

## 11. 再発までの期間(6ヶ月)が短いGBMで亢進している遺伝子

No.	Gene Title	Gene Symbol	Chromosome	wilcox p v	diff
1	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	11q23.1	7.50E-03	2.979774
2	nicotinamide N-methyltransferase	NNMT	11q23.1	4.58E-03	2.798138
3	sarcophilin	SLN	11q22-q23	8.38E-03	2.113282
4	retinoic acid receptor responder (tazarotene inducible)	RARRES2	7q36.1	1.72E-03	2.093608
5	BIC transcript	BIC	21q21.3	7.97E-05	1.991908
6	spermatogenesis associated 17	SPATA17	1q41	4.12E-04	1.898549
7	----	----	----	4.86E-03	1.874617
8	sulfatase 1	SULF1	8q13.2-q1	6.45E-03	1.850367
9	chromosome 11 open reading frame 70 /// chromosome 11	C11orf70	11q22.1	4.24E-03	1.847866
10	Tctex1 domain containing 1	TCTEX1D1	1p31.3	5.87E-03	1.710043
11	CD109 molecule	CD109	6q13	1.94E-03	1.674342
12	----	----	----	8.21E-03	1.646659
13	transcription elongation factor A (SII), 3	TCEA3	1p36.12	6.66E-03	1.607704
14	hypothetical protein LOC136288	LOC136288	7p12.3	6.74E-03	1.589254
15	hypothetical protein MGC26963	MGC26963	4q25	5.11E-03	1.580219
16	WD repeat domain 16	WDR16	17p13.1	9.84E-03	1.564501
17	interleukin 1 receptor antagonist	IL1RN	2q14.2	8.66E-03	1.564492
18	EF-hand domain (C-terminal) containing 2	EFHC2	Xp11.3	2.43E-03	1.54569
19	Yes-associated protein 1, 65kDa	YAP1	11q13	5.16E-04	1.539789
20	chromosome 8 open reading frame 34	C8orf34	8q13	4.86E-03	1.534643
21	vimentin	VIM	10p13	3.96E-03	1.514596
22	sulfatase 1	SULF1	8q13.2-q1	2.91E-03	1.493628
23	WD repeat domain 78	WDR78	1p31.3	1.08E-03	1.372708
24	Kruppel-like factor 4 (gut)	KLF4	9q31	7.12E-03	1.346569
25	ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1), member 1	ABCA13	7p12.3	9.05E-03	1.345479
26	sperm associated antigen 1	SPAG1	8q22.2	6.57E-03	1.296798
27	major histocompatibility complex, class II, DQ beta	HLA-DQB1	6p21.3	1.86E-03	1.267928
28	hypothetical protein FLJ23049	FLJ23049	3q26.1	5.85E-03	1.201805
29	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	5q23.1	9.57E-03	1.165455
30	Neural precursor cell expressed, developmentally downregulated 9	NEDD9	6p25-p24	9.33E-03	1.135394
31	tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8	TNFAIP8	5q23.1	6.77E-03	1.129071
32	protein disulfide isomerase family A, member 5	PDIA5	3q21.1	5.44E-03	1.111982
33	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11B	TNFRSF11B	8q24	1.68E-03	1.110835
34	ADP-ribosylation factor-like 4C	ARL4C	2q37.1	6.45E-04	1.079684
35	Transcribed locus	----	----	2.32E-03	1.074835
36	regulator of G-protein signalling 2, 24kDa	RGS2	1q31	9.83E-03	1.060714
37	histone 1, H2bd	HIST1H2BD	6p21.3	4.67E-03	1.052342
38	Transcribed locus	----	----	3.44E-03	1.048794
39	ADP-ribosylation factor-like 4C	ARL4C	2q37.1	3.92E-03	1.048409
40	hypothetical protein LOC641518	LOC641518	4q23-q25	2.13E-03	1.008998
41	fibronectin type III and ankyrin repeat domains 1	FANK1	10q26.2	2.21E-03	0.980099
42	G protein-coupled receptor 39	GPR39	2q21-q22	3.24E-03	0.974376
43	vasorin	VASN	16p13.3	5.51E-03	0.955424
44	matrix metalloproteinase 7 (matrilysin, uterine)	MMP7	11q21-q22	8.31E-03	0.948368
45	hypothetical protein FLJ37440	FLJ37440	2q13	5.46E-03	0.947072
46	dynein, axonemal, light intermediate polypeptide	DNALI1	1p35.1	7.54E-03	0.939467
47	myeloid leukemia factor 1	MLF1	3q25.1	9.07E-03	0.90994
48	chromosome 3 open reading frame 15	C3orf15	3q12-q13	4.49E-03	0.908751
49	CD109 molecule	CD109	6q13	1.04E-03	0.899107
50	hypothetical LOC145788	FLJ27352	15q21.3	1.49E-03	0.883882

## 12. 再発までの期間(6ヶ月)が短いGBMで抑制されている遺伝子

No.	Gene Title	Gene Symbol	Chromosome	wilcox p v	diff
1	GALK2	galactose meta	15q21.1	7.33E-03	-0.08076
2	---	---	---	1.49E-03	-0.08671
3	RNF43	ubiquitin cycle	17q22	5.65E-03	-0.08683
4	FCRL1	---	1q21-q22	9.42E-03	-0.08888
5	RAB31P	protein transp	12q14.3	8.79E-03	-0.10089
6	---	---	---	4.01E-03	-0.10578
7	SCGB2A2	---	11q13	4.26E-04	-0.10708
8	---	---	---	5.62E-03	-0.11058
9	GRHL2	---	8q22.3	9.81E-03	-0.11333
10	TRA@	cellular defens	14q11.2	7.39E-03	-0.11337
11	KRTAP4-4	---	17q12-q21	8.01E-03	-0.11431
12	MUSK	protein amino a	9q31.3-q3	8.74E-03	-0.11803
13	ABCA1	lipid metabolisr	9q31.1	2.88E-03	-0.11849
14	RP11-647M7.1	---	Xq22.3	9.24E-03	-0.11853
15	NSUN3	---	3q11.2	5.28E-03	-0.1219
16	AGTR2	apoptosis ///	Xq22-q23	3.00E-03	-0.12292
17	NHSL1	---	6q23.3	2.81E-03	-0.12492
18	HTR2C	signal transduc	Xq24	3.51E-03	-0.1287
19	C6orf78	---	6q22.1	5.57E-03	-0.12874
20	RNH1 /// FLJ23519	RNA catabolisr	11p15.5	1.05E-03	-0.13316
21	---	---	---	2.30E-03	-0.14423
22	UBE2U	ubiquitin cycle	1p31.3	9.96E-03	-0.145
23	C9orf5	---	9q31	2.41E-03	-0.14999
24	MGC32805	---	5q23.2	3.26E-03	-0.15159
25	C11orf54	---	11q21	9.98E-03	-0.15256
26	ARMCX4	---	Xq22.1	8.36E-03	-0.15582
27	LCE1E	---	1q21.3	1.57E-03	-0.15624
28	---	---	---	3.62E-05	-0.15824
29	OR2A20P /// OR2A9P	signal transduc	7q35	1.56E-03	-0.15977
30	CTSE	proteolysis ///	1q31	1.68E-03	-0.16033
31	PLGLB2 /// PLGLB1 /// PLGLA1	---	2p11-q11	4.28E-03	-0.16091
32	MFSD1	transport	3q25.33	2.91E-03	-0.16444
33	DDX51	---	12q24.33	6.53E-03	-0.16574
34	---	---	---	6.90E-03	-0.16803
35	TRIM3	nervous system	11p15.5	5.78E-03	-0.17578
36	---	---	---	6.40E-03	-0.1789
37	---	---	---	8.52E-04	-0.18105
38	TBC1D5	---	3p24.3	6.79E-03	-0.18522
39	CSNK2A1	protein amino a	20p13	7.70E-03	-0.19038
40	ZBTB10	transcription /	8q13-q21	6.83E-03	-0.19253
41	UBE2O	ubiquitin cycle	17q25.1	3.60E-03	-0.19276
42	C10orf93	---	10q26.3	5.16E-03	-0.19586
43	SSH2	protein amino a	17q11.2	3.76E-03	-0.19726
44	C12orf47	---	12q24.12	5.19E-03	-0.20144
45	SLC4A5	anion transport	2p13	7.51E-03	-0.20714
46	---	---	---	3.39E-03	-0.22033
47	KIAA1303	---	17q25.3	4.62E-03	-0.22628
48	MAS1	signal transduc	6q25.3-q2	4.90E-03	-0.23196
49	KTN1	microtubule-ba	14q22.1	6.69E-03	-0.23278
50	PAIP2 /// LOC153095	regulation of tr	5q31.2 ///	5.23E-04	-0.23534

「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

## 病理画像・FISH 画像情報の数値化の研究

分担研究者 齋藤 彰 日本電気株式会社意イベイ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R<sup>2</sup>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係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R<sup>2</sup>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R<sup>2</sup>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、R<sup>2</sup>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R<sup>2</sup>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R<sup>2</sup>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

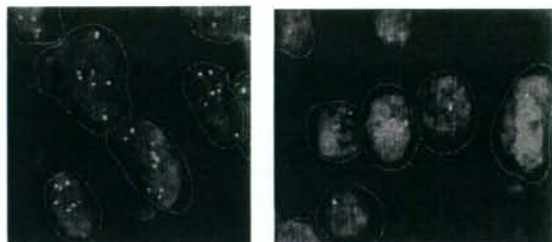


図2 複数コピー 図3 Greenスポット問題

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	GBM				5	5	7			
N010	GBM							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	GBM	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	GBM	9	35	27				5	27	9
N024	AA	11	11	10	11	10	15			
N025	GBM	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	GBM							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	5	8	2	5	10	5			
N037	GBM	19	27	24	18	15	21	8	20	12
N039	DA	11	13	11	8	14	15			
N041	GBM	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	GBM							7	21	12
N046	OA	5	5	0	8	10	4			
N047	GBM							5	54	7
N049	AA	8	18	17	6	14	12	6	13	5
N051	GBM	12	22	13	12	18	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	8	11	9	8	10	16	10	17	12
N056	GBM	11	14	10	8	10	14	7	16	17
N057	GBM	6	11	3	8	17	17	6	23	21
N058	GBM	7	11	0	4	9	4	14	21	16
N059	GBM	13	25	12	9	24	20	9	13	14
N060	PA	8	10	7	13	27	18			
N061	PA	8	12	15	13	19	13			
N062	PA	9	19	10	13	23	17			
N063	GBM	13	21	18	7	10	12	4	19	17
N064	GBM	12	22	7	9	11	14	6	15	13
N065	OA	7	8	11	5	5	9			
N066	DA	12	23	13	11	24	11			
N067	DA	11	14	9	11	22	14			
N071	GBM	21	38	30	9	9	23			
N072	OA	18	19	16	13	9	8			
N073	AO	15	18	28	12	26	22			
N074	GBM	10	13	8	7	15	6			
N075	AA	13	21	12	7	11	7			
N076	DA	8	14	5	9	17	16			
N077	GBM	8	10	15	13	21	18			
N078	GBM	8	11	14	9	11	16	3	5	0
N079	AA	9	14	15	6	9	8			
N080	GBM	4	4	2	3	3	4			
N081	GBM	10	16	7	6	12	9	6	17	8
N082	GBM	6	8	0	6	11	12			
N083	GBM	7	11	9	7	9	10	3	6	0
N088	GBM	30	30	28	29	27	31			
N089	DA	6	11	7	8	10	10			
N090	GBM	7	8	4	5	16	21			
N091	GBM	5	7	8	4	4	5			
N092	GBM	16	20	22	10	10	13			

N093	GBM	10	14	18	7	11	11			
N094	DA	9	16	15	8	11	11			
N095	GBM	13	19	8	9	16	14			
N096	GBM	10	12	15	8	12	10	13	30	36
N098	GBM	6	5	6	10	12	15	8	27	28
N100	GBM	8	8	10	11	13	11	10	21	19
N101	DA	9	8	7	11	12	9			
N102	GBM	12	17	9	7	11	9			
N103	GBM	6	9	14	4	6	6	4	6	4
N105	GBM	12	16	13				10	23	21
N108	DA	8	11	9	6	9	8			
N109	GBM	11	18	16	9	13	10			
N110	GBM	10	18	12	9	15	7			
N111	GBM	13	17	15	17	22	13			
N112	GBM	11	16	7	10	14	16			
N113	GBM	10	18	13	13	15	22	6	64	6
N114	GBM	3	6	3	9	14	9	4	8	4
N115	GBM	15	19	23	8	12	10	6	10	10
N116	GBM	20	38	24	9	17	14			
N117	GBM	9	16	13	11	22	15			
N118	GBM	9	18	17	7	16	11			
N119	GBM	14	20	15	6	9	8			
N139	GBM							6	8	8
N145	GBM	10	18	14	15	27	18	17	23	19
N146	AOA							1	12	13
N153	GBM							1	25	0
N154	GBM							15	29	23
N155	GBM							8	15	12
N156	AOA							21	45	29
N158	GBM							10	13	14
N163	GBM							8	20	16
N164	AOA							12	20	18
N168	GBM							10	50	14
N172	AOA							14	30	10
N179	GBM							8	137	11
N189	PA	10	14	9	15	22	12			
N193	GBM	23	38	32	25	43	45			
N238	AO	12	29	19	16	43	43			

表1 FISH画像の解析結果

表1では症例番号、腫瘍の種類、解析した細胞核数とOrange, Greenのスポット数を示す。グレーの網掛けは画像が存在しないことを示す。すべてに画像がない症例は表示していない。

#### D. 考察

Glioblastomaの症例でも長期生存症例があり、その特徴はなにかなどを説明する解析を行うことが最終目標である。一般的にマイクロアレイの情報は今までにない情報を提供できるが、その再現性および意味の解釈に困難性を伴う。また1分子が最終的な生存時間に直接的に影響を与えるほど明確ではない。一方、病理での悪性度は現在でも臨床家にとり基盤となる情報であり、臨床情報を病理画像の計測情報で説明を行い、その要素になる項目を遺伝子発現情報で説明をしていくことを試みるため、データベースを構築しデータを蓄積することから開始した。最終的な臨床情報が整備途中であることから、どのような症例が薬剤感受性・放射線感受性が高いのか、長期生存の要素などの解析には至っていないが、プロトタイプとしての解析では臨床家が日ごろ感じている傾向を解析した。

まずグレードについての解析について考察する。

Glioblastoma であれば自動的にグレード4になる。Glioblastoma であるとの診断には腫瘍内に壊死部分があるか、pseudopalisading 構造などがあれば自動的に診断される。一方 Anaplastic があればグレード3になるが、どの程度の退形成性で判断するのか、またグレード4への条件などを探る意味でのステップワイズの回帰分析を行った。その結果として採用された項目としては Mib の染色率と Pleomorphism の分散値であった。Mib の染色率が高ければ本来細胞の分裂が優勢であり、結果として細胞密度が高くなるはずであり、両者の測定値も高い相関をしめすはずであるが、0.37 程度であり優位に高相関を示すものではなかった。また細胞核の大きさ、形状といった個別の測定値ではなく、これらの測定値の分散値が説明するのに有益な値となっている。

Oligo 細胞の成分が多い症例ほど薬剤感受性あるいは放射線感受性が高いとの傾向を分析した。Oligo 細胞を含む症例は昨年分析から細胞の密度が高いことが示されている。今回の回帰分析でも Mib の染色率が説明項目として選択されており、Oligo 成分を含む症例が分裂能力が高く、この分裂期を阻害するような薬剤あるいは放射線治療であるなら、感受性が高いことを示すことになる。また CD31 の染色率も選択されており、分裂に伴う血管の新生も高いと考えるならば意味を持つと思われる。一方 CD68 が選択されているが、CD68 はマクロファージを選択的に染色する。Oligo 成分が多いとなぜマクロファージの浸潤が多いのかは不明である。

遺伝子発現における解析では主として画像の計測値をフェノタイプとした解析を実施した。オントロジーをベースとして、機能別に選択した遺伝子のみで解析実施した場合、あるいは注目する遺伝子のみを選定して解析を行う場合などさまざまな方法論が考えられる。今回はこれらの考慮を行わず、5000 個単位に解析を行い、選択された遺伝子を集積しながら反復する方法を使用した。結果としては機能もよくわからない遺伝子が選択されていたり、説明できない遺伝子が採用されており、結果自体から意味を見出すことはできないが、すべてのデータが整備されてからの解析を行うプラットフォームは完成でき

ていると考える。

FISH 画像の解析では、表1に示すように欠損画像が多いことと、1画像に含まれる細胞の個数が少ないため直接的に一連の解析の中に組み込むことは困難であった。また 1p 19q など、トリソノミなどの報告がない中、明確に orange のスポットが5個といった細胞が多々あったこと、Green がスポットにならず核に広がった状態あるいは観測できない細胞核が多々あり、結果として Orange のスポットが Green のスポットより多い症例が多く出ている。しかし EGFR のように無数のコピーが存在する場合(図4)



図4 EGFR FISH 画像

細胞の自動計測は意味がある。しかし、細胞の重なり分離が困難な画像も多く、液状細胞診のようなスライド作成方法からの検討も必要かも知れない。また今回特に green のスポットについて問題があり、染色プロトコルの見直しなども必要かと考える。今回提供された画像では20個程度の細胞しか分離できなかった。一般として最低でも400個以上の細胞を計測して判断するべきと考えるので、スライド全体の撮影などのプロセスを加えることも必要であると考ええる。

#### E. 結論

今回蓄積された情報についての部分的解析を試みると同時にその方法論について検討を行った。今後欠損値を極力埋めていくと同時に、臨床情報を加えることで最終的なフェノタイプを充実させ、さまざまな角度からの解析を実施していくことが重要である。この場合、特に臨床家が持っている感覚としての治療の感受性・長期生存性などの根拠を解析によって裏づけしていくことと、そこに含まれる新たな特徴をどう説明するかにより、解析すべき項目が新規に生み出されることを示唆している。

## 悪性脳腫瘍の髄液・組織プロテオミクス研究の確立

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 $\mu$ 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 $\mu$ 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. 二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  $\mu$ l の TA 溶液 (0.1 % TFA / 50 % アセトニトリル) に溶解した。0.7  $\mu$ l を MALDI (Matrix-assisted laser desorption ionization) サンプルプレートにのせ、この上に 7  $\mu$ l の  $\alpha$ -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 $\mu$ g/ml の濃度を境界と

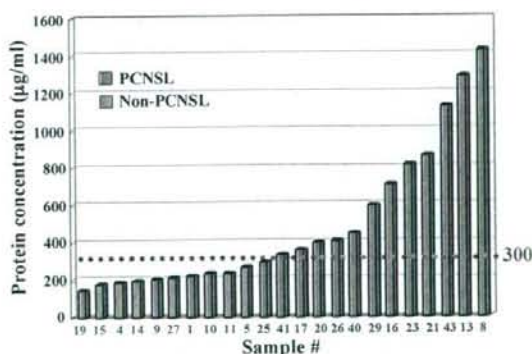


図 1. CSF 中のタンパク質濃度

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。

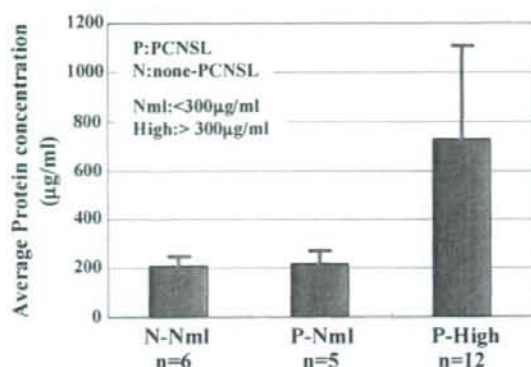


図2. 各群の平均タンパク質濃度

## 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

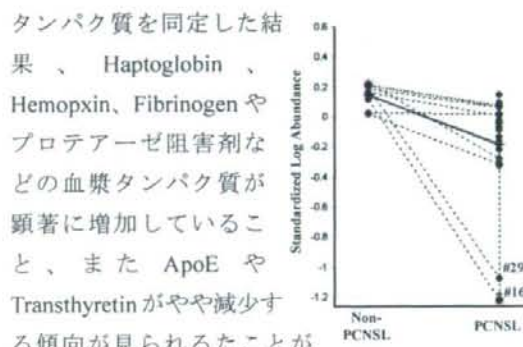
### 3-1. PCNSLとnon-PCNSL間で異なる発現を示すタンパク質

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、Hemopexin、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	0.0004

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。

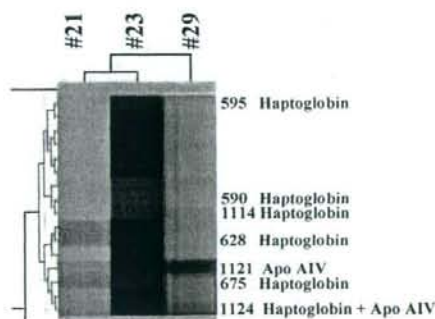


図 5. サンプル#29 において発現が亢進するタンパク質

Haptoglobin のほか Complement component 3 も顕著に増加した。一方、#21 や #23 に比べて  $\alpha$ 1-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 300 $\mu$ g/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、 $\alpha$ 1-antitrypsin、 $\alpha$ 1-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、 $\alpha 2$ -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 $\alpha 2$ -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。

Sample #	Pathology	
45	OA <sup>1)</sup>	表 3. GBM サンプル 1) OA: Oligoastrocytoma 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
46	AO <sup>2)</sup>	
47	GBM <sup>3)</sup>	
50	GBM	
51	GBM	
52	GBM	
54	GBM	
56	NB <sup>4)</sup>	
57	GBM	
58	GBM	
59	NB <sup>5)</sup>	
61	GBM	
62	GBM	
64	GBM	
69	GBM	
71	GBM	

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、ボ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。

### 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

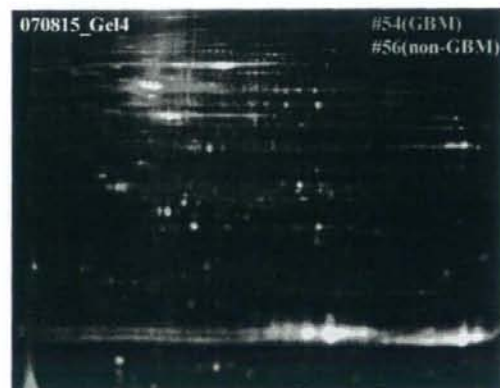


図 6. GBM の二次元電気泳動イメージ

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 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 ApoA1 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。

## 研究成果の刊行に関する一覧表レイアウト (参考)

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
渋井壮一郎	脳腫瘍の疫学	田淵和雄	「グリオーマ病態と治療	シュブリンガー・フェアラク社	東京	2006	7-20
渋井壮一郎	疫学からみた脳腫瘍の実態	渋井壮一郎	脳腫瘍 がん看護実践シリーズ1	メヂカルフレンド社	東京	2007	4-12
渋井壮一郎	悪性神経膠腫の化学療法	伊達編	脳神経外科エキスパート 前頭葉・側頭葉	中外医学社	東京	2008	163-158
西川亮	グリオーマにおけるテモゾロミド療法	柳澤信夫, 篠原幸人, 岩田誠, 清水輝夫, 寺本明 編集	Annual Review 神経2008	中外医学社	東京	2008	96-100
西川亮	新しい化学療法	寺本明他編	グリオーマの最新知見	メヂカルビュー社	東京	2009	74-79

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Narita Y., Shibui S.	Cases with Carcinomatous Meningitis and Cerebral Infarction.	Jpn. J. Clin. Oncol.	36	676	2006
Mishima K., Nishikawa R., et al.	Increased expression of podoplanin in malignant astrocytic tumors as a novel molecular marker of malignant progression.	Acta Neuro-pathol	111	483-488	2006
Ishizawa T., Nishikawa R., et al.	Papillary glioneuronal tumor with minigemistocytic components and increased proliferative activity.	Human Pathology	37	637-630	2006

Uchikawa H., <u>Nishikawa R.</u> et al.	Brain- and heart-specific Patched-1 containing exon 12b is a dominant negative isoform and is expressed in medulloblastomas.	Biochem Biophys Res Commun	349	277-283	2006
Batistatou A., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Expression patterns of dysadherin and E-cadherin in lymph node metastases of colorectal carcinoma.	Virchows Arch.	448 (6)	763-767	2006
Kyzas PA., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Dysadherin Expression in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: Association With Lymphangiogenesis and Prognostic Significance.	Am J Surg Pathol.	30(2)	185-193	2006
Nishizawa A., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Muir-Torre Syndrome with intriguing squamous lesions: case report and review of the Literature.	Am J Dermatopathol	28	56-59	2006
Eguchi T., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Histopathological criteria for additional treatment after endoscopic mucosal resection for esophageal cancer: Analysis of 464 surgically resected cases.	Modern Pathol	19	475-480	2006
Huang JF., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Primary hepatocellular carcinoma detected long after tumor markers and lymph metastases. Beyond our vision?	Dig Dis Sci	51(3)	610-615	2006
Izumi T., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Prognostic significance of dysadherin expression in epithelioid sarcoma and its diagnostic utility in distinguishing epithelioid sarcoma from malignant rhabdoid tumor.	Mod Pathol	19(6)	820-831	2006
Matsumoto S., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Frequent EGFR mutations in brain metastases of lung adenocarcinoma.	Int J Cancer	119	1491-1494	2006
Fukaya M., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Hedgehog signal activation in gastric pit cell and in diffuse-type gastric cancer.	Gastroenterology	131	14-29	2006

Takahashi H., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Classification of intramural metastases and lymph node metastases of esophageal cancer from gene expression based on boosting and projective adaptive resonance theory.	J Biosci Bioeng	102	46-52	2006
Kim DH., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Array-based comparative genomic hybridization of circulating esophageal tumor cells.	Oncology reports	16	1053-1059	2006
Nishizawa A., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Syringoid eccrine carcinoma with a apparently aggressive transformation: case report and review of the literature.	Int J Dermatopathol	45	1218-1221	2006
Hotta K., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Usefulness of Ki-67 for predicting metastatic potential of rectal carcinoids.	Pathol Int	56	591-596	2006
Takada H., <u>Nakanishi Y.</u> et al.	Genomic loss and epigenetic silencing of very-low-density lipoprotein receptor involved in gastric carcinogenesis.	Oncogene	25	6554-6562	2006
<u>成田善孝</u>	脳腫瘍に対する抗腫瘍薬の基礎(解説)	脳神経外科速報	16(7)	642-648	2006
<u>成田善孝</u>	肺癌の脳転移に対する治療	呼吸器科	10(4)	320-327	2006
<u>渋井壮一郎</u>	悪性グリオーマに対する化学療法 - 大規模臨床試験とテーラーメイド治療 -	脳神経外科	15	3-9	2006
<u>渋井壮一郎</u>	JCOG脳腫瘍グループ：星細胞腫grade 3/4に対するACNU vs ACNU+PCZによる第II/III相試験 (JCOG0305臨床試験)	Neuro-Oncology	15	50-53	2006



西川亮, 渋井壮一郎, 他	初回再発の退形成性星細胞腫患者に対するTemozolomide単剤投与の有効性および安全性の検討ー多施設共同第II相試験ー	癌と化学療法	33	1279-1285	2006
西川亮	頭蓋内胚細胞腫瘍の最新知見	脳神経外科速報	16	129-135	2006
西川亮	中枢神経胚細胞腫瘍治療の基本方針	脳神経外科ジャーナル	15	171-176	2006
西川亮	あらたな一歩を踏み出した膠芽腫治療: テモゾロミド.	医学の歩み	218	1037-1038	2006
西川亮	悪性神経膠腫の治療戦略2006	脳神経外科ジャーナル	15	694-699	2006
西川亮	新しい化学療法ーテモゾロミドー	脳と神経	58	1035-1041	2006
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
Hu B., Nishikawa R., et al.	Neuropilin-1 promotes human glioma progression through potentiating the activity of the HGF/SF autocrine pathway.	Oncogene	26	5577-5586	2007
Jarzynka M.J., Nishikawa R., et al.	ELMO1 and Dock180, a bipartite Rac1 guanine nucleotide exchange factor, promote human glioma cell invasion.	Cancer. Res.	67	7203-7211	2007
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

<u>Nobeyama Y., Nakanishi Y., et al.</u>	Silencing of tissue factor pathway inhibitor-2 gene in malignant melanomas.	Int J Cancer	121	301-307	2007
<u>Batistatou A., Nakanishi Y., et al.</u>	In breast carcinoma dysadherin expression is correlated with invasiveness but not with E-cadherin.	Br J Cancer	96(9)	1404-1408	2007
<u>Nakayama R., Takahashi H., et al.</u>	Gene expression analysis of soft tissue sarcomas: characterization and reclassification of malignant fibrous histiocytoma.	Mod. Pathol.	20	749-759	2007
<u>Takahashi H., Honda H., et al.</u>	New cancer diagnosis modeling using boosting and projective adaptive resonance theory with improved reliable index.	Biochem. Eng. J.	33	100-109	2007
<u>成田善孝</u>	新しい神経疾患治療薬の動き グリオーマ	Clinical Neuroscience	25(1)	1242-1246	2007
<u>成田善孝</u>	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(11)	820-827	2007
<u>渋井壮一郎</u>	悪性脳腫瘍に対する新しい治療	医学のあゆみ	222	953-954	2007
<u>Maeshima AM., et al.</u>	Histological evaluation of the effect of smoking on peripheral small adenocarcinomas of the lung.	J Thorac Oncol	3	698-703	2008
<u>Maeshima AM., et al.</u>	Diffuse large B-cell lymphoma after transformation from low-grade follicular lymphoma: morphological, immunohistochemical, and FISH analyses.	Cancer Sci	99	1760-1768	2008
<u>Maeshima AM., et al.</u>	Histologic and immunophenotypic changes in 59 cases of B-cell non-Hodgkin's lymphoma after rituximab therapy.	Cancer Sci	100	54-61	2009
<u>Sentani K., Maeshima AM., et al.</u>	Follicular lymphoma of the duodenum: a clinicopathologic analysis of 26 cases.	Jpn J Clin Oncol	38	547-552	2008
<u>Ando M., Maeshima AM., et al.</u>	Mucoepidermoid carcinoma of the thyroid gland showing marked ciliation suggestive of its pathogenesis.	Pathol Int	58	741-744	2008

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
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
成田善孝, 渋井壯一郎	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	10(3)	449	2008
成田善孝, 渋井壯一郎	脳神経脊髄症状に対する緊急処置	癌と化学療法	35(13)	2301-2306	2008
成田善孝, 渋井壯一郎	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(4)	496-503	2008
渋井壯一郎	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
西川亮	Temozolomide(TMZ)を長期間投与することの有効性と危険性	脳21	12	44-49	2009
浅井昭雄, 河本圭司	放射線照射による脳障害	Brain and Nerve	60	123-129	2008

08(XVI)-110

## 悪性脳腫瘍の TRI (Translational Research Informatics) システムの構築

○成田善孝<sup>a</sup>, 秋葉幸範<sup>b</sup>, 奥泉盛司<sup>c</sup>, 齋藤彰<sup>b</sup>, 西川亮<sup>d</sup>, 永根基雄<sup>a</sup>, 三島一彦<sup>d</sup>, 村垣善浩<sup>f</sup>, 宮北康二<sup>a</sup>, 波井壮一郎<sup>a</sup>

<sup>a</sup> 国立がんセンター 脳神経外科, <sup>b</sup> NEC 日本電気(株), <sup>c</sup> NEC ソフト株式会社 医療ソリューション事業部, <sup>d</sup> 埼玉医科大学国際医療センター 脳・脊髄科, <sup>e</sup> 杏林大学 脳神経外科, <sup>f</sup> 東京女子医科大学 脳神経外科

### Clinical and molecular-biological analyses of malignant brain tumors by the TRI (Translational Research Informatics) System

Y. Narita<sup>a</sup>, Y. Akiba<sup>b</sup>, S. Okuizumi<sup>c</sup>, A. Saito<sup>b</sup>, R. Nishikawa<sup>d</sup>, M. Nagane<sup>e</sup>, K. Mishima<sup>d</sup>, Y. Muragaki<sup>f</sup>, K. Miyakita<sup>a</sup>, S. Shibui<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Neurosurgery Division, National Cancer Center, Tokyo, Japan, <sup>b</sup> NEC, Tokyo, Japan, <sup>c</sup> NEC software, Tokyo, Japan, <sup>d</sup> Department of Neuro-Oncology, International Medical Center, Saitama Medical University, Saitama, Japan, <sup>e</sup> Department of Neurosurgery, Kyorin University, Tokyo, Japan, <sup>f</sup> Department of Neurosurgery, Tokyo Women's Medical University, Tokyo, Japan.

**Abstract:** Glioblastoma is one of cancers with the worst prognosis. Because malignant brain tumors including glioblastoma are relatively rare cancers, it is difficult to do a large-scale clinical trial and develop a new treatment in a single institute. To improve the prognosis of malignant brain tumors, clinical and biological information of an individual case should be accumulated and analyzed in detail. We accumulated many cases of malignant brain tumors in multi institutions and developed the TRI (Translational Research Informatics) system based on data bases of clinical information, radiological and pathological findings and the gene (microarray) and proteome information, etc. This system is expected to analyze and forecast the therapeutic effect of an individual patient.

**Key words:** Glioma, Microarray, Bioinformatics

悪性脳腫瘍(神経膠腫)はあらゆる癌の中で最も治療が困難であるものの、症例が少なく単施設での症例集積や臨床試験は困難である。治療成績向上のためには個々の症例の臨床情報・遺伝子情報を統合して詳細に解析する、いわば“症例集”のような統合型データベースを構築し、これを参考に新規症例の治療効果・治療上の問題点を予測したうえで治療をすすめる必要がある。我々は国立がんセンターをはじめ多施設で集められた悪

性脳腫瘍の匿名化臨床情報、画像情報、病情報、腫瘍検体の遺伝子(マイクロアレイ)・プロテオーム情報などのデータベースをもとに、治療効果の予測・治療上の問題点を明らかにする TRI システムを開発した。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もとに個々の患者に最適化された治療法の開発が期待される。