

平成 24 年 4 月 25 日

平成 23 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 東京女子医科大学・脳神経外科
氏 名 藍原 康雄

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名	小児脳腫瘍に対する、遺伝学・新悪性度分類の構築
(英文名)	Establishment of new genetic grading for the pediatric brain tumor
2. 研究実施期間	平成 23 年 4 月 1 日 ~ 平成 24 年 3 月 31 日
3. 助成金額	1,000,000 円
4. 研究の目的	<p>我々は既に日本人小児脳腫瘍症例の腫瘍組織を用いて、予後不良因子の遺伝子発現レベルを real-time PCR 法により検討し、初発時より播種・転移像が認められた例では PDGFRA や ErbB2 などの発現増強を確認した。特に髄芽腫の播種・転移に関しては Tobey らの報告より PDGFR、SPARC、PCNA などの遺伝子発現が重要と考えられるようになったが、我々はその遺伝子発現を定量 PCR 法により検討し、より正確な発現比較を検討した。発症に関係する Wnt、SHH pathway に関しては多くの報告があるが、同様に臨床データと細かく比較した予後比較の報告は認められない。さらに、我々は髄芽腫の予後不良因子として知られている ErbB2、p53、c-myc、予後良好因子として知られている TrkC、アポトーシスに関係するとされる G-CSFR 遺伝子発現を定量し、初発時の腫瘍進展形式や抗腫瘍薬による治療効果と比較した。</p> <p>研究方法</p> <p>1) 腫瘍組織よりの RNA の抽出と定量 PCR 反応</p> <p>小児悪性脳腫瘍 { 髄芽腫、原始神経外胚性腫瘍 (PNET) など } の摘出術時に得られた脳腫瘍組織 (100 ~ 500mg) より Qiagen 社製、RNA 抽出キット (RNeasy) を用いて総 RNA を抽出し、得られた総 RNA より 1 µg を用い cDNA を合成し、Stratagene 社製のサーマルサイクラー (Mx3000P) を用いて RNA を定量した。尚、コントロールとして BD バイオサイエンス社の小脳組織より得られた RNA を用いる。各遺伝子の発現量は GAPDH 遺伝子など構成的に発現している遺伝子発現量と比較し、適宜、補正する。プライマーとして用いいる遺伝子は TrkC、p53、c-myc、ErbB2、-catenin、Sufu、PDGFR、PCNA、SPARC、G-CSFR を測定した。</p> <p>2) 臨床データとの比較</p> <p>初発時の造影 MRI 像や臨床症状を播種の有無、転移性腫瘍形成に有無などにより細かく分類し、各因子の発現と比較する。各因子と密接に関係がある症状を検討する。治療成績・予後などと比較検討し治療法やその成績と関係する因子を検討し、リスク分類を行う。上記の文献の内容と定量 PCR で得られた結果を比較検討し、総合的な予後因子の予想を試みた。</p>

5 . 研究概要報告結果・考察

3例とも L-PAM+TESPA 前処置による二回の PBSCT により、造影 MRI 画像上で腫瘍所見は消失し、2名は外来経過観察中（小学校、および高校通学中）であり、残り1名も二回目の PBSCT よりの回復を待っているが、重篤な後遺症は認められていない。

近年、DNA マイクロアレイによる遺伝子プロファイリング技術の進歩に伴い髄芽腫に関しても予後や播種・転移に係る遺伝子の解明が進んでいる。一方、Wnt pathway や Sonic Hedgehog (SH) pathway の様に髄芽腫の発症に係るシグナル伝達経路の解析も進み、予後との関係が解明されつつあるが、国内ではその解析は一般的ではなく、治療に応用されているとは言い難い。今回、髄芽腫の予後に係ると考えられる遺伝子発現検索を開始したが、診断時に播種・転移が認められた3例の髄芽腫で得られた結果を中心に報告する。

-catenin は核内で LEF/TCF ファミリー分子と結合して DNA の転写を活性化する。Wnt が Frizzled (FRZ) に結合すると GSK (glycogen synthase kinase) 3 による -catenin のリン酸化を抑制し、-catenin を安定化する。-catenin の GSK3 によるリン酸化は -catenin の変性を促進する。大腸癌、肺癌などの悪性腫瘍では、-catenin 発現は増加しているものは予後が良く、低下しているものでは悪い(予後良好因子?)と報告されている。Medulloblastoma では -catenin (6%) APC、Axin、遺伝子などの mutation が確認されている。-catenin は癌抑制遺伝子 p53 活性を促進するが、逆に p53 により -catenin は抑制される。

PTCH (Patched) は: SMO (Smoothed) を抑制しているが、SHH が PTCH に結合すると、SMO の抑制が取れ、SMO が SUFU (Suppressor of fused) などにより形成されている MPC (Multiprotein complex) を抑制するようになる。MPC には GLI (Glioma-associated oncogen homologue)1 を抑制し、Full length の GLI2/3 を切断し、GLI による遺伝子転写を抑制する働きがある。すなわち、SHH が PTCH に結合すると、MPC が抑制され、GLI による遺伝子転写活性が高くなる。Medulloblastoma では PTCH 及び SUFU の mutation により、SHH pathway の欠損(約 10%) 及び機能低下(約 5%) が知られている。SHH の発現上昇は GLI を介さず、Medulloblastoma 発症に係るという報告もある(Cancer Res 2002; 62: 6385-89)。

初発時より脊髄に転移が認められた3例の髄芽腫について予後や播種・転移に係る遺伝子の mRNA を Real-Time PCR 法 (SYBR Green 発色系) にて検索した。3例とも発現量に違いはあるものの予後不良因子、播種・転移に係る因子の高発現が認められた。今後、播種の有無、組織型との関係、各因子間の相互関係などを症例数を増やし、検討する必要があるが、3例とも PBSCT を併用した強力な化学療法を行うことにより、腫瘍の消失が認められている。一つの予後不良因子で、20~60%の生存率の変化は認められることが多いことから、髄芽腫の階層的な集学的な治療法の確立にはこれらの予後因子の検索が不可欠である。今回用いた SYBR Green 発色系による Real-Time PCR 法は Taqman Probe を用いた PCR 法に比較し、少量の検体量で測定が可能であり、10種類前後の予後因子の検索には有用である。

6 . 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職
氏 名

論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に を付けて下さい。