

平成 21 年 4 月 8 日現在

研究種目：基盤研究(C)  
 研究期間：2006～2008  
 課題番号：18591605  
 研究課題名（和文） 頭蓋内胚細胞腫瘍の新規腫瘍マーカーの探索と発生機序・治療感受性に関する解析  
 研究課題名（英文） Search for novel markers, and mechanisms of tumorigenesis and treatment responsiveness of central nervous system germ cell tumors  
 研究代表者  
 松谷 雅生(MATSUTANI MASAO)  
 埼玉医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：90010454

研究成果の概要：頭蓋内胚細胞腫瘍の凍結標本を用いた cDNA array による遺伝子発現解析を行った。Germinoma に比べて non-greminomatous germ cell tumor において有意に発現の高い遺伝子として Bone Morphogenetic Protein-4, SOX-11, Frizzled 7 をピックアップした。免疫組織化学染色による蛋白質発現の解析を行って、新規腫瘍マーカーとしての可能性を検討した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 18 年度	900,000	0	900,000
平成 19 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 20 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	750,000	4,150,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・脳神経外科

キーワード：胚細胞腫瘍，腫瘍マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

頭蓋内胚細胞腫瘍 (CNSGCT) の発生に関しては，始原生殖細胞 primordial germ cell 起源説が有力である。GCT に関する分子遺伝学的知見としては，wild-type TP53 蛋白の過剰発現，cyclin D2 遺伝子の増幅と過剰発現，isochromosome 12p, X 染色体の増加等が知られている。これらの変化は，減数分裂過程の内，特に DNA ploidy が 4n になる

過程，即ち第一減数分裂の prophase の pachytene stage において認められる形質で，primordial germ cell の減数分裂過程の或るタイミングが腫瘍化のターゲットであることを示唆する。しかし具体的な腫瘍化の機序は未解明である。また CNSGCT は放射線照射や抗がん剤による化学療法に対する感受性が幅広い。例えば germinoma は放射線治療および化学療法

に対して極めて感受性が高く、24Gyの放射線照射と3クール of 化学療法によって10年生存率が90%に達する。一方、胎児性癌、卵黄嚢腫瘍、絨毛癌、およびこれらの組織型を主体とする mixed germ cell tumor は、放射線照射と化学療法に対して共に感受性が低く、50Gy以上の放射線と年余にわたる化学療法を必要とする。Germinoma であれば現行の放射線照射 + 化学療法によって90%の症例で治療させることが出来るが、裏返せば10%の treatment failure がある。この10%の症例を予め識別することが出来れば、低感受性群並の強力な治療を行なうことによって救うことが出来るかもしれない。臨床的な観点から治療感受性を支配している分子機構の解明も急務である。

我々はこれまでに CNSGCT 19 例の凍結標本を用いて cDNA array による preliminary な解析を行なった。従来から言われているマーカー、HCG、AFP、PLAP、c-Kit は、いずれもそれぞれに特有の組織型において発現している事が観察され、cDNA array 解析が十分に信頼できる情報を提供する事が確認された。いくつかの遺伝子の発現が germinoma と non-germinomatous GCT を区別する遺伝子としてピックアップされたが、その中には primordial germ cell の分化に関与していると報告されている遺伝子が複数含まれていた。特に TGF- $\beta$  関連因子である Bone Morphogenetic Protein-4(BMP-4)が統計学的有意差を持って non-germinomatous tumor に高発現していた(図1)。BMP-4 は extraembryonic ectoderm の細胞が germ cell lineage に入る最初の段階を制御して

いる事が知られていることから、詳細に検討する必要があるものと考察された。

今回は、CNSGCT の発生機序ならびに治療感受性に関する網羅的な知見を得るために更に複数の新規腫瘍マーカー分子候補の抽出と解析を計画した。

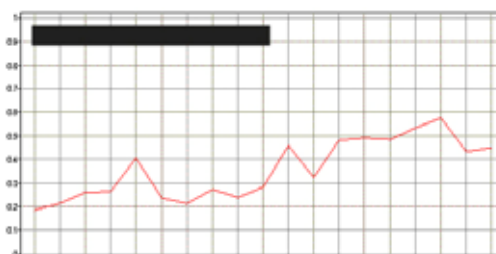


図1. 頭蓋内胚細胞腫瘍における BMP-4 の発現。横軸は症例。縦軸は発現レベル。左の10症例は germinoma。右の9症例は non-germinomatous GCT。Germinoma 群において発現が有意に ( $p=4.1 \times 10^{-6}$ ) 低い。

## 2. 研究の目的

- (1) CNSGCT における遺伝子発現パターンを cDNA array を用いて網羅的に解析し新規腫瘍マーカー候補分子を抽出する。
- (2) 抽出された新規腫瘍マーカー候補分子の発現について腫瘍組織を用いた免疫組織化学法で解析し、新しいマーカーとしての可能性を検討する。

## 3. 研究の方法

- (1) BMP-4 以外のマーカーとしての候補遺伝子を探索する為に、引き続き CNSGCT における遺伝子発現パターンの cDNA array を用いた網羅的解析により得られた遺伝子発現パターンの統計学的解析から Germinoma と non-germinomatous GCT(NGGCT)を識別する遺伝子群を同定する。
- (2) 手術により摘出された腫瘍組織を用いて免疫組織化学染色を行い、germinoma と NGGCT の発現強度の違い、ある組織型、

例えば未熟奇形腫や胎児性癌など、従来特異的マーカーの知られていない組織型に特徴的に発現していないかどうか調べる。

- (3) マーカーとしてピックアップされた遺伝子群について既知の機能を検索する。

#### 4. 研究成果

- (1) CNSGCT19 例の凍結標本を用いて cDNA array による遺伝子発現解析を行った結果、Bone Morphogenetic Protein-4 (BMP-4), SOX-11, frizzled 7, SFRP1 が統計学的に NGGCT に高発現する分子として抽出された(表 1)。これらは primordial germ cell の発生と分化に関与した分子であり、また幹細胞の分化に関するシグナル伝達系の構成分子であった。

NAME	t-test/Anov
211518_s_at Bone morphogenetic protein 4 precursor (BMP-4) (BMP-2B). [	3.08E-0
204915_s_at Transcription factor SOX-11. [Source:SWISSPROT;Acc:P35716]	3.33E-0
203706_s_at Frizzled 7 precursor (Frizzled-7) (Fz-7) (hFz7) (FzE3). [Source:SWISSPROT	0.0152434
211124_s_at Kit ligand precursor (C-kit ligand) (Stem cell factor) (SCF) (Mas	0.0152434
203705_s_at Frizzled 7 precursor (Frizzled-7) (Fz-7) (hFz7) (FzE3). [Source:SWISSPROT	0.0152434

表 1 . NGGCT と germinoma を区別する分子 . 既知の germinoma のマーカーである C-kit は比較のために記載した .

- (2) BMP-4 の染色性には既知のマーカーである PLAP , cKit 程の特異性は認められなかった .Germinoma においては 20 例中 18 例が陽性であったが( 図 2 ), PLAP あるいは cKit に比べると染色性の弱いものが多かった .
- (3) BMP-4 は卵黄嚢腫瘍 ,絨毛癌でも陽性所見が得られ ,むしろ germinoma よりも染色性の強い症例が目立った .代表的な染色を 図 3 に示した .

- (4) BMP-4 は奇形腫では ,主として上皮成分 , 神経組織 , 間質の一部に陽性を認め , 特に上皮の反応性が強いようであった . 新規マーカーとしての可能性を示唆した .

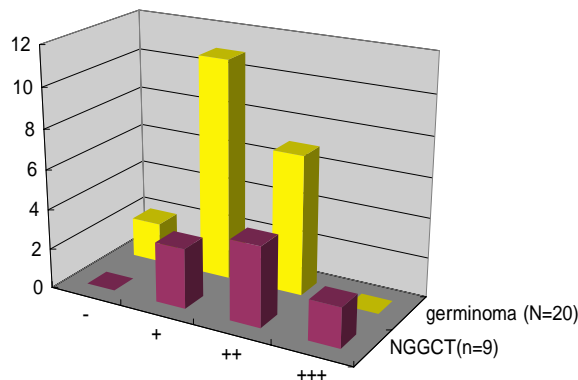


図 2 . BMP-4 の染色様態 . 横軸は染色強度 . NGGCT における染色性が強いが , germinoma においても陽性率は高い .

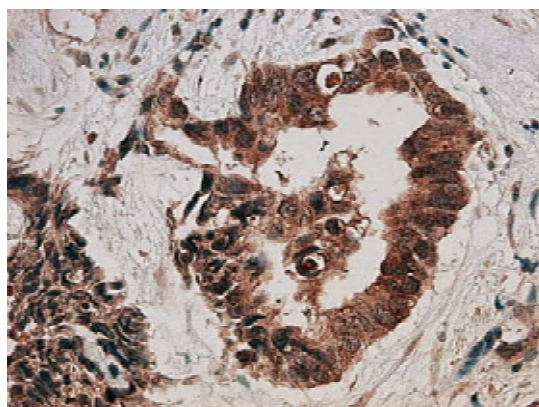


図 3 . Yolk sac tumor + Immature teratoma. BMP-4. Original magnification x400.

- (5) SOX-11 の免疫組織化学における発現は germinoma においても non-germinomatous GCT においても見られたが , むしろ germinoma において強く発現している症例が多かった ( 図 4 , 5 ) .

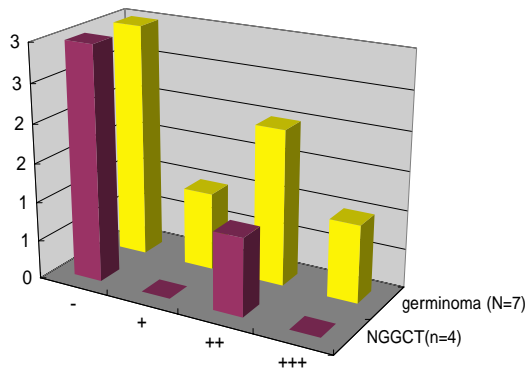


図4 .SOX-11 の染色様態 .むしろ NGGCT において染色陰性症例が目立った .

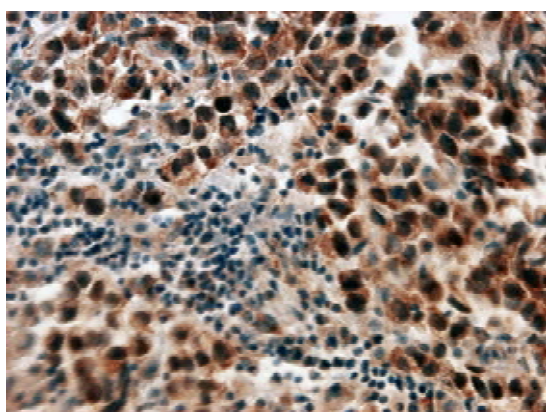


図5 .Germinoma. SOX-11. Original magnification x400.

(6)Frizzled-7 の免疫組織化学による発現解析では non-germinomatous GCT において強く発現している症例が多かった ( 図 6 , 7 ). これは特に NGGCT の発生過程に Wnt シグナルの異常が関与していることを示唆した .

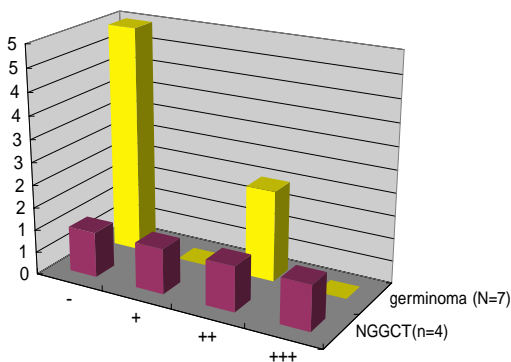


図6 . Frizzled-7 の染色様態 .

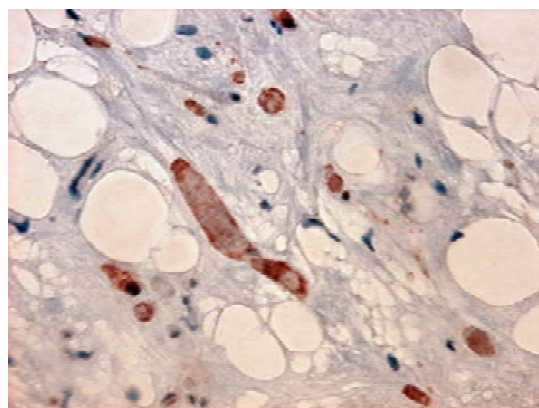


図7 . Immature teratoma. Frizzled 7 (GTX12996) . Original magnification x400.

現実的には腫瘍マーカーとしてはいずれも特異性には乏しい結果であった . 次のステップとしては , 幹細胞の分化における Wnt シグナルの関与の観点から解析を進展させる計画である .

#### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 0 件 )

#### 6 . 研究組織

##### (1) 研究代表者

松谷 雅生 (MATSUTANI MASAO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 90010454

##### (2) 研究分担者

西川 亮 (NISHIKAWA RYO)

埼玉医科大学・医学部・教授

研究者番号 : 90237678