

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 3月31日現在

機関番号：82609

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22500323

研究課題名（和文） 悪性神経膠腫における腫瘍前駆細胞とニッチの同定

研究課題名（英文） Identification of glioma progenital cells and their niche

研究代表者

小森 隆司（KOMORI TAKASHI）

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員

研究者番号：90205526

研究成果の概要（和文）：悪性神経膠腫を対象に NG2 グリアのマーカーである CSPG4 抗体を複数用いて検索を行ったところ、極めて少数の細胞のみが陽性であった。そこで対象を神経細胞と乏突起膠細胞の分化に関与する Olig2 が高発現している乏突起膠腫に絞り、臨床遺伝学的な解析を行った。その結果、古典的な形態を示す乏突起膠腫は IDH1R132H 変異と染色体 1p19q 共欠失を伴い、p53 と CIC 発現を欠く単一腫瘍であることが判明した。

研究成果の概要（英文）：In the first step of the study, anti-CSPG4 antibodies, a maker for NG2 glia, failed to disclose constituent tumor cells in human malignant glioma tissues. We then characterized oligodendroglioma that express Olig2, a transcription factor acted on oligodendrocyte progenitors. Our study revealed that classic oligodendroglioma is a distinct monoclonal tumor that harbors isocitrate dehydrogenases-1 (IDH1) R132H mutation and chromosome 1p/19 co-deletion but lacks p53 and CIC expression.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
2012年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：悪性神経膠腫、前駆細胞、病理形態、遺伝子解析、乏突起膠腫

## 1. 研究開始当初の背景

悪性神経膠腫はヒトの悪性腫瘍の中でもっと治療法の開発が遅れている腫瘍である。膠芽腫についてはこの30年間にほとんど予後は改善していない。近年、脳腫瘍においても癌幹細胞の存在を示唆する知見が報

告され、癌幹細胞を標的として治療法の開発が待たれる。一方で、ヒトの悪性膠腫の手術検体では癌幹細胞の同定法は確立されていない。一方、悪性神経膠腫の遺伝学的知見は急速に集積されており、幹細胞マーカーと表現形との関連を明らかにすること

は、悪性神経膠腫の治療戦略上必須と考られる。

## 2. 研究の目的

- (1) 悪性膠腫における腫瘍前駆細胞の検索
- (2) 悪性膠腫のニッチの同定
- (3) 悪性膠腫の臨床遺伝学的解析

## 3. 研究の方法

外科手術によって切除された悪性膠腫のホルマリン固定パラフィン包埋材料に対して、免疫組織化学並びに蛍光 in situ hybridization 法を行った。得られた結果と臨床情報との相関を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 悪性膠腫における CSPG4 陽性細胞の検索とニッチの同定

①ヒト悪性膠腫における CSPG4 陽性細胞の探索

Oligodendrocyte 前駆細胞 (OPC) は悪性膠腫の前駆細胞の一つとして着目されているが、ヒト悪性膠腫において OPC の存在は確認されていない。マウスモデルにおいて OPC が発現していることが知られている chondroitin sulfate proteoglycan 4 precursor (CSPG4) 抗体を用いて、glioblastoma や oligodendroglioma を含む悪性膠腫の手術検体に対して 3 種類の抗体を用いて免疫組織学的に OPC の有無を検討した。その結果、oligodendroglioma と glioblastoma の一部で局所的に膜様の染色性を得た。少なくとも一部の悪性膠腫は OPC が含まれていると推定された。しかし、抗体によるばらつきが大きく、また、CSPG4 陽性細胞と陰性細胞に形態学的な差異は認められなかったことから、本手法によって前駆細胞のニッチを同定することは困難であると結論した。

②悪性膠腫の臨床遺伝学的解析

次いで oligodendroglioma の臨床遺伝学的解析を行った。まず、FISH 法における 1p/19q co-deletion の検出精度を上げるために、oligodendroglioma 以外のしゅようで陽性となったデータを検討したところ、polysomy と imbalance が多いことが判明した(図 1)。また、そのような症例では cut-off 値に近接していた。そこで、欠失パターン比とシグナル比の cut-off 値をそれぞれ 0.65 に再設定したところ、polysomy と imbalance の症例

が減少し、FISH 法の検出精度が向上した(図 2)。

## FISH法におけるpolysomyとimbalance

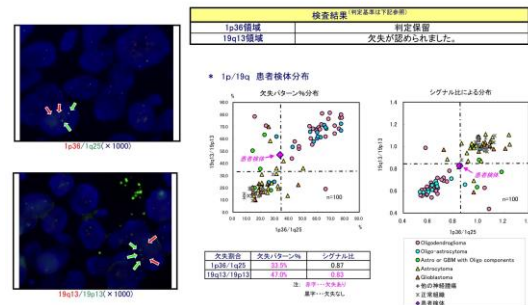


図 1

## Polysomyによる疑陽性を回避する Cut-off 値の再設定

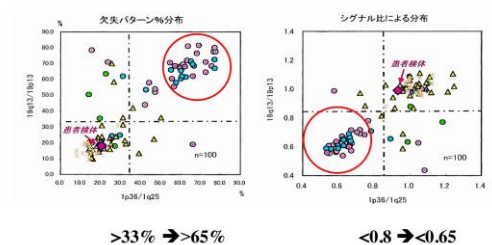


図 2

対象：対象は 3 年間に集積された形態学的に oligodendroglioma と診断された 133 例である。染色体 1p36 と 19q13 に対するプローブを用いた FISH 法を行い、既に公表されているカットオフ値を適応して欠失の有無を判定した。イソクエン酸脱水素酵素 1 型 (IDH-1) の変異については、R132H 変異特異抗体を用いた免疫組織化学を施行した。また、p53 遺伝子産物の発現については抗 wild type p53 抗体を用い、陽性細胞が 10% 以下の場合は陰性と判定した。a-internexin と CIC の発現をそれぞれ 84 例と 53 例の悪性膠腫で検討した。

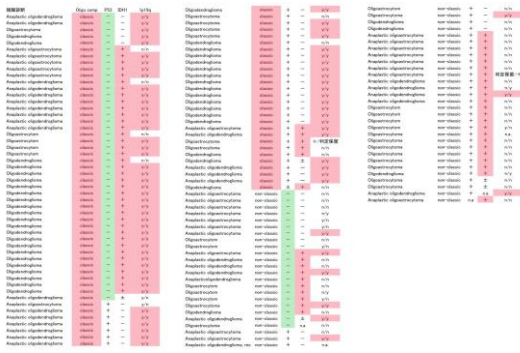


表 1

結果：1) 113 例中 79 例が古典的組織像を、64 例が非古典的組織像を示した。2) 形態学的に“古典的”と判定され p53 の発現が陰性であった腫瘍のうち 89%が 1p/19q 共欠失を示した。3) p53 陰性・IDH-1 R132H 陽性腫瘍 872%が 1p/19q 共欠失を示した (表 1)。

	n	1p/19q co-del		
		+	INA	IDH-1
O	18	17	3	17
AO	13	10	4	11
OA	14	5	8	4
AOA	11	2	4	2
DA	2	0	0	2
AA	2	0	0	0
GBMO	11	0	1	0
GBM	13	0	2	3
Total	84	34	22	39

表 2

(O:oligodendroglioma, AO:anaplastic oligodendroglioma, AOS:anaplastic oligoastrocytoma, DA:diffuse astrocytoma, AA:anaplastic astrocytoma, GBM:glioblastoma))

	n	1p/19q co-del		
		+	CIC	IDH-1
O	6	6	3	5
AO	6	5	1	4
OA	6	0	1	6
AOA	1	1	0	1
DA	4	0	0	1
AA	6	1	0	0
GBMO	11	0	1	2
GBM	13	1	3	2
Total	53	14	9	21

表 3

4) Co-delated oligodendroglioma における a-internexin (表 2) と CIC (表) の発現は

それぞれ 56%、42%であった以上から、IDH-1 変異と 1p/19q 共欠失は独立した予後因子であることが知られていることを考慮すると、古典的組織像を示し、かつ、p53 陰性・IDH-1 R132H 陽性・1p/19q 共欠失陽性の oligodendroglioma は臨床遺伝学的に均一な腫瘍である可能性が示唆された。また、a-internexin と CIC はサロゲート・マーカーとして不十分であると結論された。

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 7 件)

1. Komori T, Arai N. Dysembryoplastic neuroepithelial tumor, a pure glial Tumor? Immunohistochemical and morphometric studies. 査読あり、Neuropathology 03/2013, DOI:10.1111/neup.12033
2. Shioyama T, Muragaki Y, Maruyama T, Komori T, Iseki H. Intraoperative flow cytometry analysis of glioma tissue for rapid determination of tumor presence and its histopathological grade. J Neurosurg 査読あり、02/2013 DOI:10.3171/2013.1.JNS12681
3. Ishida A, Shibuya M, Komori T, et al. Papillary tumor of the pineal region: a case involving isocitrate dehydrogenase (IDH) genotyping. 査読あり、03/2012, DOI: 10.1007/s10014-0098-9
4. Amano K, Kubo O, Komori T, et al. Clinicopathological features of sellar region xanthogranuloma: correlation with Rathke's cleft cyst. Brain Tumor Pathology 査読あり、01/2013, DOI:10.1007/s10014-012-0130-0
5. Lee JH, Takai K, Ota M, Komori T, Taniguchi M. Isolated neurosarcoidosis in the medulla oblongata involving the fourth ventricle: a case report. British Journal of Neurosurgery, 査読あり、11/2011, DOI:10.3109/02688697.2012.741736
6. Ishizawa K, Komori T, Aihara Y, et al. Clear cells are associated with proliferative activity in ependymoma: a quantitative study. Clin Neuropathol 査読あり、2012 31:146-151
7. 小森隆司 Mixed neuronal-glial tumor-

概念と病理学的問題点東京女子医科大学雑誌、81巻、特別号、査読あり、37-44、2011

〔学会発表〕（計6件）

1. Komori T, Standardization of pathological diagnosis of oligodendrogliomas, 3月22日、2013年、Mumbai、India
2. 小森隆司、てんかん原生脳腫瘍の組織学的スペクトラム:特に神経細胞性分化について 第53回日本神経病理学会シンポジウム 6月29日、2012年、新潟
3. Komori T, Standardization of Pathological Diagnosis of Oligodendrogliomas. The 4th International Symposium of Brain Tumor Pathology, 5月24日、2012年、名古屋
4. 石澤圭介、廣瀬隆則、小森隆司、他 Glioneuronal tumor with neuropil-like islands 5例における isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1)の免疫組織化学的検討 第52回日本神経病理学会 6月3日 2011年、京都
5. Komori T. Pediatric brain tumor of posterior fossa. 8th Meeting of Asian Society for Neuro-Oncology. 5月27日、2011年、Suzhou, China
6. 小森隆司 佐々木惇、廣瀬隆則、他 グリオーマ悪性度分類標準化の試み 第29回日本脳腫瘍病理学会シンポジウム 5月21日、2011年 東京

〔図書〕（計1件）

1. 小森隆司 神経細胞系腫瘍 癌診療指針のための病理診断プラクティス 脳腫瘍 169-185 中山書店 2012年 東京

〔その他〕

ホームページ

東京都医学研・脳神経病理データベース  
(<http://pathologycenter.jp/>)

6. 研究組織

(1)研究代表者

小森 隆司 (KOMORI TAKASHI)

公益財団法人東京都医学総合研究所・脳発達・神経再生研究分野・研究員  
研究者番号：90205526

(2)研究分担者

佐々木 惇 (SASAKO ATSUSHI)

埼玉医科大学・医学部・教授  
研究者番号：80225862