

厚生労働科学研究費補助金

第3次対がん総合戦略研究事業

**希少がん（悪性脳腫瘍）の個別適正化治療のための
TRI(Translational Research Informatics)システムの
構築に関する研究**

(H18-3次がん-一般-008)

平成19年度 総括研究報告書

主任研究者 成田 善孝

平成20（2008）年 4月

目 次

I. 総括研究報告

- 希少がん（悪性脳腫瘍）の個別適正化治療のための ----- 1
TRI(Translational Research Informatics)システムの
構築に関する研究
成田 善孝

II. 分担研究報告

1. 悪性脳腫瘍の髄液蛋白・組織プロテオミクス解析による ----- 11
新規診断マーカーの開発
成田 善孝
2. Low grade gliomaに対する化学療法単独療法の実現にむけて ----- 17
—MGMTプロモーター領域のメチル化、1p/19q LOH解析と
放射線による腫瘍縮小効果の検討について—
渋谷 壮一郎
3. 神経膠腫におけるPodoplanin発現の意義 ----- 20
西川 亮
4. 悪性脳腫瘍に対する遺伝子治療の臨床応用に関する研究 ----- 24
浅井 昭雄
5. 脳腫瘍に発現する分子マーカーの形態変化を含めた
臨床病理学的意義との相関の研究（がんの病理診断に関する研究） ----- 27
中西 幸浩
6. 悪性脳腫瘍に関する統合化データベース解析のための、
統計・情報学に基づいた新しい解析手法の開発に関する研究 ----- 29
高橋 広夫
7. がんTRIシステムの開発に関する研究 ----- 33
齋藤 彰
8. がんTRIシステムの開発に関する研究 ----- 37
秋葉 幸範

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ----- 42

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ----- 44

厚生労働科学研究費補助金（第3次対がん総合戦略研究事業）

総括研究報告書

希少がん（悪性脳腫瘍）の個別適正化治療のための

TRI(Translational Research Informatics)システムの構築

主任研究者 国立がんセンター放射線治療部医長

成田善孝

研究要旨

あらゆる癌の中で最も治療困難な悪性脳腫瘍 Glioma(神経膠腫)の予後改善を目的として、患者背景・画像情報・病理情報・マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現プロファイル・プロテオームデータ・治療結果などの質の高い臨床情報を収集した統合化データベース[TRI システム]を作成した。Glioma のマイクロアレイデータベースとしては国内最大であり、これをもとに悪性脳腫瘍の診断や放射線化学療法の感受性をはじめとした治療効果を予測する遺伝子の探索を行った。我々は Glioma の中でも最も悪性度の高い Glioblastoma において、MGMT の高発現が化学療法感受性と関係していることを報告したが、今回の解析により MGMT が高発現しているにもかかわらず予後不良の症例では、血管新生因子や癌遺伝子が発現していることが明らかとなり、血管新生抑制剤の投与が治療成績を改善する可能性があることが示唆された。

主任研究者

成田 善孝

国立がんセンター中央病院

放射線治療部医長

西川 亮

埼玉医科大学国際医療センター

包括的がんセンター

脳・脊髄腫瘍科教授

分担研究者

渋井壮一郎

国立がんセンター中央病院

脳神経外科医長

浅井 昭雄

関西医科大学医学部

脳神経外科教授

中西 幸浩

国立がんセンター研究所
病理部第一組織病理部医長

齋藤 彰

日本電気（株）NEC 中央研究所
ソリューション開発研究本部
ビジネスイノベーションセンター
バイオ IT センター 主幹研究員

秋葉 幸範

日本電気（株）NEC 中央研究所
ソリューション開発研究本部
ビジネスイノベーションセンター
バイオ IT センター 主任研究員

高橋 広夫

中部大学応用生物学部
応用生物化学科講師

研究協力者

吉田 輝彦

国立がんセンター研究所
疾病ゲノム解析・情報部部長

田伏 洋

日本電気（株）NEC 中央研究所
ソリューション開発研究本部
ビジネスイノベーションセンター

滝中 徹

ソリューション開発研究本部
ビジネスイノベーションセンター
バイオ IT センター

研究目的

悪性脳腫瘍に代表される希少がんは、症例が少なく、肺癌や消化器癌に比べて治療効果の予測、標準的治療の確立や新規治療法の開発が極めて困難である。特に悪性脳腫瘍の中で最も多い膠芽腫 Glioblastoma は、平均生存期間が 1 年程度であり、あらゆるがんの中でも極めて予後が悪い。本研究は希少がんとして悪性脳腫瘍を対象とし、臨床情報・画像情報・病理情報・マイクロアレイを用いた網羅的な遺伝子発現プロファイル・プロテオームについてのデータを収集し、放射線化学療法感受性をはじめとした治療効果を予測する TRI システムを構築し、新規症例の個別適正化した治療法を開発することを目的とした。

研究方法

悪性脳腫瘍を対象とし、国立がんセンター・埼玉医科大学・杏林大学・東京女子医科大学など多施設で集められた凍結腫瘍組織、匿名化臨床情報、画像情報、病理情報（HE 染色・免疫染色標本）をデジタル化し、凍結腫瘍組織・髄液より得られたマイクロアレイによる腫瘍遺伝子情報、プロテオーム

情報をデータベース化した。

これらの蓄積した情報をもとに、診断・治療効果の予測・治療上の問題点を明らかにする TRI (Translational Research Informatics) システムを、日本電気バイオインフォマティクス部門と共同で開発をすすめた。

(倫理面への配慮)

本研究にあたっては国立がんセンター、試料提供施設、NEC の倫理審査委員会の承認を得て行った。試料は全て国立がんセンター中央病院において厳重に管理・連結可能匿名化し、第三者は元より、遺伝子情報解析担当者、TRI システム開発担当者にも個人情報と連結した遺伝子・臨床情報が渡ることではなく、プライバシーと人権は高度に擁護された。また腫瘍のゲノム解析については「ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針」に基づいて行った。

A. 研究結果

(1) Glioma の遺伝子発現解析とデータベースの構築

前年度にひきつづき、200 症例からなる国内最大の 悪性脳腫瘍のマイクロアレイデータ (Affymetrix HG-U133) を解析し

た。今年度はさらに、Illumina 550K array を用いて、SNP array によるデータも蓄積した。

これらの解析データとともに、HE 染色・免疫染色などの病理標本の全画像・MRI 所見・臨床経過をデジタル化し、BIOPRISM ソフトウェアを用いてデータベースを構築した。遺伝子発現は昨年度に開発した、症例ごとの発現の差異を染色体上にマッピングする

Chromosome viewer を用いて参照できるようにした。この TRI システムにより遺伝子情報と様々なデータを結びつけた解析が可能となり、症例集としても利用できるデータベースが可能となった。

(2) MGMT 遺伝子発現と生存期間

MGMT 遺伝子はアルキル化剤により架橋形成された DNA を修復するため、腫瘍における MGMT 遺伝子の高発現が Glioma におけるアルキル化剤に対する耐性獲得の機序と考えられる。MGMT 遺伝子はプロモーター領域のメチル化により調節されている。我々はメチル化のある症例や MGMT 遺伝子の発現が低い症例は化学療法に対する反応がよく、MGMT 遺伝子の発現が Glioma の化学療法に対する予測

因子であることを報告した。一方で MGMT の遺伝子発現が低いにもかかわらず、化学療法に対する感受性が低く予後不良である症例があり、その機序を解明するために、MGMT 遺伝子の発現が低いにも関わらず生存期間の短い症例で高発現している遺伝子を抽出した。生存期間 12 ヶ月、MGMT 発現値 6 を閾値として、長期生存かつ MGMT 低発現の Control 群 7 症例、短期生存かつ MGMT 高発現の Case 群 8 症例を検討したところ、短期生存期間かつ MGMT 高発現の群で、JUN などの癌遺伝子や血管新生関連の遺伝子 IL6ST が亢進していることが明らかとなった。

(3)MKI67 遺伝子発現と免疫染色率の検討

Ki67 (MIB) 抗体による免疫染色率は MIB-1 staining index として用いられ、Non-G0 周期の細胞割合を示すため、Glioma の悪性度と関連があることが判明している。

MIB-1 staining index は Grade 2 から Grade 3, Grade 4 と悪化するにつれて、おおよそ 5%以下、5-15%、15%以上を示すことが報告されてきたが、マイクロアレイ解析における MKI67 遺伝子発現と、免疫染

色による MIB-1 index がマイクロアレイ解析上も相関することを確認することができた。さらに、MKI67 遺伝子と共発現している遺伝子は、BUB1 やや CEMPA、CyclinB2 等の Cellcycle、G2/M 期などであり、MKI67 の発現パターンが細胞分裂と深く関連していることが明らかとなった。

(3)病理画像の自動診断システムの開発と数値化

浜松ホトニクス社製のデジタルスライド画像読み取り装置NDPを使用し、HE染色・CD31/3/20/68およびMIBの免疫染色画像を取得した。取得されたデジタル画像をもとに10倍を中心とし、細胞核の情報は40倍の画像で解析を行った。解析については自動細胞核抽出プログラム・免疫染色については発色剤であるDABの色素分析プログラムを構築し、自動にて全領域を対象とした計測した。40倍の画像を用い、細胞核の輪郭線を抽出し、細胞核面積と周囲長を算出する。これらの値から円形度を算出し、平均・分散・最大・中央値などの統計数量を算出した。Gliomaはastrocytoma系腫瘍と化学療法感

受性の高い oligodendrogloma 系に分類されるが、oligodendrolioma 系の細胞を抽出するプログラムを作成した。

MIB-1 index の測定は、免疫染色を行い、染色性の高い部分のみを選んで、細胞核を少なくとも 400 個以上カウントして測定するが、この方法は必ずしも腫瘍の全体像を反映しているわけではない。われわれは HE 標本だけでなく、免疫染色像の全体を電子情報としてとりこみ、染色性を自動的に検出するシステムを作成した。

悪性度の高い Glioblastoma では、Low grade glioma に比べて細胞の密集度および変形度の分散が大きく、multiform であることを示すとともに、CD31/MIB 陽性細胞数が増加することが病理画像の自動診断システムから明らかとなり、さらにこれらの指標をもとに病理画像による細分化と予後との相関を検証中である。

(4) 髄液蛋白のプロテオミクス解析

髄液蛋白のプロテオミクス解析法 (2D-DIDE) を確立した。髄液中のタンパク量は組織に比較して濃度が低く、また含まれるたんぱく

の種類も低いことを特徴とするため、プロテオミクス解析により、悪性腫瘍の中で、神経膠腫の次に難治性である中枢性悪性リンパ腫 (PCNSL) の新規の腫瘍マーカー候補を探索した。2D-DIDE 法により、正常髄液と中枢生悪性リンパ腫サンプルのタンパク質の発現比較を行い、中枢生悪性リンパ腫／非腫瘍髄液の発現比が 1.7 倍以上あるいは 1/1.7 以下であり、かつ t-test の p 値 ≤ 0.05 となるタンパク質を検索した。それぞれ 85 個と 22 個であった。これらのうち、それぞれ 30 個、4 個のスポットについてタンパク質を同定した。これまで、PMF 解析から、中枢生悪性リンパ腫で発現増加が見られた 5 個のスポットで、また発現の減少が見られた 8 個のスポットでタンパク質を同定することができた。Fibrinogen、Haptoglobin、Hemopexin、 α -1-antitrypsin、 α -1-antichymotrypsin や Complement component 3 などの血漿タンパク質などの血漿タンパク質が顕著に増加していること、また ApoE や Transthyretin がやや減少する傾向が見られることが明らかになった。Prostaglandin H2 や D-isomerase も全体に減少する傾

向が見られるた。

これらのタンパクは PCNSL の診断的マーカーとなりえると考え、新規のサンプルで ELISA により髄液中濃度を測定し、その特異性を検証をすすめている。

(5) Glioma 組織のプロテオミクス解析

Glioma のなかで、もっとも悪性である Glioblastoma (GBM) を特徴づけるタンパク質の検出をめざし、2D-DIGE 法により non-GBM 由来の組織とプロテオーム比較を行った。GBM/ non-GBM の発現量比が 1.7 倍以上あるいは 1/1.7 以下で、かつ $p < 0.05$ となるスポットを選択した。GBM で発現が増加あるいは減少するスポットが、それぞれ 71 個、29 個、見出された。GBM において発現が増加するタンパク質には Albumin、Transferrin や ApoAI など血漿タンパク質が見られた。さらに Vimentin、Moesin あるいは Annexin 5 などが明らかに増加していることが観察された。これらのタンパクは、GBM における免疫染色の特異的マーカーと一致していた。

B. 考察

(1) TRI システムの発展

TRI システムにより、治療を行った過去の症例や遺伝子・蛋白研究を無駄にすることなく、網羅的に収集・蓄積された臨床および遺伝子・病理などのバイオ情報を長期にわたり基盤的に蓄積可能となる。われわれは今年度の研究として、病理画像・MRI 画像も網羅した 100 例以上の症例の詳細なデータベースを作成し、新規の症例を治療する前に同様の症例がないか比較検討しており、治療学習プログラムにも応用することが可能となった。今後、遺伝子発現プロファイルデータをもとに、他の癌で有効な抗癌剤の感受性と遺伝子発現パターンから、新たに Glioma でも有効な抗癌剤の開発・応用が可能となることが見込まれる。TRI システムは治療法の探索・予後推測などを強力に支援し、個々の患者に最適化された治療法の開発が期待される。TRI プロジェクトは脳腫瘍をモデルに本研究を行っているが、他の癌種にも応用可能である。

(2) Glioma のマイクロアレイ

国内最大の Glioma の腫瘍遺伝子情報を獲得したが、glioma に対しては、世界的な標準治療薬である新規の抗癌剤であるテモダールが 2006 年秋から発売されたため、その効果や、生存期間などのプロファイルと比較した症例をさらに収集する必要がある、来年度前半にデータ解析を行う予定である。

今後さらに Glioblastoma を中心に解析し診断・治療予測に関連する遺伝子を同定し、あらゆる癌のなかできわめて予後不良な Glioblastoma の治療に貢献できるよう研究を進めていく。

(3) Glioblastoma における化学療法抵抗性のメカニズム

Glioblastoma において、MGMT の高発現が化学療法感受性に関係していることを報告してきたが、MGMT が高発現しているにもかかわらず予後不良の症例では、血管新生因子や癌遺伝子が発現していることが明らかとなった。最近 VEGF 抗体などが海外の臨床試験が行われているが、現在の標準的治療薬であるアルキル化剤であるテモゾロマイドの投与に比べ、VEGF 抗体や VEGF 阻害剤などの血管新生抑制剤の投与が予後を改善

することが報告されている。

マイクロアレイの解析結果から、アルキル化剤抵抗性の症例においては、血管新生因子である IL-6 が高発現していることが明らかとなった。

Glioblastoma においては、mutant EGFR が高発現しており、そのシグナル伝達経路についても研究を行い、mutant EGFR を発現する腫瘍においては、IL-6 が分泌されていることをこれまでの研究で明らかにしてきた。IL-6 抗体はトシリズマブとして国内で開発され骨髄腫やリュウマチなどの治療にもちいられているが、3年目の事業として、マウス脳腫瘍モデルにテモダールと同時にこの IL-6 抗体を注射してその抗腫瘍相乗効果を検証し、臨床応用を目指す予定である。

(4) 髄液蛋白のプロテオミクス解析

中枢性悪性リンパ腫 PCNSL は急激に腫瘍が脳実質内に広がり、急性水頭症をきたし意識障害が進行する。大量メソトレキセートなどの抗がん剤が有効であり、緊急に治療を開始する必要がある疾患である。診断は手術的に腫瘍組織を生検することであるが、手術による出血のリスクが他の悪性脳腫瘍に比べて高いことが問題となって

いる。髄液タンパク解析から得られた、診断マーカーにより、PCNSLの診断が可能となることにより早期に治療を開始することができ、患者の予後改善に大きく貢献することが期待される。

今後 Glioma や転移性脳腫瘍についても髄液蛋白の解析をすすめ、癌性髄膜炎などの早期診断や、筋萎縮性側索硬化症 ALS や Alzheimer 病などの難治性神経内科疾患の診断・治療への応用も期待される。

E. 結論

国内最大の Glioma の遺伝子データベースを作成し、プロテオームデータ・臨床情報・病理所見・画像上からなる統合的な TRI システムの基礎を築いた。Glioma のみならず、他の癌種へも応用可能である。今後さらに解析をすすめ、悪性脳腫瘍の治療成績改善のために新規の治療を開発する。

F. 健康危険情報

特になし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoki, T., Nishikawa, R., et al., Pharmacokinetic study of temozolomide on a daily-for-5-days schedule in Japanese patients with relapsed malignant gliomas: first study in Asians., Int J Clin Oncol, 12:241-249, 2007
2. Hu, B., Nishikawa, R., et al., Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway., Oncogene, 26:557-5586, 2007.
3. Jarzynka, M.J., Nishikawa, R., et al., ELM01 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion., Cancer Res., 67:7203-7211, 2007
4. Izumi T, Nakanishi Y, et al., Dysadherin expression as a significant prognostic factor and as a determinant of histologic features in synovial sarcoma: Special reference to its inverse relationship with E-cadherin expression., Am J Surg Pathol, 31(1): 85-94, 2007.

5. Nobeyama Y, Nakanishi Y, et al., Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas., Int J Cancer, 121: 301-307, 2007.
6. Batistatou A, Nakanishi Y, et al., In breast carcinoma dysadherin expression is correlated with invasiveness but not with E-cadherin., Br J Cancer, 96(9): 1404-1408, 2007.
7. Nakayama R., Takahashi H. et al., Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocyoma., Mod. Pathol., 20:749-759, 2007.
8. Takahashi H., Honda H. et al., New cancer diagnosis modeling using boosting and projective adaptive resonance theory with improved reliable index., Biochem. Eng. J., 33:100-109, 2007
9. 成田善孝, 新しい神経疾患治療薬の動き グリオーマ, Clinical Neuroscience, 25 巻 1 号:1242-1246, 2007.
10. 成田善孝, 転移性脳腫瘍治療の問題点と手術適応, 脳神経外科ジャーナル, 16 巻 11 号:820-827, 2007.
11. 成田善孝, 悪性神経膠腫に対する長期 Temozolomide 投与例の検討, 脳神経外科速報, 印刷中, 2008
12. 成田善孝, 血液脳関門と化学療法, 消化器がん化学療法 2008, 市倉隆編集, 東京, 日本メディカルセンター, 71-77, 2008
13. 渋井壮一郎, 疫学からみた脳腫瘍の実態, 渋井壮一郎 (編) 脳腫瘍, がん看護 実践シリーズ 1, p4-12, メヂカルフレンド社 (東京), 2007
14. 渋井壮一郎, 悪性脳腫瘍に対する新しい治療, 医学のあゆみ, 222:953-954, 2007
15. 渋井壮一郎, 脳腫瘍の診断, がん看護, 12:396-400, 2007
16. 渋井壮一郎, 脳腫瘍の放射線治療・化学療法, がん看護, 12:416-419, 2007
17. 西川亮, グリオーマにおけるテモゾロミド療法, In: Annual Review 神経 2008, 柳澤信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明 編集, pp. 96-100, 中外医学社, 2008
18. 西川亮, 頭蓋頸椎移行部病変の症候と治療法・治療指針 膠芽腫 (脳幹, 延髄, 上位頸髄), Clinical Neuroscience, 25:1360-1362, 2007

2. 学会発表

1) 成田善孝, MGMT promoter methylation status is a strong predictive factor for response to nitrosourea (ACNU) but not to carboplatine and etoposide in glioblastoma : a retrospective study, World Federation of Neurosurgical Societies, 13th Interim Meeting / The 12th Asian-Australasian Congress of Neurological Surgeons, 2007

2) 成田善孝, 渋井壮一郎, 悪性脳腫瘍に対する保険適応外の治療に関する調査, 日本脳神経外科学会総会, 2007

3) 成田善孝, 渋井壮一郎, 悪性神経膠腫における緩和治療・告知の現状, 日本脳腫瘍学会, 2007

4) 渋井壮一郎, 星細胞腫 grade 3・4 に対するランダム化第Ⅱ/Ⅲ 相試験 (JCOG0305) 結果 The result of a randomized phase Ⅱ /Ⅲ study for astrocytoma grade 3 and 4 (JCOG0305), 日本脳腫瘍学会, 2007

H. 知的財産権の出願・登録状況
特許申請

なし

悪性脳腫瘍の髄液蛋白・組織プロテオミクス解析による新規診断マーカーの開発

分担研究者

成田善孝 国立がんセンター中央病院放射線治療部頭頸・胸部放射線治療室医長

班長協力者

田伏 洋 日本電気株式会社中央研究所B I C バイオ IT センター

研究要旨

悪性脳腫瘍の個別適性治療のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた統合解析を行う。本報告では、二次元電気泳動を用いた中枢神経原発悪性リンパ腫と神経膠腫のタンパク質発現解析について報告する。

§ 1. 中枢神経原発悪性リンパ腫におけるタンパク質発現解析

A. 研究目的

脳腫瘍の中で中枢神経原発悪性リンパ腫（Primary CNS Lymphoma：PCNSL）の割合は約3%とされている。近年、発生率は増加傾向にあると言われており、その進行の早さや再発率の高さから、PCNSLの診断や予後予測に有効なバイオマーカーが求められている。PCNSLに特徴的な発現パターンをもつタンパク質を探索するために、2D-DIGE (Difference Gel Electrophoresis)を用いて PCNSL 患者と非 PCNSL 患者の脳脊髄液(CSF)におけるプロテオームの比較解析を行った。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院を中心に収集された脳脊髄液検体について、主任研究者である成田先生の指示に従って 2D-DIGE 解析を実施した。

1. 倫理面への配慮

すべてのサンプルは連結不能匿名化されている。本研究の活動内容および計画に関するインフォームドコンセントや匿名化管理等について、国立がんセンターおよび日本電気株式会社の倫理審査委員会の

審査を経て、研究活動の承諾を得ている。また、サンプル取扱いおよび管理についても、厳重に管理している。

2. 脳脊髄液検体

PCNSL 患者由来 CSF 17 症例、非 PCNSL 患者由来 CSF 6 症例の 2D-DIGE 解析を行った。これらのうち、PCNSL 8 例、非 PCNSL 3 例は昨年度に解析したものであり、今年度の解析例と併せてデータ処理を行った。

3. タンパク質発現解析

3-1. サンプル調製

CSF のタンパク質濃度は一般に数十 mg/dL であり、また血清と同様にアルブミンや IgG などの主要成分がタンパク質の大半を占める。そこで、前処理として限外濾過によってタンパク質を濃縮した後、アルブミン/抗体の除去を行った。その後、サンプルをアセトン沈殿し、適量のサンプル溶解液（7 M 尿素、2M チオ尿素、30mM Tris-HCl [pH8.5]、4% CHAPS、プロテアーゼ阻害剤）に溶解した。サンプルのタンパク質濃度はプロテインアッセイ (Bio-Rad)を用いて測定した。

3-2. 2D-DIGE

2D-DIGE は発現比較するサンプルをそれぞれ異なる蛍光色素 (Cy3 と Cy5: GE ヘルスケア) で標識し、混合した後、同一のゲル上で二次元電気泳動を行う。同一ゲル上で泳動することにより、Cy3 と Cy5 で標識されたタンパク質は同一のスポットとして分離されるので、サンプル間のスポットマッチングが容易になる。50 μ g のタンパク質サンプルに対してジメチルフォルムアミドで溶解した蛍光色素 (Cy3 または Cy5) を最終濃度 400mM で添加し、氷上で 30 分間、標識反応を行った。各チューブに 1 μ l の 10mM Lysine を添加することで反応停止し、さらに 10 分間氷上に静置した。標識したサンプルは泳動まで -80 $^{\circ}$ C で保存した。また、全サンプルを等量ずつ混合した「内部標準」を Cy2 で標識した。この内部標準をすべてのゲルに添加することで、ゲル間のスポットマッチングと発現比較が更に容易かつ正確に行うことが可能になっている。

3-3. 2次元電気泳動とイメージ解析

Cy2、Cy3 および Cy5 で蛍光標識し、混合したサンプルを固定化 pH グラジエントゲル (Immobiline DryStrip, pH 3-10, 24 cm; GE ヘルスケア) にアプライし、一次元目は等電点電気泳動 (12 時間膨潤、500 V x 500Vh、1000 V x 1000Vh、8000 V x 70000Vh) を行った。二次元目の SDS-PAGE は 12.5 % のポリアクリルアミドゲル (24 cm x 20 cm) を使い、1 W/ゲルで一晩、電気泳動した。電気泳動後、ゲルイメージを蛍光スキャナーにより取得した。Decyder ソフトウェアを用いて、ゲルイメージ上のスポット認識、スポットマッチングあるいは発現量比較を行った。タンパク質の発現データを用いた階層クラスター解析は TIGR MultiExperimentViewer により行った。タンパク質同定用のゲルは銀染色を行った後、同定するスポットを選択し、切り出した。

3-4. ペプチドマスフィンガープリンティング (PMF) によるタンパク質の同定

ゲルから切り出されたタンパク質スポットをトリプシン消化し、得られたペプチド混合物を乾燥後、

5 μ l の TA 溶液 (0.1 % TFA / 50 % アセトニトリル) に溶解した。0.7 μ l を MALDI(Matrix-assisted laser desorption ionization) サンプルプレートにのせ、この上に 7 μ l の α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) 溶液を加え自然乾燥後、Voyager-DE STR (Applied Biosystems) を用いた MALDI-TOF(Time-of-flight)-MS 解析により、質量分析を行った。タンパク質の同定は MS-fit あるいは MASCOT により、NCBI Human データベースを用いて行った。

C. 結果

1. 脳脊髄液検体のタンパク質濃度について

今回、解析した PCNSL および非 PCNSL 由来 CSF のタンパク質濃度を図 1 に示した。PCNSL では CSF 中のタンパク質濃度が疾患の悪性度の指標の一つとされている。便宜上、300 μ g/ml の濃度を境界と

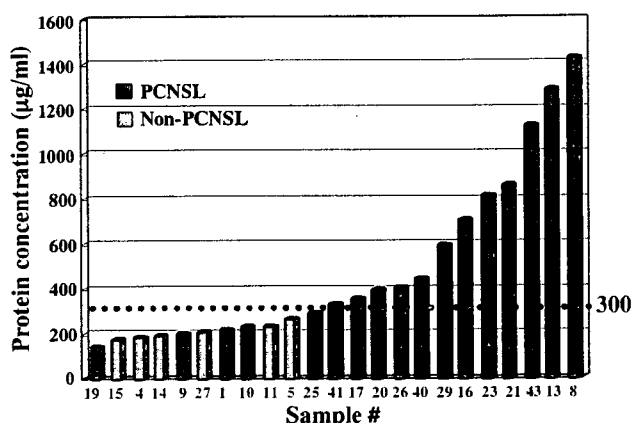


図 1. CSF 中のタンパク質濃度

して、PCNSL-高タンパク質濃度群 (P-High)、PCNSL-正常タンパク質濃度群 (P-Nml) および Non-PCNSL-正常タンパク質濃度群 (N-Nml) とした。各群のタンパク質濃度の平均を図 2 に示した。

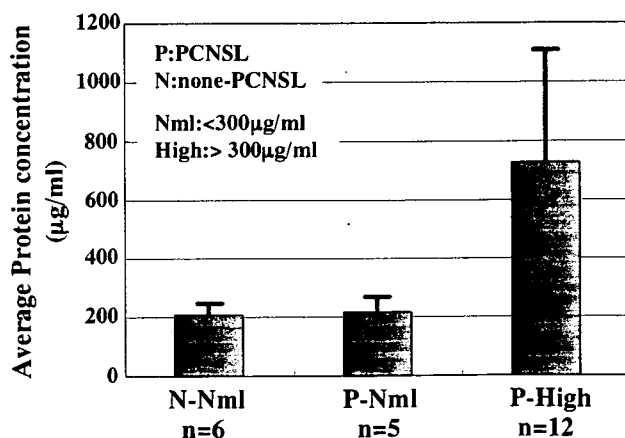


図 2. 各群の平均タンパク質濃度

2. 電気泳動パターンとタンパク質同定結果

電気泳動結果の一例として、サンプル#29(P-High群)と#27(Non-PCNSL)のゲルイメージを図3に示した。赤のスポットは#29において、また緑のスポットは#27において、それぞれ発現が高いことを示している。ゲルからタンパク質スポットを切り出しPMF解析を行った結果、118スポットにおいてタンパク質を同定することができた。タンパク質の種類は32種類であった。

3. タンパク質発現量の解析

3-1. PCNSL と non-PCNSL 間で異なる発現を示すタンパク質

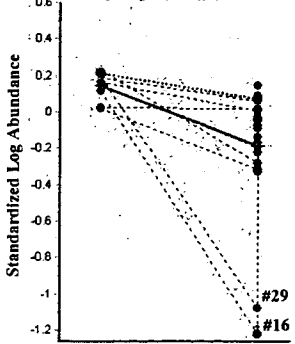
PCNSLとnon-PCNSLの間で発現量が1.7倍以上あるいは1/1.7以下(t-test、p<0.05)を示すタンパク質スポットを選択したところ、それぞれ85個と22個であった。これらのうち、それぞれ30個、4個のスポットについてタンパク質を同定できた(表1)。PCNSLにおいて発現が増加しているタンパク質の方が減少しているものに比べてかなり多く認められた。



図3. CSFの二次元電気泳動イメージ
サンプル#29(赤)、#27(緑)のイメージを重ね合わせた。赤や緑のスポットはそれぞれ#29あるいは#27で発現が亢進しているタンパク質を示す。

図4. Prostaglandin H2 D-isomeraseの発現比較

タンパク質を同定した結果、Haptoglobin、Hemopxin、Fibrinogenや



プロテアーゼ阻害剤などの血漿タンパク質が顕著に増加していること、またApoEやTransthyretinがやや減少する傾向が見られることが明らかになった。Prostaglandin H2 D-isomeraseも全体に減少する傾向が見られるが、特定のサンプル中(#29及び#16)の量が極端に減少していることが強く影響していると考えられる(図4)。

表1-1. Proteins Up-regulated in PCNSL

Master No.	Name	Av. Ratio	T-test
607	Fibrinogen Fragment D	9.94	0.0025
604	Fibrinogen Fragment D	9.92	0.0011
590	Haptoglobin	5.85	0.032
595	Haptoglobin	5.31	0.014
346	Hemopexin	4.44	0.01
577	Haptoglobin	4.05	0.0015
1107	Hemopexin	3.61	0.0059
337	Hemopexin	2.92	0.0068
408	Alpha-1-antichymotrypsin	2.33	0.00016
144	Complement component 3	2.2	0.0002
293	Hemopexin	2.17	0.00038
160	Alpha-1-antitrypsin	2.16	0.0013
411	Alpha-1-antichymotrypsin	2.14	0.00021
288	Hemopexin	2.08	0.0015
420	Alpha-1-antichymotrypsin	2.07	8.10E-05
511	Alpha-1-antitrypsin	2.01	0.019
415	Alpha-1-antichymotrypsin	1.97	3.70E-05
322	Complement component 3	1.94	6.20E-07
153	Inter-alpha (globulin) inhibitor	1.92	1.60E-05
418	Alpha-1-antichymotrypsin	1.9	0.00019
389	Alpha-1-antichymotrypsin	1.88	0.037
1106	Hemopexin	1.86	0.0054
583	Apolipoprotein A-IV precursor	1.85	1.60E-06
802	Apolipoprotein A-I	1.84	0.0054
803	Apolipoprotein A-I	1.83	0.028
278	Hemopexin	1.81	8.60E-05
433	Alpha-1-antitrypsin	1.79	0.00056
302	Hemopexin	1.78	0.0026
313	Complement component 3	1.74	8.20E-06
363	Hemopexin	1.72	0.0042

表1-2. Proteins down-regulated in PCNSL

Master No.	Name	Av. Ratio	T-test
645	Apolipoprotein E	-1.82	0.00059
656	Transthyretin	-1.86	0.00075
716	Prostaglandin H2 D-isomerase	-1.79	0.014
1112	Prostaglandin H2 D-isomerase	-1.74	0.015

同一のタンパク質が複数のスポットとして同定されている場合、個々のスポットの発現比較を示した。

3-2. 同一患者におけるタンパク質発現変動

サンプル#21、#23および#29は同一患者由来で異なる時期に採取されたCSFであり、#29が最も時間が経過し診断確定後に採られたものである。全体で54ゲルイメージあるうちの45イメージ以上で確認

することのできたスポットの発現データを用いて階層クラスター解析を行った。その結果、#21 と#23 の発現は比較的類似しているものの、これらと#29 は異なる発現パターンと分類された。#29 で発現が亢進するタンパク質の例を図5に示した。

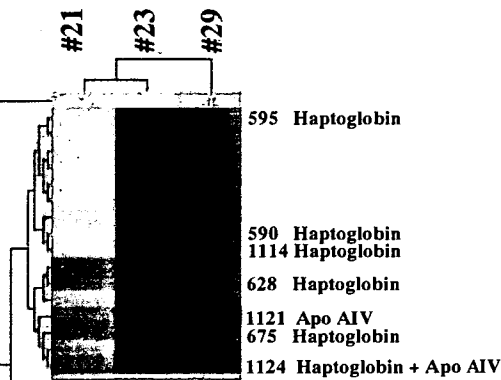


図5. サンプル#29 において発現が亢進するタンパク質

Haptoglobin のほか Cmplment component 3 も顕著に増加した。一方、#21 や#23 に比べてα1-antitrypsin や Prostaglandin H2 D-isomerase の減少が認められた。

3-3. CSF 中のタンパク質濃度の差異と発現との関連

PCNSL の CSF サンプル中で 300μg/ml 以上のタンパク質濃度をもつ P-High 群と、それ以下の P-Nml 群の間でタンパク質発現プロファイルの比較を行った。P-Nml と比較して P-High 群で発現が<1/1.7 あるいは>1.7 (いずれも t-test : p<0.05) となるタンパク質スポットを選択すると、それぞれ 21 個および 30 個であった。これらのうちタンパク質が同定できたスポットを表 2-1 と 2-2 に示した。

表2-1. Down-regulated proteins in the P-High group

Master No.	Name	T-test	Av. Ratio
530	alpha-2 antiplasmin	0.0067	-1.91
531	Alpha-2 antiplasmin	0.0068	-1.86
536	Alpha-2 antiplasmin	0.013	-1.79
549	Alpha-2 antiplasmin	0.0065	-1.73
645	Apolipoprotein E	0.0023	-1.88
652	Apolipoprotein E	0.027	-1.92
847	Transthyretin	0.012	-1.71
1105	Transthyretin	0.0033	-1.94

表2-2. Up-regulated proteins in the P-High group

Master No.	Name	T-test	Av. Ratio
144	Complement component 3	0.01	1.83
145	Complement component 3	0.029	1.84
288	Hemopexin	0.03	1.77
293	Hemopexin	0.018	1.91
316	Hemopexin	0.009	1.79
337	Hemopexin	0.0065	2.87
346	Hemopexin	0.0059	5.23
352	Lymphocyte cytosolic protein-1	0.036	1.75
453	Alpha-1-antitrypsin	1.70E-05	1.96
604	Fibrinogen Fragment D	0.036	4.32
799	Apolipoprotein A-I	7.90E-05	1.95
801	Apolipoprotein A-I	0.0025	1.87
802	Apolipoprotein A-I	0.00015	2.26
803	Apolipoprotein A-I	0.00072	2.39
1106	Hemopexin	0.0057	2.06
1107	Hemopexin	0.0054	3.48

D. 考察

1. PCNSL と Non-PCNSL 間で異なる発現を示すタンパク質

non-PCNSL と比較して PCNSL において増加しているタンパク質は Fibrinogen、Haptoglobin、Hemopexin、α1-antitrypsin、α1-antichymotrypsin や Complement component 3 などの血漿タンパク質がほとんどであった。これらのタンパク質は「Acute-phase proteins」と呼ばれており、炎症に反応して好中球から分泌されるサイトカインにより肝臓での産生が上昇するとされているが、PCNSL との関連は明かではない。

2. CSF 中のタンパク質濃度の差異との関連が示唆されるタンパク質

PCNSL サンプルを高タンパク質濃度群(P-High)と“正常”濃度群(P-Nml)に分けて、両者での発現プロファイルの差異を検討した。P-High で発現が増加しているタンパク質には、Hemopexin や Fibrinogen などやはり Acute-phase proteins が多く見られた。タンパク質濃度の増加のメカニズムは、これまで明らかにされていないが、Acute-phase proteins の増加が一因となっている可能性がある。一方、α2-antiplasmin は P-High 群において明確に発現が減少していた。Fibrinogen の発現上昇と併せてα2-antiplasmin が減少していることは、凝固系の亢進を示唆する。リンパ腫や白血病において Fibrinogen の上昇による凝固系異常が臓器障害をもたらすことが報告されている。

E. 結論

PCNSL に特徴的な発現パターンをもつタンパク質を探索するために、2D-DIGE を用いて PCNSL 患者と非 PCNSL 患者の CSF におけるタンパク質の発現の比較を行った。その結果、PCNSL において血漿中の acute-phase proteins に属するメンバーの発現が明瞭に増加していることが明らかになった。また、PCNSL の CSF のうち、高濃度タンパク質群においては、凝固系の亢進が示唆された。

§ 2. 神経膠腫のプロテオーム解析

A. 研究目的

脳腫瘍のうち、神経膠腫(Glioblastoma、GBM)を特徴づけるタンパク質の検出をめざし、2D-DIGE 法により non-GBM 由来の組織とプロテオーム比較を行った。

B. 研究方法

国立がんセンター中央病院を中心に収集された GBM サンプルについて、主任研究者である成田先生の指示に従って 2D-DIGE 解析を実施した。倫理上の配慮は CSF サンプルと同様である。

1. 脳腫瘍サンプルの調製

解析に用いた組織サンプルを表 3 にまとめた。サンプル#45、46、56 および 59 を Non-GBM サンプルとして用い、他の GBM サンプルのプロテオームとの比較を行った。各サンプルに溶解液 (7M 尿素、2M チオ尿素、4% CHAPS、プロテアーゼ阻害剤) を適量添加し、ポッターホモジェナイザーを用いてホモジェナイズした。タンパク質量は CSF と同様に測定した。

表 3. GBM サンプル

Sample #	Pathology
45	OA ¹⁾
46	AO ²⁾
47	GBM ³⁾
50	GBM
51	GBM
52	GBM
54	GBM
56	NB ⁴⁾
57	GBM
58	GBM
59	NB ⁵⁾
61	GBM
62	GBM
64	GBM
69	GBM
71	GBM

1) OA:Oligastrocytoma
2) AO:Anaplastic Oligodendroglioma
3) GBM:Glioblastoma
4) 他のサンプルの正常周辺組織
5) #58 の正常周辺組織

2. タンパク質発現解析およびタンパク質の同定

2D-DIGE 解析は上述の CSF 解析の時と同様に行った。サンプルを Cy3 あるいは Cy5 で標識し、それぞれ 3 回ずつ二次元電気泳動を行った。計 48 ゲルイメージを取得し、DeCyder を用いて発現解析を行った。また、PMF 解析によりタンパク質の同定を行った。

C. 結果

1. 電気泳動パターンとタンパク質同定結果

GBM の 2D-DIGE ゲルイメージの一例を図 6 に示した。図 6 から、サンプル間で異なる発現を示すタンパク質の存在が示唆される。PMF 解析を行い、75

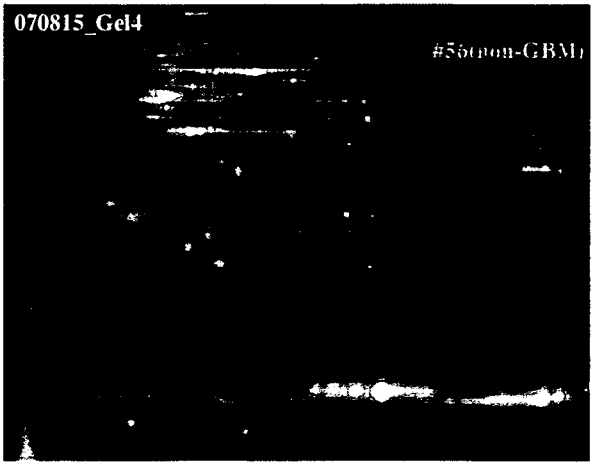


図 6. GBM の二次元電気泳動イメージ
スポットでタンパク質を同定した。タンパク質の種類は 41 であった。

2. GBM と non-GBM のプロテオーム比較

図 6 で示した結果には、GBM と non-GBM の差異に限らずサンプルが由来する部位や個体間の差異なども含まれると予想される。そこで、12 検体の GBM と 4 検体の non-GBM 間でのタンパク質発現を比較し、両方で発現量が異なるスポットを検出した。GBM/non-GBM の発現量比が 1.7 倍以上あるいは 1/1.7 以下で、かつ $p < 0.05$ となるスポットを選択した (表 4)。GBM で発現が増加あるいは減少するスポットが、それぞれ 71 個、29 個、見出された。これらのうちタンパク質が同定されたものを表 4 に示す。

表4-1. Proteins down-regulated in GBM

Master spot no.	Protein Name	Average ratio	T-test value
2405	beta 5-tubulin	-2.22	0.000509
1107	ATP synthase	-1.94	2.9E-05
1621	Lactate dehydrogenase B	-1.79	0.00017
1822	14-3-3 Protein Zeta	-1.70	0.001529

表4-2. Proteins up-regulated in GBM

Master spot no.	Protein Name	Average ratio	T-test value
718	Vimentin	4.39	2.77E-11
534	Transferrin	4.26	0.000709
719	Vimentin	4.18	8.03E-10
535	Transferrin	4.12	0.004159
1923	Apolipoprotein A-I	3.88	1.76E-05
529	Transferrin	3.61	0.000328
656	Albumin	3.54	0.001853
520	Transferrin	3.49	0.01298
657	Albumin	3.42	0.001829
1924	Apolipoprotein A-I	3.27	3.64E-05
606	Moesin	3.17	1.47E-14
2412	Albumin	2.82	6.32E-05
1679	Annexin 5	2.39	9.23E-05
607	Moesin	2.33	1.45E-07
2408	Albumin	2.23	0.000149
1680	Annexin 5	2.08	0.001479

D. 考察

nonGBM と比較して GBM において発現が変動するタンパク質

GBM において発現が増加するタンパク質には Albumin、Transferrin や ApoAI など血漿タンパク質が見られた。しかし、これらの他に Vimentin、Moesin あるいは Annexin 5 などが明らかに増加していることが観察された。Vimentin は様々な細胞において中間径フィラメントを形成する主要な細胞骨格蛋白であり、細胞の形態の維持など重要な細胞機能を担うと考えられている。同様に中間径フィラメントを形成する glial fibrillary acidic protein とともに GBM で発現が増加すると報告されている。Moesin は Ezrin や Radixin とともに細胞膜に存在し、細胞膜と細胞骨格アクチンフィラメントを架橋している。Moesin は細胞分裂溝、ラッフル膜や細胞接着部位などに局在し、細胞の増殖や分化あるいは運動に関わっており、がんの進展とも深く関連する考えられている。Annexin 5 は Ca^{2+} 依存性リン脂質に結合するアネキシンファミリーの一員であるが、最近コラーゲン・レセプター活性が明らかになり、細胞接着との関連性が注目されている。一方、発現が減少するタンパク質にはミトコンドリア呼吸鎖構成酵素である ATP synthase

や解糖系の最終段階でピルビン酸産生を触媒する LDH などエネルギー産生に関わるものが見られた。これら GBM において発現が変動するタンパク質と疾患病態との関連や診断における有用性を論ずるには、さらに多くの症例を検討する必要がある。

E. 結論

脳腫瘍のうち、GBM を特徴づけるタンパク質の検出をめざし、2D-DIGE 法により Non-GBM 由来の組織とプロテオーム比較を行った。その結果、GBM においては各種の血漿タンパク質の他、細胞骨格関連タンパク質 (Vimentin や Moesin) や Annexin が増加すること、一方、エネルギー産生に関わる ATP synthase や LDH が減少することが明らかになった。

F. 学会・論文発表

- (1)成田善孝, 新しい神経疾患治療薬の動き グリオーマ. Clinical Neuroscience 25 巻 1 号, 1242-1246,2007.
- (2)成田善孝 転移性脳腫瘍治療の問題点と手術適応. 脳神経外科ジャーナル 16 巻 11 号,820-827, 2007.
- (3) 成田善孝, 悪性神経膠腫に対する長期 Temozolomide 投与例の検討, 脳神経外科速報、印刷中,2008
- (4)成田善孝, 血液脳関門と化学療法, 消化器がん化学療法 2008, 市倉隆編集, 東京, 日本メディカルセンター, 71-77, 2008

分担研究報告書

Low grade glioma に対する化学療法単独療法の実現にむけて
—MGMT プロモーター領域のメチル化、1p/19q LOH 解析と放射線による腫瘍縮小効果の検討について—

分担研究者 渋井 壮一郎

国立がんセンター中央病院 脳神経外科医長

研究要旨

Low grade glioma の遺伝子学的背景を検討するために、MGMT のプロモーター領域のメチル化・1p/19q の LOH などについて検討した。その結果、Low grade glioma においても、MGMT のメチル化や 1p/19q の LOH が認められることが明らかとなった。

Low grade glioma に対する放射線治療効果を MRI 上の腫瘍体積の変化を測定したところ、放射線治療では 60%以上の症例で腫瘍が縮小することが明らかとなった。Low grade glioma も遺伝子バックグラウンドから、化学療法に対して感受性のあることが示唆され、放射線にかわる化学療法単独による治療の可否について検討した。

A. 研究目的

Diffuse Astrocytoma (DA),
Oligoastrocytoma (OA),
Oligodendroglioma (OD) に対する標準治療は、RTOG や EORTC の第三相試験の結果、手術＋放射線治療とされている。いずれの試験でも、手術

後の経過観察群に対して、手術＋放射線治療群は再発までの期間 (progression free survival) は短いものの、生存期間 (overall survival) は両者では有意差が認められていない。放射線治療による痴呆などの遅発性障害を考えると、

いまだ手術＋放射線治療が標準治療であるとは必ずしもいえない。

神経膠腫ではこれまで、1p/19q の LOH がある群では、化学療法に対する感受性があることが知られている。また悪性神経膠腫では、MGMT 遺伝子のプロモーター領域のメチル化により、MGMT 遺伝子の発現の低い症例では、アルキル化剤等の化学療法感受性が高いことが知られている。

そこで、われわれは Low grade glioma に対して、放射線治療を用いず化学療法単独で治療することの可能性について検討することとした。

B. 研究方法

Low grade 症例のもつグリオーマの遺伝子背景について MGMT のプロモーター領域のメチル化および 1p/19q の LOH について検討した。MGMT は Methylation specific PCR (MSP) を、LOH は FISH および PCR によるマイクロサテライト法も行い検討した。

Low grade グリオーマの化

学療法の奏効率の基礎データを取得するために、これまでに行われた放射線感受性について、1999-2006 年までに当院で手術および放射線化学療法をおこなった患者 28 例について、MRI 上の T2 高信号域を腫瘍体積として放射線治療後の変化を計測して検討した。

C. 研究成果

1. Low grade glioma における MGMT プロモーター領域のメチル化の頻度

当院で手術を行った、Low grade glioma 24 例について検討した。DA 17 例中 MGMT のプロモーター領域のメチル化 (MGMTmet(+)) および、非メチル化の症例 (MGMTmet(-)) はそれぞれ、11 例 (64.7%)、6 例 (35.3%) であった。また OA+OD においては、6 例 (85.7%) で (MGMTmet(+))、1 例 (14.3%) で (MGMTmet(-)) であった

2. Low grade glioma における 1p/19q LOH の頻度

FISH 法を用いて検討したところ、1p および 19q の LOH は OA+OD の全例 (9 例) に認められ