

主論文の要旨

A novel high-sensitivity assay to detect a small fraction of mutant *IDH1* using droplet digital PCR

〔 droplet digital PCRを用いた微量*IDH1*変異  
検出のための新規高感度アッセイ 〕

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)

平野 雅規

## 【緒言】

近年、isocitrate dehydrogenase 1 gene (*IDHI*)における変異が、特に WHO 分類 grade II /III 神経膠腫(lower grade glioma)の約 80%においてドライバー変異として働いていることが報告された。2016 年に改定された WHO 分類においても、この *IDHI* ステータスの検査が glioma の正確な診断に必須となった。しかし、一般に glioma は極めて浸潤性の性質を示すため、手術中得られる検体には多くの正常脳組織が含まれている。従来標準とされてきた Sanger 法による変異検出限界は 6.6-20%程度であり、偽陰性となる症例が一定数存在すると考えられるため、僅かな遺伝子変異をも検出できる新たな検査法の確立が必要である。

また近年、新たな非侵襲的分子診断法として liquid biopsy が様々な癌種で確立されつつある。Glioma に関しては、脳脊髄液(CSF)から少量のセルフリー腫瘍由来 DNA(ctDNA)が検出されたという報告が僅かにあるが、これを用いて上述の *IDHI* 変異を同定することができれば、非侵襲的 glioma 診断として大変有用である。このためにもやはり、僅かな遺伝子変異を検出できる新たな高感度の検査法が必須となる。

Droplet digital polymerase chain reaction (ddPCR)は近年開発された技術で、DNA 断片を封入した何千ものナノサイズの油滴を作り、各々の中で蛍光プローベを用いた PCR 反応を起こすことで、僅かな遺伝子変異の検出を可能にしている。今回この ddPCR システムを用い、凍結および formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE)検体由来 DNA からの *IDHI* 変異検出の感度・特異度等を評価した。また ddPCR を用いた CSF 由来 DNA からの *IDHI* 変異検出の可能性についても検討した。

## 【対象および方法】

当院にて脳腫瘍摘出術を受けた 14 例 (13 例 : lower grade glioma G1-G13, 1 例 : 髄膜腫 M1)より、術中に腫瘍組織を採取した。G2 を除く全例の凍結検体から DNA を抽出し、更に G1,G2,M1 の 3 例については FFPE 検体から DNA 抽出を行った。術中十分な CSF が得られた 1 例については、CSF からの DNA 抽出も実施した。

まず全例につき、抽出した DNA を用いて Sanger 法による *IDHI* sequencing を行った。変異アリル頻度(mutant allele frequency, MAF)評価のため、現在標準とされる pyrosequencing による解析も実施した。

続いて、Sanger 法で *IDHI* 変異(R132H)陽性と判断された症例につき、DNA(凍結, 30ng)を用いて ddPCR による MAF 測定を実施した。本検討では、測定された蛍光強度の分布に基づき、FAM (*IDHI* R132H 変異に対応), VIC (*IDHI*-wildtype に対応)の閾値をそれぞれ 10000, 7000(平均値-2×標準偏差)と設定した。この条件を用いて全サンプルの *IDHI* MAF を検討し、前述の pyrosequencing の結果と比較した。DNA 10ng, 1ng でも同様の検討を行った。

更に、これまで *IDHI* 変異が報告されていない髄膜腫由来の DNA (M1, *IDHI*-wildtype)で *IDHI*-mutant DNA を段階希釈して様々な MAF のサンプルを作成し、DNA 使用量を 30ng, 10ng, 1ng と変えて ddPCR による MAF 検出限界を検討した(凍結・FFPE

検体由来 DNA)。

### 【結果】

今回対象とした全症例の臨床・病理学的所見を Table1 に示す。2016WHO 分類では、乏突起神経膠腫(oligodendroglioma)の診断には IDH 変異が必須となったが、唯一 G2 において形態学的病理診断と Sanger 法の結果に矛盾が生じた。

Sanger 法にて *IDH1* (R132H)変異陽性とされた凍結検体由来 DNA を用いた ddPCR 解析の結果は Fig.1, Table2 の様になった。Pyrosequencing で得られた結果との比較では、極めて高い相関関係を認めた(DNA 30ng :  $R^2=0.990$ , 10ng :  $R^2=0.976$ , 1ng :  $R^2 = 0.912$ ) (Fig.1b,c)。

*IDH1*-wildtype DNA で *IDH1*-mutant DNA を段階希釈して得られた様々な MAF サンプルを ddPCR で解析した結果は Fig.2 で示す通りであった。凍結検体由来 DNA 1ng で行った解析では、1%MAF サンプルにおいて変異が検出されず、検出限界は 5%であった(Fig.2a)。同様に凍結由来 DNA 10ng, 30ng で行った解析では、検出限界はそれぞれ 0.5%, 0.05%であった(Fig.2b)。更に、FFPE 検体由来 DNA 30ng を用いた検討では、検出限界は 0.5%であった(Fig.2c)。この結果に基づき、以下の検討では DNA 30ng を用いて解析を行うこととした。

前述の通り G2 (Fig.3a)においては、形態学的病理診断は退形成性乏突起神経膠腫(anaplastic oligodendroglioma)であったが、Sanger 法では IDH 変異が検出されず矛盾が生じた(Fig.3b)。しかし FFPE 検体由来 DNA 30ng を用いた ddPCR 解析の結果、1.23%の *IDH1* 変異が認められ、確定診断に至った(Fig.3c)。

また、開頭直後に CSF が十分採取できた別の症例(anaplastic oligodendroglioma, Fig.4a)では、1mL の CSF から 118ng の DNA を抽出することができ、やはり DNA 30ng を用いた ddPCR 解析により 0.21%の *IDH1* 変異を検出することができた(Fig.4c)。

### 【考察】

今回の検討では、凍結検体由来 DNA 1ng 程度を用いた解析でも、従来標準とされる pyrosequencing の MAF 解析結果と非常に高い相関を示す結果が得られ、ddPCR の精度の高さが示された。また 30ng の DNA を用いることで、*IDH1* MAF 0.05%(凍結), 0.5%(FFPE)と非常に僅かな変異の検出が可能となることが明らかになった。結果の蛍光強度分布から、凍結に比べて FFPE 由来 DNA の検出感度が劣るのは、FFPE による DNA 損傷や塩基置換により PCR 効率が低下するためと考えられた。しかし前述の通り、MAF 検出限界は Sanger 法で 6.6-20%程度、また近年報告される様になった next generation sequencing (NGS)を用いた解析でも 2%程度とされており、例え FFPE 検体を対象とした解析であっても、ddPCR は他の解析方法より優れた変異検出能を持つと言える。

特記すべき点として、今回 anaplastic oligodendroglioma の 1 例において、従来の Sanger 法では検出の出来なかった *IDH1* 変異を、ddPCR を用いることで初めて検出すること

が出来た。2016WHO 分類では、IDH 遺伝子のステータスが **lower grade glioma** の診断マーカーとして非常に重要な位置付けとなっている。変異 IDH1 タンパクに対する阻害剤の発見・開発が進み、いくつかの **first-in-human** トライアルも現在進行中であり、予後が悪いとされる IDH-wildtype glioma と IDH-mutant glioma をより正確に診断できる ddPCR システムは、今後ますます重要な役割を果たすと考えられる。

加えて今回我々は、ddPCR を用いて CSF 中の ctDNA から *IDH1* 変異(0.21%)を検出することに成功した。腫瘍本体から抽出した DNA 中の *IDH1* MAF は 20.0%であり、フラグメント解析の結果からは他の様々な組織由来の DNA が CSF 中に含まれていることが示唆されたが、非侵襲的 glioma 診断の実現につながる結果と考えられた。

### 【結論】

ddPCR は従来の方法よりも優れた遺伝子変異検出感度を示し、glioma の正確な診断、および非侵襲的診断(liquid biopsy)の実現に有用である。