

博士論文

膠芽腫における *PIK3CA* 遺伝子変異の
臨床的意義についての考察

田 中 將 太

内容

I.	要旨.....	5
II.	序文.....	6-16
	A. 神経膠腫および膠芽腫の疫学・病理.....	6
	B. 膠芽腫の治療・予後.....	7
	C. 膠芽腫に見られる主な遺伝子異常.....	7
	D. 癌治療における分子標的薬.....	10
	E. 癌における PI3 キナーゼ経路の亢進と <i>PIK3CA</i> 遺伝子変異.....	11
	F. 膠芽腫に対する PI3 キナーゼ阻害薬の開発.....	14
	G. 神経膠腫における遺伝子型と表現型.....	15
III.	目的.....	17
IV.	方法.....	18-28
	A. MGH 症例を対象とした研究.....	18-24
	i. 対象患者.....	18
	ii. チャートレビュー.....	18
	iii. クリニカルシーケンス.....	19
	iv. 予後解析.....	22
	v. 画像評価.....	23
	B. 公開データベースを利用した検証.....	24
	C. 当院症例を利用した検証.....	25-27

i.	対象患者.....	25
ii.	チャートレビュー.....	25
iii.	<i>PIK3CA</i> 遺伝子のサンガーシーケンス.....	25
iv.	予後解析・画像評価.....	27
D.	統計解析.....	27
E.	倫理的配慮.....	28
V.	結果.....	29-63
A.	MGH 症例を対象とした研究.....	29-51
i.	対象患者.....	29
ii.	クリニカルシーケンス.....	30
iii.	予後解析.....	33
iv.	初発膠芽腫において <i>PIK3CA</i> 変異が予後に与える影響...	36
v.	<i>PIK3CA</i> 変異を有する初発膠芽腫の臨床的特徴.....	44
vi.	<i>PIK3CA</i> 変異を有する初発膠芽腫の放射線学的特徴.....	46
B.	公開データベースを利用した検証.....	51-55
C.	当院症例を利用した検証.....	56-63
i.	対象患者.....	56
ii.	遺伝子解析.....	57
iii.	予後解析.....	58
iv.	<i>PIK3CA</i> 変異を有する初発膠芽腫症例の経過.....	62
VI.	考察.....	64-69

VII.	結語.....	70
VIII.	引用文献.....	71-87
IX.	謝辞.....	88

I. 要旨

細胞の増殖や遊走に関連するホスファチジルイノシトール 3 キナーゼ経路は、膠芽腫の大多数の症例で異常亢進していることが知られる。一部の症例では *PIK3CA* 遺伝子の活性化型変異を認めるが、その臨床的意義は未だ不明であった。マサチューセッツ総合病院で分子診断を受けた成人初発膠芽腫 157 症例の後方視的検討、公共データベースである TCGA グループの膠芽腫症例および当院の膠芽腫症例での検証では、*PIK3CA* 変異を有する症例は再発までの期間が短く予後不良であった。若年で発症しやすいものの、多発・神経膠腫症様・髄液播種といった広範な腫瘍進展を来しての発症が多く、それが早期再発に関係している可能性がある。

II. 序文

A. 神経膠腫および膠芽腫の疫学・病理

脳腫瘍は原発性脳腫瘍と転移性脳腫瘍に分けられ、2006-2010 年の米国脳腫瘍統計 CBTRUS によると、原発性脳腫瘍の発生頻度は人口 10 万人につき年間 21 人であった[1]。また本邦では、熊本県の 1989-2008 年の発生頻度調査で、原発性脳腫瘍の発生頻度は人口 10 万人につき年間 14.1 人であった[2]。

神経膠腫 glioma は原発性脳腫瘍の中で髄膜腫と並んで最も頻度の高い腫瘍であり、本邦の脳腫瘍全国統計 2001-2005 年によると、神経膠腫は原発性脳腫瘍の 25.6%を占めた[3]。そのうち膠芽腫 glioblastoma は神経膠腫の約半分を占め、本邦で膠芽腫の年間発生数は人口 10 万人につき約 2 人と推測される。なお、米国脳腫瘍統計では、人口 10 万人につき年間 3.19 人であった[1]。

神経膠腫は脳を構成する細胞の一つ、グリア細胞を起源とする腫瘍の総称で、星細胞腫系、乏突起膠腫系、上衣腫系などに分類される。また、組織学的悪性を示す指標として WHO 分類によるグレードが一般に広く使われており、星細胞腫系の中で最も悪性の高い（グレード IV）ものが膠芽腫である。神経膠腫は一般に浸潤性の高い腫瘍であり、悪性の高いものほど急速に増大し圧排性にも発育するようになる。それにより、頭蓋内圧亢進症状として頭痛、嘔気・嘔吐、霧視、また局所神経脱落症状として麻痺、感覚障害、言語障害、視野障害など、そしててんかん発作といった、多彩な症状を呈し発見に至る。

B. 膠芽腫の治療・予後

初発膠芽腫の標準治療は、安全かつ最大限の外科的摘出と、それに続くテモゾロミドによる化学療法を併用した放射線療法である（Stupp レジメンと称される）[4]。腫瘍の高い浸潤性と脳機能温存の観点から手術のみで完全に摘出することがほぼ不可能なため、後療法が必要不可欠となる。再発腫瘍には、抗血管新生薬であるベバシズマブが使用されることが多い[5, 6]。

上記治療を以てしても膠芽腫患者の全生存期間（overall survival, OS）は14.6 か月（中央値）に過ぎず、予後不良である[4]。また前述の脳腫瘍全国統計 2001-2004 では、5 年生存割合は約 10%であった[3]。予後規定因子として広く知られているのは、年齢・カルノフスキーパフォーマンスステータス（Karnofsky performance status, KPS）スコア・手術摘出度である[7, 8]。実際に、大規模な膠芽腫データの再帰分割分析から得られた Recursive partitioning analysis 分類では、年齢・KPS スコア・摘出度・神経症状が変数として採択されている[9]。

C. 膠芽腫に見られる主な遺伝子異常

神経膠腫・膠芽腫の発生・増殖は様々な遺伝子異常の蓄積によってもたらされる。膠芽腫の遺伝子異常として早くから注目されてきたのは *EGFR* 遺伝子である[10]。上皮成長因子受容体（Epidermal growth factor receptor, EGFR）は細胞膜貫通型の受容体型チロシンキナーゼで、上皮成長因子を認識し細胞内にシグナル伝達を行う。癌において *EGFR* 遺伝子の変異や増幅により発現が亢

進し、腫瘍細胞の増殖などに関与する。膠芽腫では約 40-50%に *EGFR* 増幅が認められることが知られている[10, 11]。

その他 *CDKN2A* 欠損や *TP53*・*PTEN* 遺伝子変異などが膠芽腫に見られる遺伝子異常として早くから知られていたが、多数の遺伝子異常の関連性を大規模遺伝子解析にて初めて明らかにしたのが、The Cancer Genome Atlas (TCGA) プロジェクトである[11, 12]。図 1 にあるように膠芽腫では、*EGFR* など膜タンパクに始まる細胞内シグナル伝達に関与する RTK/RAS/PI3K 経路、細胞老化や細胞死に関与する p53 経路、細胞分裂周期に関与する RB 経路における遺伝子異常が複数同時に見られることが明らかになった。

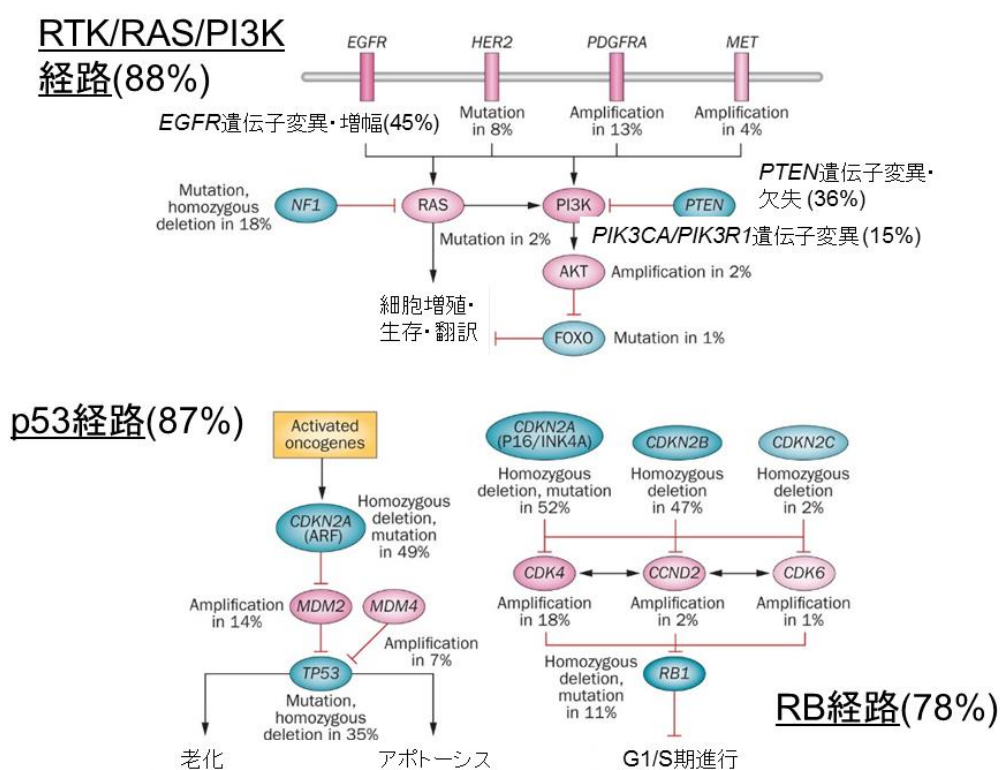


図 1 膠芽腫に見られる遺伝子異常のまとめ（文献[11, 13]を改変）

膠芽腫の標準治療に含まれるテモゾロミドは経口アルキル化剤であり、DNA にメチル基を付与することで DNA 複製を阻害する作用を持つ。DNA 修復酵素 MGMT (O⁶-メチルグアニン DNA メチル基転移酵素) はテモゾロミドにより付与されたメチル基を除去するため、テモゾロミドの効果発現を減弱する[14]。MGMT 遺伝子の発現がその上流のプロモーター領域のメチル化で抑制されている症例では、MGMT のタンパク発現も低くテモゾロミドの効果が高い、すなわち MGMT プロモーターメチル化はテモゾロミドの効果予測因子であると考えられた[15]。放射線単独治療群でもメチル化の有無により予後に差が見られたため、現在では予後因子とも捉えられている[16]。

神経膠腫に見られる遺伝子異常として最大の発見は、TCGA プロジェクトと同年の 2008 年に報告された IDH1 遺伝子変異である[17]。IDH1 はイソクエン酸デヒドロゲナーゼの一つで、イソクエン酸を α -ケトグルタル酸に変換する酵素である。当初は膠芽腫の一部で見られる IDH1 をコードする遺伝子 IDH1 (132 番アルギニン) の点突然変異として報告されたが[17]、続報では IDH1 変異は原発性膠芽腫では 5%程度と稀で、むしろ低悪性度神経膠腫とそれらが悪性転化した続発性膠芽腫において、IDH1 の相同遺伝子である IDH2 (172 番アルギニン) の変異も含めて高頻度に見られると報告された[18]。変異 IDH タンパクは本来の産物である α -ケトグルタル酸から別の代謝産物 2-ヒドロキシグルタル酸を産生し[19]、これが癌代謝産物としてヒストン脱メチル化酵素の阻害によりヒストン修飾の異常を[20]、あるいは DNA 脱メチル化酵素の阻害により広範

な DNA メチル化の異常を引き起こすことで[21, 22]、腫瘍化を惹起すると考えられている。膠芽腫を含めた悪性神経膠腫において、*IDH1/2* 変異は強力な予後良好因子であることが知られている[18]。

近年の遺伝子解析技術の進歩により神経膠腫の分子遺伝学的知見が蓄積されるにつれ、神経病理医の見立てによるため診断の不一致をみやすい従来の組織診断に加え、客観性の高い遺伝子解析による分子診断を取り入れることの重要性が認識されるようになり[23]、2016 年 WHO 脳腫瘍分類の改訂においてそれらの「統合診断」という概念が導入された[24]。神経膠腫においては前述の *IDH1/2* 変異と、乏突起膠腫系に特徴的な遺伝子異常として知られる染色体 1p19q 共欠失[25]が、正式な病理診断に必須となった。

D. 癌治療における分子標的薬

近年の癌治療の成績は、分子標的薬の開発・臨床応用により飛躍的に向上した。分子標的薬とは標的となる腫瘍細胞の特定の分子に作用して効果を発揮する薬剤で、低分子化合物と抗体医薬との 2 種類がある。癌領域で臨床応用されてきたのは主に低分子化合物で、従来からある細胞傷害性の抗癌剤と比べ副作用が少ないという利点がある。

2001 年 *Bcl-Abl* 融合遺伝子を有する慢性骨髄性白血病、*KIT* 遺伝子変異を有する消化管間質腫瘍に対するチロシンキナーゼ阻害薬イマチニブが認可を受けて以来[26]、様々な癌腫で多岐にわたる作用機序の分子標的薬が開発され、臨床試験を経て認可を受けてきた。概して分子標的薬は、一つの癌腫の中で全症

例に有効なわけではなく、その薬剤の標的分子に異常を来たした症例において強い効果を示す。*EGFR* 変異を有する非小細胞肺癌に対するゲフィチニブ・エルロチニブ[27, 28]、*BRAF* 変異を有する悪性黒色腫に対するベムラフェニブ[29]などがその代表である。特筆すべきは *EML4-ALK* 融合遺伝子を有する非小細胞肺癌に対するクリゾチニブで、同融合遺伝子の保有率は約 5%にすぎないものの、それらの症例においては進行期であっても奏効率 65%と、従来の化学療法の 20%を大きく上回る[30, 31]。

そして肺癌など癌腫によっては、遺伝子異常に応じて治療薬を選択するテーラーメイド癌治療、あるいはプレシジョン・メディシンが現実的になってきた[32]。その際に必須となるのが、癌腫によらず癌関連遺伝子を網羅的に、しかも比較的短期間に検索可能な遺伝子パネル検査である。本研究で用いた SNaPshot（後述）はその先駆的存在であり[33]、また 10000 人以上の患者に適用し、様々な遺伝子変異の癌腫による頻度を報告した MSK-IMPACT も、その一例である[34]。

E. 癌における PI3 キナーゼ経路の亢進と *PIK3CA* 遺伝子変異

細胞増殖に関わる主な細胞内シグナル伝達経路には、phosphatidylinositol-3 (PI3) キナーゼ経路と mitogen-activated protein (MAP) キナーゼ経路とがある。図 2 に示すように PI3 キナーゼには、細胞膜の構成分子であるイノシトールリン脂質をリン酸化してホスファチジルイノシトール 3,4,5-三リン酸にする作用がある。これにより細胞膜に遊走されたプロテ

インキナーゼ B (Akt と呼ぶ) は、mammalian target of rapamycin complex 2 (mTORC2)により活性化され、そのキナーゼ活性によって mTORC1 など多数の分子を活性化あるいは不活性化することで、細胞内シグナル伝達を行う。

PI3 キナーゼは 3 つのクラスに分類され、クラス I がシグナル伝達において重要な役割を果たす。そのうちクラス IA は触媒サブユニット p110 α , β , δ からなり、制御サブユニットである p85 α などと結合している (図 2)。

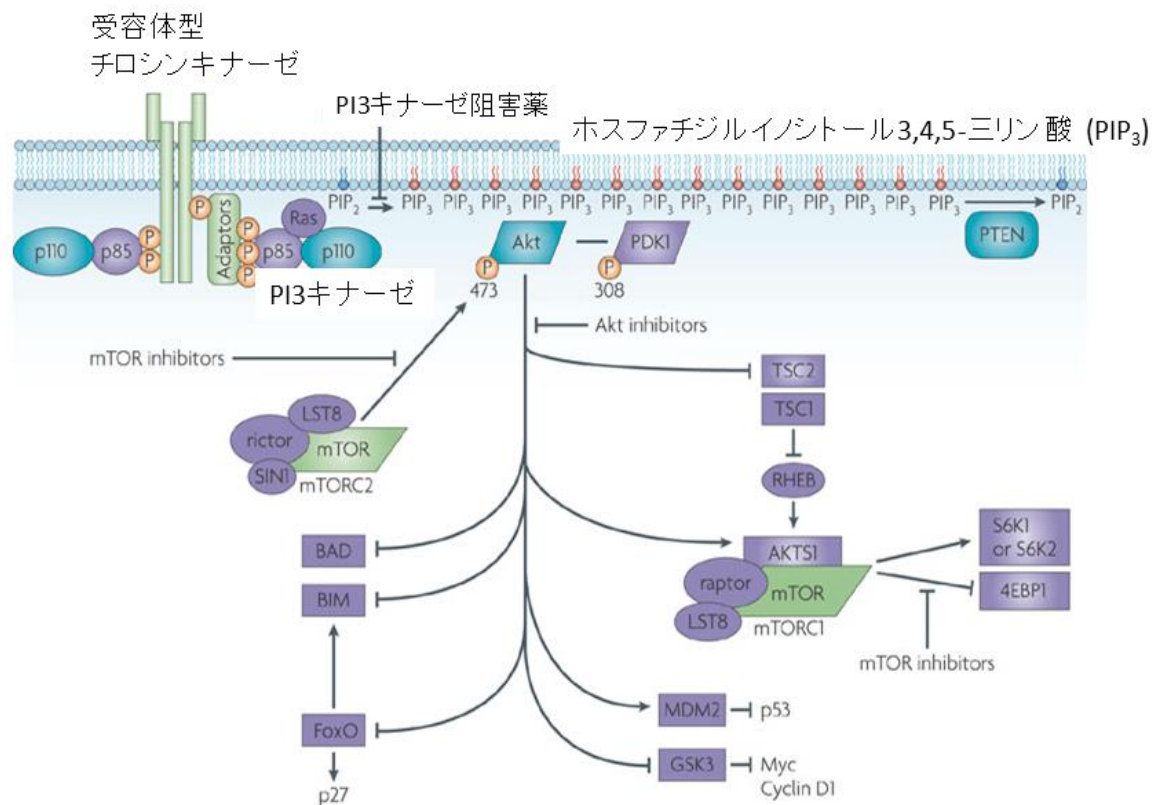


図 2 PI3 キナーゼ経路 (文献[35]を改変)

癌において、様々な遺伝子の異常が契機となって細胞内シグナル伝達が恒常的に活性化し、細胞が無限増殖能を獲得して腫瘍化する。PI3 キナーゼ経路の

亢進は癌細胞の増殖・生存に働くと報告され[35, 36]、さらには癌細胞の遊走・浸潤・転移にも関わるとの報告もある[36-38]。p110 α をコードする phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*) 遺伝子の活性化型変異により、上流のシグナルの有無に関わらずクラス IA PI3 キナーゼが活性化されていることが、乳癌・大腸癌・前立腺癌・子宮内膜癌など様々な癌腫において報告されている[35]。そして *PIK3CA* 変異の約 80%は、キナーゼドメインあるいはヘリカルドメインのホットスポットの点突然変異である[39] (図 3)。膠芽腫においては、6-15%に *PIK3CA* 変異が見られることが知られている[11, 40, 41]。In vitro において、*PIK3CA* 変異が膠芽腫を含め癌の細胞増殖や浸潤を促進するという報告が多く見られる[42-44]。

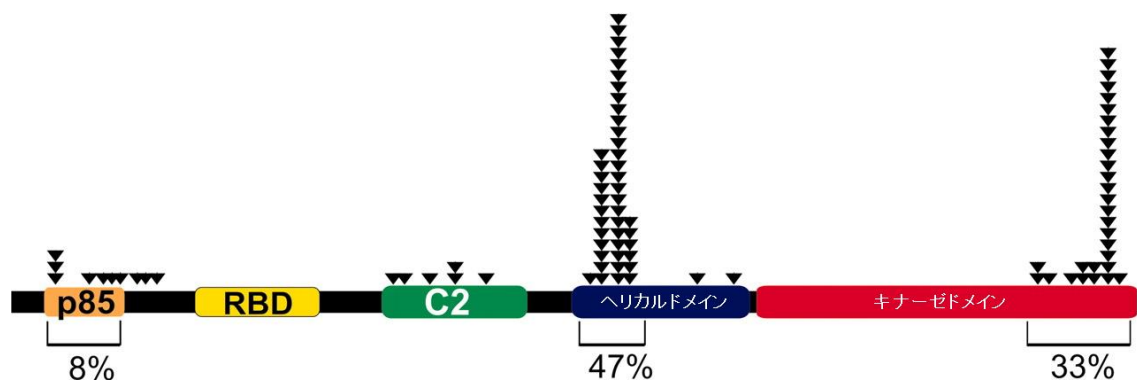


図 3 癌における *PIK3CA* 変異 (文献[39]を改変)

なお、制御サブユニット p85 α をコードする *PIK3R1* 遺伝子に機能喪失型変異が起こることでも PI3 キナーゼ経路が亢進することが知られており[36, 44, 45]、膠芽腫においては約 10%に見られる[11]。

F. 膠芽腫に対する PI3 キナーゼ阻害薬の開発

他癌腫を追従する形で膠芽腫に対しても、分子標的薬を中心として新規治療の開発が盛んに行われてきた。図 4 に挙げているものはその一部である。TCGA プロジェクトで膠芽腫において高頻度に遺伝子異常が見られることが明らかになった受容体型チロシンキナーゼと PI3 キナーゼ経路をターゲットとした薬剤が多い。

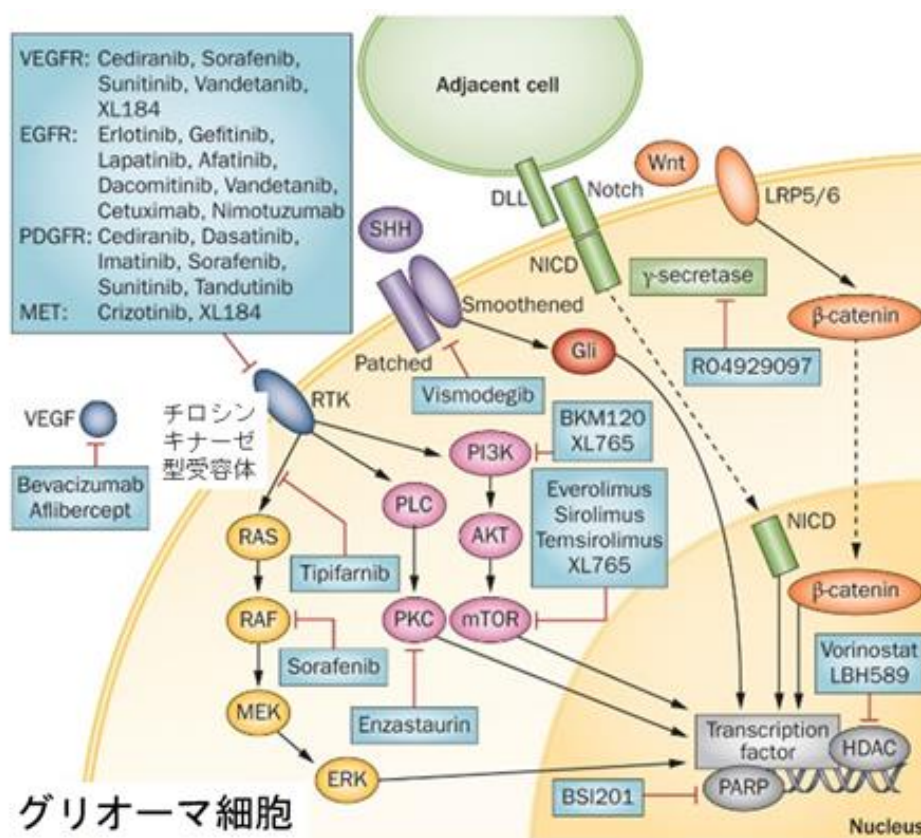


図 4 膠芽腫を対象に臨床試験が行われた分子標的薬の例（文献[13]を改変）

PI3 キナーゼ阻害薬[46]の一例として、PX-866 は経口汎 PI3 キナーゼ阻害薬であるが、再発膠芽腫に対する臨床試験において残念ながら効果は殆ど見られず、同経路への依存が特に強いと考えられる *EGFR* 変異、*PTEN* 変異、*PIK3CA* 変異、*PIK3R1* 変異と効果との相関はなかった[47]。また、*EGFR* 遺伝子増幅、*PTEN* 遺伝子変異／欠失、*PIK3CA* 変異のある再発膠芽腫のみを対象とした PI3 キナーゼ阻害薬ブパリシブ（BKM120）の臨床試験（NCT01339052）も、耐容性はよいものの効果が見られなかった。PI3 キナーゼとともにその下流の mTORC1/2 を同時に阻害するボクスタリシブ（XL765）は、第 I 相試験を終え耐容性は問題なかった（NCT01240460）。

多くの臨床試験が企画・遂行されながら承認に至った薬剤がない理由として、血液脳関門の透過性、毒性ゆえの不十分な用量、クロストークによる他の経路の代償的活性化、腫瘍内不均一性、などが考えられる[46]。さらに対象設定の問題である可能性もあり、理論的には標的となる遺伝子異常を有する患者群のみを選定すれば、奏効率が向上するものと期待される。

G. 神経膠腫における遺伝子型と表現型

神経膠腫の分子生物学的理解が深まり、ある遺伝子異常を有する症例に特徴的な臨床像が知られている。例えば前述の *IDH1/2* 変異を有する膠芽腫は、若年に多く前頭葉に発生しやすいことが報告されている[48]。またヒストンタンパクをコードする遺伝子 *H3F3A* や *HIST1H3B* に変異を有する神経膠腫は、小児や若年成人に多く正中部に好発する[49]。しかし、遺伝子型と表現型の関連が

未だ明確になっていないものも多く、それらを新たに見出すことができれば神経膠腫の病態への理解がさらに深まり、正確な分子診断、治療の最適化、新規治療の開発につながるものと期待される[50, 51]。

例えば肺癌において、前述の *EML4-ALK* 融合遺伝子陽性の症例は約 5%にすぎないが、若年女性の非喫煙者に多く、肺野末梢に発生する腺癌に多いことが明らかになっており、合致する臨床像を呈した症例で重点的に遺伝子解析を行うことにより、陽性症例を高頻度に見出すことが可能である[30]。

ひるがえって膠芽腫においては、*PIK3CA* 遺伝子変異は比較的高頻度に認められる遺伝子異常であるにも関わらず、同変異を有する症例が呈することの多い臨床像、予後に与える影響については未だ殆ど明らかになっていない。

III. 目的

膠芽腫において *PIK3CA* 遺伝子変異は約 10%に見られる遺伝子異常であるが、同変異を有する膠芽腫の臨床的特徴を詳細に検討した報告は殆ど見られない。そこで本研究では、米国主要施設の大規模な症例シリーズを研究対象として、初発膠芽腫において *PIK3CA* 活性型変異が有する臨床的意義について検討することを目的とした。具体的には、野生型に比して変異型には、発症年齢や腫瘍部位においてどのような特徴が見られるのか、予後に差異が見られるのかなどについて検討した。さらに公共データベースや当院症例など複数の独立したデータセットを用いて、検証を行った。

IV. 方法

A. MGH 症例を対象とした研究

i. 対象患者

2009 年 12 月から 2012 年 6 月の間にハーバード大学医学部・マサチューセッツ総合病院 (Massachusetts General Hospital, MGH) (米国ボストン) にて分子診断を受けた成人膠芽腫患者、連続 184 症例について、後方視的検討を行った。上記症例のうち、KPS スコアが 60 (自分に必要なことはできるが時々介助が必要な状態) 以上で、標準治療である放射線療法併用テモゾロミド化学療法 (Stupp レジメン) [52] で治療しえた初発膠芽腫患者、157 症例を研究対象とした。グレード II/III 神経膠腫の既往歴のある続発性膠芽腫の症例は除外した。

ii. チャートレビュー

電子カルテにて病理レポートを参照し、病理診断が膠芽腫であることを確認した。患者に関する情報 (年齢・性別・KPS スコア・発症形態等) および腫瘍に関する情報 (左右・部位等) を抽出した。また治療歴として、ベバシズマブなどの化学療法の有無を抽出した。

手術における摘出度に関しては、手術記載に加え術前術後の MRI 画像にて確認し、造影 T1 画像における造影病変の摘出を全摘出、それ以下を部分摘出とした。穿頭による定位的腫瘍生検術または開頭による腫瘍生検術は生検とした。

iii. クリニカルシーケンス

分子診断として、SNaPshot アッセイ、蛍光 in situ ハイブリダイゼーション (fluorescence in situ hybridization, FISH)、メチル化特異的 PCR (methylation-specific PCR, MSP) の結果を抽出した。これらは、腫瘍検体のホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed paraffin-embedded, FFPE) 標本を用いて、米国臨床検査室改善法 (Clinical Laboratory Improvement Amendment) に準拠した MGH Translational Research Laboratory にて行われた。

SNaPshot アッセイは、Applied Biosystems 社 (現 Thermo Fisher Scientific 社 (Waltham, Massachusetts, USA)) で開発された、多数の遺伝子変異が単一のポリメラーゼ連鎖反応 (polymerase chain reaction, PCR) で検出可能な遺伝子解析技術である [33]。汎用性を高めるため、複数の癌腫で共通して異常が見られる癌関連遺伝子 (癌原遺伝子および癌抑制遺伝子) を解析対象とし、本研究で使用された 2.0 版・3.0 版では 15 遺伝子 (*AKT1*, *APC*, *BRAF*, *CTNNB1*, *EGFR*, *HER2*, *IDH1*, *KIT*, *KRAS*, *MEK1*, *NOTCH1*, *NRAS*, *PIK3CA*, *PTEN*, *TP53*) に見られる 68 のホットスポット (表 1) の変異を、9 回のマルチプレックス塩基伸長反応にて検出していた。なお、*IDH2* および *PIK3R1* は当時のアッセイに含まれていなかった。

表 1 SNaPshot アッセイで検出される遺伝子変異（文献[33]を改変）

遺伝子	遺伝子座
AKT1	E17
APC	R1114, Q1338, R1450, T1556
BRAF	G466, G469, L597, V600
CTNNB1(β -catenin)	D32, S33, G34, S37, T41, S45
EGFR	G719, T790, L858, L861, E746_A750 deletion, Exon19 deletion, Exon20 insertion/deletion
HER2	E20 insertion
IDH1	R132
KIT	D816
KRAS	G12, G13, Q61
MEK1	Q56, K57, D67
NOTCH1	L1575, L1601
NRAS	G12, G13, Q61
PIK3CA	R88, E542, E545, Q546, H1047, G1049
PTEN	R130, R173, R233, K267
TP53	R175, G245, R248, R273, R306

SNaPshot アッセイの概略を図 5 に示す[33]。マルチプレックス PCR によりテンプレート DNA 増幅を行った後に、得られた PCR 産物を鋳型にしてホットスポットの部位の直前に 3' 末端が来るように設定したプライマーと 4 色の蛍光に標識した ddNTP を加えてマルチプレックス塩基伸長反応を起こし、蛍光ラベルされた産物を ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用い

てキャピラリー電気泳動で分離し、蛍光の色と移動度の違いを利用して変異判定を行うものである。

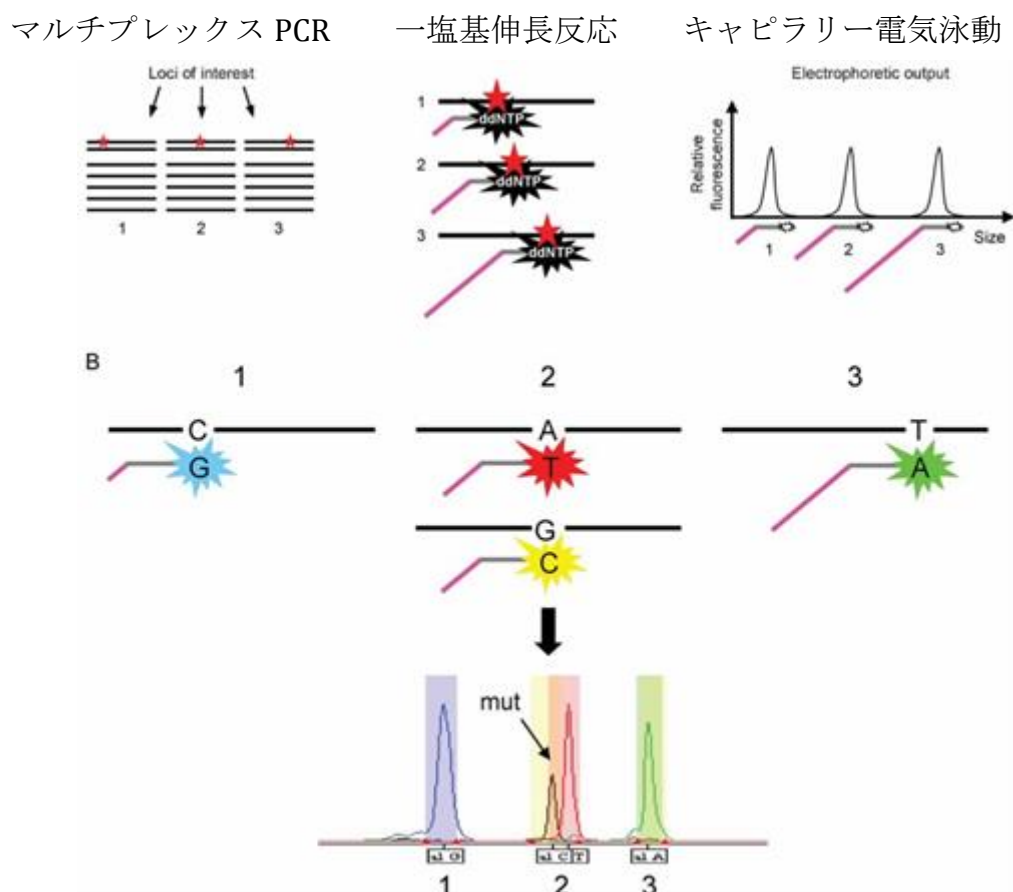


図5 SNaPshot アッセイの原理 (文献[33]を改変)

FISH では、epithelial growth factor receptor (*EGFR*)、mesenchymal-epithelial transition (*c-MET*)、platelet-derived growth factor receptor alpha (*PDGFRA*) の遺伝子増幅の有無が調べられた[53]。腫瘍検体の FFPE 標本から作製された 5 μ m 厚の未染スライドにて、CTD-2113A18 (染色体 7p の *EGFR*

遺伝子座) および CTB-13N12 (染色体 7q の *c-MET* 遺伝子座) を 7 番のセントロメアプローブ CEP7 (Abbott-Vysis) とともに、また RP11-58C6 (染色体 4q の *PDGFRA* 遺伝子座) を 4 番のセントロメアプローブ CEP4 (Abbott) とともに使用して、FISH が行われた。セントロメアをコントロールとした比が 2.0 以上で遺伝子増幅と判断された[53]。

MSP では、O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase (*MGMT*) のプロモーター領域のメチル化の有無を調べた[53]。未染スライドから標準的な手順で抽出された DNA をバイサルファイト処理することで、メチル化されていないシトシン (非メチル化シトシン) はウラシルに変換される一方、メチル化シトシンは変換されないため、非メチル化 DNA とメチル化 DNA とで異なる塩基配列を持つことになる[54]。それぞれを検出するプライマーを用いて PCR を行い[55]、電気泳動で増幅の有無を検索した。

iv. 予後解析

本研究においては、「増悪」を以下のように定義した。

- 手術によって再発という病理診断がなされた
- 以下の二つ以上を満たした場合
 - ①放射線療法完遂後 3 か月以上経過して腫瘍の増大が見られた
 - ②腫瘍に関連した神経学的徴候の悪化が見られた
 - ③新規の治療が開始された

そして、初回手術日から増悪と判断された日または死亡日のうちの早い方までの期間を、無増悪生存期間 (progression-free survival, PFS) と定義した。増悪と判断されていない生存例では、最終無増悪生存確認日をもって打ち切りとした。

また、全生存期間 (overall survival, OS) は初回手術日から死亡日までの期間と定義した。生存例あるいは追跡不能例では、最終生存確認日をもって打ち切りとした。

予後規定因子を検討すべく、臨床情報や遺伝子情報を統合し、予後解析を行った (統計解析の項を参照のこと)。

v. 画像評価

全症例で MRI にて腫瘍評価を行った。腫瘍増大の判断には造影 T1 画像および T2 画像を用い、通常の効果判定基準として頻用される Macdonald 基準および Response Assessment in Neuro-Oncology (RANO) 基準に従った[56, 57]。

本研究において、「広域播種性病変 widespread disseminated disease」を下記のいずれかを満たした場合と定義した (図 6)。

-多発病変 multicentric lesions :

複数の病変が複数の葉にあるいはお互いに独立して存在し、
間に T2 変化が介在しない

-神経膠腫症様病変 gliomatosis-like lesions :

腫瘍がびまん性に脳幹・基底核を含む 3 つ以上の葉に存在する

-髄液播種病変 distant leptomeningeal lesions :

主病変とは別部位に髄液播種によると思われる別病変が存在する

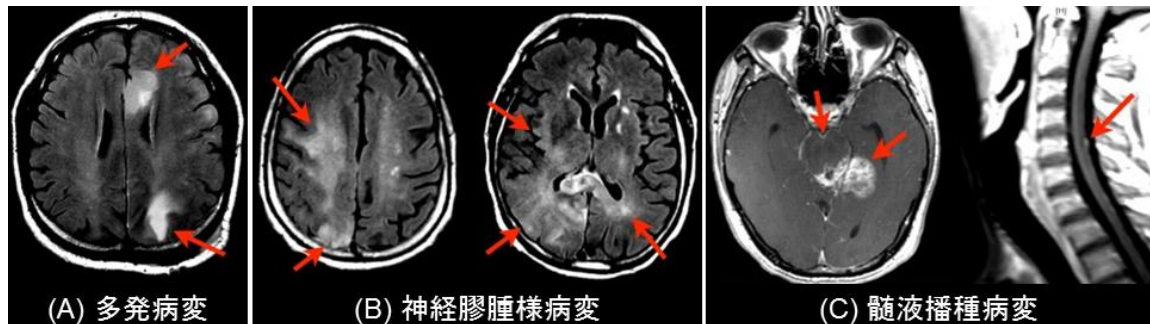


図 6 本研究における広域播種性病変の定義

B. 公開データベースを利用した検証

独立したデータセットを用いた検証として、TCGA プロジェクトとして行われた膠芽腫の大規模遺伝子解析研究[12]をデータベースとして、遺伝子変異を含めた臨床情報を cBioPortal からダウンロードした (<http://www.cbioportal.org>) [58, 59]。データベースは 2017 年 9 月 22 日の時点のものである。

PIK3CA 変異の有無と *PIK3R1* 変異の有無がともに判明している症例を抽出し、その他にデータベースから抽出可能であった遺伝子情報 (*IDH1* 変異・*MGMT* プロモーターメチル化) および臨床情報 (年齢・性別・KPS スコア) と併せ、A. と同様の基準を用いて予後解析を行った。

C. 当院症例を利用した検証

i. 対象患者

2016 年 1 月から 2017 年 12 月の間に当院にて手術治療を受けた膠芽腫患者、連続 27 症例を対象に、後方視的研究を行った。グレード II/III 神経膠腫の既往歴のある続発性膠芽腫の症例（1 例）は除外した。70 歳以上の高齢者の中には *MGMT* プロモーターメチル化に応じて放射線単独療法あるいはテモゾロミド単独療法で治療された患者も存在するため[60, 61]、テモゾロミド化学療法併用放射線療法を施行されていない症例（5 例）は除外した。なお、高齢者には 60Gy/30Fr の代わりに 40Gy/15Fr の寡分割照射が行われることが一般的なため[62]、そのような症例に関しては適格とした。そして、遺伝子解析に供する検体が取得できなかった症例（1 例）は除外し、計 20 症例を研究対象とした。

ii. チャートレビュー

電子カルテより、患者に関する情報（年齢・性別・KPS スコア・発症形態等）および腫瘍に関する情報（左右・部位等）を抽出した。手術における摘出度に関しては、A. と同様に全摘出・部分摘出・生検に分けた。また治療歴として、ベバシズマブなどの化学療法の有無を抽出した。

iii. *PIK3CA* 遺伝子のサンガーシーケンス

腫瘍凍結検体から DNA extraction kit (Qiagen) を用いてゲノム DNA の抽出を行った後、表 1 に示す既報のプライマー[39]、および DNA ポリメラーゼとし

て KOD FX (Toyobo)を用いて、ターゲット領域を PCR 増幅した。なお、*PIK3CA* 変異のサンガーシーケンスを上記の 10 種類（あるいは表 1）のプライマーで行ったのは、癌における *PIK3CA* 変異がホットスポットを有し、アダプター結合ドメインであるエクソン 1、ヘリカルドメインであるエクソン 9、キナーゼドメインであるエクソン 20 に多く（図 3）、また A. で使用した MGH で用いられている SNaPshot アッセイもエクソン 1, 9, 20 に存在するホットスポットを対象としているためである。また、膠芽腫において変異の報告が複数あるエクソン 4, 5, 7 も含めた[39]。PCR 条件は表 3 の通りとした。

表 2 *PIK3CA* 変異の検出に使用した PCR プライマー（文献[39]より）

	Forward primer	Reverse primer	Sequence primer
Ex 1-1	GTTTCTGCTTTGGGACAACCAT	CTGCTTCTTGAGTAACACTTACG	GATTCATCTTGAAGAAGTTGATGG
Ex 1-2	CTCCACGACCATCATCAGG	GATTACGAAGGTATTGGTTTAGACAG	ACTTGATGCCCAAGAATC
Ex 1-3	CCCCCTCCATCAACTTCTTC	GGTGTTAAAAATAGTTCCATAGTTTCG	CTCAAGAAGCAGAAAGGGAAG
Ex 4-1	TCTTGTGCTTCAACGTAAATCC	CGGAGATTGGATGTTCTCC	AAAATAATAAGCATCAGCATTTGAC
Ex 4-2	TCTCAACTGCCAATGGACTG	CGGAGATTGGATGTTCTCC	TTATTCCAGACGCATTTCCAC
Ex 5	TAGTGGATGAAGGCAGCAAC	TTGTAGAAATGGGGTCTTGC	TTTGAGTCTATCGAGTGTGTGC
Ex 7	GGGGAAAAAGGAAAGAATGG	TGCTGAACCAGTCAAACCTCC	TGAATTTTCTTTTGGGGAAG
Ex 9	GATTGGTTCTTTCCTGTCTCTG	CCACAAATATCAATTACAACCATTTG	TTGCTTTTCTGTAAATCATCTGTG
Ex 20-1	TGGGGTAAAGGGAATCAAAAG	CCTATGCAATCGGTCTTTGC	TGACATTTGAGCAAAGACCTG
Ex 20-2	TTGCATACATTCGAAAGACC	GGGGATTTTGTTTGTTTGT	TTGTTTTGTTTGTTTTTT

表 3 PCR 条件

Component	Volume	Final concentration
2x PCR buffer	10 μ L	1×
2mM dNTPs	4 μ L	0.4mM
20 μ M Forward primer	0.3 μ L	0.3 μ M
20 μ M Reverse primer	0.3 μ L	0.3 μ M
Template DNA	X μ L	Genomic DNA 50ng/20 μ L
PCR grade water	(5.2-X) μ L	
KOD FX (1.0U/ μ L)	0.2 μ L	0.2U/20 μ L
Total reaction volume	20 μ L	

PCR cycle			
94°C	2min		
98°C	10sec		
62°C	30sec	x35 cycles	
68°C	30sec		
68°C	7min		
4°C	∞		

次に 3%アガロースゲルにて電気泳動を行い、目的とする PCR 産物のバンドを切り出し、Gel extraction kit (Qiagen)にて PCR 産物の精製を行った。最後に、シーケンスプライマーを用い、ファスマック社に依頼して BigDye Terminator kit (Applied Biosystems)を用いてのシーケンス反応に続き、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)にて塩基配列解析を行った。

PIK3CA 変異が陽性であった場合には、それが体細胞変異であることを確認するため、同一患者の血液検体から DNA を収集し、同様にサンガーシーケンスを行い、腫瘍 DNA の結果と比較した。

なお、*IDH1/2* 変異は免疫組織染色あるいはサンガーシーケンス[18]、*MGMT* プロモーターメチル化は A. と同様に MSP にて解析を行った。

iv. 予後解析・画像評価

予後解析および画像評価は、A. と同様の基準を用いて行った。

D. 統計解析

連続変数に関する検定には等分散性を評価したうえでスチューデント t 検定あるいはウェルチの t 検定を、カテゴリー変数に関する検定にはフィッシャー正確確率検定を用いた。生存解析において、カプラン・マイヤー法により生存曲線を描画し、ログランク検定を用いて 2 群間の生存期間の比較を行った。ま

た再発および死亡のリスクに関して、単変量および多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて、イベント発生に関するハザード比 (hazard ratio, HR) および 95%信頼区間 (95% confidence interval, 95%CI) を算出した。多変量 Cox 比例ハザードモデルに用いる因子選択はステップワイズ法を用いて行い、 $p=0.25$ をカットオフとして決定した。その際に予め、多重共線性の観点から因子間の相関係数を求め、強い相関を示唆する因子が存在しないことを確認した。

統計ソフトとして JMP 11 Pro (SAS Institute Inc., Cary, North Carolina, USA) を用い、有意水準は $p<0.05$ とした。

E. 倫理的配慮

本研究の MGH 症例を用いた研究に関しては、MGH の Institutional Review Board (IRB) の審査・承認を受け、説明・同意が得られた患者のみを対象とした。

また、当院症例を用いた研究に関しては、本学ヒトゲノム・遺伝子解析研究倫理委員会の審査・承認を受けた、「脳腫瘍のゲノム・遺伝子解析とその臨床病理学的意義の解明」研究 (審査番号 G10028) の一部として行われた。研究参加への書面での同意が得られた患者のみを、本研究の対象とした。

V. 結果

A. MGH 症例を対象とした研究

i. 対象患者

標準的な Stupp レジメンで治療され、KPS スコアが 60 以上であった成人膠芽腫 157 症例が対象となった。患者および腫瘍の特徴を表 4 にまとめた。年齢中央値は 58 歳（範囲、23-85 歳）、91 例（58.0%）が男性であり、KPS スコア中央値は 90（範囲、60-90）であった。腫瘍の部位としては前頭葉が最多で（55 (35.0%) 例）、機能領域に腫瘍が存在するのは 44 例（28.0%）であった。

治療に関しては、造影病変の全摘出は 157 例中 69 例（43.9%）で達成されていた。生検は 21 例（13.4%）であった。後療法として、本シリーズの選択基準であることから全例で放射線療法およびテモゾロミドによる化学療法がなされていた。91 例（58.0%）で初発時あるいは再発時にベバシズマブが投与されていた。

表 4 初発膠芽腫 157 例の患者・腫瘍プロフィールと治療内容

	症例数(割合)または中央値(範囲)
患者	
年齢	58 (23-85)
男性	91 (58.0%)
KPSスコア	90 (60-100)
痙攣発症	56 (35.7%)
腫瘍	
前頭葉	55 (35.0%)
左側	87 (55.4%)
機能領域	44 (28.0%)
広域播種性病変	22 (14.0%)
多発病変	12 (7.6%)
神経膠腫症様病変	9 (5.7%)
髄液播種病変	1 (0.6%)
治療	
生検	21 (13.4%)
全摘出	69 (43.9%)
放射線療法	157 (100%)
化学療法	157 (100%)
テモゾロミド	157 (100%)
ベバシズマブ*	91 (58.0%)
* 初発時・再発時を問わない	

ii. クリニカルシーケンス

SNaPshot アッセイにて、*PIK3CA* 遺伝子の活性型変異 [63, 64] を 13 例 (8.3%) に認めた。その他の遺伝子変異として、*IDH1* 変異を 12 例 (7.6%) 、

TP53 変異を 11 例 (7.0%) に認めた。また、*MGMT* プロモーター変異を 50.4% (61/121 例)、*EGFR* 増幅を 44.4% (64/144 例) に認めた。クリニカルシーケンスの結果をまとめたものを表 5 に示す。また、症例毎に認められた遺伝子異常を並べたものが図 7 である。*PIK3CA* 変異を有する症例 13 例のうち、*EGFR* 増幅を認めたものが 2 例 (12 例中)、*PDGFRA* 増幅を認めたものが 1 例 (3 例中) あったが、その他の症例では本研究で調べられた範囲では同一経路内のその他の遺伝子異常を認めなかった。

表 5 初発膠芽腫 157 例のクリニカルシーケンスの結果

	症例数(割合)
SNaPshot	
<i>PIK3CA</i> 変異	13 (8.3%)
<i>IDH1</i> 変異	12 (7.6%)
<i>TP53</i> 変異	11 (7.0%)
<i>PTEN</i> 変異	3 (2.0%)
<i>EGFR</i> 変異	2 (1.3%)
<i>BRAF</i> 変異	2 (1.3%)
<i>KRAS</i> 変異	2 (1.3%)
遺伝子変異なし	118 (75.2%)
MSP	
<i>MGMT</i> プロモーターメチル化	61/121 (50.4%)
FISH	
<i>EGFR</i> 増幅	64/144 (44.4%)
<i>c-MET</i> 増幅	9/87 (10.3%)
<i>PDGFR</i> 増幅	9/41 (22.0%)

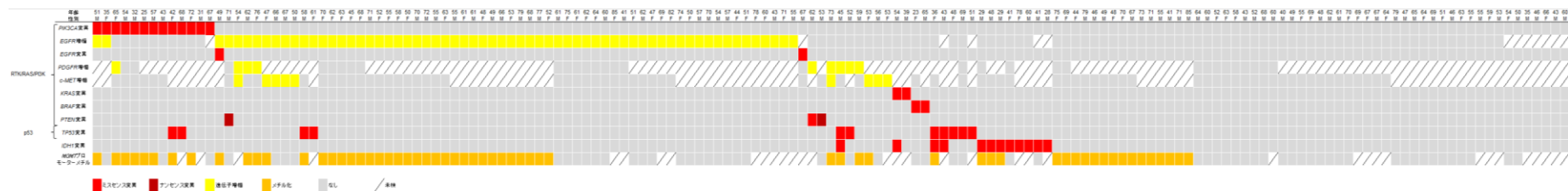


図 7 初発膠芽腫 157 例の遺伝子異常のまとめ

各列がそれぞれの症例を表し、各行が *PIK3CA* 変異をはじめ検出された遺伝子異常を表す

iii. 予後解析

20.9 か月（中央値）の追跡期間で、PFS 中央値は 11.9 か月、OS 中央値は 24.0 か月であった。膠芽腫における既知の予後規定因子として年齢・KPS スコア・全摘出が知られ[7, 8]、今回 MGH 症例においてもそれらは総じて予後と相関していた。年齢の中央値が 58 歳、平均値が 57.4 歳であったことから、年齢を 60 歳以上（75 例）と 60 歳未満（82 例）に分けてログランク検定を行うと、PFS・OS とも 60 歳以上で有意に短かった（PFS 中央値：10.7 か月 *vs.* 13.8 か月、 $p=0.01$ ；OS 中央値：21.6 か月 *vs.* 27.8 か月、 $p=0.02$ ）（図 8）。同様に、KPS スコアの中央値が 90（軽い臨床症状はあるが正常活動可能な状態）、平均値が 88.0 であったことから KPS スコアを 90 以上（113 例）と 80 以下（44 例）に分けてログランク検定を行うと、OS は KPS 90 以上で有意に長く（中央値 27.1 か月 *vs.* 19.1 か月、 $p=0.04$ ）、PFS でも長い傾向が見られた（中央値 13.8 か月 *vs.* 10.1 か月、 $p=0.08$ ）（図 9）。また、全摘出がなされた症例では有意に PFS が長かった（中央値 14.8 か月 *vs.* 10.5 か月、 $p=0.02$ ）（図 10）。なお、OS では有意差が見られなかった（ $p=0.11$ ）。

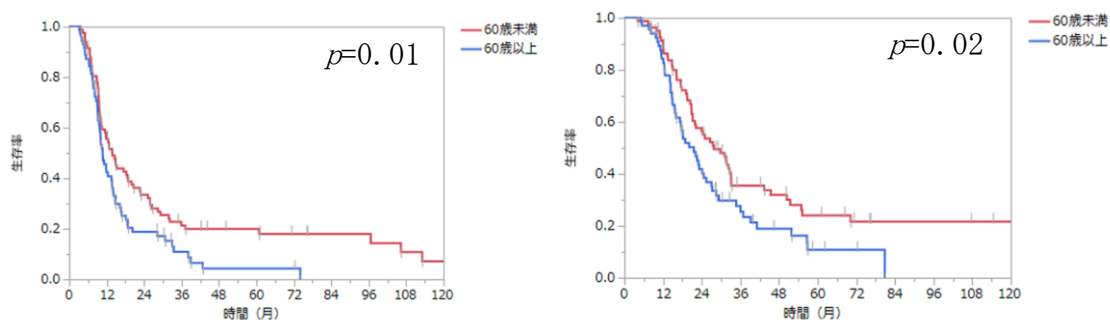


図8 年齢別の生存曲線（左：PFS、右：OS）

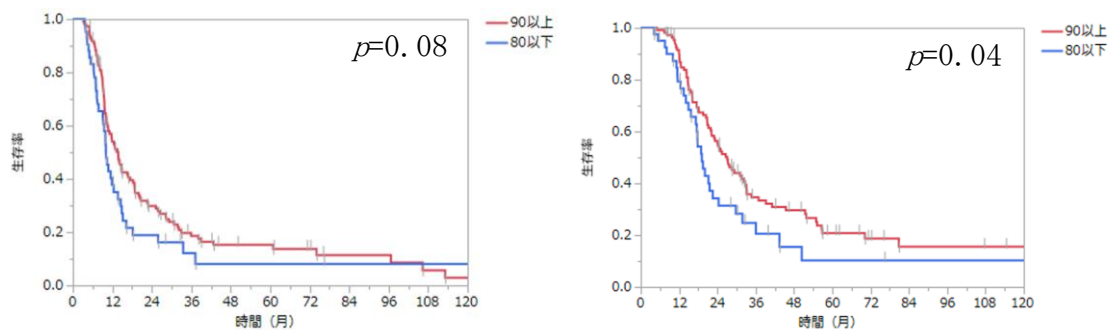


図9 KPS 別の生存曲線（左：PFS、右：OS）

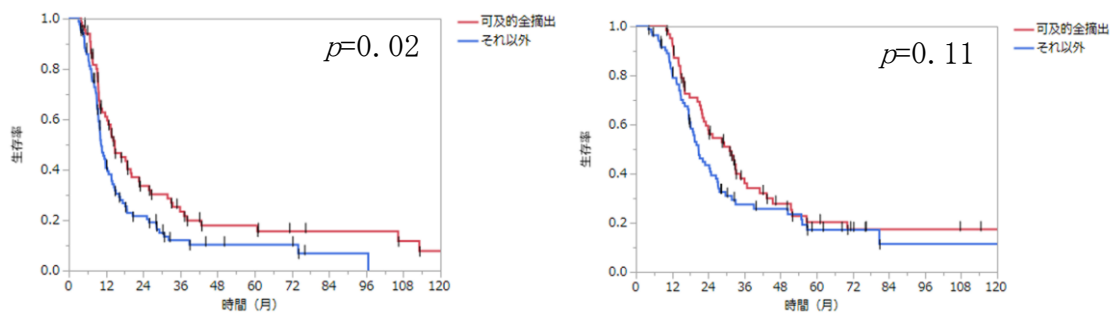


図10 摘出率別の生存曲線（左：PFS、右：OS）

膠芽腫の予後との相関が知られる *IDH1* 変異と *MGMT* プロモーターメチル化は [13, 65, 66]、MGH 症例においても予後との強い相関が見られた。*IDH1* 変異に関

しては、野生型症例に比べ変異型症例で PFS・OS とも有意に長かった（PFS 中央値：96.7 か月 *vs.* 11.1 か月、 $p<0.0001$ ；OS 中央値：未達 *vs.* 22.2 か月、 $p<0.0001$ ）（図 11）。*MGMT* プロモーターメチル化に関しても、非メチル化症例に比べメチル化症例で PFS・OS とも有意に長かった（PFS 中央値：18.3 か月 *vs.* 9.6 か月、 $p<0.0001$ ；OS 中央値：36.9 か月 *vs.* 17.5 か月、 $p<0.0001$ ）（図 12）。

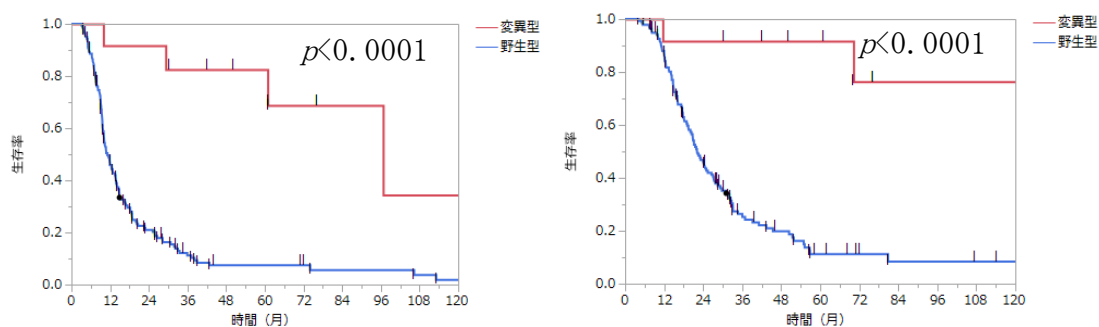


図 11 *IDH1* 変異別の生存曲線（左：PFS、右：OS）

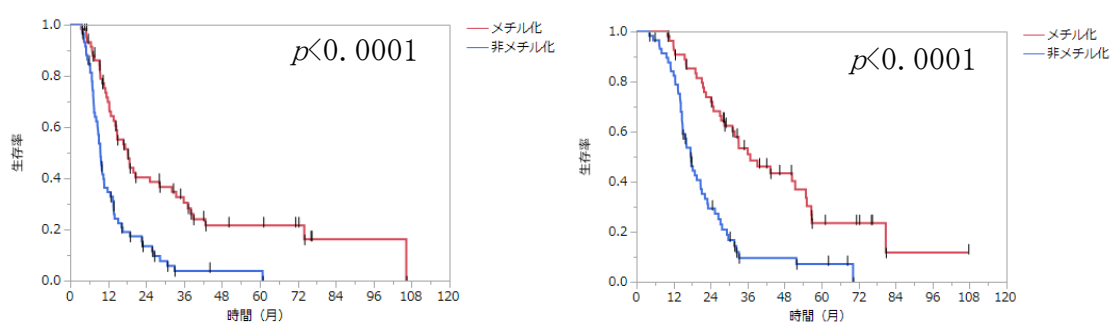


図 12 *MGMT* プロモーターメチル化別の生存曲線（左：PFS、右：OS）

以上の結果から、MGH 症例は単一施設でのシリーズではあるが、年齢・*IDH1* 変異・*MGMT* プロモーターメチル化等の膠芽腫において既知の予後規定因子が、実際に予後と相関していること、*MGMT* プロモーターメチル化や *EGFR* 遺伝子増幅の頻度が既報による頻度と類似していることから[15, 67]、一般的な膠芽腫のシリーズと大きな相違はないものと推察された。

iv. 初発膠芽腫において *PIK3CA* 変異が予後に与える影響

PIK3CA 変異が初発膠芽腫の予後に与える影響に関しては、図 13 に示すように、ログランク検定にて野生型に比べ変異型で PFS が有意に短かった（中央値 6.9 か月 vs. 12.4 か月、 $p=0.03$ ）。OS には有意な差が見られなかった（中央値 21.2 か月 vs. 24.2 か月、 $p=0.19$ ）。

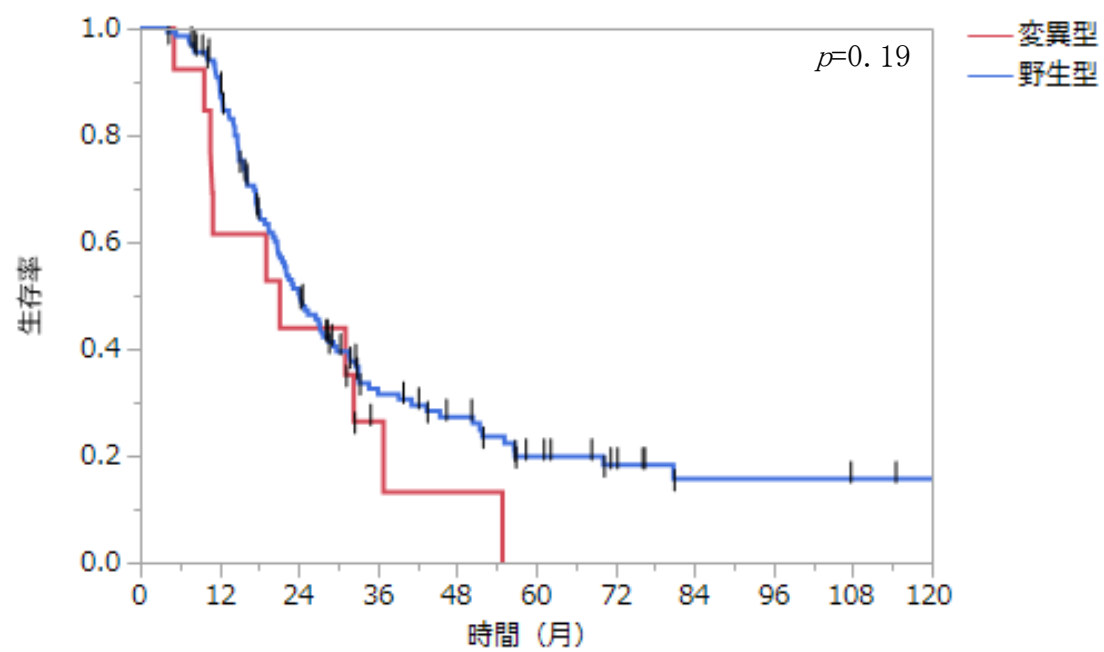
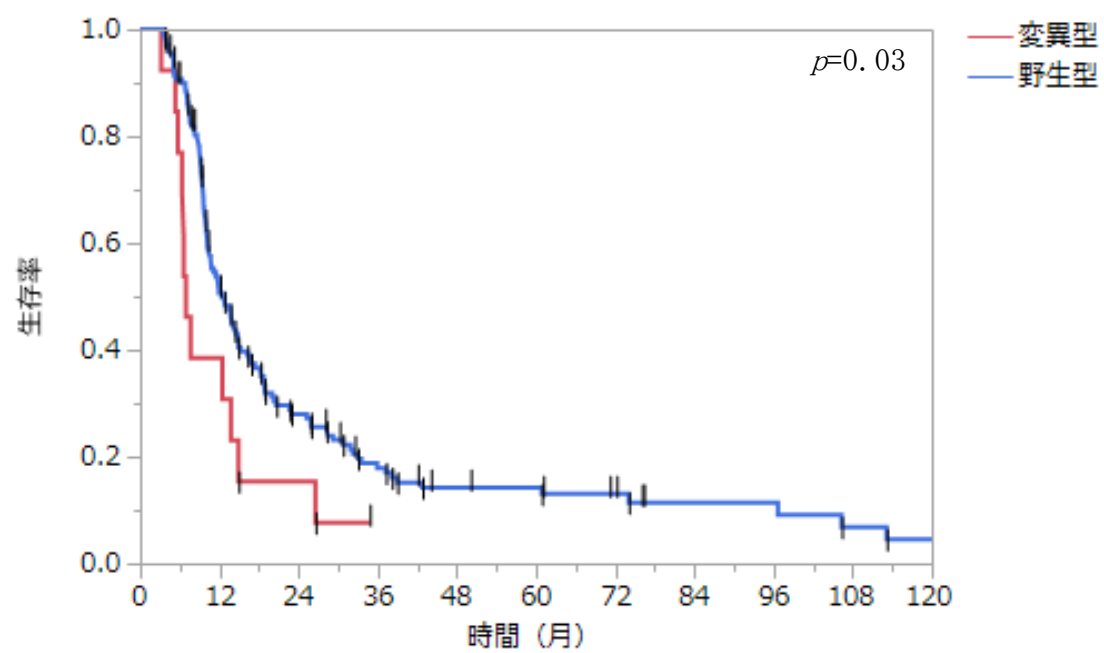


図 13 *PIK3CA* 変異別の生存曲線（上：PFS、下：OS）

ログランク検定で得られた *PIK3CA* 変異と予後との相関が、他の因子との交絡によるものでないことを検証するために、単変量および多変量 Cox 比例ハザードモデルを用いて PFS および OS のリスク因子に関する解析を行った。なお、ベバシズマブに関しては、初発時の使用と再発時の使用が区別されていないため、予後に与える影響の解釈が難しく、因子に含めなかった。

まず、因子間の相関係数を算出し、多重共線性の検討を行った（表 6）。年齢と KPS スコアにおいて、連続変数として扱った場合と二分変数として扱った場合との間に 0.8 を超える強い相関が見られたため、年齢および KPS スコアは連続変数のものを採用した。それ以外の因子には、中等度の相関を示唆する 0.4 以上の相関は見られなかった。

表 6 多重共線性の検討

		患者						腫瘍					治療		遺伝子異常			
		年齢(連続変数)	年齢(60歳以上vs.60歳未満)	男性	KPSスコア(連続変数)	KPSスコア(90以上vs.80以下)	痙攣発症	前頭葉	左側	機能領域	腫瘍内出血	広域播種性病変	生検	全摘出	PIK3CA変異	IDH1変異変異	MGMTプロモーターメチル化	EGFR増幅
患者	年齢(連続変数)	1	0.8162	-0.0688	-0.2561	0.1803	0.0612	0.0054	-0.0883	0.0204	0.2773	-0.0277	0.0539	-0.0293	0.2454	0.3688	-0.0341	-0.1554
	年齢(60歳以上vs.60歳未満)	0.8162	1	-0.0521	-0.2172	0.1142	0.0098	-0.0634	-0.0091	0.0251	0.2076	-0.0221	0.1195	-0.0029	0.1654	0.219	0.0231	-0.1061
	男性	-0.0688	-0.0521	1	-0.1888	0.1353	0.1275	-0.1657	-0.0617	-0.0243	-0.1397	0.1056	0.0287	-0.0122	0.0169	0.0442	0.0024	-0.151
	KPSスコア(連続変数)	-0.2561	-0.2172	-0.1888	1	-0.8242	-0.0933	0.0013	0.0714	0.1379	-0.0329	0.0193	0.1018	-0.1511	-0.1547	-0.125	-0.0828	0.0453
	KPSスコア(90以上vs.80以下)	0.1803	0.1142	0.1353	-0.8242	1	0.1403	0.0857	-0.1054	-0.132	0.0535	-0.0395	-0.1863	0.1603	0.0713	0.071	0.0656	-0.063
	痙攣発症	0.0612	0.0098	0.1275	-0.0933	0.1403	1	0.0346	0.0475	0.2007	0.1241	0.0604	0.014	0.0514	0.0958	0.1541	0.0941	-0.0926
腫瘍	前頭葉	0.0054	-0.0634	-0.1657	0.0013	0.0857	0.0346	1	-0.1306	0.0551	0.0461	-0.1172	0.0042	-0.1239	-0.1696	0.1443	0.0561	-0.1595
	左側	-0.0883	-0.0091	-0.0617	0.0714	-0.1054	0.0475	-0.1306	1	0.1337	0.0296	0.1022	0.2686	-0.0593	0.1808	-0.0795	0.2477	0.1468
	機能領域	0.0204	0.0251	-0.0243	0.1379	-0.132	0.2007	0.0551	0.1337	1	-0.0171	0.1543	0.3151	-0.2838	0.1077	-0.0437	0.1538	-0.0054
	腫瘍内出血	0.2773	0.2076	-0.1397	-0.0329	0.0535	0.1241	0.0461	0.0296	-0.0171	1	-0.1064	-0.0782	0.0595	0.1412	0.0783	0.0198	0.0595
	広域播種性病変	-0.0277	-0.0221	0.1056	0.0193	-0.0395	0.0604	-0.1172	0.1022	0.1543	-0.1064	1	0.2131	-0.1768	0.1699	-0.0857	0.0369	0.0877
治療	生検	0.0539	0.1195	0.0287	0.1018	-0.1863	0.014	0.0042	0.2686	0.3151	-0.0782	0.2131	1	-0.2465	0.1594	-0.063	-0.0116	0.0256
	全摘出	-0.0293	-0.0029	-0.0122	-0.1511	0.1603	0.0514	-0.1239	-0.0593	-0.2838	0.0595	-0.1768	-0.2465	1	0.0289	0.0998	0.0814	0.0342
遺伝子異常	PIK3CA変異	0.2454	0.1654	0.0169	-0.1547	0.0713	0.0958	-0.1696	0.1808	0.1077	0.1412	0.1699	0.1594	0.0289	1	-0.0711	0.1705	-0.1554
	IDH1変異変異	0.3688	0.219	0.0442	-0.125	0.071	0.1541	0.1443	-0.0795	-0.0437	0.0783	-0.0857	-0.063	0.0998	-0.0711	1	0.1452	-0.2116
	MGMTプロモーターメチル化	-0.0341	0.0231	0.0024	-0.0828	0.0656	0.0941	0.0561	0.2477	0.1538	0.0198	0.0369	-0.0116	0.0814	0.1705	0.1452	1	0.1157
	EGFR増幅	-0.1554	-0.1061	-0.151	0.0453	-0.063	-0.0926	-0.1595	0.1468	-0.0054	0.0595	0.0877	0.0256	0.0342	-0.1554	-0.2116	0.1157	1

表 7 に示すように、単変量解析で PFS と有意な相関が見られた因子は、年齢 ($p=0.0004$, HR 1.03 [95%CI 1.01-1.04])、痙攣発症 ($p=0.009$, HR 0.60 [95%CI 0.40-0.87])、広域播種性病変 ($p=0.003$, HR 2.15 [95%CI 1.31-3.38])、全摘出 ($p=0.02$, HR 0.65 [95%CI 0.45-0.92])、*IDH1* 変異 ($p<0.0001$, HR 0.14 [95%CI 0.04-0.33])、*MGMT* プロモーターメチル化 ($p<0.0001$, HR 0.38 [95%CI 0.25-0.57]) であった。なお、*PIK3CA* 変異に関しては $p=0.051$ 、HR 1.91 [95%CI 1.00-3.33] であった。また OS に関しては、年齢 ($p=0.0004$, HR 1.03 [95%CI 1.01-1.05])、KPS スコア ($p=0.0047$, HR 0.98 [95%CI 0.96-1.00])、痙攣発症 ($p=0.04$, HR 0.65 [95%CI 0.42-0.98])、広域播種性病変 ($p=0.005$, HR 2.20 [95%CI 1.29-3.57])、*IDH1* 変異 ($p<0.0001$, HR 0.09 [95%CI 0.02-0.30])、*MGMT* プロモーターメチル化 ($p<0.0001$, HR 0.32 [95%CI 0.20-0.50]) が有意であった。*PIK3CA* 変異に関しては $p=0.22$ 、HR 1.52 [95%CI 0.76-2.71] であった。

上記の単変量解析にて $p<0.25$ の因子を用いて、ステップワイズ法により因子選択を行ったところ、PFS に関しては年齢・痙攣発症・全摘出・*PIK3CA* 変異・*IDH1* 変異・*MGMT* プロモーターメチル化、OS に関しては年齢・KPS スコア・*PIK3CA* 変異・*IDH1* 変異・*MGMT* プロモーターメチル化が選択された。

これらを用いて多変量解析を行うと、PFS を規定する因子として年齢 ($p=0.004$, HR 1.03 [95%CI 1.01-1.05])、痙攣発症 ($p=0.01$, HR 0.58 [95%CI 0.37-0.89])、*PIK3CA* 変異 ($p=0.007$, HR 3.06 [95%CI 1.39-6.17])、

IDH1 変異 ($p=0.003$, HR 0.10 [95%CI 0.01-0.51])、*MGMT* プロモーターメチル化 ($p<0.0001$, HR 0.31 [95%CI 0.20-0.49]) が抽出され、また OS を規定する因子として年齢 ($p=0.002$, HR 1.03 [95%CI 1.01-1.05])、*PIK3CA* 変異 ($p=0.04$, HR 2.35 [95%CI 1.03-4.87])、*IDH1* 変異 ($p=0.01$, HR 0.15 [95%CI 0.01-0.72])、*MGMT* プロモーターメチル化 ($p<0.0001$, HR 0.27 [95%CI 0.16-0.43]) が抽出された。

以上をまとめると、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析にて初発膠芽腫における予後規定因子として、年齢・*IDH1* 変異・*MGMT* プロモーターメチル化といった既知の因子と並んで *PIK3CA* 変異が挙げられ、しかも HR が 2 を超える強力な予後規定因子であることが明らかになった。

表 7 初発膠芽腫の予後規定因子に関する単変量解析・多変量解析

PFS	単変量解析		多変量解析	
	p値	ハザード比 (95%信頼区間)	p値	ハザード比 (95%信頼区間)
患者				
年齢(連続変数)	0.0004*	1.03 (1.01-1.04) ^{\$}	0.004*	1.03 (1.01-1.05) ^{\$}
男性	0.63	1.09 (0.77-1.56)		
KPSスコア(連続変数)	0.1	0.98 (0.97-1.00) ^{\$}		
痙攣発症	0.009*	0.60 (0.40-0.87)	0.01*	0.58 (0.37-0.89)
腫瘍				
前頭葉	0.12	0.75 (0.51-1.08)		
左側	0.96	0.99 (0.70-1.41)		
機能領域	0.9	0.97 (0.65-1.43)		
広域播種性病変	0.003*	2.15 (1.31-3.38)		
治療				
生検	0.16	1.46 (0.85-2.40)		
全摘出	0.02*	0.65 (0.45-0.92)	0.1	0.71 (0.47-1.07)
遺伝子異常				
<i>PIK3CA</i> 変異	0.051	1.91 (1.00-3.33)	0.007*	3.06 (1.39-6.17)
<i>IDH1</i> 変異	<0.0001*	0.14 (0.04-0.33)	0.003*	0.10 (0.01-0.51)
<i>MGMT</i> プロモーターメチル化	<0.0001*	0.38 (0.25-0.57)	<0.0001*	0.31 (0.20-0.49)
<i>EGFR</i> 遺伝子増幅	0.48	1.14 (0.79-1.64)		

^{\$} 単位ハザード比 * 有意水準: $p < 0.05$

OS	単変量解析		多変量解析	
	p値	ハザード比(95%信頼区間)	p値	ハザード比(95%信頼区間)
患者				
年齢(連続年齢)	0.0004*	1.03 (1.01-1.05) ^{\$}	0.002*	1.03 (1.01-1.05) ^{\$}
男性	0.97	0.99 (0.68-1.47)		
KPSスコア(連続変数)	0.047*	0.98 (0.96-1.00) ^{\$}	0.22	0.99 (0.96-1.01) ^{\$}
痙攣発症	0.04*	0.65 (0.42-0.98)		
腫瘍				
前頭葉	0.41	0.85 (0.56-1.26)		
左側	0.9	1.03 (0.70-1.51)		
機能領域	0.94	0.98 (0.62-1.51)		
広域播種性病変	0.005*	2.20 (1.29-3.57)		
治療				
生検	0.25	1.41 (0.77-2.41)		
全摘出	0.11	2.20 (1.29-3.57)		
遺伝子異常				
PIK3CA変異	0.22	1.52 (0.76-2.71)	0.04*	2.35 (1.03-4.87)
IDH1変異	<0.0001*	0.09 (0.02-0.30)	0.01*	0.15 (0.01-0.72)
MGMTプロモーターメチル化	<0.0001*	0.32 (0.20-0.50)	<0.0001*	0.27 (0.16-0.43)
EGFR遺伝子増幅	0.67	1.09 (0.73-1.63)		

^{\$} 単位ハザード比 * 有意水準: $p < 0.05$

v. *PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫の臨床的特徴

13 例に見られた *PIK3CA* 遺伝子変異は R88 が 4 例、542-546 が 4 例、H1047 が 5 例であった。それらの臨床情報と予後データを表 8 に示す。

変異型の膠芽腫の臨床的特徴を野生型と比較したところ、表 9 に示すように、若年に有意に多く見られた ($p=0.02$)。 *IDH1* 変異や *MGMT* プロモーターメチル化との有意な相関は見られなかった。また、*EGFR* 増幅との有意な相関も見られなかったものの、*PIK3CA* 変異は *EGFR* 増幅がない症例に多く見られる傾向があった ($p=0.07$)。図 7 にあるように、*EGFR* の他にも図 1 の RTK/RAS/PI3K 経路に属する遺伝子異常が多く検出されたが、*PIK3CA* 変異を有する症例 13 例の中で異常は 3 例のみであったのに対し、野生型の 144 例の中では 75 例に異常を認めており ($p=0.08$)、本研究においては相互排他的な傾向にあった。

表 8 *PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫の症例リスト

症例	年齢	性別	発症形態	摘出度	KPSスコア	<i>PIK3CA</i> 変異	<i>MGMT</i> プロモーター	<i>IDH1</i> 変異	<i>EGFR</i> 遺伝子増幅	その他	PFS (月)	OS (月)
1	67	男	多発	部分摘出	90	H1047R	非メチル化	野生型	未検	<i>TP53</i> R248W	6.3	9.7
2	68	男	神経膠腫症様	生検	90	R88Q	未検	野生型	なし		3.2	5.1
3	31	男	髄液播種	生検	90	H1047R	未検	野生型	なし		6.6	10.9
4	42	女	単発	部分摘出	100	R88Q	メチル化	野生型	なし	<i>TP53</i> R273C	12.4	54.9
5	72	女	単発	全摘出	90	R88Q	メチル化	野生型	なし		5.3	10.6
6	35	女	多発	全摘出	90	Q546R	非メチル化	野生型	あり		26.6	32.4
7	25	男	多発	生検	80	R88Q	メチル化	野生型	なし		6.9	19.1
8	65	女	単発	全摘出	100	Q546K	メチル化	野生型	なし		7.6	36.9
9	43	男	単発	部分摘出	90	E545K	非メチル化	野生型	なし		5.7	11
10	32	男	単発	部分摘出	100	H1047R	メチル化	野生型	なし		13.8	17.7*
11	54	男	単発	全摘出	100	E542K	メチル化	野生型	なし		34.8*	34.8*
12	57	男	神経膠腫症様	生検	80	H1047Y	メチル化	野生型	なし		6.6	21.2
13	51	男	単発	全摘出	100	H1047R	メチル化	野生型	あり		14.9	31.1

* 最終無増悪生存確認日・最終生存確認日をもって打ち切り

表 9 *PIK3CA* 変異の有無による臨床像の相違

	全体(n=157)	<i>PIK3CA</i> 変異型(n=13)	<i>PIK3CA</i> 野生型(n=144)	<i>p</i> 値
患者				
年齢(連続変数)	57.4 ± 12.6	49.4 ± 15.9	58.1 ± 12.1	0.02*
男性	91 (58.0%)	9 (69.2%)	82 (56.9%)	0.56
KPSスコア(連続変数)	88.0 ± 10.3	92.3 ± 7.3	87.7 ± 10.4	0.12
痙攣発症	56 (35.7%)	6 (46.2%)	50 (34.7%)	0.55
腫瘍				
前頭葉	55 (35.0%)	2 (15.4%)	53 (36.8%)	0.14
左側	87 (55.4%)	10 (76.9%)	77 (53.5%)	0.15
機能領域	44 (28.0%)	7 (53.9%)	37 (25.7%)	0.049*
腫瘍内出血	12 (7.6%)	2 (15.4%)	10 (6.9%)	0.26
広域播種性病変	22 (14.0%)	6 (46.2%)	16 (11.1%)	0.004*
多発病変	12 (7.6%)	3 (23.1%)	9 (6.3%)	0.06
神経膠腫様病変	9 (5.7%)	2 (15.4%)	7 (4.9%)	0.16
髄液播種病変	1 (0.6%)	1 (7.7%)	0 (0.0%)	0.08
治療				
生検	21 (13.4%)	4 (30.8%)	17 (11.8%)	0.08
全摘出	69 (43.9%)	5 (38.5%)	64 (44.4%)	0.78
遺伝子異常				
<i>IDH1</i> 変異	12/157 (7.6%)	0/13 (0.0%)	12/144 (8.3%)	0.6
<i>MGMT</i> プロモーターメチル化	61/121 (50.4%)	8/11 (72.7%)	53/110 (48.2%)	0.2
<i>EGFR</i> 遺伝子増幅	64/144 (44.4%)	2/12 (16.7%)	62/132 (47.0%)	0.07
各セル内の数値は症例数(割合)または平均±標準偏差 * 有意水準: $p < 0.05$				

vi. *PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫の放射線学的特徴

初発膠芽腫において *PIK3CA* 変異は若年に多く見られるものの、再発までの期間が短く、生存期間も短いことの原因を推察するために、画像所見の詳細な検討を行ったところ、表 9・図 14 に示すように、変異型の膠芽腫は野生型に比べ広域播種性病変で発症する確率が有意に高かった。具体的には、変異型 13

例中 6 例（46.2%）が広域播種性病変をもって発症していたのに対し、野生型では 144 例中 16 例（11.1%）にとどまり、統計学的に有意であった（ $p=0.0004$ ）。

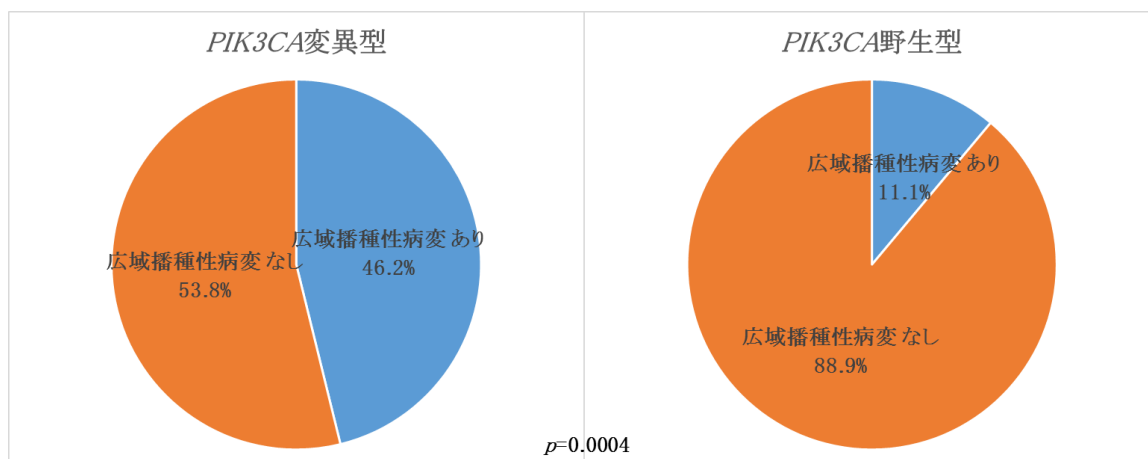
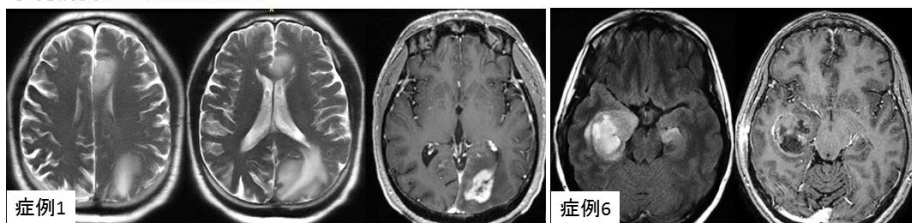


図 14 初発膠芽腫における *PIK3CA* 変異と広域播種性病変との関係

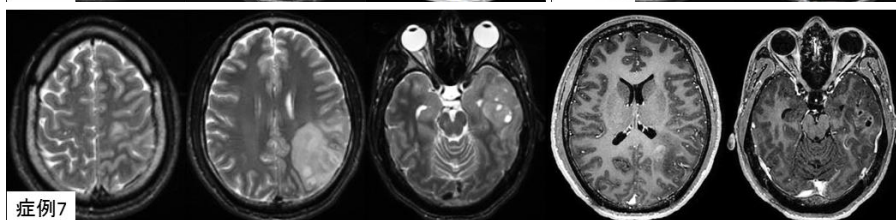
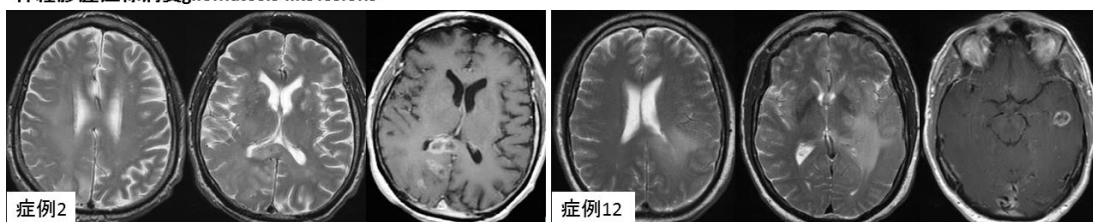
PIK3CA 変異を有する膠芽腫 13 例の MRI 画像を図 15 に示す。

広域播種性病変
widespread disseminated disease

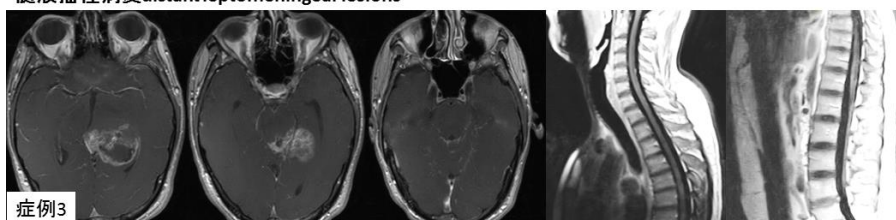
多発病変 multicentric lesions



神経膠腫症様病変 gliomatosis-like lesions



髄液播種病変 distant leptomeningeal lesions



単発病変
single lesion

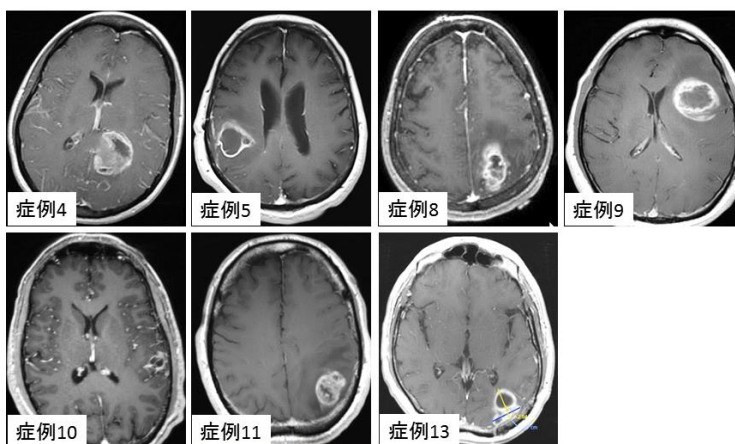


図 15 *PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫の MRI 画像

その他の分子マーカーに関しても同様の検討を加えたが、広域播種性病変での発症と相関の見られる遺伝子異常はなかった（図 16）。ハイレベルな *EGFR* 増幅を有する症例は高い浸潤性を示すことが報告されているが[68, 69]、MGH 症例においてハイレベルな *EGFR* 増幅が見られた症例は 144 例中 64 例(44.4%)で、広域播種性病変との相関は見られなかった ($p=0.63$)。 *MGMT* プロモーターメチル化に関しては、メチル化症例は非メチル化症例に比べて Stupp レジメンでの治療後に遠隔転移で再発することが多いとの報告があり[70]、浸潤性・播種性との関連性が示唆されるが、MGH 症例ではメチル化（121 例中 61 例（50.4%））と広域播種性病変との相関は見られなかった ($p=1.00$)。

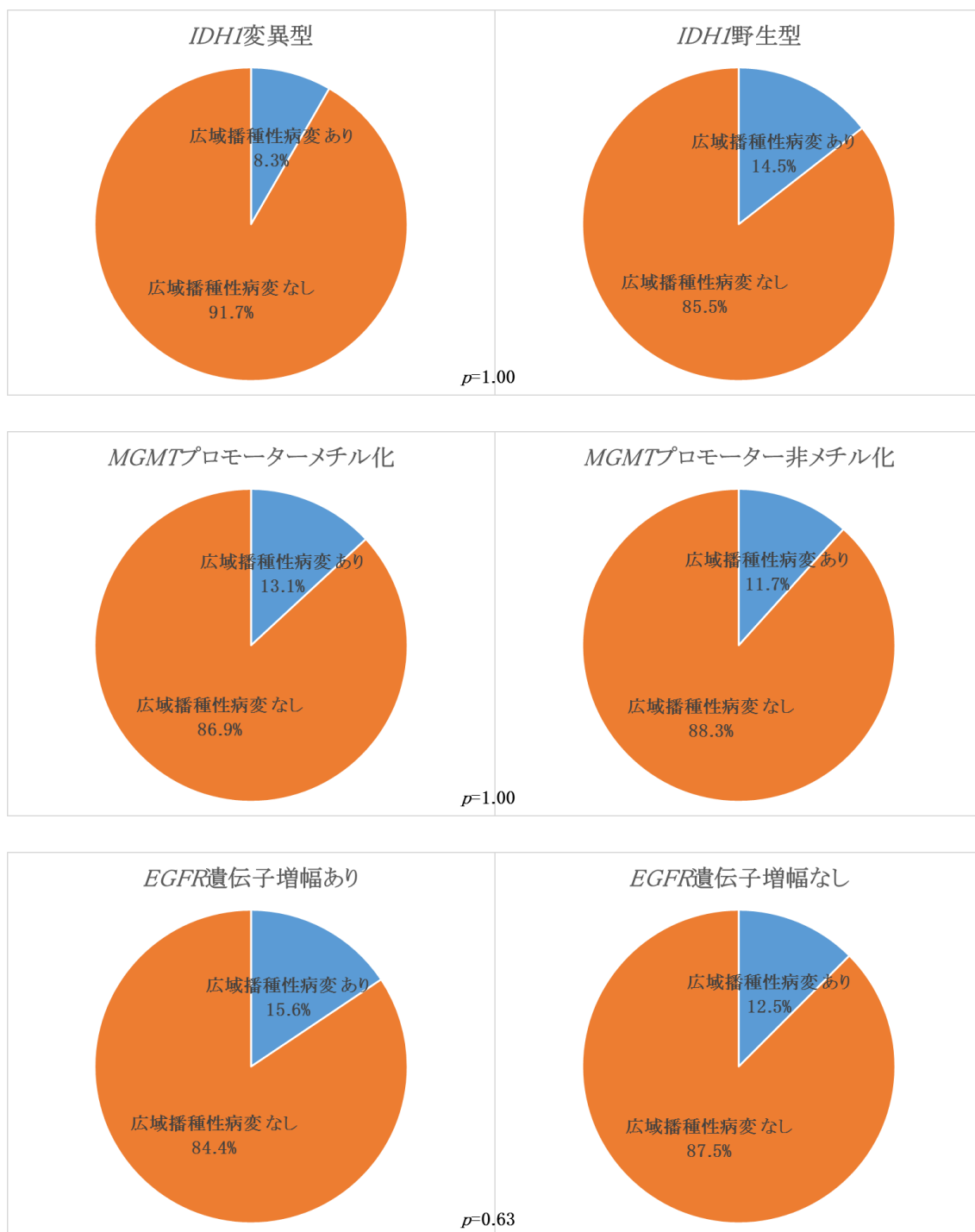


図 16 主な遺伝子異常と広域播種性病変の頻度との関係
(上：IDH1 変異、中：MGMT プロモーターメチル化、下：EGFR 遺伝子増幅)

逆に、広域播種性病変で発症した初発膠芽腫 22 例のうち 6 例 (27.3%) に *PIK3CA* 変異が見られ、その他の症例における頻度 (135 例中 7 例 (5.2%)) に比べると有意に高かった ($p=0.0004$) (図 17)。

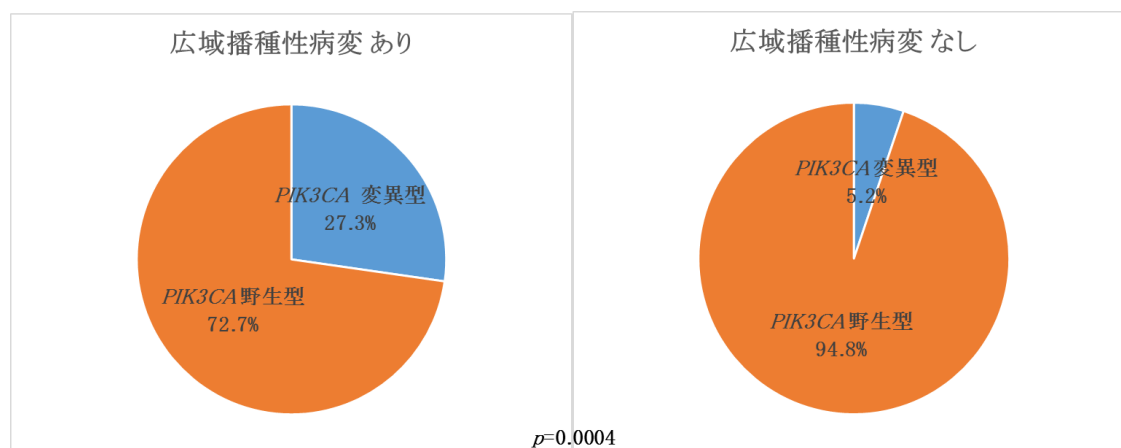


図 17 広域播種性病変にて発症した初発膠芽腫における *PIK3CA* 変異の頻度

B. 公共データを利用した検証

MGH 症例を対象とした研究で得られた知見を検証すべく、独立したデータセットに対し同様の検討を加えることとした。公共データベースとして TCGA プロジェクトの膠芽腫症例を利用した[12]。*PIK3CA* 変異は 291 症例のうち 26 例 (8.9%) で見られた。図 18 に示すとおり、ログランク検定にて変異型の膠芽腫は野生型に比べ PFS が有意に短かった (中央値 6.1 か月 *vs.* 9 か月、 $p=0.008$)。なお、OS に関しては有意差が見られなかった (中央値 13.1 か月 *vs.* 13.3 か月、 $p=0.4$)。

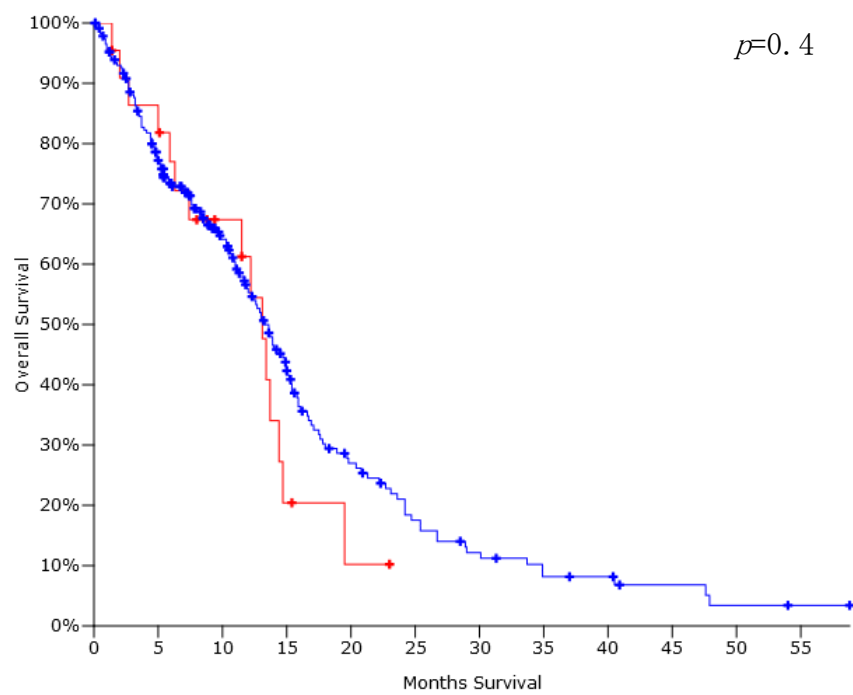
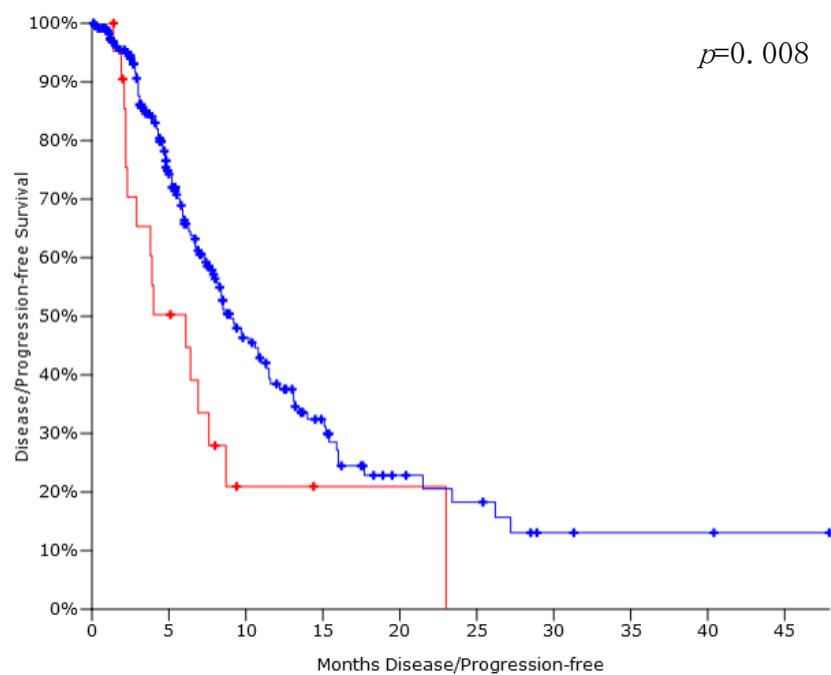


図 18 *PIK3CA* 変異別の PFS (上) と OS (下)
(赤：変異型、青：野生型)

なお、*PIK3R1* 変異は 256 症例のうち 25 例（10.0%）に見られたが、図 19 に示すように予後との相関は PFS、OS とも見られなかった（PFS 中央値：6.2 か月 *vs.* 8.5 か月、 $p=0.14$ ；OS 中央値：13.7 か月 *vs.* 13.3 か月、 $p=0.73$ ）。

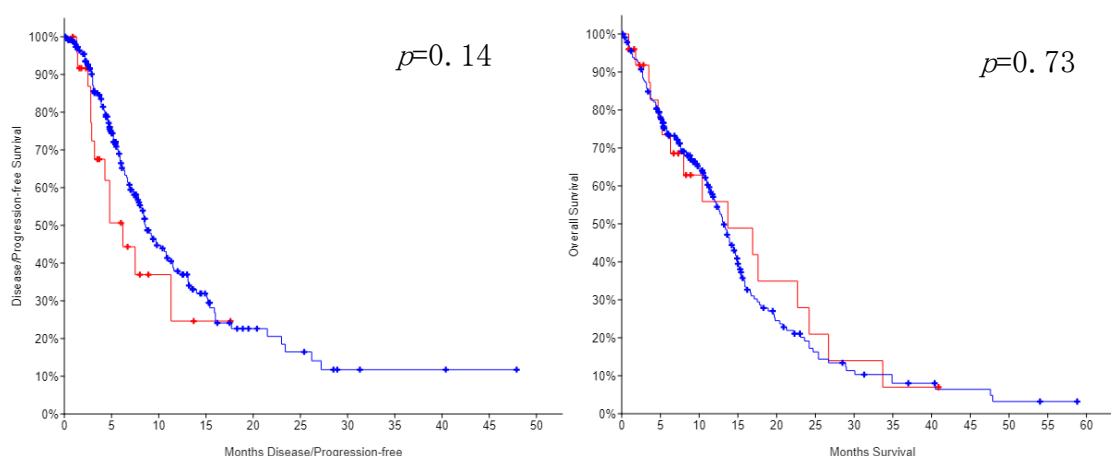


図 19 *PIK3R1* 変異別の PFS（左）と OS（右）
（赤：変異型、青：野生型）

多変量解析を行うために、TCGA 膠芽腫症例の臨床情報および遺伝子情報をダウンロードした。*PIK3CA* 変異および *PIK3R1* 変異の有無が判明している症例は 255 例あった。なお *PIK3CA* 変異と *PIK3R1* 変異は、両方をもった 1 例を除いて相互排他的であった。

因子として抽出可能であったのは、年齢・性別・KPS スコア・*IDH1* 変異・*MGMT* プロモーターメチル化であった。単変量解析で PFS と有意な相関が見られた因子は、*PIK3CA* 変異（ $p=0.008$, HR 2.03 [95%CI 1.20-3.43]）のみであった。また OS に関しては、年齢（ $p<0.0001$, HR 1.04 [95%CI 1.02-1.05]）、KPS スコア（ $p<0.0001$, HR 0.97 [95%CI 0.96-0.99]）、*IDH1* 変異（ $p=0.0002$, HR

0.24 [95%CI 0.07-0.57])、*MGMT* プロモーターメチル化 ($p=0.0002$, HR 0.55 [95%CI 0.37-0.80]) が有意であった。*PIK3CA* 変異に関しては $p=0.40$ 、HR 1.26 [95%CI 0.71-2.08] と有意ではなかった。

KPS スコアが記載された症例は 255 例中 185 例 (72.5%)、*MGMT* プロモーターメチル化が記載された症例は 191 例 (74.9%)にとどまり、全ての因子を用いてのモデルの当てはめは妥当でないと思われたため、多変量解析から除外した。その他の因子からステップワイズ法で因子選択を行ったところ、PFS に関しては *PIK3CA* 変異・*PIK3R1* 変異・*IDH1* 変異、OS に関しては年齢のみが選択された。そしてこれらを用い PFS に関して多変量解析を行うと、*PIK3CA* 変異 ($p=0.01$, HR 2.15 [95%CI 1.22-3.53]) だけが予後規定因子として抽出された。上記の結果をまとめたものが表 10 である。

以上をまとめると、独立した大規模なデータセットである TCGA 膠芽腫症例においても、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析にて、初発膠芽腫の再発までの期間を規定する因子として *PIK3CA* 変異が抽出された。なお、TCGA プロジェクトの公開データベースには画像データが附随していないため、MGH 症例を対象とした研究で明らかになった *PIK3CA* 変異を有する膠芽腫の放射線学的特徴に関しては検証できなかった。

表 10 TCGA 症例における予後規定因子に関する単変量解析・多変量解析

PFS	単変量解析		多変量解析	
	p値	ハザード比 (95%信頼区間)	p値	ハザード比 (95%信頼区間)
年齢(連続変数)	0.37	0.99 (0.98-1.01) ^{\$}		
男性	0.52	1.12 (0.79-1.63)		
KPSスコア(連続変数)	0.24	1.02 (0.99-1.02) ^{\$}	-	
PIK3CA 変異	0.008*	2.03 (1.20-3.43)	0.01*	2.15 (1.22-3.53)
PIK3R1 変異	0.46	1.28 (0.65-2.26)	0.29	0.57 (0.05-1.20)
IDH1 変異	0.26	0.63 (0.24-1.30)	0.15	1.42 (0.72-2.53)
MGMTプロモーターメチル化	0.19	0.76 (0.50-1.14)	-	
^{\$} 単位ハザード比 * 有意水準: $p < 0.05$ - 除外				

OS	単変量解析		多変量解析	
	p値	ハザード比 (95%信頼区間)	p値	ハザード比 (95%信頼区間)
年齢(連続変数)	<0.0001*	1.04 (1.02-1.05) ^{\$}	<0.0001*	1.04 (1.02-1.05) ^{\$}
男性	0.53	0.90 (0.66-1.24)		
KPSスコア(連続変数)	<0.0001*	0.97 (0.96-0.99) ^{\$}	-	
PIK3CA 変異	0.4	1.26 (0.71-2.08)		
PIK3R1 変異	0.99	1.01 (0.59-17.78)		
IDH1 変異	0.0002*	0.24 (0.07-0.57)		
MGMTプロモーターメチル化	0.0002*	0.55 (0.37-0.80)	-	
^{\$} 単位ハザード比 * 有意水準: $p < 0.05$ - 除外				

C. 当院症例を利用した検証

i. 対象患者

解析対象の 20 症例の一覧を表 11 に示し、その特徴を表 12 にまとめた。

表 11 初発膠芽腫 20 例の症例リスト

症例	年齢	性別	痙攣発症	発症形態	摘出度	KPSスコア	MIB-1#	PIK3CA変異	MGMTプロモーター	IDH1変異	PFS (月)	OS (月)
1	57	女	なし	単発	部分摘出	80	12.5	なし	メチル化	R132H	35.6*	35.6
2	39	男	なし	単発	全摘出	80	50	なし	非メチル化	なし	36.2*	36.2*
3	40	男	あり	単発	全摘出	100	8.5	なし	非メチル化	R132H	36.9*	36.9*
4	60	男	なし	単発	生検	80	70	なし	未検	なし	3.7	4.3*
5	65	男	なし	単発	全摘出	80	30	なし	非メチル化	なし	32.1	33.6*
6	87	女	なし	単発	部分摘出	50	10	なし	非メチル化	なし	1.4*	1.4*
7	58	女	あり	単発	部分摘出	70	40	なし	メチル化	なし	27.1*	27.1*
8	41	男	なし	多発	部分摘出	90	20	なし	非メチル化	なし	4.2	23.7*
9	69	女	あり	単発	全摘出	80	90	なし	メチル化	なし	30.4*	30.1*
10	52	女	なし	単発	全摘出	40	80	なし	非メチル化	なし	21.9	23.8*
11	58	女	なし	単発	全摘出	40	15	なし	非メチル化	なし	21.1	26.5
12	35	女	なし	髄液播種	部分摘出	100	60	R93W	メチル化	なし	5.1	12.9
13	62	女	なし	単発	部分摘出	60	55	なし	メチル化	なし	8.6	15.6
14	54	女	なし	単発	全摘出	80	15	なし	非メチル化	なし	13.3	15.4*
15	72	男	なし	多発	生検	80	50	なし	非メチル化	なし	13.8	15.2*
16	16	男	なし	単発	全摘出	80	##	R38H	非メチル化	R132H	5.0	11.7
17	73	女	なし	単発	全摘出	80	30	なし	非メチル化	なし	5.4	11.7
18	60	女	なし	単発	部分摘出	70	70	なし	メチル化	なし	3.4	4.4
19	65	男	あり	単発	全摘出	80	50	なし	非メチル化	なし	9.1	10.7*
20	83	女	なし	単発	全摘出	80	40	なし	非メチル化	なし	5.9	9.6

*最終無増悪生存確認日・最終生存確認日をもって打ち切り #範囲の記載がある場合は中央値を記載 ##核分裂像:強拡大視野あたり8個

表 12 初発膠芽腫 20 例の患者・腫瘍プロフィール、治療内容、遺伝子異常

	症例数(割合)または中央値(範囲)
患者	
年齢(連続変数)	59 (16-87)
年齢<60歳	10 (50.0%)
男性	8 (40.0%)
KPSスコア(連続変数)	80 (40-100)
KPSスコア \geq 80	14 (70.0%)
痙攣発症	3 (15.0%)
腫瘍	
広域播種性病変	2 (10.0%)
治療	
全摘出	11 (55.0%)
遺伝子異常	
<i>PIK3CA</i> 変異	2 (10.0%)
<i>IDH1</i> 変異	3 (15.0%)
<i>MGMT</i> プロモーターメチル化	6/19 (31.6%)

ii. 遺伝子解析

サンガーシーケンスの結果、2 例 (10.0%) に *PIK3CA* 変異を認めた。変異を有する症例は 16 歳と 35 歳と、野生型に比べて有意に若年での発症であった (25.5 ± 9.4 vs. 60.8 ± 3.1 , $p=0.002$)。細胞増殖能を表す Ki-67%は野生型では $40.9 \pm 6.0\%$ であり、変異を有する症例では 1 例でデータが欠損しているものの、もう 1 例では 60%であり、欠損した例も強拡大視野で核分裂像を 8 個認め MIB-1 高値が予想された。臨床経過については後に詳述する。

iii. 予後解析

15.5 ヶ月（中央値）の追跡期間で、PFS 中央値は 13.3 か月、OS 中央値は 35.6 か月であった。ただし、20 例中 14 例で再発を認めたものの、12 例で最終フォロー時に生存していたため、OS に関する解析結果の解釈には注意が必要と考えられた。

少数症例での検討ではあるが、*PIK3CA* 変異と初発膠芽腫の予後との相関をログランク検定にて検討すると、野生型に比べ変異型で PFS・OS とともに有意に短かった（PFS：中央値 5.1 か月 *vs.* 13.8 か月、 $p=0.03$ ；OS：中央値 12.3 か月 *vs.* 35.6 か月、 $p=0.04$ ）（図 20）。なお、その他の因子で有意なものはなかった。

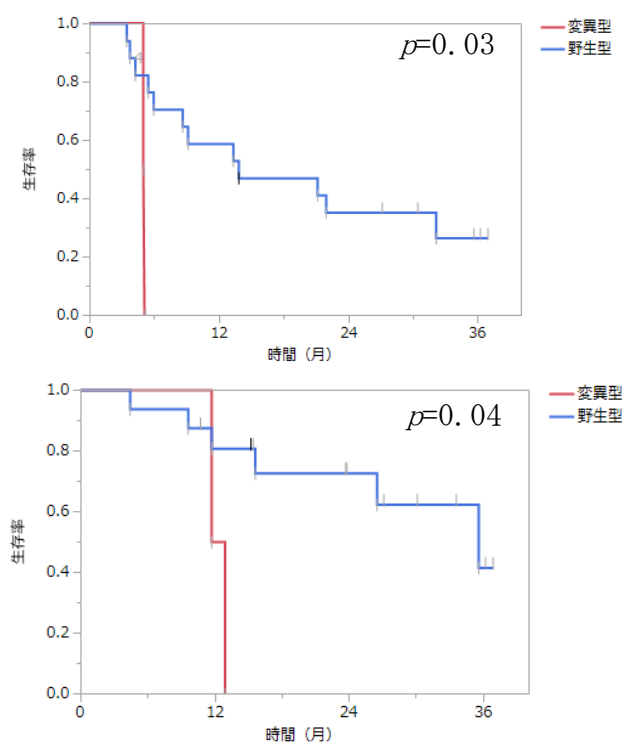


図 20 *PIK3CA* 変異別の生存曲線（上：PFS、下：OS）

MGH 症例を対象とした研究と同様に、まず多重共線性の検討を行った（表 13）。同じように年齢と KPS スコアは連続変数を採用することとした。*PIK3CA* 変異と年齢、*IDH1* 変異と年齢、*MGMT* プロモーターメチル化と全摘出、*MGMT* プロモーターメチル化と性別、*PIK3CA* 変異と広域播種性病変との相関は、相関係数 0.4~0.7 の中等度にとどまり、強い相関は見られなかった。

表 14 に示すように、単変量解析にて $p < 0.25$ の因子を用いてステップワイズ法により因子選択を行い、PFS に関して選択された *PIK3CA* 変異および *IDH1* 変異を用いて多変量解析を行うと、*PIK3CA* 変異（ $p = 0.049$, HR 7.72 [95%CI 1.00-47.20]）のみが有意であった。OS に関しては、ステップワイズ法によるモデルの当てはめが不可能であったため、症例数（20 例）を勘案し p 値が 0.1 以下の 3 因子を多変量解析に用いた。有意な因子はなく、*PIK3CA* 変異は $p = 0.12$, HR 4.68 [95%CI 0.61-28.30] であった。

以上から、非常に小規模なシリーズではあるが、*PIK3CA* 変異が早期再発を予測する因子であることが示唆された。

表 13 多重共線性の検討

		患者						腫瘍	治療	遺伝子異常		
		年齢(連続変数)	年齢(60歳以上vs.60歳未満)	男性	KPSスコア(連続変数)	KPSスコア(80以上vs.70以下)	痙攣発症	広域播種性病変	全摘出	PIK3CA変異	IDH1変異	MGMTプロモーターメチル化
患者	年齢(連続変数)	1	0.7458	0.3738	-0.3398	0.2196	0.0756	-0.0748	0.0993	0.6427	0.5001	0.0109
	年齢(60歳以上vs.60歳未満)	0.7458	1	0	-0.0626	0	0.14	0	0.1005	0.3333	0.4201	-0.047
	男性	0.3738	0	1	-0.4474	0.5345	0.2287	-0.2722	0.1231	0.068	0.2287	-0.4791
	KPSスコア(連続変数)	-0.3398	-0.0626	-0.4474	1	-0.8199	-0.2192	0	0.0315	-0.3131	-0.3069	-0.0833
	KPSスコア(80以上vs.70以下)	0.2196	0	0.5345	-0.8199	1	-0.0306	-0.1455	0.2851	0.2182	0.275	-0.2561
	痙攣発症	0.0756	0.14	0.2287	-0.2192	-0.0306	1	-0.14	0.0985	-0.14	0.2157	0.0109
腫瘍	広域播種性病変	-0.0748	0	-0.2722	0	-0.1455	-0.14	1	-0.3685	0.4444	-0.14	0.1304
治療	全摘出	0.0993	0.1005	0.1231	0.0315	0.2851	0.0985	-0.3685	1	-0.0335	0.0985	-0.5585
遺伝子異常	PIK3CA変異	0.6427	0.3333	0.068	-0.3131	0.2182	-0.14	0.4444	-0.0335	1	0.3267	0.1304
	IDH1変異	0.5001	0.4201	0.2287	-0.3069	0.275	0.2157	-0.14	0.0985	0.3267	1	0.0109
	MGMTプロモーターメチル化	0.0109	-0.047	-0.4791	-0.0833	-0.2561	0.0109	0.1304	-0.5585	0.1304	0.0109	1

表 14 初発膠芽腫の予後規定因子に関する単変量解析・多変量解析

PFS	単変量解析		多変量解析	
	p値	ハザード比(95%信頼区間)	p値	ハザード比(95%信頼区間)
患者				
年齢(連続変数)	0.87	1.00 (0.96-1.05) [§]		
男性	1.00	1.00 (0.21-2.93)		
KPSスコア(連続変数)	0.10	0.98 (0.97-1.00) [§]		
痙攣発症	0.13	0.27 (0.01-1.38)		
腫瘍				
広域播種性病変	0.29	3.97 (0.20-26.91)		
治療				
全摘出	0.38	0.61 (0.21-1.87)		
遺伝子異常				
PIK3CA変異	0.08	5.76 (0.75-35.19)	0.049*	7.72 (1.00-47.20)
IDH1変異	0.15	0.28 (0.02-1.44)	0.08	0.22 (0.01-1.18)
MGMTプロモーターメチル化	0.48	0.64 (0.14-2.09)		
OS	単変量解析		多変量解析	
	p値	ハザード比(95%信頼区間)	p値	ハザード比(95%信頼区間)
患者				
年齢(高年齢)	0.60	1.01 (0.96-1.08) [§]		
男性	0.052	0.18 (0.01-1.02)	0.08	0.21 (0.01-1.20)
KPSスコア(高KPSスコア)	0.61	0.99 (0.95-1.03) [§]		
痙攣発症	0.06	0.000000001 (1.08-1.08)	0.14	0.000000002 (0.84-1.96)
腫瘍				
広域播種性病変	0.32	3.61 (0.18-24.46)		
治療				
全摘出	0.48	0.60 (0.14-2.57)		
遺伝子異常				
PIK3CA変異	0.10	5.22 (0.68-31.8)	0.12	4.68 (0.61-28.30)
IDH1変異	0.97	0.96 (0.13-4.62)		
MGMTプロモーターメチル化	0.40	1.82 (0.43-7.76)		

[§] 単位ハザード比 * 有意水準: p<0.05

iv. *PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫症例の経過

PIK3CA 変異を認めた 2 症例の経過を図 21・図 22 にまとめた。ともに若年での発症で、1 例では初発時に髄液播種を強く疑う脳幹周囲・小脳溝のびまん性造影を認め、もう 1 例では初発時は単発病変であったが、再発時に小脳への遠隔転移を来した。

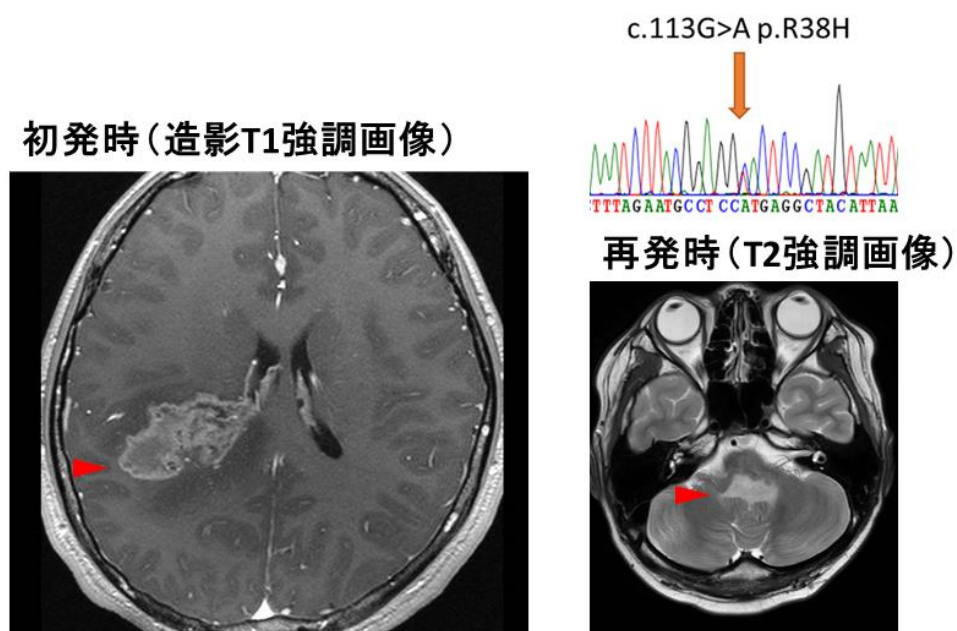
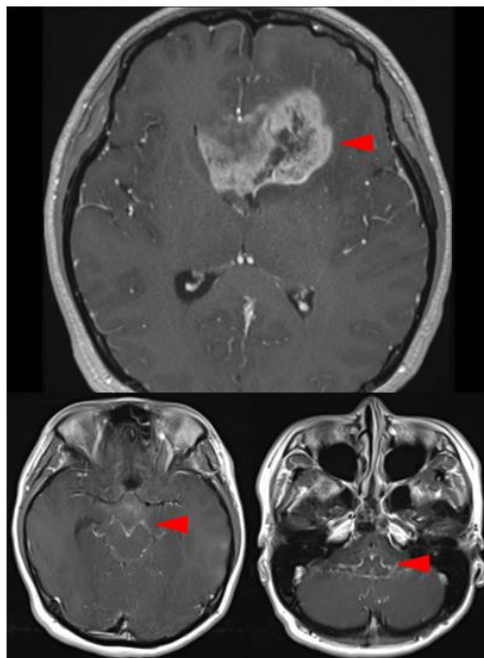
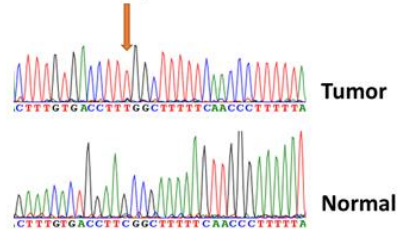


図 21 症例 16 (16 歳男性) : 頭痛の精査で指摘された右頭頂葉腫瘍
術前に左片麻痺出現し KPS スコア 80。可及的全摘出され、
膠芽腫の診断にて Stupp レジメン施行
途中で僅かな残存腫瘍の再増大を認め、ベバシズマブ追加
術後 5.0 か月で脳幹背面に播種性病変が出現 (局所再発なし)
局所照射を追加し化学療法も継続。術後 11.7 か月で死亡

初発時（造影T1強調画像）



c.277C>T p.R93W



再発時（造影T1強調画像）

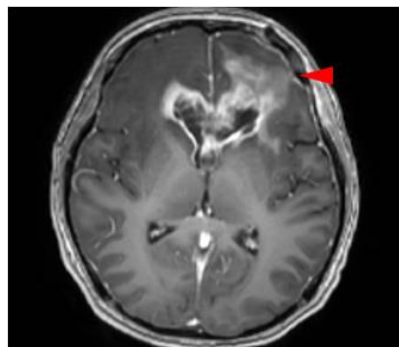


図 22 症例 12（35 歳女性）：頭痛の精査で指摘された右前頭葉腫瘍
初発時より脳幹周囲・小脳溝にびまん性造影あり、播種疑い
KPS スコア 100。部分摘出され、膠芽腫の診断にて Stupp レジメン施行
術後 5.1 か月で再発。ベバシズマブ治療も術後 12.9 か月で死亡
クロマトグラムから uniparental disomy の可能性が考えられた[71]

VI. 考察

本研究により、*PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫は同変異を有さない症例に比べ、より早期に再発し予後不良であることが示された。上記の知見は単一施設において放射線化学療法を受けた比較的均一な患者シリーズにおいて示されたものであるが、多施設で治療されより不均一と考えられる患者シリーズでも追認された[12]。さらに本研究により、*PIK3CA* 変異を有する初発膠芽腫に特徴的な臨床像が明らかになり、同変異を有さない症例よりも若年で発症しやすいこと、腫瘍が多発、あるいは広範に浸潤、あるいは遠隔に播種して発症することが多いということが示された。

本研究の知見を導いた MGH 症例を対象とした研究では、*PIK3CA* 変異をターゲットシーケンスにて検出しており、全エクソーム解析などより網羅的な遺伝子解析のデータを用いて検証を行うのが望ましい。TCGA 膠芽腫症例に関して、初報では 206 症例中の 91 例に対しサンガーシーケンスの手法により 601 の遺伝子の変異頻度を調べたのみであった[11]。しかし続報では、次世代シーケンサーによる全エクソーム解析も追加されており（サンガーシーケンスで解析された症例は 148 例、全エクソーム解析で解析された症例は 291 例）[12]、TCGA 膠芽腫症例においては *PIK3CA* を含め遺伝子変異がかなり網羅的に探索されたものと考えられる。したがって、本研究に用いる目的で 2017 年 9 月にダウンロードした TCGA のデータセットの大半も、全エクソーム解析がなされていると思われる。また 2017 年の Lee らの報告によると、膠芽腫の全エクソ-

ム解析の結果、多発膠芽腫に *PIK3CA* 変異が有意に多く見られ[72]、*PIK3CA* 変異型の膠芽腫は野生型に比べ予後不良であることが分かった。これは本研究で得られた知見を支持するデータである。なお本研究においては、多発病変のみでなく、神経膠腫症様病変や髄液播種病変も併せて広域播種性病変と定義しているが、より広域に進展した形で発症しやすいという意味で類似していると言えよう。

癌一般において、PI3 キナーゼ経路の亢進は癌細胞の増殖促進・生存につながる事が知られ[35, 36, 42]、さらに癌細胞の遊走能、浸潤能、転移能をも高めることが報告されている[36-38, 42]。神経膠腫においても、PI3 キナーゼ経路の異常亢進が腫瘍細胞の遊走性、浸潤性を高めるという研究報告が多い[44, 63, 73-76]。例えば McNeill らは、膠芽腫によく見られるホットスポット変異 6 種類を、レンチウイルスベクターを用いて不死化した正常ヒトアストロサイトに導入し、野生型に比べ変異型で、MTS アッセイにて増殖能が増すことを示し、また gap closure アッセイにて遊走能も増すことを示した[63]。また、一つの膠芽腫検体の複数箇所からサンプリングし解析すると *PIK3CA* 変異が全てのサンプルで認められることから、かなり早期に生じる遺伝子異常であると Lee らは推測している[72]。以上より、*PIK3CA* 変異が早期に腫瘍内に生じると、PI3 キナーゼ経路が活性化し腫瘍細胞の遊走性が高まり、より広範に進展した病変として発症しやすくなるものと推察される。そしてこれが、拡大局所放射線照射を行う Stupp レジメンからの腫瘍細胞の逃避につながり、早期に再発を来とし、若年発症にも関わらず予後不良である一因なのかもしれない。なお、

PIK3CA 変異を有する膠芽腫の若年発症に関しては、症例数が少ないがそれを示唆した報告もある[77]。

上記の推察に対し機能解析による実証がなされていないことが、本研究の限界の一つである。またその他にも、後方視的研究であり、*PIK3CA* 遺伝子変異の症例数が少ないためバイアスがかかりやすいという点が挙げられる。しかしながら、MGH 症例は単一施設において比較的均一な治療を受けた患者群ではあるものの、その臨床的特徴や遺伝子異常の頻度は既報の大規模な膠芽腫シリーズと概ね合致していることから[18, 52]、このデータセットの外的妥当性は充分あると思われる。実際 *PIK3CA* 変異の頻度に関しても、本研究は既報と概ね合致するものである。すなわち、TCGA では *PIK3CA* 変異は 11%に見られ[12]、Lee らの全エクソーム解析でも 13.8%に見られている[72]。

PI3 キナーゼ経路の異常亢進の原因となりうる遺伝子変異として *PIK3R1* 変異の検索が不十分である点も、本研究のもう一つの限界として挙げられる。制御サブユニット p85 α をコードする *PIK3R1* 遺伝子に機能喪失型変異が起こることにより、PI3 キナーゼ経路が亢進することが知られている[36, 41]。当時（2009 年～2012 年）の SNaPshot アッセイ 2.0 版・3.0 版は *PIK3R1* を含んでおらず、今回の MGH 症例において *PIK3R1* 変異が *PIK3CA* 変異と同等の効果を示すか否かを検証することは不可能である。しかしながら前述の Lee らの報告によると、*PIK3CA* 変異は多発膠芽腫に多く見られたが *PIK3R1* 変異にその傾向はなかった[72]。また TCGA 症例において、*PIK3CA* 変異が PFS と相関していたのに対し *PIK3R1* 変異は有意な相関を示さなかった。したがって、これら PI3 キナーゼ経

路の二つの遺伝子変異が膠芽腫の臨床像に与える影響は、両者間で若干異なるのかもしれない。

膠芽腫において最も頻繁に見られる遺伝子異常である *EGFR* 増幅や、*PIK3CA* 変異以外の RTK/RAS/PI3K 経路の遺伝子異常も、PI3 キナーゼ経路の異常亢進を惹起する。MGH 症例において *PIK3CA* 変異と *EGFR* 増幅、あるいは *PIK3CA* 変異とそれ以外の RTK/RAS/PI3K 経路の遺伝子異常とは、重複症例が複数存在したものの、相互排他的な傾向が見られた。ただし、SNaPshot はターゲットシーケンスであるため遺伝子異常を網羅的に検知できていない可能性がある。一般的に膠芽腫において同一シグナル伝達経路内での遺伝子異常のオーバーラップは稀と考えられるが、他癌腫においては他の RTK/RAS/PI3K 経路の異常に *PIK3CA* 異常が加わって腫瘍形成がなされるという報告もある[78]。また、*PIK3CA* 変異の部位を膠芽腫と他癌腫で比較すると、図 23 から分かるように他癌腫ではエクソン 9・エクソン 20 が主なのに対し、膠芽腫ではエクソン 1 にも多く見られるなど、*PIK3CA* 変異が腫瘍形成・進展に果たす役割も癌腫により若干異なる可能性がある。*PIK3CA*・*PIK3R1*・*EGFR*・*PTEN*を含む PI3 キナーゼ経路関連の遺伝子異常が膠芽腫に与える影響については、より網羅的な遺伝子解析研究が必要である。

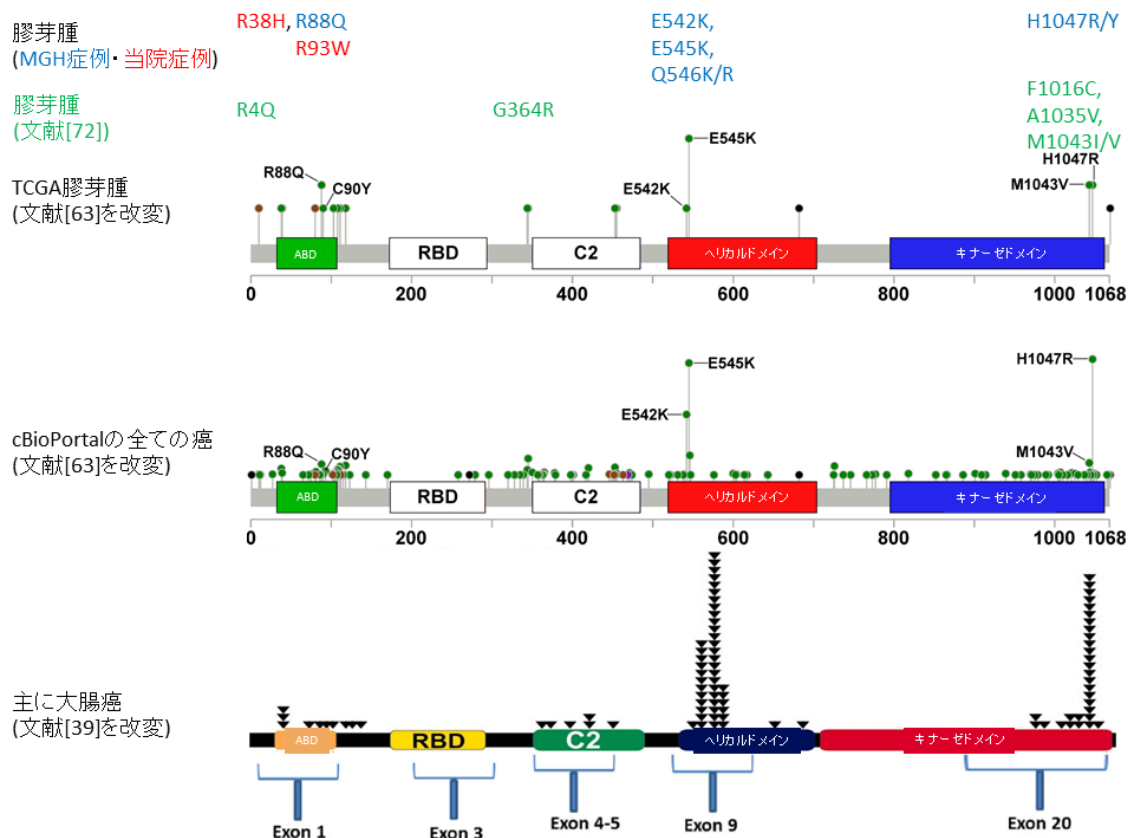


図 23 膠芽腫と他癌腫における *PIK3CA* 変異の部位

本研究により、*PIK3CA* 変異を有する膠芽腫は多発・浸潤・播種などにより発症当初から広域に進展していることが多く、外科的摘出や拡大局所照射といった局所治療の有効性が低い可能性が示唆された。したがって全身治療である化学療法が特に重要となり、治療成績向上のために新規治療の開発が渴望されるところである。ただし、臨床試験では多発・播種を示すような膠芽腫は除外されることが多いことから、本研究で得られた知見から推察するに、*PIK3CA* 変異を有する症例が選択的に排除されてしまう可能性がある。PI3 キナーゼ阻害薬の効果は *PIK3CA* 変異を有する膠芽腫で高いことが予想されるだけに、過去の

臨床試験で投与された PI3 キナーゼ阻害薬や PI3 キナーゼ・mTOR 同時阻害薬の効果が不十分であった理由の一つかもしれない[47]。膠芽腫に対する臨床試験の企画やデータ解釈に際し、母集団の分子プロファイルに充分配慮する必要があるという示唆を与えてくれたことは、本研究の大きな意義と言えよう。

VII. 結語

本研究から、*PIK3CA* 遺伝子の活性化型変異を有する一部の膠芽腫は、変異を有さない野生型に比べより若年で発症し、にも関わらず早期に再発し予後不良であることが明らかになった。また、変異型の症例は野生型の症例に比べて、発症時点でより広範に腫瘍進展している場合が多く、それが早期再発に関係している可能性がある。

VIII. 引用文献

1. Ostrom QT, Gittleman H, Farah P, Ondracek A, Chen Y, Wolinsky Y, Stroup NE, Kruchko C, Barnholtz-Sloan JS. Cbtrus statistical report: Primary brain and central nervous system tumors diagnosed in the united states in 2006-2010. *Neuro Oncol* 2013;15 Suppl 2:ii1-56.
2. Nakamura H, Makino K, Yano S, Kuratsu J, Kumamoto Brain Tumor Research G. Epidemiological study of primary intracranial tumors: A regional survey in kumamoto prefecture in southern japan--20-year study. *International journal of clinical oncology* 2011;16:314-321.
3. Narita Y, Shibui S, Committee of Brain Tumor Registry of Japan Supported by the Japan Neurosurgical S. Trends and outcomes in the treatment of gliomas based on data during 2001-2004 from the brain tumor registry of japan. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2015;55 Suppl 1:286-295.
4. Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine* 2005;352:987-996.
5. Vredenburgh JJ, Desjardins A, Herndon JE, Marcello J, Reardon DA, Quinn JA, Rich JN, Sathornsumetee S, Gururangan S, Sampson J, Wagner M, Bailey L, Bigner DD, Friedman AH, Friedman HS. Bevacizumab plus irinotecan in recurrent glioblastoma multiforme. *J Clin Oncol* 2007;25:4722-4729.

6. Friedman HS, Prados MD, Wen PY, Mikkelsen T, Schiff D, Abrey LE, Yung WK, Paleologos N, Nicholas MK, Jensen R, Vredenburgh J, Huang J, Zheng M, Cloughesy T. Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:4733-4740.
7. Lacroix M, Abi-Said D, Fourney DR, Gokaslan ZL, Shi W, DeMonte F, Lang FF, McCutcheon IE, Hassenbusch SJ, Holland E, Hess K, Michael C, Miller D, Sawaya R. A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme: Prognosis, extent of resection, and survival. *J Neurosurg* 2001;95:190-198.
8. Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS. An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg* 2011;115:3-8.
9. Li J, Wang M, Won M, Shaw EG, Coughlin C, Curran WJ, Jr., Mehta MP. Validation and simplification of the radiation therapy oncology group recursive partitioning analysis classification for glioblastoma. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 2011;81:623-630.
10. Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987;84:6899-6903.
11. Cancer Genome Atlas Research N. Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. *Nature* 2008;455:1061-1068.

12. Brennan CW, Verhaak RG, McKenna A, Campos B, Noushmehr H, Salama SR, Zheng S, Chakravarty D, Sanborn JZ, Berman SH, Beroukhi R, Bernard B, Wu CJ, Genovese G, Shmulevich I, Barnholtz-Sloan J, Zou L, Vegesna R, Shukla SA, Ciriello G, Yung WK, Zhang W, Sougnez C, Mikkelsen T, Aldape K, Bigner DD, Van Meir EG, Prados M, Sloan A, Black KL, Eschbacher J, Finocchiaro G, Friedman W, Andrews DW, Guha A, Iacocca M, O'Neill BP, Foltz G, Myers J, Weisenberger DJ, Penny R, Kucherlapati R, Perou CM, Hayes DN, Gibbs R, Marra M, Mills GB, Lander E, Spellman P, Wilson R, Sander C, Weinstein J, Meyerson M, Gabriel S, Laird PW, Haussler D, Getz G, Chin L, Network TR. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* 2013;155:462-477.
13. Tanaka S, Louis DN, Curry WT, Batchelor TT, Dietrich J. Diagnostic and therapeutic avenues for glioblastoma: No longer a dead end? *Nat Rev Clin Oncol* 2013;10:14-26.
14. Nagane M, Kobayashi K, Ohnishi A, Shimizu S, Shiokawa Y. Prognostic significance of o6-methylguanine-DNA methyltransferase protein expression in patients with recurrent glioblastoma treated with temozolomide. *Jpn J Clin Oncol* 2007;37:897-906.
15. Hegi ME, Diserens AC, Gorlia T, Hamou MF, de Tribolet N, Weller M, Kros JM, Hainfellner JA, Mason W, Mariani L, Bromberg JE, Hau P, Mirimanoff RO, Cairncross JG, Janzer RC, Stupp R. Mgmt gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *The New England journal of medicine* 2005;352:997-1003.

16. Hegi ME, Liu L, Herman JG, Stupp R, Wick W, Weller M, Mehta MP, Gilbert MR. Correlation of o6-methylguanine methyltransferase (mgmt) promoter methylation with clinical outcomes in glioblastoma and clinical strategies to modulate mgmt activity. *J Clin Oncol* 2008;26:4189-4199.
17. Parsons DW, Jones S, Zhang X, Lin JC, Leary RJ, Angenendt P, Mankoo P, Carter H, Siu IM, Gallia GL, Olivi A, McLendon R, Rasheed BA, Keir S, Nikolskaya T, Nikolsky Y, Busam DA, Tekleab H, Diaz LA, Hartigan J, Smith DR, Strausberg RL, Marie SK, Shinjo SM, Yan H, Riggins GJ, Bigner DD, Karchin R, Papadopoulos N, Parmigiani G, Vogelstein B, Velculescu VE, Kinzler KW. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* 2008;321:1807-1812.
18. Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batnig-Haberle I, Jones S, Riggins GJ, Friedman H, Friedman A, Reardon D, Herndon J, Kinzler KW, Velculescu VE, Vogelstein B, Bigner DD. Idh1 and idh2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine* 2009;360:765-773.
19. Dang L, White DW, Gross S, Bennett BD, Bittinger MA, Driggers EM, Fantin VR, Jang HG, Jin S, Keenan MC, Marks KM, Prins RM, Ward PS, Yen KE, Liao LM, Rabinowitz JD, Cantley LC, Thompson CB, Vander Heiden MG, Su SM. Cancer-associated idh1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* 2009;462:739-744.
20. Lu C, Ward PS, Kapoor GS, Rohle D, Turcan S, Abdel-Wahab O, Edwards CR, Khanin R, Figueroa ME, Melnick A, Wellen KE, O'Rourke DM, Berger SL,

- Chan TA, Levine RL, Mellinghoff IK, Thompson CB. Idh mutation impairs histone demethylation and results in a block to cell differentiation. *Nature* 2012;483:474-478.
21. Noushmehr H, Weisenberger DJ, Diefes K, Phillips HS, Pujara K, Berman BP, Pan F, Pelloso CE, Sulman EP, Bhat KP, Verhaak RG, Hoadley KA, Hayes DN, Perou CM, Schmidt HK, Ding L, Wilson RK, Van Den Berg D, Shen H, Bengtsson H, Neuvial P, Cope LM, Buckley J, Herman JG, Baylin SB, Laird PW, Aldape K, Cancer Genome Atlas Research N. Identification of a cpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma. *Cancer Cell* 2010;17:510-522.
22. Turcan S, Rohle D, Goenka A, Walsh LA, Fang F, Yilmaz E, Campos C, Fabius AW, Lu C, Ward PS, Thompson CB, Kaufman A, Guryanova O, Levine R, Heguy A, Viale A, Morris LG, Huse JT, Mellinghoff IK, Chan TA. Idh1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* 2012;483:479-483.
23. Louis DN, Perry A, Burger P, Ellison DW, Reifenberger G, von Deimling A, Aldape K, Brat D, Collins VP, Eberhart C, Figarella-Branger D, Fuller GN, Giangaspero F, Giannini C, Hawkins C, Kleihues P, Korshunov A, Kros JM, Beatriz Lopes M, Ng HK, Ohgaki H, Paulus W, Pietsch T, Rosenblum M, Rushing E, Soylemezoglu F, Wiestler O, Wesseling P, International Society Of N-H. International society of neuropathology--haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 2014;24:429-435.

24. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A, Figarella-Branger D, Cavenee WK, Ohgaki H, Wiestler OD, Kleihues P, Ellison DW. The 2016 world health organization classification of tumors of the central nervous system: A summary. *Acta Neuropathol* 2016;131:803-820.
25. Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, Lisle DK, Finkelstein DM, Hammond RR, Silver JS, Stark PC, Macdonald DR, Ino Y, Ramsay DA, Louis DN. Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 1998;90:1473-1479.
26. Druker BJ, Talpaz M, Resta DJ, Peng B, Buchdunger E, Ford JM, Lydon NB, Kantarjian H, Capdeville R, Ohno-Jones S, Sawyers CL. Efficacy and safety of a specific inhibitor of the bcr-abl tyrosine kinase in chronic myeloid leukemia. *The New England journal of medicine* 2001;344:1031-1037.
27. Mitsudomi T, Morita S, Yatabe Y, Negoro S, Okamoto I, Tsurutani J, Seto T, Satouchi M, Tada H, Hirashima T, Asami K, Katakami N, Takada M, Yoshioka H, Shibata K, Kudoh S, Shimizu E, Saito H, Toyooka S, Nakagawa K, Fukuoka M, West Japan Oncology G. Gefitinib versus cisplatin plus docetaxel in patients with non-small-cell lung cancer harbouring mutations of the epidermal growth factor receptor (wjtog3405): An open label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2010;11:121-128.
28. Rosell R, Carcereny E, Gervais R, Vergnenegre A, Massuti B, Felip E, Palmero R, Garcia-Gomez R, Pallares C, Sanchez JM, Porta R, Cobo M, Garrido P, Longo F, Moran T, Insa A, De Marinis F, Corre R, Bover I, Illiano A, Dansin E, de Castro J, Milella M, Reguart N, Altavilla G, Jimenez U, Provencio M, Moreno MA,

- Terrasa J, Munoz-Langa J, Valdivia J, Isla D, Domine M, Molinier O, Mazieres J, Baize N, Garcia-Campelo R, Robinet G, Rodriguez-Abreu D, Lopez-Vivanco G, Gebbia V, Ferrera-Delgado L, Bombaron P, Bernabe R, Bearz A, Artal A, Cortesi E, Rolfo C, Sanchez-Ronco M, Drozdowskyj A, Queralt C, de Aguirre I, Ramirez JL, Sanchez JJ, Molina MA, Taron M, Paz-Ares L, Spanish Lung Cancer Group in collaboration with Groupe Francais de P-C, Associazione Italiana Oncologia T. Erlotinib versus standard chemotherapy as first-line treatment for european patients with advanced egfr mutation-positive non-small-cell lung cancer (eurtac): A multicentre, open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:239-246.
29. Flaherty KT, Puzanov I, Kim KB, Ribas A, McArthur GA, Sosman JA, O'Dwyer PJ, Lee RJ, Grippo JF, Nolop K, Chapman PB. Inhibition of mutated, activated braf in metastatic melanoma. *The New England journal of medicine* 2010;363:809-819.
30. Kwak EL, Bang YJ, Camidge DR, Shaw AT, Solomon B, Maki RG, Ou SH, Dezube BJ, Jänne PA, Costa DB, Varella-Garcia M, Kim WH, Lynch TJ, Fidias P, Stubbs H, Engelman JA, Sequist LV, Tan W, Gandhi L, Mino-Kenudson M, Wei GC, Shreeve SM, Ratain MJ, Settleman J, Christensen JG, Haber DA, Wilner K, Salgia R, Shapiro GI, Clark JW, Iafrate AJ. Anaplastic lymphoma kinase inhibition in non-small-cell lung cancer. *The New England journal of medicine* 2010;363:1693-1703.
31. Shaw AT, Kim DW, Nakagawa K, Seto T, Crino L, Ahn MJ, De Pas T, Besse B, Solomon BJ, Blackhall F, Wu YL, Thomas M, O'Byrne KJ, Moro-Sibilot D,

- Camidge DR, Mok T, Hirsh V, Riely GJ, Iyer S, Tassell V, Polli A, Wilner KD, Janne PA. Crizotinib versus chemotherapy in advanced alk-positive lung cancer. *The New England journal of medicine* 2013;368:2385-2394.
32. Collins FS, Varmus H. A new initiative on precision medicine. *The New England journal of medicine* 2015;372:793-795.
33. Dias-Santagata D, Akhavanfard S, David SS, Vernovsky K, Kuhlmann G, Boisvert SL, Stubbs H, McDermott U, Settleman J, Kwak EL, Clark JW, Isakoff SJ, Sequist LV, Engelman JA, Lynch TJ, Haber DA, Louis DN, Ellisen LW, Borger DR, Iafrate AJ. Rapid targeted mutational analysis of human tumours: A clinical platform to guide personalized cancer medicine. *EMBO Mol Med* 2010;2:146-158.
34. Zehir A, Benayed R, Shah RH, Syed A, Middha S, Kim HR, Srinivasan P, Gao J, Chakravarty D, Devlin SM, Hellmann MD, Barron DA, Schram AM, Hameed M, Dogan S, Ross DS, Hechtman JF, DeLair DF, Yao J, Mandelker DL, Cheng DT, Chandramohan R, Mohanty AS, Ptashkin RN, Jayakumaran G, Prasad M, Syed MH, Rema AB, Liu ZY, Nafa K, Borsu L, Sadowska J, Casanova J, Bacares R, Kiecka IJ, Razumova A, Son JB, Stewart L, Baldi T, Mullaney KA, Al-Ahmadie H, Vakiani E, Abeshouse AA, Penson AV, Jonsson P, Camacho N, Chang MT, Won HH, Gross BE, Kundra R, Heins ZJ, Chen HW, Phillips S, Zhang H, Wang J, Ochoa A, Wills J, Eubank M, Thomas SB, Gardos SM, Reales DN, Galle J, Durany R, Cambria R, Abida W, Cercek A, Feldman DR, Gounder MM, Hakimi AA, Harding JJ, Iyer G, Janjigian YY, Jordan EJ, Kelly CM, Lowery MA, Morris LGT, Omuro AM, Raj N, Razavi P, Shoushtari AN, Shukla N, Soumerai TE,

- Varghese AM, Yaeger R, Coleman J, Bochner B, Riely GJ, Saltz LB, Scher HI, Sabbatini PJ, Robson ME, Klimstra DS, Taylor BS, Baselga J, Schultz N, Hyman DM, Arcila ME, Solit DB, Ladanyi M, Berger MF. Mutational landscape of metastatic cancer revealed from prospective clinical sequencing of 10,000 patients. *Nat Med* 2017;23:703-713.
35. Engelman JA. Targeting pi3k signalling in cancer: Opportunities, challenges and limitations. *Nat Rev Cancer* 2009;9:550-562.
36. Courtney KD, Corcoran RB, Engelman JA. The pi3k pathway as drug target in human cancer. *J Clin Oncol* 2010.
37. Xue G, Hemmings BA. Pkb/akt-dependent regulation of cell motility. *J Natl Cancer Inst* 2013.
38. Schmidt-Kittler O, Zhu J, Yang J, Liu G, Hendricks W, Lengauer C, Gabelli SB, Kinzler KW, Vogelstein B, Huso DL, Zhou S. Pi3kalpha inhibitors that inhibit metastasis. *Oncotarget* 2010;1:339-348.
39. Samuels Y, Wang Z, Bardelli A, Silliman N, Ptak J, Szabo S, Yan H, Gazdar A, Powell SM, Riggins GJ, Willson JK, Markowitz S, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. High frequency of mutations of the pik3ca gene in human cancers. *Science* 2004;304:554.
40. Gallia GL, Rand V, Siu IM, Eberhart CG, James CD, Marie SK, Oba-Shinjo SM, Carlotti CG, Caballero OL, Simpson AJ, Brock MV, Massion PP, Carson BS, Sr., Riggins GJ. Pik3ca gene mutations in pediatric and adult glioblastoma multiforme. *Mol Cancer Res* 2006;4:709-714.

41. Mizoguchi M, Nutt CL, Mohapatra G, Louis DN. Genetic alterations of phosphoinositide 3-kinase subunit genes in human glioblastomas. *Brain Pathol* 2004;14:372-377.
42. Samuels Y, Diaz LA, Jr., Schmidt-Kittler O, Cummins JM, Delong L, Cheong I, Rago C, Huso DL, Lengauer C, Kinzler KW, Vogelstein B, Velculescu VE. Mutant *pik3ca* promotes cell growth and invasion of human cancer cells. *Cancer Cell* 2005;7:561-573.
43. Engelman JA, Chen L, Tan X, Crosby K, Guimaraes AR, Upadhyay R, Maira M, McNamara K, Perera SA, Song Y, Chirieac LR, Kaur R, Lightbown A, Simendinger J, Li T, Padera RF, Garcia-Echeverria C, Weissleder R, Mahmood U, Cantley LC, Wong KK. Effective use of *pi3k* and *mek* inhibitors to treat mutant *kras* g12d and *pik3ca* h1047r murine lung cancers. *Nat Med* 2008;14:1351-1356.
44. Weber GL, Parat MO, Binder ZA, Gallia GL, Riggins GJ. Abrogation of *pik3ca* or *pik3r1* reduces proliferation, migration, and invasion in glioblastoma multiforme cells. *Oncotarget* 2011;2:833-849.
45. Jaiswal BS, Janakiraman V, Kljavin NM, Chaudhuri S, Stern HM, Wang W, Kan Z, Dbouk HA, Peters BA, Waring P, Dela Vega T, Kenski DM, Bowman KK, Lorenzo M, Li H, Wu J, Modrusan Z, Stinson J, Eby M, Yue P, Kaminker JS, de Sauvage FJ, Backer JM, Seshagiri S. Somatic mutations in *p85alpha* promote tumorigenesis through class ia *pi3k* activation. *Cancer Cell* 2009;16:463-474.

46. Zhao HF, Wang J, Shao W, Wu CP, Chen ZP, To ST, Li WP. Recent advances in the use of pi3k inhibitors for glioblastoma multiforme: Current preclinical and clinical development. *Mol Cancer* 2017;16:100.
47. Pitz MW, Eisenhauer EA, MacNeil MV, Thiessen B, Easaw JC, Macdonald DR, Eisenstat DD, Kakumanu AS, Salim M, Chalchal H, Squire J, Tsao MS, Kamel-Reid S, Banerji S, Tu D, Powers J, Hausman DF, Mason WP. Phase ii study of px-866 in recurrent glioblastoma. *Neuro Oncol* 2015;17:1270-1274.
48. Lai A, Kharbanda S, Pope WB, Tran A, Solis OE, Peale F, Forrest WF, Pujara K, Carrillo JA, Pandita A, Ellingson BM, Bowers CW, Soriano RH, Schmidt NO, Mohan S, Yong WH, Seshagiri S, Modrusan Z, Jiang Z, Aldape KD, Mischel PS, Liau LM, Escovedo CJ, Chen W, Nghiemphu PL, James CD, Prados MD, Westphal M, Lamszus K, Cloughesy T, Phillips HS. Evidence for sequenced molecular evolution of idh1 mutant glioblastoma from a distinct cell of origin. *J Clin Oncol* 2011;29:4482-4490.
49. Wu G, Broniscer A, McEachron TA, Lu C, Paugh BS, Becksfort J, Qu C, Ding L, Huether R, Parker M, Zhang J, Gajjar A, Dyer MA, Mullighan CG, Gilbertson RJ, Mardis ER, Wilson RK, Downing JR, Ellison DW, Zhang J, Baker SJ, St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome P. Somatic histone h3 alterations in pediatric diffuse intrinsic pontine gliomas and non-brainstem glioblastomas. *Nat Genet* 2012;44:251-253.
50. Ceccarelli M, Barthel FP, Malta TM, Sabedot TS, Salama SR, Murray BA, Morozova O, Newton Y, Radenbaugh A, Pagnotta SM, Anjum S, Wang J,

- Manyam G, Zoppoli P, Ling S, Rao AA, Grifford M, Cherniack AD, Zhang H, Poisson L, Carlotti CG, Jr., Tirapelli DP, Rao A, Mikkelsen T, Lau CC, Yung WK, Rabadan R, Huse J, Brat DJ, Lehman NL, Barnholtz-Sloan JS, Zheng S, Hess K, Rao G, Meyerson M, Beroukhi R, Cooper L, Akbani R, Wensch M, Haussler D, Aldape KD, Laird PW, Gutmann DH, Network TR, Nushmehr H, Iavarone A, Verhaak RG. Molecular profiling reveals biologically discrete subsets and pathways of progression in diffuse glioma. *Cell* 2016;164:550-563.
51. Shirahata M, Ono T, Stichel D, Schrimpf D, Reuss DE, Sahm F, Koelsche C, Wefers A, Reinhardt A, Huang K, Sievers P, Shimizu H, Nanjo H, Kobayashi Y, Miyake Y, Suzuki T, Adachi JI, Mishima K, Sasaki A, Nishikawa R, Bewerunge-Hudler M, Ryzhova M, Absalyamova O, Golanov A, Sinn P, Platten M, Jungk C, Winkler F, Wick A, Hanggi D, Unterberg A, Pfister SM, Jones DTW, van den Bent M, Hegi M, French P, Baumert BG, Stupp R, Gorlia T, Weller M, Capper D, Korshunov A, Herold-Mende C, Wick W, Louis DN, von Deimling A. Novel, improved grading system(s) for idh-mutant astrocytic gliomas. *Acta Neuropathol* 2018;136:153-166.
52. Stupp R, Mason W, van den Bent M, Weller M, Fisher B, Taphoorn M, Belanger K, Brandes A, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer R, Ludwin S, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross J, Eisenhauer E, Mirimanoff R. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 2005;352:987-996.
53. Chi AS, Batchelor TT, Dias-Santagata D, Borger D, Stiles CD, Wang DL, Curry WT, Wen PY, Ligon KL, Ellisen L, Louis DN, Iafrate AJ. Prospective, high-

- throughput molecular profiling of human gliomas. *J Neurooncol* 2012;110:89-98.
54. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific pcr: A novel pcr assay for methylation status of cpg islands. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93:9821-9826.
 55. Esteller M, Sanchez-Cespedes M, Rosell R, Sidransky D, Baylin SB, Herman JG. Detection of aberrant promoter hypermethylation of tumor suppressor genes in serum DNA from non-small cell lung cancer patients. *Cancer Res* 1999;59:67-70.
 56. Macdonald DR, Cascino TL, Schold SC, Jr., Cairncross JG. Response criteria for phase ii studies of supratentorial malignant glioma. *J Clin Oncol* 1990;8:1277-1280.
 57. Wen PY, Macdonald DR, Reardon DA, Cloughesy TF, Sorensen AG, Galanis E, Degroot J, Wick W, Gilbert MR, Lassman AB, Tsien C, Mikkelsen T, Wong ET, Chamberlain MC, Stupp R, Lamborn KR, Vogelbaum MA, van den Bent MJ, Chang SM. Updated response assessment criteria for high-grade gliomas: Response assessment in neuro-oncology working group. *J Clin Oncol* 2010;28:1963-1972.
 58. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, Gross BE, Sumer SO, Aksoy BA, Jacobsen A, Byrne CJ, Heuer ML, Larsson E, Antipin Y, Reva B, Goldberg AP, Sander C, Schultz N. The cbio cancer genomics portal: An open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2:401-404.

59. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, Dresdner G, Gross B, Sumer SO, Sun Y, Jacobsen A, Sinha R, Larsson E, Cerami E, Sander C, Schultz N. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cbioportal. *Sci Signal* 2013;6:pl1.
60. Wick W, Platten M, Meisner C, Felsberg J, Tabatabai G, Simon M, Nikkhah G, Papsdorf K, Steinbach JP, Sabel M, Combs SE, Vesper J, Braun C, Meixensberger J, Ketter R, Mayer-Steinacker R, Reifenberger G, Weller M, Society ftN-SGotN-oWGNotGC. Temozolomide chemotherapy alone versus radiotherapy alone for malignant astrocytoma in the elderly: The noa-08 randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012;13:707-715.
61. Malmström A, Grønberg BH, Marosi C, Stupp R, Frappaz D, Schultz H, Abacioglu U, Tavelin B, Lhermitte B, Hegi ME, Rosell J, Henriksson R, (NCBTSG) ftNCBTSG. Temozolomide versus standard 6-week radiotherapy versus hypofractionated radiotherapy in patients older than 60 years with glioblastoma: The nordic randomised, phase 3 trial. *Lancet Oncol* 2012.
62. Roa W, Brasher PM, Bauman G, Anthes M, Bruera E, Chan A, Fisher B, Fulton D, Gulavita S, Hao C, Husain S, Murtha A, Petruk K, Stewart D, Tai P, Urtasun R, Cairncross JG, Forsyth P. Abbreviated course of radiation therapy in older patients with glioblastoma multiforme: A prospective randomized clinical trial. *J Clin Oncol* 2004;22:1583-1588.
63. McNeill RS, Stroobant EE, Smithberger E, Canoutas DA, Butler MK, Shelton AK, Patel SD, Limas JC, Skinner KR, Bash RE, Schmid RS, Miller CR. Pik3ca

- missense mutations promote glioblastoma pathogenesis, but do not enhance targeted pi3k inhibition. *PLoS One* 2018;13:e0200014.
64. Shin MK, Payne S, Bilger A, Matkowskyj KA, Carchman E, Meyer DS, Bentires-Alj M, Deming DA, Lambert PF. Activating mutations in pik3ca contribute to anal carcinogenesis in the presence or absence of hpv-16 oncogenes. *Clin Cancer Res* 2019;25:1889-1900.
65. Sanson M, Marie Y, Paris S, Idbaih A, Laffaire J, Ducray F, El Hallani S, Boisselier B, Mokhtari K, Hoang-Xuan K, Delattre JY. Isocitrate dehydrogenase 1 codon 132 mutation is an important prognostic biomarker in gliomas. *J Clin Oncol* 2009;27:4150-4154.
66. Weller M, Felsberg J, Hartmann C, Berger H, Steinbach JP, Schramm J, Westphal M, Schackert G, Simon M, Tonn JC, Heese O, Krex D, Nikkhah G, Pietsch T, Wiestler O, Reifenberger G, von Deimling A, Loeffler M. Molecular predictors of progression-free and overall survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: A prospective translational study of the german glioma network. *J Clin Oncol* 2009;27:5743-5750.
67. Ohgaki H, Kleihues P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am J Pathol* 2007;170:1445-1453.
68. Snuderl M, Fazlollahi L, Le LP, Nitta M, Zhelyazkova BH, Davidson CJ, Akhavanfard S, Cahill DP, Aldape KD, Betensky RA, Louis DN, Iafrate AJ. Mosaic amplification of multiple receptor tyrosine kinase genes in glioblastoma. *Cancer Cell* 2011;20:810-817.

69. Okada Y, Hurwitz EE, Esposito JM, Brower MA, Nutt CL, Louis DN. Selection pressures of tp53 mutation and microenvironmental location influence epidermal growth factor receptor gene amplification in human glioblastomas. *Cancer Res* 2003;63:413-416.
70. Brandes AA, Tosoni A, Franceschi E, Sotti G, Frezza G, Amista P, Morandi L, Spagnolli F, Ermani M. Recurrence pattern after temozolomide concomitant with and adjuvant to radiotherapy in newly diagnosed patients with glioblastoma: Correlation with mgmt promoter methylation status. *J Clin Oncol* 2009;27:1275-1279.
71. Yu CC, Qiu W, Juang CS, Mansukhani MM, Halmos B, Su GH. Mutant allele specific imbalance in oncogenes with copy number alterations: Occurrence, mechanisms, and potential clinical implications. *Cancer letters* 2017;384:86-93.
72. Lee JK, Wang J, Sa JK, Ladewig E, Lee HO, Lee IH, Kang HJ, Rosenbloom DS, Camara PG, Liu Z, van Nieuwenhuizen P, Jung SW, Choi SW, Kim J, Chen A, Kim KT, Shin S, Seo YJ, Oh JM, Shin YJ, Park CK, Kong DS, Seol HJ, Blumberg A, Lee JI, Iavarone A, Park WY, Rabadan R, Nam DH. Spatiotemporal genomic architecture informs precision oncology in glioblastoma. *Nat Genet* 2017;49:594-599.
73. Koul D, Shen R, Kim YW, Kondo Y, Lu Y, Bankson J, Ronen SM, Kirkpatrick DL, Powis G, Yung WK. Cellular and in vivo activity of a novel pi3k inhibitor, px-866, against human glioblastoma. *Neuro Oncol* 2010;12:559-569.

74. Kleber S, Sancho-Martinez I, Wiestler B, Beisel A, Gieffers C, Hill O, Thiemann M, Mueller W, Sykora J, Kuhn A, Schreglmann N, Letellier E, Zuliani C, Klussmann S, Teodorczyk M, Grone H, Ganten T, Sultmann H, Tuttentberg J, von Deimling A, Regnier-Vigouroux A, Herold-Mende C, Martin-Villalba A. Yes and pi3k bind cd95 to signal invasion of glioblastoma. *Cancer Cell* 2008;13:235-248.
75. Pu P, Kang C, Li J, Jiang H. Antisense and dominant-negative akt2 cdna inhibits glioma cell invasion. *Tumour Biol* 2004;25:172-178.
76. Liang H, Wang R, Jin Y, Li J, Zhang S. Mir-422a acts as a tumor suppressor in glioblastoma by targeting pik3ca. *Am J Cancer Res* 2016;6:1695-1707.
77. Broderick DK, Di C, Parrett TJ, Samuels YR, Cummins JM, McLendon RE, Fults DW, Velculescu VE, Bigner DD, Yan H. Mutations of pik3ca in anaplastic oligodendrogliomas, high-grade astrocytomas, and medulloblastomas. *Cancer Res* 2004;64:5048-5050.
78. Oda K, Okada J, Timmerman L, Rodriguez-Viciano P, Stokoe D, Shoji K, Taketani Y, Kuramoto H, Knight ZA, Shokat KM, McCormick F. Pik3ca cooperates with other phosphatidylinositol 3'-kinase pathway mutations to effect oncogenic transformation. *Cancer Res* 2008;68:8127-8136.

IX. 謝辞

本研究にあたりご指導を賜りました東京大学大学院医学系研究科脳神経外科学教室・齊藤延人教授に深く感謝いたします。

論文作成にあたり詳細なご意見を賜りました高柳俊作先生に深く感謝いたします。

遺伝子解析に際しご尽力を賜りました小俣麻友さん、松浦玲子さんに深く感謝いたします。また、研究データの解釈について貴重なご意見を賜りました野村昌志先生、根城堯英先生、高橋慧先生、北川陽介先生、花大洵先生、小池司先生に深く感謝いたします。

本研究の企画・遂行する機会を賜り、また論文化までご指導を賜りましたハーバード大学医学部・マサチューセッツ総合病院脳脊髄腫瘍科・トレーシー・バッチェラーTracy T. Batchelor 教授（現・同大学医学部・ブリガムアンドウイメンズ病院神経内科）、アンドリュー・チーAndrew S. Chi 先生（現・ネオン・セラピューティックス）、マサチューセッツ総合病院脳神経外科・ダン・ケーヒルDaniel P. Cahill 先生に深く感謝いたします。