

受付番号： 2019-1-323

課題名：ヒト脳腫瘍におけるがん関連遺伝子異常の網羅的検討

1. 研究の対象

対象は東北大学病院脳神経外科で摘出術を受けた原発性脳腫瘍・転移性脳腫瘍の症例とする。原発性脳腫瘍は稀少疾患であり小児・意識障害のある症例も対象とする。意識障害・神経症状などにより患者本人から同意が得られない場合は家族にインフォームドコンセントを書面でもとり、承諾の得られた症例を対象とする。また1997年以降に生検や摘出術を受けた際に本研究について承諾をいただいた患者さんも引き続き対象とする。

2. 研究期間

西暦 2011 年 6 月（倫理委員会承認後）～西暦 2021 年 3 月

3. 研究目的

近年の医学研究の進歩により、癌は遺伝子異常（癌遺伝子、癌抑制遺伝子）の蓄積により生じることが明らかになり、遺伝子異常の発生に影響を及ぼす遺伝子異常の存在も明らかになってきた。原発性脳腫瘍においてもがん遺伝子、がん抑制遺伝子異常の解析が進み、その発生・進展に関する知見が得られつつある。これらの解析の最終目標は分子生物学的な所見に基づく腫瘍の分類、治療方針の決定、予後の予測であるが現時点で我々が得ている知見からは目標には到達していないのが現状である。加えて転移性脳腫瘍も分子標的治療の開発に伴い、腫瘍発生・進展の機序を明らかにする必要がある。本研究により得られる知見により脳腫瘍の発生、進展の機序の解明、新たな治療戦略の開発の糸口が得られるものと期待する。

4. 研究方法

本研究では以下の検討を予定している。

1. 癌抑制・癌遺伝子の点変異の検討

原発性脳腫瘍に関連する既知の遺伝子点変異について塩基配列決定法にて検討する。
対象とする遺伝子はp53,PTEN, EGFR, PDGFR, IDH1/2, NF1, BRAF, PIK3R1, RB1, ERBBB, NRF2, KEAP1, hTERT, ATRX遺伝子とする。

2. 染色体欠失・増幅の検討

MLPA法にて全染色体について染色体欠失・増幅を検討する。

3. 遺伝子発現量の検討

予後・治療反応性に相関すると報告されているMGMT遺伝子、NRF2遺伝子の標的遺伝子群についてreal time PCR法で解析する

4. タンパク発現量の検討

・ IDH 遺伝子変異腫瘍に特異的に発現している onco- metabolite としての『2-hydroxyglutarate』と、薬剤耐性・治療抵抗性に関する『グルタチオン・還元型グルタチオン』『N-アセチルアスパラギン酸』『ホスファチジルイノシトール・ホスファチジルセリン・遊離脂肪酸などの脂質』の濃度測定を高速液体クロマトグラフィータンデム質量分析 (LC/MS/MS) 抽出腫瘍検体でおこない治療効果との相関を解析する。また同時に採取された腫瘍組織内の腫瘍細胞の比率・増殖能について腫瘍特異的な変異である IDH1R132H タンパクや Ki67 に対する抗体を用いた免疫組織化学的な検討を加える。この解析については術中に得られた腫瘍サンプルを用いた測定を試みる。ただし解析結果は術中の治療方針には反映させない。

・ 予後・治療反応性に相関すると報告されているMGMTタンパク、CD133タンパクの定量をウェスタンブロット法で検討する

・ 2-hydroxyglutarate には RNA の脱メチル化酵素 ALKBH ファミリー因子群を抑制する効果があるという仮説を検証するために、IDH 遺伝子変異型、野生型腫瘍検体の RNA に含まれるの N1 位、もしくは、N6 位のメチル化アデノシン の定量をおこない、IDH 遺伝子変異と RNA メチル化について検討する。関連がある場合、腫瘍検体でメチル化 RNA-IP-seq によりメチル化されている RNA を探索する。

加えて過去に採取した神経膠腫の症例を用いて高い質量分解能の高分解能精密質量データが得られるイオントラップ型質量分析計(Orbitrap mass spectrometer)によるメタボローム解析をおこない、悪性転化に関わる代謝産物のスクリーニングをおこなう。

5. 薬剤耐性遺伝子の多型解析

薬剤代謝遺伝子であるMGMT, GSTP1, NQO1, MDR1, NRF2, CYP2C9, UGT1A1遺伝子の遺伝子多型をInvader法で解析し、副作用との相関を検討する。

6. 1-4は腫瘍組織から直接DNA, RNAを抽出し解析を行うが、加えて培養液内またはマウス脳内で腫瘍細胞を増殖させ、細胞株化をおこないIn vitro, in vivoでの薬剤感受性、放射線感受性を評価し遺伝子異常と治療感受性の比較検討を行う。

7. 中枢性神経細胞腫の原因となる遺伝子異常を明らかにする目的で、腫瘍と血液 DNA を次世代シーケンス法にて全エクソンの解析を行い腫瘍特異的な遺伝子異常を検索する。

8. 過去の報告で DKK1, SFRP1, NPR3, KCNA1 タンパクの発現を免疫染色で解析することで髄芽腫の中で予後不良な群が抽出されると報告されている。これらのタンパク質の発現を免疫組織学的に解析し予後との相関を検討する。また髄芽腫の腫瘍発生において、抑制的に働いている可能性があるマイクロ RNA-124 とその候補調節因子 EBPI について免疫組織学的に検討を加え、予後との相関を明らかにする。
9. 膠芽腫の遠隔再発(播種)の原因となる遺伝子異常を明らかにする目的で、腫瘍と血液 DNA を次世代シーケンス法にて全エクソンの解析を行い腫瘍特異的な遺伝子異常を検索する。
10. MGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析、蛍光ナノイメージング法によるタンパク質定量解析
11. ヒストン変異を有する diffuse midline glioma の症例について次世代シーケンサーを用いて全ゲノムシーケンス、またはエクソームシーケンスをおこない変異の網羅的解析をおこなう。
12. IDH 遺伝子変異型腫瘍について chromosome 1p/19q 共欠失、TERT 遺伝子変異を検索し、臨床経過との対比を行う。
13. 高速 PCR 法での IDH・TERT 遺伝子変異の検出方法を確立する
14. グリオーマ増殖における脂肪酸結合蛋白質(FABP7)の機能解析を試みる。これまでに、WHO 分類で定義されたグリオーマの悪性度と FABP7 の発現レベルが正に相関することは明らかになっているが、近年細分類化された WHO 分類での FABP7 の発現レベルは不明である。そこで、IDH 変異の有無で細分類化されたグリオーマで、各 grade の腫瘍サンプルを用いて、FABP7 の発現を形態学的、及び分子生物学的(ウェスタンブロット、定量 RT-PCR など)に解析する。さらに FABP7 が制御する細胞内 CoA 含量を測定する。

5. 研究に用いる試料・情報の種類

摘出腫瘍組織・血液

6. 外部への試料・情報の提供

1-8, 10, 14 は本学のみ、9 は本学と北里大学、11, 12, 13 は他機関へ提供します。9, 11, 12, 13 の検討を行うために国立がん研究センター・山形大学・北里大学・大阪医療センター・トラストメディカル株式会社に一部の試料を匿名化したうえで提供します。また 9 の検討のため、株式会社マクロジェン・ジャパンに匿名化した DNA を提供し、解析を委託します。

7. 研究組織

各機関の責任者は以下です。

東北大学病院：脳神経外科・准教授・金森政之

国立がん研究センター：脳腫瘍連携研究分野・市村幸一

山形大学：脳神経外科・教授・園田順彦

北里大学：脳神経外科・主任教授・隈部俊宏

大阪医療センター：臨床研究センター先進医療研究開発部 金村米博

トラストメディカル株式会社：代表取締役 児玉崇

8. お問い合わせ先

本研究に関するご質問等がありましたら下記の連絡先までお問い合わせ下さい。

ご希望があれば、他の研究対象者の個人情報及び知的財産の保護に支障がない範囲内で、研究計画書及び関連資料を閲覧することが出来ますのでお申出下さい。

また、試料・情報が当該研究に用いられることについて患者さんもしくは患者さんの代理人の方にご了承いただけない場合には研究対象としますので、下記の連絡先までお申出ください。その場合でも患者さんに不利益が生じることはありません。

照会先および研究への利用を拒否する場合の連絡先：

住 所：宮城県仙台市青葉区星陵町1-1

研究機関名：東北大学大学院医学系研究科 神経外科学分野

電 話：022-717-7230

F A X：022-717-7233

担当者氏名：金森政之 E-mail：mkanamori@med.tohoku.ac.jp （研究責任者）

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

◆個人情報の利用目的の通知に関する問い合わせ先

保有個人情報の利用目的の通知に関する問い合わせ先：「8. お問い合わせ先」

※注意事項

以下に該当する場合にはお応えできないことがあります。

<人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 第6章第16の1(3)>

- ①利用目的を容易に知り得る状態に置くこと又は請求者に対して通知することにより、研究対象者等又は第三者の生命、身体、財産その他の権利利益を害するおそれがある場合
- ②利用目的を容易に知り得る状態に置くこと又は請求者に対して通知することにより、当該研究機関の権利又は正当な利益を害するおそれがある場合

◆個人情報の開示等に関する手続

本学が保有する個人情報のうち、本人の情報について、開示、訂正及び利用停止を請求することができます。

保有個人情報とは、本学の役員又は職員が職務上作成し、又は取得した個人情報です。

1) 診療情報に関する保有個人情報については、東北大学病院事務部医事課が相談窓口となります。詳しくは、下記ホームページ「配布物 患者さまの個人情報に関するお知らせ」をご覧ください。（※手数料が必要です。）

【東北大学病院個人情報保護方針】

<http://www.hosp.tohoku.ac.jp/privacy.html>

2) 1)以外の保有する個人情報については、所定の請求用紙に必要事項を記入し情報公開室受付窓口に提出するか又は郵送願います。詳しくは請求手続きのホームページをご覧ください。（※手数料が必要です。）

【東北大学情報公開室】 <http://www.bureau.tohoku.ac.jp/kokai/disclosure/index.html>

※注意事項

以下に該当する場合には全部若しくは一部についてお応えできないことがあります。

<人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 第6章第16の2(1)>

- ①研究対象者等又は第三者の生命、身体、財産その他の権利利益を害するおそれがある場合
- ②研究機関の研究業務の適正な実施に著しい支障を及ぼすおそれがある場合
- ③法令に違反することとなる場合