

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16190

研究課題名（和文）発生・分化に基づいたグリオーマ細胞の解析および特異的マーカーの開発

研究課題名（英文）Analysis of glioma cells based on development and differentiation and development of specific markers

研究代表者

松村 望（MATSUMURA, Nozomi）

群馬大学・大学院医学系研究科・講師

研究者番号：20729511

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：グリオーマの形態学的多様性の原因を探るべく、アストロサイトーマおよびオリゴデンドログリオーマにおいて、発生中のグリアの分化に重要な役割を果たす転写因子の発現と、腫瘍細胞の形態との関連性を解析した。その結果、オリゴデンドログリオーマにおいて、アストロサイトへの分化に重要な転写因子を発現する一群では、腫瘍細胞がアストロサイトーマに類似した形態を示し、グリアの分化に關与する転写因子発現と腫瘍形態との間に関連性があることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

グリオーマの診断では、その形態学的多様性のため形態学的分類の難しさが指摘されており、近年の遺伝学的研究成果と相まって、病理診断に遺伝子検索が必須となった。しかし、遺伝子検索は全ての医療機関で行えるわけではなく、現状グリオーマの診断精度を保つためにも、形態学的な診断精度の向上は喫緊の課題である。本研究では日常診断業務で使用している解析手法を用いて、グリアの発生分化の観点からグリオーマ細胞の転写因子発現と形態学的特徴との関連性を見出した。本研究成果はグリオーマ細胞の表現型とその形態学的特徴、およびこれに起因する形態学的多様性への理解を深め、グリオーマの形態学的診断の精度向上に寄与する。

研究成果の概要（英文）：To investigate the cause of the morphological diversity of gliomas, we analyzed the relation between the expression of transcription factors that play an important role in the differentiation of glia and tumor cell morphology in astrocytomas and oligodendrogliomas. We revealed that oligodendrogliomas which expressed transcription factors that are important for astrocyte differentiation showed astrocytoma-like morphology, and consequently the expression of transcription factors which involved in glial differentiation was suggested to affect with tumor morphology.

研究分野：脳腫瘍病理

キーワード：グリオーマ 分化階層性 表現型 形態

## 1. 研究開始当初の背景

2016年のWHO分類改訂より脳腫瘍、特にグリオーマの診断は大きく変化した。従来、グリオーマの診断は形態学的な特徴に基づいて行われてきたが、改訂に伴って形態学的分類に遺伝学的分類を取り入れた統合診断を行うこととなり、2021年に刊行されたWHO分類第5版において統合診断が正式に取り入れられた。すなわち、グリオーマの診断に遺伝学的検索が必須となったのである。このような改訂の背景として、遺伝学的分類に基づく組織分類では、診断者間のばらつきが少なく診断上有用であること、また遺伝学的分類と予後が相関することなどが挙げられる。しかし、遺伝学的検索をすべての医療機関で日常的に行うことは、実際には困難である。

一方、従来行われてきた形態学的分類では、診断者間で組織分類にばらつきが生じるという問題点が指摘されてきた。

グリオーマの主要な組織型であるアストロサイトーマとオリゴデンドログリオーマは、治療感受性や予後などが全く異なる。しかし両者の形態学的鑑別は必ずしも容易ではない。その原因として、同一組織型内においても形態学的にばらつきが見られること(図1)、腫瘍組織内に混在する非腫瘍性のグリア細胞とグリオーマ細胞を、形態学的に鑑別することが困難な場合が稀ならずあること、が考えられる。

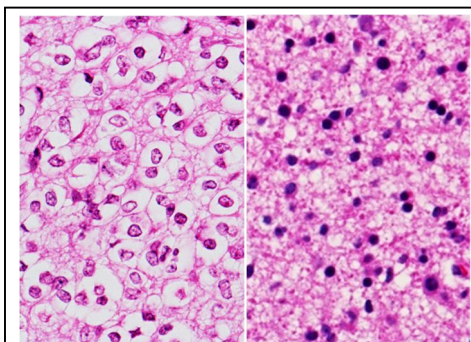


図1: オリゴデンドログリオーマと統合診断された2症例。

形態学的所見のみでは、同一組織型との判断が難しい。

## 2. 研究の目的

グリオーマの形態学的多様性を生じる一因として、グリオーマの発生母細胞と推定されているオリゴデンドロサイト前駆細胞(Oligodendrocyte precursor cell; OPC)の性質が考えられる。OPCはオリゴデンドロサイトへの分化能を有するほか、一部のアストロサイト、また一定の条件下で神経細胞へ分化することが知られている。したがって、このOPCの性質がグリオーマの形態学的多様性に寄与し、さらに組織特異的のマーカの開発を困難にしている可能性を考える。

OPCのマーカとして知られているSOX9、nuclear factor 1-A(NFIA)とともに、グリアの発生、分化に重要な役割を果たすことが明らかとなってきた(図2)。SOX9はneural precursor cellに発現し、細胞をグリアへの分化へと導く。SOX9発現細胞にOlig2が発現すると、SOX10が誘導され、細胞の分化方向はオリゴデンドロサイト系譜へ向かう。また、SOX9がNFIAと複合体を形成すると、細胞はアストロサイト系譜へと分化する。したがって、これら転写因子がどの程度各グリオーマ組織の腫瘍細胞において発現しているかを解析することで、そのグリオーマがいずれの発生段階の細胞に近い性質を有しているのかを検討することが出来る。その結果に基づいて、グリオーマをグリアの分化段階に準じて階層化することでグリオーマ細胞

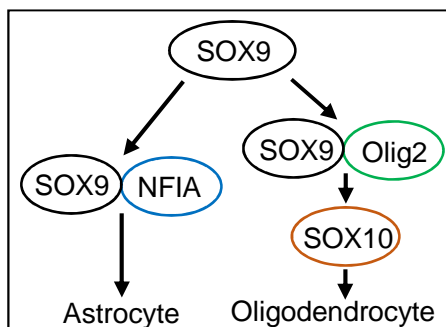


図2: グリアの発生・分化に関する転写因子。

Neural precursor cellに発現したSOX9がNFIAやOlig2、SOX10と相互作用し、アストロサイト系譜またはオリゴデンドロサイト系譜に誘導する。

の性質解明および各組織型に特異性の高いマーカーの確立を目指し、ひいてはグリオーマの形態学的診断の精度を向上させることを目的とした。

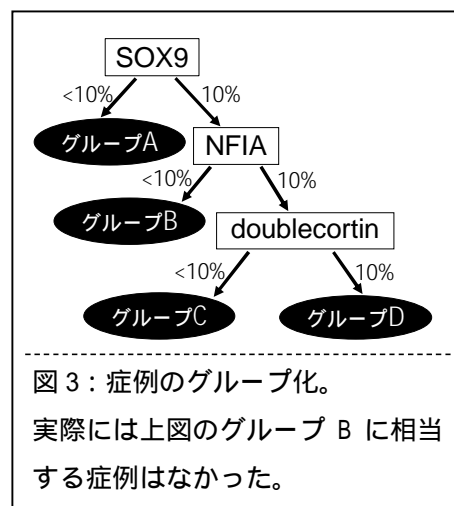
### 3. 研究の方法

#### (1) 症例の抽出

改訂された WHO 分類に則った組織分類法における形態学的診断の精度向上を目指す観点から、遺伝学的検索を含めて統合診断されたグリオーマの中から症例を抽出した。特に、オリゴデンドログリオーマおよびアストロサイトーマの形成に重要な遺伝子変異であり、免疫組織化学的に認識可能である *isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)* R132H 変異を有する症例を対象とした。これにより、多重染色法を用いて IDH1 R132H 変異抗体に陽性を示すグリオーマ細胞における、グリアの発生分化に關与するマーカーの発現解析を可能とした。

#### (2) 多重染色を用いたグリアの発生分化に關与するマーカーの発現解析

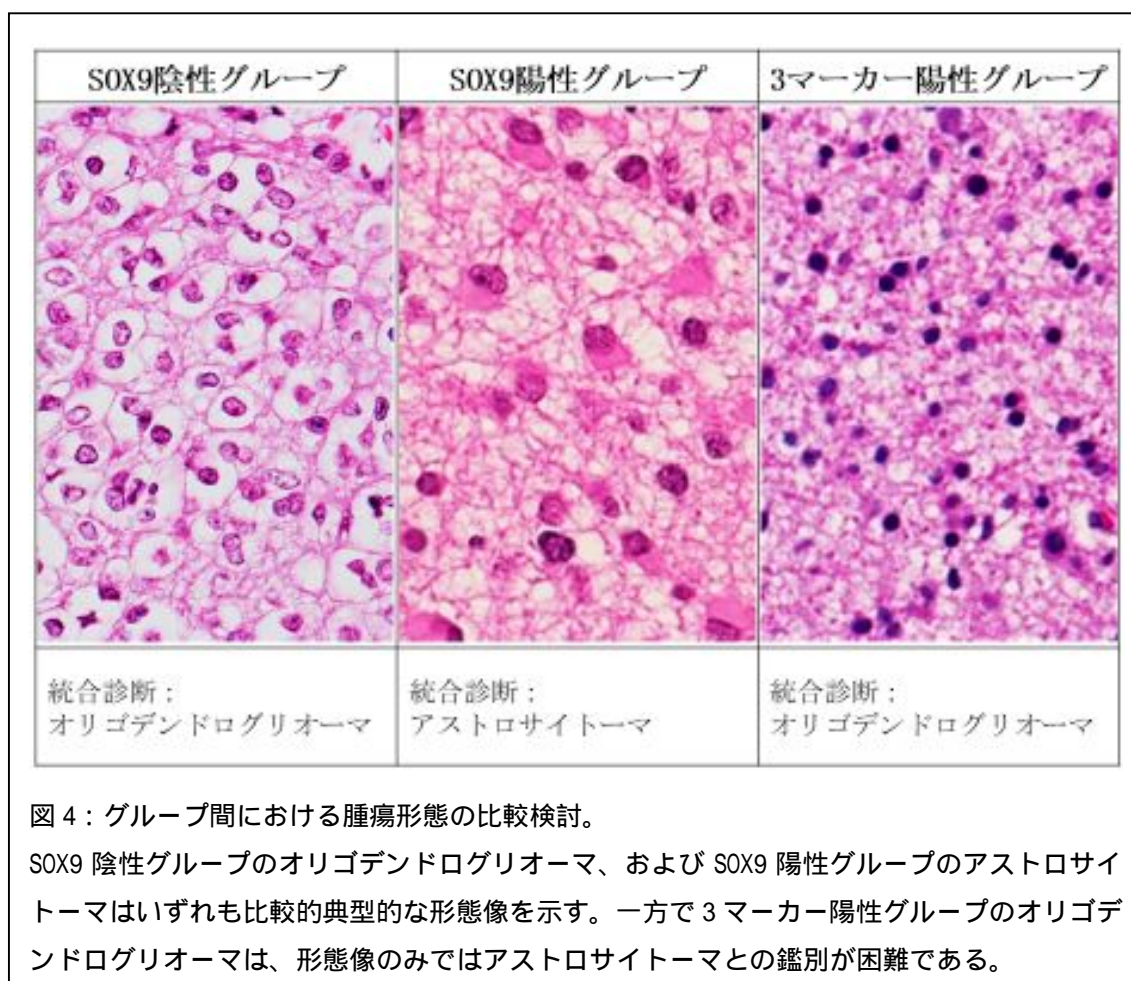
本研究では SOX9、SOX10 および NFIA を、グリオーマを分化階層化する上で軸となる発生分化のマーカーとし、これらマーカーの発現解析からグリオーマ細胞が neural precursor cell、アストロサイト系譜細胞またはオリゴデンドロサイト系譜細胞のいずれに近い性質を持っているのかを検討することを試みた。しかし解析の結果、SOX10 陽性を示す症例がわずかしかないことが判明したため、未熟なオリゴデンドロサイト系譜のマーカーである doublecortin を加え、検討を進めた。各グリオーマ組織内においてマーカー発現を解析する領域には、細胞の増殖能の指標である Ki-67 抗体陽性細胞が最も多い領域を選択し、IDH1 R132H 変異抗体陽性のグリオーマ細胞の 10% 以上にマーカー発現が認められれば陽性、認められなければ陰性と判定した。免疫組織化学的に解析した各マーカー発現の結果に基づいて、図 3 に示した方法で症例をグループ化した。さらに SOX9 陰性のグループ(図 3 のグループ A に相当)が見られたため、神経細胞系譜の分化に關与する SOX11 および MAP2 の発現を免疫組織化学的に追加解析した。以上のようにマーカー発現に基づいてグループ化した症例群について、形態学的に比較検討した。



### 4. 研究成果

対象とした症例はアストロサイトーマ 7 例、オリゴデンドログリオーマ 8 例、計 15 例であった。SOX9、NFIA および doublecortin の発現結果からこれらの症例は 3 グループに分けられた。すなわち、SOX9 陰性グループ(図 3 のグループ A に相当)、SOX9 陽性グループ(図 3 のグループ C に相当)、3 マーカー陽性グループ(図 3 のグループ D に相当)である。これらのうち、SOX9 陰性グループに分類されたのは、全て統合診断でオリゴデンドログリオーマと診断された症例であり、全例 doublecortin 陽性を示した。またこのグループのほとんどの症例が SOX11、MAP2 いずれも陽性であった。形態学的には典型的なオリゴデンドログリオーマの像を呈していた。SOX9 陽性グループに分類されたのは、全例統合診断でアストロサイトーマと診断された症例であった。これらはいずれも NFIA 陽性、doublecortin 陰性であり、非腫瘍性のアストロサイトと同様のマーカー発現パターンを示した。SOX11 および MAP2 は陰性、あるいは低発現率を示すものがほとんどであった。形態学的には、いずれも比較的典型的なアストロサイトーマの像を呈し

ていた。3 マーカー陽性グループにはオリゴデンドログリオーマ 4 例およびアストロサイトーマ 1 例が含まれた。このグループに含まれるアストロサイトーマは、SOX9 陽性グループのアストロサイトーマと比較して形態学的差異は見られなかったが、一方オリゴデンドログリオーマでは、SOX9 陰性グループのオリゴデンドログリオーマと比較して、形態学的にアストロサイトーマと類似した所見を呈するものが多かった(図 4)。SOX11、MAP2 の発現の程度は症例毎に様々で、その他のマーカー発現や腫瘍形態との間に明らかな関係性は認められなかった。



以上の結果から、遺伝子検索を含め統合診断されたグリオーマにおいて、その形態と発生分化に關与するマーカーの発現、すなわちグリアの分化階層性には關連があることが示唆された。しかし、本研究においては腫瘍形態と組織型を強力に結びつける特異性の高いマーカーの確立には至らなかった。その原因として、一つの転写因子が複数の細胞系譜の分化に關与することが多いことが考えられる。グリアの発生分化には多数の転写因子が複雑に關与しており、かつ転写因子以外の様々な因子の關与も知られている。したがって、グリオーマの形態決定も同様に、複数の因子が複雑に關与していることが予想され、一部の転写因子の発現解析のみでは、グリオーマの形態を決定するためにどの因子が、もしくはどの因子同士の作用が最も重要であるのかを特定するには至らなかったものとする。しかし、特にオリゴデンドログリオーマでは、発生分化に關与するマーカーの発現によって腫瘍形態像が異なる、すなわちアストロサイトの発生分化に關与するマーカーである SOX9 や NF1A の発現が見られるものでは、その形態はアストロサイトーマと類似するという知見が得られた。したがって、これらマーカー発現の検討を加えることで、アストロサイトーマとオリゴデンドログリオーマの鑑別が困難なグリオーマ症例において、形態学的診断精度を高める一助となると考える。すなわち、形態像からはアストロサイトーマが

疑わしい、もしくはオリゴデンドログリオーマとしては非典型的な像を呈するグリオーマ症例において、SOX9、NF1A、doublecortinいずれも陽性である場合、アストロサイトーマに形態学的に類似したオリゴデンドログリオーマの可能性を考慮し診断を進めるべき、と考える。今後はさらに、発生分化に関与する因子の検討数を増やしてグリオーマの形態との関連性について追究し、同時に分子遺伝学的因子がグリオーマの表現型や腫瘍形態にどのように影響を及ぼすのかについても検討を進める必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松村望、伊古田和江、横尾英明
2. 発表標題 Adult type diffuse gliomaにおける分化階層性に基づく表現型と形態の検討
3. 学会等名 第40回日本脳腫瘍病理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------