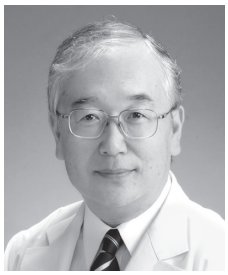
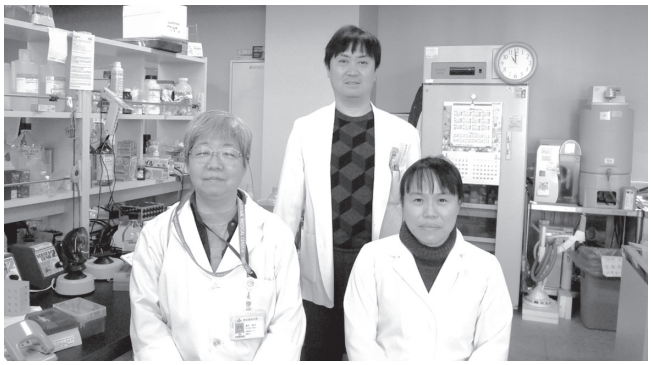
研究室紹介



国際医療センター　脳神経外科／脳脊髄腫瘍科
西川　亮



左から遠竹恭子（実験助手），安達淳一（准教授，研究主任），渡邊こずえ（実験助手）．脳脊髄腫瘍科実験室にて撮影．

国際医療センター教員研究棟7階に位置する脳脊髄腫瘍科の研究室は，2007年4月のセンター開設時点に，それまでの毛呂の埼玉医科大学脳神経外科研究室から分離移転する形で発足した．分子遺伝学，病理学，細胞培養などに対応する体制を確立し，脳腫瘍に見られる遺伝子異常の解析を中心に研究を行っている．

脳腫瘍研究における遺伝子解析には以下に述べるように大きく2つの意義がある．第1には，特定の遺伝子異常が診断，治療感受性，予後と相関することが確認されていて，こうした遺伝子異常の解析は，脳腫瘍を専門に扱っている施設では今や必須の情報となっている．第2に，変異*EGFR*遺伝子や変異*BRAF*遺伝子の特異的な阻害剤がそれぞれの異常を有する肺非小細胞癌や転移性悪性黒色腫に奏効することが示されたように，脳腫瘍にみられる特異的な遺伝子異常が治療に応用され成功を収める可能性を秘めているからである．神経膠腫をはじめとする悪性脳腫瘍は浸潤性が高く，放射線照射や化学療法などの治療にも抵抗性を示す極めて難治性の腫瘍である．脳という臓器の特殊性ゆえ外科的に全摘出をして治癒を期待するのは困難であり，新たな治療法の開発が急務となっている．

研究室を構成するメンバーは国際医療センター脳脊髄腫瘍科医師の他に，研究助手の遠竹恭子と渡邊こずえ（非常勤）が試料作製や保存，免疫染色などの基礎的実験業務に携わっている．以下に当研究室にて過去に行ってきた，あるいは現在遂行中の研究について簡単に紹介する．

＜神経膠腫の診断や予後に関連する分子マーカーの解析＞

神経膠腫の治療反応性と予後を規定する重要な因子として，(1) 染色体1p，19qの欠失の有無，(2) O^6-methylguanine-DNA methyltransferase（*MGMT*）遺伝子プロモーターのメチル化の状態，(3) Isocitrate dehydrogenase 1（*IDH1*）遺伝子の変異の有無が重要であることが知られている．これらの分子マーカーの解析をルーチンに行い，例えば染色体1p，19q欠失に関してはFluorescence *in situ* hybridization（FISH）法にて検出を行っている．*MGMT*遺伝子プロモーターのメチル化を持つ膠芽腫は抗腫瘍薬テモゾロミドへの感受性が期待でき，生存期間の延長効果がみられることが知られている．この*MGMT*遺伝子のプロモーターのメチル化については，メチル化感受性高解像能融解曲線分析法にて定量的に検索している．

メチル化感受性高解像能融解曲線分析法とは，まず神経膠腫組織由来のDNAにbisulfite処置を施した後に，飽和型インターカレート色素の存在下で*MGMT*遺伝子プロモーター領域をLightCyclerシステムを用いてPCR増幅する．その後，引き続き融解曲線データを微分プロットに変換してピークとして表示するTm callingアルゴリズムにより解析して，非メチル化とメチル化DNAの割合を算出する定量的な解析法である．我々はこの方法を*IDH1*遺伝子の点突然変異の有無についての解析にも応用している．*IDH1*遺伝子の突然変異の検出においては，Sanger DNAシークエンス法（正しい結果を得るのに腫瘍純度が約20%以上必要）よりも，1塩基変異を高感度に検出できる（腫瘍純度が約1%で変異の検出可能）．また，小児の主に脳幹に発生するびまん性神経膠腫で高頻度に異常がみられることが最近のゲノム解析によって明らかになった，*Histone H3.3*遺伝子の変異や毛様細胞性星細胞腫の一部にみられる*BRAF*遺伝子のV600E変異についても同様の方法で解析している．

＜中枢神経悪性リンパ腫における*MGMT*遺伝子プロモーターメチル化の定量的解析とテモゾロミドへの治療反応性の検討＞

中枢神経悪性リンパ腫に対する化学療法は大量メソトレキセート療法が標準治療であるが，再発や治療抵抗性の症例の一部には，前出のテモゾロミドが有効な例が存在する．再発中枢神経悪性リンパ腫にテモゾロミド治療をおこなった症例でこれが有効であった症例はすべて，メチル化感受性高解像能融解曲線分析法にて*MGMT*遺伝子のプロモーターが高メチル化を示していた．従って，*MGMT*遺伝子のプロモーターメチル化は膠芽腫だけでなく，中枢神経悪性リンパ腫においてもテモゾロミド治療効果を予測する分子マーカーになりうる．

＜マイクロアレイ解析を用いた神経膠腫のポルフィリン代謝経路の解析＞

境界不明瞭で浸潤性腫瘍である神経膠腫の摘出には5アミノレブリン酸（5-ALA）を用いた蛍光診断下の摘出が有効であり広く用いられている．しかしすべての腫瘍で蛍光発光が得られるわけではなく，また5-ALAを投与することにより，悪性腫瘍細胞が特異的に発光する機序についての詳細は不明である．そこで，我々はマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析から，5-ALAによる蛍光発色メカニズムに関わる遺伝子の探索と蛍光発色における機能解析を行った．

神経膠腫患者の腫瘍において，同一症例で蛍光診断陽性・陰性腫瘍部が併存して認められた検体を用い，その蛍光陽性・陰性腫瘍部それぞれより抽出したRNAを使用して，マイクロアレイによる遺伝子発現解析を行った．解析によって策定した蛍光陽性・陰性規定候補遺伝子については，real-time RT-PCR法によって詳細な遺伝子発現レベルの確認を行った．

遺伝子発現解析の結果，Cadherin 13（CDH13）が蛍光陰性腫瘍において蛍光陽性腫瘍に比べ，有意に高発現していることが示された．CDH13は神経細胞の成長抑制，乳癌，卵巣癌，肺癌における過剰メチル化や欠失による発現低下などが報告されており，腫瘍細胞増殖の抑制に関与していると考えられている分子である．さらに，膠芽腫細胞株であるU251に対してCDH13のノックダウン実験を行ったところ，発光物質であるPPIXの細胞内含有量が有意に増加した．また，CDH13をノックダウンしたU251細胞を用いたマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行ったところ，PPIXの輸送に関与するATP-binding cassette transporter（ABCG2）が減少し，Oligopeptide transporter 1（PEPT1）は上昇していた．ABCG2は薬物排出に関わる物質であり，ポルフィリン代謝においては，ヘムやポルフィリンを細胞外へ排出するトランスポーターの一つと考えられている．一方，PEPT1はポルフィリンの細胞内流入に関わるトランスポーターとして働いており，5-ALAによる蛍光発色において，ポルフィリンの輸送に大きく関わっていると考えられる．

以上の結果から，神経膠腫の蛍光陽性部位ではCDH13遺伝子の発現が低下しており，それに伴うABCG2の発現抑制とPEPT1の発現亢進によって，細胞内へのPPIX蓄積が促進されているのではないかと推測された．

＜希少脳腫瘍における遺伝子プロファイリングの確立＞

脳腫瘍のなかで，中枢神経悪性リンパ腫，頭蓋内胚細胞腫，髄芽腫，上衣腫は頻度も少なく，そこに存在する遺伝子異常は十分に明らかにされていない．

また，難治性で特に再発時に有効な治療法が極めて少ないのが現状である．そこで，多施設共同研究体制を組んで症例を集積し網羅的遺伝子解析を行っている．その結果が，遺伝子プロファイリングに基づいた新たな病型診断，治療法の選択に役立つことが期待され，さらに新規分子標的薬の開発の契機となる可能性がある．

＜論文＞

1) Suzuki T, Wada S, Eguchi H, Adachi J, Mishima K, Matsutani M, Nishikawa R, Nishiyama M. Cadherin 13 overexpression as an important factor related to the absence of tumor fluorescence in 5-aminolevulinic acid-guided resection of glioma. J Neurosurg 2013;119:1331-9.
2) Adachi J, Yanagisawa Y, Suzuki T, Fukuoka K, Koga T, Shirahata Y, Mishima K, Nishikawa R. IDH1 mutations with relevamce to 1p/19q loss and MGMT methylation in 23 pediatric glioma patients. J Cancer Res Ther 2013;9:30.
3) Mukasa A, Takayanagi S, Saito K, Shibahara J, Tabei Y, Furuya K, Ide T, Narita Y, Nishikawa R, Ueki K, Saito N. Significance of IDH mutations varies with tumor histology, grade, and genetics in Japanese glioma patients. Cancer Sci 2012;103:587-92.
4) Adachi J, Mishima K, Wakiya K, Suzuki T, Fukuoka K, Yanagisawa T, Matsutani M, Sasaki A, Nishikawa R. O^6-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.
5) Feng H, Hu B, Liu KW, Li Y, Lu X, Cheng T, Yiin JJ, Lu S, Keezer S, Fenton T, Furnari FB, Hamilton RL, Vuori K, Sarkaria JN, Nagane M, Nishikawa R, Cavenee WK, Cheng SY. Activation

of Rac1 by Src-dependent phosphorylation of Dock180(Y1811) mediates PDGFRα-stimulated glioma tumorigenesis in mice and humans. J Clin Invest 2011;121:4670-84.
6) Liu KW, Feng H, Bachoo R, Kazlauskas A, Smith EM, Symes K, Hamilton RL, Nagane M, Nishikawa R, Hu B, Cheng SY. SHP-2/PTPN11 mediates gliomagenesis driven by PDGFRA and INK4A/ARF aberrations in mice and humans. J Clin Invest 2011;121:905-17.
7) Adachi J, Totake K, Mishima K, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Matsutani M, Nishikawa R. Methylation-sensitive high-resolution melting analysis: Quantitative assessment of MGMT promoter methylation in high-grade gliomas. Neuro-Oncology 2010;12:31.
8) Mishima K, Adachi J, Suzuki T, Wakiya K, Yanagisawa T, Fukuoka K, Nishikawa R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma in elderly patients. Neuro-concology 2010;12:46.

© 2014 The Medical Society of Saitama Medical University