

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 24 年 5 月 28 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22791344

研究課題名（和文） Olig-1, Olig-2 遺伝子導入による悪性グリオーマ治療の試み

研究課題名（英文） Treatment of malignant glioma with Olig-1 and Olig2

研究代表者

水川 克 (MIZUKAWA KATSU)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80403260

研究成果の概要（和文）：グリオーマはグリア細胞由来の原発性脳腫瘍で、原発性脳腫瘍の約 1/4 を占める悪性脳腫瘍である。Olig2 はグリア前駆細胞に発現し、オリゴデンドロサイトの分化に関与する転写因子である。しかし、Olig2 はオリゴデンドログリオーマだけでなく、astrocytoma にも発現している。オリゴデンドログリオーマはアストロサイトーマよりも予後良好であることが知られており、オリゴデンドログリオーマではアストロサイトーマと遺伝子の発現パターンが異なっている。Olig2 はグリア細胞の細胞周期を調節しているとも報告されている。そこで、悪性アストロサイトーマのうち、グリオブラストーマ (GBM) および退形成アストロサイトーマ (AA) での Olig2 の発現率と予後について詳細に検討し、Olig2 遺伝子導入が治療ターゲットになりうるかについて検討した。(結果) 対象は GBM: 43 例、AA: 75 例。118 例のパラフィン包埋された GBM あるいは AA の腫瘍サンプルを解析。症例は、1987～2007 年に手術・治療を行い、追跡可能であった症例。平均 Olig2 陽性細胞率は GBM: 16.0% (0～64.7%)、AA: 45.11% (0.1～89%) であり、AA では平均陽性細胞率が高かった。GBM では Olig2 陽性細胞率の差による予後の差を認めなかったが、AA では Olig2 陽性細胞率が 40% 以上と 40% 未満で分けると、生存期間中央値は 40% 以上の群で 98.6 ヶ月、40% 以下の群で 30.6 ヶ月であり、2 年生存率は 40% 以上の群で 61%、40% 以下の群で 31% であり、有意に生存期間の延長を認めた。以上より、AA では Olig2 発現細胞が多い方が予後良好である傾向があり、グリオーマにおいて Olig2 を発現させることで、腫瘍の悪性度が低下する可能性があることが示唆された。(結論) Olig2 の発現は、GBM よりも AA の方で有意に高く、Olig2 の発現が高い AA は、発現量の低い AA に比べると、統計学的に生存期間が長かった。一方、GBM では、Olig2 の発現は予後と関連しなかった。以上より、AA では Olig2 の発現を誘導することで、予後が改善する可能性があると思われた。

研究成果の概要（英文）：Gliomas are primary intracranial malignant tumors derived from glial cells. Olig2 is a transcriptional factor which is expressed in glial precursor cells and functions in the differentiation to oligodendrocyte. Also, Olig2 is expressed in malignant astrocytoma, i.e. glioblastoma (GBM) and anaplastic astrocytoma (AA). Therefore, I analyzed the Olig2 expression in GBM and AA in detail and examined the association between Olig2 expression and prognosis of malignant gliomas. (Results) Total of 118 malignant gliomas were examined (GBM: 43 cases, AA: 75 cases). The patients were treated between 1987 and 2007. Mean Olig2 positive rate was 16% in GBM and 45% in AA. In GBM, there was not the association between Olig2 positive rate and prognosis. On the other hand, in AA, high positive rate of Olig2 (>40%) associated with longer survival. This association was statistically significant. (Log rank test: p=0.0048) (Conclusion) We observed correlation between Olig2 positive rates and survival in AA patients. These results indicate that the induction of Olig2 in glioma cells would improve the prognosis in AA patients.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
総計	2,400,000	720,000	3,120,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学、脳神経外科学、脳腫瘍学

キーワード：グリオーマ、Olig2

1. 研究開始当初の背景

グリオーマはグリア細胞由来の原発性脳腫瘍で、原発性脳腫瘍の約 1/4 を占める。主にアストロサイト由来のアストロサイトーマとオリゴデンドロサイト由来のオリゴデンドログリオーマに分類される。アストロサイトーマ、オリゴデンドログリオーマとも高い浸潤能を持ち、脳内に発生するために、共に治療に難渋する疾患である。グリオーマに対する現在の治療法は、手術、放射線照射とテモゾロマイド等の化学療法を組み合わせた集学的治療であるが、それらを駆使してもアストロサイトーマやグリオブラストーマは非常に予後不良である。(Ohgaki, et al., *J Neuropathol Exp Neurol* 2005) 一方、オリゴデンドログリオーマはアストロサイトーマと比較すると非常に予後良好で、生存期間中央値はオリゴデンドログリオーマ Grade II では約 7~10 年、Grade III でも 2~8 年である。(Lebrun et al., *Neurology*, 2004, Sunyach et al., *J Neurooncol.* 2007) グリオーマの予後因子として重要なのは、1 番染色体短腕(1p)、19 番染色体長腕 (19q) の LOH (Loss of heterozygosity)の存在であり(Mariani et al., *J Clin. Oncol* 2006)、オリゴデンドログリオーマでは多くの症例でこの 1p, 19q の LOH を有することがわかってきているが、1p, 19q の LOH がオリゴデンドログリオーマの発生の原因であるのか、あるいはオリゴデンドログリオーマの発生の結果であるのか、また、化学療法に対する高感受性は LOH とどのように関連しているのかは全く不明である。オリゴデンドロサイトの分化には Nkx2.2 や Sox2 等の様々な分子が関与している。Olig1, Olig2 は近年発見された Basic helix-loop-helix (bHLH) 構造を有する転写因子で、オリゴデンドロサイトの前駆細胞に発現し、オリゴデンドロサイトへの分化を誘導する。(Lu, et al., *Neuron*, 2000, Zhou, et al., *Neuron*, 2000, Corray et al., *Stem Cells*, 2006) Olig1 ノックアウトマウスでは正常脳の形成が見られるが、Olig2 ノックアウトマウスでは脳内のオリゴデンドロサイトの減少およびアストロサイトの増加が認められ、正常脳の形成が遂行されなかったことが報告されている。このことから、Olig2 の方がオリゴデンドロサイトの分化に必須と考えられている。Olig1, Olig2 ともグリア前駆細胞では核内に存在し、STAT3 と p300 との複合体形成を阻害することによりアストロサイトへの分化を阻止し、(Takabayashi, et al., *Curr. Biol.*,2002) アストロサイトへ分化するには Olig 蛋白の核外へ移行が必須である。(Setoguchi, et al., *JCB*, 2004)

Olig2 は神経幹細胞等に発現し、これらの細胞の細胞周期を調節していることが最近の

報告でわかってきた。Tabu らの国内のグループは、グリオーマ培養細胞に Olig2 を発現させると細胞増殖が抑制され、これは Olig2 が細胞周期抑制因子である p27Kip1 の転写を亢進するためであることを報告している。

(Tabu et al., *J Cell Science*, 2006) 一方、Ligon ら海外のグループは、Olig2 は p27 を誘導せず、別の細胞周期抑制因子である p21 の転写を抑制したことを報告している。このように、Olig 転写因子は神経幹細胞、グリア前駆細胞の細胞周期を制御し、グリオーマ形成にも重要であることが、海外および国内の研究でわかってきたのである。

2. 研究の目的

我々は、臨床的な研究より、オリゴデンドログリオーマはアストロサイトーマに比べ非常に予後が良好であること、preliminary 試験では Olig2 高発現アストロサイトーマが Olig2 低発現アストロサイトーマに比較し予後良好であったこと、グリオーマに対してオリゴデンドロサイトへの分化誘導が腫瘍の進行を抑制するのではないかという仮説の基に以下の研究を計画した。

3. 研究の方法

[腫瘍サンプル]

118 例の パラフィン包埋された Glioblastoma (GBM)あるいは Anaplastic astrocytoma (AA) の腫瘍サンプルを解析。症例は、1987~2007 年に手術・治療を行い、追跡可能であった症例。

Olig2 の発現は抗 Olig2 抗体 (IBL 社) を用いて免疫染色を行い、陽性細胞率を計測した。

4. 研究成果

[患者背景]

平均年齢 (GBM:54.8 歳、AA:47.9 歳)、性別 (GBM:男性 26 例、女性 17 例、AA:男性 31 例、女性 44 例) 局在 (GBM:右半球 27 例、左半球 14 例、両側 2 例、AA:右半球 37 例、左半球 31 例、両側 7 例) であった。平均 Follow up 期間は、GBM で 14.1 ヶ月 (3~96 ヶ月)、AA で 49.1 ヶ月 (2~175 ヶ月) であった。

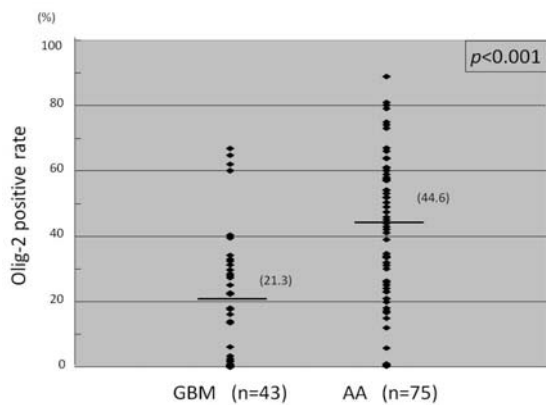
[Olig2 陽性細胞率]

平均 Olig2 陽性細胞率は GBM:16.0 % (0~64.7%)、AA: 45.11% (0.1~89%)であり、AA では平均陽性細胞率が高かった。GBM では半数以上が Olig2 陽性率 20%以下であり、発現強度も弱かった。一方、AA においては 50%以上の陽性率の症例の割合が全 AA の 60%も占め、AA においては Olig2 の陽性率が非常

に高いことが分かった。それらの組織を検討すると、Oligodendrogloma 様の細胞が大半を占めていた。

Olig2陽性率の内訳

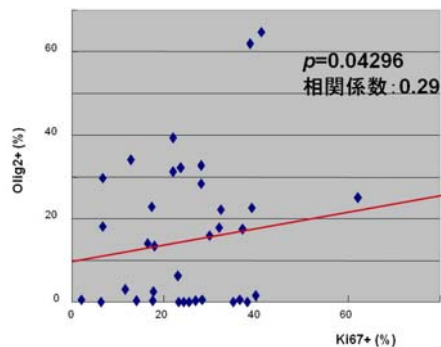
Olig2+ (%)	GBM	AA
0~<10	17 (40%)	6 (8%)
10~<20	6 (14%)	6 (8%)
20~<30	8 (19%)	9 (12%)
30~<40	5 (12%)	9 (12%)
40~<50	1 (2%)	9 (12%)
50~<60	1 (2%)	14 (19%)
60~<70	4 (9%)	10 (14%)
>70	1 (2%)	11 (15%)
計	43 (100%)	75 (100%)



[Olig2 陽性率と MIB-1 との関係]

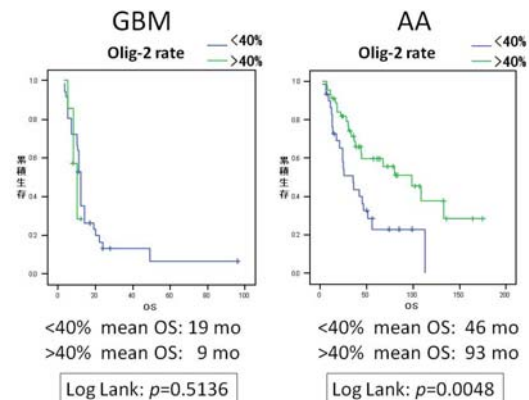
Olig2 と Ki-67 との関連を検討すると、AA では有意な相関を認めなかったが、GBM では Olig2 の陽性率が高い症例は Ki-67 の発現も高い傾向があり、Olig2 は増殖能と関連性がある可能性が示唆された。

GBMにおけるOlig2とKi-67陽性率との関連



[Olig2 陽性率と予後との関連]

GBMではOlig2陽性細胞率の差による予後の差を認めなかったが、AA では Olig2 陽性細胞率が 40%以上 (n=27) と 40%未満(n=42) で分けると、生存期間中央値は40%以上の群で 98.6 ヶ月、40%以下の群で 30.6 ヶ月であり、2年生存率は40%以上の群で 61%、40%以下の群で 31%であり、有意に生存期間の延長を認めた。以上より、AA では Olig2 発現細胞が多い方が予後良好である傾向があり、グリオーマにおいて Olig2 を発現させることで、腫瘍の悪性度が低下する可能性があることが示唆された。



(結論)

Olig2 の発現は、GBM よりも AA の方で有意に高かった。

Olig2 の発現が高い AA は、発現量の低い AA に比べると、統計学的に生存期間が長い。一方、GBM では、Olig2 の発現は予後と関連しなかった。

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 3 件)

①Nakamizo S, Sasayama T, Kondoh T, Inoue S, Shiomi R, Tanaka H, Nishihara M, Mizukawa K, Uehara K, Usami Y, and Kohmura E.

Supratentorial Pure Cortical Ependymoma
Journal of Clinical Neuroscience, in press.
(査読あり)

②Sasayama T, Nakamizo S, Nishihara M, Kawamura A, Tanaka H, Mizukawa K, Miyake S, Taniguchi M, Hosoda K, Kohmura E.
Cerebrospinal fluid interleukin-10 is a

potentially useful biomarker in immunocompetent primary central nervous system lymphoma (PCNSL).
Neuro Oncol. 2012 Mar;14(3):368-80. (査読あり)

③Arai A, Mizukawa K, Nishihara M, Fujita A, Hosoda K, Kohmura E.
Spontaneous cerebrospinal fluid rhinorrhea associated with a far lateral temporal encephalocele.
Neurol Med Chir (Tokyo). 2010;50(3):243-5 (査読あり)

[学会発表] (計 25 件)

1) 水川 克、石井 大嗣、篠山 隆司、甲村 英二

Granular cell astrocytoma に併発した glioblastoma の 1 例
第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会
2011 年 11 月 27～29 日

2) 田中 宏知、篠山 隆司、中溝 聡、水川 克、甲村 英二、西原 賢在
悪性グリオーマにおける IDH2 発現とマイクロ RNA による発現制御

第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会
2011 年 11 月 27～29 日

3) 篠山 隆司、上原 和之、西原 賢在、佐々木 真人、藤井 収、副島 俊典、中溝 聡、田中 宏知、水川 克、三宅 茂、佐々木 良平、甲村 英二

悪性グリオーマ放射線化学療法後の再発部位の検討
第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会
2011 年 11 月 27～29 日

4) 中井 友昭、中溝 聡、甲田 将章、小山 淳二、水川 克、三宅 茂、篠山 隆司、近藤 威、甲村 英二

Supratentorial extraventricular ependymoma の 2 例
第 29 回日本脳腫瘍学会学術集会
2011 年 11 月 27～29 日

5) 田中 宏知、篠山 隆司、中溝 聡、水川 克、甲村 英二、西原 賢在
悪性グリオーマにおける IDH2 発現とマイクロ RNA による発現抑制

第 12 回日本分子脳神経外科学会
2011 年 10 月 14～15 日

6) 森下 暁二、潤井 誠司郎、石原 洋右、

奥村 泰史、笥 達也、内橋 義人、水川 克、甲村 英二

足関節痙縮に対する頸骨神経縮小術の治療効果および問題点

日本脳神経外科学会第 70 回学術総会
2011 年 10 月 12～14 日

7) 篠山 隆司、中溝 聡、田中 宏知、水川 克、西原 賢在、甲村 英二

頭蓋内び慢性大細胞性 B リンパ腫における髄液中 IL-10 値と B 細胞分化マーカーとの関連性の検討

日本脳神経外科学会第 70 回学術総会
2011 年 10 月 12～14 日

8) 田中 宏知、篠山 隆司、中溝 聡、水川 克、甲村 英二、西原 賢在

悪性グリオーマにおける IDH2 発現とマイクロ RNA による発現抑制

日本脳神経外科学会第 70 回学術総会
2011 年 10 月 12～14 日

9) 水川 克、内橋 義人、森下 暁二、近藤 威、甲村 英二

視床下核刺激療法がパーキンソン病の精神症状に及ぼす影響について

日本脳神経外科学会第 70 回学術総会
2011 年 10 月 12～14 日

10) 篠山 隆司、西原 賢在、水川 克、中溝 聡、田中 宏知、甲村 英二

再発膠芽腫に対する再摘出術の効果および問題点

第 16 回日本脳腫瘍の外科学会
2011 年 9 月 9～10 日

11) 中井 友昭、水川 克、小山 淳二、篠山 隆司、三宅 茂、甲村 英二

術前診断に苦慮した扁平上皮癌を合併した小脳橋角部類上皮腫の 1 例

第 61 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会
2011 年 4 月 2 日

12) 森下 暁二、潤井 誠司郎、石原 洋右、山本 浩隆、水川 克、近藤 威、甲村 英二

低酸素虚血性脳症後の筋緊張に対してボツリヌス毒素療法およびバクロフェン髄腔内投与療法が有用であった 1 小児例

第 61 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集会
2011 年 4 月 2 日

13) 水川 克、荒井 篤、近藤 威、三宅 茂、甲村 英二

痙性対麻痺に対する Complex Continuous ITB

療法

第 50 回日本定位・機能神経外科学会
2011 年 1 月 22 日

14) 森下 暁二、潤井 誠司郎、石原 右洋、
小林 光郎、神岡 一郎、足立 昌夫、山本
浩隆、水川 克、近藤 威、甲村 英二
ボツリヌス毒素後、ITB 療法により呼吸障害
の改善を認めた低酸素脳症の 1 小児例
第 50 回日本定位・機能神経外科学会
2011 年 1 月 22 日

15) 中溝 聡、篠山 隆司、西原 賢在、田
中 宏知、水川 克、甲村 英二
カルボプラチン、エトポシド (CARE) 療法が
奏功した悪性グリオーマの 4 例
第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会
2010 年 11 月 28～30 日

16) 篠山 隆司、中溝 聡、田中 宏知、西
原 賢在、水川 克、甲村 英二
頭蓋内悪性リンパ腫における髄液中 IL-10 と
Bcl-2 発現・予後との関連
第 28 回日本脳腫瘍学会学術集会
2010 年 11 月 28～30 日

17) 中溝 聡、篠山 隆司、田中 宏知、
水川 克、甲村 英二
頭蓋内悪性リンパ腫の髄液中 IL-10 値の治
療経過中の変化と予後
日本脳神経外科学会第 69 回学術総会
2010 年 10 月 27～29 日

18) 水川 克、三宅 茂、近藤 威、甲村
英二
ITB 療法の合併症について
日本脳神経外科学会第 69 回学術総会
2010 年 10 月 27～29 日

19) 田中 宏知、中溝 聡、篠山 隆司、
西原 賢在、水川 克、甲村 英二
グリオーマにおける IDH1 遺伝子変異の検討
日本脳神経外科学会第 69 回学術総会
2010 年 10 月 27～29 日

20) 篠山 隆司、西原 賢在、水川 克、
田中 宏知、中溝 聡、甲村 英二
当院における悪性グリオーマの放射線化
学療法での治療成績の検討
日本脳神経外科学会第 69 回学術総会
2010 年 10 月 27～29 日

21) 藤本 陽介、篠山 隆司、水川 克、中
溝 聡、川上 史、甲村 英二
画像上 Glomatosus Cerebri に類似した CD3
陽性中枢神経性 B 細胞リンパ腫の 1 例
第 72 回近畿脳腫瘍研究会

2010 年 9 月 17 日

22) 高石 吉將、鈴木 壽彦、長嶋 宏明、
近藤 威、松本 悟、甲村 英二、水川 克
痙縮に対する SPN 治療前後に立位・歩行バラ
ンス評価を行った 1 例
第 40 回兵庫県脳神経外科医懇話会
2010 年 7 月 31 日

23) 林 成人、武田 直也、片山 重則、水
川 克
出産時出血を来した再発小脳管芽腫の 1 例
第 35 回日本脳卒中学会総会
2010 年 4 月 15～17 日

24) 林 成人、武田 直也、片山 重則、水
川 克
ヘディングにより硬膜下血腫を来した中頭
蓋窩くも膜のう胞の 1 例
第 59 回日本脳神経外科学会近畿支部学術集
会
2010 年 4 月 3 日

25) 水川 克、鶴山 淳、荒井 篤、近藤 威、
甲村 英二
Our experiences of Intrathecal Baclofen
Therapy
第 49 回日本定位・機能神経外科学会
2010 年 1 月 22～23 日

〔図書〕 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等
該当なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

水川 克 (MIZUKAWA KATSU)
神戸大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：80403260