

令和 6 年 4 月 16 日現在

機関番号：82685

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15521

研究課題名（和文）脳腫瘍における腫瘍内多様性解析の確立と臨床応用

研究課題名（英文）Establishment and clinical application of intratumoral heterogeneity analysis in brain tumors

研究代表者

大谷 亮平（Ryohei, Otani）

地方独立行政法人東京都立病院機構東京都立駒込病院（臨床研究室）・脳神経外科・医長

研究者番号：30786968

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究の目的は、現状では研究レベルでしか行われていない腫瘍内多様性の解析を一般臨床で行える方法として確立すること、およびその臨床的意義を明らかにすることである。計16症例の脳腫瘍検体から空間的に離れた部位を切り出し、網羅的遺伝子変異解析を行うことで腫瘍内多様性の解析を行った。得られた各部位の体細胞変異のデータより腫瘍内クローン進化の系統樹の作成し、脳室側から脳表側へ広がる進化が予測された。また、腫瘍内多様性の程度が再発までの期間と相関する可能性が示唆された。本研究の結果は、日常臨床における腫瘍内多様性の解析の臨床的意義につながるものであり、今後の脳腫瘍の治療戦略に影響を与えることが期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の結果は、日常臨床における腫瘍内多様性の解析の臨床的意義につながるものであり、今後の脳腫瘍の治療戦略に大きな影響を与え、脳腫瘍患者の予後改善への貢献が期待される。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study was to establish a method to analyze intratumoral heterogeneity in general clinical practice, which is currently performed only at the research level, and to clarify its clinical significance. We analyzed intratumoral heterogeneity by performing a comprehensive genomic variant analysis of spatially separated regions in 16 brain tumor cases. A phylogenetic tree of intratumoral clonal evolution was generated from the somatic mutation data obtained for each site, and evolution was predicted to spread from the ventricular side to the surface of the brain. The results also suggest that the degree of intratumoral heterogeneity may correlate with the time to recurrence. The results of this study have clinical implications for the analysis of intratumoral heterogeneity in clinical practice and are expected to influence future treatment strategies for brain tumors.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 腫瘍内多様性

1. 研究開始当初の背景

悪性脳腫瘍は、集学的治療を行っても未だに予後不良の疾患である。代表的な悪性脳腫瘍である膠芽腫の生存期間中央値は1年であり、新たな治療戦略が強く求められている。治療抵抗性および再発の大きな要因の1つとして、腫瘍内でのクローン進化により遺伝学的に異なる多様な細胞集団を形成することで生じる腫瘍内多様性が関わっていることが、近年の研究により明らかとなっている (Vinci et al. Nat Med 2018)。しかし、腫瘍内多様性が脳腫瘍の治療において重要であるにも関わらず、その解析は研究レベルでの限られた解析に留まり、日常臨床に応用されておらず、治療戦略にも用いられていないのが現状である。その要因の1つとして、腫瘍内多様性の解析の臨床的意義が確立されていないことが挙げられる。

2. 研究の目的

本研究の目的は、脳腫瘍における遺伝学的腫瘍内多様性解析の臨床的意義を明らかにし、一般臨床に応用できる方法として確立することである。

3. 研究の方法

本研究では、脳腫瘍における腫瘍内の病理学的、遺伝学的多様性を解析し、臨床情報とともに症例間で比較検討することで、臨床的意義を明らかにする。

a) 多様性解析のための腫瘍検体採取

腫瘍サンプルは、脳腫瘍の手術中に採取する。予め定めた、腫瘍内の空間的に離れた複数箇所をサンプリングし、遺伝子解析用と病理標本用に分けて保存する。

b) 遺伝学的多様性の解析

空間的に最も離れた2箇所を基本とし、必要に応じて解析箇所を追加する。特に病理学的に異なる部位の解析を追加していく。各部位の凍結検体からDNAを抽出し、全エクソーム解析を行い、体細胞変異を同定する。

c) 腫瘍内多様性解析の臨床的意義の解明

得られた各部位の体細胞変異のデータより、各症例毎に腫瘍内クローン進化の系統樹の作成、クラスタリング解析、腫瘍内多様性の程度の症例間比較を行う。クローン進化の系統樹から、今後の腫瘍浸潤の方向、再発部位の予測、治療標的となる遺伝子異常の分布の把握、腫瘍起源の部位の予測などを症例毎に行い、実際の臨床経過と対比して、症例間での比較検討を行う。病理学的な形態学的多様性に対応した部位の、遺伝学的異常の特徴も併せて評価する。腫瘍内多様性の程度は、統計学的に数値として算出した上で症例間で比較し、治療抵抗性および予後との相関、病理学的悪性度との相関を評価する。また、各部位の体細胞変異の腫瘍内分布のデータより、再発時のがんゲノムパネル検査を仮定し、再発部位に応じて提出検体を適切に選択した場合と、従来ランダムな検体を提出した場合で、選択できる治療薬の違いを比較する。以上により、腫瘍内多様性解析の臨床的意義を明らかにする。

4. 研究成果

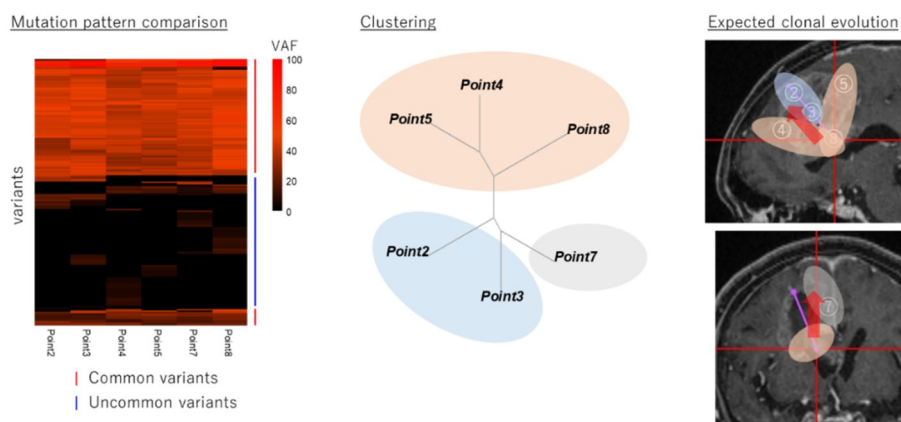
計16症例に対して解析を施行した。腫瘍の種類の内訳は、膠芽腫9例、Grade3神経膠腫1例、肺癌原発の転移性脳腫瘍6例であった。腫瘍内の2箇所以上から採取

したサンプル、及び血液検体から抽出した DNA を用いて全エクソーム解析を行い、全エクソンの遺伝子配列を同定し、体細胞変異、およびコピー数異常を特定した。

1) 腫瘍内のクローン進化の予測

膠芽腫症例を用いて、腫瘍内の 6 箇所から採取した DNA を用いて、体細胞変異に基づく腫瘍内クローン進化の推定を行った。6 箇所の体細胞変異のデータから non-synonymous variant を抽出し、Variant allele frequency に基づいてクラスタリング解析を行った。図 1 のように、大きな 3 つのサブグループに分かれ、各グループの体細胞変異の積み重なり方より、図のような脳室側から脳表側へ広がるクローン進化が予測できた。これは、脳室付近の神経幹細胞を腫瘍化の起源として膠芽腫が発生するという仮説に合致する予測結果であった。

図 1 腫瘍内のクローン進化の予測



2) 体細胞変異およびコピー数異常に基づく、腫瘍内進化の系統樹

膠芽腫症例に関して、体細胞変異およびコピー数異常を呈していた遺伝子の数に基づいて、系統樹を作成した。図 2 のように、体細胞変異に基づいた系統樹とコピー数異常に基づいた系統樹では、傾向に乖離があった。

転移性脳腫瘍でも同様に系統樹を作成した (図 3)。従来、転移性脳腫瘍は比較的均一な細胞集団と考えられているが、今回の系統樹は、転移性脳腫瘍でも予想以上に腫瘍内多様性を認めることがわかる。

図 2 膠芽腫における腫瘍内多様性を示す系統樹。青は 2 箇所で共通して異常を呈する遺伝子、赤は各箇所で固有に異常を呈する遺伝子を示す。

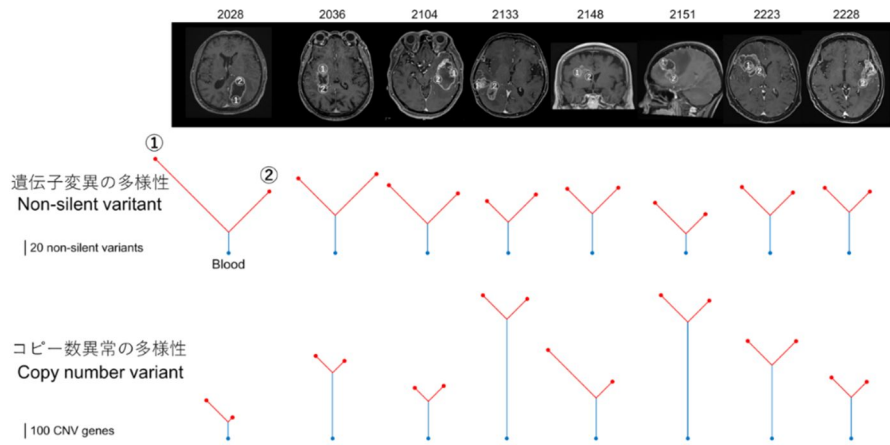
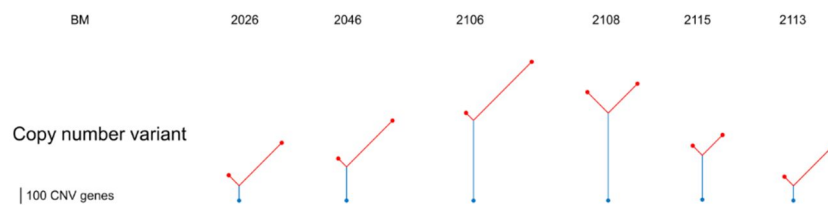


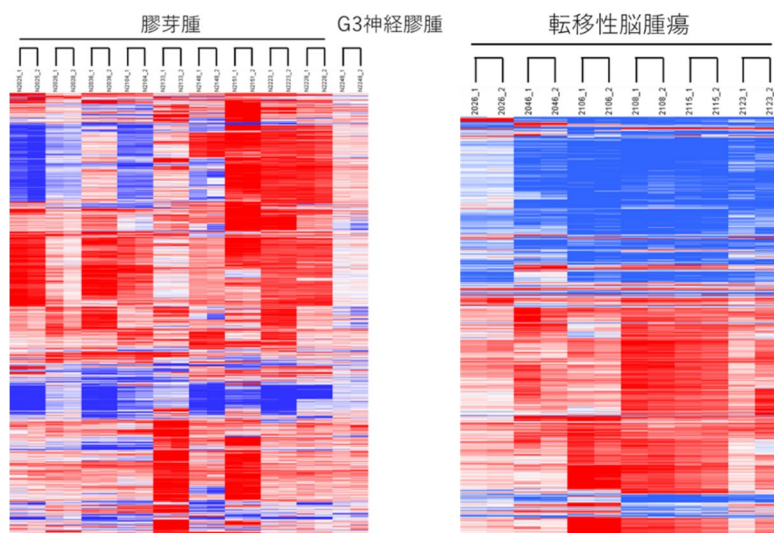
図3 転移性脳腫瘍における腫瘍内多様性



3) 2点間の遺伝学的な違いに基づく、遺伝学的距離の算出

膠芽腫、Grade3 神経膠腫、および転移性脳腫瘍における全検体のコピー数異常のヒートマップを図4に示す。腫瘍内の2箇所の間で、コピー数異常の分布に差を認めている。さらに、膠芽腫では症例間においても、コピー数異常の分布に大きなばらつきがある事がわかる。これは、転移性脳腫瘍のコピー数の分布と比較すると、明らかである。

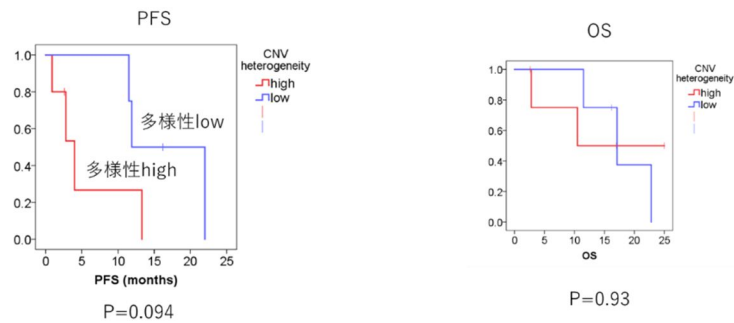
図4 全検体におけるコピー数異常の分布



4) 遺伝学的距離と臨床的予後との相関

遺伝学的距離の算出は、以下のように算出した。腫瘍内の2箇所においてコピー数異常に差がある遺伝子に関して、各遺伝子のコピー数を行列とし、2箇所のベクトルの差をユークリッド距離として算出し、遺伝学的距離とした。採取した腫瘍内の2箇所の物理的な距離は、各症例間で異なるため、単位物理的距離あたりの遺伝学的距離として補正し、症例間の比較を行った。補正した遺伝学的距離に基づき、中央値で多様性 high 群と low 群に分けて、臨床的な PFS と OS の比較を行った(図5)。OS は差がなかったが、PFS は多様性 high 群で短い傾向にあった。有意差は出なかったが、これは症例数が少ないことが影響している可能性がある。今後、症例数を増やすことで、有意差が出る可能性がある。

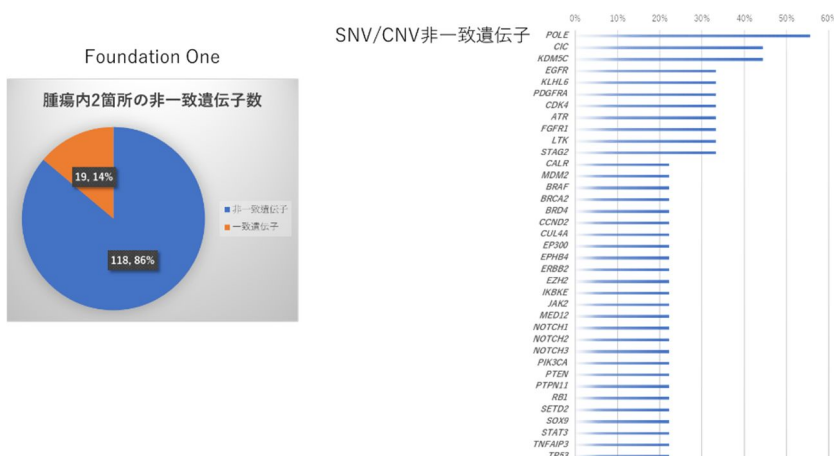
図5 遺伝学的距離と臨床的予後の相関



5) 腫瘍内多様性ががんゲノムパネル検査の結果に及ぼす影響

腫瘍内多様性が、がんゲノムパネル検査の結果に及ぼす影響を評価した。FoundationOne パネルにおいて、体細胞変異、コピー数異常が評価される 137 遺伝子に関して、本研究の膠芽腫症例を用いて、腫瘍内 2 箇所の間で結果に差があるかを解析した。2 箇所で結果が異なる遺伝子は、137 遺伝子中 118 遺伝子 (86%) であり、その中には、治療標的となり得る重要な遺伝子も多数含まれていた。膠芽腫において、採取する部位によりパネル検査の結果が異なってくることに留意する必要があると思われる。

図6 腫瘍内多様性がパネル検査の結果に及ぼす影響



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 大谷亮平、矢島寛久、山田良治、篠浦伸禎
2. 発表標題 新規開発した脳腫瘍サンプラーによる腫瘍内多様性の解析
3. 学会等名 第40回 日本脳腫瘍学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 腫瘍サンプラー特許	発明者 大谷亮平	権利者 東京都
産業財産権の種類、番号 特許、2022-139368	出願年 2022年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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