

(平成 23 年度研究報告書)

23-A-50 神経膠腫における腫瘍マーカーの効果的な測定法と
それらの予後推定における有用性の検証に関する研究

独立行政法人国立がん研究センター研究所 脳腫瘍連携研究分野 分野長 市村 幸一

研究の分類・属性

基礎系

研究の概要

神経膠腫はヒトの脳腫瘍で最も頻度が高く、また極めて難治性であるが、同一の病型であっても腫瘍により治療に対する反応性や生存期間が異なることが知られている。近年神経膠腫では MGMT 遺伝子のメチル化、IDH1 遺伝子の点突然変異、染色体 1 番と 19 番の欠失、BRAF 融合遺伝子など、治療反応性や予後を予測できる分子マーカーがいくつか見つかっているが、その検査方法などには問題もあり、より正確で再現性の高い方法の開発が必要になってきている。また本邦においては脳腫瘍の大規模なコホート研究が少なく、標準的治療を受けた脳腫瘍症例における、分子マーカーのわが国独自の臨床的意義などはまだ確立されていない。本研究では正確さと経済性を兼ね備えた分子マーカーの検査法を確立することによって神経膠腫における臨床試験の附随研究の標準化を行い、分子マーカーをより有効に臨床に活用することを目指すとともに、国立がん研究センターを中心に多施設共同研究による Japanese Glioma Network を形成し、今後の神経膠腫の translational research を促進していくことを目標とする。また頭蓋内胚細胞腫はわが国では小児脳腫瘍において 2 番目に頻度が高く 15 歳未満の小児がんの約 15% を占めるといった臨床的に重要な疾患であるにもかかわらず、世界的にもその遺伝子解析は進んでおらず病態は謎のままである。本研究では全国規模の多施設共同研究により頭蓋内胚細胞腫を国立がん研究センターに集め、次世代シーケンスと多層オミックス技術を用いて頭蓋内胚細胞腫の遺伝子を全ゲノム的に解析しその病態解明を図るとともに、新たな治療標的分子や腫瘍マーカーの特定を目指す。

研究経費

20,000 千円

研究班の組織

市村幸一

脳腫瘍連携研究分野長

脳腫瘍連携研究分野

脳神経外科副科長

成田善孝

悪性脳腫瘍の臨床情報・腫瘍検体の収集・遺伝子解析

研究の目的と到達目標及び実績要点

全期間

(目的と到達目標): 国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科で手術された症例についてMGMT、IDH1/2、1p/19q、BRAF 融合遺伝子などの分子的マーカーを網羅的に調べ、国立がん研究センターとしての基礎データを構築する。他施設と共同して分子的マーカーのより正確かつ効率的な検査法とその判定基準を確立し、今後の臨床試験の附随検査などに普遍的に使えるように標準化を行う。Japanese Glioma Network の設立を行い、多施設共同研究による大規模な国内の神経膠腫の translational study group を形成し、基礎と臨床が密接に連携した神経膠腫臨床研究体制を確立する。Japanese Glioma Network では当面神経膠腫全体で 1,000 例程度を目標に凍結手術検体を集めることを目指す。これら症例に対し、既知の分子マーカーおよび今後ゲノムシーケンスや多層オミックス解析などによって明らかになっていくさまざまな遺伝子異常を網羅的に調べ、予後や治療への反応性といった臨床的な意義を精査し、それらの分子マーカーとしての意義の確立などに役立てて行く。この研究の結果我が国において今後標準となる神経膠腫の分子的、臨床的基礎データが確立され論文の形で公開されること、神経膠腫の国内における大規模多施設共同研究の基盤が形成されることを目的とする。また頭蓋内胚細胞腫に対し全ゲノム解析を行うことによりこれらの腫瘍の分子病態を解明するとともに、新たな治療標的分子と治療への反応性や予後の予測の指標となる腫瘍マーカーを特定することを目指す。この研究を通し、全国規模の小児脳腫瘍研究のネットワークを形成する。

第1年次

(到達目標)

- 1 新設の脳腫瘍連携研究室を整備し、必要な機器、試薬等を揃え、研究に従事する人員を募集して、脳腫瘍の臨床と基礎をつなぐ連携研究を第2年次より行っていく基盤（インフラストラクチャ）を確立する。
- 2 国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科で手術された症例について、腫瘍の凍結手術検体および血液からDNAを抽出し、さらに bisulfite modification を行って IDH1/2 の突然変異、MGMT のメチル化などの分子的マーカーを direct sequencing や pyrosequencing を駆使して網羅的に解析を行う。
- 3 国内脳神経外科多施設共同研究の枠組みを作り始める。MGMT メチル化の pyrosequencing を用いたアッセイや、MLPA を用いた 1p/19q の欠失の検査法の標準化に向けた多施設共同研究を開始する。

(年次評価時点の実績要点)

- 1 実験台、サーマルサイクラー (PCR)、ゲル撮影装置、超低温槽、各種遠心機をはじめ、分子的解析に必要な設備と機器はほぼそろえることができた。人員としては、新しい事務補助員と実験補助員が3月から加わり、第2年次からはリサーチレジデントと外来研究員各一人が参加する。
- 2 国立がん研究センター中央病院脳脊髄腫瘍科で手術された症例の凍結検体は 258 例分保存されている（膠芽腫 129 例を含む）。このうち第1年次末までに合計 186 検体の神経膠腫について MGMT のメチル化のアッセイを pyrosequencing を用いて行った。アッセイは申請者がケンブリッジ大学病理部で MGMT の CpG island 全体を網羅的に精査した結果確立したものであり、MGMT の CpG island の中で最も転写に関与していると考えられる 16 の CpG におけるメチル化の程度をそれぞれ独立に評価できるアッセイである。この結果を通じ、パイロシーケンスが極めて普遍的に適用できる検査法であることが確認された。
- 3 Japanese Glioma Network の設立に向けた呼びかけを行い、まず共同研究施設から神経膠腫全体で 210 例分の検体とともに参加の表明があった。また、他の2施設と pyrosequencing を用いた MGMT メチル化判定法の標準化に向けて共同研究を行うことについて合意し、それぞれの施設から 32 検体ずつの bisulfite modification を行った DNA を交換し、第1年次末の時点において3施設でそれぞれ行っているアッセイを、3施設合計 96 検体についてそれぞれ独自に検査を進めている。

研究成果と考察

第1年次評価時点

脳腫瘍連携研究室は第1年次末までの6か月間でほぼ基盤が整備され、フル稼働可能な状態となった。第1年次末までは多施設共同研究の体制を作って神経膠腫の手術検体を収集すること、および国立がん研究センターの神経膠腫検体に

対し MGMT メチル化に関する基礎データを作るための実験を行うことに主眼を置いた。中央病院脳脊髄腫瘍科 186 例の神経膠腫に対して行った pyrosequencing による MGMT のメチル化解析の結果は、メチル化を認める症例が全体の 60% で、亜型別でも星細胞腫 65%、膠芽腫 50% など、申請者が以前にスウェーデンの 406 例の検体に対して行った解析とほぼ同様の頻度であることがわかり、MGMT のメチル化の頻度については少なくともスウェーデンと日本の間では人種や地理的な差はほとんどないことが示唆された。

倫理面への配慮

全ての研究は基本的には体細胞遺伝子異常を発見することを目的としており、生殖細胞系の変化は対象外である。従って個人の特定につながる可能性のある一塩基多型等のデータをゲノム全体として見ることはなく、この観点から本研究は「疫学研究に関する倫理指針」に沿って行われ、「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」の対象とはならないが、個人情報の保護や倫理面での対応を適切に行うため、この倫理指針の趣旨を踏まえて行うものとする。国立がん研究センター中央病院の検体については全て包括同意のもと、治療及び診断目的で摘出された組織及び血液、髄液等で、診療に必要な検査等を終了したものについて個人情報の保護に十分留意したうえで研究に使用することに対し検体提供者の同意が得られている。本研究は倫理審査委員会によって承認を受けた研究計画「脳腫瘍のゲノム・プロテオーム解析とその臨床応用を目指す多施設共同研究」(脳脊髄腫瘍科 成田善孝)の枠内で行われている。共同研究機関においてもそれぞれの施設で同様の倫理審査を受けすでに承認されているか、今後新たに加わる共同研究機関については申請を随時執り行うものとする。

本研究に関連する、本研究期間中の主な発表論文等

(雑誌論文)

第 1 年次 :

1. Mulholland S, Pearson DM, Hamoudi RA, Malley DS, Smith CM, Weaver JM, Jones DTW, Kocialkowski S, Backlund LM, Collins VP, Ichimura K.: MGMT CpG island is invariably methylated in adult astrocytic and oligodendroglial tumours with IDH1 or IDH2 mutations. *Int J Cancer* 2011 [Epub ahead of print]
2. **Ichimura, K.** Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2012, [Epub ahead of print]
3. 市村幸一 : 「神経膠腫における IDH 突然変異の意義」 *文光堂 病理と臨床* 30(4): 356-361, 2012

(学会発表)

第 1 年次 :

(国際学会)

1. 9-10 December, 2011. **The 16th Korea-Japan Cancer Research Workshop – Progress in brain tumor and inflammation/immunity in tumorigenesis** in Sapporo, Japan “Molecular Pathways of Glioma Development”
2. 23-25 November, 2011. **The 24th International Symposium, Foundation for Promotion of Cancer Research** in Tokyo, Japan. “Gene Profiling – The present status and next step”

(国内学会、研究会)

1. 第 7 回脳腫瘍の基礎シンポジウム【特別講演 2】「神経膠腫の分子的発生機構」、東京、2012 年 3 月 24 日
2. 第 3 回栃木ニューロオンコロジー研究会【講演 2】「MGMT メチル化の神経膠腫における臨床的意義」、宇都宮、2012 年 3 月 16 日
3. 第 23 回東京脳腫瘍治療懇話会【一般講演】「パイロシーケンス法による MGMT メチル化の評価」、東京、2012 年 1 月 13 日
4. 第 29 回日本脳腫瘍学会学術総会、一般口演-6 バイオマーカー「神経膠腫の MGMT メチル化と 1p19q 欠失の臨床検査における Pitfall」 岐阜県下呂温泉、2011 年 11 月 28 日