

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2014～2016

課題番号：26462186

研究課題名（和文）次世代シーケンサーを利用した膠芽腫の治療抵抗性と再発に関連する遺伝子変異の探索

研究課題名（英文）Deep sequence analysis of treatment resistance in glioblastoma

研究代表者

秀 拓一郎（HIDE, Takuichiro）

熊本大学・医学部附属病院・診療講師

研究者番号：40421820

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,800,000円

研究成果の概要（和文）：治療抵抗性や再発の原因となる遺伝子変化を検出するため、検討症例の条件を絞りディープシーケンズを行った。初発時・再発時の検討では多くの症例で再発時に遺伝子変異の蓄積が見られたが、再発時に初発時に見られた変異が検出できない場合もあった。これらは膠芽腫組織の時間的、空間的不均一性を示しており、治療抵抗性の原因と考えられた。また、詳細な臨床情報とディープシーケンズによりこれまでは同一集団と考えられていた脳中心部発生グリオーマもサブグループに分かれる可能性も得られた。

研究成果の概要（英文）：To identify gene mutations on treatment resistance and recurrence, deep sequence analysis was done. Comparing to primary tumor, mutations were generally accumulate in recurrent tumor, however, some mutations were disappeared in recurrent tumors. These results suggested that recurrent tumors were not always same to primary tumors. This spatio-temporal heterogeneity is regarded as the cause of resistance for chemo-radiotherapy and recurrence of glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：膠芽腫 ディープシーケンズ 治療抵抗性 再発

1. 研究開始当初の背景

(1) 膠芽腫は最悪性の腫瘍の一つで、集約的治療(摘出術+放射線治療+化学治療)を行っても、平均生存期間は約1年程度である。テモゾロミドの出現によって平均生存期間はわずかに伸びたが、14カ月という現状である。

(2) これまでのグリオーマ研究で、膠芽腫にはTP53経路、Rb経路、RTK/RAS/PI3K経路の遺伝子変異や発現異常が蓄積していることが報告されている。同様の研究の中で、他癌種においては、EGFR変異を持つ肺癌に対するゲフィチニブや、慢性骨髄性白血病においては遺伝子転座によるBcr-Ablを標的とするイマチニブなど、分子標的治療薬が開発され治療効果を上げている。しかし、膠芽腫に対しては、高頻度に見つかる遺伝子変異や高発現するタンパクに対する治療薬として、これまでにEGFRやVEGFなどを標的とするいくつかの分子標的薬が臨床応用されてきたが、残念ながら満足な結果は得られていない。

(3) 近年、次世代シーケンサーにおける遺伝子解析が行われるようになり、これまで見過ごされていた遺伝子変異も発見できるようになった。その中で、グリオーマ研究においてIDH1変異は大変重要な発見であり、これまで数々の分類が提唱されてきている。IDH1変異、1p/19q co-deletion、TERT変異がグリオーマの診断や予後に重要なことが分かってきた。また、MGMTメチル化はテモゾロミドの治療効果予測に重要である。

(4) 全ゲノムシーケンスは膨大なデータが取れるが、多くのサンプル数を解析するにはいまだ高価であり、また、得られる情報量が多すぎて、その解釈が困難な場合がある。本研究では、多種類の癌種で共通にみられる遺伝子変異に注目したTruSeq癌パネル(イルミナ)を利用して、がん関連48遺伝子の体細胞変異ホットスポット領域(212領域)に絞ったディープシーケンスを行い、遺伝子変異マーカーや治療標的として応用を目的とする。

2. 研究の目的

(1) 膠芽腫患者の平均生存期間は約1年であり、これまでのところ有効な分子標的治療薬も報告されていない。これまで、非腫瘍部分と比較し腫瘍部分における、遺伝子変異の出現頻度が高いものや遺伝子発現量の変化が大きいものが注目され検討されてきたが、癌化や再発に必須な遺伝子変異でも頻度や発現量が低いものは見逃されていた可能性がある。予後やQOLを改善させるためにはこれまでの研究だけでは十分ではないと考えられる。

(2) 膠芽腫治療のブレイクスルーを目指して、本研究では臨床的特徴を絞った症例において次世代シーケンサーによるディープ

シーケンスを行い、詳細に比較検討をすることで、これまで見えていなかった重要な遺伝子変異を発見し、予後・治療抵抗性・再発予測のマーカーや新規治療の標的とすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 材料: 患者 DNA
脳腫瘍 DNA サンプルおよび血液 DNA サンプルから DNA を精製
(熊本大学倫理委員会で承認済み)

(2) 方法:
次世代シーケンサー:
イルミナ MiSeq
使用したパネル:
イルミナ TruSeq

癌パネルがん関連 48 遺伝子の体細胞変異ホットスポット領域(212領域)に絞ったディープシーケンス

(3) 比較症例
長期生存例と短期生存例の比較
線条体膠芽腫と視床膠芽腫の比較
同一症例による再発、再再発の比較

4. 研究成果

(1) 解析症例
(脳腫瘍 DNA)
長期生存(1000日以上) 20症例
短期生存(100日未満) 14症例

視床膠芽腫 7症例
線条体膠芽腫 13症例

再発・再再発症例 17症例(36検体)

(2) 解析症例
(同一患者血液 DNA)
ディープシーケンスを行った膠芽腫患者の血液 DNA

長期生存(1000日以上) 14症例
短期生存(100日未満) 9症例

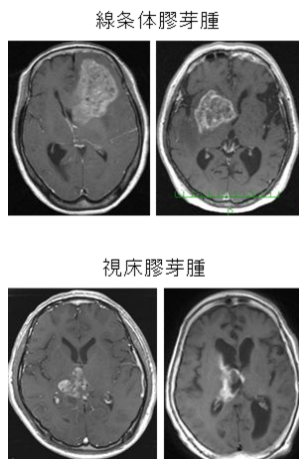
視床膠芽腫 5症例
線条体膠芽腫 5症例

再発・再再発症例 13症例

(3) 長期生存(1000日以上)と短期生存(100日未満)の比較
TP53変異が長期生存群で多い傾向にあったが、現在論文発表に向け解析を進めている。

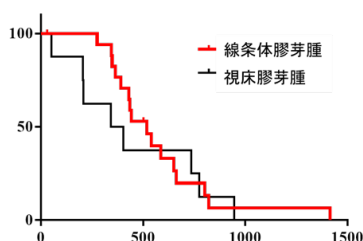
(4) 線条体膠芽腫と視床膠芽腫の比較
 脳中心部に発生する膠芽腫(線条体、視床、脳幹、脊髄など)は共通の変異 H3K27M を持ち一群と考えられている。しかし、線条体膠芽腫、視床膠芽腫の腫瘍の進展や臨床経過異なる印象がある。

(臨床経過)



線条体膠芽腫は皮質方向へ進展するが、視床膠芽腫は局所で増大する傾向にあった。

(生存曲線)

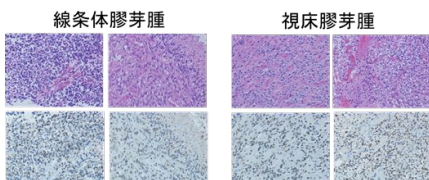


視床膠芽腫は生検術で終わる症例が多いにもかかわらず、平均生存期間は長い傾向にあった。

(ディープシーケンス)

TP53 変異は両群で高頻度に認められ、異なる遺伝子変異も認められた。新たな知見が得られており、詳細は論文発表準備中である。

(ヒストン H3F3AK27M 変異)



中心部グリオマで高頻度に認められる変異(文献)であるが、免疫染色では線条体膠芽腫では 6/6 (100%) で強陽性、視床膠芽腫では 11/12 (92%) で強陽性、1/12 (8%) で弱陽性を示した。これまでの定義に一致する結果となった。

(5) 再発・再再発症例の検討

再発時には初発時の変異に比べ新たな変異が蓄積を認める症例が多かった。再発、再再発時の比較では変異の蓄積がみられるが、再再発時に再発時に認められた変異が消失し新たな変異の出現も認められた。これらは膠芽腫組織内での時空間的不均一性を表していると考えられ、初回手術で摘出した腫瘍組織の検討で見出した治療標的遺伝子が必ずしも再発時には有効ではないことを示している。これらの結果は Jinkuk の報告と一致していた(文献)。TP53 変異は高頻度に認められた。

これら3つの比較研究は現在論文発表準備中である。

(参考文献)

Sturm et al, Cancer Cell 22, 425-437, 2012
 Jinkuk Kim, Cancer Cell 28, 318-328, 2015

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

Takuichiro Hide, Yoshinobu Takahashi, Hideo Nakamura, Keishi Makino, Hajime Kamada, Jun-ichi Kuratsau, Shigetoshi Yano, GBMs in striatum are different from thalamic GBMs in gene profiles, 5th World Federation of Neuro-Oncology Societies, May 4-7, 2017 Kongresshaus Zurich (Zurich, Switzerland)

秀拓一郎、高橋義信、中村英夫、牧野敬史、鎌田一、倉津純一、矢野茂敏、尾状核膠芽腫は視床膠芽腫より皮質下膠芽腫に近い、第 27 回日本間脳下垂体腫瘍学会、2017 年 2 月 24-25 日、日経ホール&カンファレンスルーム(東京)

秀拓一郎、高橋義信、中村英夫、牧野敬史、矢野茂敏、鎌田一、倉津純一、視床および尾状核に発生する膠芽腫のディープシーケンスによる比較、第 34 回日本脳腫瘍病理学会、2016 年 5 月 27-28 日、東京コンファレンスセンター・有明(東京)

平尾佳奈、秀拓一郎、中村英夫、牧野敬史、矢野茂敏、高橋義信、鎌田一、倉津純一、初発、再発、再再発の経過をディープシーケンスで検討した膠芽腫症

例、第 34 回日本脳腫瘍病理学会，2016 年 5 月 27-28 日，東京コンファレンスセンター・有明（東京）
秀拓一郎、矢野茂敏、篠島直樹、倉津純二，視床および尾状核に発生する膠芽腫の比較，第 26 回日本間脳下垂体腫瘍学会，2016 年 2 月 19-20 日，ザ・セレクトン福島（福島）

(3)連携研究者 ()

研究者番号：

(4)研究協力者 ()

〔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：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

秀 拓一郎 (HIDE Takuichiro)
熊本大学・医学部附属病院・診療講師
研究者番号：40421820

(2)研究分担者

牧野 敬史 (MAKINO Keishi)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：90381011

中村 英夫 (NAKAMURA Hideo)
熊本大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：30359963

矢野 茂敏 (YANO Shigetoshi)
熊本大学・生命科学研究部・准教授
研究者番号：60332871

倉津 純一 (KURATSU Junichi)
熊本大学・生命科学研究部・教授
研究者番号：20145296