

## デジタル PCR が切り開く 悪性脳腫瘍診断・治療の道



新潟大学脳研究所 腫瘍病態学分野 准教授

新潟大学医歯学総合病院 ゲノム医療部 がんゲノム医療センター長

棗 田 学

### はじめに

2016年に出版された WHO（世界保健機関）脳腫瘍診断ガイドライン第4版の改訂版に初めて、脳腫瘍の病理診断には分子診断が取り入れられ、遺伝子学的な裏付けが必要となった<sup>1)</sup>。悪性神経膠腫（グリオーマ）の診断には *IDH1* 遺伝子等の遺伝子に変異がないかどうかの解析が必須となった。しかし、脳腫瘍領域ではその疾患稀少性や血液脳関門というバリアーや特殊な免疫環境が存在する故に、分子標的治療や免疫チェックポイント阻害剤などの免疫療法の開発が他の癌領域と比べて大きく遅れをとった。そして脳腫瘍に特化した遺伝子診断は、治療に結び着かないという理由で、保険適応にならないという現状に直面している。WHO ガイドラインでは定義され必須とされている脳腫瘍の遺伝子診断は、研究ベースでサンガー法や免疫染色などの方法を駆使し、各施設で行っているのが国内の現状である。この現状を打破し、安価で信頼性の高い脳腫瘍遺伝子診断を実現させるのはデジタル PCR の技術と確信している。本編では、脳腫瘍遺伝子診断の現状と今後の展望について解説する。

### がんゲノムパネル検査の保険収載が脳腫瘍診断にもたらしたもの

2019年に国内に NCC オンコパネルおよび Foundation One<sup>®</sup> CDx の2つのがんゲノムパネルが保険収載された。腫瘍検体ベースのパネル検査は GenMine TOP が加わり、2025年現在3つのパネルが使用可能である。脳腫瘍領域でも精密医療への期待は高かったが、ゲノムパネル検査には、一患者当たり生涯一度しか施行できない、結果が戻って来るのに時間がかかる、少量の組織検体では結果がでない、高価である、複雑なシステムで

あり結果の解釈が難解である場合があることなど、課題は山積している。悪性神経膠腫（グリオーマ）の診断に必要な遺伝子の多くはゲノムパネルに含まれているが（図1）、そもそも初発時にはゲノムパネル検査は推奨されておらず、上述の脳腫瘍の病理診断のための遺伝子診断にがんゲノムパネル検査を用いることは少なくとも当科では殆どない。

### 精密医療の威力と限界

Epithelioid glioblastoma は核が偏在し、胞体が豊かで突起を有さないグリオーマ細胞から成る特徴的な形態を示す。高率に髄膜播種を来とし極めて予後不良な *IDH* 野生型膠芽腫の一亜型として、WHO2016に初めて定義された<sup>1)</sup>。遺伝子学的には高率に *BRAF* V600E 変異を有する事が知られている。がんゲノム医療時代の2017年に肉眼的に全摘出したものの初期放射線治療中に広範な脊髄播種を来した症例を経験した。その症例は形態学的に典型的な epithelioid glioblastoma であり、研究ベースで *BRAF* V600E 変異を確認しており、当時、院内倫理委員会で承認を得て、*BRAF* V600変異を有する進行性悪性黒色腫（メラノーマ）に有効性が示され保険適応となっていたダブラフェニブ（*BRAF* 阻害剤）、トラメチニブ（*MEK* 阻害剤）の併用療法を4週間施行したところ、厚い脊髄播種がほぼ消失した経験をした（図2）<sup>2)</sup>。本症例を通して精密医療の威力をまざまざと見せつけられただけでなく、標準治療（テモゾロミド併用放射線治療）抵抗性の膠芽腫症例には今まで間違った治療を行って来たことを痛感させられた。

その後、時代が流れ、epithelioid glioblastoma を含む *BRAF* V600E 変異を有する固形癌に対してダブラフェニブ、トラメチニブの保険適応拡大

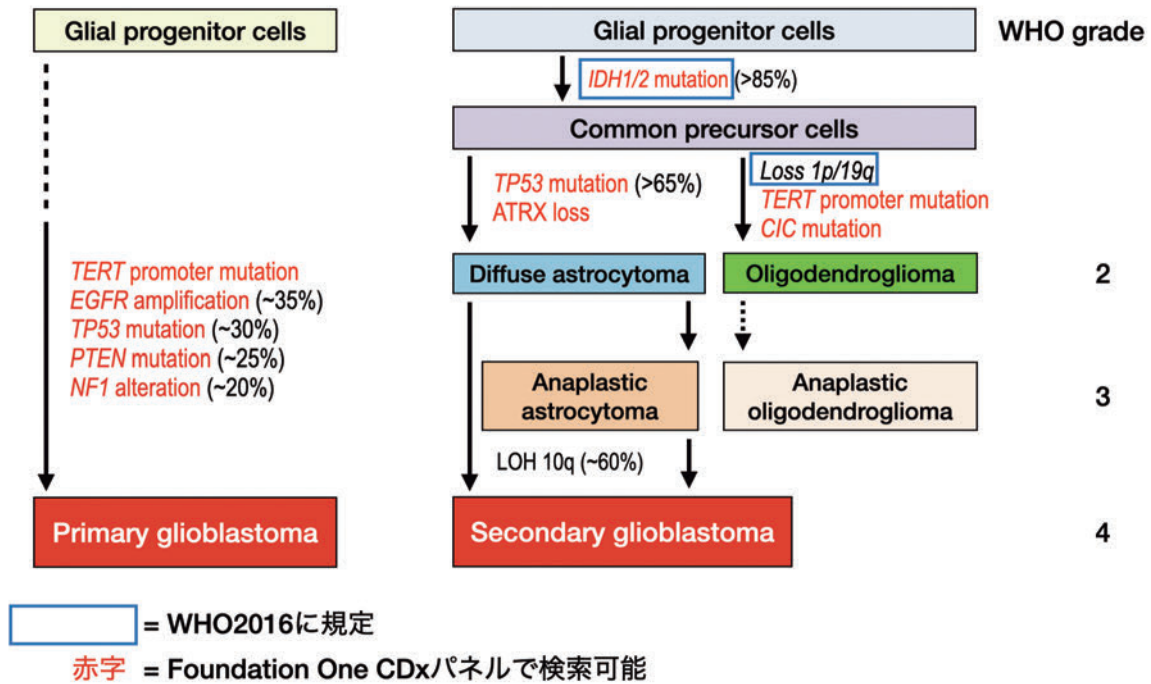


図1 グリオーマ形成および増殖に関わる遺伝子・染色体異常。Foundation One CDx パネルに含まれる遺伝子は赤字で示している。

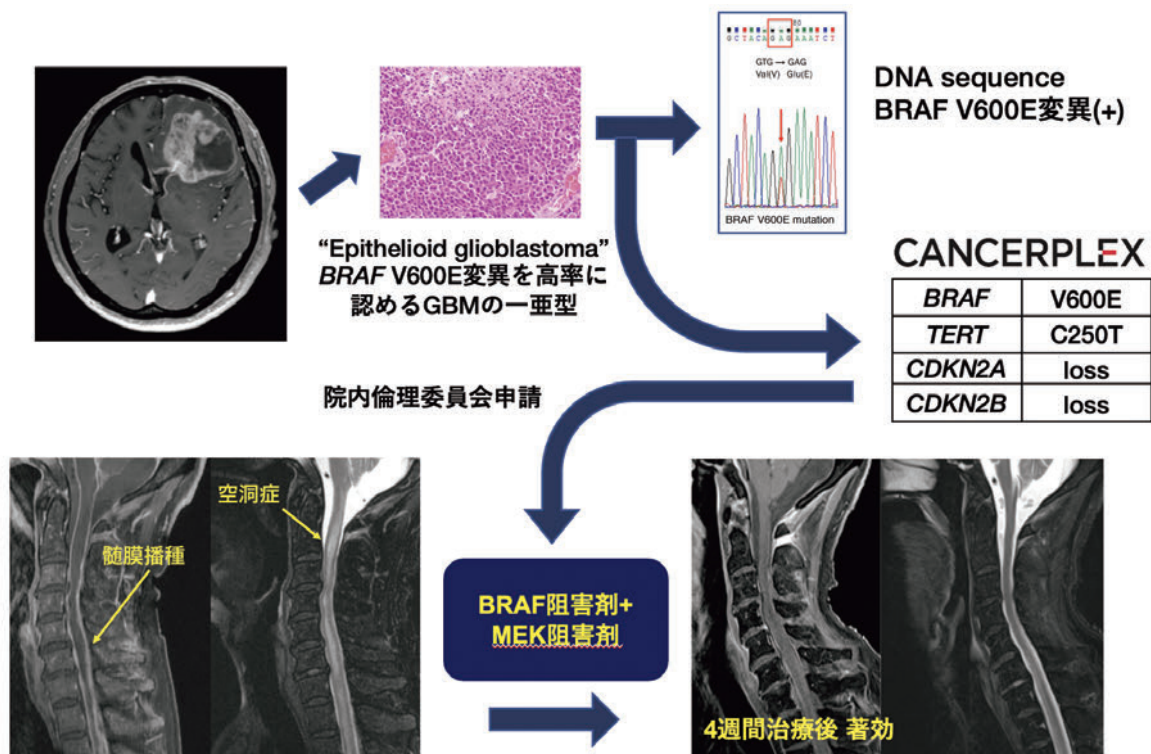


図2 BRAF V600E 変異を有し、標的治療が奏効した一例。文献2より引用。一部改変

がなされ、実臨床で使用可能となった。しかし、ここ最近、播種症状で発症し、入院後10日目、12日目に死亡した epithelioid glioblastoma の2例を経験した。つまり、がんゲノムパネルや PCR rSSO 法を用いた外注検査により BRAF V600E

変異が同定できる前に病状が進行してしまい、治療機会を逸してしまう症例が未だに見受けられる(図3)。しかも、in house でデジタル PCR 法では DNA の抽出からデジタル PCR の結果が出るまで半日程度しかかからないため、デジタル

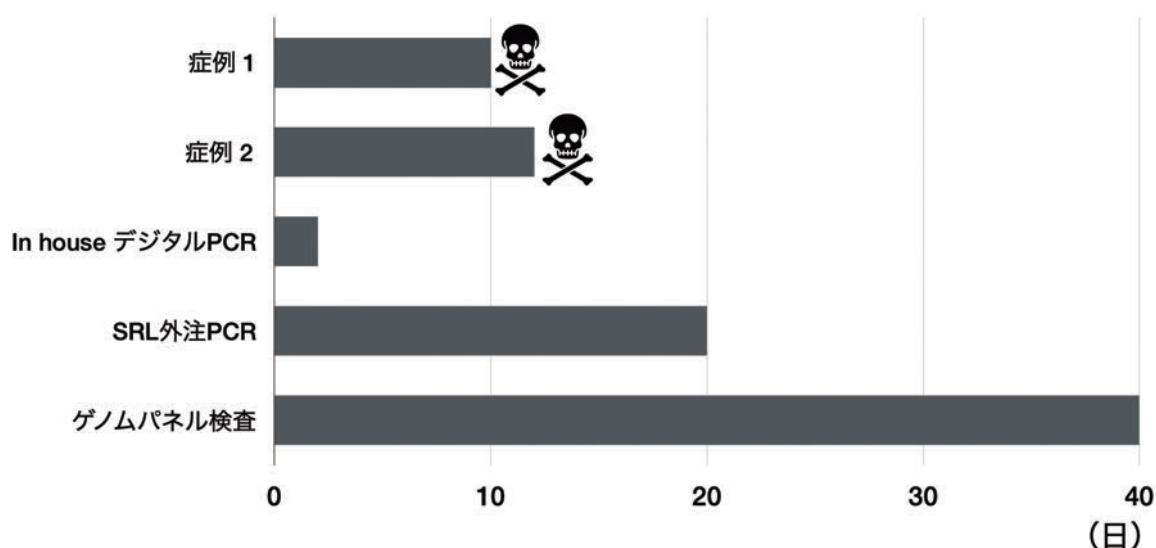


図3 2症例の経過および *BRAF* V600E 変異解析にかかる日時。

PCR 法を用いると遅滞なくこのような症例を治療することが可能となる。

### リキッドバイオプシーの研究から見たデジタル PCR の有用性

リキッドバイオプシーは血液、尿、髄液中に認められる微量な腫瘍 DNA を検出する方法である<sup>3), 4)</sup>。当科では国内でいち早く脳腫瘍患者のリキッドバイオプシー、つまり、髄液中セルフリー DNA の遺伝子変異をデジタルドロップレット PCR (ddPCR) で検出するのに成功した。主な適応としては中枢神経系原発リンパ腫の診断のための *MYD88* L265P 変異解析<sup>5), 6)</sup> やびまん性正中膠腫の診断のための *H3F3A* K27M 変異の検出<sup>7), 8)</sup> であり、それらの診断に有用であることを報告した。ddPCR は油滴の中で何千もの PCR 反応を行う方法であり、サンガー法の100倍の感度があることが知られている。この技術を駆使することで、髄液中に存在する微量の変異脳腫瘍 DNA を検出することができる。デジタル PCR の短所の一つとして、点突然変異の一アミノ酸置換に対して一つのプライマーを設計しないといけないということである。つまり、*TP53*変異のように様々な位置に遺伝子変異が生じうる場合は良い適応とはならず、次世代型シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析が適応となる。一方で *MYD88* L265P や *H3F3A* K27M 変異のように hot spot が一箇所の場合は特に有用である。

### デジタル PCR による脳腫瘍遺伝子診断プロジェクトの開始

我々はリキッドバイオプシーで用いているデジタル PCR の技術を脳腫瘍組織の遺伝子診断に応用するプロジェクトを始めている。脳腫瘍患者の髄液中の微量な循環腫瘍由来 DNA が検出できるのであれば、脳腫瘍手術摘出標本の腫瘍 DNA の解析は100%の信頼性が持てるという感触は持っていたが、プロジェクトのアイデアは法医学教室の小山哲秀先生との意見交換により生まれた。まずは神経膠腫の診断や治療選択に必須である *IDH1* R132H や *BRAF* V600E のプライマー設計を小山先生にお願いしました。サンガー法との比較で、サンガー法は腫瘍含有率が5-10%程度までであれば変異ピークの検出が可能であるが、それ以下では検出困難である。一方でデジタル PCR を用いると、腫瘍含有率が1-2%でも変異が検出可能であった。実際、リキッドバイオプシーにおいてサンガー法では遺伝子変異が検出されないがデジタル PCR では検出可能であった症例を経験している (図4)。図1で示したグリオーマの診断に重要である遺伝子変異から、条件設定を行っている。また、本稿を執筆中の11月末日に、最新のデジタル PCR の機器が納入され、今後の研究がますます迅速に進められることが期待される (図5)。



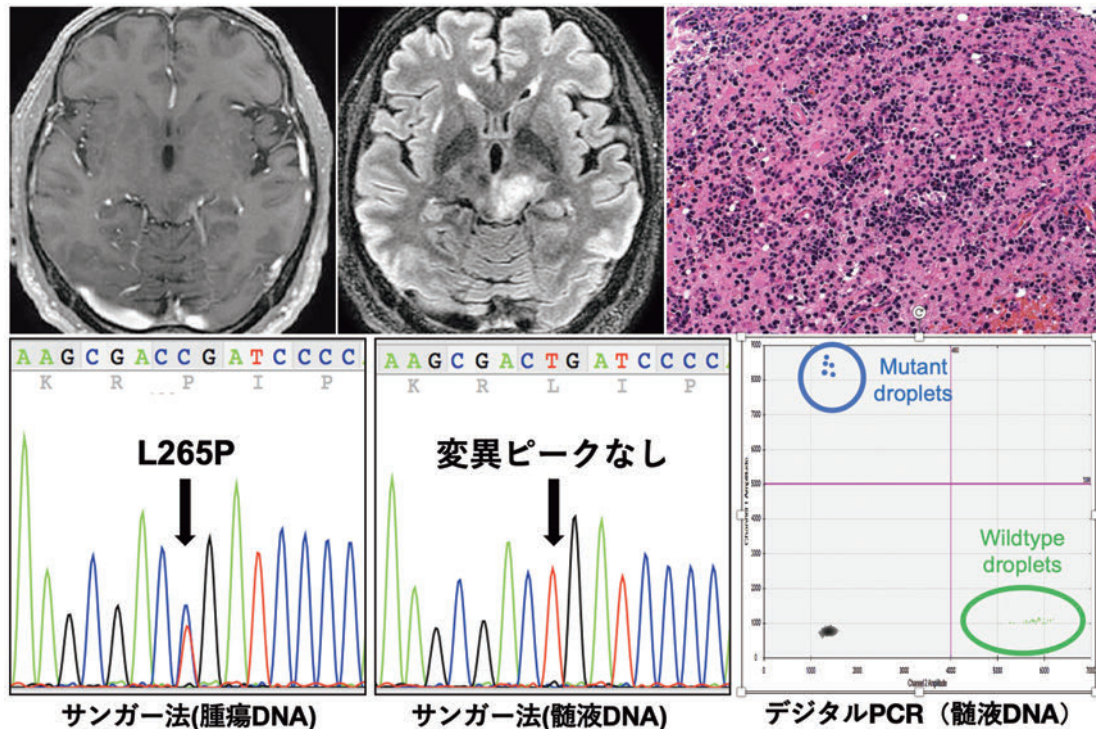


図4 中枢神経系リンパ腫症例における髄液循環腫瘍由来 DNA 中 *MYD88* L265P 解析。  
サンガー法では変異ピークを検出できなかったが、デジタル PCR では変異 droplet を  
検出できた。文献5より引用。一部改変

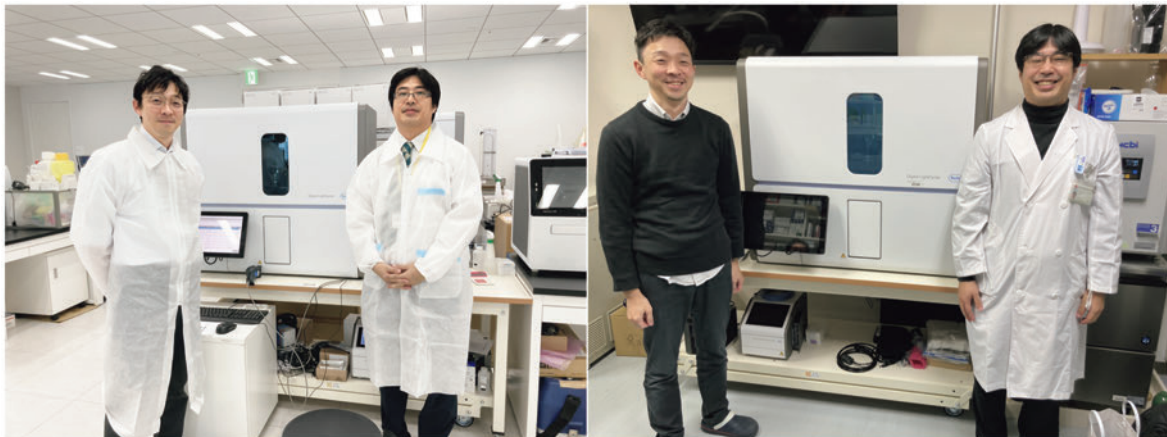


図5 最新のデジタル PCR 機器の前で小山先生との一枚。左は出張にて、右は大学納入同日に  
撮像。(いずれも右側が筆者)

## 謝辞

デジタル PCR プロジェクトの立案から実装まで、多大な貢献をして頂いている法医学教室小山哲秀助教に深謝したい。また、デジタル PCR 機器の購入にご支援頂いた消化器・一般外科若井俊文教授、脳研究所病理学分野柿田明美教授、整形外科川島寛之教授、法医学分野高塚尚和教授、脳神経外科大石誠教授に厚く御礼申しあげる。本研究に関わって頂いている他、全ての方々に感謝申しあげる。

## 文献

- 1) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, et al : WHO classification of tumours of the central nervous system. Revised 4th edition, Lyon : IARC, 2016.
- 2) Kanemaru Y, Natsumeda M, Okada M, et al : Dramatic response of BRAF V600E-mutant epithelioid glioblastoma to combination therapy with BRAF and MEK inhibitor : establishment and xenograft of a cell line to predict clinical efficacy. Acta Neuropathol Commun 2019 ; 7 : 119.
- 3) Corcoran RB, Chabner BA : Application of cell-free DNA analysis to cancer treatment. New Eng J

- Med 2018 ; 379 : 1754-1765.
- 4) Natsumeda M, On J, Watanabe J, et al : The present and future of less-invasive liquid biopsy for the diagnosis of gliomas and brain tumors. No Shinkei Geka 2021 ; 49 : 527-534.
  - 5) Watanabe J, Natsumeda M, Okada M, et al : High detection rate of *MYD88* mutations in cerebrospinal fluid from patients with CNS lymphomas. JCO Precis Oncol 2019 ; 3 : 1-3.
  - 6) Watanabe J, Natsumeda M, Kanemaru Y, et al : Comparison of circulating tumor DNA between body fluids in patients with primary central nervous system lymphoma. Leuk Lymphoma 2019 ; 60 : 3587-3589.
  - 7) On J, Natsumeda M, Watanabe J, et al : Low detection rate of H3K27M mutations in cerebrospinal fluid taken by lumbar puncture in newly diagnosed diffuse midline gliomas. Diagnostics 2021 ; 11 : 681.
  - 8) Shibuma S, On J, Natsumeda M, et al : Diagnosis of leptomeningeal disease in diffuse midline gliomas by detection of H3F3A K27M mutation in circulating tumor DNA of cerebrospinal fluid. Pediatr Blood Cancer 2025 ; 72 : e31535.