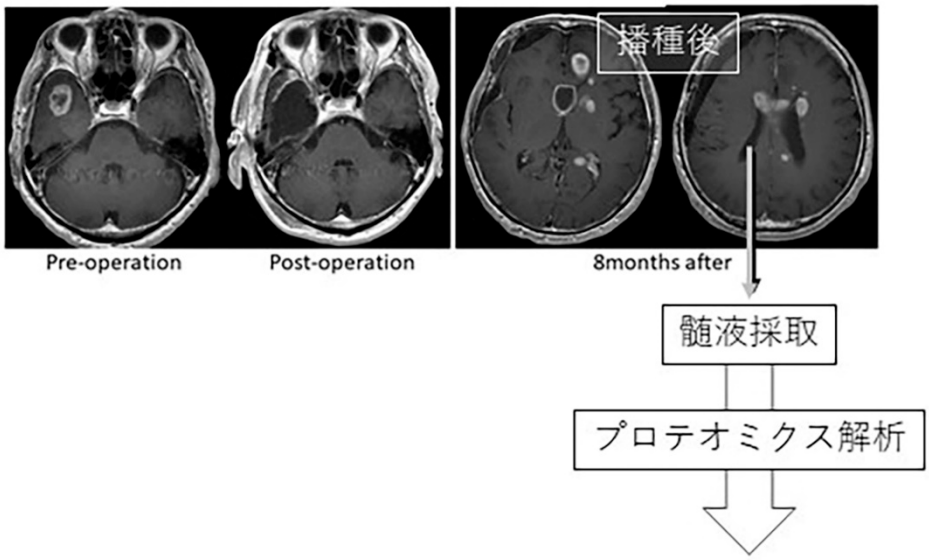
62　膠芽腫髄液を用いたプロテオミクスによる播種病態解明	柴原　一陽

【目的】膠芽腫は脳原発悪性腫瘍で、5 年生存率 10%未満、全生存期間中央値 14 か月と予後不良の疾患である。無再発生存期間は 7〜9 か月とされ、局所再発または原発巣と異なる遠隔部に再発する播種再発を認める。本研究の目的は、膠芽腫の予後不良の一因である播種病態に関与する因子をプロテオミクス解析で明らかにすることである。

【方法】播種病態に髄液が関与すると想定し、膠芽腫播種後髄液を対象試料とした。プロテオミクス解析は、本学理学部附属疾患プロテオミクスセンターとの共同研究で行い、使用した質量分析計は Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific) ベンチトップ型四重極フーリエ変換ハイブリッド質量分析計であった。初めに、非膠芽腫例の髄液を用いて、髄液を用いたプロテオゲノミクス解析が可能かどうかの予備実験を行った。続いて安定供給できる膠芽腫培養細胞の上清を用いたプロテオゲノミクス解析を行い、最後に、膠芽腫播種後髄液を用いた解析を行った。

【結果】非膠芽腫例の髄液を用いた予備実験ではわずか 10 μL の髄液から 768 種類のタンパクを同定することが可能で、分泌タンパクが 367 種類、膜タンパクが 179 種類含まれていた。培養上清を用いた解析は、血清培地と無血清培地の 2 通りを行い、血清培地 10 μL から 206 種類のタンパクの同定に成功した。無血清培地に関してはまだ動態が安定せず再検討している。そして、膠芽腫播種後髄液 4 検体を用い、同様に 10 μL から 939 種類のタンパク同定が可能であった。特に、非膠芽腫例の髄液の結果を比較対象とすると、45 種類が $p<0.1$ で膠芽腫播種後髄液に特徴的であった。

播種再発を呈した膠芽腫症例の経時的 MRI 及び研究シェーマ



62. 膠芽腫髄液を用いたプロテオミクスによる播種病態解明

柴原　一陽

北里大学 医学部 脳神経外科

Key words：膠芽腫，髄液，播種，プロテオミクス，再発

緒　言

膠芽腫は脳原発の悪性腫瘍で、手術、放射線化学療法を施行しても、5 年生存率 10%未満、全生存期間中央値 14 か月、無再発生存期間は 7～9 か月、と予後不良の疾患である。予後不良の原因は多岐にわたるが、その一つに播種がある。図 1 の様に、初回再発の 80%は初回摘出腔周囲に再発する局所再発であるが（図 1 上段）、残りの 20%に初回腫瘍局在と連続しない遠隔部へ再発する播種再発（図 1 下段）がある。現在、この播種という病態には有効な治療法がなく、治療撤退の最大の原因となる。我々は、これまでこの播種病態に注目した解析を行い、播種に関連する臨床及び分子学的因子を明らかにしてきたが［1～3］、網羅的な解析ができていない。国内外を見ても、膠芽腫播種病態を明らかにした報告はなく、その機序は全くわかっていない。故に、播種病態を明らかにし、播種制御が可能となれば、究極的には膠芽腫を局所に抑え込み、局所制御のみを標的とすればよいことになる。

本研究の目的は、播種を呈した膠芽腫の髄液を対象試料とし、プロテオミクス解析により播種関連因子の網羅的探索を行い、播種病態の基礎的知見を得ることである。

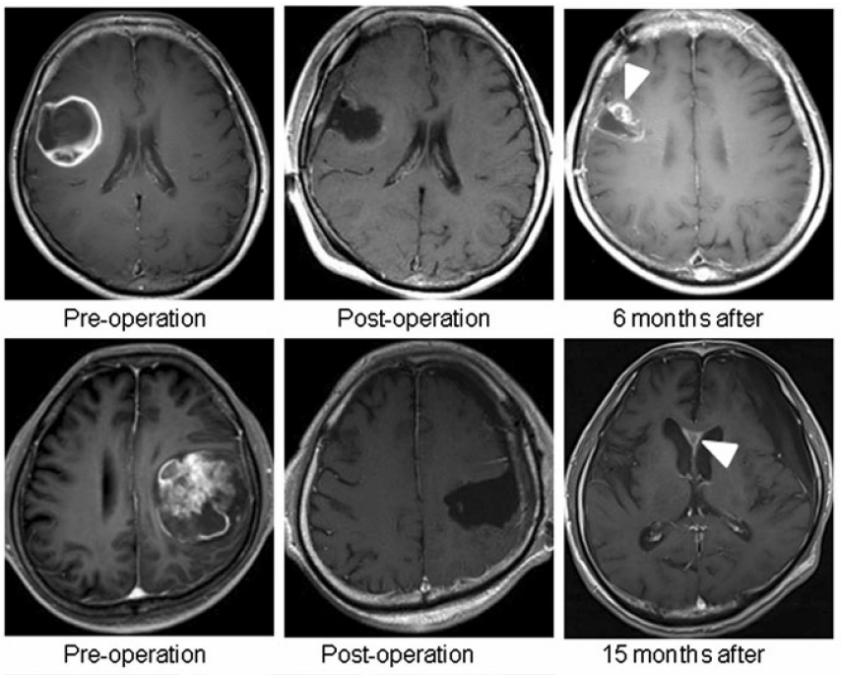


図 1. 再発形式の代表症例

上段：局所再発 右前頭葉膠芽腫（左図）を全摘出（中央）したが、摘出腔周囲に再発。

下段：播種再発 左頭頂葉膠芽腫（左図）を全摘出（中央）し、原発巣と連続しない遠隔部に再発。

（Shibahara et al., Neuro Oncol 2013［2］のFigureより）

方　法

本研究は、北里大学医学部倫理委員会ヒトゲノム研究審査の承認を得た上で行っている（G19-03）。癌の転移は血行性やリンパ行性に起こるとされている。一方で、膠芽腫の播種は、脳を満たす髄液を介して起こっているとされる。本研究では、診療及び治療の一貫で採取された播種再発を呈した後の膠芽腫患者の髄液を研究試料とした。即ち、膠芽腫の播種病態を解明する手掛かりが、この播種後の髄液に存在すると仮定した。

1. 質量分析計

用いた出量分析計は、Q-Exactive（Thermo Fisher Scientific）ベンチトップ型四重極フーリエ変換ハイブリッド質量分析計または、質量分析部に高分解能な Orbitrap を使用した高分解能質量分析計（Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific）である。Q-Exactive は、溶媒流速 300 nL/min の超低流速 LC（Easy-nLC 1000, Thermo Fisher Scientific）と組み合わせて使用した。LC の分析カラムとして Nano HPLC capillary Column、C18 0.075×125 mm analytical column（日京テクノス）を使用した。

2. 髄液を用いたプロテオミクス解析の基盤構築

ヒト髄液を対象としたプロテオミクス解析は一般化しておらず、予備実験として水頭症や虚血性脳疾患など膠芽腫と別疾患の症例の髄液を用いた研究を行った。PTS 試薬 20 μL に髄液 10 μL を加えて、1 試料あたり 30 μL（210 μg）として酵素消化した後、遠心して上清を試料として回収した。その後、逆相 C18 担体をピペットマンのチップの先に詰めたチップ（Stage Tip）を用いて脱塩処理を行った。脱塩処理後の試料を凍結乾燥して、20 μL で再溶解して Liquid Chromatography Mass Spectrometry（LC-MS）試料とした。

3. 培養細胞上清を用いたプロテオミクス解析

髄液の他に、安定供給できる培養細胞を用いたプロテオミクス解析を並行して行った。膠芽腫細胞株には、無血清培地で浮遊細胞として培養できる膠芽腫幹細胞株と、血清培地で接着細胞として培養できる膠芽腫非幹細胞があり、細胞株には U87 と A172 を用いた。2 での方法と同様に、10 μL の血清培地の上清を用いて LC-MS 試料とした。

4. 膠芽腫播種後髄液を用いたプロテオミクス解析

膠芽腫症例で、播種を呈した後の髄液を用いたプロテオミクス解析を行った。2 での方法と同様に、10 μL の髄液を用いて LC-MS 試料とした。

結　果

1. 髄液を用いたプロテオミクス解析の基盤構築

4 種類の非膠芽腫症例の髄液を用いて LC-MS 解析を行った。わずか 10 μL という少量の髄液を用いて、768 種類のタンパクを同定することが可能であった。そのうち、分泌タンパクが 367 種類、膜タンパクが 179 種類含まれていた。表 1 に 4 種類の髄液いずれにおいても高カバレッジで同定されたタンパクを列挙した。Albumin に加えて、補体など免疫関連のタンパクも同定された。

表 1. 非膠芽腫例の髄液を対象試料とした LC-MS 解析結果：上位 10 個のタンパクを列記

Serum albumin	Complement C4-A
Serotransferrin	Immunoglobulin gamma-1 heavy chain
Alpha-1-antitrypsin	Alpha-2-macroglobulin
Complement C3	Fibronectin
Complement C4-B	Immunoglobulin heavy constant gamma 3

2. 培養上清を用いたプロテオミクス解析

無血清培地と血清培地の上清をプロテオミクス解析の試料とした。培地そのものをコントロールとして、血清培地 10μL の少量から 206 種類のタンパクを同定できた。U87 及び A172 のいずれからも同定されたタンパクを 5 つ挙げると、Plasminogen activator inhibitor 1、Vimentin、Clusterin、Extracellular matrix protein 1、Collagen alpha-2(I) chain であった。無血清培地でも同様に解析を行ったが、結果が安定せず、再検討が必要であった。

3. 膠芽腫播種後髄液を用いたプロテオミクス解析

膠芽腫播種後髄液を 4 検体用い、非膠芽腫髄液 4 検体と比較検討を行った。同様に 10μL とわずかな試料量で 939 種類のタンパクを同定できた。コントロールである非膠芽腫髄液 4 検体と比較し、統計学的に $p<0.1$（t 検定）で膠芽腫播種後髄液から同定されたタンパクを 45 種類認めた。

考　察

髄液からのプロテオミクス解析は、広く行われている研究ではないため、最初のステップとして、そもそも髄液からプロテオミクス解析を行えるのか、という課題の解決に取り組んだ。膠芽腫播種後髄液は稀少試料であるため、非膠芽腫の髄液から研究を開始し、わずか 10μL の髄液から 700 種類を超えるタンパクの検出に成功した。並行して安定供給のできる膠芽腫培養細胞の上清を用いたプロテオミクス解析も始めた。こちらでも、10μL の少量の培養上清から 200 種類を超えるタンパクの同定が可能であった。以上から、プロテオミクスを用いた髄液研究が可能であることを示すことができた。

続いて、膠芽腫播種後髄液を用いたプロテオミクス解析を行い、非膠芽腫髄液と比較し、膠芽腫播種に特徴的なタンパクの検出が可能であった（データ未公表）。10μL とわずかな試料量で 939 種類のタンパクを同定でき、コントロールである非膠芽腫髄液 4 検体と統計学的に $p<0.1$ で膠芽腫播種後髄液に特徴的であったタンパクは 45 種類認めた。さらに、解析症例数を増やすことに加えて、髄液を用いたプロテオミクス解析の感度を上げることでさらに微量のタンパクの検出を行っている。そして、エクソソームやペプチドを対象とした解析も施行中である。本支援により、さらに mRNA 発現とタンパク発現の相関を得る解析にも着手することができ、同時進行で膠芽腫複数検体の RNA シーケンスを行い現在解析中である。The Cancer Genome Atlas（TCGA）から 170 例の膠芽腫の RNA シーケンスの fastq データをダウンロードして比較対象として解析を進め、膠芽腫播種検体の RNA 発現の特徴と、プロテオゲノミクス解析の結果との統合解析を行い、播種病態解明のための研究を精力的に進めている。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者である、北里大学理学部附属疾患プロテオミクスセンターセンター長／理学部物理学科物性物理学講座生体分子物性ユニット教授の小寺義男先生及び同研究室講師の松井崇先生に感謝申し上げます。本研究に支援して下さった上原記念生命科学財団に心より感謝申し上げます。また本研究支援中に、神経膠腫の病態解明に繋がる 2 編の論文［4，5］を発表致しましたので、この場をもって御礼申し上げます。

文　献

1） Shibahara I, Saito R, Osada Y, Kanamori M, Sonoda Y, Kumabe T, Mugikura S, Watanabe M, Tominaga T (2019) Incidence of initial spinal metastasis in glioblastoma patients and the importance of spinal screening using MRI. J Neurooncol 141:337-345. doi:10.1007/s11060-018-03036-4

2） Shibahara I, Sonoda Y, Saito R, Kanamori M, Yamashita Y, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Watanabe T, Ishioka C, Tominaga T (2013) The expression status of CD133 is associated with the pattern and timing of primary glioblastoma recurrence. Neuro Oncol 15:1151-1159. doi:10.1093/neuonc/not066

3) Shibahara I, Sonoda Y, Shoji T, Kanamori M, Saito R, Inoue T, Kawaguchi T, Yamashita Y, Watanabe T, Kumabe T, Watanabe M, Suzuki H, Tominaga T (2015) Malignant clinical features of anaplastic gliomas without IDH mutation. Neuro Oncol 17:136-144. doi:10.1093/neuonc/nou112
4) Shibahara I, Miyasaka K, Sekiguchi A, Ishiyama H, Inukai M, Yasui Y, Watanabe T, Sato S, Hide T, Kumabe T (2021) Long-term follow-up after BCNU wafer implantation in patients with newly diagnosed glioblastoma. J Clin Neurosci 86:202-210. doi:10.1016/j.jocn.2021.01.037
5) Shibahara I, Sato S, Hide T, Saito R, Kanamori M, Sonoda Y, Tominaga T, Kumabe T (2021) Postcentral gyrus resection of opercular gliomas is a risk factor for motor deficits caused by damaging the radiologically invisible arteries supplying the descending motor pathway. Acta Neurochir (Wien). doi:10.1007/s00701-021-04737-y