, Watanabe Takashi, Orihashi Yasushi, Handa Hajime, Inukai Madoka, Hide Takuichiro, Yasui Yoshie, Kumabe Toshihiro	4. 巻 159
2. 論文標題 Ventricular opening and cerebrospinal fluid circulation accelerate the biodegradation process of carmustine wafers suggesting their immunomodulation potential in the human brain	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 425 ~ 435
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-022-04078-5	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 Shibahara Ichiyo, Sato Sumito, Hide Takuichiro, Saito Ryuta, Kanamori Masayuki, Sonoda Yukihiro, Tominaga Teiji, Kumabe Toshihiro	4. 巻 -
2. 論文標題 Postcentral gyrus resection of opercular gliomas is a risk factor for motor deficits caused by damaging the radiologically invisible arteries supplying the descending motor pathway	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Acta Neurochirurgica	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00701-021-04737-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 -

1. 著者名 Ichiyo Shibahara 1, Mitsuto Hanihara, Kazuhiro Miyasaka, Sumito Sato, Takuichiro Hide, Toshihiro Kumabe	4. 巻 130
2. 論文標題 Temporal Glioblastoma Mimicking Basal Ganglia Invasion: Distinguishing Removable and Unremovable Tumors	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 World Neurosurgery	6. 最初と最後の頁 e213-e221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.wneu.2019.06.035	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5件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 Ichiyo Shibahara
2. 発表標題 Role of the parietooccipital fissure in glioma surgery
3. 学会等名 Asian Congress of Neurosurgery (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ichiyo Shibahara
2. 発表標題 Analysis of anatomical invasion pattern of gliomas: Special consideration of the parietooccipital fissure and medial posterior temporal gliomas
3. 学会等名 World Federation of Neuro-Oncology Society (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴原一陽
2. 発表標題 ヒト生体内での生体吸収性基剤の挙動：膠芽腫複数回手術検体を用いた1,3-bis-(p-carboxyphenoxy) propaneとsebacic acidの検討
3. 学会等名 第60回日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 柴原一陽
2. 発表標題 神経膠腫の解剖学的進展様式解析：頭頂後頭溝に注目した側頭葉内側後方神経膠腫の検討
3. 学会等名 第39回日本脳腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 柴原一陽
2. 発表標題 前頭頭頂弁蓋部神経膠腫摘出後の運動機能障害に関する危険因子の検討
3. 学会等名 第79回日本脳神経外科学会
4. 発表年 2020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
---------	---------