

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：17501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09392

研究課題名（和文）liquid biopsyによる、神経膠腫の非侵襲的診断/病態把握システムの開発

研究課題名（英文）Development of non-invasive diagnostic system of glioma by liquid biopsy
liquid biopsy

研究代表者

秦 暢宏 (Hata, Nobuhiro)

大分大学・医学部・准教授

研究者番号：10596034

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）：脳脊髄液には神経膠腫由来のct-DNAが存在することが知られていたが、従来はそのような微量な核酸では、正確な解析を行うことは困難であった。我々はdigital PCRシステムを用いた解析法を開発して、グリオーマで重要とされるドライバー変異：IDH,TERT,H3に対して、各々の変異を高感度で検出することに成功した（J Neurooncol. 2021;152(1):47-54.）。

さらにWHO2021に対応した最新の分子診断項目に対応するために、MLPA法を用いたliquid biopsyを開発した（Neurooncol Adv. 2023;5:1-11. vdac178）。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実際の臨床で採取した髄液を用いて、術前診断に繋げる試みを導入しており、一部の患者では臨床に役立つ知見を得られるようになってきている。具体的には髄液中の微量核酸の遺伝子解析の結果により、diffuse midline gliomaの診断が得られて、手術を回避して放射線化学療法を行った症例を経験した。

研究成果の概要（英文）：Previously, ct-DNA derived from gliomas in cerebrospinal fluid has been difficult to accurately analyze. We have developed an analysis method using a digital PCR system and succeeded in detecting each mutation with high sensitivity for driver mutations: IDH, TERT, and H3 (J neurooncol. 2021;152(1):47-54.)

Furthermore, in order to respond to the latest molecular diagnosis corresponding to WHO 2021, we developed liquid biopsy using the MLPA method (Neurooncol Adv. 2023;5:1-11. vdac178)

研究分野：glioma

キーワード：liquid biopsy molecular diagnosis IDH TERT H3 MLPA WHO2021 digital PCR

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫は、他の癌腫と異なり、血中から検出される腫瘍マーカーが存在しないため、早期診断や病勢の把握が困難であり、治療に難渋する一因となっている。また近年はペバシズマブの導入により、画像による病勢の把握が一層困難になる状況も生じている。

神経膠腫においては、近年の大規模遺伝子解析の成果により、その発生および悪性化の分子メカニズムが解明してきた。系統特異的な遺伝子変異 (mutation) と染色体欠失 (deletion もしくは LOH) が判明しており、その組み合わせによる分子診断が確立している。分子診断は、従来の病理診断と比較して予後や治療反応性との相関がより強く、臨床に必須となった。

しかしながら、手術で採取した腫瘍検体による分子診断では、治療経過における病勢の評価や、術前診断へは応用できていないという現状がある。神経膠腫においては、腫瘍発生、悪性化、治療抵抗性獲得などにおいて各々異なる遺伝子異常が発生する、いわゆる時間的多様性を豊富に有するという特徴がある。そのため、手術時のみの解析では緻密な治療戦略の構築には不十分といえる。よって治療経過中の分子診断が可能となれば、臨床的意義が高い。

近年の遺伝子解析技術の飛躍的進歩に伴い、微量の核酸解析が可能となった。その手法を応用して、血液中に微量に含まれる circulating tumor DNA (ct-DNA)、microRNA(miRNA)といった分子の解析による分子診断 : Liquid Biopsy が様々な癌種で注目されている。ct-DNA の腫瘍マーカーとしての利用は、神経膠腫よりも先に体部の悪性腫瘍で研究が進んでいる。転移性乳癌、大腸癌、非小細胞性肺癌などの体部の癌では腫瘍組織と血中 ct-DNA の遺伝子プロファイルが良く一致することが知られ、また、乳癌、大腸癌、メラノーマにおいて生存率と ct-DNA 量に負の相関があることが報告されている。さらに ct-DNA は分子標的薬の治療効果予測にも役立つと思われる。そのような研究が進む中で、神経膠腫においては、脳血液関門の存在から、体部の癌と比較し血中 ct-DNA が検出可能である頻度は顕著に低いため、十分な研究が進んでいない現状がある。

2. 研究の目的

本研究では、digital PCR を用いた微量核酸の定量的解析法を開発することで、手術前、術後、術後治療法の時期に髄液に対する liquid biopsy を行い、腫瘍発生、悪性化、治療抵抗性獲得、空間的多様性獲得の予測可能性を探索することを目的とする。また開発した解析法を、MRI、PET などの画像検査データと統合することで、腫瘍の経時的動態 (治療反応性や再発・増勢) を正確にモニターするシステムを構築することが本研究の最終目的である。究極的には、髄液採取により、神経膠腫の治療反応性や再発を正確に予測することを目指している。

脳脊髄液には神経膠腫由来の ct-DNA が存在することが知られていたが、従来はそのような微量な核酸では、正確な解析を行うことは困難であった。しかし、近年非常に感度が高い digital PCR システムが開発され、微量な検体からも ct-DNA が検出できるようになってきた。

我々は digital PCR システムを用いた研究を開始しており、preliminary な結果が得られている。グリオーマで重要とされるドライバー変異 : IDH1/2 mutation, H3K27M mutation に対して、digital PCR のプローブを設計して、各々の変異を高感度で検出することに成功した。さらに、開頭手術を行う際に、術野近傍から採取した髄液を採取し抽出した核酸を用いて解析したところ、16 例中 14 例 (88%) で実際の腫瘍からの解析による結果と一致した。分子診断に必須となる遺伝子変異の組み合わせを各々解析可能なため、髄液のみによる分子診断法の確立を既に独自に達成している点が、我々の研究の強みである。

本研究では、これまでに確立した手法をさらに発展させて、経時的な腫瘍の動態の変化を正確に把握し得る検査法を構築していく。このようなシステムは未だ神経膠腫では確立していないため、非常に独自性・創造性が高く、臨床的意義の高い研究となることが期待できる。

3. 研究の方法

(1) 腰椎穿刺による髄液を用いた定量的解析法の確立

腰椎より採取した髄液より cell free DNA (cf-DNA) を抽出する。抽出した髄液 cf-DNA に digital PCR を行い、ct-DNA を検出する。腰椎からの髄液では ct-DNA の濃度が低いため、検出される変異特異的シグナルが極端に少ないことで、偽陰性の結果が多く出る可能性が想定される。よって腰椎からの髄液での検査結果が実際にどのような条件に左右されるのかを検定することが必要である。

術野から得られた比較的高濃度の ct-DNA を段階的に薄めて解析を行い、濃度による感度、特異度の変化を ROC カーブなどで検定し、正確に変異陽性を判定できる限界濃度を同定する。

ターゲットとする遺伝子変異 (IDH1/2、BRAF、H3F3A、TERT promoter 変異など) に対して異なるプローブを用いるため、各々に対しての検出限界に違いがないかを検定する。

以上の検定を経て、解析に適切な ct-DNA 濃度と、その感度、特異度を決定することができれば、腰椎から採取した検体での解析の信頼性を担保することができると考えられる。また検出に必要な髄液量を逆算することや、濃縮、genome amplify などの修飾を加えることで、より正確な解析結果を得られるかどうかを試みる。

(2) バイオマーカーとしての髄液中の遊離核酸の利用法の確立

digital PCR で検出可能となった ct-DNA に対し、術前から手術後の治療経過にかけて、その推移を定量する。MRI 画像検査などから判断した治療反応性や病勢と ct-DNA 量の推移を比較検討する。具体的には、下記の要領で進行する。

腰椎からの髄液より遊離核酸を抽出し、digital PCR で ct-DNA を定量する。

悪性脳腫瘍群と対照群との間でその頻度の差を統計学的に検討すると共に、様々な臨床マーカー (KPS、病理組織学的分化度、画像所見) の相関を検討する。

術前、手術中、術後、放射線化学療法中、治療終了後、再発時といった、臨床的イベントに際しての解析を経時的に行うことで、バイオマーカーの動態を詳細に把握して、以下のような評価を行う

A) 術前後の定量的な変化と、その後の治療経過や予後との相関

B) 放射線化学療法中の動態と、治療反応性との相関

C) 再発までの経過中の動態により、再発予測性の評価

特に、髄液中の遊離核酸の検出は、遠隔再発や播種といった臨床経過を早期発見するために有用なマーカーとなる可能性があるため、各症例での臨床経過を詳細に追っていき、相関を詳細に検討する。

(3) 画像検査との統合システムの確立

当院臨床放射線科はこれまでに様々な画像シーケンスを撮像することで、神経膠腫の臨床像や分子診断との関連を解析しており、最近では独自の撮像シーケンスを開発して、神経膠腫との関連を模索している。これらの知見を我々の liquid biopsy から得られた結果と統合して解析することで、腫瘍の経時的動態 (治療反応性や再発・増勢) を正確にモニターするシステムを構築する。

4. 研究成果

digital PCR システムを用いた解析法を開発して、グリオーマで重要とされるドライバー変異: IDH, TERT, H3 に対して、各々の変異を高感度で検出することに成功した (J Neurooncol. 2021;152(1):47-54.)。

さらに WHO2021 に対応した最新の分子診断項目に対応するために、MLPA 法を用いた liquid biopsy を開発した (Neurooncol Adv. 2023;5:1-11. vdac178)。

実際の臨床で採取した髄液を用いて、術前診断に繋げる試みを導入しており、一部の患者では臨床に役立つ知見を得られるようになってきている。具体的には髄液中の微量核酸の遺伝子解析の結果により、diffuse midline glioma の診断が得られて、手術を回避して放射線化学療法を行った症例を経験した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 9件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Mizoguchi Masahiro, Hata Nobuhiro, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Akagi Yojiro, Sangatsuda Yuhei, Fujioka Yutaka, Takigawa Kosuke, Funakoshi Yusuke, Suzuki Satoshi O., Iwaki Toru	4. 巻 38
2. 論文標題 Clinical implications of molecular analysis in diffuse glioma stratification	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 210 ~ 217
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-021-00409-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Funakoshi Yusuke, Hata Nobuhiro, Takigawa Kosuke, Arita Hideyuki, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Fujioka Yutaka, Sako Aki, Umehara Toru, Yoshitake Tadamasu, Togao Osamu, Hiwatashi Akio, Yoshimoto Koji, Iwaki Toru, Mizoguchi Masahiro	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical significance of CDKN2A homozygous deletion in combination with methylated MGMT status for IDH wildtype glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 3177 ~ 3187
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3860	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Takigawa Kosuke, Hata Nobuhiro, Michiwaki Yuhei, Hiwatashi Akio, Yonezawa Hajime, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Fujioka Yutaka, Funakoshi Yusuke, Otsuji Ryosuke, Sako Aki, Togao Osamu, Yoshiura Takashi, Yoshimoto Koji, Mizoguchi Masahiro	4. 巻 154
2. 論文標題 Volumetric study reveals the relationship between outcome and early radiographic response during bevacizumab-containing chemoradiotherapy for unresectable glioblastoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 187 ~ 196
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-021-03812-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Funakoshi Yusuke, Hata Nobuhiro, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Fujioka Yutaka, Takigawa Kosuke, Yoshimoto Koji, Mizoguchi Masahiro, Iihara Koji	4. 巻 26
2. 論文標題 Current trend in treatment of glioblastoma in Japan: a national survey using the diagnostic procedure combination database (J-ASPECT study-glioblastoma)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1441 ~ 1449
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01929-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Tanaka Shunya, Ohgidani Masahiro, Hata Nobuhiro, Inamine Shogo, Sagata Noriaki, Shirouzu Noritoshi, Mukae Nobutaka, Suzuki Satoshi O., Hamasaki Hideomi, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Fujioka Yutaka, Takigawa Kosuke, Funakoshi Yusuke, Iwaki Toru, Hosoi Masako, Iihara Koji, Mizoguchi Masahiro, Kato Takahiro A.	4. 巻 12
2. 論文標題 CD206 Expression in Induced Microglia-Like Cells From Peripheral Blood as a Surrogate Biomarker for the Specific Immune Microenvironment of Neurosurgical Diseases Including Glioma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Immunology	6. 最初と最後の頁 670131
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fimmu.2021.670131	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujioka Yutaka, Hata Nobuhiro, Akagi Yojiro, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Michiwaki Yuhei, Amemiya Takeo, Takigawa Kosuke, Funakoshi Yusuke, Sako Aki, Iwaki Toru, Iihara Koji, Mizoguchi Masahiro	4. 巻 152
2. 論文標題 Molecular diagnosis of diffuse glioma using a chip-based digital PCR system to analyze IDH, TERT, and H3 mutations in the cerebrospinal fluid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-020-03682-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujioka Yutaka, Hata Nobuhiro, Akagi Yojiro, Kuga Daisuke, Hatae Ryusuke, Sangatsuda Yuhei, Michiwaki Yuhei, Amemiya Takeo, Takigawa Kosuke, Funakoshi Yusuke, Sako Aki, Iwaki Toru, Iihara Koji, Mizoguchi Masahiro	4. 巻 152
2. 論文標題 Molecular diagnosis of diffuse glioma using a chip-based digital PCR system to analyze IDH, TERT, and H3 mutations in the cerebrospinal fluid	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Neuro-Oncology	6. 最初と最後の頁 47 ~ 54
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11060-020-03682-7	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fujii Yutaro, Hatae Ryusuke, Hata Nobuhiro, Suzuki Satoshi O., Sangatsuda Yuhei, Takigawa Kosuke, Funakoshi Yusuke, Fujioka Yutaka, Kuga Daisuke, Mizoguchi Masahiro, Iwaki Toru, Yoshimoto Koji	4. 巻 42
2. 論文標題 A case of ganglioglioma grade 3 with H3 K27M mutation arising in the medial temporal lobe in an elderly patient	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuropathology	6. 最初と最後の頁 197 ~ 203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/neup.12793	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Otsuji Ryosuke, Fujioka Yutaka, Hata Nobuhiro, Kuga Daisuke, Sangatsuda Yuhei, Takigawa Kosuke, Funakoshi Yusuke, Sako Aki, Yamamoto Hidetaka, Nakamizo Akira, Mizoguchi Masahiro, Yoshimoto Koji	4. 巻 5
2. 論文標題 Liquid biopsy with multiplex ligation-dependent probe amplification targeting cell-free tumor DNA in cerebrospinal fluid from patients with adult diffuse glioma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Neuro-Oncology Advances	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/oaajnl/vdac178	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計8件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 Nobuhiro Hata, Yusuke Funakoshi, Daisuke Kuga, Yuhei Sangatsuda, Yutaka Fujioka, Kosuke Takigawa, Koji Yoshimoto, Masahiro Mizoguchi, Koji Iihara
2. 発表標題 Current Trend in Treatment of Glioblastoma in Japan: A National Survey Using the Diagnostic Procedure Combination Database (J-ASPECT Study-Glioblastoma)
3. 学会等名 The 39th Annual Meeting of the Japan Society for Neuro-Oncology
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秦 暢宏、溝口 昌弘、尾辻 亮介、舟越 勇介、空閑 太亮、三月田 祐平、藤岡 寛、瀧川 浩介、吉本 幸司
2. 発表標題 膠芽腫はどこまで摘出すべきか? volumetric解析による検証
3. 学会等名 第26回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秦暢宏
2. 発表標題 グリオーマ分子診断に応じた手術治療戦略
3. 学会等名 第41回日本脳神経外科コンgres (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 秦暢宏、溝口昌弘、空閑太亮、三月田祐平、藤岡寛、瀧川浩介、舟越勇介、尾辻亮介、吉本幸司
2. 発表標題 1p19q co-del oligodendrogliomaに対するPAVの有効性：分子診断による治療層別化の長期成績
3. 学会等名 第80回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 藤岡寛、秦 暢宏、空閑太亮、赤木洋二郎、波多江龍亮、三月田祐平、瀧川浩介、舟越勇介、溝口昌弘
2. 発表標題 髄液中cell free tumor DNAを用いたDiffuse gliomaの分子診断
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 2020年

1. 発表者名 藤岡 寛, 秦 暢宏, 空閑 太亮, 波多江 龍亮, 三月田 祐平, 瀧川 浩介, 舟越 勇介, 溝口 昌弘
2. 発表標題 髄液中cell free DNA解析によるdiffuse gliomaの分子診断
3. 学会等名 第37回日本脳腫瘍学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 秦 暢宏;尾辻 亮介;三月田 祐平;藤岡 寛;瀧川 浩介;舟越 勇介;空閑 太亮;中溝 玲;溝口 昌弘;吉本 幸司
2. 発表標題 膠芽腫に対する拡大的摘出は 予後を改善するか？
3. 学会等名 第27回日本脳腫瘍の外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 秦 暢宏;尾辻 亮介;三月田 祐平;藤岡 寛;瀧川 浩介;舟越 勇介;空閑 太亮;中溝 玲;溝口 昌弘;吉本 幸司
2. 発表標題 膠芽腫に対する積極的摘出の意義：volumetric解析による検証
3. 学会等名 第81回日本脳神経外科学会総会
4. 発表年 2022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
研究分担者	溝口 昌弘 (Mizoguchi Masahiro) (50380621)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	
研究分担者	空閑 太亮 (Kuga Daisuke) (40759932)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	波多江 龍亮 (Hatae Ryosuke) (20570774)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	三月田 祐平 (Sangatsuda Yuhei) (00848640)	九州大学・大学病院・助教 (17102)	
研究分担者	樋渡 昭雄 (Hiwatashi Akio) (30444855)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	梅尾 理 (Togao Osamu) (10452749)	九州大学・医学研究院・准教授 (17102)	

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