

神経膠腫における¹H-Magnetic Resonance Spectroscopy (MRS) と LCModelを用いた2-hydroxyglutarate (2-HG) 検出及びその定量的解析

久 米 賢¹⁾ 五 明 美 穂²⁾ 小 林 啓 一¹⁾
 齊 藤 邦 昭¹⁾ 土 屋 一 洋^{2), 3)} 似 鳥 俊 明²⁾
 塩 川 芳 昭¹⁾ 永 根 基 雄¹⁾

1) 杏林大学医学部脳神経外科学

2) 杏林大学医学部放射線科学

3) 東京通信病院放射線科

【抄 録】

*IDH1/2*遺伝子異常を持つ神経膠腫では腫瘍特異的オンコメタボライトである2-hydroxyglutarate (2-HG) が細胞内に異常集積する。今回神経膠腫と画像類似疾患を3Tでの¹H-MRSとLCModelを用い2-HGとその他蛋白質の定量的解析を行った。対象症例68例、総解析数127回、2-HGを検出し得た解析は16回であり、検出感度34%、特異度80%、精度60%であった。したがって、¹H-MRSとLCModelを用いて2-HGの定量的分析が可能であったが、検出精度は十分とは言えず、今後は適切な関心領域の設定条件やMRSの測定条件、代謝産物との関連性を検討し、精度を高める必要がある。

Key words: *IDH1/2*, glioma, LCModel, 2-hydroxyglutarate, MR spectroscopy

【はじめに】

神経膠腫 (glioma) は原発性脳腫瘍の中で最も高頻度で、未だ致死的な悪性腫瘍であり、予後と組織型により世界保健機関 (WHO) の定める悪性度分類 (Grade) のI～IVに分類される¹⁾。その発生と悪性転化には種々の遺伝子異常が関与していることが知られているが、特に近年発見された*IDH1/IDH2*遺伝子異常はGrade II/IIIの神経膠腫の大多数、及び一部のGrade IV膠芽腫 (glioblastoma, GBM) に認められ²⁾、2016年に改訂されたWHO脳腫瘍分類においては、*IDH*変異の有無を病理組織診断名に明記することが必須となった³⁾。したがって、*IDH*変異の有無を検出することは、悪性脳腫瘍の診断上、また治療方針決定上極めて重要である。

*IDH1/2*は細胞内でKrebs回路に属してisocitrateを α -ketoglutarate (α -KG) へ変換する代謝酵素である。*IDH1/2*遺伝子変異により生じる変異型*IDH1/2*は、 α -KG合成阻害とともに α -KGから(R)-2-hydroxy-glutarate (2-HG) の生成を促進する。2-HGはヒストン脱メチル化酵素及びDNA脱メチル化酵素を阻害することで、DNAの広範なメチル化と異常な遺伝子発現を誘導し、血管新生も促進することなどにより細胞の腫瘍化に直接寄与するオンコメタボライトとして機能する⁴⁾。

脳腫瘍においては、神経膠腫以外の腫瘍では*IDH1/2*遺伝子変異の報告はなく、極めて神経膠腫に特異的なマーカーであり、90%以上が*IDH1*変異である²⁾。神経膠腫の中でもGrade II及びIIIのびまん性星細胞腫 (diffuse astrocytoma, DA)、乏突起膠腫 (oligodendroglioma, OD)、乏突起星細胞腫 (oligoastrocytoma, OA)、ならびにGrade II/III DAまたは退形成性星細胞腫 (anaplastic astrocytoma, AA) から悪性転化の過程を経てGrade IVと変化する二次性膠芽腫 (secondary GBM) にのみ70%を超える高頻度で検出されるが、初発時から膠芽腫である一次性膠芽腫 (primary GBM) (5%程度)、最も低悪性度のGrade Iの毛様細胞性星細胞腫 (pilocytic astrocytoma, PA) (0%)、脳室壁から発生する上衣腫 (ependymoma) (0%)、小児小脳に発生する悪性脳腫瘍の髄芽腫 (medulloblastoma) (0%) ではほとんど認められず、組織型・Grade特異的な診断マーカーの側面も有している²⁾。

*IDH*変異の検出法としては、*IDH1/2*遺伝子変異がほぼ各遺伝子の一つのコドンに局限した点変異であることから、*IDH1*ではコドン132アルギニン、*IDH2*ではコドン172アルギニン位を標的としたサンガーシーケンス法が

最も広く行われている²⁾。また、全てのIDH変異の90%以上を占めるIDH1^{R132H}変異に対する特異抗体を用いた免疫染色法により、容易に変異の有無を検出可能である⁵⁾。しかし、これらの方法は、腫瘍標本が必須であり、術前あるいは非手術例では実施が不可能である。

IDH1/2変異をもつ神経膠腫では2-HGが細胞内に異常集積し、特殊な条件でのMRスペクトロスコピー (MRS) で非観血的に2-HGを検出できることが報告された⁶⁻⁸⁾。2-HGは¹H-MRS上、2.25 ppm付近にピークをもつスペクトラムを示す。この部位には脳内のその他のメタボライト (代謝物) のピークも集積しているため、3テスラ (T) 以上の高磁場MRI装置を使用し、2-HGとその他の代謝物を分離するためのMRS撮像法と解析方法が検討されている⁶⁻⁸⁾。LCModelは¹H-MRSから代謝産物の定量解析を行うソフトウェアであり、MRSで得られた生のDICOMデータのスペクトラムを自動処理 (フーリエ変換, 位相補正等) し、MRI装置、TE値毎にBasis-setデータと比較し、代謝物毎のピーク分離で計算されるピークエリアから各代謝物の定量計算を自動処理により行う。LCModel解析により、2-HGを含めた脳内代謝物の定量的検出が可能となることから、LCModelを用いたMRSによる2-HG検出は、IDH変異をもつ多くの神経膠腫症例において、非侵襲的に、術前検査として、また治療後の効果判定ならびに再発の有無を評価するための有力な検査法となることが期待される^{8,9)}。

今回、LCModelを用いて、神経膠腫を含めた多種の脳疾患症例を対象に、2-HG検出の定量的解析と特異性、臨床的有用性を検討した。

【対象・方法】

症例：

2014年12月～2015年11月に当院にて脳腫瘍、特に神経膠腫と病理組織診断された、または画像上疑われた症例、及びその他の脳腫瘍例、脳腫瘍類似疾患例において、以下の方法でMRIが撮像された症例を適格とした。

MRI撮像：

3T MRI装置 (東芝メディカルシステムズ製 TITAN 3T) を用い、¹H-MRSを以下の条件 (single voxel, voxel size = 15 × 15 × 15 または 20 × 20 × 20 mm, PRESS sequence, TR = 2000 ms, TE = 35, 97 ms) で撮像した。LCModelによる解析：

上記撮像法で獲得されたMRS DICOMデータは解析用PCへデータ転送され、LCModelを用いてデータ処理を行い、2-HGとその他蛋白質の定量的解析を行った。LCModelでは2-HGを含む蛋白質の定量値とともに%SD (standard deviation) も自動的に解析される。この%SDが50%以上では検出した蛋白質の定量値の誤差範囲が0を

下回る可能性があるため、2-HGを検出した解析では%SD < 50%を有意な検出とし、%SD ≥ 50%を測定精度が低いとして除外した。

IDH変異解析：

神経膠腫におけるIDH1/2変異遺伝子の有無はIDH1ではコドン132アルギニン、IDH2ではコドン172アルギニン位を標的としたサンガーシーケンス法を用いて検出した。また腫瘍標本切片ではIDH1^{R132H}変異に特異的な抗体を用いた免疫組織化学染色による変異検出も行った¹⁰⁾。

倫理的配慮：

本研究は、杏林大学医学部臨床疫学研究審査委員会にて承認され、人を対象とする医学系研究に関する倫理指針に則り、当科ホームページに公開し実施された。

【結果】

対象症例の病理診断とIDH変異：

上記期間中に本研究に該当した対象症例数は68例、男女比 = 7:10、年齢中央値は45才 (6-89才) であった。内、摘出または生検術により病理診断が確定した症例は42例であった。撮像されたMR DICOMデータを全例でLCModelにて解析した。IDH1/2遺伝子変異を有する群 (以下変異群) はGrade IVであるGBM 6例、GBM with oligodendroglioma component (GBMO) 1例、Grade IIIであるAA、退形成性乏突起膠腫 (anaplastic oligodendroglioma, AO)、退形成性乏突起星細胞腫 (anaplastic oligoastrocytoma, AOA) が合わせて9例、Grade IIであるDA, OD, OAが合わせて4例であった。IDH1/2遺伝子変異を有さない群 (以下非変異群) はGBM 9例、Grade III 1例、Grade II 5例であり、その他に他院にて生検されIDH1/2の変異が不明な2例の低悪性度神経膠腫 (low-grade glioma, LGG) 2例であった。

摘出または生検術にて確定診断された非神経膠腫例は、中枢神経系原発悪性リンパ腫 (primary central nervous system lymphoma, PCNSL) 3例、髄膜腫 (meningioma, MGM) 2例 (2例ともtransitional type)、脳膿瘍 (brain abscess) 1例、転移性脳腫瘍 (metastatic brain tumor) 1例、リンパ腫様肉芽腫症 (lymphomatoid granulomatosis, LYG) 1例、正常脳組織1例であった。非病理診断例は22例であった。

LCModel解析：

LCModelによる総解析数は127回 (TE = 35 ms 119回, TE = 97 ms 8回) であった。このうち2-HGを検出し得た解析は16回であり、1例で放射線化学療法の前後で同一病変を測定したため症例数は15例であった。Fig. 1に当院にてLCModelを用いて実際に解析した典型的データを示す。MR DICOMデータより2-HGを含む各代謝産物が定量的に検出され (Fig. 1a)、検出した2-HGのスペクトラムのみ

を選択的にグラフ上に可視化すると、2-HGは2.25 ppm付近のMRS上に波形として得られた (Fig. 1b)。

次にLCModelによる2-HG含有量解析の各症例における結果をTable 1に示す。2-HG検出例では2-HG含有量の中央値は2.563 mM、2-HGの% SD中央値は38%であった。LCModelによる2-HG検出の効率性：

LCModelにより2-HGと同時に測定される% SDにより検出精度の低い例を除外すると、解析回数は47回、このうち2-HGを検出した解析はTable 1に示す16回、2-HGを検出し得なかった解析は41回であった。2-HGを検出し得なかった解析は神経腫36回、その他の腫瘍で6回、その他の疾患3回、非生検例2回であった。このうち神経腫腫瘍例において、*IDH*変異群での解析は計14回 (Grade IV 7回, Grade III 2回, Grade II 6回) であり、*IDH*非変異群の解析は16回 (Grade IV 8回, Grade III 1回, Grade II 7回) であった。*IDH*変異群において腫瘍摘出前や摘出後再増大病変、部分摘出後残存病変という「2-HGを検出すべきである」関心領域を設定し、2-HGを検出し得た解析 (true positive) はTable 1に示す8回、*IDH*非変異群または非神経腫腫瘍において2-HGを検出した解析 (false positive) は6回、*IDH*変異群において「2-HGを検出すべきである」関心領域を設定したにも関わらず2-HGを検出し得なかった解析 (false negative) は15回、*IDH*非変異群または非神経腫腫瘍において2-HGを検出し得なかった解析 (true negative) は24回であった。そのため本研究において、LCModelを用いた*IDH*遺伝子変異の検出感度は34%、特異度80%、精度60%という結果であった。

【考 察】

今回、脳腫瘍症例において、¹H-MRSとLCModelを用い

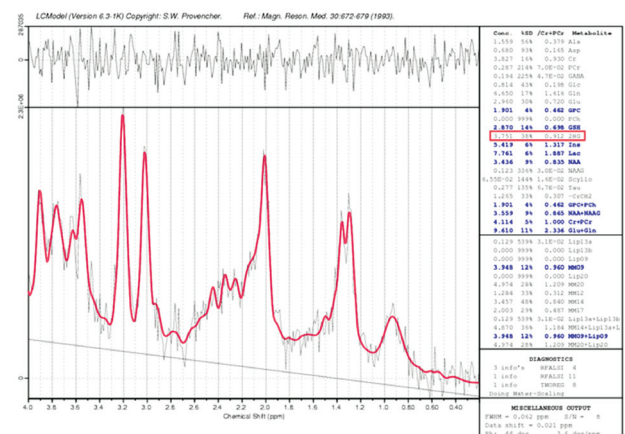


Fig. 1a LCModelによるメタボライトの定量的解析結果。図左にMRSの波形が、図右に定量解析された代謝産物の含有量が絶対値で表記される。赤四角が2-HGの値である。

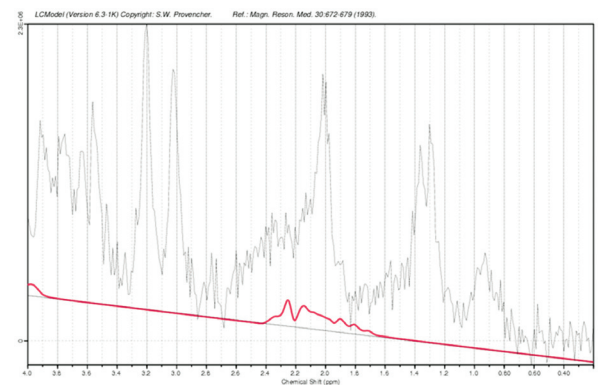


Fig. 1b LCModelによる2-HGのMRS波形。2-HGは2.25ppm付近にピークを持つ波形として解析される (赤線)。

Table 1 2-HG検出症例のLCModel解析結果と臨床情報

年齢	性別	診断	WHO Grade	mIDH	2-HG (mM)	2-HG %SD	TE (ms)	関心領域(ROI)	ROI 信号	壊死	化学療法	放射線療法
37	女性	GBM	IV	(+)	15.54	22	35	摘出残存病変	T2	無	済	済
34	男性	GBM	IV	(+)	8.096	10	35	摘出前	T2	無	未	未
35	男性	AOA	III	(+)	3.751	38	35	摘出後再増大	T2+CE	済	済	済
38	男性	AO	III	(+)	3.508	39	35	摘出後再増大	T2	無	済	済
37	女性	GBM	IV	(+)	3.179	49	97	摘出残存病変	T2+CE	無	未	未
45	男性	GBMO	IV	(+)	0.00145	39	97	摘出後再増大	T2+CE	済	済	済
45	女性	GBM	IV	(+)	0.00249	34	35	摘出後再増大	T2+CE	済	済	済
23	女性	AA	III	(+)	0.00135	40	35	摘出前	T2+CE	済	未	未
57	男性	AA	III	(-)	8.877	49	35	摘出前	T2	無	未	未
39	女性	OD	II	(-)	2.602	42	35	摘出後	T2	無	済	済
68	女性	DA	II	(-)	2.524	4	35	摘出後	T2	無	未	未
79	男性	GBM	IV	(-)	0.00523	16	35	摘出後	T2+CE	済	済	済
6	女性	正常脳組織		-	0.00296	34	35	摘出後	T2	無	未	未
56	女性	MGM		-	0.00184	44	35	摘出前	T2	済	未	未
76	男性	Biopsy(-)		-	5.083	43	35	摘出前	T2+CE	済	未	未
35	女性	Biopsy(-)		-	0.00293	39	35	摘出前	T2	無	未	未

た2-HGの定量的分析を行い、神経膠腫に特異的なkeyとなる遺伝子変異である*IDH*変異のある腫瘍で、*IDH*変異により腫瘍細胞内に産生されるオンコメタボライトである2-HGの非観血的検出が可能であった。特に今回解析した症例の中では、造影病変摘出術後の残存T2延長域に関心領域 (region of interest: ROI) を置いた例で2-HGが高度に検出されており、同部位への腫瘍細胞の浸潤を示唆する結果が得られ、非観血的に残存腫瘍や腫瘍診断、再発の評価を行うことができる可能性を示すことができた。

一方でその検出能力は決して高いとは言えず、*IDH*変異 (2-HGの存在) の検出は、感度34%、特異度80%、精度60%に留まった。低い感度を含め、これらの数値はこのままの方法で本法を日常の臨床利用に定常的に組み込む基準には達し得ない結果と考えられる。これまでに¹H-MRSを用いた測定では、感度100%、特異度72.2%との良好な報告もある¹¹⁾。この先行研究と本研究の違いとして、関心領域の設定部位の違いが挙げられる。先行研究では関心領域全体に腫瘍を設定できるような比較的大きな腫瘍や充実成分を対象としてきた。しかし本研究では関心領域を設定するにあたり以下の3つの課題が問題点として考えられる。

1点目の課題は、測定病変が小さな病変であることである。今回関心領域全体が腫瘍で満たされる大きな病変のみでなく、Grade II/ⅢのLGG例や摘出後残存病変、摘出後再増大例など比較的小さな病変も対象としている。これらの小病変では、関心領域内に病変部以外の正常脳組織を含んでしまうことは避けることができず、病変内に2-HGが産生されているにもかかわらず、相対的にその他代謝産物の信号にマスクされ、検出量が低くなってしまったことが考えられる。

2点目の課題としては、摘出後残存病変や摘出後再増大病変への関心領域の設定が挙げられる。腫瘍摘出術後摘出腔は摘出した腫瘍や錐体路や基底核など周囲の重要構造物、周囲脳の復元力により、複雑な形状となる。摘出術後残存病変やその再増大病変などは摘出腔に接することほとんどであるため、関心領域のvoxel内に摘出腔や脳溝の髄液を含んでしまうことや関心領域と髄液が非常に近接してしまうことが多くみられる。¹H-MRSは関心領域内や近傍に髄液を含む場合、髄液の大きなスペクトラムのピークにマスクされ代謝産物の検出が困難となるため、各スペクトラムの検出精度が下がってしまう結果となりやすい。本研究では、シグナルのバラツキの大きい2-HG% SD $\geq$ 50%以上は除外しているが、その除外例の中に本来であれば2-HGを検出し得た症例が含まれている可能性が考えられる。また2-HG検出例においても、2-HG% SD中央値が39%とその信号の検出精度は決して高くない。

3点目の課題としては、腫瘍内部の壊死巣が関心領域内

に含まれてしまうことである。Gradeの高い神経膠腫、特にGBMでは腫瘍内部に広範な壊死巣を伴うことが多く、増殖している腫瘍細胞は壊死巣周囲の造影病変に偏在している。そのためmass effectを呈する腫瘍は大きくとも、腫瘍辺縁に関心領域とせざるを得ず、実データが正常脳組織や壊死巣を含むこととなり、結果的にMR信号の検出が困難となってしまう。これら関心領域に関する問題に対し、ROIのvoxel sizeを15 $\times$ 15 $\times$ 15 mmまたは20 $\times$ 20 $\times$ 20 mmと小さくすることで対応したが、撮像時間の兼ね合いもありvoxelの大きさの制限によって、得られる信号も制限されてしまうことは避けられない。したがって、課題2と同様にノイズの程度が大きかった% SD $\geq$ 50%例の中に、この観点からも2-HG検出例が除外されていることも考えられる。

逆に、本研究において先行研究より特異度が高くなった理由として、非神経膠腫例の症例を含めたことが考えられる。非神経膠腫例では摘出前の腫瘍本体の測定を中心にしており、摘出後や生検後の病理診断確定後の関心領域の設定が困難になる例での追跡測定は行っていない。そのため2-HGを検出し得ない症例での解析 (true negative) を重ねた結果、先行研究より特異度が高くなった可能性がある。以上から、検出精度を高める目的で、適切な関心領域設定の条件検索が必要と考えられる。

本研究では先行研究と比較し、対象症例数が多い点、同一病変を複数回測定し解析している点、腫瘍本体以外も測定している点などが異なっている。しかし、それらの点から摘出後や小病変における適切な関心領域の設定という、先行研究にはない実臨床に沿った新たな問題を提起し得たものとする。今後のさらなる課題として、関心領域の設定の他、撮像条件、特にTE値について検討の余地がある。本研究では¹H-MRSの測定にTE = 35 ms (short TE) を主に用いているが、TE = 97 ms (long TE) がよりMRSにおける2-HG近傍の代謝産物との判別に優れているとの報告もある⁶⁾。実際、本研究においてはlong TEを測定した症例もあり、short TEとlong TEの同一症例での比較検討も重要な課題と言える。また2-HGと同時測定した代謝産物のデータを用いることで2-HGとの組み合わせの情報解析を行うことが可能である。特に*IDH*変異によって生じ得る細胞内の代謝系変化と連携する分子について、同一の関心領域においての増減を評価することで2-HGの検出精度を高める方法を現在検討中である。

【結 論】

脳腫瘍の症例で¹H-MRSとLCModelを用いて腫瘍特異的オンコメタボライトである2-HGの定量的分析が可能であった。しかし、摘出後残存病変や再増大病変、小病変における2-HGの測定を臨床利用するには適切な関心領域の

設定条件や¹H-MRSの測定条件、代謝産物との関連性を検討し、精度を高める必要がある。

Conflict of interest:

本研究に関する開示すべきCOIはない。

【文献】

- 1) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK: WHO classification of tumours of the central nervous system, (ed 4th). Lyon, IARC Press, 2007, pp 10–11
- 2) Yan H, Parsons DW, Jin G, McLendon R, Rasheed BA, Yuan W, Kos I, Batinić-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. *N Engl J Med* 360: 765–773, 2009.
- 3) 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 Neuropathology--Haarlem consensus guidelines for nervous system tumor classification and grading. *Brain Pathol* 24: 429–435, 2014.
- 4) Ichimura K: Molecular pathogenesis of IDH mutations in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 29: 131–139, 2012.
- 5) Arita H, Narita Y, Yoshida A, Hashimoto N, Yoshimine T, Ichimura K: IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain Tumor Pathol* 2014.
- 6) Andronesi OC, Rapalino O, Gerstner E, Chi A, Batchelor TT, Cahill DP, Sorensen AG, Rosen BR: Detection of oncogenic IDH1 mutations using magnetic resonance spectroscopy of 2-hydroxyglutarate. *J Clin Invest* 123: 3659–3663, 2013.
- 7) Choi C, Ganji SK, DeBerardinis RJ, Hatanpaa KJ, Rakheja D, Kovacs Z, Yang XL, Mashimo T, Raisanen JM, Marin-Valencia I, Pascual JM, Madden CJ, Mickey BE, Malloy CR, Bachoo RM, Maher EA: 2-hydroxyglutarate detection by magnetic resonance spectroscopy in IDH-mutated patients with gliomas. *Nat Med* 18: 624–629, 2012.
- 8) Pope WB, Prins RM, Albert Thomas M, Nagarajan R, Yen KE, Bittinger MA, Salamon N, Chou AP, Yong WH, Soto H,

Wilson N, Driggers E, Jang HG, Su SM, Schenkein DP, Lai A, Cloughesy TF, Kornblum HI, Wu H, Fantin VR, Liao LM: Non-invasive detection of 2-hydroxyglutarate and other metabolites in IDH1 mutant glioma patients using magnetic resonance spectroscopy. *J Neurooncol* 107: 197–205, 2012.

- 9) Provencher SW: Estimation of metabolite concentrations from localized in vivo proton NMR spectra. *Magn Reson Med* 30: 672–679, 1993.
- 10) Capper D, Weissert S, Balss J, Habel A, Meyer J, Jäger D, Ackermann U, Tessmer C, Korshunov A, Zentgraf H, Hartmann C, von Deimling A: Characterization of R132H mutation-specific IDH1 antibody binding in brain tumors. *Brain Pathol* 20: 245–254, 2010.
- 11) Natsumeda M, Igarashi H, Nomura T, Ogura R, Tsukamoto Y, Kobayashi T, Aoki H, Okamoto K, Kakita A, Takahashi H, Nakada T, Fujii Y: Accumulation of 2-hydroxyglutarate in gliomas correlates with survival: a study by 3.0-tesla magnetic resonance spectroscopy. *Acta Neuropathol Commun* 2: 158, 2014.

【口演記録】

1. 久米 賢, 五明美穂¹, 小林啓一, 齋藤邦昭, 土屋一洋¹, 塩川芳昭, 永根基雄 (¹杏林大学 放射線医学): 悪性神経膠腫と画期的類似疾患におけるMRI/H-MRSとLCModelを用いた2-HG検出とその定量的解析. 第74回日本脳神経外科学会学術集会, 札幌, 2015年10月16日.
2. 久米 賢, 五明美穂¹, 小林啓一, 齋藤邦昭, 土屋一洋^{1, 2}, 塩川芳昭, 似鳥俊明¹, 永根基雄 (¹杏林大学 放射線医学, ²東京通信病院 放射線科): 神経膠腫における¹H-MRSとLCModelを用いた2-HG検出及びその定量的解析. 杏林医学会総会, 多摩, 2015年11月21日.
3. 久米 賢, 五明美穂¹, 小林啓一, 齋藤邦昭, 土屋一洋^{1, 2}, 塩川芳昭, 似鳥俊明¹, 永根基雄 (¹杏林大学 放射線医学, ²東京通信病院 放射線科): 神経膠腫における¹H-MRSとLCModelを用いた2-HG検出及びその定量的解析. 第33回脳腫瘍学会, 京都, 2015年12月7日.
4. 久米 賢, 五明美穂¹, 小林啓一, 齋藤邦昭, 土屋一洋^{1, 2}, 塩川芳昭, 似鳥俊明¹, 永根基雄 (¹杏林大学 放射線医学, ²東京通信病院 放射線科): 神経膠腫における¹H-MRSとLCModelを用いた2-HG検出及びその定量的解析. 第39回日本脳神経CI学会総会, 東京, 2016年1月29日.