

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おらず、さらなる手術での摘出率の向上が求められている。浸潤性の高い神経膠腫の腫瘍組織をできるだけ選択的に摘出する方法の一つとして、5-アミノレブリン酸(5-ALA)を用いた術中蛍光診断が注目されている。しかし、同じ組織型の腫瘍でも蛍光に陽性、陰性があったり、疑問な点が多く存在する。腫瘍の蛍光はPpIX蓄積により得られるが、その機序の統合的な解析は行われておらず、全体像については未だ明らかになっていない。そこで我々はこの機序をマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析およびパイオインフォマティクス技法を駆使したアプローチにより明らかにしようと考えた。

B. 研究目的

本研究は、5-ALA投与後の蛍光診断における個体間の差異を生み出す機序を、1) 網羅的遺伝子発現解析を駆使して明らかにし、2) PpIX産生・蓄積に関与する遺伝子ネットワークを解明し、3) これらの個体差に関わる遺伝的背景を検討し、将来の診断・治療の開発に寄与する基礎的知見を得ることを目的とする。

C. 研究方法:

1) 遺伝子発現解析

脳腫瘍組織検体から抽出した全RNA

を用い、約44,000種の遺伝子についてoligonucleotide microarrayを用いた網羅的なmRNA発現解析を行う。この解析によって得られた遺伝子発現プロファイルを基に統計学的手法を用い、蛍光発色と強い相関の見られる遺伝子群を抽出する。これをReal time PCR法で定量的発現解析し検証する。パイオインフォマティクス技法等を用い、蛍光発色の差異を生み出す遺伝子ネットワークを明らかにする。

2) 遺伝子変異・メチル化解析

遺伝子ネットワークで重要なことが示された遺伝子について、腫瘍組織における体細胞遺伝子変異ならびにメチル化を確認する。対照用正常DNAとして同患者の末梢血より得られたリンパ球DNAを用いる。メチル化についても同様に検討する。

3) 遺伝子多型解析

遺伝子ネットワークで重要なことが示された遺伝子について、公的データベース情報ならびにこれまでの知見を基に、候補となる遺伝子多型を選別し、制限酵素断片長多型(RFLP)、TaqMan Probeを用いたReal-time PCR法によるSNP判別、直接塩基配列決定によって解析を行う。SNPならびに必要な応じてハプロタイプと遺伝子発現ならびに蛍光強度との相関解析を行う。

D. 研究進捗状況:

現在までに26検体より RNA を抽出、クオリティーチェックを行い、マイクロアレイを施行。5 アミノレブリン酸による蛍光診断の陽性、陰性と関与する候補遺伝子の抽出作業およびパスウェイ解析を行っているところである。

E. 研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

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

3. 頭蓋内胚細胞腫瘍の新規腫瘍マーカーの探索と発生機序・治療感受性に関する解析

A. 研究目的

頭蓋内胚細胞腫瘍(CNSGCT)における遺伝子発現パターンを cDNA array を用いた網羅的解析を行い、組織亜型毎に特異的に発現している分子をピックアップして、CNSGCT の腫瘍マーカーとし

ての可能性を検索するとともに、本腫瘍の発生機序を探索する。

B. 研究方法

CNSGCT の手術標本を用いてまず cDNA array 解析を行う。得られた発現パターンを分析し、CNSGCT の組織亜型毎に特異的に発現している分子をピックアップする。それぞれの分子に対する抗体を入手して、免疫組織化学染色により実際の腫瘍内における発現パターンを解析する。

C. 研究結果

1. CNSGCT19 例の凍結標本を用いて cDNA array による遺伝子発現解析を行った結果、Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4), SOX-11, frizzled 7, SFRP1. これらは primordial germ cell の発生と分化に関与した分子であり、また幹細胞の分化に関与するシグナル伝達系の構成分子であった。
2. BMP-4 は統計学的有意差を持って non-germinomatous tumor に高発現していた。
3. Frizzled 7 もやはり non-germinomatous germ cell tumor, 特に teratomatous tumor において高発現している傾向にあったが、逆に SOX-11 は germinoma に発現する傾向を示した。代表的な染色を図に示した。

D.研究結果

現実的には腫瘍マーカーとしてはいずれも特異性にはやや乏しい結果であった。幹細胞の分化における Wnt シグナルの関与の観点から解析を発展させる計画である。

E.研究発表

1. 論文発表
該当なし
2. 学会発表
該当なし

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

図1. Immature teratoma. Frizzled 7(GTX12996). Original magnification x400.



図2. Germinoma. SOX-11 .Original magnification x400.

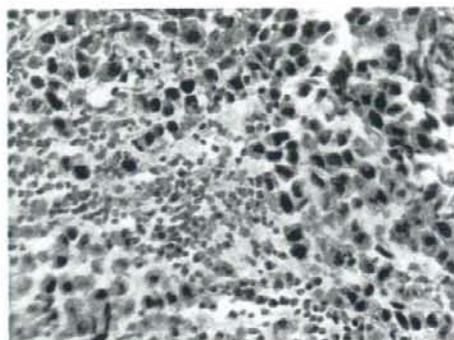
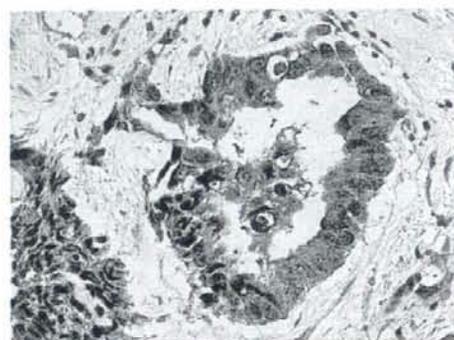


図3. Yolk sac tumor + Immature teratoma. BMP-4. Original magnification x400



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

悪性脳腫瘍におけるフローサイトメーターを用いた
テモゾロミド感受性試験の確立

研究分担者 浅井昭雄 関西医科大学附属枚方病院脳神経外科教授

研究要旨

個々の悪性脳腫瘍のテモゾロミド感受性のスクリーニング法としてフローサイトメトリーをもちいた G2/M arrest の解析が有用であることが明らかになった。

A. 研究目的

テモゾロミドの抗腫瘍効果の作用機序の1つとして G2/M arrest の誘導が示唆されている。しかし、この作用機序により実際に抗腫瘍効果が発揮されているか否かは不明である。本研究ではテモゾロミドによる G2/M arrest の誘導がその抗腫瘍効果と相関するか否かを動物実験レベルで検証することを目的とした。

B. 研究方法

ヌードマウス皮下で継代しているヒト悪性神経膠腫組織10種の primary culture をテモゾ

ロミドで3日間処理したものを single cell suspension とし flow-cytometry 解析した。一方それら10種の担癌ヌードマウスに対してテモゾロミドを経口投与し皮下腫瘍の成長を測定した。

（倫理面への配慮）

実験動物はすべて当大学の動物実験指針に則って行われた。

C. 研究結果

皮下腫瘍の増殖抑制は Flowcytometry による G2/M arrest の程度とよく相関したが apoptosis の程度とは相関し

なかった。

該当なし

D. 考察

悪性脳腫瘍のヌードマウス皮下移植腫瘍モデルではテモゾロミドの抗腫瘍効果は G2/M arrest の誘導により発揮されている可能性が高いと判断できる。

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

E. 結論

ヒト悪性脳腫瘍の primary culture をテモゾロミドで処理して Flowcytometer により G2/M arrest の程度を評価することはテモゾロミドに対する感受性試験として有用であることが示唆された。

F. 研究発表

1. 論文発表

放射線照射による脳障害。浅井昭雄、河本圭司；Brain and Nerve 60: 123-129, 2008

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

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

B細胞リンパ腫における抗CD20抗体(rituximab)投与後の
形態形質変化に関する臨床病理学的研究

（がんの病理診断に関する研究）

研究分担者 前島亜希子 国立がんセンター中央病院
臨床検査部 病理検査室医師

研究要旨

Rituximabはキメラ型抗CD20抗体で、広くB細胞非ホジキンリンパ腫(B-NHL)の治療に使用されているが、しばしば治療抵抗例が認められる。そこでB-NHLにおけるrituximab投与前後での形態形質変化について検討した。B-NHLの生検検体を用いて、形態学的変化および免疫組織学的にCD20抗原の発現変化を検索した。59例中16例(27%)においてCD20発現の消失が認められた。この内10例では治療前後で形態所見の変化を認めず、4例では形質細胞分化を示し、各1例ではHodgkinリンパ腫・未分化大細胞リンパ腫様に変化していた。以上よりB-NHLの一部ではrituximab投与後にCD20発現消失を示し、また形態学的にも形質細胞分化や他の特殊型への変化を来しうることが示唆された。

A. 研究目的

B-NHLにおけるrituximab投与前後での形態形質変化の臨床病理学的検討。

B. 研究方法

B-NHLのrituximab投与前後の生検検体のホルマリン固定、パラフィン包埋切片を用いて、HE標本での形態所見の変化、

および免疫組織学的にCD20発現の変化を検索した。

C. 研究結果

1. rituximab投与後検体において免疫組織学的にCD20発現の消失が59例中16例(27%)に認められた。その内、完全消失は13例、部分消失は3例に認められた。

2. 16例の CD20 抗原消失例のうち 10 例では治療前後で形態所見の変化を認めず、4 例では形質細胞分化を示し、各 1 例では Hodgkin リンパ腫・未分化大細胞リンパ腫様に変化していた。

3. CD20 発現消失は再生検までの期間、rituximab の投与回数、治療効果に相関しなかった。

になった場合には、再生検により形態形質を確認することが推奨される。

D. 考察

1. rituximab 投与後に B-NHL の一部に CD20 発現消失を認めたが、過去の *in vivo* での報告では CD20 抗原の *masking* や CD20 陰性クローンの *selection* などの可能性が考えられている。

2. 一部では形質細胞分化や CD20 陰性の特殊型への変化により rituximab 抵抗性を獲得すると考えられた。

3. CD20 発現消失の現象は、rituximab の投与方法よりも、各腫瘍の特性による影響が大きいと推測された。

E. 結論

B-NHL の 27%において rituximab 投与後に CD20 発現消失を認め、4 パターンの形態所見の変化を伴っていた。
rituximab 投与後に治療抵抗性

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

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

研究分担者 高橋 広夫 中部大学 講師(専任)

研究要旨

悪性脳腫瘍に関して、個々の症例のリスク分類、治療効果を予測する TRI システムを構築することを目的としている。このため、患者背景・網羅的な遺伝子発現などの統合化データベースを作成し、このデータを解析するための統計的・情報学に基づいた新しい解析手法が必要である。統合化データベースが完成するまでの間、他のデータベースを用いて新手法の開発を行った。

A. 研究目的

本研究は、TRI システムを構築するためのデータベース解析手法の開発を目的としている。そのため、悪性脳腫瘍に関する統合データベースが完成するまでの間、以下の検討を行った。

子発現データを始めとした網羅的な生物情報の解析は困難であったため、以前、我々は、これを解析するための新手法を開発した。今回はさらに小サンプルデータからでも解析可能な手法の開発を行った(論文1)

1)がん診断のための判別器構築法の改良

がんのテーラーメイド医療の為には、診断マーカー抽出法の開発と、診断モデル(判別器)が必要であるが、従来法では、遺伝

2)既知ベースクラスタリング手法の開発

一般的のがんの研究では、ある程度の遺伝子情報が分かっている状況で、新しい遺伝子や遺伝子間ネットワークなどを探索す

ることが多い。そこで、新しいクラスタリング手法として、このような既知の遺伝子情報を用いることで適切なクラスタリングを行い、効率的な遺伝子探索が行えるように改良した知識ベースファジィ適応共鳴理論 (KB-FuzzyART) 法を開発した。(論文2)

3) 類似度を用いたがんのサブタイプ分類

がんを、客観的に、サブタイプに分類するために、遺伝子発現情報を用いた診断手法が期待されている。急性骨髄性白血病 (AML) は様々な遺伝子異常を有するヘテロな疾患であり、サブタイプにより治療内容や予後が異なるため、適切な層別化治療を行うには適確な診断が重要である。そこで、本研究では、AML を分類するために遺伝子発現の類似度から、自動で診断できる手法の開発を試みた。(学会発表3)

B. 研究方法

1) これまで我々は、新しい遺伝子スクリーニング手法である PART (projective adaptive

resonance theory) 法と、診断モデル構築と同時にバイオマーカーの抽出が可能な新しいモデリング手法である BFCS (boosted fuzzy classifier with the SWEEP operator method) 法を開発し、従来法よりも優れていることを示した。本研究では、この二つの手法を組み合わせた PART-BFCS 法に、さらに、bagging と呼ばれる手法の概念を取り込んだ BagPART-BFCS 法の開発を行い、がんのマイクロアレイデータに応用した。

2) 以前、我々は、生物情報解析に適したクラスタリング手法であるファジィ適応共鳴理論 (FuzzyART: Fuzzy adaptive resonance theory) を開発した。本研究では、これに既知情報を利用することでより適切なクラスタリングを可能とする知識ベースファジィ適応共鳴理論 (KB-FuzzyART) を開発し *Arabidopsis thaliana* の遺伝子発現データに応用した。KB-FuzzyART は既知遺伝子情報を必要とするので、まず、細胞周期や分化に関わる遺伝子約 300 個を文献等から調べ、デー

データベースを構築した。このデータベースから、FuzzyARTを用いて、クラスターの代表パターンを構築し、この代表パターンを用いて、未知遺伝子も含めたクラスリングを行った。

3) AMLの123症例の遺伝子発現データを教師無しクラスターリングによりクラスターを構築した。各クラスター特徴的な遺伝子を抽出したのみ、重心を計算し、各サンプルと重心の類似度を計算することで各クラスターとの類似性を計算し、6つのクラスターに分類するためのアルゴリズムを構築した。

(倫理面への配慮)

公に公開された、もしくは、倫理審査を経たデータのみを解析に用いている。

C. 研究結果

1) BagPART-BFCS法をwebに公開されている大腸がんと前立腺がんの遺伝子発現データに応用したところ、新規に開発したBagPART-BFCS法の方が、従来のPART-BFCS法より、少ないサンプル数で、診断や遺伝子抽出が

可能なことが示された。

2) *Arabidopsis thaliana*の遺伝子発現データに、KB-FuzzyARTを応用することで17クラスターが形成し、葉の形態制御に関わる遺伝子である*AS1, 2*の遺伝子の下流遺伝子候補を複数抽出することが出来た。一方、従来FuzzyARTでは、膨大な数のクラスターが生成してしまい解析が困難であった。

3) AMLの症例は、教師無しクラスターリングにより $t(8;21)$ 、 $t(15;17)$ 、 $inv(16)$ 、FAB-M7、FAB-M4/M5、そしてFAB-M0/M1/M2の6つに分類された。この6クラスターに関する遺伝子の抽出と、重心の計算を行った。この遺伝子を用いることで、ほぼすべての症例が綺麗に、6クラスターに分類された。

D. 考察

1) PART-BFCS法は、従来法に比して、高速計算が可能で、診断モデル構築やと、マーカー遺伝子抽出に関して、他手法よりも優れた手法であったが、

BagPART-BFCS法では、さらに、少ない症例数からでも、診断モデル構築やマーカー遺伝子抽出が可能となった。本手法を用いることで、診断や治療に有用な遺伝子の抽出や正確な診断モデルの構築が可能になると期待される。

2) 今回開発した知識ベースクラスタリング手法 KB-FuzzyART は、*Arabidopsis thaliana* に応用したが、がんなど、多数の遺伝子が分かっている場合には、有効であると期待される。癌化に関わる遺伝子群などをデータベースとして、これを KB-FuzzyART に応用することで、これまでよりもより正確な遺伝子抽出が可能である。

3) AML の再分類を行うために開発した重心計算と類似度を用いた方法により、遺伝子発現による診断の有用性が示された。本手法は、脳腫瘍の解析においても新たな解析法になると期待される。

E. 結論

1)~3)のように、がんのサブ

タイプ分類のための重心計算と類似度を用いた手法、がん診断のための判別器構築法の改良、知識ベースクラスタリング手法を開発することが出来た。これらの手法を改良しつつ、完成した悪性脳腫瘍の統合化データベースに適用することで、今までの解析では分からなかった多くのことが解明できることが期待される。

G. 研究発表

1. 論文発表

1) Kawamura, T. Takahashi, H. et al., Proposal of newly gene filtering method, BagPART, for gene expression analysis with small samples., *J.Biosci. Bioeng.* 105(1), 81-84, 2008.

2) Takahashi, H., Kobayashi, T. et al., Knowledge-based Fuzzy Adaptive Resonance Theory and Its Application to the Analysis of Gene Expression in Plants., *J.Biosci. Bioeng.* 106(6), 587-593, 2008

2. 学会発表

1) Takahashi, H. Honda, H.: Gene expression analysis of various cancers using a new method combined with boosting and projective adaptive resonance theory, *ICSB2008* (Gothenburg)2008.8

2) 馬淵智子 高橋広夫等: マイクロアレイ解析による予後不良な食道扁平上皮がんのマーカー遺伝子の同定とその起源と性質について 第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008.10

3) 城青衣 高橋広夫等: DNAマ

イクロアレイによる小児急性骨髄性白血病の診断 第67回日本癌学会学術総会(名古屋)2008.10

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

脳腫瘍の臨床・遺伝子情報解析

研究分担者 武笠 晃丈 東京大学附属病院 脳神経外科・特任講師

研究要旨

悪性神経膠腫の予後予測因子として、既知の染色体 1p19q の欠失や MGMT プロモーターのメチル化に加え、より臨床使用が容易で、またこれら既知のマーカーを補完することの出来る新たな予後予測マーカーを確立するため、臨床検体の DNA 解析やこれまでの遺伝子発現解析の結果をさらに発展させ検討した。

A. 研究目的

悪性神経膠腫の臨床使用が容易な、新たな予後予測マーカーを確立する。

B. 研究方法

悪性脳腫瘍、主に悪性神経膠腫の手術摘出検体を用いて、染色体 1p19q の欠失、MGMT プロモーターのメチル化など DNA の異常を解析し、患者の臨床経過との関連性につき検討した。

染色体 1p19q の欠失については、マイクロサテライト解析を行い、メチル化の解析に関して

は、Methylation specific PCR (MSP) 法を用いた。

また、悪性神経膠腫における遺伝子発現の網羅的な解析と前述の様な染色体や遺伝子異常の解析結果を統合した結果、いくつかの遺伝子が、染色体 1p19q 欠失などの既存の予後因子と、強い相関をもって高発現しているという知見が、これまでの実験より得られた。

そこで、それらの遺伝子の発現をさらに多数の腫瘍検体を用いて、定量的 RT-PCR 法にて検証

した。また、これにより確かめられた遺伝子に関しては、ポリクローナル抗体の作成を行い、免疫染色による予後判定が可能か検討した。

(倫理面への配慮)

臨床検体の使用にあたっては、施設の倫理委員会の承認を得た後にインフォームドコンセントを経て行った。また、データの発表に関しては検体の提供者が特定できないように配慮した。

C. 研究結果

悪性神経膠腫約 30 例において、MSP 法を用いて MGMT プロモーターのメチル化を同定したところ、その約 30%において、同領域のメチル化を認めた。これら、メチル化を認める症例は実際、テモダールを用いた化学療法に対する反応性が良かったものが多く、予後良好の傾向を認めたが、そうでないものも含まれた。また、逆に MGMT プロモーターがメチル化されていないにも関わらず、化学療法に対する反応性が高いと考えられる症例も存在し、他の予後予測因子の存在が強く示唆された。

さらに、以前のマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析の結果などから同定した、染色体 1p19q の欠失と強い相関をもって発現している遺伝子群につき、より多数・他種類の臨床検体も用いて定量的 RT-PCR 法にて遺伝子発現を検討した結果、INA や MYT1L といった遺伝子がやはり確実に高発現している

($p < 0.05$) といった結果をえることが出来た。

この中でも特に、MYT1L 遺伝子が、染色体 1p19q のヘテロ接合性の消失との相関が強かったため、この遺伝子のクローニングを行い、さらにポリクローナル抗体を作成し、その有効性は検証中である。

D. 考察

MGMT プロモーターのメチル化のみで、化学療法の予測は不十分であり、メチル化があっても化学療法に不応であった症例や、メチル化がないにもかかわらず化学療法が著効した症例などに対するマイクロアレイや蛋白解析の結果をさらに吟味し、その他の因子の同定を進めていくことが必要と考えられた。

また、MGMT プロモーターのメチル化の MSP による解析が、不確実性の原因である可能性もあり、定量的 RT-PCR 法や、ピロシーケンス法などによる、定量的な測定を現在検討中である。

さらに、再発時の検体のメチル化についても評価中で、再発時点でのメチル化の状態が、化学療法剤変更の指標になるかなどの点につき、検討している。

神経膠腫のなかでも特に、乏突起神経膠腫の予後や化学療法感受性と相関が高いことが知られている染色体 1p19q の欠失と相関が高い分子として、以前も我々がマイクロアレイの網羅的遺伝子発現解析の結果からも提唱していた、ニューロンと関連した発現や機能をもつ遺伝子群の発現が高いことが今回の実験にても確認された。

これらのうち、INA 遺伝子に関しては、最近他のグループから、免疫染色にて実際に染色体 1p19q 欠失と相関が高いとの報告がなされたが、その染色性が不十分なことなどより満足いく結果とは言い難かった。そこで、今回、まだ市販の抗体が作成さ

れていない、MYTIL 分子を今回ターゲットとし、この遺伝子のクローニングおよびポリクローナル抗体の作成を行った。

この遺伝子は以前の実験により、乏突起神経膠腫や正常脳の一部において、高発現していることを *in situ* ハイブリダイゼーションにても確認しており、またその局在は核内であると考えられ、現在免疫染色にてその有効性につき詳細を検討中である。迅速な結果確認が必要とされる臨床現場での応用が期待される。

E. 結論

MGMT プロモーターのメチル化は従来の報告通りテモダールによる化学療法の有効性を予測し、予後良好の予測因子であったが、これのみでの予後予測は不十分であり、他の予後予測因子の存在が強く示唆された。今後さらなる検討を有すると思われる。

染色体 1p19q 欠失を補完する、免疫染色による予測可能な分子の候補として、MYTIL を同定した。染色体 1p19q 欠失と免疫染色性の相関や、どちらがよりよ

い予後予測因子となるかについては、今後さらなる検討が必要と考えられた。

G. 研究発表

1. 論文発表

該当なし

2. 学会発表

武笠晃丈、植木敬介、井手隆文、藤巻高光、西川亮、浅井昭雄、桐野高明、斉藤延人、油谷浩幸：経細胞関連遺伝子群の染色体 1p 欠失を有するオリゴデンドログリオーマにおける発現。第 67 回日本脳神経外科学会総会（盛岡）

H. 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

「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

研究分担者 齋藤 彰 日本電気株式会社意イベティブサービスソリューション事業部

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、そのうちの病理画像の計測が臨床情報を反映しているか、また遺伝子発現情報に対するフェノタイプになりえるのかを検証したので報告する。

A. 研究目的

Glioblastoma において化学療法・放射線療法に奏効する症例はどのような症例なのか、長期生存する要因はなにか、また Glioblastoma は他のグレードの脳腫瘍に対しどこが異なるのかなどの解明のため、バイオ情報と臨床情報を組み合わせた総合的解析を行う目的でプロジェクトが実施された。遺伝子発現情報は、脳腫瘍の発生あるいは進展のメカニズム解明については有益な情報を提供する可能性はあるが、同じ Glioblastoma の中で長期生存例などの検証については、1分子などの違いよりも腫瘍の占拠部位などの情報がより反映する。すなわち臨床的にはグレイディングよりもステージングの結果が臨床情報を反映する。しかし脳腫瘍にはこのステージングの概念がなく、病理画像の計測データがその役目を果たし得ないか、また遺伝子発現情報に対してはそのフェノタイプデータと成りえるとの考えで病理画像の計測データを収集かつ測定するソフトを構築し、データを収集した。このデータをもとに解析を実施した。

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腫瘍検体の病理標本および免疫染色標本について、主任研究者である成田先生の指示に従い、昨年度デジタル画像取得した画像で計測を再実行した。

（倫理面への配慮）

本研究の活動内容および計画について、インフォームドコンセントが取られているか、匿名化管理がされているか等のチェック項目とともに、国立がんセンターおよび日本電気株式会社それぞれの倫理審査委員会の稟議を経て、研究活動の承諾を得ている。

また、実際のデータの取り扱いおよび管理については、いわゆる三省倫理に則った匿名化担当者を置き、データの匿名化とその安全性を確保している。さらに、互いにデータや染色スライド等の預り証を交わし、保管と返却について厳重に管理している。

1. 症例について

非腫瘍細胞 5 症例(6 症例中 1 症例除外)、Astrocytoma grade2 10 症例、grade3 18 症例、Oligodendroglioma grade2 8 症例、grade3 12 症例、Oligoastrocytoma grade2 14 症例、grade3 16 症例、Glioblastoma 71 症例、その他 13 症例の合計 168 症例(うち除外 1 症例)の遺伝子発現データが収集された。これらの症例を基本とし、欠損データは統計上欠損値処理を行った。

2. 病理画像データ解析とその手法

2. 1. デジタル画像の取得

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。これらの画像はすべて DVD にて主任研究者である成田先生へ提供を行っている。また FISH 画像については、国立がんセンター中央病院で撮影された画像の提供を受けた。

2. 2. 取得した画像の計測情報

解析に使用した画像の計測情報は次のものである。

- ① 細胞密度(cellularity)として単位領域内の細胞核数の平均値、最大値、分散など 8 項目
- ② Mib の染色情報 免疫染色された細胞数、未染色細胞数、比率など 10 項目
- ③ Oligo 細胞の比率 2 項目
- ④ CD31 に関する染色情報 10 項目
- ⑤ CD3 に関する染色情報 8 項目
- ⑥ CD20 に関する染色情報 4 項目
- ⑦ CD68 に関する染色情報 8 項目
- ⑧ Pleomorphism に関する核の形態情報 9 項目
- ⑨ 各種細胞のクロマチン構造情報 100 項目

合計 159 項目の情報である。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と目視により、最も各症例の特徴を有した領域を数枚選択した上での画像計測を実施したしかし免疫染色などについては、非腫瘍組織については実行されておらず、欠損値もあり、統計処理可能な条件のもと選択利用を行った。

2. 3 その他の情報

FISH 画像は染色体 1p, 19q の欠損チェックと EGFR の画像であるが、すべての症例におけるデータがなく単独の解析を行うこととした。マイクロアレイによる遺伝子発現情報としては昨年度採取した Affimetrix 社製の DNA チップを使用して採取したデータを使用した。また解析には SAS 社の統計パッケージを使用した。

C. 研究結果

1. グレードに関する解析

Glioblastoma をグレード 4、Anaplastic 症例をグレード 3、Astrocytoma、Oligodendroglioma をグ

レード 2 とし、グレードを示す値は病理画像から計測されるどのパラメータで決定されているかをステップワイズによる回帰分析で検証した。結果として Mib の染色率、Pleomorphism での分散値、Mib 画像での未染色 (カウンターでの DAPI) 細胞数が選択された。この 3 つのパラメータでのモデル R² 乗値は 0.63 であり、全体 63% の説明になる。

2. Oligo 細胞に関する解析

Oligoastrocytoma などのように Oligo 細胞の形成とその他の計測値の関数の解析を同様にステップワイズ回帰分析で実施した。その結果選択された計測値は順に CD68 染色比率、Mib 染色率、細胞密度の最小領域での密度、CD31 染色率、Pleomorphism における平均値が選択された。このモデルの R² 乗値は 0.74 である。

3. マイクロアレイデータによる解析

マイクロアレイのデータ量が多いため、通常の解析方法では統計処理が行えないため、5000 個ごとにステップワイズによる回帰分析を行い、選択された上位 10% を集計し、合計 11 回の解析で選択された 623 の遺伝子発現情報を利用して解析を実施した。

3. 1 グレードを目的変数とした場合

選択された遺伝子は C10orf85, C1orf163, RIF1, TNFSF13B, C17orf42, FAM69B, TUBA1C, NCR2, C1QTNF6, ARL16 であった。モデルの R² 乗値は 0.928 である。

3. 2 Pleomorphism を目的変数とした場合

2 で述べた解析で選択された Pleomorphism における平均値を目的変数として同様の解析を行った。結果として選択された遺伝子は LOC100131053, DYNC1H1, SLC25A27, ELF5, CD84, EPS8L3, STAT5B であった。

一方 Pleomorphism の分散値を目的変数とした場合については、KLHL1, CASC4, SERGEF, BAIAP2L1, CDH8, STK24, ANXA11 が選択され、R² 乗値は 0.79 であった。

3. 3 その他の目的変数

2 で述べた CD68 の最大染色率を目的変数にしたステップワイズ回帰分析では、RGS3, LAMA5, TUBA3C, TUBA3D, ARG1, PVRL1, AJAP1,

ATP7A, ARHGEF11, HTR7P, EXOC5が選択され R²乗値は0.94であった。

CD68の平均染色率ではCFHR5, TBC1D1, C2orf3, LAMA5, KIAA2019, CHST3, BRD8, LAG3が選択され、モデルのR²乗値は0.93であった。

4. FISH画像の解析

染色体1の短腕pと19の長腕qの欠損を示す症例は予後が良いとされている。Vysis社のプローブで染色されたFISH画像を解析した。1pについては1p36の領域400kbをSpectrum Orange, 1q25の領域620kbをSpectrum Greenで染色する。同様に19q13の400kbをOrange 19p13の500kbをGreenでマークするプローブである。またEGFRのプローブはEGFR(7p12)の300kbをOrangeで、7番のセントロメア領域(7p11.1-7q11.1)をGreenで染色している。いずれも細胞核はDAPIで細胞核を染色されている。コンピュータ上で細胞の核分離が行え、かつその内部にOrange/Greenのスポットを検出した細胞核に認識番号を画像上付与しOrange/Greenのスポット数を出力することとした。(図1参照)



図1. FISH画像(1p)の解析結果

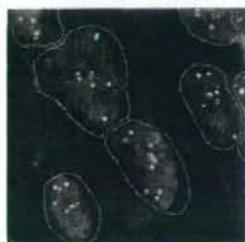


図2 複数コピー 図3 Greenスポット問題
本来、1pの欠損を検討する染色であり、染色体に

問題がなければ orange/green のスポットは細胞あたり2個ずつ観測されるはずであるが、Orangeのスポットが3-6個観測されたり、Greenのスポットが3個観測されトリソミーの状態を示す細胞も多数観測されている。(図2参照) また図3に示すように特にGreenのスポットが細胞核全体に広がり、にじみのような状態であり、システムでのスポットカウントには至らない細胞が多数存在した。このように状態の悪い細胞を多数含んでも、細胞核数を多量に自動計測し、最終的なOrange/Greenの比で判定できるかを検討した。その結果をまとめたのが表1である。

Case	Tumor	1p			19q			EGFR		
		Nuclei	Orange	Green	Nuclei	Orange	Green	Nuclei	Orange	Green
N001	AOA	7	14	8	9	18	22	5	20	6
N005	GEM				5	5	7			
N010	GEM							6	317	20
N012	AA	9	14	5	9	11	11	16	26	17
N014	OA				12	11	9			
N015	AOA	10	15	17						
N017	GEM	11	11	13				12	32	20
N019	AA	9	14	15	10	15	8	4	13	7
N021	OA	6	8	7	7	5	9			
N022	GEM	5	25	27				5	37	9
N024	AA	11	11	10	11	10	15			
N025	GEM	15	21	17	14	18	16			
N026	AA	7	11	10	5	7	8	8	17	16
N027	AOA	11	9	9	13	15	22			
N028	GEM							6	32	14
N029	AA	19	32	13	18	23	11			
N033	AA	18	21	23	6	9	11			
N035	AA	5	8	5	10	15	18	3	133	3
N036	DA	7	8	7	5	10	5			
N037	GEM	19	27	24	16	15	21	8	20	12
N039	DA	11	13	11	8	14	15			
N041	GEM	13	19	15	28	35	25	8	94	11
N042	AA	15	16	4	14	14	19			
N043	AA	21	42	21	10	20	1			
N044	OA	8	14	13	8	9	10			
N045	GEM							7	21	12
N046	OA	7	5	0	8	10	4			
N047	GEM							6	54	7
N049	AA	8	18	17	6	14	12	6	13	5
N051	GEM	12	22	13	12	16	16			
N052	OA	15	18	22	6	7	2	7	11	8
N054	DA	8	17	18	5	5	9	14	19	18
N055	AA	6	11	9	8	10	16	10	17	12
N058	GEM	11	14	10	8	10	14	7	16	17
N057	GEM	6	11	3	8	17	17	6	23	21
N058	GEM	7	11	0	4	9	4	14	21	16
N059	GEM	13	25	12	9	24	20	9	13	14
N060	PA	6	10	7	13	27	18			
N061	PA	8	12	15	13	19	13			
N062	PA	9	19	10	13	23	17			
N063	GEM	13	21	18	7	10	12	4	19	17
N064	GEM	12	22	7	9	11	14	6	15	13
N065	OA	7	6	11	5	5	9			
N066	DA	12	23	13	11	24	11			
N067	DA	11	14	9	11	22	14			
N071	GEM	21	38	30	9	9	23			
N072	OA	16	19	16	13	9	9			
N073	AO	15	19	29	12	26	22			
N074	GEM	10	13	8	7	15	6			
N075	AA	13	21	12	7	11	7			
N076	DA	8	14	5	9	17	16			
N077	GEM	8	10	15	13	21	18			
N078	GEM	8	11	14	9	11	16	3	5	0
N079	AA	9	14	15	6	9	9			
N080	GEM	4	4	2	3	3	4			
N081	GEM	10	16	7	6	12	9	6	17	9
N082	GEM	6	8	0	6	11	12			
N083	GEM	7	11	9	7	8	10	3	6	0
N088	GEM	30	30	28	29	27	31			
N089	DA	6	11	7	8	10	10			
N090	GEM	6	9	4	5	16	21			
N091	GEM	5	7	6	4	4	5			
N092	GEM	16	20	22	10	10	13			

