

主論文の要旨

**Development of a rapid and comprehensive genomic
profiling test supporting diagnosis and research for
gliomas**

〔 神経膠腫の診断および研究に有用な迅速かつ包括的な
ゲノムプロファイリング検査法の開発 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
脳神経病態制御学講座 脳神経外科学分野

(指導：齋藤 竜太 教授)

中島 拓真

【緒言】

脳腫瘍は世界保健機関(World Health Organization (WHO))が定めた分類(WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System (CNS))に基き 130 以上の疾患に分類される。疾患毎に臨床的特徴が異なるため、適切な治療選択には正確な診断が求められる。2021 年に改訂された最新の第 5 版(WHO-CNS5)では分子診断の重要性が強調されている。

臨床現場においては遺伝子パネル検査による包括的ゲノムプロファイリング(Comprehensive Genome Profiling (CGP))が普及してきている。現在、我が国の保険診療下で使用可能な CGP は多様な悪性腫瘍を対象としており、脳腫瘍の診断に必要な遺伝子の全てが網羅できていない。多くの CPG において、コピー数異常(copy number variants (CNV))解析は局所の CNV(focal CNV)に限定され、染色体腕レベルの CNV (broad CNV)の解析が困難である。代表的な脳腫瘍である膠芽腫(GBM)の診断では chromosome 7 の増幅と chromosome 10 の欠失の評価が必要であり、乏突起膠腫(Oligodendroglioma)においても chromosome 1p/19q の共欠失が診断に必要な。また MGMT promoter の DNA メチル化状態(MGMT メチル化)は GBM に対する治療で使用されるテモゾロミドの治療反応性予測に有用だが、既存の CGP で解析できない。既存の CPG は、結果報告まで約 4 週間を要し、分子診断不明のまま治療を開始しなければいけない場合があることも問題の 1 つである。このような課題に対処すべく、脳腫瘍を対象とした遺伝子パネルによる CGP を開発した。

【方法】

本研究では、30 例の神経膠腫(glioma)の手術検体を用いて、変異、CNV、染色体構造異常、MGMT メチル化の解析について我々の CGP の正確性を検証し、連続 23 例の脳腫瘍症例に対して臨床応用における有用性を評価した。CNV 検出用のプローブは common single-nucleotide polymorphism (SNP)から選択して設計した。hybridization capture 法でライブラリーを作成し、次世代シーケンスを行った。変異解析は、MuTect2, EBCall, Strelka2 の 3 つの手法のうち 2 つ以上で同定された変異アリル頻度 (Variant allele frequency (VAF)) ≥ 0.05 の変異を使用した。染色体構造異常は Delly アルゴリズムを用いて解析した。CNV は GATK4 Somatic CNV discovery workflow で解析した。MGMT メチル化の解析には Bismark を使用した。

【結果】

WHO-CNS5 に基き脳腫瘍の診断に必須の遺伝子に加え、既知のドライバー遺伝子および予後マーカーを加えた 113 遺伝子を標的とした(Fig.1a)。CNV は染色体腕あたり 17 箇所、SNP を標的とし、特に脳腫瘍診断に使用される 1p, 7, 9p, 10, 17p, 19q では染色体腕あたり 27 箇所を標的とした。2 日でライブラリー作成、1 日でシーケンス、1 日で解析を行い最短 4 日で結果が得られるワークフローを整備した(Fig.1b)。

検証に用いた 30 例中 14 例は腫瘍と正常血液(matched-control)とのペアで解析を行

い、残りの 16 症例は腫瘍のみ(tumor-only)で CGP 解析を行った。腫瘍は凍結検体を使用した。tumor-only のうち 3 例では formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE)検体を使用した。また全例の腫瘍と matched-control に対して Whole-genome sequencing (WGS)を行い、CGP による解析結果の検証に使用した。WGS で同定された 105 個の体細胞変異のうち 100 個(95.2%)は CGP でも同定可能であった。CGP で同定できなかった 5 個の変異は、全て FFPE 検体を使用して CGP 解析を行った症例で同定された。これらの変異は VAF が低く、シーケンスに用いた DNA が WGS に用いた凍結検体とは採取部位が異なるため、腫瘍内多様性を反映した結果だと考察した。続いて tumor-only の解析の評価を行った。tumor-only の解析結果においては、CGP のみで同定された変異が 31 個あった。このうち VAF が比較的高い(≥ 0.25)変異は、同一患者の WGS の matched-control 側でも認められ、rare germline SNP の混入が示唆された。これは病的変異を偽陰性として見逃してしまうことを避けるために、保守的なフィルタリングで検証を行ったためであると判断した。次に FFPE 検体に対する有用性を検証した。FFPE 検体はホルマリンによる脱アミノ変化が生じ、アーチファクトによる変異数が増えることが知られている。FFPE 検体を用いた 3 例で同定された変異のうち、13 個は WGS と CGP に共通、5 個が WGS のみ、8 個が CGP のみで検出された。CGP が高深度であることを踏まえると、必ずしも FFPE のアーチファクトにより変異数が増えているとは言えず、我々の CGP は FFPE にも適応できることが支持された(Fig.1c)。

CNV 解析では、glioma の診断に必要な chromosome 7 増幅、chromosome 10 欠失、chromosome 1p/19q 共欠失の結果は CGP と WGS で完全一致しており、さらに *CDKN2A*, *PDGFRA*, *EGFR*, *CDK4* など既知のドライバー-focal CNV も同定可能であった(Fig.2)。一方、数十 Mb 未満の領域では CGP と WGS のコピー数評価に乖離を認めた。この領域は設計した CNV プローブの間隙となっており前後のプローブのコピー数につられるため、CGP のコピー数解像度は不十分である可能性が示唆された。

融合遺伝子の解析は染色体構造異常解析を基に行い、RNA-seq で同定された 2 例の *FGFR3-TACC3* fusion、1 例の *COBL-EGFR* fusion の全てを我々の CGP でも検出できた。同定したブレイクポイントは WGS と一致し、ターゲットにした融合遺伝子は正確に検出できることが示された (Fig.3)。

MGMT メチル化はバイサルファイトコンバージョンした DNA を用いてアンプリコンシーケンスにより解析した。MGMT メチル化の解析結果は同一検体に対する pyrosequencing の結果と高い相関を示した($r = 0.988$, $p\text{-value} = 8.49 \times 10^{-8}$) (Fig.4)。MGMT メチル化割合は、既報に一致して IDH-mutant glioma で IDH-wild type glioma よりも有意に高く(two-tailed Welch's t-test $P\text{-value} = 0.010$)、解析が有効であると判断した。

連続 23 例の頭蓋内腫瘍性病変に対して我々の CGP を行い、有用性を評価した(Fig. 5)。21 例でドライバー異常が同定されたが、2 例では認めなかった。1 例は未だドライバー遺伝子が不明な上衣下腫、もう 1 例は髄芽腫に対する放射線治療後 30 年で小脳に発生した腫瘍性病変だった。放射線誘発性神経膠腫(radiation-induced glioma (RIG))が疑われていたが、CGP の結果 RIG に特徴的な遺伝子異常を認めず、コピー数変化も

伴わないことから、腫瘍性病変ではない可能性が示唆された。病理診断でも腫瘍細胞を認めないことから、放射線治療後の反応性変化と診断した。また、小さな生検組織であるため病理学的診断がつかず、Sanger sequencing では *IDH1/2*, *TERT* promoter に変異を認めなかった 1 例において、CGP により *TERT* promoter 変異および chromosome 7 増幅、chromosome 10 欠失を同定でき GBM と診断することが可能であった。そのため、CGP は腫瘍割合が低い症例に対しても有効であると判断された。診断に必要な遺伝子以外にも、予後と関連する可能性が指摘されている *CDK4*, *PDGFRA* の高度増幅が 3 例で同定され、将来的な予後との関連の再評価にも有用であることが示唆された。

【考察】

我々の CGP はほぼ全ての原発性脳腫瘍の診断に必要な遺伝子を対象として、変異、CNV、既知の融合遺伝子、MGMT メチル化解析を同時に行えることを示した。また、最短 4 日という短期間で結果が報告されるワークフローにより、遺伝子プロファイルに基づいた迅速な術後治療の選択および開始が可能となる。

CNV は腫瘍の発生進展に寄与するため、ゲノムワイドな CNV 解析は腫瘍性病変と非腫瘍性病変の区別にも有用であった。また、既存のパネルには含まれない MGMT メチル化解析も可能であった。

我々の CGP は FFPE 検体にも応用可能であったが、FFPE から得られる DNA の質は経年劣化し、変異解析の成功率の低下につながるということが知られている。そのため、検体の質と得られるデータの質に留意が必要である。

我々の CGP には、幾つかの制約がある。まず融合遺伝子の検出は、ブレイクポイントが存在するイントロンが CGP の標的になっている場合に限定される。次に、ゲノムワイドな DNA メチル化及び遺伝子発現パターンによる診断が必要な髄芽腫や上衣腫には、CGP のみでは十分な診断に至らないことに留意すべきである。

【結論】

脳腫瘍の臨床および研究に有用な、包括的かつ迅速に変異、融合遺伝子、CNV、MGMT メチル化解析を同時に解析可能な CGP を新たに開発した。我々の CGP のデザインは簡便に変更できるため、将来的な WHO 分類改訂に新しい遺伝子変異が追加された場合にも柔軟に対応可能である。