

ナノポア DNA メチル化シーケンスによる神経膠  
腫の術中悪性度診断

東京大学医学部附属病院

野村 昌志

## 【研究目的】

IDH 遺伝子変異を有する神経膠腫(astrocytoma 及び oligodendroglioma)は、その組織学的悪性度により grade 2 (低悪性度)から grade4(高悪性度)に分類される。組織診断時に低悪性度腫瘍であっても、数年の経過で必ず高悪性度腫瘍へと変貌を遂げる予後不良の疾患である。最近の大規模臨床試験により同腫瘍に対する IDH 変異阻害剤の高い治療効果が示された(Mellinghoff et al., *NEJM*, 2024)。また研究代表者らが主導した最近の研究により同阻害剤が腫瘍細胞を分化誘導することにより増殖抑制効果を示すことを明らかにした (Spitzer†, Gritsch†, Nomura†, *Cancer Cell*, 2024)。IDH 変異阻害剤は本邦でも承認となり、IDH 変異腫瘍治療の主軸となっていくことが見込まれる。IDH 変異阻害剤による腫瘍縮小効果は低悪性度の症例にみられるため、腫瘍の悪性度がわかれば、それに応じた手術戦略が可能であるが、術中病理組織診断では悪性度の決定までには至らないのが一般的である。IDH 変異神経膠腫の悪性度診断の手法として、DNA メチル化情報が有用であることが近年の研究で明らかになってきた。IDH 変異神経膠腫はゲノム全体の高メチル化(G-CIMP: Glioma CpG island Methylator Phenotype)を示すことが知られているが、研究代表者らは、同腫瘍の悪性化に伴い広範なメチル化の低下が見られることを過去の研究により明らかにしている (Nomura et al., *Sci Rep.*, 2019)。そこで本申請研究では、ナノポアシーケンスを利用し、手術中に短時間で IDH 変異神経膠腫の G-CIMP 領域のメチル化の度合いを測定し、その悪性度を予測する手法を確立することを目的とする。

## 【方法と結果】

IDH 変異神経膠腫の悪性化に伴う低メチル化が過去の研究により示されているが、これらは DNA メチル化アレイによる研究である。そこで、まずナノポアシーケンスによる比較的疎な DNA メチル化データでも同様にこれが検出できるかを探索することとした。研究代表者が過去にメチル化アレイにより悪性度分類を行ったコホートから 12 例を抽出し、これらの検体からナノポアシーケンスデータを取得した。高悪性度群、低悪性度群で DNA メチル化データを比較すると、ナノポアシーケンスデータにおいても低悪性度群で優位に DNA メチル化が低いことが明らかになった。特に差が大きく見られる領域を抽出し、DNA メチル化により IDH 変異神経膠腫の悪性度スコアを作成した。ついでこれを術中に測定する手法を確立することとした。従来臨床検体から DNA を抽出する場合、組織融解ステップを含めて 4 時間程度を要していたが、このステップに改良を加えることにより、手術により採取された生検体から 30 分程度で DNA 抽出が可能となった。術中解析の汎用性を考えポケット型ナノポアシーケンサーである MinION MK1D シーケンサーを採用することとし、40 分程度でナノポアライブラリーが調整可能となった。最近の脳腫瘍の術中 DNA メチル化解析の論文で開発された機械学習の手法(Vermeulen et al., *Nature*, 2023)を取り入れ、メチル化分類により IDH 変異神経膠腫の術中診断が可能となった。さらに本研究で開発したナノポアシーケンサーによるメチル化スコアをリアルタイムに測定するプログラムにより術中測定すると、シーケンス開始から 20 分程度で悪性度スコアはプラトーに達することが明らかになり、術中に短時間で IDH 変異神経膠腫の悪性度を連続値として測定することが可能となった。

## 【考察と今後の展望】

本研究では術中にナノポアシーケンスにより得られる DNA メチル化データを利用して IDH 変異神経膠腫の悪性度を評価する手法を確立した。ナノポアシーケンサーはリアルタイムにデータ取得ができるというメリットがあるが、短時間で取得されるデータは疎であり、遺伝子変異の検出など、特定のゲノムポジションの評価にはさらなる改良が必要と言える。一方、IDH 変異神経膠腫の悪性化に伴う低メチル下は広範囲に生じるイベントであり、薄いデータ量であっても評価が可能であり、短時間シーケンスでプラトーに達したと考えられた。本研究成果は今後、IDH 変異阻害剤の効果を術中に予測する指標の一つとなりうる。今後前向きに症例を積み重ねていき、術中に測定される悪性度スコアと、最終病理診断、臨床的予後、IDH 変異阻害剤の治療反応性などとの比較等を進めていく予定である。