

また、登録された患者情報および臨床情報は患者の検索機能によって検索できるので、本画面で目的の患者情報を絞りこむことができる。

【退院サマリーの検索】

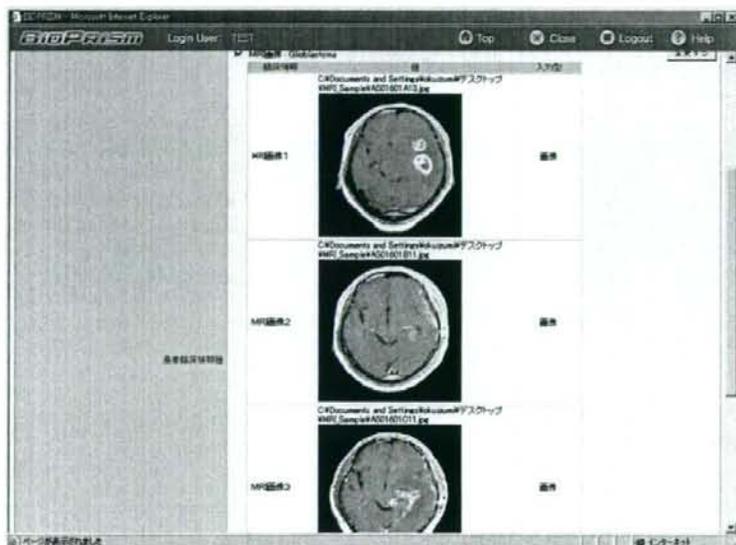
TRI システムでは、退院サマリーに登録した情報から患者を検索し特定する。そして、患者情報と解析結果情報は患者匿名化 ID によって紐付いており、解析結果検索機能によって TRI システムを実現する。

退院サマリーの検索機能では、登録された患者サマリーの各項目に登録されたテキスト情報、数値情報、選択枝情報を検索キーとして用いることができる。この検索キーは一回の指定で複数選択することが出来るので、例えば、生存期間が 12 ヶ月以上かつ薬剤として CBDCA を投与した患者を検索できる。その患者に関する退院サマリーや詳細情報や MRI 画像を併せて表示することが可能である。

患者情報は実験に用いられた検体情報に関連付けて保存されるため、患者番号からプロテオーム実験などに用いた結果を速やかに検索できるため、TRI システムとして理想的な環境を提供する。

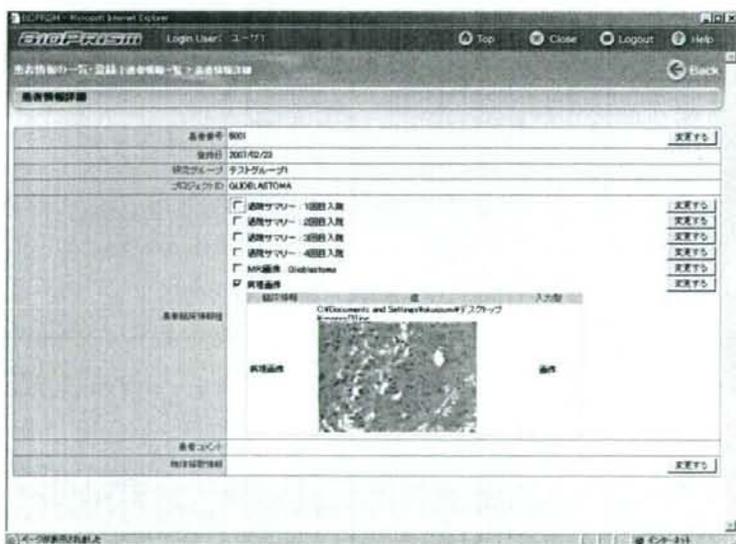
5-2. MRI、病理スライド画像管理機能

【MRI 画像の登録】



退院サマリーを登録した患者ごとに MRI 画像を登録する。本システムに登録された MRI 画像は患者匿名化 ID によって関連付けられ、3 枚まで CV 上で自動的に表示される。退院サマリーの登録情報から、患者を検索して対応する MRI 画像を表示することができる。

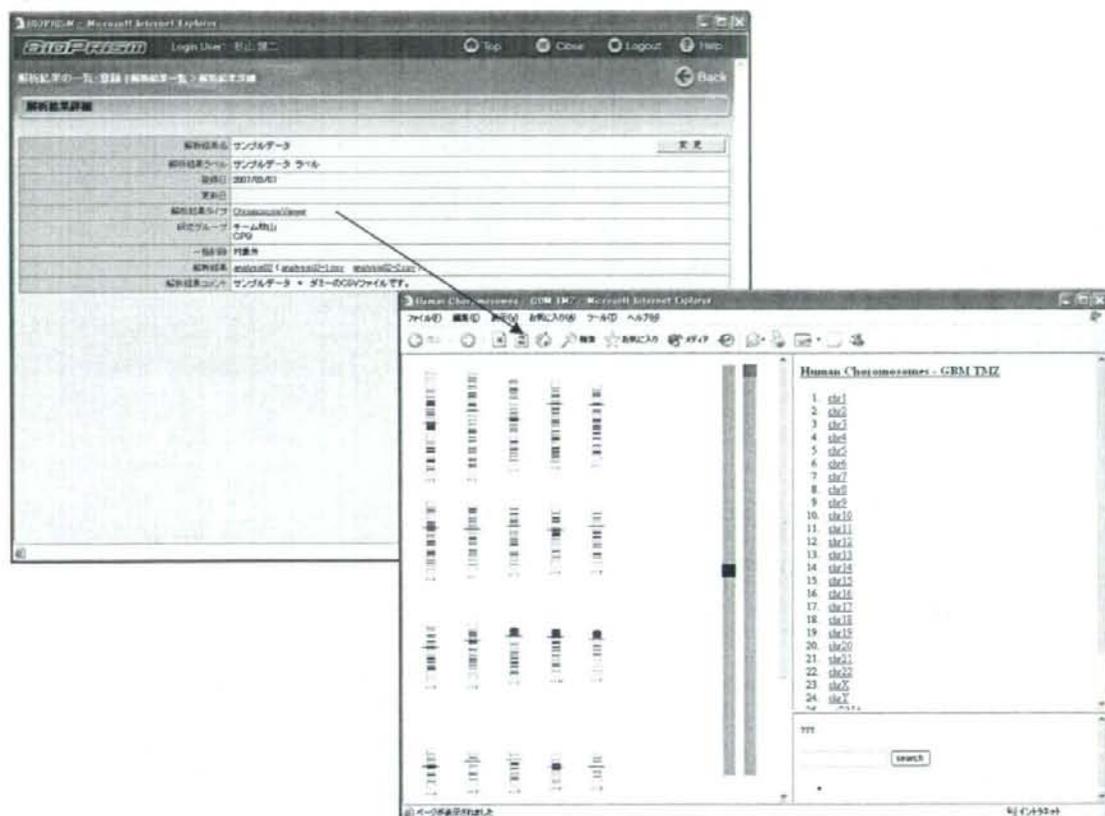
【病理画像登録】



退院サマリーを登録した患者ごとに病理画像を登録できる。同様に退院サマリーの登録情報から、患者を検索して対応する病理画像を表示することができる。

5-3. 解析データ管理およびCV連携機能

【解析結果登録】



CV コンテンツなどの解析結果に名称やコメントを入力して登録できる。CV コンテンツは個別のフォルダーにて構成されるが、本システムの登録する際に、基になるCSVデータファイルと併せ一括して登録するため、データ管理が容易となる。解析結果タイプとしてChromosomeViewerを登録し、ChromosomeViewerリンクをクリックするとCVをポップアップにて表示できる。また、同時に登録されたCSVデータファイルは解析結果として一覧でき、対象結果ファイル名をクリックするとデータファイルをダウンロードあるいは表示することができる。

【解析結果一覧機能】

解析結果一覧

登録日: 2006 / 00 / 00 ~ 2007 / 00 / 00

解析結果名: 部分一致

解析結果ラベル: 部分一致

クリア 検索

案件	登録日	更新日	解析結果名	解析結果ラベル	結果タイプ	解析コメント
	2007/03/08		Human_GenomeData - GEM_TAC	CV連携の仕療書ごとのメタデータ	OrganizationView	
<input type="checkbox"/>	2007/03/07		dummy02	dummy02 label	OrganizationView	dummy02 comment
<input type="checkbox"/>	2007/03/07		サンプルデータ	サンプルデータ ラベル	OrganizationView	サンプルデータ + ダミーのCSVファイルです。
<input type="checkbox"/>	2007/03/07		test	test label	OrganizationView	test comment
<input type="checkbox"/>	2007/03/03		dummy02	a dummy02 ラベル	OrganizationView	dummy02コメント
<input type="checkbox"/>	2007/03/02	2007/03/01	dummy02	b dummy02 ラベル	OrganizationView	dummy02コメント
<input type="checkbox"/>	2007/03/01	2007/03/01	dummy01	c dummy01 ラベル	test	dummy01のコメント

解析結果を登録する

この解析結果を一括削除

多様な解析結果を管理するために、本システムでは登録された解析結果について名称やコメントを一覧で表示できる。また、簡易な検索機能が付属するため、解析結果の管理を容易にする。

【解析結果検索機能】

解析結果検索

登録日: 2006 / 00 / 00 ~ 2007 / 00 / 00

解析結果名: 部分一致 前方一致 完全一致

解析結果ラベル: 部分一致 前方一致 完全一致

解析結果タイプ: 部分一致 前方一致 完全一致

検索タイプ: 部分一致 前方一致 完全一致

クリア 検索

登録した解析結果を登録日時や解析結果のファイル名から検索できる。

【CV連携機能】

退院サマリーに登録した MRI 画像およびコメント情報を患者匿名化 ID に関連づけて CV 画面上で表示する。

The screenshot shows a web browser window with the following content:

Human Chromosomes - GEM survival 12months - Mozilla Firefox
http://127.0.0.1:8000/gem_survival_12months/chr7/d1.23/232535_at.html

GeneID	222194
ProbeID	232535_at
Symbol	RSNB1L
Description	round spermatid basic protein 1-like [Source RefSeq_peptide, Acc NP_940869]
Start Pos.	77163696 (bp)
End Pos.	77246232 (bp)
Strand	+
Chromosome	chr7
Band	q11.23
P-value	0.0043028998613

case [232535_at] (4.630)

control [232535_at] (3.942)

AS05801 Rank.1(5.277)
GEM AS05801

AS05201 Rank.2(5.170)
GEM AS05201

AS00201 Rank.29(2.773)
GEM AS00201

AS03901 Rank.27(3.212)
GEM AS03901

7

5-4. プロテオーム解析結果閲覧機能

【ゲル一覧】



プロテオーム解析結果をゲル情報として登録して、各実験ごとにゲル画像を一覧表示する。

【ゲル画像詳細情報】

スポットID	スポット名	分子量 (kDa)	pI	豊富性	スポット数
1	Transferrin (transferrin, amyloid)	76.0	5.0	1376	256
2	Transferrin (transferrin, amyloid)	76.0	5.0	1376	256
3	Transferrin	76.0	5.0	1376	256
4	Transferrin	76.0	5.0	1376	256
5	Transferrin	76.0	5.0	1376	256
6	Transferrin	76.0	5.0	1376	256
7	Transferrin	76.0	5.0	1376	256

脳脊髄液や脳腫瘍に関するプロテオーム実験データを登録、閲覧できる。この画面では、ゲル画像に関連付けられたスポット情報を一覧表示し、NEC プロテオミクス研究センターにて検出した主要な蛋白質について併せて表示する。ゲル画像は自由に縮小拡大が可能であり、登録されたスポットの位置情報やスポットの容積、強度を表示する。

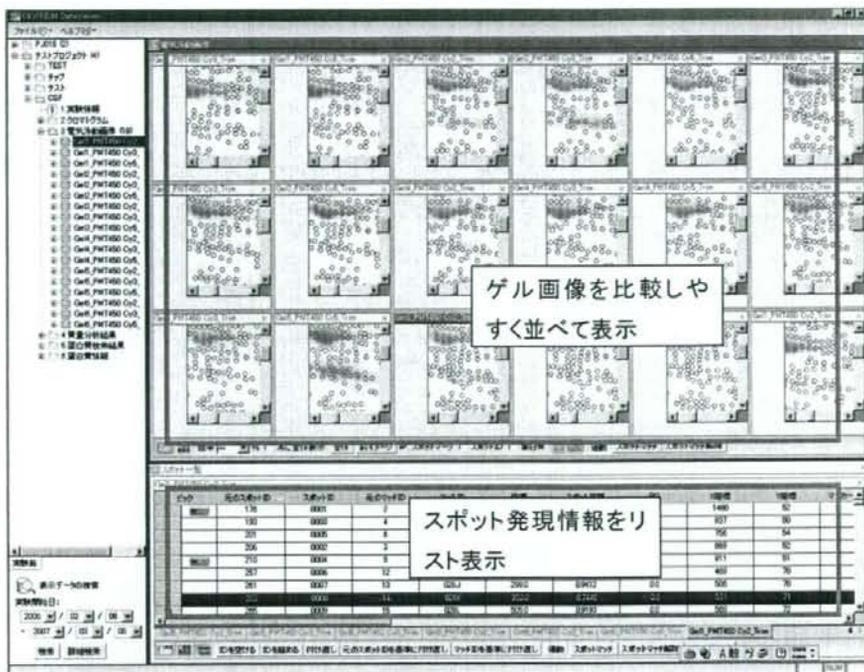
【スポット詳細情報】

マッチング情報やマッチしたスポットの発現量を参照する場合は、ゲル画像詳細画面においてスポットを選択し、「選択スポットの詳細データ表示」ボタンよりスポット詳細情報を表示する。

スポットID	蛋白質名	ゲル画像名	スポット容積	強度	強度比
0202	未知	Gel1_PMT450_Cy2_Trim	0202	0.57	0.787
0201	未知	Gel1_PMT450_Cy2_Trim	0201	0.632	0.714
0201	未知	Gel2_PMT450_Cy2_Trim	0197	1.038	1.227
0201	未知	Gel2_PMT450_Cy2_Trim	0197	2.069	2.911
0201	未知	Gel2_PMT450_Cy2_Trim	0197	0.726	0.98
0201	未知	Gel3_PMT450_Cy2_Trim	0199	1.347	1.956
0201	未知	Gel3_PMT450_Cy2_Trim	0199	0.756	1.069
0201	未知	Gel3_PMT450_Cy2_Trim	0199	1.643	2.282
0201	未知	Gel4_PMT450_Cy2_Trim	0191	0.924	1.599
0201	未知	Gel4_PMT450_Cy2_Trim	0191	1.971	2.824
0201	未知	Gel4_PMT450_Cy2_Trim	0191	0.822	1.171
0201	未知	Gel5_PMT450_Cy2_Trim	0209	0.915	0.704
0201	未知	Gel5_PMT450_Cy2_Trim	0209	0.495	0.639
0201	未知	Gel5_PMT450_Cy2_Trim	0209	2.359	2.322
0201	未知	Gel5_PMT450_Cy2_Trim	0270	1.434	1.221
0201	未知	Gel5_PMT450_Cy2_Trim	0270	1.068	1.324
0201	未知	Gel5_PMT450_Cy2_Trim	0270	0.994	0.807

【統合表示機能】

プロテオーム実験結果で得られたゲル画像について複数枚同時に同じ画面上で表示することが出来る。その際に、関連するスポットの情報および蛋白質の情報を表示して、スポットの発現量を複数サンプル間で比較可能である。



【Excel への Export 機能】



プロテオーム解析で得られたスポット発言情報と蛋白質情報を併せて Microsoft Excel 上
に出力できる。これによって、他の Excel ファイルとの融合や、Excel のフィル機能などを
活用して、データ整理を容易に行うことができる。

原発性中枢神経系悪性リンパ腫における新規診断マーカーの検討

研究代表者 成田 善孝

国立がんセンター中央病院 脳神経外科医長

研究要旨

原発性中枢神経系悪性リンパ腫（PCNSL）は病状が急速に進行するため早期の治療が必要である。診断には手術による組織診断が必要であるが、手術を行わずに髄液による診断マーカーの検索をおこなった。

髄液中の Soluble IL-2 receptor や IL-10 が診断マーカーとして有用と考えられたが、IL-10 は抗腫瘍免疫にも関与している可能性があり、今後治療への応用も期待される。

A. 研究目的

原発性中枢神経系悪性リンパ腫（PCNSL）に対する標準治療は、手術により病理診断を確定し、メソトレキセート（MTX）大量療法とその後の放射線治療である。

PCNSL は MTX や放射線治療によく反応するため、手術の目的は全摘出ではなく、診断が目的であり、小開頭または穿頭による定位的な針生検術（needle biopsy）が一般的である。しかし、腫瘍の多くは脳深部に存在するため、直視下の顕微鏡下に行う

脳腫瘍摘出術と異なり、出血による合併症が高いことが報告されている。これまでの報告では、手術に伴う術後の合併症による神経症状の悪化が 2-13%、また手術死亡率も 1-3% と極めて高いことが報告されている。

PCNSL は高齢者に多く、神経症状が発症後急速に進行するため、腫瘍増大や脳浮腫の進行により、来院時に高度の意識障害をきたしている症例が多く、早期に診断を行い治療を開始することが重要である。

そこで我々は、PCNSL患者とPCNSL以外の患者から得られた髄液検体をもとに、PCNSLに特異的な髄液マーカーを同定し診断へ応用することを目的として本研究を行った。

B. H18/19年度までの成果

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、これまでに臨床検体を用いて、髄液蛋白のプロテオミクス解析法

(2D-DIDE)を確立した。その結果、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炎症性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。

C. 研究方法

これまでの結果をもとに、炎症に関する蛋白や、サイトカインなどがPCNSLの診断的マーカーとなりえると考え、新規のサ

ンプルを用いてELISAにより髄液中濃度を測定し、診断マーカーとしての特異性を検証した。

臨床検体は、2006年4月から2008年8月までに、国立がんセンター中央病院で診断・治療をおこなった患者の髄液検体を持ちいた。PCNSLの患者は26名・Glioma/転移性脳腫瘍など他の腫瘍性疾患37名・腫瘍が疑われて入院したが、髄液検査のみで腫瘍が認められなかったコントロール患者7名。

ELISAを用いて測定した項目は、 β 2 microglobulin、sol IL-2R、IL-1b、IL-1ra、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-8、IL-9、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-17、Eotaxin、FGF、G-CSF、GM-CSF、IFN-g、IP-10、MCP-1、MIP-1a、MIP-1b、PDGF-bb、RANTES、TNF-a、VEGFなどである。

髄液使用にあたっては、国立がんセンター倫理審査委員会の承認をえて、患者から同意を得た。

D. 研究結果

β 2 microglobulinはcontrol (n=7)では、中央値1.2 (0.8-1.4)であったが、PCNSLで

は 3.3 (0.7-3.3) と高値で、88% (23/26) が 1.5 以上であった。IL-10 は、control では検出されず、PCNSL では中央値が 15.5 で、81% (21/26) の症例が陽性であった。IL-10 は他の腫瘍性疾患 37 例中陽性だったものはわずかに 3 例で特異性も高かった。Soluble IL-2 receptor も control では検出されず、PCNSL では中央値が 155 で、62% (16/26) の症例が陽性であった。Sol-IL-2R は他の腫瘍性疾患 37 例中陽性だったものは 3 例であった。また VCAM-1 は control では 53 であったが、PCNSL では 116 と高く、77% (20/26) の症例で 80 以上であった。 $\alpha 1$ anti-trypsin は control では 0.7 であったが、PCNSL では 1.9 と高く、65% (17/26) の症例で 80 以上であった。

D. 考察

これまでに、PCNSL では髄液中の $\beta 2$ microglobulin の上昇が報告され、PCNSL を疑わせる診断マーカーとされてきたが、特異性が低く、他の腫瘍性疾患や髄膜炎などの炎症疾患でも上昇することが知られている。

Soluble IL-2 receptor は、PCNSL 患者の血液でも上昇することが知られ、再発などのマーカーとして用いられているが、当院での検討では 22% (5/23) しか高値を示さず、78% は正常範囲であった。PCNSL で鑑別となる Glioblastoma では 13 例中 13 例とも正常範囲であったため、Glioblastoma との鑑別には有用と考えられる。血中の Soluble IL-2 receptor は全身の Lymphoma や Sarcoidosis などの炎症性疾患でも上昇することが知られているため、診断マ-

	control (n=7)	PCNSL (n=26)	
$\beta 2$ microglobulin	1.2 (0.8-1.4)	3.3 (0.7-3.3)	88% (23/26) が 1.5 以上
IL-10	N.D.	15.5 (0-1680)	81% (21/26) が陽性
sol-IL-2R	N.D.	155 (0-4050)	62% (16/26) が陽性
VCAM-1	53 (0-71)	116 (0-222)	77% (20/26) が 80 以上
$\alpha 1$ anti-trypsin	0.7 (0-1.1)	1.9 (0-15.1)	65% (17/26) が 80 以上

カーとしては特異性にかけていた。

IL-10 は今回 81%の症例で高値であった。しかも control では検出されないこと、他の腫瘍性疾患でも陽性例はわずかに 8%であったことから、PCNSL の髄液診断マーカーとして有用であると考えられた。IL-10 は腫瘍細胞から分泌されている可能性があり、樹状細胞等の抗原提示能を低下させるなど腫瘍免疫能を低下させる機能が知られており、PCNSL の腫瘍免疫抑制能にも関連している可能性があると考えられた。

E. 結論

今回検討した髄液検査の中で、IL-10 が PCNSL の診断マーカーとして有用であると考えられた。IL-10 は腫瘍免疫抑制能にも関与しており、今後 PCNSL に対する抗体療法なども期待される。

G. 研究発表

1) Yonemori K., Narita Y., Shibui S., et al.

Immunohistochemical profiles of brain metastases from breast cancer. J Neurooncol. 2008 Nov;90(2):223-8.

2) 成田善孝, 渋井壮一郎. 悪性脳腫瘍の TRI システムの構築. 日本コンピュータ外科学会誌. 2008;10(3):449.

3) 成田善孝, 渋井壮一郎. 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. 2008;18(4):496-503.

4) 成田善孝 渋井壮一郎. 脳神経脊髄症状に対する緊急処置. 癌と化学療法. 2008;35(13):2301-6.

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）
分担研究報告書

原発性中枢神経系悪性リンパ腫における治療効果予測因子の検討

研究分担者 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

原発性中枢神経系悪性リンパ腫（PCNSL）はいまだ予後不良である。腫瘍組織を CD5、CD10、BCL-6、MUM-1 による免疫染色を行い、腫瘍の由来を germinal center B cell と non germinal center B cell とに分類することにより、予後との相関を検討した。33 例の PCNSL 症例を検討し、BCL-6 陽性例は、再発を来しやすく予後不良のマーカーであることが明らかとなった。

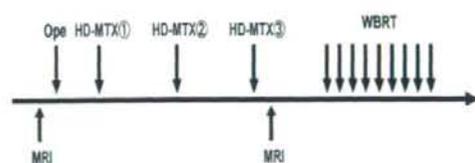
A. 研究目的

原発性中枢神経系悪性リンパ腫(PCNSL)に対する標準治療は、メソトレキセート(MTX)大量療法とその後の放射線治療であるが、特にMTXの治療効果は患者により大きく異なる。近年、高齢者のPCNSL患者への治療として、合併症である高次脳機能障害を減らす目的から、MTX大量療法後の放射線治療をなるべく行わない方向になって来ており (Gavrilovic et al., J Clin Oncol 2006)、MTXの治療効果を

いかに最大限に引き出すかが重要な課題となっている。PCNSLの予後因子として、年齢、performance status (PS)、血清LDH、腫瘍のBCL-6発現などが報告されているが、MTXの治療効果そのものに影響を与える因子は未検討な部分が多い。MTXは肝臓で代謝され、腎臓から排泄されるが、肝臓での分解酵素であるCYP活性に影響を与える抗癌薬の服用や、クレアチニン・クリアランス(CCr)に代表される腎機能の値によって、MTX

の血中濃度は変化すると考えられる。PCNSL患者の治療効果や予後の改善を目的に、抗癌薬の種類とMTX血中濃度やMTX大量療法の奏効率の関係、また、予後因子とされる血清LDHやBCL-6発現などと無増悪生存期間(PFS)との関係を調べた。

MTX大量療法



B. 研究方法

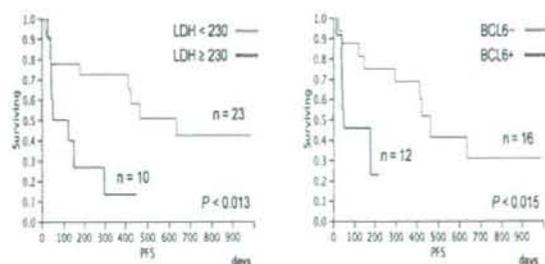
2004年4月から2008年8月までに、脳生検術により診断が得られ、国立がんセンター中央病院でMTX大量療法を連続3コース行ったPCNSL患者33症例を対象とし、療効果予測因子とPFSの検討を行った。患者の平均年齢は60歳、男女比1.3、MTX投与量は体表面積辺り平均3.51gを連続3回使用した。療効果予測因子として、年齢、PS、腫瘍組織の免疫染色(CD5、CD10、BCL-6、MUM-1)、血清LDH、血清sIL2-R、CCr、抗癌薬の使用の

有無を検討した。また、抗癌薬の種類(パルプロ酸、フェニトイン、ゾニサミド)とMTX血中濃度の関係を調べ、治療の奏効率を、治療前後のMRI所見から、CR、PR、SD、PDの4つに分けて比較した。結果をスチューデントのt検定と χ^2 独立性の検定を用いて統計学的に解析した。

C. 研究結果

PCNSL33症例の平均観察期間は14.9ヵ月、PFS中央値は411日であった。治療効果予測因子において、血清LDH($P=0.013$)とBCL-6発現($P=0.015$)で、PFSに有意差が見られた。

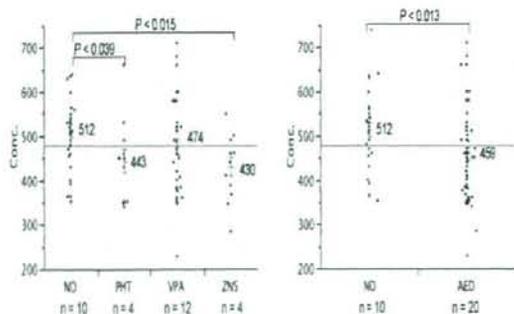
PCNSLの治療効果予測因子



びまん性大細胞型 B 細胞リンパ腫 (DLBCL) 26 症例における腫瘍組織の免疫染色陽性率は、カットオフ値を 30%とした時、CD5 (15.4%)、CD10 (19.2%)、BCL-6 (46.2%)、MUM-1 (80.8)であった。

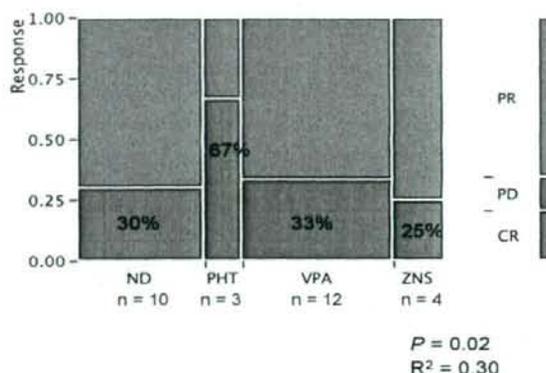
抗癌薬のバルプロ酸(VPA)、フェニトイン(PHT)、ゾニサミド(ZNS)使用群と抗癌薬未使用(ND)の4群について、MTX投与直後のMTX血中濃度を調べたところPHT ($P = 0.039$)とZNS使用群($P = 0.015$)で、有意にMTX血中濃度が低かった。また、抗癌薬使用(AED)群とND群で比較したところ、AED群で有意にMTX血中濃度が低かった($P = 0.013$)。

抗癌薬使用とMTX平均血中濃度



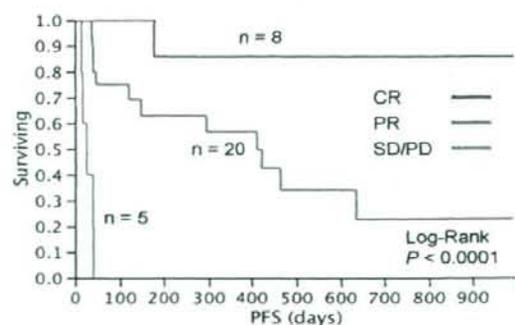
MTX 大量療法 3 コース後の MRI における奏効率は、使用する抗癌薬の種類により異なり、VPA 使用群で有意に奏効率が低かった ($P = 0.02$)。

MTX大量療法の奏効率とAED



MTX 大量療法 3 コース後の MRI における奏効率が良い症例ほど、PFS が有意に良好であった ($P < 0.0001$)。

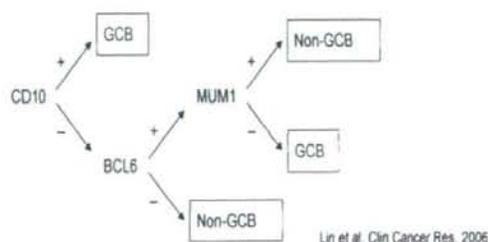
MTX大量療法の奏効率とPFS



D. 考察

B細胞の分化段階は、複数のマーカーの発現を見ることにより、ある程度同定可能である。CD10またはBCL-6陽性のB cellはgerminal center B cellと呼ばれ、これらの特徴を持つB細胞リンパ腫は予後が良いとされている (Lin et al., Clin Cancer Res 2006; Levy et al., Cancer 2008)。

免疫染色によるGCBサブグループの分類



われわれの結果は、BCL-6陽性例で治療効果が不良であり、これらの報告例と一致しなかった。この原因として、少ない症例数、腫瘍型の違い、人種や地理的要因などが考えられるが、今後の更なる検討が必要である。

また、抗癌薬の使用により、MTXの血中濃度が低下し、VPA

使用群ではMTX治療の奏効率が有意に低い結果となった。MTXは肝臓のCYPにより代謝されるが、PHTはCYPを誘導する薬剤として知られており、PHTを服用すると、CYP活性が上がることによりMTXの血中濃度が低下したと想像される。しかし、VPAとZNSについてはCYPを抑制または影響しない薬剤とされている (Vecht et al. Lancet Neurol 2003)。MTX血中濃度の下がった原因は不明であるが、抗癌薬がCYP以外の代謝や排泄に作用している可能性も考えられる。VPA使用群での奏効率の低さについては、症例対象研究のための選択バイアスと見ることもできるが、MTXの血中濃度が有意に低下するという事実には注意して治療に当たる必要があると思われる。MTX大量療法3コースによる初期治療の奏効率が高い程PFSが有意に良好であるという結果から、放射線治療の有無を問わず、MTXによる初期治療の成績を少しでも改善していく努力が必要である。

E. 結論

BCL-6 陽性例で治療効果が不良であることが示唆されたが、今後の更なる検討が必要である。

G. 研究発表

(1)Miyakita Y, Shibui S: Three cases of sub-scalp tumor presenting with protrusion of the head, Jpn J Clin Oncol 38 : 323, 2008

(2)Yonemori K, Shibui S: Immunohistochemical profiles of brain metastases from breast , J Neurooncol 90: 223-228, 2008

(3)成田善孝, 渋谷壮一郎: 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 18: 496-503, 2008

(4)成田善孝, 渋谷壮一郎: 脳神経脊髄症状に対する緊急処置, 癌と科学療法 35 : 2301-2306, 2008

(5)渋谷壮一郎: がん薬物療法学, -基礎・臨床研究のアップデート- XI. 各臓器癌に対する薬物療法 脳腫瘍, 日本臨牀 67: 557-562, 2009

(6)渋谷壮一郎: 悪性神経膠腫の化学療法, 脳神経外科エキスパート 前頭葉・側頭葉 伊達編, 中外医学社, 東京, 2008 , p163-158

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)
分担研究報告書

希少がん(悪性脳腫瘍)の個別適正化治療に向けての基礎研究
—キーとなる分子の探索—

研究分担者 西川 亮 埼玉医科大学国際医療センター教授

研究要旨

平成20年度は3つの観点からこの問題にアプローチした。まず、近年悪性神経膠腫の治療感受性と生物学的特性に関与していることが示唆されているMGMT(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase)遺伝子のプロモーターのメチル化を評価する新しい方法を開発した。次にやはり悪性神経膠腫の蛍光診断に用いられる5-アミノレブリン酸の関与しているポルフィリン代謝経路についてマイクロアレイによる解析に着手した。最後に、我が国において重要な小児悪性脳腫瘍である胚細胞腫瘍の発生に関わると考えられる分子の探索をやはりマイクロアレイによる解析により行った。

1. メチル化感受性高解像能融解曲線分析法に基づくMGMT遺伝子プロモーターメチル化の定量的解析

評価はできない。今回、我々は以下に述べる方法でMGMT遺伝子メチル化の定量法を確立した。

A.研究目的

悪性グリオーマにおいてテモゾロミド投与の効果が期待できる重要なファクターとしてMGMT(O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase)遺伝子プロモーターのメチル化の程度が重要とされている。メチル化の検出に一般に用いられる方法はメチル化特異的PCR法であるが、定量的解析法でありメチル化の定量的

B.研究方法

まず、抽出した腫瘍DNAをbisulfite処理する。これにより、非メチル化シトシンはウラシルへ変換(変異型)されるが、メチル化シトシンは変換されない(野生型)。その後、飽和型インターカレート色素の存在下で目的のMGMT遺伝子プロモーター領域をPCRで増幅する。この色素は2本鎖DNAに特異的に結合し、励

起されることで蛍光を発生する。増幅後、高解像度融解曲線の分析を行う。変異型ではより低い温度で融解が始まり、蛍光が減弱する。融解曲線の波形の解析で非メチル化とメチル化のバリエーションの比率が決定できる。PCR 開始から融解曲線が得られるまでに要する時間は約1時間30分である。

なお、本研究は連結不可能匿名化したサンプルを用いた研究であり、研究対象者に対する人権擁護上の配慮などの事項には該当しない。

C.研究結果

本実験で得られる融解曲線には変異型、野生型由来の2つのピークが見られる。既知の非メチル化とメチル化テンプレートと混合したスタンダードの融解曲線データとの相似性から、未知サンプルDNAのMGMTメチル化レベルを評価できる。

D.考察と結論

SYBR Green(不飽和型)を用いたReal-time PCR法では解像度が低く本実験が目的とするMGMT遺伝子メチルの定量化は困難であったが、飽和型色素を用いる本法は温度正確性、再現性が高く、かつ短時間で解析が完了する点で有用である。飽和型色素を用いて、PCR産物のT_m値の相違からMGMT遺伝子プロモーターのメチル化、非メチル

化を分離し評価する本法は1%のメチル化の検出も可能な解像度の高い解析法であった。

E.研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

安達淳一, 遠竹恭子, 三島一彦, 脇谷健司, 鈴木智成, 柳澤隆昭, 松谷雅生, 西川亮. メチル化感受性高解像度融解曲線分析法に基づくMGMT遺伝子メチル化の定量的解析. 第26回日本脳腫瘍学会, 2008.11.30-12.2, 松山

F.知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

2. 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:5-アミノレブリン酸を用いた脳腫瘍術中蛍光診断および蛍光治療へ向けての基礎研究

A.研究背景

神経膠芽腫を代表とした悪性脳腫瘍