

受付番号： 2024-1-436

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书面でとり、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行っ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 2026 年 1 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) 摘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 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、分子診断に有用な代謝産物のスクリーニングをおこなう。

・ 腫瘍・血清内の酸化ストレス防御に関わる関連タンパク, RNA のスクリーニング

5. 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 を次世代シーケンシング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。
6. 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
7. 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シング、またはエクソームシーケンシングをおこない変異の網羅的解析をおこなう。
8. 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。
9. 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。

10. 腫瘍組織・血清中・髄液のタンパク、脂質を分光計で網羅的に計測し分子診断への応用を図る
11. 検体から DNA 抽出を行い、細菌 16S ribosome V3-V4 領域増幅 PCR、インデックス PCR 後に次世代シーケンサ Miseq を用いてシーケンス解析を行う。得られた配列データを細菌 16S ribosome データベースにマッピングすることで、検体に存在している細菌種・量の推定を行う。また、推定細菌のゲノム配列に存在する遺伝子を利用して、検体中に存在する細菌機能の推定・分類を行う。
12. 摘出した腫瘍細胞を培養し、腫瘍検体をマウスやラットなどの脳へ移植することによって、腫瘍細胞と神経細胞や神経膠細胞との相互作用を検討します。
13. 摘出検体を用いて、RNA の一部である Transfer RNA の詳細を解析し、腫瘍の悪性度、転帰との相関を解析します。本検討では Transfer RNA の修飾について質量分析法、Transfer RNA の塩基配列決定法により、発現量を評価し、再発や悪性度などの臨床像との相関を検討します。
14. 摘出検体を用いて、陽電子放射断層撮影(PET)用のモノアミン酸化酵素(MAO-B)と結合する 18F-SMBT-1 によるオートラジオグラフィーを行います。脳腫瘍の MAO-B の発現と摘出検体の病理学的診断、IDH 遺伝子変異や臨床像との関連性について検討します。
15. 当院で放射線化学療法をしないで摘出をした非胚腫胚細胞腫の患者さんの摘出検体から得られたパラフィン切片を用いて空間トランスクリプトーム解析をおこない、細胞 1 個 1 個の発現プロファイルを検討します。
16. 非典型奇形腫様ラブドイド腫瘍は *SMARCB1* 遺伝子産物の INI-1 蛋白欠損によって発症します。INI-1 蛋白欠損のない非典型奇形腫様ラブドイド腫瘍症例において *SMARCB1* 遺伝子変異解析、変異 INI-1 蛋白の機能解析を行い、発がんのメカニズムを解明します。
17. 小児・AYA 世代の後頭蓋窩上衣腫は PFA と PFB に分類されますが、PFB は稀であり、遺伝子変異等、判明していないことが多く、次世代シーケンサー(ナノポアシーケンサーを含む)を用いた網羅的なゲノム解析などを行い、小児後頭蓋窩上衣腫 PFB の詳細な遺伝的背景を検討します。
18. 血液・尿中の『細胞外小胞』は腫瘍細胞内の環境を反映していることが知られています。患者さんの血漿・尿中に含まれる『細胞外小胞』を抽出し、質量分析計を用いて細胞外小胞に含まれる代謝産物を詳細に解析し、病気の進行、再発との関係を解析します。
19. 術野に露出した腫瘍の写真から腫瘍に特徴的に認められる代謝産物の波長を検出することを試みます。さらに摘出した腫瘍凍結検でも同様の検討をおこないます。

5. 研究に用いる試料・情報の種類

摘出腫瘍組織・血液・髄液

6. 外部への試料・情報の提供

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、マサチューセッツ工科大学、順天堂大学、**藤田医大、名古屋大学、東京大学**に一部の試料を匿名化したうえで提供します。また 5.の検討のため、株式会社マイクロジェンに匿名化した 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・助教・下田由輝

順天堂大学：脳疾患連携分野研究講座・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

株式会社マイクロジェン：営業部 高橋翼

マサチューセッツ工科大学：教授 Peter C. Dedon

国立がん研究センター・先端医療開発センタートランスレーショナルインフォマティクス分野：ユニット長 山下 理宇

国立がん研究センターがん進展研究分野：分野長・吉田健一

藤田医科大学 研究支援推進本部 腫瘍医学研究センター 解析病理部門：准教授・山田勢至

名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経外科：教授・斎藤竜太

東京大学医学部附属病院循環器内科 先進循環器病学講座：特任教授 藤生克仁

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せんので、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：下田由輝 yositeru8.8simoda@yahoo.co.jp （研究責任者）

◆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お問い合わせ先：「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。

- 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へ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。

- 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