

主論文の要旨

**Rapid sensitive analysis of *IDH1* mutation in
lower-grade gliomas by automated genetic typing
involving a quenching probe**

〔 全自動ゲノムタイピングを用いた低悪性度神経膠腫における
*IDH1*変異迅速解析の有効性 〕

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：若林 俊彦 教授)

栗本 路弘

【緒言】

神経膠腫(glioma)は中枢神経原発腫瘍の中でも最も一般的なものであり、全脳腫瘍の内28%を占める。その中で低悪性度(World Health Organization; WHO grade II-III)に分類される神経膠腫(lower-grade glioma:LGG)は悪性度としては低いものの浸潤性に富み、5-10年で段階的に悪性化するという生物学的特徴をもつ。また治療法としての外科的摘出においても、腫瘍組織本体が正常脳組織と区別できない肉眼的特徴を呈することにより境界が不鮮明であることがほとんどで、最終的な摘出範囲は術者の判断に委ねられてきたのが実情である。

ニューロナビゲーション・システムや術中MRI、術中蛍光診断として5-aminolevulinic acid (5-ALA)など様々な手術支援技術・機器の研究開発が近年目覚ましいが、術中の脳偏位によるニューロナビゲーションのずれや5-ALAの偽陽性・偽陰性染色などの課題が未解決であり、さらなる研究が望まれている状態である。最近の研究でWHO grade II-IIIの神経膠腫において実に80%が*isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)*の変異を有していることが解明され、これを受けて我々は術中の迅速IDH1変異解析が神経膠腫の手術成績のさらなる進歩に貢献すると考え検討を行った。

【対象及び方法】

今回我々は、変異の中でも最も頻度の高いとされる *IDH1-R132H* codon 変異を全自動かつ短時間で測定可能とした機器(i-densy™: アークレイ社)を使用し、臨床現場における利便性、実用性についての検討を行った。この機器は前処置から polymerase chain reaction(PCR)、single nucleotide polymorphism (SNP) typing までを全自動化し、約 80 分にて解析を行うことを可能にしたシステムである。SNP typing には蛍光ラベルされた Quenching probe(Q-probe: TAMRA-cataagcatgacgacctat-Phosphate)を用い、Q-probe と相補的 DNA の分離により惹起される蛍光測定による解析を行う。感度や特異性を検討するために、次世代 deep sequencing により IDH1R132H variant allele frequency (VAF; 遺伝子変異率)や腫瘍細胞割合が既知の LGG 腫瘍検体(2例の退形成性乏突起星細胞腫、1例の乏突起星細胞腫、1例の退形成性星細胞腫の計4検体)より抽出した DNA (Mismatch group:mutated DNA) と、健常人の血液検体より抽出した DNA(Perfect match group:wild type DNA)を用いて検討を行った。両者の濃度を 6ng/ μ L に調整し、5種類の比率(Mutant ratio=mutated DNA/wild type DNA+mutated DNA:0, 0.2, 0.5, 0.8, 1.0)で調整した DNA サンプルを使用した。Mismatch group では相補的DNAとQ-probeの結合が弱いため、Q-probeが分離する温度がPerfect match group (60℃)に比べて低く(48℃)、それにより惹起される蛍光発色を検出される熱安定性解析(Tm解析)を行った(Figure 1)。

【結果】

測定の結果、すべてのサンプルにおいて48℃と60℃にそれぞれMismatch groupとPerfect match groupに由来する2つの明確な蛍光ピークを認めた(Figure 2)。また

ピーク比（48℃ピーク値/60℃ピーク値）と各サンプルにおける *IDH1-R132H* codon 変異 DNA の混合比率は良好な相関を示した。各サンプルにおけるピーク比をそれぞれの *IDH1-R132H*VAF で除して標準化を行った場合にも、同様に良好な相関を認めた (Figure 3)。今回のデータにおいて *IDH1-R132H* の VAF がすべて 0.4 から 0.5 の範囲であったことから、実際の腫瘍細胞においても 40%から 50%の *IDH1-R132H* codon 変異の存在が示唆され、検出限界は 10%の変異腫瘍細胞が含まれるサンプルであれば十分であるとの結論を得た。実際の解析に要した時間は1サンプル 80 分程度（4サンプルまで同時解析可能だが、今回は1サンプルごとに解析を実施）であり、術中迅速病理診断に要する時間を考慮しても十分臨床応用に付加価値を与えるものと認識している。また、手技も非常に簡易であることから施行者による測定結果のばらつきも最小限に抑えられることができる点も臨床応用に非常に有利であると考えられる。

【考察】

IDH1/2 変異は LGG の 80%に認められ、さらにその 95%以上において *IDH1-R132H*codon 変異である。*IDH1/2* 変異は神経膠腫の発生において最初に起こる遺伝子変異とされているため、LGG の起源に関与していると考えられている。この変異の検出を行うことで LGG と他の腫瘍の鑑別を行うことや、腫瘍と正常脳組織や腫瘍周辺の反応性グリオシスの判別を行うことが可能となる。腫瘍摘出率は有意な LGG の予後予測因子のひとつであるが、正常脳組織との肉眼的区別が難しい LGG の摘出手術においては肉眼的全摘出 (gross total resection: GTR) を行うことは非常に困難である。そのため、術中迅速分子診断には腫瘍摘出率を最大限に引き上げることが要求されるが、今回の研究は、Q-probe を用いた全自動 PCR が *IDH1* 変異の高精度検出に有用であることを示した初めての論文である。i-densy は DNA を抽出する過程も自動化されているため、今回のように抽出した DNA を用いる必要もなく手術の現場で摘出した検体をそのまま解析することも特徴である。そのため、リアルタイムな手術支援技術として非常に有用なものであると期待している。また、高感度であるために、髄液中の cell-free DNA や血液循環中の circulating-tumor cells (CTCs) も検出可能であり、非侵襲な検出技術としてもさらなる発展応用が期待できる。

【結論】

低悪性度神経膠腫において、*IDH1-R132H*codon 変異を全自動かつ短時間で測定可能な機器の感度・特異性や実用性、今後の展望についての検討を行った。非常に鋭敏な検出が可能であり、神経膠腫診断の補助となるだけでなく、術中支援技術として低悪性度神経膠腫における腫瘍摘出率を可能な限り向上することで疾患予後を改善し得る技術であると期待している。今後は LGG 術中摘出検体からの解析データの収集や、他腫瘍への応用利用などを計画している。