

## 学内グラント 報告書

## 平成24年度 学内グラント終了時報告書

## 術中迅速変異型 IDH1 遺伝子検出のグリオーマ手術への応用

研究代表者 安達 淳一 (国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科)

研究分担者 西川 亮\*

## 緒言

IDH1 (染色体2q34上)はイソクエン酸脱水素酵素 (IDH: Isocitrate Dehydrogenase)に属して, NADPを補酵素としてイソクエン酸を $\alpha$ -ケトグルタル酸に変換するという細胞のエネルギー代謝, クエン酸回路に関わる機能を持っている。2009年に, WHO grade2及びgrade3の星細胞腫, 乏突起膠腫, さらに続発性膠芽腫 (secondary glioblastoma)を含めたグリオーマの50-70%以上に IDH1の点突然変異がみられることが明らかになった<sup>1-3)</sup>。そして, 点突然変異の起こるアミノ酸はグリオーマではIDH1遺伝子のR132変異 (アミノ酸残基132番目のアルギニンが他のアミノ酸に置換)にほぼ限られていることが判明した<sup>1)</sup>。このIDH1遺伝子の点突然変異は正常細胞やグリオーマ以外の固形癌では観察されないことが報告されており<sup>1)</sup>, また, この変異はグリア細胞が低悪性度グリオーマから高悪性度グリオーマへと進展する過程の比較的初期の段階で出現することもわかっている<sup>1,4)</sup>。従って, このIDH1遺伝子変異が検出されればグリオーマであることは間違いなく, グリオーマの遺伝子診断への応用が可能になると考え, これをグリオーマ手術時の迅速診断に応用させるべく本研究を行った。

## 材料と方法

画像診断でグリオーマが疑われた患者を対象とした。手術時に採取した腫瘍組織を, UltraClean Tissue & Cell DNA Isolation Kit (MO BIO Laboratories社)を用いてDNAを採取した。必要な腫瘍組織は径約2ミリ (10-15 mg相当)であった。DNA抽出から精製に要する時間は約15分を要した。精製DNAをLightCycler480システム (ロシュ・ダイアグノスティクス)を用いて高解像能融解曲線分析法にてIDH1遺伝子のR132点突然変異の有無を解析した。

\*国際医療センター 脳神経外科/脳脊髄腫瘍科

高解像能融解曲線分析法は以下の様に行った。まず, 目的のIDH1遺伝子R132を挟んでPCRで増幅した。PCRのプライマーはPardanani<sup>5)</sup>らの報告に基づいてデザインした (表1)。DNAインターカレート色素を含むLightCycler HRM マスターミックス (ロシュ社)を使用し, 総反応液量20  $\mu$ lとしてPCR反応を進めた。PCRサイクルの条件は以下の通りである。

DNA変成: 95°C, 3分。

PCRサイクル: 94°C, 30秒 (DNA変成) / 57°C, 30秒 (アニーリング) / 72°C, 40秒 (DNA伸長) の条件で30回のサイクル後に72°C, 40秒 (最終伸長)。

この後に融解曲線へのステップとして95°C 1分, 50°C 1分, 72°C 5秒の後, 95°Cへ向かって1°Cにつき30回連続して蛍光を取得した。以上, 全経過約50~60分で解析結果が得られた。IDH1遺伝子に変異があると, 変異の無い野生型と比べて2本鎖DNAにミスマッチが生じてDNA融解温度が上昇した。この融解温度の違いをLightCycler480システムで解析しIDH1遺伝子変異が検出された (図1)。以上設定した迅速診断用プロトコルで得られた結果と, 通常の解析 (アニーリング時間とDNA伸長時間が上記の2倍) で得られた結果と比較した。

## 結果

6例のグリオーマ症例 (びまん性星細胞腫2例, 乏突起膠腫2例, 退形成性星細胞腫1例, 膠芽腫1例)で, IDH1変異について通常の解析と迅速診断用の解析の両者を行ったところ, 全ての症例で通常法と迅速法いずれでも同じ結果が得られた (表2, 図2)。

## 考察

IDH1変異の同定には, 我々の用いた方法以外に直接DNAシーケンス法, 免疫染色法がある。前者では

解析に数時間を要するため迅速診断には使えない。後者では、現在の市販の抗体が R132H 変異タンパク質のみの検出のため、R132 変異の全てを網羅できない。我々の方法では、組織採取から約 50-60 分で全ての

IDH1R132 変異陽性グリオーマを判定できた。また、本法は IDH1 変異陽性低悪性度グリオーマとグリオシスなどの非腫瘍性組織との鑑別において、術中病理診断の補助として有用と考えられた。

表 1.

5'-CGGTCTTCAGAGAAGCCATT-3' (sense)  
5'-CACATTATTGCCAACATGAC-3' (anti-sense)

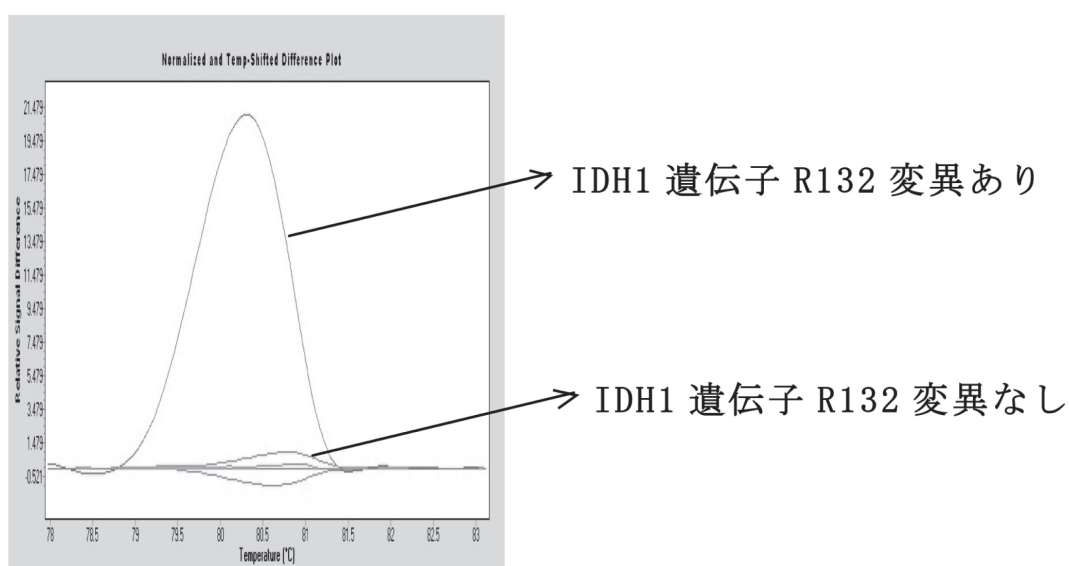


図 1.

表 2.

Cases	Age	Location	Histology	IDH1R132 mutation	
				通常法	迅速法
1	32	Lt. frontal	Diffuse astrocytoma	あり	あり
2	30	Lt. frontal	Diffuse astrocytoma	あり	あり
3	33	Lt. frontal	Oligodendroglioma	あり	あり
4	25	Lt. frontal	Oligodendroglioma	あり	あり
5	59	Lt. parietal	Anaplastic astrocytoma	なし	なし
6	53	Lt. parietal	Glioblastoma	なし	なし

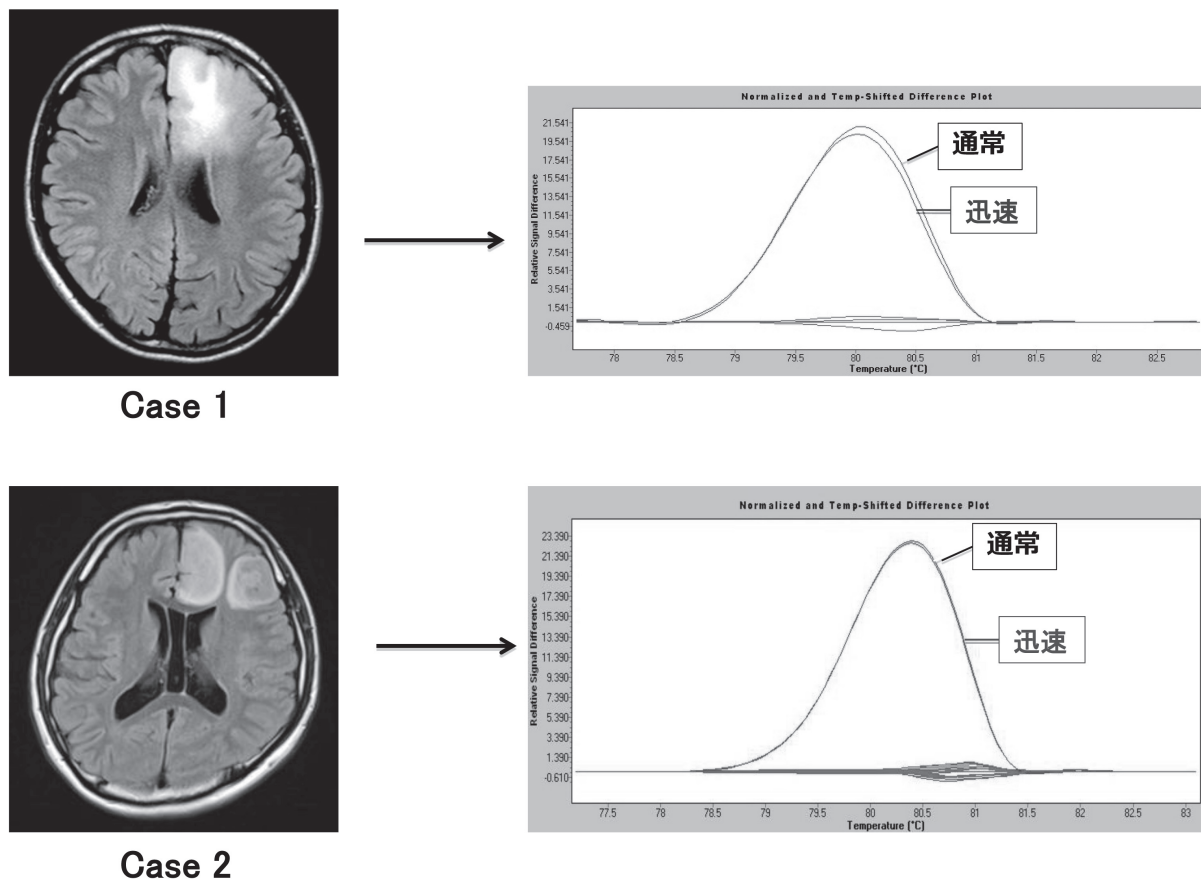


図 2.

## 文 献

- 1) Yan H, et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* 2009;360:765-73.
- 2) Parsons DW, et al. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2009;321:1807-12.
- 3) Ichimura K, et al. IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro Oncol* 2009;11:341-7.
- 4) Sonoda Y, et al. Analysis of IDH1 and IDH2 mutations in Japanese glioma patients. *Cancer Sci* 2009;100:1996-8.
- 5) Pardanani A, et al. IDH1 and IDH2 mutation analysis in chronic-and blast-phase myeloproliferative neoplasmas. *Leukemia* 2010;24:1146-51.

## 研究成果リスト

## 論文

- 1) Adachi J, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Matsutani M, Sasaki A, Nishikawa R. *O*<sup>6</sup>-methylguanine-DNA

methyltransferase promoter methylation in 45 primary central nervous system lymphomas: quantitative assessment of methylation and response to temozolomide treatment. *J Neurooncol* 2012;107:147-53.

- 2) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. *IDH1* mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients. *J Cancer Res Ther* 2013;9:S30.

## 学会発表

- 1) 安達淳一, 三島一彦, 甲賀智之, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 福岡講平, 佐々木惇, 西川亮. グリオーマ手術における術中迅速変異型 IDH1 遺伝子検出の試み, 第30回日本脳腫瘍病理学会, 2012年5月, 東京
- 2) 安達淳一, 甲賀智之, 三島一彦, 白畑充章, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 福岡講平, 佐々木惇, 西川亮. 変異型 IDH1 遺伝子解析の術中迅速診断への応用, 日本脳神経外科学会, 第71回学術総会, 2012年10月, 大阪

- 3) Adachi J, Mishima K, Yanagisawa T, Fujimaki T, Matsutani M, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in pediatric glioma, The 19th International Brain Tumor Research and Therapy Conference, June 2012, Niagara Falls, Canada
- 4) Adachi J, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Mishima K, Koga T, Matsutani M, Nishikawa R. IDH1 mutation analysis in pediatric glioma patients, 15th International Symposium on Pediatric Neuro-Oncology, June 2012, Toronto, Canada
- 5) Adachi J, Suzuki T, Yanagisawa T, Mishima K, Fukuoka K, Koga T, Matsutani M, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in pediatric glioma patients, 10th Congress of European Association of NeuroOncology, September 2012, Marseille, France
- 6) Adachi J, Yanagisawa T, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata M, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevance to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients, 10th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology, March 2013, Mumbai, India
- <特許出願>  
なし