

研究機関名：東北大学

受付番号： 2016-1-96

研究課題名 分子プロファイリングによる新規標的の同定を通じた難治がん治療法開発：悪性脳腫瘍克服のための新規治療標的及びバイオマーカーの創出に向けた多施設共同研究による小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子解析

研究期間 西暦 2012年 9月（倫理委員会承認後）～2016年 3月

対象材料

- 病理材料（対象臓器名 脳腫瘍 ）
■生検材料（対象臓器名 脳腫瘍）
■血液材料 遊離細胞 その他（ ）

上記材料の採取期間 西暦 年 月～2016年 3月

意義、目的

- 1) 小児脳腫瘍、特に世界的にも基礎研究の遅れている頭蓋内胚細胞腫において、5つの亜型すべてに対し次世代シーケンス技術を使ったゲノムシーケンスを中心とした多層オミックス解析により網羅的遺伝子解析をおこない、ゲノムおよびエピゲノムの異常を精査することによりあらたな腫瘍関連遺伝子の候補を特定する。
- 2) 新たな腫瘍関連遺伝子を含めたゲノム解析のデータと、年齢、性別、腫瘍発生部位などの診断情報、治療への反応性および生存期間などの臨床データとの関連を統計的に解析することにより、診断や予後予測など臨床的に有用な新しい腫瘍マーカーを発見する。
- 3) 発見された腫瘍関連遺伝子の機能と腫瘍化をもたらす機序について組み換え DNA 技術と細胞生物学的腫瘍を駆使して検索を行うい、新規治療開発を行う。

本研究は、研究参加者に直接的な利益を必ずしももたらすとは限らないが、現在死亡率の非常に高い難治がんである脳腫瘍の発生・進展の機構を遺伝子レベルで解明することで、脳腫瘍の新しい治療法の開発に資する情報を提供するものである。社会的利益に大きく貢献する研究である。具体的に予測される成果として、脳腫瘍の病理型ごとに特徴的な遺伝子異常のパターンが特定されればこれらが病理診断のマーカーとなる可能性がある。また放射線・化学療法に対する反応性または予後と相関する遺伝子型を特定されれば、治療法の選択に役立つことが予想される。さらに腫瘍特異的な分子標的となりうる遺伝子異常が発見されれば新たな治療法の開発にもつながる可能性がある。

方法

研究参加施設は各施設で倫理審査を受けて研究計画の承認を得たのち、連結可能匿名化された凍結手術検体またはパラフィン包埋切片および血液(もしくはその DNA)を国立がん研究センターに送る。国立がん研究センターでは検体を管理し、DNA/RNA を抽出して以下のような解析を行う。病理診断については群馬大学病態病理学部において中里洋一教授により central review が行われ、最終的に診断が確定される。

まず凍結手術検体が十分量あり、また本人の正常 DNA が得られる症例を使って全ゲノムのエクソームシーケンスを行う。エクソームシーケンスはタンパク質をコードしているほぼ全遺伝子のエクソンを選択的にシーケンスする方法で、全ゲノムのわずか数%に集中するため効率が良い。この方法を使って近年脳腫瘍を含め様々な腫瘍で続々と新たな腫瘍関連遺伝子が発見されており [17, 18]、胚細胞腫の病態に迫るためには最も効果的な方法であると考えられる。具体的には Agilent Technologies 社製の SureSelectXT Human All Exon v4 キットを使って全エクソンの選択を行った後、Illumina 社のペアエンドマルチプレックスシーケンスを用いた次世代シーケンシング法によりほぼ全遺伝子において蛋白コード領域の塩基配列の解析を行う。

エクソームシーケンスの結果得られた体細胞点突然変異の情報を総合し、胚細胞腫に関与している可能性のある遺伝子を絞り込む。その根拠は 1) 複数の腫瘍で点突然変異の見られるもの 2) アミノ酸の伸長を止めて不完全な蛋白を作ることによりその機能を明らかに失活させると考えられるもの(protein truncating mutation) 3) 生殖細胞または神経細胞の発生、分化等に関与することが遺伝子の機能から予測されうるもの 4) 他の疾患、特に他の部位の腫瘍ですでに点突然変異が報告されているもの、などである。

エクソームシーケンスに供した検体に認められた体細胞点突然変異は通常のサンガーシーケンシング法により確認を行う。確認された遺伝子突然変異については参加各施設から集められた大きな腫瘍のコホートにおいてサンガーシーケンシング法の他、Ion torrent PGMなどの高速シーケンシングシステムを用いて大規模なスクリーニングを行う。また染色体転座によって形成される融合遺伝子は点突然変異と並びがん遺伝子活性化の重要なメカニズムであることが知られており、脳腫瘍でも近年毛様細胞性星細胞腫における BRAF 融合遺伝子の発見はこの腫瘍の病態解明に大きく役立った[3]。こういった融合遺伝子を効率的に発見するため全ゲノムシーケンスおよび全 RNA シーケンスを行う[19, 20]。得られた融合遺伝子の所見は RT-PCR で確認し、さらに大きな腫瘍コホートでも RT-PCR または FISH などを用いてスクリーニングを行う。さらにゲノムのコピー数異常、トランスクリプトームおよびメチロームを解析するためにマイクロアレイ、パイロシーケンシングなどを駆使して全ゲノム的な網羅的解析を行う。トランスクリプトームおよびメチローム解析などにおける正常コントロールには、胚細胞腫とは無関係の手術検体または剖検検体から得られる、腫瘍を含まない正常組織(脳、精巣など)を用いる。メタボローム解析については慶應義塾大学先端生命科学研究所において、キャピラリー電気泳動-質量分析計(CE-MS)などを用いて行う。

これらのゲノムデータを診断情報、治療反応性、再発までの期間、生存期間などの臨床データと比較し、統計的解析を行うことによりその腫瘍マーカーとしての有用性を検証する。

これらの遺伝子のうち、特に機能面などから脳腫瘍の発生にかかわっている可能性が高いと考えられる遺伝子に対し、正常または変異を起こした組み換え遺伝子を作成してベクターに組み込むか、shRNA により遺伝子の発現を抑制するベクターを作成し、それらを培養ヒト神経幹細胞や iPS 細胞などに導入することにより、細胞の機能に対する影響を調べる。また、神経幹細胞培養の技術を応用して手術検体の初代培養を行い、頭蓋内胚細胞腫由来の細胞株を樹立して遺伝子の機能解析に役立てることを目指す。また免疫不全マウスを使った異種移植による腫瘍原性の検索などにより、その腫瘍発生における意義を解明する。さらにその機能に応じて、その機能を妨げる処理(例えばリン酸化酵素阻害剤など)を行い用いた、標的治療への応用の可能性を探る。

胚細胞腫には遺伝素因の関与はほとんどないと考えられるため本研究の、解析の対象は体細胞点突然変異である。一塩基多型と区別するため必ず同じ症例の正常の DNA も可能な限り同時に解析し、多型のデータは解析段階で棄却される。ゲノムシーケンスの対象は頭蓋内胚細胞腫全体で 50 例程度を目標とする。

問い合わせ等の窓口

東北大学大学院医学系研究科神経外科学分野

TEL: 022-717-7230

FAX: 022-717-7233

金森政之 E-Mail: mkanamori@ med.tohoku.ac.jp

斎藤竜太 E-Mail: ryuta@ nsg.med.tohoku.ac.jp