HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	神経膠腫における遺伝子解析 ： 特に成人のBRAF V600E点変異に注目して
Author(s)	伊師, 雪友
Description	配架番号：2358
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第12979号
Issue Date	2018-03-22
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k12979
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/88961
Type	doctoral thesis
File Information	Yukitomo_Ishi.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

神経膠腫における遺伝子解析：特に成人の BRAF V600E 点変異に注目して

(Genetic Analysis of Gliomas: Focused on BRAF V600E Mutation in Adults)

2018 年 3 月

北海道大学

伊師雪友

目次

発表論文目録および学会発表目録 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 3 頁
緒言 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 4 頁
略語表 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 9 頁
実験方法 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・10 頁
実験結果 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・14 頁
考察 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・32 頁
総括および結論 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・36 頁
謝辞 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・ 38 頁
引用文献 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・39 頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

１．著者、雑誌名、巻数・頁、（発表年）

Yukitomo Ishi, Shigeru Yamaguchi, Michiharu Yoshida, Hiroaki Motegi, Hiroyuki Kobayashi, Shunsuke Terasaka, Kiyohiro Houkin. Clinicopathological Analysis of Adult High-grade Gliomas Harboring the *BRAF* V600E Mutation. Journal of Neuro-oncology （投稿中）

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 伊師雪友, 山口秀, 吉田道春, 遠藤将吾, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 ： 若年成人の神経膠腫に対するBRAFおよびH3F3A遺伝子変異検索の意義, 第33回 日本脳腫瘍学会学術集会, 2015年12月7日・京都
2. 伊師雪友, 山口秀, 畑中佳奈子, 藤田裕美, 吉田道春, 遠藤将吾, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 ： 様々な組織像を呈したBRAF変異を有する小児低悪性度神経膠腫の一例, 第34回 日本脳腫瘍病理学会, 2016年5月27日・東京
3. 伊師雪友, 山口秀, 畑中佳奈子, 藤田裕美, 吉田道春, 茂木洋晃, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 ： BRAFの変異に基づいた間脳毛様細胞性星細胞腫におけるMRI所見の特徴, 第34回 日本脳腫瘍学会学術集会, 2016年12月4日・甲府
4. 伊師雪友, 山口秀, 吉田道春, 茂木洋晃, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 ：BRAF V600変異を有する成人高悪性度神経膠腫の臨床病理学的検討, 第18回日本分子脳神経外科学会, 2017年8月27日・甲府
5. 伊師雪友, 山口秀, 茂木洋晃, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 ： 成人の小脳高悪性度神経膠腫の分子生物学的特徴と臨床像, 第22回日本脳腫瘍の外科学会, 2017年9月9日・鹿児島
6. 伊師雪友, 山口秀, 吉田道春, 茂木洋晃, 小林浩之, 寺坂俊介, 寶金清博 :てんかん発作で発症した小児・若年成人神経膠腫における遺伝子異常, 日本脳神経外科学会 第76回学術総会, 2017年10月14日・名古屋
7. Ishi Y, Yamaguchi S, Yoshida M, Motegi H, Kobayashi H, Terasaka S, Houkin K：Clinicopathological Analysis of Adult High-Grade Gliomas Harboring *BRAF* V600E Mutation, ASNO 2017 – 14th Meeting of the Asian Society for Neuro-Oncology, Osaka, 10.28.2017

緒言

神経膠腫は脳実質内腫瘍における代表的なカテゴリーの一つであり、その分類は多岐にわたる。世界保健機関（World Health Organization; WHO）分類において Grade 4 の膠芽腫（glioblastoma）をはじめ、星細胞系腫瘍のびまん性星細胞腫（diffuse astrocytoma）と退形成性星細胞腫（anaplastic astrocytoma）、乏突起膠細胞系腫瘍の乏突起膠腫（oligodendroglioma）と退形成性乏突起膠腫（anaplastic oligodendroglioma）に代表されるびまん性神経膠腫や、限局性神経膠腫に分類される毛様細胞性星細胞腫（pilocytic astrocytoma）や神経節膠腫（ganglioglioma）など様々な組織型が含まれる。成人神経膠腫では glioblastoma に代表されるびまん性神経膠腫が大部分を占める一方、小児では pilocytic astrocytoma に代表される限局性神経膠腫が代表的でびまん性神経膠腫の頻度は低いといった特徴がある。

近年の大規模な遺伝子解析の結果、神経膠腫における様々な原因遺伝子が特定されている。成人の神経膠腫では isocitrate dehydrogenase 1/2 (IDH1/2)や 1p19q 共欠失、telomerase reverse transcriptase (TERT)が代表的な原因遺伝子とされている。IDH1/2 の点変異は、Parsons らによって行われた glioblastoma の遺伝子解析結果において 2008 年に初めて報告された [1]。IDH1/2 遺伝子のクエン酸回路における機能ははっきりしていないが、相同遺伝子である IDH3 はクエン酸回路においてイソクエン酸をα-ケトグルタル酸に変換する作用を持つ [2]。変異 IDH1/2 はクエン酸回路においてイソクエン酸を 2-ヒドロキシグルタル酸（2-hydroxyglutarate; 2-HG）へ変換され、これが oncometabolite として作用し DNA に広範なメチル化が生じることで腫瘍化に至ると考えられている [3]。前述の Parsons らの研究では glioblastoma が対象であったが、その後の研究で IDH1/2 変異は神経膠腫の中で WHO grade 2/3 に属する星細胞系腫瘍（diffuse astrocytoma、anaplastic astrocytoma）、乏突起細胞系腫瘍（oligodendroglioma、anaplastic oligodendroglioma）と混合型腫瘍（乏突起星細胞腫（oligoastrocytoma）、退形成性乏突起星細胞腫（anaplastic oligoastrocytoma））および WHO grade4 に属し低悪性度神経膠腫から悪性転化した secondary glioblastoma に多いことが明らかにされた [4]。また遺伝子上の変異の見られる部位はほぼ決まっており、IDH1 R132H が約 90%を占め、IDH1 R132 のその他のアミノ酸への点変異が約 5%、相同遺伝子である IDH2 の R172 における変異が約 5%となっている [5]。神経膠腫以外に、軟骨肉腫や白血病においても IDH1/2 の変異が高頻度であることが報告されている [6,7] 。TERT 遺伝子はテロメア合成酵素の酵素活性部位をコードしており、TERT プロモーター領域の点変異が悪性黒色腫において高頻度であることが 2013 年に Horn らと Huang らによって報告された [8,9]。その後 TERT プロモ

ーター領域の点変異は様々な癌腫に確認されているが、特に神経膠腫において glioblastoma での頻度が高い他、乏突起細胞系腫瘍（oligodendroglioma、anaplastic oligodendroglioma）においても高いことが明らかとなった[10-13]。変異の認められる部位は転写開始点の上流における 2 箇所のシトシンがチミンに変換され（C228T、C250T）、変異により形成された塩基配列が転写因子である E-twenty six 1/2（Ets1/2）の結合モチーフになることで TERT の転写活性が亢進すると考えられている[8,9]。

1p19q 共欠失は 1994 年 Reifenberger らによって報告され[14]、病理学的に oligodendroglioma の診断マーカーとして用いられてきた。近年の遺伝子解析の結果、1p19q 共欠失は IDH1/2 変異および TERT プロモーター変異と高い相同性があることが分かり[11,15]、WHO 分類の 2016 年改訂版では乏突起細胞系腫瘍の oligodendroglioma および anaplastic oligodendroglioma の診断基準に IDH 変異や 1p19q 共欠失の存在が含まれている[16]。一方で星細胞系腫瘍の diffuse astrocytoma および anaplastic astrocytoma では IDH1/2 変異が高頻度であるが TERT プロモーター変異や 1p19q 共欠失は認められず、代わりに TP53 変異や ATRX 変異が多く認められ[15]、 WHO 分類の 2016 年改訂版では、神経膠腫の病理診断基準の中に IDH 変異の有無や 1p19q 共欠失の有無が加えられた。また混合型である oligoastrocytoma や anaplastic oligoastrocytoma ではこれらいずれもの変異形式が認められうるが[11]、分子診断の観点からは星細胞系腫瘍もしくは乏突起細胞系腫瘍に分類されるため WHO 分類の 2016 年改定では分類から削除されている。TERT プロモーターの変異は診断基準には加えられていないが、1p19q 共欠失とよく相関することや glioblastoma における頻度が高いことから診断における代替マーカーとしている報告も多い[11,17]。Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (CDKN2A)遺伝子は代表的ながん抑制遺伝子の一つで、その発現タンパクである p16 は RB 経路において Cyclin D1 と CDK4 の複合体形成を阻害し細胞周期の G1 期から S 期への移行を妨げることで増殖抑制に働く[18]。CDKN2A のホモ接合性欠失は 1994 年に膠芽腫をはじめとした様々な癌腫において高頻度であることが報告されており[18]、神経膠腫の遺伝子解析の歴史において比較的初期に同定された遺伝子異常の一つである。Alpha-thalassemia / mental retardation, X-linked （ATRX）は ATP 依存性クロマチンリモデリングタンパクをコードする遺伝子で、精神遅滞症候群の一つである alpha-thalassemia X-linked intellectual disability syndrome（ATRX 症候群）の原因遺伝子として 1995 年に報告された[19]。2012 年には神経膠腫においても ATRX 遺伝子の変異が高頻度であることが報告され[20,21]、特に IDH 変異を有する WHO Grade 2/3 の神経膠腫の中で 1p19q 共欠失および TERT プロモーターの変異を有する群とは相互排他的である[15]。神経膠腫を含む様々な癌腫において、ATRX 遺伝子の変異による ATRX の不活性化はテロメア合成酵素に依存しないテロメア伸長機構である alternative lengthening of

telomeres に関連しているとされる[22]。

一方小児の glioblastoma やびまん性内在性橋膠腫（diffuse intrinsic pontine glioma）では、成人とは異なる遺伝子異常が認められる。2012 年に Schwartzentruber らと Wu らによって報告された H3F3A および HIST1H3B の遺伝子異常は[23,24]、小児 glioblastoma では K27M もしくは G34R/V が、diffuse intrinsic pontine glioma では K27M 変異が多く認められるとされている。これらの遺伝子はそれぞれヒストンバリアントの H3.3 および H3.1 をコードし、K27M 変異をもつ腫瘍では、変異ヒストンの存在により H3K27 のメチル化酵素 EZH2 の酵素複合体である polycomb recessive complex 2 (PRC2)の活性が阻害され、H3K27 のトリメチル化が低下することで転写活性が亢進し腫瘍化に至ると考えられている[25]。WHO の 2016 年改訂版では diffuse midline glioma, K27M-mutant が新たな分類として加えられた[16]。

小児の限局性神経膠腫である毛様細胞性星細胞腫（pilocytic astrocytoma）や神経節膠腫（ganglioglioma）では B-Raf proto-oncogene（BRAF）遺伝子の点変異（V600E）や KIAA1549 遺伝子との融合遺伝子が高頻度であることが報告されている[26-29]。BRAF 遺伝子の転写産物である BRAF 蛋白は、mitogen activated protein kinase（MAPK）シグナル経路において RAS によって活性化されて MEK をリン酸化し、リン酸化 MEK がさらに ERK をリン酸化することで細胞増殖に働く。BRAF 遺伝子の異常は 2002 年に Davies らによって[30]、大腸癌や悪性中皮腫をはじめとした様々な癌腫の細胞株に同定されたことが報告された。変異の形式は癌腫を問わず V600E の点変異が大部分であり、この変異をマウスの線維芽細胞に導入すると細胞形態の変化や増殖能の亢進、接触阻害の抑制などが認められることが報告されている[31]。神経膠腫の細胞株についても前述の Davies らの研究で解析が行なわれているが[30]、”Glioma”と表記されているのみで、詳細な組織型については言及されていない。その後の研究により、BRAF B600E 点変異は神経膠腫の中で特に低悪性度の pilocytic astrocytoma[26,27,29,32,33]、ganglioglioma[28,29]、pleomorphic xanthoastrocytoma[34]、dysembryoblastic neuroepithelial tumor などに高頻度に認められることが明らかになった[28]。また BRAF 遺伝子変異のもう一つの主要な型である KIAA1549 との融合遺伝子は 2008 年に Jones らによって報告され[33]、7 番染色体の 7q34 における tandem duplication により上流に KIAA1549 遺伝子が、下流に BRAF 遺伝子のキナーゼドメインが含まれる融合遺伝子が生成される。この融合遺伝子は小脳半球をはじめとした pilocytic astrocytoma に多く、その他の小児低悪性度神経膠腫で認められる頻度は少ない[32]。また好発する break point が決まっており、KIAA1549 は exon9 もしくは exon11、BRAF は exon15 もしくは exon16 の間での融合が多く、これらの組み合わせ 4 通りが全体の 95%以上を占めるとされている[32,35,36]。BRAF 遺伝子の V600E 点変異では恒常活性型の BRAF タンパクが、融合遺伝子では恒常的な転写活性をもつ

KIAA1549 遺伝子と BRAF 遺伝子のキナーゼドメインの融合タンパクが形成され[33]、いずれの場合でも MAPK シグナル経路が活性化することが腫瘍化の原因と考えられている。また BRAF 遺伝子異常に次いで、同じく MAPK シグナル経路上の分子をコードする fibroblast growth factor receptor 1 (FGFR1)遺伝子や neurofibromatosis type 1（NF1）遺伝子の異常が pilocytic astrocytoma では多いとされている[26,27,32]。

従来の神経膠腫の病理診断は組織所見に基づいた形態学的診断であるが、2016 年の WHO 分類の改定に見られたように、今後遺伝子変異に基づいた分子診断に重きが置かれるようになることは確実である。一方で遺伝子診断による分類が疾患の予後予測に有用であるかどうかは、遺伝子によって異なる。たとえば IDH 変異は成人のびまん性神経膠腫全体の中では予後良好因子であり[4]、Suzuki らは WHO grade 2 および 3 の神経膠腫は IDH 変異と 1p19 共欠失両方を有する群、IDH 変異のみの群、いずれも有さない群とでは予後が異なり形態診断よりも分子診断が有用であることを報告した[37]。一方で glioblastoma の多くで認められる TERT 点変異は、変異型は野生型に比べやや予後が劣るものの有意差が出るには至っておらず[11]、TERT の点変異単独では予後予測因子とはなり得ないと考えられている。分子診断の歴史はまだ浅く、臨床像との関連において不明な点もまだ多い。したがって神経膠腫の分子診断と臨床像の関連を明らかにすることは、今後の診断や治療方針の進歩において極めて重要な意味を持つと考えられる。また当教室においてもこれまでに神経膠腫の手術が多数行われているが、病理診断は診断時点での WHO 基準に則って行われており、分子診断を併用した最新の診断基準に則った診断ではない。神経膠腫の臨床像を解析する上で、分子診断を併用した最新の診断基準に基づいて過去の症例を再分類することが必要と考えられる。

また前述の通り WHO 分類の改定により遺伝子異常が診断基準に加えられているが、変異の認められない野生型も多数存在する。これらは変異を有する群に対して「その他」に相当する群であり、様々な遺伝子異常を背景に有する症例の集まった雑多な群であると考えられる。したがって臨床的にも一定した特徴を持つわけではないと思われるが、特定の遺伝子異常に着目することで臨床的に分類する意義のある群が存在する可能性はあると考えらえる。今回我々は、代表的な遺伝子異常を有さない群における遺伝子解析の対象として BRAF 遺伝子の V600E 点変異に着目した。BRAF 遺伝子は 2016 年の WHO 分類の改定版では診断基準に含まれていないが、小児の低悪性度神経膠腫に認められる頻度が高く今後診断基準に組み込まれる可能性が高い遺伝子の一つと考えられる。BRAF 遺伝子と KIAA1549 との融合遺伝子は pilocytic astrocytoma に比較的特異的な変異であるが、V600E 点変異は小児のみならず成人において、glioblastoma など様々な組織型の神経膠腫にも認められることが報告されている[29]。また過去の成人神経膠腫に関する報告は、代表的な IDH1/2 や TERT プロモ

ーター点変異などに着目したものがほとんどであり、成人神経膠腫に対して BRAF 点変異を解析した報告は少ない。また実臨床においても成人のびまん性神経膠腫に対して BRAF 点変異の解析が行われることは少なく、小児と比べて BRAF 点変異を有する成人神経膠腫における臨床的特徴や頻度については不明な点も多い。

本研究では、まず過去の神経膠腫の手術検体に対して、代表的な遺伝子変異の解析を行い分子診断による分類を改めて行った。また特に成人の BRAF 点変異を有する症例に関しては文献上も不明な点が多いことから、その臨床像における特徴や解析の意義について検討を行った。

略語表

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

ACNU	nimustine hydrochloride
ANOVA	analysis of variance
ATRX	alpha-thalassemia / mental retardation syndrome X
BRAF	B-Raf proto-oncogene
CDKN2A	cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
cDNA	complementary deoxyribonucleic acid
CT	computed tomography
DNA	deoxyribonucleic acid
F	female
FGFR1	Fibroblast growth factor receptor 1
FLAIR	fluid attenuated inversion recovery
Gd-T1WI	gadolinium-enhanced T1-weighted imaging
GTR	gross total resection
2-HG	2-hydroxyglutarate
IDH1	isocitrate dehydrogenase 1
IDH2	isocitrate dehydrogenase 2
IHC	immunohistochemistry
M	male
MAPK	mitogen-activated protein kinase
MRI	magnetic resonance imaging
NF1	neurofibromatosis type 1
OS	overall survival
PCR	polymerase chain reaction
RNA	ribonucleic acid
RT	reverse transcription
STR	sub-total resection
TERT	telomerase reverse transcriptase
TMZ	temozolomide
WHO	world health organization
WT	wild-type

実験方法

【対象】

2000 年以降に北海道大学病院及び関連施設で手術を行い初発の神経膠腫の病理診断となった症例で、凍結検体を得られた 329 症例を対象とした。また本検討では、小児を 0-14 歳、若年成人を 15-29 歳、成人を 30 歳以上と定義した。病理診断は診断時点での WHO 診断基準に則って施設の病理専門医によって行われており、2016 年改訂版で使用されなくなった oligoastrocytoma および anaplastic oligoastrocytoma の病理診断は本検討ではそのまま使用した。

【DNA/RNA 抽出】

凍結検体からの DNA 及び RNA の抽出は AllPrep DNA/RNA Mini Kit (Qiagen, Tokyo, Japan)を使用し、濃度測定は NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, *Massachusetts, America*)を使用した。cDNA の合成は PrimeScript® II 1st strand cDNA Synthesis Kit (Takara, Tokyo, Japan)を用いた。

【遺伝子変異解析】

神経膠腫の代表的な遺伝子異常である IDH1 (R132)、IDH2 (R172)、TERT プロモーター領域(C228、C250)、BRAF (V600)、H3F3A (K27、G34)、FGFR1 (N546、K656)の点変異をサンガー法で検出した。また KIAA1549-BRAF 融合遺伝子の検出は RT-PCR 法でスクリーニングしたのち、融合遺伝子の見られた症例はサンガー法で確認した。PCR 法による DNA の増幅は TERT プロモーターでは AmpliTaq Gold® (Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, America)、その他の遺伝子では Quick Taq ® HS DyeMix (TOYOBO, Osaka, Japan)を用いて行った。サイクルシークエンスは各遺伝子の forward 及び reverse プライマーを用いて BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)にて行い、データは Genetic Analyzer 3130 Avant (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)で解析した。KIAA1549-BRAF 融合遺伝子の検出は過去に報告されている RT-PCR 法を用いた方法[33]で検出した。cDNA を鋳型とし、5'側のプライマーを KIAA1549 に、3'側のプライマーを BRAF に設定し、PCR 法で増幅した後に電気泳動を行いバンドが確認できたサンプルを融合ありと判定した。また得られた増幅産物を用いてサンガー法で解析を行い、融合点でのエクソンの組み合わせを確認した。遺伝子変異解析に用いたプライマー配列を示す（表１）。

表 1: 遺伝子変異解析で用いたプライマー配列の一覧

Target gene	Forward (F)/Reverse (R)	Primer Sequence (5′–3′)
TERT promoter	F	GGCCGATTCGACCTCTCT
	R	CAGCGCTGCCTGAAACTC
IDH1	F	TGTGGAAATCACCAAATGGCAC
	R	TACAAGTTGGAAATTTCTGGGC
IDH2	F	GGGAGCCCATCATCTGCAAAAA
	R	ACAAGAGGATGGCTAGGCGA
H3F3A[38]	F	TCAATGCTGGTAGGTAAGTAAGGA
	R	GGTTTCTTCACCCCTCCAGT
BRAF V600[39]	F	TGCTTGCTCTGATAGGAAAATG
	R	TGATGGGACCCACTCCAT
KIAA1549 exon15[33]	F	CGGAAACACCAGGTCAACGG
BRAF exon11[33]	R	GTTCCAAATGATCCAGATCCAATTC
BRAF exon6[33]	F	TTGTGACTTTTGTCGAAAGCTGC
BRAF exon7[33]	R	AAGGGGATGATCCAGATGTTAGG
FGFR1 exon12[40]	F	TCAAGTCCCAGGGAAAAGCAG
FGFR1 exon12[40]	R	AGGCCTTGGGACTGATACCC
FGFR1 exon14[40]	F	GACAAGTCGGCTAGTTGCAT
FGFR1 exon14[40]	R	CCCACTCCTTGCTTCTCAGAT

【遺伝子発現解析】

遺伝子発現の定量は quantitative reversetranscriptase PCR（qRT-PCR）法を用いた。cDNA を LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Burgess

Hill, UK）を用いて増幅し、SYBR Green I (483–533 nm）の蛍光を LightCycler96 (Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK)で検出し LightCycler480 software (Roche Diagnostics, Burgess Hill, UK)で解析した。内因性のコントロール遺伝子は GAPDH を用い、市販の正常脳組織由来の脳 RNA（#636530 (Takara, Tokyo, Japan) and #AM6050 (Life Technologies, Carlsbad, CA, USA)）を用いて標準化した。遺伝子発現解析に用いたプライマー配列を示す（表 2）。

表 2：遺伝子発現解析で用いたプライマー配列の一覧

Target gene	Forward (F)/Reverse (R)	Primer Sequence (5′–3′)
CDKN2A	F	CCCTCAGACATCCCCGATTGAA
	R	AAACTACGAAAGCGGGGTGG
GAPDH	F	CTATAAATTGAGCCCGCAGCC
	R	CGGGAATACGACCAAATCCGT

【免疫染色】

免疫染色はホルマリン固定後にパラフィン包埋した組織から 3mm の切片を作成し、10mM クエン酸ナトリウム緩衝液に浸し 3 分間高圧高温下で抗原賦活化を行った。内因性ペルオキシダーゼのブロッキングは peroxidase blocking solution (Dako, Carpinteria, CA, USA)を用いた。一次抗体（表２）を Can Get Signal Immunostain SolutionA (TOYOBO, Osaka, Japan)で希釈し、４℃で半日間インキュベートした。一次抗体を EnVision Dual Link system-HRP (Dako, Carpinteria, CA, USA)及び Liquid DAB+ Substrate Chromagen System (Dako, Carpinteria, CA, USA) を用いて可視化し、Meyer's hematoxylin (Sakura Finetek Japan, Tokyo, Japan)、70%, 80%, 100%エタノール及びキシレンで処理した。ATRX 染色では腫瘍内部の血管を陽性コントロールとした。

【統計解析】

R (The R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, version 2.13.0)のグラフィカルユーザーインターフェースである EZR (Saitama Medical Centre, Jichi Medical University,

http://www.jichi.ac.jp/saitama-sct/SaitamaHP.files/statmedEN.html; Kanda, 2012)を用いた。2 群間の比較は Student-t test、多群間の比較は one-way analysis of variance (ANOVA)、生存解析は Log-rank test を用い、p 値 0.05 未満を有意差ありとした。

実験結果

【全年齢の神経膠腫における遺伝子解析結果】

まず小児及び成人の神経膠腫すべての症例に対して行った、遺伝子解析の結果を示す（図 1)。年齢は 0-14 歳、15-29 歳、30 歳以上の 3 群に分け、0-29 歳までは解析対象の全遺伝子を、30 歳以上では BRAF、IDH1/2、TERT の解析を行った。対象となった症例は小児 42 例、若年成人 42 例、成人 245 例での計 329 例で、組織型別では diffuse astrocytoma　30 例、anaplastic astrocytoma 30 例、glioblastoma 140 例、oligoastrocytoma 24 例、anaplastic oligoastrocytoma 26 例、oligodendroglioma 16 例、anaplastic oligodendroglioma 18 例、gliosarcoma 3 例、gliomatosis cerebri 1 例、pilocytic astrocytoma 29 例、pilomyxoid astrocytoma 4 例、ganglioglioma 3 例、anaplastic ganglioglioma 1 例、dysembryoblastic neuroepithelial tumor 1 例、low-grade glioma, unclassified 3 例であった。0-14 歳においては、IDH および TERT 変異を持つ症例は認められず、BRAF 点変異および融合遺伝子や FGFR1、H3F3A などの遺伝子変異によって規定される症例のみであった。また解析した遺伝子のなかで変異を有する症例は 28 例（66.7%）を占めた。一方 30 歳以上においては、IDH 変異を有する症例は 78 例（31.8%)、TERT 変異を有する症例は 132 例（53.9%）認められ、IDH および TERT の少なくとも一方を有する症例が 170 例（69.4%）と全体の大部分を占めた。ここで 15-29 歳の若年成人に着目すると、小児に多い BRAF や H3F3A などの遺伝子異常を持つ群と、成人に多い IDH および TERT の遺伝子異常を持つ群とが相互排他的に存在していた。

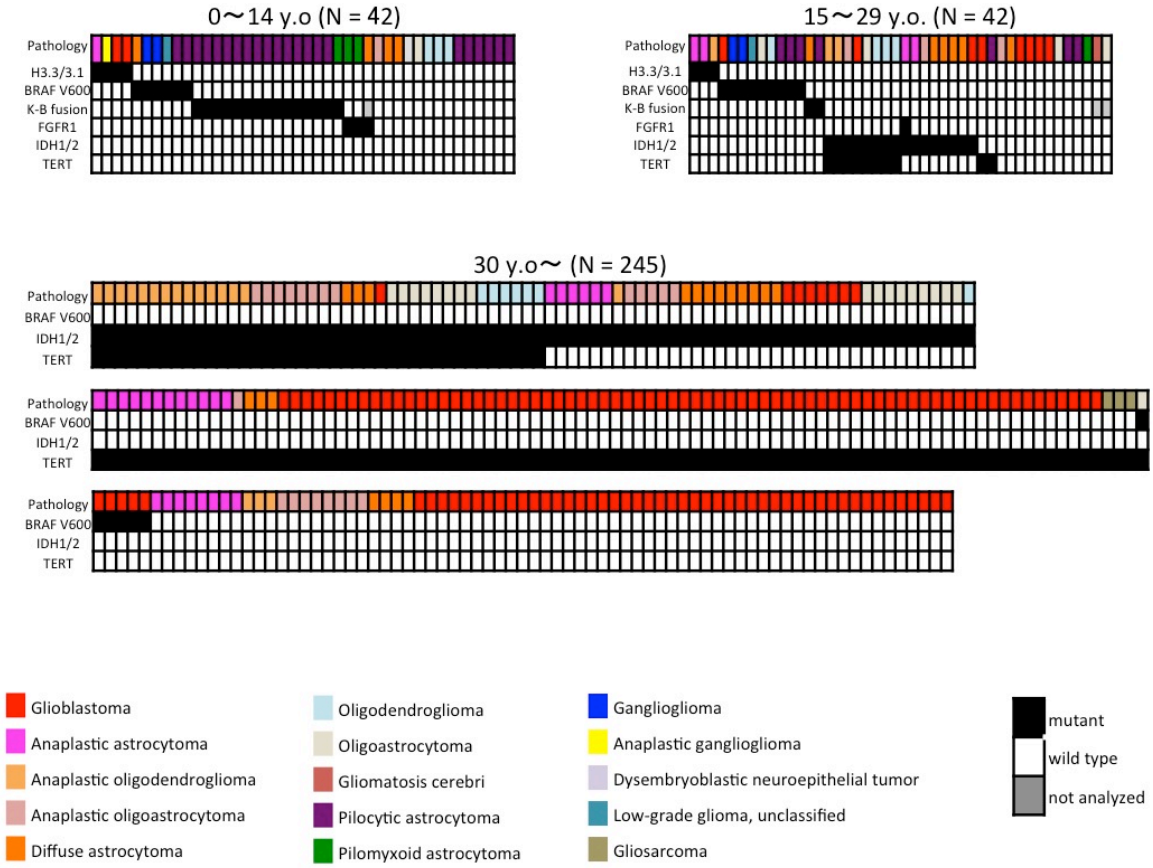


図 1: 神経膠腫における遺伝子プロファイリング

0〜14 歳では IDH および TERT の変異例は認めず、H3F3A/HIST1H3B、BRAF、FGFR1 遺伝子の変異例が 66.7%を占めた。成人では IDH または TERT いずれかの変異を有する例が 69.4%を占めた。若年成人では H3F3A/HIST1H3B や BRAF の変異を有する群と、IDH や TERT の変異を有する群が相互排他的に存在し、特に BRAF V600E 点変異を有する症例が多い。

ここで若年成人をさらに 15-19 歳、20-24 歳、25-29 歳の 3 群に分け、各年齢層における遺伝子異常の頻度を比較した（図 2)。IDH および TERT で規定される症例は 20 代で頻度が高くなる一方、その他の遺伝子異常で規定される症例は 10 代後半までが高頻度であった。この結果は、従来の報告と同様に IDH および TERT は成人神経膠腫に高頻度な遺伝子異常である一方、BRAF や H3F3A は小児神経膠腫に高頻度な遺伝子異常であり、若年成人においてその頻度が逆転することを示唆すると考えられた。

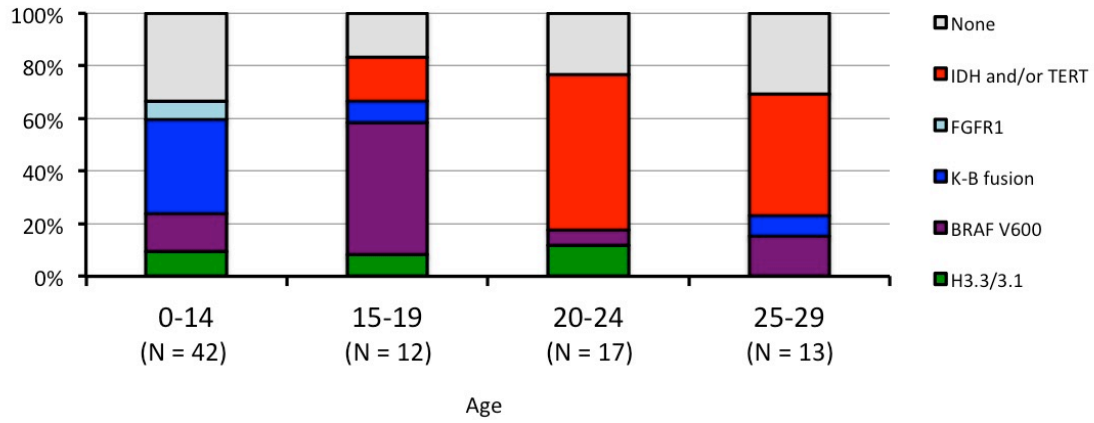


図 2: 若年成人神経膠腫における遺伝子変異の頻度の推移

10 歳代から 20 歳代への移行に伴い、小児神経膠腫に多く認められる BRAF や H3F3A 変異の頻度と成人神経膠腫に多く認められる IDH や TERT 変異の頻度が逆転している。

次に若年成人の神経膠腫における生存解析を行った。WHO Grade2 以上の神経膠腫において、IDH 変異は予後良好因子、IDH 野生型は予後不良因子とされている。本研究で解析を行った若年成人神経膠腫の中で、WHO Grade 2 以上であった 30 例を対象に行った生存解析の結果を示す（図 3-A)。IDH 変異の有無で生存解析を行ったところ、IDH 野生型は早期の死亡例が多かったものの有意差は得られなかった。ここで IDH 野生型の中に BRAF 変異を有する症例が含まれていることに着目し、BRAF 変異群を分けて解析を行った（図 3-B)。BRAF 変異群は観察期間内で死亡例は認められず、予後良好な群を形成する可能性が示唆された。一方 IDH 変異群と野生型群とでは、有意差は得られなかったものの BRAF 変異群を分けなかった解析と比べて生存曲線の差が広がった。すなわち、若年成人の Grade 2 以上の神経膠腫において、診断基準上は予後の不良な IDH 野生型とされる症例の中から BRAF 変異例を鑑別することで、予後良好群と不良群をより明確に区別できる可能性が示唆された。

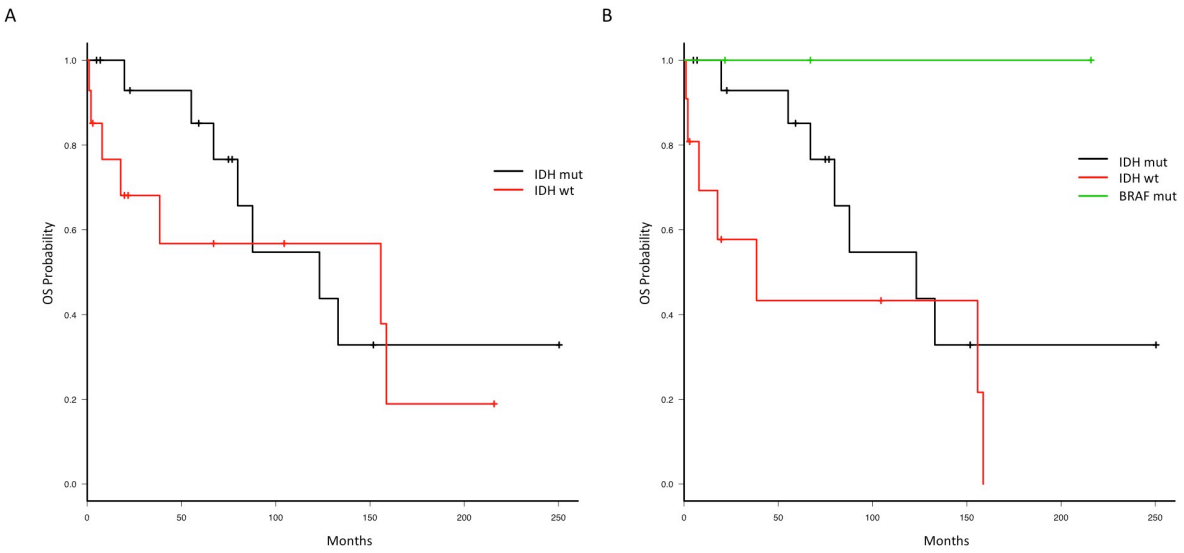


図 3: 若年成人の WHO Grade 2～4 の神経膠腫 30 例における全生存期間の解析
A: IDH 変異の有無による解析、IDH 野生型群（赤）は IDH 変異群（黒）に比べ早期の死亡が多かったものの全生存期間に有意差は認められなかった。B: IDH 野生型群から BRAF 変異群（緑）を分けた解析において、BRAF 変異群では観察期間内の死亡症例はなかった。また統計学的有意差はないが、IDH 野生型群と IDH 変異型群の生存曲線の差がより明確となった。

若年成人において BRAF 変異をもつ症例が特徴的な群を形成していたことに着目し、成人全体において BRAF 変異を有する症例がどのような臨床的特徴を有しているか解析を行った。

【成人神経膠腫における BRAF 点変異】

解析を行った 15 歳以上の成人における組織型は、15 歳以上の成人全体で、BRAF 点変異を有した症例の一覧を示す（表 3)。病理診断において WHO Grade 1 が 6 例、Grade 2 が 3 例、Grade 4 が 6 例であった。本検討では WHO Grade 1-2 を低悪性度神経膠腫、Grade 3-4 を高悪性度神経膠腫に分けて解析を行った。

表 3: BRAF V600E 点変異を有する成人神経膠腫の症例一覧

Case	Age	Gender	WHO Grade	Pathology
#1	18	F	1	Pilocytic astrocytoma
#2	19	F	1	Pilocytic astrocytoma
#3	22	M	1	Pilocytic astrocytoma
#4	16	M	1	Ganglioglioma
#5	16	M	1	Ganglioglioma
#6	16	F	1	Low-grade glioma, unclassified
#7	26	M	2	Oligoastrocytoma
#8	68	M	2	Oligoastrocytoma
#9	15	F	2	Oligodendroglioma
#10	27	F	4	Glioblastoma
#11	37	M	4	Glioblastoma
#12	37	M	4	Glioblastoma
#13	42	M	4	Glioblastoma
#14	61	M	4	Glioblastoma

F = female;　M = male

【成人低悪性度神経膠腫における BRAF 点変異】

まず成人低悪性度神経膠腫の各組織型における BRAF 点変異の頻度を解析した（図 4-A)。WHO Grade 1 の症例では従来の報告通り、BRAF 点変異は高頻度であった。一方 WHO Grade 2 の症例にも低い頻度ながら BRAF 点変異をもつ症例が確認された。

BRAF 変異例が若年成人に多かったことに着目し、若年成人に限っての各組織型における変異の頻度について解析を行った（図 4-B)。少数例の解析であるが、BRAF 変異例は oligoastrocytoma 1/4 例（25%)、oligodendroglioma 1/4 例（25%）と比較的高頻度に認められた。WHO Grade 2 の神経膠腫は診断基準上 IDH 変異の有無によって診断される組織型であり、本組織型であっても若年成人においては BRAF 変異の解析の必要性が示唆された。なお WHO Grade 1 では 8 例中 6 例（75%）が BRAF 点変異を有しており、従来の報告と矛盾しない結果であった。

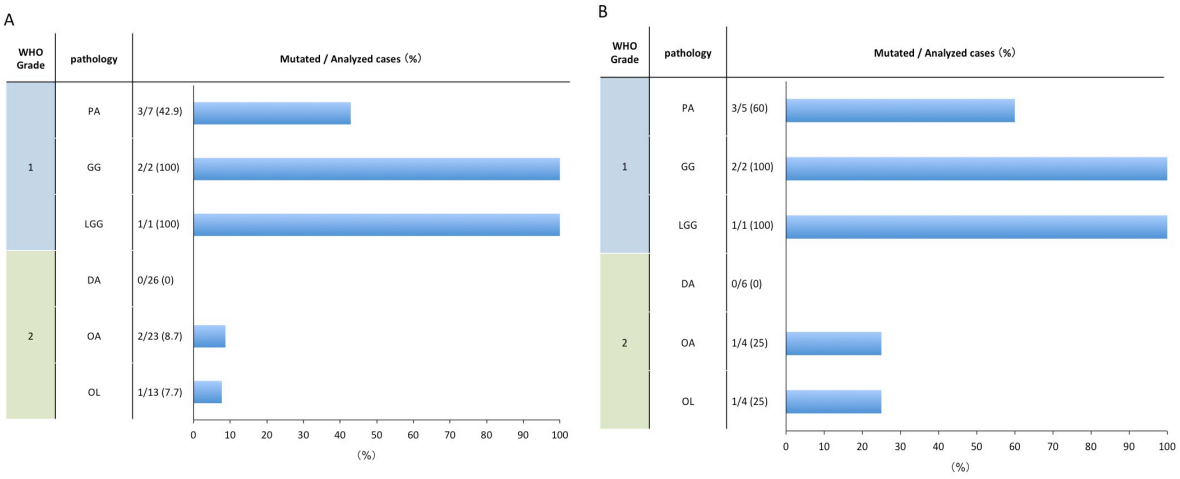


図 4: 成人 WHO Grade 1/2 神経膠腫における BRAF 変異の頻度

(A) 15 歳以上の成人神経膠腫の各組織型における BRAF 点変異の頻度。Grade 1 における変異は高頻度であるが、Grade 2 の症例にも程頻度ながら変異が認められる。(B)15～29 歳の低悪性度神経膠腫における BRAF 点変異の頻度。Grade 1 神経膠腫の大部分が BRAF 点変異を有し、Grade 2 でも成人全体よりも高頻度で変異症例が確認された。

BRAF 点変異を有した低悪性度神経膠腫 9 例の一覧を提示する（表 5)。9 例中 8 例が若年成人の発症かつ IDH や TERT の変異を伴わなかった。したがって高齢の症例や IDH 変異を有する症例では、BRAF 点変異の解析の意義は乏しいと考えられた。臨床的には大脳半球に発生し初発症状としててんかん発作を呈した症例と、視床下部を始めとする間脳から発生し頭痛を呈した症例の大きく２つの型に分けられた。

表 5：BRAF 点変異を有する成人低悪性度神経膠腫の症例一覧

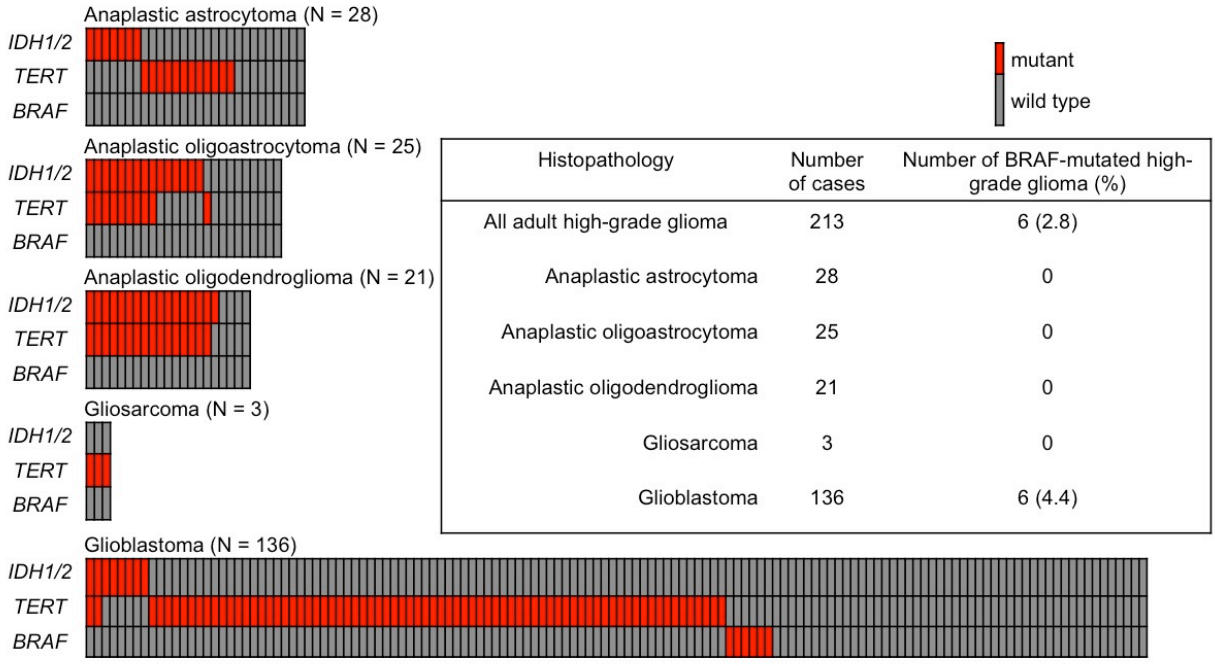
Case	Age	Gender	Pathology	IDH	TERT	Location	Initial symptom
#9	15	F	Oligodendroglioma	WT	WT	Temporal lobe	Epilepsy
#4	16	M	Ganglioglioma	WT	WT	Temporal lobe	Epilepsy
#5	16	M	Ganglioglioma	WT	WT	Parietal lobe	Epilepsy
#6	16	F	Low-grade glioma, unclassified	WT	WT	Pineal body	Headache
#1	18	F	Pilocytic astrocytoma	WT	WT	Temporal lobe	Epilepsy
#2	19	F	Pilocytic astrocytoma	WT	WT	Hypothalamus	Headache
#3	22	M	Pilocytic astrocytoma	WT	WT	Hypothalamus	Headache
#7	26	M	Oligoastrocytoma	WT	WT	Temporal lobe	Epilepsy
#8	68	M	Oligoastrocytoma	WT	C250T	Frontal lobe	Epilepsy

F = female;　M = male; WT = wild-type

【成人高悪性度神経膠腫における BRAF 点変異】

15 歳以上の成人高悪性度神経膠腫の、各組織型における遺伝子解析結果を示す（図 5）。解析対象となった症例の組織型は anaplastic astrocytoma 28 例、anaplastic oligoastrocytoma 25 例、anaplastic oligodendroglioma 21 例、gliosarcoma 3 例、glioblastoma 136 例であった。

IDH/TERT 両方の変異を有するものは anaplastic oligodendroglioma に、IDH 変異単独を有するものは anaplastic astrocytoma に、TERT 変異単独を有するものは glioblastoma に多く、anaplastic oligoastrocytoma では IDH 変異に加えて TERT 野生型と変異型の両方が見られるという傾向は過去の報告と矛盾しない結果であった。WHO Grade3 では、BRAF 点変異を有する症例は認められなかった。WHO Grade 4 では、glioblastoma において 6 例が BRAF 点変異を有していた。これら 6 症例いずれも、IDH および TERT の変異を認めなかった。BRAF 変異症例の頻度は、WHO Grade 3-4 の高悪性度神経膠腫全体の 2.8%、glioblastoma の 4.4%を占めた。



Histopathology	Number of cases	Number of BRAF-mutated high-grade glioma (%)
All adult high-grade glioma	213	6 (2.8)
Anaplastic astrocytoma	28	0
Anaplastic oligoastrocytoma	25	0
Anaplastic oligodendroglioma	21	0
Gliosarcoma	3	0
Glioblastoma	136	6 (4.4)

図 5: 成人高悪性度神経膠腫における IDH1/2、TERT、BRAF 点変異の全体像
BRAF 点変異を有する症例は glioblastoma に 6 例認められ、全高悪性度神経膠腫の 2.8%、glioblastoma の 4.4%を占めた。

BRAF 点変異を有する症例は glioblastoma に 6 例認められ、その他の組織型では認められなかった。いずれの症例も IDH1/2 および TERT の点変異は認められなかった。BRAF 変異症例は WHO grade 3/4 の 2.8%、glioblastoma の 4.4%を占めた。BRAF 変異症例の内訳を示す（表 6）。

表 6：BRAF 点変異を有する症例の一覧

Case	Age at onset (years)	Gender	Initial symptom	Location	CT/MRI	Pathological diagnosis	*BRAF* V600 status	
							Coding	Protein
#10	27	F	Partial seizure	Temporal lobe	Ring-like enhancement, mild edema	Glioblastoma	1799T>A	V600E
#11	37	M	Seizure Hemiparesis	Parietal lobe	Ring-like enhancement, mild edema	Glioblastoma	1799T>A	V600E
#12	37	M	Verbal abnormality Headache	Temporal lobe	Ring-like enhancement, medium edema	Glioblastoma	1799T>A	V600E
#13	42	M	Grand mal seizure	Frontal lobe	Ring-like enhancement, mild edema, calcification	Epithelioid glioblastoma	1799T>A	V600E
#14	61	M	Facial numbness	Multifocal	Partial enhancement	Glioblastoma	1799T>A	V600E
#15	66	M	Consciousness disturbance	Temporal lobe	Ring-like enhancement, strong edema	Glioblastoma	1799_1801del	V600E K601del

CT = computed tomography, F = female, M = male, MRI = magnetic resonance imaging

初発症状としてけいれん発作が最も多く（3/6 例、50%）、5 例は大脳半球の単発病変であったが 1 例は大脳半球から脳幹部に至る多発性の病変であった。術前の magnetic resonance imaging (MRI)で単発病変はいずれもリング状の増強効果を呈する病変で通常の glioblastoma との鑑別は困難であると考えられたが、3 例では比較的浮腫が軽度であった（図 6）。

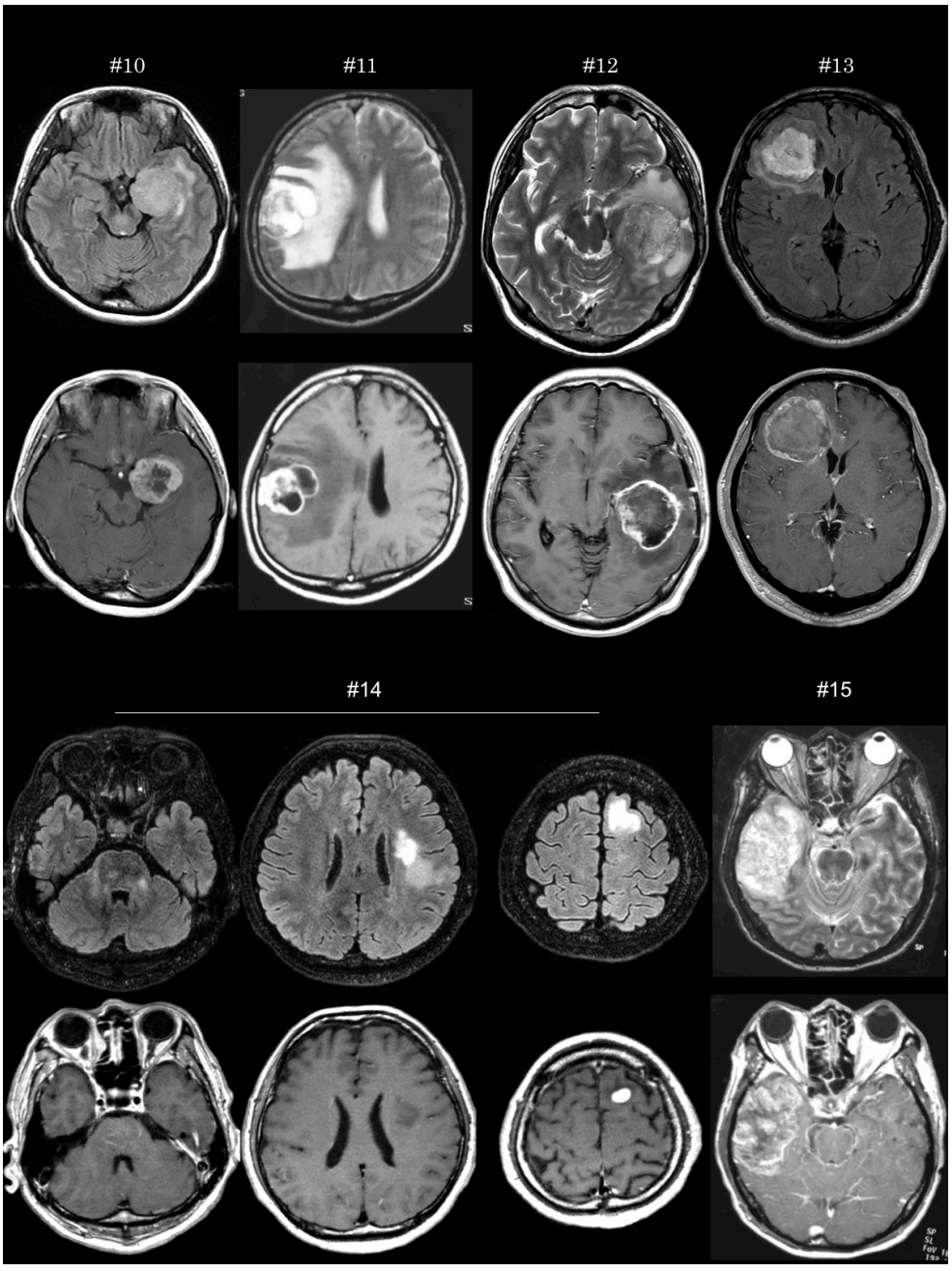


図 6 :BRAF 点変異を有する glioblastoma の MRI
上段：FLAIR、下段：Gd-T1WI
症例 #14 を除き、強い増強効果を伴う半球性の単発病変であった。

病理診断では 1 例のみ epithelioid glioblastoma の診断であり、遺伝子型は 5/6 例が 1 塩基置換による BRAF V600E の点変異で最も一般的な変異型であったが、1/6 例は 3 塩基欠失による BRAF V600E および K601del で過去に報告のない変異であった（図 7）。

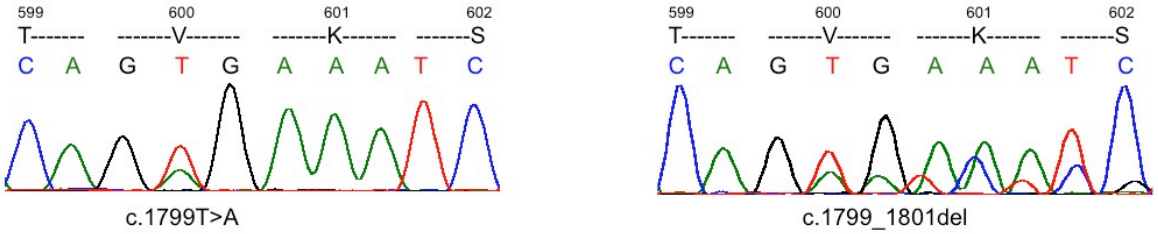


図 7：BRAF V600 の前後におけるサンガーシークエンス結果
左：典型的な 1 塩基置換の症例（#10、c.1799T>A, p.V600E）右：3 塩基欠失の症例（#15、c.1799_1801del、p.V600E,K601del）

BRAF 点変異を有する 6 例の発症年齢は 27 歳から 66 歳（平均 45 歳）であった。遺伝子変異型別に比較すると、IDH 変異群は TERT 変異の有無に関わらず 30～60 歳での発症が多く、BRAF 変異群も同様の傾向であった。一方 glioblastoma に最も多い TERT 単独変異型はむしろ 60 歳以上での発症が多かった。TERT 単独変異群に比べ、IDH 変異群および BRAF 変異群は有意に若年での発症であった。また BRAF 変異群と、IDH/TERT 野生型や WHO grade 2/3 に多い IDH 変異型との有意差は認められなかった（図 8）。

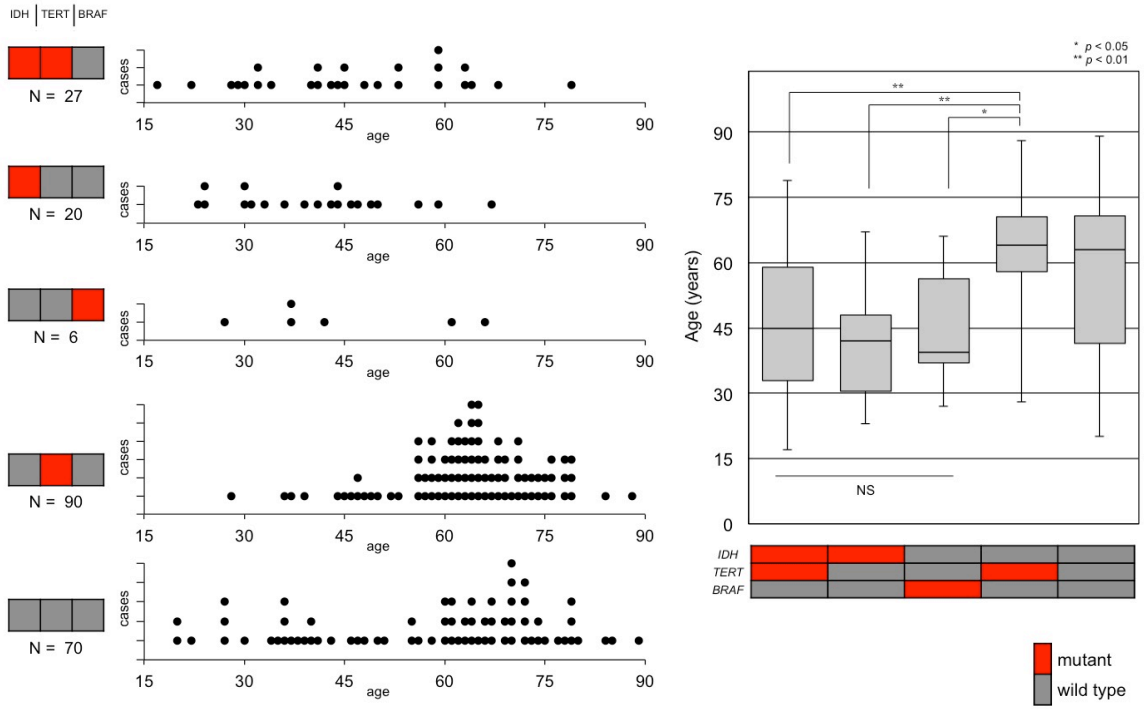


図 8: 各遺伝子型における発症年齢の分布

右：各遺伝子変異型における発症年齢のプロット図。左：遺伝子変異別の発症年齢の分布。IDH 単独変異群、IDH・TERT 共変異群、BRAF 変異群はいずれも TERT 単独変異群に比べて有意に発症年齢が若かった。

次に glioblastoma における全生存期間（overall survival; OS）の解析を行った。glioblastoma において IDH 変異は予後良好因子、IDH 野生型は予後不良因子であることが報告されている。まず IDH 変異の有無で 2 群に分けて解析を行ったところ、IDH 野生型は変異型よりも有意に全生存期間が短かった（図 9-A）。次に IDH 野生型群から BRAF 変異群を分けて解析を行ったところ、BRAF 変異群は IDH 変異群と同様に IDH 野生型群と比べ有意に全生存期間が長かった（図 9-B）。BRAF 変異群と IDH 変異群との間に有意差は認めなかった。

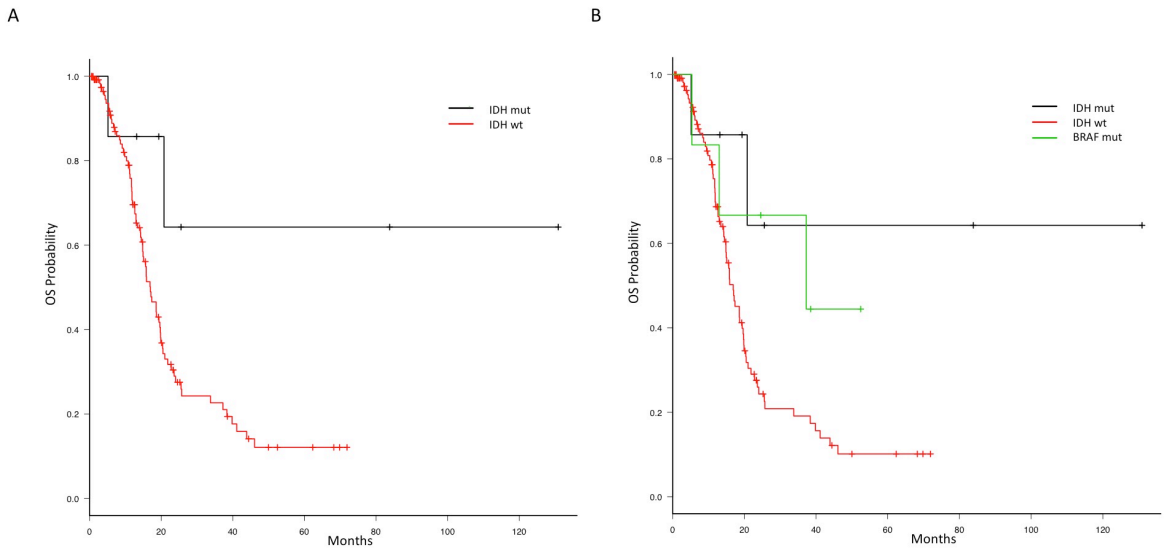


図 9：Glioblastoma における生存曲線（OS; overall survival）
A: IDH 変異の有無による解析結果では、IDH 野生型群において有意に OS が短い。
B: IDH 野生型群から BRAF 変異群を分けた解析結果では、BRAF 変異群は IDH 野生型群よりも有意に OS が長い。一方 IDH 変異群との有意差はなかった。

Grade 3-4 の高悪性度神経膠腫を遺伝子変異別に分類して OS を比較すると、BRAF 変異型の OS は乏突起膠細胞系腫瘍に多い IDH/TERT 変異型よりも有意に短く、glioblastoma に多い TERT 単独変異型よりも有意に長かった（図 10）。

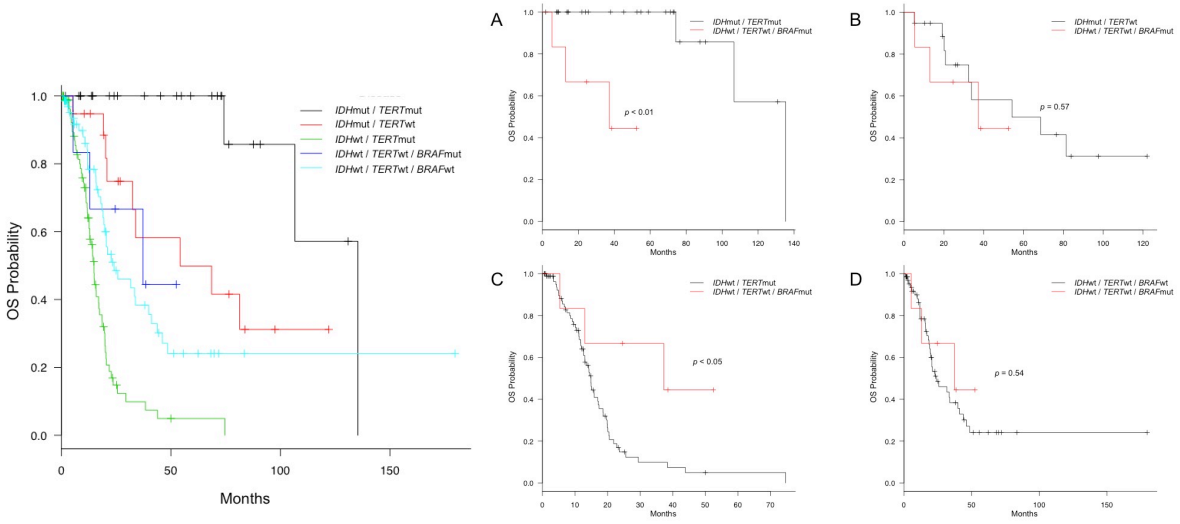


図 10：各遺伝子型における生存曲線（OS: overall survival）
左：各遺伝子型の生存曲線（黒：IDH/TERT 変異、赤：IDH 変異、青：BRAF 変異、緑：TERT 変異、水色：IDH/TERT 野生型を示す）。右：BRAF 変異群と各遺伝子型の間における OS の比較（A：IDH/TERT 共変異群、B：IDH 単独変異群、C：TERT 単独変異群、D：IDH/TERT 野生型群）。BRAF 変異群は IDH/TERT 変異型よりも有意に生存期間が短く、TERT 変異群よりも有意に生存期間が長かった。

6 例の治療内容の詳細を表 7 に示す。肉眼的全摘出は 4 例に施行され、放射線治療は全例に、化学療法は 5/6 例に施行されていた。6 例のうち 2 例は 12 ヶ月以内に死亡した一方、他の 4 例は 24 ヶ月以上生存し、最長では 77 ヶ月の生存が得られていた。この結果から、BRAF 変異を有する高悪性度神経膠腫は、何らかの因子により予後良好な症例と予後不良な症例とが分けられる可能性が示唆された。

表 7：BRAF 点変異を有する成人高悪性度神経膠腫における治療内容と予後

Case	Operation	Radiotherapy	Chemotherapy	OS (Months)	Status
#1	GTR	60 Gy	TMZ	24	Alive
#2	GTR	60 Gy	ACNU	38	Alive
#3	STR	60 Gy	TMZ	77	Alive
#4	GTR	60 Gy	TMZ	5	Dead
#5	Biopsy	Focal 40 Gy and boost 10 Gy	TMZ	12	Dead
#6	GTR	60 Gy	TMZ	37	Dead

ACNU = nimustine hydrochloride; GTR = gross total removal, OS = overall survival, STR = sub-total removal, TMZ = temozolomide

小児の高悪性度神経膠腫においてBRAF点変異とCDKN2A欠失の組み合わせが関連している症例が多いこと[41]や、成人のIDH野生型glioblastomaではATRX変異が予後に関連していること[42]が過去に報告されており、本検討ではCDKN2AとATRXの発現に着目して解析を行った。qRT-PCRでCDKN2Aの遺伝子発現を測定したところ、予後の悪かった2例では他の4例に比べ発現量が低いことが確認された(図11)。

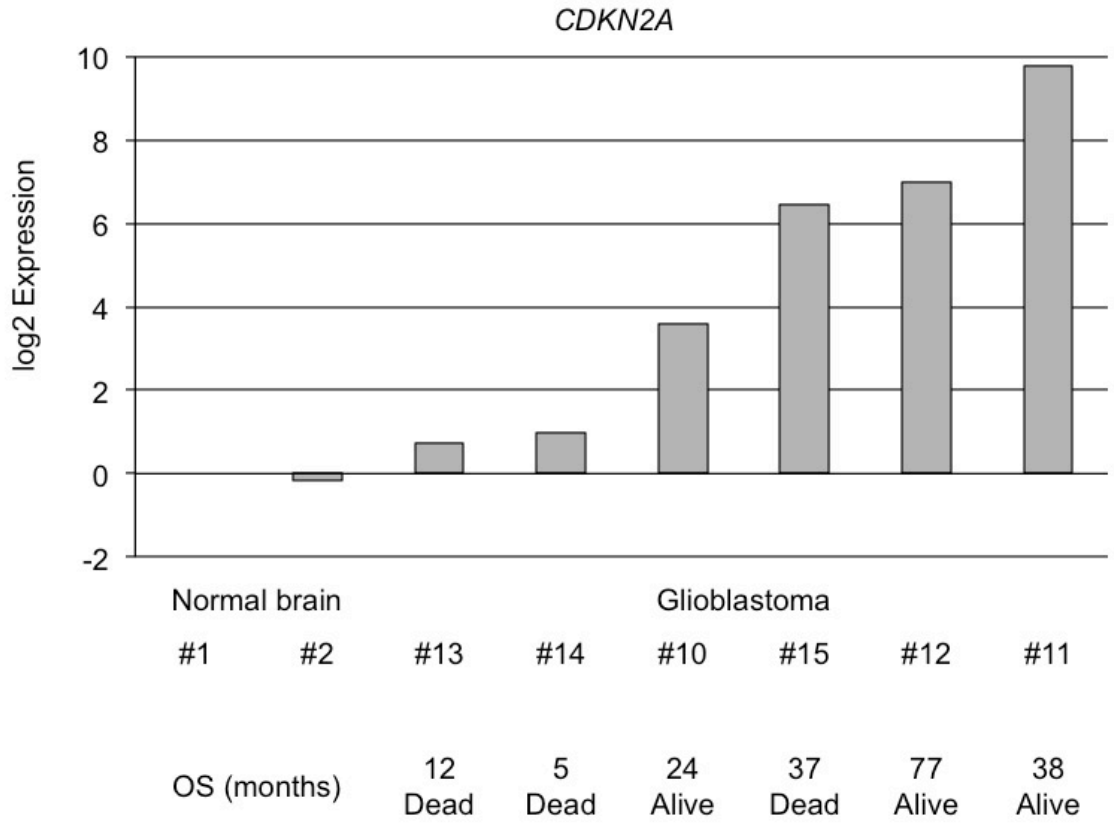


図11：qRT-PCRによるCDKN2A発現解析と生存期間の関係
予後の良好であった4例（#10,11,12,15）では、不良であった2例（#13,14）に比べCDKN2Aの遺伝子発現が高い傾向にあった。 OS; = overall survival

同様に CDKN2A の発現タンパクである p16 の免疫染色を行うと、予後が良好であった 4 例では核内で強陽性であった一方、予後不良であった 2 例では核での染色性が低下していた（図 12)。これらの結果から、BRAF 点変異を有する悪性神経膠腫の中で CDKN2A の発現が低い症例では予後が不良である可能性が示唆された。

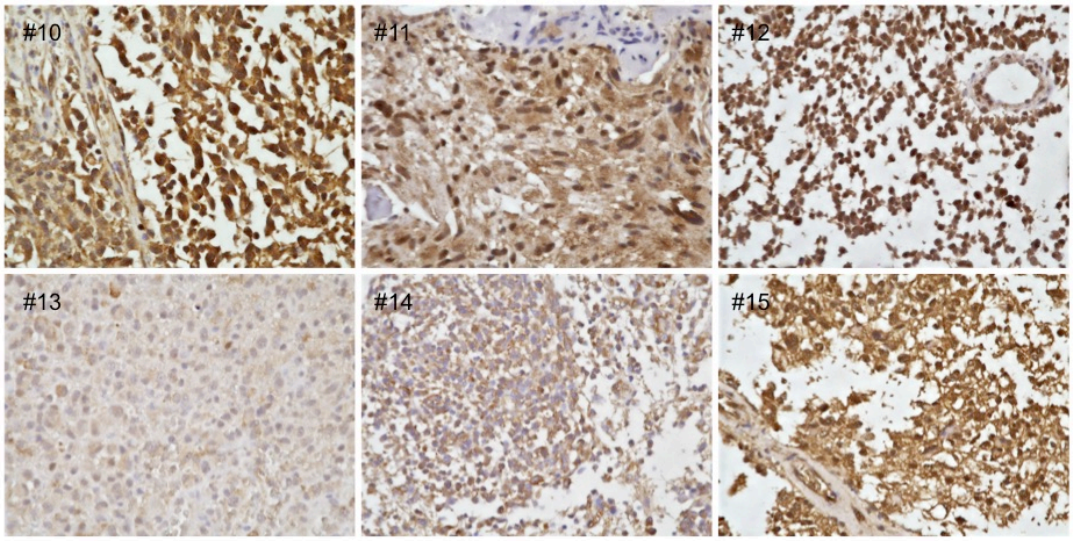


図 12：免疫染色を用いた p16 の発現解析
予後が良好であった 4 例（#10,11,12,15）では p16 の発現が強かったが、予後が不良であった 2 例（#13,14）では p16 の発現が低い。

また ATRX の免疫染色では、予後の不良であった 2 例では染色性が保たれていたが良好であった 4 例では染色性が低下していた（図 13）。以上から ATRX の発現消失を伴う症例では予後が良好である可能性が示唆された。

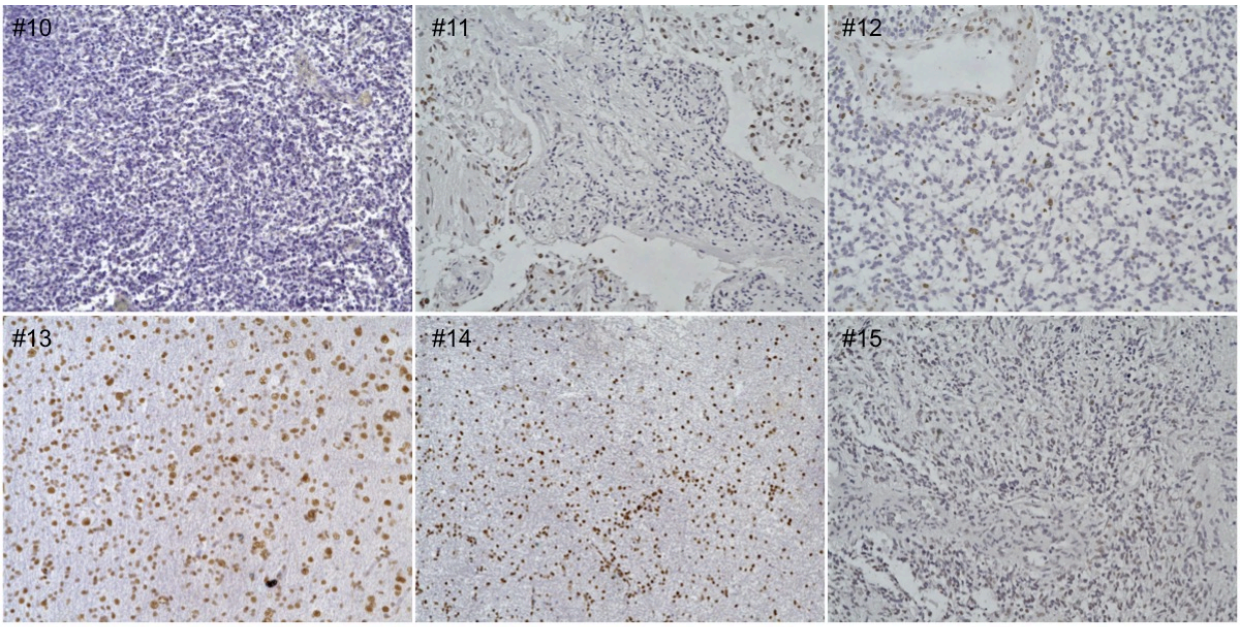


図 13: 免疫染色を用いた ATRX の発現解析
予後が良好であった 4 例（#10,11,12,15）では ATRX の発現欠失を認めたが、不良であった 2 例（#13,14）では発現が保たれていた。

以上の結果から BRAF 点変異を有する高悪性度神経膠腫は予後良好な群と不良な群が存在し、前者のマーカーとしては CDKN2A 発現高値や ATRX 発現欠失が、後者のマーカーとして CDKN2A 発現低値が有用である可能性が示唆された。

考察

若年成人における BRAF 遺伝子解析の意義

若年成人に着目した報告としては視床神経膠腫における H3F3A K27M 点変異や glioblastoma における BRAF 点変異が過去に報告されているが [38,43]、全組織型における特徴はこれまでに報告されていない。本検討において、小児神経膠腫では H3F3A や BRAF 点変異及び融合遺伝子、FGFR1 などの遺伝子変異のみが検出された一方、若年成人においてはこれらの異常をもつ症例と成人神経膠腫に代表的な IDH1/2 及び TERT プロモーター点変異をもつ症例とが相互排他的な分布を示した。これは H3F3A や BRAF 遺伝子などで規定される小児に多いタイプの腫瘍と、IDH1/2 や TERT によって規定される成人に多いタイプの腫瘍が、若年成人という特殊な年齢層においていずれもが認められ頻度が逆転することを示唆していると考えられる。また組織学的に同じ病理診断であっても、どの遺伝子変異が認められるかによって治療予後が変わる可能性がある。例えば WHO grade2 の神経膠腫では、WHO 分類の 2016 年改訂版において IDH 点変異の有無によりまず分類され、変異を認めるものでは 1p19q 共欠失の有無により oligodendroglioma IDH-mutant、diffuse astrocytoma IDH-mutant の組織分類となる [16]。しかし BRAF 点変異を有する症例では通常 IDH 変異は認められないため、自動的に diffuse astrocytoma IDH-wild の組織分類となり、このタイプの神経膠腫は Suzuki ら [37] の提唱する lower-grade glioma の type3 という予後不良な群に分類される。一方 BRAF 点変異を有する grade2 のびまん性神経膠腫は前述の通り予後良好と考えられ [16,44]、type3 神経膠腫の予後と乖離が生じむしろ IDH 変異を有する症例の方が長期的には悪性転化をきたし予後不良である [37]。Type3 のびまん性神経膠腫は IDH 以外の様々な遺伝子変異を有する雑多な集団であり、より詳細に分類されるべきであると考えられるが、本研究において若年成人においては H3F3A や BRAF の変異は頻度が高く重要な遺伝子と言えると考えられた。特に BRAF 点変異は免疫染色でも高い感度と特異度で検出できることが報告されており [45]、シークエンス解析を行うことができない施設でも簡便に検査することが可能である。また IDH1/2 や BRAF、H3F3A は遺伝子変異をターゲットとした標的治療の研究が進められており [46-48]、今後解析の必要性が高まることが想定される遺伝子である。一方本研究において H3F3A や BRAF の変異例は IDH 変異とは相互排他的であり、WHO の診断基準に準じて IDH 変異をまず解析し野生型と診断された症例に限って解析を行えば十分であると考えられる。

BRAF 点変異を有する低悪性度神経膠腫

BRAF 点変異は小児のテント上 pilocytic astrocytoma や ganglioglioma など WHO

grade1 の神経膠腫に代表的な遺伝子変異として知られており[26,29]、また成人では WHO grade2 のその他の神経膠腫に分類される pleomorphic xanthoastrocytoma に多く認められるとされている[34]。一方で BRAF 点変異を有する WHO grade2 のびまん性神経膠腫の存在も知られているが[29,49]、散発性に報告されているのみでその臨床像ははっきりしていない。Chi らは BRAF 点変異を有し WHO grade2 である diffuse astrocytoma もしくは oligoastrocytoma の診断とされた 5 例を報告しており、その特徴としてテント上に好発すること、慢性のてんかん発作で発症することが多いこと、非典型的な画像所見を呈すること、予後良好であること、20〜30 代の若年層に好発することを挙げている[44]。また BRAF 点変異は小児の diffuse astrocytoma や oligodendroglioma にも認められることがあり、これら小児に生じる WHO grade2 のびまん性神経膠腫の特徴として、てんかん発作での発症が多いことや悪性転化は稀であり予後良好であること、IDH 変異は基本的に有しないことなどが挙げられている[16]。本検討で確認された WHO grade2 の BRAF 点変異を有するびまん性神経膠腫の 3 例は、いずれもてんかん発作で発症した大脳半球病変であり、2 例が若年成人での発症でることも過去の報告に矛盾しない結果であった。前述の通り WHO grade2 の神経膠腫は本来 IDH 変異の有無によって診断が行われる疾患であるが、BRAF 点変異を有するものは予後良好である点で本来の IDH 野生型に含めるべきではないと考えられる。また BRAF 点変異を有する小児低悪性度神経膠腫は組織学的に多彩であることが報告されており[50]、部分的に WHO grade2 の腫瘍に類似した組織像を呈していたために grade2 と診断された可能性も否定できないと考えられる。

神経膠腫において、てんかん発作と関連の深い遺伝子異常として IDH1/2 点変異が知られている。膠芽腫においては腫瘍細胞におけるグルタミン酸の細胞外への輸送機構に関連する遺伝子発現が亢進しているため細胞外グルタミン酸濃度が上昇し、シナプルにおけるグルタミン酸受容体の活性化がてんかん発作に関連すると報告されている[51,52]。一方 IDH 点変異をもつ神経膠腫において、変異型 IDH によって生成された 2-HG の構造がグルタミン酸に類似しているため、細胞外に放出された 2-HG がシナプスにおけるグルタミン酸受容体の活性化を介してんかん発作が生じやすくなると言われており、これをターゲットとした抗てんかん薬の有用性が報告されている[53]。BRAF 点変異も IDH 変異と同様、てんかん発作との関連が深いとされている遺伝子異常の一つである[2,3,7]。しかし BRAF 点変異がてんかん原性を呈するメカニズムは明らかにされておらず、今後の研究の進歩により理想的な抗てんかん薬の同定が期待されると考えられる。

BRAF 点変異を有する高悪性度神経膠腫

BRAF 点変異を有する WHO grade3-4 の神経膠腫は症例報告や大規模な遺伝子解析の中で散発的に報告されているものの、その臨床像に関して言及した報告は少なく不明な点が多い。成人の glioblastoma において BRAF 点変異は 1.6〜6.3%に認められると報告されている[17,29,54,55]。また WHO grade3 の症例を含めると、Arita らの報告では 633 例中 15 例（2.4%）の頻度とされており[17]、本検討も過去の報告と同様の結果であった。また若年性に限定すると、Zhang らの報告では 35 歳以下の glioblastoma では BRAF 点変異の頻度が 107 例中 16 例（15.0%）と比較的高頻度であったとされている[43]。BRAF 点変異を有する WHO grade3-4 の高悪性度神経膠腫の臨床像について、本検討における 6 例を含むこれまでの報告例 76 例をまとめた[15,17,29,34,43,44,54-63]。病理診断では大多数が glioblastoma（60/76 例、78.9%）で、亜型である epithelioid glioblastoma が含まれた（60/13 例、17.1%）。IDH 1 の変異検索が行われた 66 例の中で、63 例（95.5%）で変異は持たなかったが残りの 3 例（4.5%）では変異を合併していた。発症年齢の記載があった 59 例で多くは 20 代（22 例、37.3%）と 30 代（13 例、22.0%）であった。

本検討における 6 例の中で、3 例では腫瘍周囲の浮腫が比較的軽度であった。同様の症例は過去にも報告されており[15,55]、画像上の特徴の一つである可能性が示唆された。また多巣性の病変を呈した 1 例は他の 5 例とは明らかに異なる画像所見であったが、同様に gliomatosis cerebri と診断された症例も少数であるものの報告されている[29,58]。

治療内容や治療成績について言及した報告は少なく、症例報告が散見されるのみである。長期生存が得られた症例の報告も散見されるが[60,64]、一方で明らかに予後が不良であった症例の報告もあり[15,55]、一定の傾向は認められない。本検討において、2 例は 12 ヶ月以内に死亡した予後不良例であったが、その他 4 例では病理診断が glioblastoma であるものの 24 ヶ月以上の生存が得られている。この結果は BRAF 点変異を有する高悪性度神経膠腫では、何らかの要因により予後不良例と良好例に分けられる可能性を示唆していると考えられ、その因子の同定を試みた。

CDKN2A の共欠失は、若年成人の BRAF 点変異を有する高悪性度神経膠腫の 80%に合併していると報告されており[54]、また BRAF 点変異と CDKN2A 欠失の合併は小児の二次性高悪性度神経膠腫において高頻度であると報告されている[41]。小児の低悪性度神経膠腫においては、CDKN2A の発現は BRAF 点変異に伴う oncogene induced senescence（OIS）によって上昇し、逆に CDKN2A 欠失を導入されることにより OIS が停止することが報告されている[65]。これらの報告から、我々は CDKN2A の発現が BRAF 点変異を有する高悪性度神経膠腫の腫瘍化において重要な役割を果たしているのではないかと考えた。本検討において CDKN2A の遺伝子発現が高い症例では予後

が良く、逆に発現が低い症例では予後が悪い傾向が認められ、CDKN2A の発現タンパクである p16 の免疫染色でも同様の傾向が認められた。なお本検討では CDKN2A の欠失の同定までは行っていないが、CDKN2A の発現量に関連する因子としては欠失のほか、プロモーター領域の DNA メチル化やヒストン H3K27 のトリメチル化など epigenetic な要因などが考えられる [66,67]。

CDKN2A 以外に予後マーカーとなりうる分子として、BRAF 点変異と ATRX の発現欠失を合併し長期生存を認めた小児高悪性度神経膠腫の症例が報告されているほか [64]、ATRX の発現が IDH 野生型の glioblastoma の生命予後に関連するという報告があることから [42]、本検討では ATRX の発現においても検討を行った。予後が良好であった 4 例では ATRX の発現欠失が認められた一方、予後が不良であった 2 例では ATRX の発現は保たれていた。この結果から、ATRX の発現は BRAF 点変異を持たない IDH 野生型 glioblastoma のみならず BRAF 点変異を有する IDH 野生型 glioblastoma においても予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

本検討における欠点として、少数例での検討にとどまる点が挙げられる。BRAF 点変異を有する高悪性度神経膠腫の臨床像をより明らかにするために、多くの症例で CDKN2A 欠失や ATRX 発現を含めた解析が必要になると考えられた。

BRAF 点変異は神経膠腫だけでなく、悪性黒色腫や大腸癌、甲状腺乳頭癌 [29]、肺癌 [68] などでも高頻度に認められる。近年、BRAF の特異的阻害剤である debrafenib と MAPK シグナル経路において BRAF の下流の分子として働く MEK の阻害剤である trametinib の併用療法が、悪性黒色腫や非小細胞性肺癌において有効であることが報告されている [68,69]。神経膠腫においては細胞株を用いた実験で BRAF/MEK の同時阻害療法の有効性が報告されており [47]、また小児の BRAF 点変異を有する glioblastoma において BRAF 阻害剤が有効であった症例も報告されている [70]。BRAF 点変異は成人高悪性度神経膠腫において決して高頻度ではないものの、治療標的として有用である可能性があることから変異検索の重要性が今後増してくることが期待される。

総括および結論

1. 本研究から得られた新知見

- 若年成人の神経膠腫において、H3F3A や BRAF 遺伝子を有する群と IDH1/2 や TERT プロモーター点変異を有する群は相互排他的であった。
- 若年成人において BRAF 変異群は予後良好な傾向が認められた。
- 成人の低悪性度神経膠腫において、従来報告されていた WHO Grade 1 のみならず Grade 2 の症例でも BRAF 変異が認められた。
- 低悪性度神経膠腫における BRAF 変異は大部分が若年成人での発症であった。
- 高悪性度神経膠腫において、BRAF 変異は Glioblastoma に認められ IDH 変異群と同様の発症年齢や治療成績であった。
- 同じ BRAF 変異を有する高悪性度神経膠腫でも治療予後が異なる可能性があり、CDKN2A の発現や ATRX の発現欠失の有無が予後予測マーカーとなる可能性が示唆された。

2. 新知見の意義

- 若年成人においては、WHO 診断基準に基づいた IDH 変異の解析のみならず、H3F3A や BRAF など小児に代表的な遺伝子変異も念頭に解析を行う必要性が示唆された。

- BRAF 変異と IDH 変異は相互排他的であり、BRAF 変異を有する神経膠腫は WHO 分類の改定版の診断基準に則ると予後不良とされる IDH 野生型の診断となる。実際には同一組織型における予後良好因子である可能性があり、IDH 野生型群とは区別されるべき群であると考えられる。

3. 今後の課題

- 高悪性度神経膠腫は少数例での検討であり、CDKN2A や ATRX 以外にも予後規定因子が存在する可能性がある。DNA メチル化アレイや RNA シークエンスなどにより、様々な遺伝子発現を解析する必要があると考えられる。
- BRAF 遺伝子解析の意義として、本遺伝子変異が治療標的となる可能性があることがあげられる。様々な組織型に対する標的治療の有用性についても、細胞実験な

どを行い評価することが必要と考えられる。

謝辞

本稿を終えるにあたり、研究の機会を与えていただきました北海道大学大学院医学研究科医学部脳神経外科学分野 寶金 清博 教授に深く感謝致します。研究全般において直接ご指導いただきました脳神経外科 山口 秀 助教に深く感謝致します。研究の方向性に関してご指導いただきました脳神経外科 寺坂 俊介 准教授、脳神経外科 小林 浩之 講師、茂木 洋晃 特任助教に深く感謝致します。また長年にわたり脳腫瘍の検体の収集に尽力いただいた脳腫瘍班並びに教室の諸先生方に深く感謝致します。

引用文献

1 Parsons, D. W., Jones, S., Zhang, X., Lin, J. C., Leary, R. J., Angenendt, P., Mankoo, P., Carter, H., Siu, I. M., Gallia, G. L., Olivi, A., McLendon, R., Rasheed, B. A., Keir, S., Nikolskaya, T., Nikolsky, Y., Busam, D. A., Tekleab, H., Diaz, L. A., Jr., Hartigan, J., Smith, D. R., Strausberg, R. L., Marie, S. K., Shinjo, S. M., Yan, H., Riggins, G. J., Bigner, D. D., Karchin, R., Papadopoulos, N., Parmigiani, G., Vogelstein, B., Velculescu, V. E. & Kinzler, K. W. An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme. *Science* **321**, 1807-1812, (2008).

2 Krell, D., Assoku, M., Galloway, M., Mulholland, P., Tomlinson, I. & Bardella, C. Screen for IDH1, IDH2, IDH3, D2HGDH and L2HGDH mutations in glioblastoma. *PLoS One* **6**, e19868, (2011).

3 Turcan, S., Rohle, D., Goenka, A., Walsh, L. A., Fang, F., Yilmaz, E., Campos, C., Fabius, A. W., Lu, C., Ward, P. S., Thompson, C. B., Kaufman, A., Guryanova, O., Levine, R., Heguy, A., Viale, A., Morris, L. G., Huse, J. T., Mellinghoff, I. K. & Chan, T. A. IDH1 mutation is sufficient to establish the glioma hypermethylator phenotype. *Nature* **483**, 479-483, (2012).

4 Yan, H., Parsons, D. W., Jin, G., McLendon, R., Rasheed, B. A., Yuan, W., Kos, I., Batinic-Haberle, I., Jones, S., Riggins, G. J., Friedman, H., Friedman, A., Reardon, D., Herndon, J., Kinzler, K. W., Velculescu, V. E., Vogelstein, B. & Bigner, D. D. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **360**, 765-773, (2009).

5 Arita, H., Narita, Y., Yoshida, A., Hashimoto, N., Yoshimine, T. & Ichimura, K. IDH1/2 mutation detection in gliomas. *Brain tumor pathology* **32**, 79-89, (2015).

6 Arai, M., Nobusawa, S., Ikota, H., Takemura, S. & Nakazato, Y. Frequent IDH1/2 mutations in intracranial chondrosarcoma: a possible diagnostic clue for its differentiation from chordoma. *Brain tumor pathology* **29**, 201-206, (2012).

7 Rakheja, D., Konoplev, S., Medeiros, L. J. & Chen, W. IDH mutations in acute myeloid leukemia. *Human pathology* **43**, 1541-1551, (2012).

8 Horn, S., Figl, A., Rachakonda, P. S., Fischer, C., Sucker, A., Gast, A., Kadel, S., Moll, I., Nagore, E., Hemminki, K., Schadendorf, D. & Kumar, R. TERT

promoter mutations in familial and sporadic melanoma. *Science* **339**, 959-961, (2013).

9 Huang, F. W., Hodis, E., Xu, M. J., Kryukov, G. V., Chin, L. & Garraway, L. A. Highly recurrent TERT promoter mutations in human melanoma. *Science* **339**, 957-959, (2013).

10 Koelsche, C., Sahm, F., Capper, D., Reuss, D., Sturm, D., Jones, D. T., Kool, M., Northcott, P. A., Wiestler, B., Bohmer, K., Meyer, J., Mawrin, C., Hartmann, C., Mittelbronn, M., Platten, M., Brokinkel, B., Seiz, M., Herold-Mende, C., Unterberg, A., Schittenhelm, J., Weller, M., Pfister, S., Wick, W., Korshunov, A. & von Deimling, A. Distribution of TERT promoter mutations in pediatric and adult tumors of the nervous system. *Acta Neuropathol* **126**, 907-915, (2013).

11 Arita, H., Narita, Y., Fukushima, S., Tateishi, K., Matsushita, Y., Yoshida, A., Miyakita, Y., Ohno, M., Collins, V. P., Kawahara, N., Shibui, S. & Ichimura, K. Upregulating mutations in the TERT promoter commonly occur in adult malignant gliomas and are strongly associated with total 1p19q loss. *Acta neuropathologica* **126**, 267-276, (2013).

12 Killela, P. J., Reitman, Z. J., Jiao, Y., Bettegowda, C., Agrawal, N., Diaz, L. A., Jr., Friedman, A. H., Friedman, H., Gallia, G. L., Giovanella, B. C., Grollman, A. P., He, T. C., He, Y., Hruban, R. H., Jallo, G. I., Mandahl, N., Meeker, A. K., Mertens, F., Netto, G. J., Rasheed, B. A., Riggins, G. J., Rosenquist, T. A., Schiffman, M., Shih Ie, M., Theodorescu, D., Torbenson, M. S., Velculescu, V. E., Wang, T. L., Wentzensen, N., Wood, L. D., Zhang, M., McLendon, R. E., Bigner, D. D., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Papadopoulos, N. & Yan, H. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **110**, 6021-6026, (2013).

13 Nonoguchi, N., Ohta, T., Oh, J. E., Kim, Y. H., Kleihues, P. & Ohgaki, H. TERT promoter mutations in primary and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol* **126**, 931-937, (2013).

14 Reifenberger, J., Reifenberger, G., Liu, L., James, C. D., Wechsler, W. & Collins, V. P. Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *The American journal of pathology* **145**, 1175-1190, (1994).

15 Suzuki, Y., Takahashi-Fujigasaki, J., Akasaki, Y., Matsushima, S., Mori, R., Karagiozov, K., Joki, T., Ikeuchi, S., Ikegami, M., Manome, Y. & Murayama, Y. BRAF V600E-mutated diffuse glioma in an adult patient: a case report and review. *Brain tumor pathology*, (2015).

16 David N. Louis, H. O., Otmar D. Wiestler, Webster K. Cavenee, David W. Ellison, Dominique Figarella-Branger, Arie Perry, Guido Reifenberger, Andreas von Deimling. *WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System*. Revised 4th Edition edn, (International Agency for Research on Cancer, 2016).

17 Arita, H. *et al.* A combination of TERT promoter mutation and MGMT methylation status predicts clinically relevant subgroups of newly diagnosed glioblastomas. *Acta Neuropathol Commun* **4**, 79, (2016).

18 Schmidt, E. E., Ichimura, K., Reifenberger, G. & Collins, V. P. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer research* **54**, 6321-6324, (1994).

19 Gibbons, R. J., Picketts, D. J., Villard, L. & Higgs, D. R. Mutations in a putative global transcriptional regulator cause X-linked mental retardation with alpha-thalassemia (ATR-X syndrome). *Cell* **80**, 837-845, (1995).

20 Jiao, Y., Killela, P. J., Reitman, Z. J., Rasheed, A. B., Heaphy, C. M., de Wilde, R. F., Rodriguez, F. J., Rosemberg, S., Oba-Shinjo, S. M., Nagahashi Marie, S. K., Bettegowda, C., Agrawal, N., Lipp, E., Pirozzi, C., Lopez, G., He, Y., Friedman, H., Friedman, A. H., Riggins, G. J., Holdhoff, M., Burger, P., McLendon, R., Bigner, D. D., Vogelstein, B., Meeker, A. K., Kinzler, K. W., Papadopoulos, N., Diaz, L. A. & Yan, H. Frequent ATRX, CIC, FUBP1 and IDH1 mutations refine the classification of malignant gliomas. *Oncotarget* **3**, 709-722, (2012).

21 Liu, X. Y., Gerges, N., Korshunov, A., Sabha, N., Khuong-Quang, D. A., Fontebasso, A. M., Fleming, A., Hadjadj, D., Schwartzentruber, J., Majewski, J., Dong, Z., Siegel, P., Albrecht, S., Croul, S., Jones, D. T., Kool, M., Tonjes, M., Reifenberger, G., Faury, D., Zadeh, G., Pfister, S. & Jabado, N. Frequent ATRX mutations and loss of expression in adult diffuse astrocytic tumors carrying IDH1/IDH2 and TP53 mutations. *Acta neuropathologica* **124**, 615-625, (2012).

22 Heaphy, C. M., de Wilde, R. F., Jiao, Y., Klein, A. P., Edil, B. H., Shi, C., Bettegowda, C., Rodriguez, F. J., Eberhart, C. G., Hebbar, S., Offerhaus, G.

J., McLendon, R., Rasheed, B. A., He, Y., Yan, H., Bigner, D. D., Oba-Shinjo, S. M., Marie, S. K., Riggins, G. J., Kinzler, K. W., Vogelstein, B., Hruban, R. H., Maitra, A., Papadopoulos, N. & Meeker, A. K. Altered telomeres in tumors with ATRX and DAXX mutations. *Science* **333**, 425, (2011).

23 Schwartzentruber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226-231, (2012).

24 Wu, G., Broniscer, A., McEachron, T. A., Lu, C., Paugh, B. S., Becksfort, J., Qu, C., Ding, L., Huether, R., Parker, M., Zhang, J., Gajjar, A., Dyer, M. A., Mullighan, C. G., Gilbertson, R. J., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Downing, J. R., Ellison, D. W., Zhang, J., Baker, S. J. & 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. *Nature genetics* **44**, 251-253, (2012).

25 Lewis, P. W., Muller, M. M., Koletsky, M. S., Cordero, F., Lin, S., Banaszynski, L. A., Garcia, B. A., Muir, T. W., Becher, O. J. & Allis, C. D. Inhibition of PRC2 activity by a gain-of-function H3 mutation found in pediatric glioblastoma. *Science* **340**, 857-861, (2013).

26 Collins, V. P., Jones, D. T. & Giannini, C. Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers. *Acta Neuropathol* **129**, 775-788, (2015).

27 Jones, D. T. *et al.* Recurrent somatic alterations of FGFR1 and NTRK2 in pilocytic astrocytoma. *Nature genetics* **45**, 927-932, (2013).

28 Chappe, C., Padovani, L., Scavarda, D., Forest, F., Nanni-Metellus, I., Loundou, A., Mercurio, S., Fina, F., Lena, G., Colin, C. & Figarella-Branger, D. Dysembryoplastic neuroepithelial tumors share with pleomorphic xanthoastrocytomas and gangliogliomas BRAF(V600E) mutation and expression. *Brain Pathol* **23**, 574-583, (2013).

29 Schindler, G., Capper, D., Meyer, J., Janzarik, W., Omran, H., Herold-Mende, C., Schmieder, K., Wesseling, P., Mawrin, C., Hasselblatt, M., Louis, D. N., Korshunov, A., Pfister, S., Hartmann, C., Paulus, W., Reifenberger, G. & von Deimling, A. Analysis of BRAF V600E mutation in 1,320 nervous system tumors reveals high mutation frequencies in pleomorphic xanthoastrocytoma, ganglioglioma and extra-cerebellar pilocytic astrocytoma. *Acta neuropathologica* **121**, 397-405, (2011).

30 Davies, H. *et al.* Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature* **417**,

949-954, (2002).

31 Mercer, K., Giblett, S., Green, S., Lloyd, D., DaRocha Dias, S., Plumb, M., Marais, R. & Pritchard, C. Expression of endogenous oncogenic V600EB-raf induces proliferation and developmental defects in mice and transformation of primary fibroblasts. *Cancer research* **65**, 11493-11500, (2005).

32 Zhang, J., Wu, G., Miller, C. P., Tatevossian, R. G., Dalton, J. D., Tang, B., Orisme, W., Punchihewa, C., Parker, M., Qaddoumi, I., Boop, F. A., Lu, C., Kandoth, C., Ding, L., Lee, R., Huether, R., Chen, X., Hedlund, E., Nagahawatte, P., Rusch, M., Boggs, K., Cheng, J., Becksfort, J., Ma, J., Song, G., Li, Y., Wei, L., Wang, J., Shurtleff, S., Easton, J., Zhao, D., Fulton, R. S., Fulton, L. L., Dooling, D. J., Vadodaria, B., Mulder, H. L., Tang, C., Ochoa, K., Mullighan, C. G., Gajjar, A., Kriwacki, R., Sheer, D., Gilbertson, R. J., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Downing, J. R., Baker, S. J., Ellison, D. W. & St. Jude Children's Research Hospital-Washington University Pediatric Cancer Genome, P. Whole-genome sequencing identifies genetic alterations in pediatric low-grade gliomas. *Nat Genet* **45**, 602-612, (2013).

33 Jones, D. T., Kocialkowski, S., Liu, L., Pearson, D. M., Backlund, L. M., Ichimura, K. & Collins, V. P. Tandem duplication producing a novel oncogenic BRAF fusion gene defines the majority of pilocytic astrocytomas. *Cancer research* **68**, 8673-8677, (2008).

34 Dias-Santagata, D., Lam, Q., Vernovsky, K., Vena, N., Lennerz, J. K., Borger, D. R., Batchelor, T. T., Ligon, K. L., Iafrate, A. J., Ligon, A. H., Louis, D. N. & Santagata, S. BRAF V600E mutations are common in pleomorphic xanthoastrocytoma: diagnostic and therapeutic implications. *PLoS One* **6**, e17948, (2011).

35 Lin, A., Rodriguez, F. J., Karajannis, M. A., Williams, S. C., Legault, G., Zagzag, D., Burger, P. C., Allen, J. C., Eberhart, C. G. & Bar, E. E. BRAF alterations in primary glial and glioneuronal neoplasms of the central nervous system with identification of 2 novel KIAA1549:BRAF fusion variants. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **71**, 66-72, (2012).

36 Taha, H., Yehia, M., Mahmoud, M., El-Beltagy, M., Ghabriel, M. & El-Naggar, S. Incidence of kiaa1549-braf fusion gene in Egyptian pediatric low grade glioma. *Clinical and translational medicine* **4**, 10, (2015).

37 Suzuki, H., Aoki, K., Chiba, K., Sato, Y., Shiozawa, Y., Shiraishi, Y.,

Shimamura, T., Niida, A., Motomura, K., Ohka, F., Yamamoto, T., Tanahashi, K., Ranjit, M., Wakabayashi, T., Yoshizato, T., Kataoka, K., Yoshida, K., Nagata, Y., Sato-Otsubo, A., Tanaka, H., Sanada, M., Kondo, Y., Nakamura, H., Mizoguchi, M., Abe, T., Muragaki, Y., Watanabe, R., Ito, I., Miyano, S., Natsume, A. & Ogawa, S. Mutational landscape and clonal architecture in grade II and III gliomas. *Nature genetics* **47**, 458-468, (2015).

38 Aihara, K., Mukasa, A., Gotoh, K., Saito, K., Nagae, G., Tsuji, S., Tatsuno, K., Yamamoto, S., Takayanagi, S., Narita, Y., Shibui, S., Aburatani, H. & Saito, N. H3F3A K27M mutations in thalamic gliomas from young adult patients. *Neuro-oncology* **16**, 140-146, (2014).

39 Lee, D., Cho, Y. H., Kang, S. Y., Yoon, N., Sung, C. O. & Suh, Y. L. BRAF V600E mutations are frequent in dysembryoplastic neuroepithelial tumors and subependymal giant cell astrocytomas. *Journal of surgical oncology* **111**, 359-364, (2015).

40 Becker, A. P., Scapulatempo-Neto, C., Carloni, A. C., Paulino, A., Sheren, J., Aisner, D. L., Musselwhite, E., Clara, C., Machado, H. R., Oliveira, R. S., Neder, L., Varella-Garcia, M. & Reis, R. M. KIAA1549: BRAF Gene Fusion and FGFR1 Hotspot Mutations Are Prognostic Factors in Pilocytic Astrocytomas. *Journal of neuropathology and experimental neurology* **74**, 743-754, (2015).

41 Mistry, M., Zhukova, N., Merico, D., Rakopoulos, P., Krishnatry, R., Shago, M., Stavropoulos, J., Alon, N., Pole, J. D., Ray, P. N., Navickiene, V., Mangerel, J., Remke, M., Buczkowicz, P., Ramaswamy, V., Guerreiro Stucklin, A., Li, M., Young, E. J., Zhang, C., Castelo-Branco, P., Bakry, D., Laughlin, S., Shlien, A., Chan, J., Ligon, K. L., Rutka, J. T., Dirks, P. B., Taylor, M. D., Greenberg, M., Malkin, D., Huang, A., Bouffet, E., Hawkins, C. E. & Tabori, U. BRAF mutation and CDKN2A deletion define a clinically distinct subgroup of childhood secondary high-grade glioma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **33**, 1015-1022, (2015).

42 Pekmezci, M., Rice, T., Molinaro, A. M., Walsh, K. M., Decker, P. A., Hansen, H., Sicotte, H., Kollmeyer, T. M., McCoy, L. S., Sarkar, G., Perry, A., Giannini, C., Tihan, T., Berger, M. S., Wiemels, J. L., Bracci, P. M., Eckel-Passow, J. E., Lachance, D. H., Clarke, J., Taylor, J. W., Luks, T.,

Wiencke, J. K., Jenkins, R. B. & Wrensch, M. R. Adult infiltrating gliomas with WHO 2016 integrated diagnosis: additional prognostic roles of ATRX and TERT. *Acta Neuropathol* **133**, 1001-1016, (2017).

43 Zhang, R. Q., Shi, Z., Chen, H., Chung, N. Y., Yin, Z., Li, K. K., Chan, D. T., Poon, W. S., Wu, J., Zhou, L., Chan, A. K., Mao, Y. & Ng, H. K. Biomarker-based prognostic stratification of young adult glioblastoma. *Oncotarget* **7**, 5030-5041, (2016).

44 Chi, A. S., Batchelor, T. T., Yang, D., Dias-Santagata, D., Borger, D. R., Ellisen, L. W., Iafrate, A. J. & Louis, D. N. BRAF V600E mutation identifies a subset of low-grade diffusely infiltrating gliomas in adults. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **31**, e233-236, (2013).

45 Capper, D., Preusser, M., Habel, A., Sahm, F., Ackermann, U., Schindler, G., Pusch, S., Mechtersheimer, G., Zentgraf, H. & von Deimling, A. Assessment of BRAF V600E mutation status by immunohistochemistry with a mutation-specific monoclonal antibody. *Acta neuropathologica* **122**, 11-19, (2011).

46 Tateishi, K., Wakimoto, H., Iafrate, A. J., Tanaka, S., Loebel, F., Lelic, N., Wiederschain, D., Bedel, O., Deng, G., Zhang, B., He, T., Shi, X., Gerszten, R. E., Zhang, Y., Yeh, J. R., Curry, W. T., Zhao, D., Sundaram, S., Nigim, F., Koerner, M. V., Ho, Q., Fisher, D. E., Roider, E. M., Kemeny, L. V., Samuels, Y., Flaherty, K. T., Batchelor, T. T., Chi, A. S. & Cahill, D. P. Extreme Vulnerability of IDH1 Mutant Cancers to NAD+ Depletion. *Cancer Cell* **28**, 773-784, (2015).

47 Zhang, J., Yao, T. W., Hashizume, R., Hariono, S., Barkovich, K. J., Fan, Q. W., Prados, M., James, C. D., Weiss, W. A. & Nicolaides, T. Combined BRAFV600E and MEK blockade for BRAFV600E-mutant gliomas. *J Neurooncol* **131**, 495-505, (2017).

48 Hashizume, R., Andor, N., Ihara, Y., Lerner, R., Gan, H., Chen, X., Fang, D., Huang, X., Tom, M. W., Ngo, V., Solomon, D., Mueller, S., Paris, P. L., Zhang, Z., Petritsch, C., Gupta, N., Waldman, T. A. & James, C. D. Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat Med* **20**, 1394-1396, (2014).

49 Qaddoumi, I., Orisme, W., Wen, J., Santiago, T., Gupta, K., Dalton, J. D., Tang, B., Haupfear, K., Punchihewa, C., Easton, J., Mulder, H., Boggs, K.,

Shao, Y., Rusch, M., Becksfort, J., Gupta, P., Wang, S., Lee, R. P., Brat, D., Peter Collins, V., Dahiya, S., George, D., Konomos, W., Kurian, K. M., McFadden, K., Serafini, L. N., Nickols, H., Perry, A., Shurtleff, S., Gajjar, A., Boop, F. A., Klimo, P. D., Jr., Mardis, E. R., Wilson, R. K., Baker, S. J., Zhang, J., Wu, G., Downing, J. R., Tatevossian, R. G. & Ellison, D. W. Genetic alterations in uncommon low-grade neuroepithelial tumors: BRAF, FGFR1, and MYB mutations occur at high frequency and align with morphology. *Acta Neuropathol* **131**, 833-845, (2016).

50 Ho, C. Y., Mobley, B. C., Gordish-Dressman, H., VandenBussche, C. J., Mason, G. E., Bornhorst, M., Esbenshade, A. J., Tehrani, M., Orr, B. A., LaFrance, D. R., Devaney, J. M., Meltzer, B. W., Hofherr, S. E., Burger, P. C., Packer, R. J. & Rodriguez, F. J. A clinicopathologic study of diencephalic pediatric low-grade gliomas with BRAF V600 mutation. *Acta Neuropathol* **130**, 575-585, (2015).

51 Huberfeld, G. & Vecht, C. J. Seizures and gliomas--towards a single therapeutic approach. *Nat Rev Neurol* **12**, 204-216, (2016).

52 Yuen, T. I., Morokoff, A. P., Bjorksten, A., D'Abaco, G., Paradiso, L., Finch, S., Wong, D., Reid, C. A., Powell, K. L., Drummond, K. J., Rosenthal, M. A., Kaye, A. H. & O'Brien, T. J. Glutamate is associated with a higher risk of seizures in patients with gliomas. *Neurology* **79**, 883-889, (2012).

53 Chen, H., Judkins, J., Thomas, C., Wu, M., Khoury, L., Benjamin, C. G., Pacione, D., Golfinos, J. G., Kumthekar, P., Ghamsari, F., Chen, L., Lein, P., Chetkovich, D. M., Snuderl, M. & Horbinski, C. Mutant IDH1 and seizures in patients with glioma. *Neurology* **88**, 1805-1813, (2017).

54 Park, C. K., Lee, S. H., Kim, J. Y., Kim, J. E., Kim, T. M., Lee, S. T., Choi, S. H., Park, S. H. & Kim, I. H. Expression level of hTERT is regulated by somatic mutation and common single nucleotide polymorphism at promoter region in glioblastoma. *Oncotarget* **5**, 3399-3407, (2014).

55 Hatae, R., Hata, N., Suzuki, S. O., Yoshimoto, K., Kuga, D., Murata, H., Akagi, Y., Sangatsuda, Y., Iwaki, T., Mizoguchi, M. & Iihara, K. A comprehensive analysis identifies BRAF hotspot mutations associated with gliomas with peculiar epithelial morphology. *Neuropathology* **37**, 191-199, (2017).

56 Myung, J. K., Cho, H., Park, C. K., Kim, S. K., Lee, S. H. & Park, S. H. Analysis of the BRAF(V600E) Mutation in Central Nervous System Tumors.

Transl Oncol **5**, 430-436, (2012).

57 Knobbe, C. B., Reifenberger, J. & Reifenberger, G. Mutation analysis of the Ras pathway genes NRAS, HRAS, KRAS and BRAF in glioblastomas. *Acta Neuropathol* **108**, 467-470, (2004).

58 Fernandez-Vega, I., Quirk, J., Norwood, F. L., Sibtain, N. A., Laxton, R. & Bodi, I. Gliomatosis cerebri type 1 with extensive involvement of the spinal cord and BRAF V600E mutation. *Pathol Oncol Res* **20**, 215-220, (2014).

59 Basto, D., Trovisco, V., Lopes, J. M., Martins, A., Pardal, F., Soares, P. & Reis, R. M. Mutation analysis of B-RAF gene in human gliomas. *Acta Neuropathol* **109**, 207-210, (2005).

60 Takahashi, Y., Akahane, T., Sawada, T., Ikeda, H., Tempaku, A., Yamauchi, S., Nishihara, H., Tanaka, S., Nitta, K., Ide, W., Hashimoto, I. & Kamada, H. Adult classical glioblastoma with a BRAF V600E mutation. *World J Surg Oncol* **13**, 100, (2015).

61 Kleinschmidt-DeMasters, B. K., Aisner, D. L., Birks, D. K. & Foreman, N. K. Epithelioid GBMs show a high percentage of BRAF V600E mutation. *Am J Surg Pathol* **37**, 685-698, (2013).

62 Nobusawa, S., Hirato, J., Kurihara, H., Ogawa, A., Okura, N., Nagaishi, M., Ikota, H., Yokoo, H. & Nakazato, Y. Intratumoral heterogeneity of genomic imbalance in a case of epithelioid glioblastoma with BRAF V600E mutation. *Brain Pathol* **24**, 239-246, (2014).

63 Tanaka, S., Nakada, M., Nobusawa, S., Suzuki, S. O., Sabit, H., Miyashita, K. & Hayashi, Y. Epithelioid glioblastoma arising from pleomorphic xanthoastrocytoma with the BRAF V600E mutation. *Brain tumor pathology* **31**, 172-176, (2014).

64 Nakata, S., Horiguchi, K., Ishiuchi, S., Yoshimoto, Y., Yamada, S., Nobusawa, S., Ikota, H., Hirato, J. & Yokoo, H. A case of high-grade astrocytoma with BRAF and ATRX mutations following a long-standing course over two decades. *Neuropathology*, (2017).

65 Jacob, K., Quang-Khuong, D. A., Jones, D. T., Witt, H., Lambert, S., Albrecht, S., Witt, O., Vezina, C., Shirinian, M., Faury, D., Garami, M., Hauser, P., Klekner, A., Bognar, L., Farmer, J. P., Montes, J. L., Atkinson, J., Hawkins, C., Korshunov, A., Collins, V. P., Pfister, S. M., Tabori, U. & Jabado, N. Genetic aberrations leading to MAPK pathway activation mediate oncogene-induced senescence in sporadic pilocytic astrocytomas.

Clin Cancer Res **17**, 4650-4660, (2011).

66 Alves, M. K., Faria, M. H., Neves Filho, E. H., Ferrasi, A. C., Pardini, M. I., de Moraes Filho, M. O. & Rabenhorst, S. H. CDKN2A promoter hypermethylation in astrocytomas is associated with age and sex. *Int J Surg* **11**, 549-553, (2013).

67 Purkait, S., Sharma, V., Jha, P., Sharma, M. C., Suri, V., Suri, A., Sharma, B. S. & Sarkar, C. EZH2 expression in gliomas: Correlation with CDKN2A gene deletion/ p16 loss and MIB-1 proliferation index. *Neuropathology* **35**, 421-431, (2015).

68 Planchard, D., Besse, B., Groen, H. J., Souquet, P. J., Quoix, E., Baik, C. S., Barlesi, F., Kim, T. M., Mazieres, J., Novello, S., Rigas, J. R., Upalawanna, A., D'Amelio, A. M., Jr., Zhang, P., Mookerjee, B. & Johnson, B. E. Dabrafenib plus trametinib in patients with previously treated BRAF(V600E)-mutant metastatic non-small cell lung cancer: an open-label, multicentre phase 2 trial. *Lancet Oncol* **17**, 984-993, (2016).

69 Flaherty, K. T., Infante, J. R., Daud, A., Gonzalez, R., Kefford, R. F., Sosman, J., Hamid, O., Schuchter, L., Cebon, J., Ibrahim, N., Kudchadkar, R., Burris, H. A., 3rd, Falchook, G., Algazi, A., Lewis, K., Long, G. V., Puzanov, I., Lebowitz, P., Singh, A., Little, S., Sun, P., Allred, A., Ouellet, D., Kim, K. B., Patel, K. & Weber, J. Combined BRAF and MEK inhibition in melanoma with BRAF V600 mutations. *N Engl J Med* **367**, 1694-1703, (2012).

70 Robinson, G. W., Orr, B. A. & Gajjar, A. Complete clinical regression of a BRAF V600E-mutant pediatric glioblastoma multiforme after BRAF inhibitor therapy. *BMC Cancer* **14**, 258, (2014).