

学内グラント 終了時報告書

平成20年度 学内グラント報告書

マイクロアレイ解析を用いた脳腫瘍における
ポルフィリン代謝経路の解析

研究代表者 鈴木 智成(埼玉医科大学 医学部 脳神経外科)

研究分担者 脇谷 健司¹⁾, 安達 淳一¹⁾, 三島 一彦¹⁾, 松谷 雅生¹⁾,
西川 亮¹⁾, 江口 英孝²⁾, 西山 正彦²⁾

緒言

原発性脳腫瘍の中で、神経膠芽腫を代表とした悪性脳腫瘍の治療成績は、診断治療法が進歩した現在でも目立った改善は得られていない。予後を決する最大の要素は組織の悪性度であるが、治療に関する予後因子としては手術での摘出率が重要であると言われている。しかし、特に悪性神経膠腫は極めて浸潤性が高く、たとえMRIにて境界明瞭に造影される腫瘍であっても、実際の手術においては肉眼的に脳腫瘍と正常脳との境界は判然とせず、専ら術者の主観と経験に基づいて摘出術が行われてきた。

そこで、客観的な判断に基づく腫瘍組織の選択的摘出の一つとして、光感受性物質を用いた術中蛍光診断による腫瘍摘出法が注目を集めている。5-ALA(5-aminolevulinic acid)は天然に存在するヘモグロビンの前駆体であり、これを手術に先立ち経口摂取させ体内に吸収させると、腫瘍特異的にヘム合成系によるポルフィリン合成が行われ、蛍光性のPpIX(protoporphyrin IX)の蓄積が認められる。腫瘍と疑われる組織に波長405 nmの青紫色のレーザー励起光を照射すると、PpIXが蓄積した部位では635 nmにピークを持つ赤色蛍光を呈する。これにより正常部と腫瘍の判別を容易にし、腫瘍部位の選択的摘出を可能とする。

実際、Stummerらは332人の無作為化第III相比較試験を行い、5-ALAを用いた蛍光ガイド下の脳腫瘍摘出は白色光下でのみ摘出を行ったコントロール群と比べ、造影部分すべてが摘出された割合が有意に高く(65% vs 36%, オッズ比(OR):3.28, 95%

CI:1.99-5.40, $P < 0.0001$), Karnofsky スコアがORで3.20(95% CI:1.98-5.40, $P = 0.0001$)と改善が認められ、また6ヶ月の無増悪生存割合は21.1%から41.0%と有意に改善を示した($P = 0.0003$)と報告している。

腫瘍におけるPpIX蓄積の機序として、これまで悪性脳腫瘍細胞におけるヘム合成酵素系の異常、例えばferrochelataseの活性低下、prophobilinogen deaminaseの活性上昇、ミトコンドリアへの移送に関係するperipheral benzodiazepine receptorの発現上昇によるPpIXの産生上昇あるいは分解抑制などが提唱されているが、これまで統合的な解析は行われておらず、その全体像については未だ明らかになっていない。

実際の手術において、神経膠芽腫など悪性度の高い腫瘍は蛍光の陽性率が高く、低悪性度神経膠腫では陰性であることが多い。さらに、同一個体の腫瘍の中にも良好に蛍光を発する部位とそうでない部位が混在する症例や、同じ組織型であっても陽性と陰性を示す症例が存在する。

このように神経膠腫同一組織型や同一固体において蛍光の陽性・陰性の差が生じる機序について検討するため、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析を行った。

材料と方法

1) 対象症例

平成17年2月より平成20年7月の間に研究課題:「手術で取り出した脳・脊髄腫瘍の標本と血液の保存および研究への利用に関するお願い」における将来の医学的研究の同意を文書で得られたもの(A群試料)で、5-ALAによる術中蛍光診断を行い、病理学的に神経膠芽腫と診断された26症例を対象とした。

2) アミノレブリン酸の投与

1) 埼玉医科大学 国際医療センター 脳神経外科
2) 埼玉医科大学 国際医療センター トランスレーショナルリサーチセンター

手術当日に術開始約4時間前に5-ALA 20 mg/kgを電解質溶液に溶解し経口投与を行った。経口投与が困難な症例については、全身麻酔導入直後に同量の5-ALAを生理食塩水に溶解し胃管より投与した。

3) 蛍光診断および検体採取

開頭手術にて腫瘍を観察し、半導体レーザー装置 (VLD-M1 ver.3.0 SP:M and M 社) より出力 140 mW、振幅波長 405 nm の violet-blue 励起光にて腫瘍が疑われる部位を照射し、分光解析装置 (BW-Spec Operating Software (B and W Tec.)) を用いて、PpIX 特異的波長ピーク (635 nm) を検出した。摘出部位は肉眼所見による執刀医の判断により行った。術中蛍光診断による手術組織の蛍光陽性・陰性を記録し、検体を陽性陰性の各部位に分けて凍結保存した。

4) マイクロアレイ

凍結保存手術検体に対し、分光解析装置のレーザー光をあて、診断時の蛍光陽性・陰性記録と一致するか確認を行った。その後、全ての検体から NucleoSpin RNA 抽出キット (Macherey-Nagel) を用いて全 RNA を調整し、Bioanalyzer (Agilent) にて RNA が分解されていないかを検査した。マイクロアレイ実験に適した良質な RNA 検体 (RNA Integrity Number > 7.0) のみについて、Quick Amp Labeling Kit (Agilent) で cRNA 合成によるラベリングを行い、Whole Human Genome 44 k (Agilent) マイクロアレイにて遺伝子発現プロファイルを得た。GeneSpring GX (Agilent) 解析ソフトウェアを用いて遺伝子発現データを標準化し、バイオインフォマティクス的手法や統計学的手法 (SAM: Significance Analysis of Microarray, WAD: Weighted Average Difference) によって陽性検体と陰

性検体の2群間比較を行った。

結 果

神経膠芽腫 26 検体のうち、励起レーザー光照射下での蛍光について、同一個体で蛍光陽性および陰性を示した手術組織が 5 例あり、その他はすべて蛍光陽性症例であった。Bioanalyzer による RNA 品質確認において、26 検体のうち、6 検体で RNA の顕著な分解が認められたため、残りの 20 検体をマイクロアレイ解析に供した。標準化した遺伝子発現プロファイルデータを基に、陽性検体群と陰性検体群に対して 1) 同一個体において陽性と陰性の組織部位が存在する検体を用いたペア解析と、2) 全ての検体を解析対象とした 2 群間比較解析を行い、それぞれの解析において有意に発現量の異なっている 1000 遺伝子を抽出した。1), 2) の両解析で共通して有意な発現量の差異が認められたものは 16 遺伝子であった。そのうち、アノテーションが付与されている 12 遺伝子を 5-ALA による蛍光診断における陽性・陰性規定候補遺伝子として選定した。(Table 1, Fig.1)

考 察

神経膠腫の手術において、正常脳との判別にアミノレブリン酸による蛍光診断が有用であるという報告は多いが、実際の手術では蛍光が極めて微弱な症例や肉眼的には明らかに腫瘍と思われても蛍光を示さないことがある。このような不安定な蛍光発色は、術中蛍光診断法において改善が望まれるところであり、そのためにはアミノレブリン酸による蛍光発色の分子メカニズムを明らかにする必要がある。

Table. 1. Candidate genes of the fluorescence diagnosis by 5-ALA in the glioblastoma

GeneSymbol	Description
HSPA1A	Homo sapiens heat shock 70kDa protein 1A (HSPA1A), mRNA [NM_005345]
DHCR24	Homo sapiens 24-dehydrocholesterol reductase (DHCR24), mRNA [NM_014762]
UBQLN1	Homo sapiens ubiquilin 1 (UBQLN1), transcript variant 2, mRNA [NM_053067]
RHOBTB3	Homo sapiens Rho-related BTB domain containing 3 (RHOBTB3), mRNA [NM_014899]
ACCN2	Homo sapiens amiloride-sensitive cation channel 2, neuronal (ACCN2), transcript variant 1, mRNA [NM_020039]
GPSM3	Homo sapiens G-protein signalling modulator 3 (AGS3-like, C. elegans) (GPSM3), mRNA [NM_022107]
TLCD1	Homo sapiens TLC domain containing 1 (TLCD1), mRNA [NM_138463]
MMP17	Homo sapiens matrix metalloproteinase 17 (membrane-inserted) (MMP17), mRNA [NM_016155]
ASCL1	Homo sapiens achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila) (ASCL1), mRNA [NM_004316]
ITM2A	Homo sapiens integral membrane protein 2A (ITM2A), mRNA [NM_004867]
SLC16A9	Homo sapiens solute carrier family 16, member 9 (monocarboxylic acid transporter 9) (SLC16A9), mRNA [NM_194298]
KRTAP5-8	Homo sapiens keratin associated protein 5-8 (KRTAP5-8), mRNA [NM_021046]

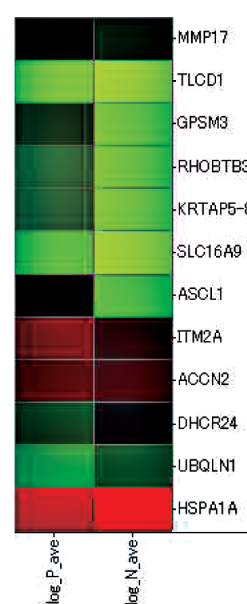


Fig. 1. Signal intensity of candidate genes.

今回、候補として挙げた12遺伝子について、既報に基づき、アミノレブリン酸代謝あるいは癌等疾病との関連を検討した。

まず、*HSPA1A*は第6染色体上にあるheat shock protein 遺伝子であり、パーキンソン病や痴呆など中枢神経系疾患との関連がこれまでに報告されている。また肝細胞癌での発現上昇が認められており、発癌や薬剤耐性への関与が示唆されている。神経膠芽腫においては温熱療法やシスプラチンなどの抗腫瘍治療により同遺伝子の発現が抑制される。また、*HSPA1A*の高発現により、グルコース代謝が活発化されるという報告もある。

一方、*SLC16A9*はモノカルボン酸トランスポーター遺伝子であり、アミノレブリン酸の輸送への関与も考えられる。5-ALA取り込みによる蛍光発色の有無が輸送蛋白質の発現と関与するか、極めて興味深い。

今後、これらのマイクロアレイにより選定された候補遺伝子について、TaqMan Probeを用いたReal time RT-PCR法によって定量的遺伝子発現解析を行い検討する予定である。また、マイクロアレイデータを基に候補遺伝子のネットワーク解析を行い、ポルフィリン

代謝経路やその他の機能ネットワークとの関連についても検討を進める。(Fig.2)さらに、培養細胞を用いたノックダウン実験や強制発現実験による機能解析を進め、術中蛍光診断での陽性・陰性を示す作用機序を明らかにできれば、将来の手術精度向上や、患者の予後改善が期待される。

研究成果リスト

- 1) 鈴木智成, 石原正一郎, 杉山達也, 中島弘之, 根木宏明, 脇谷健司, 安達淳二, 三島一彦, 西川亮, 松谷雅生: 神経内視鏡下腫瘍生検時における脳室壁観察の重要性 第15回日本神経内視鏡学会 2008.7月(学会発表)

謝 辞

本研究は平成20年度埼玉医科大学、学内グラントにより行われた。遺伝子解析およびネットワーク解析において、ご高配を賜りましたトランスレーショナルリサーチセンター 和田智先生に深謝いたします。

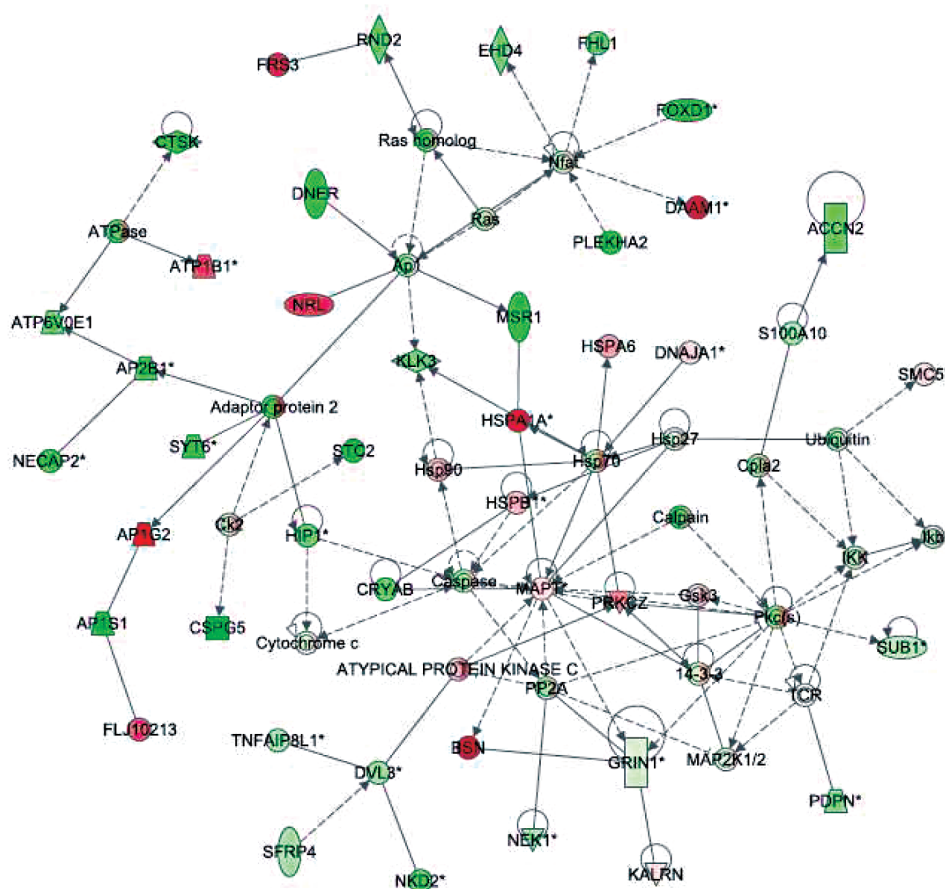


Fig. 2. Network analysis of candidate genes.