

研究機関名：東北大学

受付番号：2013-1-459
研究課題名 小児頭蓋内悪性腫瘍の遺伝子診断体制の構築 I. 髄芽腫、上衣腫
研究期間 西暦 2013年 10月 (倫理委員会承認後) ~2018年 3月
対象試料 ■病理試料 (対象臓器名 脳腫瘍) ■生検試料 (対象臓器名 脳腫瘍) □血液試料 □遊離細胞 □その他 ()
上記試料の採取期間 西暦 年 月 ~ 2018年 3月
意義、目的 小児における固形悪性腫瘍の中で脳腫瘍は最も頻度が高く、極めて重要な悪性疾患である。近年、国際的には小児脳腫瘍に関する分子遺伝学解析が急速に進展し、髄芽腫の4型分類、後頭蓋窩上衣腫の2型分類など、国際的コンセンサスが形成されつつある分子分類法が提唱されると同時に、毛様細胞性星細胞腫における BRAF 融合遺伝子、小児膠芽腫や小児脳幹部グリオーマにおける histonH3.3 (H3F3A) 遺伝子異常など、診断的価値が高くかつ新たな治療の標的分子となり得る知見が続々発見されている。本研究は全国レベルでの多施設共同研究体を組織して、小児脳腫瘍試料を収集し、その遺伝子診断を行う体制を構築する。その端緒として、まず特に世界的に最も研究が進展している髄芽腫に関して、国内で4型分類診断を実施できる体制を構築し、上衣腫に関しても同様に2型分類診断の実施体制を整備する。
方法 (他の研究機関に試料・情報を提供する場合は、その旨も記載してください) 遺伝子解析を行う研究機関の名称： ①独立行政法人国立病院機構・大阪医療センター (連絡先) 〒540-0006 大阪府大阪市中央区法円坂 2-1-14 TEL: 06-6942-1331 (代表)、FAX: 06-6943-6467 ・臨床研究センター・先進医療研究開発部 再生医療研究室 室長 金村米博：研究責任者、遺伝子解析、インフォームド・コンセント担当 再生医療研究室 流動研究員 兼松大介：病理解析 幹細胞医療研究室 室長 正札智子：遺伝子解析 幹細胞医療研究室 流動研究員 山本篤世：タンパク質発現解析 分子医療研究室 流動研究員 吉岡絵麻：遺伝子解析 ・脳神経外科 医師 埜中正博：インフォームド・コンセント担当 ・臨床検査科 部長 真能 正幸：病理解析 臨床検査科 医師 児玉 良典：病理解析 ・上記以外の大阪医療センターの職員も、遺伝子・タンパク質発現解析、臨床情報解析等を行う研究協力者になり得るが、その際も上記研究者の責任、指導の下に研究を分担する。 ②独立行政法人国立がん研究センター (連絡先) 〒104-0045 東京都中央区築地 5-1-1 TEL: 03-3542-2511 (代表)、FAX: 03-3545-3567 ・脳腫瘍連携研究分野 分野長 市村幸一：研究責任者、遺伝子解析

脳腫瘍連携研究分野 リサーチレジデント 福島慎太郎：遺伝子解析

脳腫瘍連携研究分野 研究補助員 大塚綾香：遺伝子解析

・がんゲノミクス研究分野 分野長 柴田龍弘：ゲノミクス解析

・エピゲノム解析分野 分野長 牛島俊和：エピゲノム解析

・国立がん研究センター中央病院

脳脊髄腫瘍科 副科長 成田善孝

脳脊髄腫瘍科 研究員 松下裕子

・病理科・臨床検査科 科長 津田均

・上記以外の国立がん研究センター研究所・中央病院の職員も、蛋白質・遺伝子発現解析、臨床情報解析等を行う研究協力者になり得るが、その際も上記研究者の責任、指導の下に研究を分担する。

2) 遺伝子解析の支援を行う研究機関の名称：

③大阪大学 微生物病研究所 附属感染症 DNA チップ開発センター

・微生物病研究所

附属感染症 DNA チップ開発センター 教授 野島 博

附属感染症 DNA チップ開発センター 助教 奥崎 大介

・nanoString nCounter Technology 法を用いた遺伝子解析の支援

④The Hospital for Sick Children, Toronto

Michael D Taylor, MD., PhD, FRCSC

Neurosurgeon, Associate Professor

Department of Surgery

Developmental and Stem Cell Biology

University of Toronto

・nanoString nCounter Technology 法を用いた遺伝子解析の支援

3) データ解析の支援を行う研究機関の名称：

⑤German Cancer Research Center, Heidelberg, Germany

(Deutsches Krebsforschungszentrum, DKFZ)

Prof. Dr. Stefan Pfister, MD.

Head of Division Pediatric Neurooncology

⑥St. Jude Children's Research Hospital, TN, USA

Dr. Richard J. Gilbertson, MD, PhD.

Director

Comprehensive Cancer Center

Executive Vice President

Dr. David W. Ellison, MD, PhD, MRCP, FRCPC

Chair of Pathology

Director of Neuropathology

Pathology

⑦The University of Texas MD Anderson Cancer Center, TX, USA

Prof. Kenneth D Aldape, MD

Chair, Department of Pathology

試料

①新鮮腫瘍組織試料（新規試料）

・組織摘出後、その一部を専用の保存液（Allprotect Tissue Reagent, RNAlater, DMEM/F-12 培地等）中に回収し、冷蔵（4度）で保管を行いながら、解析研究機関へ搬送する。

- ・解析研究機関では提供された新鮮組織標本を細切し、その一部を OCT にマウントして液体窒素で急速凍結を行い、凍結組織標本を作成する。
 - ・さらに残りの組織から標準的な手法を用いて、DNA/RNA およびタンパク質の抽出を行う。
- ②凍結腫瘍組織試料（既存試料）
- ・既に凍結状態で各共同研究機関に保管されている試料に関しては、凍結状態のまま解析研究機関へ搬送し、同様に標準的な手法を用いて、DNA/RNA およびタンパク質の抽出を行う。
- ③ホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織試料（新規試料および既存試料）
- ・FFPE 組織試料に関しては、薄切後、スライドガラス上に貼付した状態で解析研究機関へ搬送する。
 - ・FFPE 組織試料からは RNeasy FFPE Kit 等を用いて RNA を、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit 等を用いて DNA を、各々抽出する。

解析方法

①遺伝子発現解析

- ・腫瘍組織試料から抽出された RNA を用いて、RT-PCR 法、nanoString nCounter Technology 法[8]等の手法を用いて遺伝子発現解析を実施する。
- ・タンパク質レベルでの発現解析は、免疫組織学的手法およびウエスタンブロット法、等を用いて実施する。
- ・必要に応じて、マイクロアレイシステムを用いて全ゲノム的な包括的遺伝子発現解析を実施する。

②ゲノム構造解析

- ・腫瘍組織試料から抽出された DNA を用いて、マイクロアレイ、MLPA、fluorescence in situ hybridization（FISH）、nanoString nCounter Technology 法、等の手法を用いて体細胞コピー数異常解析および LOH（Loss of Heterozygosity）解析を実施する。

③遺伝子塩基配列解析

- ・腫瘍組織試料から抽出された DNA/RNA を用いて、キャピラリーシークエンサーを用いたサンガーシークエンス法等を用いて、塩基配列解析を実施し、遺伝子点突然変異の有無を検索する。

④DNA メチル化解析

- ・腫瘍組織試料から抽出された DNA を用いて、ゲノムのメチル化率解析（メチローム解析）を、マイクロアレイ、パイロシーケンス、バイサルフェイトシークエンス、メチル化特異的 PCR 等の手法を用いて実施する。

⑤統計解析

- ・得られた遺伝子解析結果を診断情報、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遺伝子診断法の有用性を検証する。

問い合わせ等の窓口

園田順彦 東北大学病院 脳神経外科

TEL: 022-717-7230

FAX: 022-717-7233

E-Mail: sono@nsg.med.tohoku.ac.jp