

## 16-14 「放射線・化学療法が有効な悪性神経膠腫の遺伝子学的特徴の解析と新規治療法の開発」に関する研究

主任研究者 国立がんセンター中央病院脳神経外科医長 渋井壮一郎

### 研究成果の要旨

癌の中でも最も予後の悪い膠芽腫(Glioblastoma)を含む悪性神経膠腫について FISH 法と、Microarray を用いた網羅的な腫瘍細胞の遺伝子発現の解析を行うことにより、化学療法や放射線治療が有効な症例の遺伝子学的特徴を特定し、新規治療法を開発することを目的とした。

Glioblastoma 症例の 1p LOH(+)/19q LOH(-)群では、ニトソウレアによる初期治療から再発までの期間が他の群に比べて有意に延長していることが明らかとなった。1p LOH(+)/19q LOH(+群)では、ニトソウレアにより再発しても CBDCA/VP-16 また Temozlomide 投与により生存期間が延長し、1p LOH(+症例)では積極的に化学療法を行う必要があることが示唆された。これらの LOH に関連する遺伝子や、予後悪化遺伝子を特定するために Microarray を用いた解析をおこなった。

本研究により多数の悪性神経膠腫の遺伝子発現プロファイルを蓄積することができ、今後も脳腫瘍遺伝子プロファイルデータベースとして活用することが可能となった。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
渋井壮一郎	*1 国立がんセンター中央病院 脳神経外科医長	放射線・化学療法が有効な悪性神経膠腫の遺伝子学的特徴の解析と新規治療法の開発
西川 亮	*1 埼玉医科大学 脳神経外科教授	同上
永根 基雄	*1 杏林大学 脳神経外科助教授	同上
藤堂 具紀	*1 東京大学大学院脳神経医学専攻講師	同上
北中 千史	*1 山形大学医学部器官機能統御学講座 腫瘍分子医科学分野教授	同上
村垣 善浩	*1 東京女子医科大学大学院 先端生命医科学研究所 先端工学外 科学分野助手	同上

\*1:平成16年4月1日～平成18年3月31日

## 研究報告

## 1 研究目的

悪性脳腫瘍の中で最も多い膠芽腫 (Glioblastoma) の5年生存率は10%以下であり、手術・放射線化学療法の進歩にもかかわらず、あらゆる癌の中でも最も予後の悪い腫瘍である。本研究においては、手術症例のFISH法による遺伝子解析や、Microarrayを用いた網羅的な腫瘍細胞の遺伝子発現の解析を行い、ニトロソウレア等の化学療法や放射線治療が有効な症例の遺伝子学的特徴を特定する。これらの解析から得られた悪性神経膠腫の遺伝子学的特徴を他の癌腫で得られたMicroarrayのデータと比較検討することにより、他の癌腫で投与された抗癌剤の中で悪性神経膠腫にも有効と考えられる抗癌剤を見だし、悪性神経膠腫に対する新規治療法を開発することを目的とする。

現在 Microarray を用いた様々な癌の遺伝子プロファイルの大規模な構築が国内のいくつかの施設で進行中であるが、脳腫瘍は分類が複雑なため、いずれの研究においても脳腫瘍は含まれていない。したがって、Diffuse Astrocytoma (DA:Grade II 星細胞腫)・Anaplastic Astrocytoma (AA:Grade III 悪性星細胞腫)・Oligodendroglioma (OD:Grade II 乏突起膠腫)・Anaplastic Oligodendroglioma / Anaplastic Oligoastrocytoma (AO/AOA Grade III 悪性乏突起膠腫/悪性乏突起星細胞腫)・Glioblastoma (GBM:Grade IV 膠芽腫)を含む神経膠腫についても、症例数の多い今回の共同研究施設から腫瘍検体を集め、Microarrayを用いて腫瘍の遺伝子学的特徴を解析し、国内における脳腫瘍の遺伝子プロファイルデータベース構築の基礎を固める。

## 2 研究方法

各施設の倫理審査委員会の承認をえて、脳腫瘍の手術標本・凍結組織・臨床情報を匿名化したうえで提供をうけ、国立がんセンター研究所で検体の解析を行った。

脳腫瘍組織のFISHは、未染色標本を用いて、Vysis社の1p/19q probe, EGFR probe, PTEN probeを用いて行い、蛍光顕微鏡で観察した。LOHの判定は、DAPIで染色した腫瘍細胞の核を200個以上数え、50%以上にLOHが見られる症例をLOHありと判断した。Microarray解析は、Affymetrix社のHuman HG 133 plusを用いて解析を行った。FISHの結果と、Microarray解析による遺伝子発現プロファイルを治療効果・生存期間などの臨床情報をもとに解析を行った。

## 3 研究成果

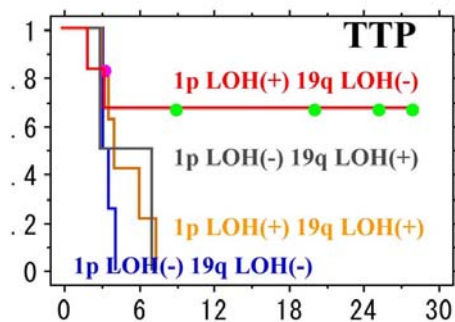
(1) GBM (膠芽腫) における1p/19q LOHと予後との相関  
Gliomaの中で、AO/AOA Grade IIIにおいては、染色体1p/19qのLOHのあるものが、PCV (Procarbazine, CCNU, Vincristine)に対する感受性が高く、予後が良いことはこれまで報告されてきた。しかしこれまでのところ、GBMやAA Grade IIIについては1p/19q LOHと予後との相関は明らかにされていない。これまでのLOHの解析は、腫瘍細胞からDNAを抽出し、Gene Scanを用いたPCR法で主におこなわれてきたが、この方法の問題点は、腫瘍細胞それぞれのLOHは判別できず、GBM (多形性膠芽腫)のように、細胞によって遺伝子発現が異なる腫瘍の解析は困難であった。またGBMは血管内皮の増生が特徴的であるが、Gene Scanによる解析では、血管内皮等の正常細胞の混在を排除することが難しかった。そこで、未染色パラフィン標本を用いてFISH法により細胞それぞれのLOH解析をGlioma症例60症例を用いて解析した。ProbeはVysis社の1p36 (LOH対象)/1p25(control), 19q13 (LOH対象)/19p13(control)を用いて未染色標本とのhybridizationを行い、蛍光顕微鏡で観察し、200個以上の細胞内をカウントし、LOHが見られる割合が50%以上の検体をLOHありと判断した。

この方法の妥当性を検証するために、OA, AO / AOAについてまず、LOHを解析した。Gliomaは主にAstrocytoma系腫瘍とoligodendroglioma系腫瘍に大きく分類されるが、1p/19q LOHは比較的oligodendroglioma系腫瘍に特徴的であるとされ、Gene Scanでの解析結果が、HE標本を用いた病理診断の補助診断になっていた。FISH法によるOA, AO / AOAの1p/19q LOHの割合は、それぞれ、100%/100%、67%/50%で、さらに腫瘍細胞の75%以上にLOHがみられる腫瘍細胞は、それぞれ、67%/56%、50%/34%と、これまでの報告とほぼ同様であった。

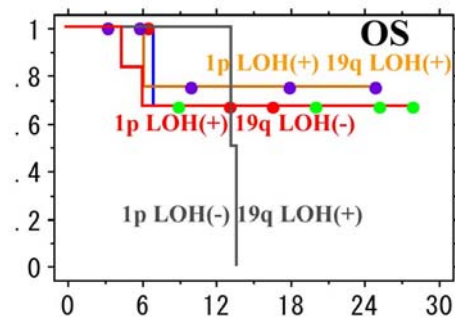
GBMについては、その腫瘍細胞の多様性を反映し、1p/19q LOHの割合は、68%/48%であった。GBMに対しては、手術後初期治療として局所放射線照射(60Gy)とNitrosourea (ACNU)が用いられ、再発するまでACNUを2ヶ月おきに投与する。再発後はCarboplatin (CBDCA) / Etoposide (VP-16)あるいは、最近では国外で標準的に使用されているものの日本国内では未承認のTemozolomide (TMZ)も個人輸入による治療も行われている。そこで、GBMにおける1p/19q LOHの有無と予

後との相関について、TTP (time to progression)・OS (overall survival)を用いて分析した。ACNUによる初期治療からのMedian TTPは1p LOH(+)/1p LOH(-)群および19q LOH(+)/19q LOH(-)群で、6.2ヶ月/3.3ヶ月(Logrank p=0.06)、3.7ヶ月/4.1ヶ月(Logrank p=0.33)とあきらかな有意差は見られず、OSについては全く差が認められなかった。GBMにおいては、1p LOH(+)/19q LOH(+), 1p LOH(+)/19q LOH(-), 1p LOH(-)/19q LOH(+), 1p LOH(-)/19q LOH(-)群はそれぞれ、40%、28%、4%、24%であったが、図1に示すように、1p LOH(+)/19q LOH(-)群では、有意にACNUによるTTPが延長していた(Logrank p<0.01)。また、OSについては図2に示すように、1p LOH(+)/19q LOH(+), 1p LOH(+)/19q LOH(-)群は、1p LOH(-)群と比較して生存期間の延長をみとめた。これらのことより、1p LOH(+)/19q LOH(-)群はACNUを用いた初期治療による再発までの期間が延長していることが明らかになり、これらの症例においてはACNUによる初期治療が有用であることが明らかとなった。1p LOH(+), 1p LOH(-)群に比べ生存期間が長かったが、特に1p LOH(+)/19q LOH(+), 1p LOH(+)/19q LOH(-)症例では、ACNUによる再発後、CBDCA/VP-16 または TMZを使用することにより生存期間の延長が得られ、化学療法による積極的な治療が必要であることが示唆された。これらの結果について現在論文準備中である。

[図1]



[図2]



(2) Microarray 解析

初年度(2004年)に40症例、本年度にさらに40症例の悪性神経膠腫症例の凍結腫瘍組織および腫瘍組織の含まれていなかった腫瘍周辺組織からRNAを抽出し、Affymetrix社のHG U-133 plus Microarray probeを用いて約4万個の腫瘍細胞の遺伝子発現の解析を行った。解析手順は、遺伝子発現量をRMA (Robust Murtichip Average)法により正規化を行い、各プローブのシグナルの中央値のばらつきを補正し、解析対象群の遺伝子発現量が、コントロール群の2倍または1/2の遺伝子の中でt検定を行い、p<0.01またはp<0.001の遺伝子を抽出した。抽出された遺伝子のクラスター分析を行い、さらに遺伝子マイニングソフトBioCompassを用いて、意味のある遺伝子を検索した。コントロールとして、腫瘍組織が含まれなかった摘出腫瘍周辺脳組織(control)を用いた。解析対象は(1) 予後良好GBM症例 vs 予後不良GBM症例 (2) 放射性感受性GBM vs 放射線照射中に増大したGBM症例 (3) 抗癌剤感受性GBM vs 抗癌剤抵抗性GBM (4) Control vs GBM / AA / DA である。

GBMの生存期間中央値(MST)は約15ヶ月であり、1年以上再発のない症例を予後良好群、1年未満を予後不良群として(1) 予後良好GBM症例 vs 予後不良GBM症例の解析を行った。予後不良群の半数以上の症例で2倍以上の亢進または半分以下に抑制されている遺伝子は、それぞれ2565、2990遺伝子であった。t検定を行い、p<0.01の亢進または抑制されている遺伝子は、それぞれ304、69遺伝子であった。GBMにおける細胞内増殖の亢進・高い浸潤性・血管増生を反映し、発現が亢進している遺伝子は、cell cycle 関連遺伝子: 8・アポトーシス抵抗性遺伝子: 9・DNA 修復遺伝子: 1・細胞内接着関連遺伝子: 10・angiogenesis 関連遺伝子: 1・神経発達関連遺伝子: 10などが抽出された。抑制されている遺伝子は、cell cycle 関連遺伝子: 4・アポトーシス遺伝子: 4・DNA 修復遺伝子: 1・細胞内接着関連遺伝子: 4・angiogenesis 関連遺伝子: 1・神経発達関連遺伝子: 2が抽出された。FISH法の結果、GBMにおいても、1p LOH, 19q LOHは予後との相関が見られたが、染色体上の1p, 19q上の遺伝子で、t検定結果がp<0.01であった遺伝子はそれぞれ18、20個であった。これらの発現の増減がみられた遺伝子について、RT-PCR法や免疫染色等にて発現の増減の妥当性を検証している。本研究を開始して2年経過したが、今後生存が3年以上の症例を予後良好群として解析可能

であり、FISHの結果とあわせて予後に関する遺伝子を絞り込む予定である。

同様に(2)(3)についても、t検定結果が $p < 0.01$ の亢進・抑制遺伝子が約300個程度抽出された。初期治療としてニトロソウレアで治療し再発した腫瘍に対しては、今回の多施設共同施設ではCBDCA/VP16あるいはTemozolomideにより治療を行っているが、CBDCA/VP16、Temozolomideに対する感受性を検討し、脳腫瘍の化学療法の効果に相関する遺伝子群を検索している。

GBMの中にはDA grade II → AA Grade III → GBMと段階的に悪性化するものがある。GBM vs control, DA vs control, AA vs control, GBM vs AA, GBM vs DA, AA vs DAの解析も行ったが、いずれも抽出された遺伝子が500個以上あり、悪性化に関する遺伝子を特定するためにさらにデータを解析している。

本研究では、これまでAO/AOAで報告されて来たように、GBMにおいても染色体上の1p/19q LOHが抗癌剤感受性・予後と相関があることを示唆する結果が得られたが、Microarrayの解析は継続中であり、GBMにおける予後相関遺伝子・悪性化の責任遺伝子は、いまだ解析中である。しかし、多数の悪性神経膠腫症例のMicroarrayによる遺伝子プロファイルを蓄積することができ、今後も脳腫瘍遺伝子プロファイルデータベースとして活用することが期待される。

#### 4 倫理面への配慮

本研究は、臨床検体提供者が決して不利益を被る事のないように計画段階から倫理面を考慮し、腫瘍検体の提供に当たり、各研究者の施設の倫理委員会に申請し承諾を得た。研究に当たり「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」として国立がんセンター倫理委員会に申請を行った。遺伝子解析について手術・腫瘍摘出前に患者に対して十分なインフォームドコンセントを取得し、連結可能な臨床検体の匿名化を行い、放射線・化学療法の効果判定を含め、患者のプライバシーが第三者に知り得ることがないように注意した。

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Guo P, Nishikawa R, et al: Up-regulation of angiopoietin-2, matrix metalloprotease-2, membrane type 1 metalloprotease, and laminin 5 $\gamma$ 2 correlates with the invasiveness of human glioma. *Am J Path* 166:877-890, 2005
2. Shiokawa M, Nishikawa R, et al: Genetic alteration of poly(ADP-ribose) polymerase-1 in human germ cell tumors. *Jpn J Clin Oncol* 35:97-102, 2005
3. Inagawa H, Nishikawa R, et al: Giant invasive pituitary adenoma extending into the sphenoid sinus and nasopharynx. Report of a case with intraoperative cytologic diagnosis. *Acta Cytologica* 49:452-456, 2005
4. Adachi J, Nishikawa R, et al: Mixed neuronal-glioma of the fourth ventricle and successful treatment of postoperative mutism with bromocriptine: case report. *Surg Neurol* 63:375-379, 2005.
5. Tanaka M, Todo T, et al: High-dose conformal radiotherapy for supratentorial malignant glioma: a historical comparison. *Lancet Oncology* 6(12): 953-960, 2005.
6. Fukuhara H, Todo T, et al: Oncolytic herpes simplex virus vector G47 $\delta$  in combination with androgen ablation for the treatment of human prostate adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 11(21): 7886-7890, 2005.
7. Fukuhara H, Todo T, et al: Triple gene-deleted oncolytic herpes simplex virus vector double-armed with IL-18 and soluble B7-1 constructed by BAC-mediated system. *Cancer Res* 65(23): 10663-10668, 2005.
8. Nakano K, Todo T, et al: Enhanced efficacy of conditionally replicating herpes simplex virus (G207) combined with 5-fluorouracil and surgical resection in peritoneal cancer dissemination. *J Gene Med* 7(5): 638-648, 2005.

9. Ino Y, Todo T, et al: Triple combination of oncolytic HSV-1 vectors armed with interleukin 12, interleukin 18 or soluble B7-1 results in enhanced antitumor efficacy. Clin Cancer Res 12 (2): 643-652, 2006.
10. Kamada K, Todo T, et al: Functional identification of the primary motor area by corticospinal tractography. Neurosurgery 56[ONS Suppl 1]: ONS-98 ONS-109, 2005.
11. Kamada K, Todo T, et al: Combined use of tractography-integrated functional neuronavigation and direct fiber stimulation. J Neurosurg 102(4): 664-672, 2005.
12. Kamada K, Todo T, et al: Dissociated expressive and receptive language functions on MEG, functional MRI and amytal test: A case study and literature review. J Neurosurg (in press)
13. Chernov MF, Muragaki Y, et al: Spectroscopy and navigation. J Neurosurg. 2005 Feb;102(2):402-3
9. 稲生靖, 藤堂具紀: 脳腫瘍のウイルス療法. 脳神経外科速報 15(4): 354-360, 2005.
10. 藤堂具紀: 増殖型ウイルスベクターを用いる治療. 日本臨床 63:504-509, 2005
11. 藤堂具紀, 他: グリオーマに対するウイルス療法. グリオーマ病態と治療. 東京, Springer-Verlag, 2005, pp. 235-244.
12. 藤堂具紀, 稲生靖: 単純ヘルペスウイルス I 型を用いた癌のウイルス療法の開発. 実験医学 24 (1): 11-16, 2006.
13. 藤堂具紀, 宮本伸哉: 脳腫瘍の遺伝子治療. 医学のあゆみ 216 (10): 3914-3919, 2006.
14. 村垣善浩, 他: 覚醒下手術と機能マッピング(脳腫瘍の診断と治療): 日本臨床 63 (増刊 9 号) 330-340, 2005

#### 日本語論文

1. 渋井壮一郎: 悪性脳腫瘍治療の新しい展開 化学療法の新展開. Jpn J Cancer Chemother 32: 442-447, 2005
2. 渋井壮一郎: 悪性グリオーマに対する化学療法 大規模臨床試験とテーラーメイド治療- 脳神経外科ジャーナル in press
3. 西川亮: 小児神経膠腫. 脳腫瘍の診断と治療 最新の研究動向 III. 脳腫瘍の病理. 日本臨床, 増刊 9: 183-187, 2005.
4. 西川亮: 化学療法の副作用とその対策. 脳神経外科学大系 4. 周術期管理. (山浦晶総編集), pp. 297-304, 中山書店, 2005
5. 西川亮: 癌局所療法. 外科治療, 脳神経外科領域. 治療学 39:1327-1330, 2005
6. 永根基雄: Glioma の分子生物学. 脳神経外科速報 15: 243-252, 2005
7. 永根基雄: 薬剤耐性関連遺伝子と個別化化学療法. 日本臨床 63:460-471, 2005
8. 小林啓一, 永根基雄, 他: 再発悪性神経膠腫に対する Carboplatin/ 高圧酸素併用療法の治療経験- palliation 療法の可能性. 日本高気圧酸素・潜水病学会誌 (in press)