

平成 21 年 5 月 8 日現在

研究種目:基盤研究 C

研究期間:2007—2008

課題番号:19590360

研究課題名(和文) 脳神経膠腫の病理診断および治療法選択のための遺伝子
解析に関する研究

研究課題名(英文) Study on genetic analyses for pathological diagnosis and therapy in glioma

研究代表者 中村 光利(MITSUTOSI NAKAMURA)

奈良県立医科大学 医学部 准教授

研究者番号 305715

研究成果の概要:

組織多様性を示す神経膠腫では各組織型における genotype が異なる場合があり、治療を含めた臨床病理学的な診断には、遺伝子変異の解析が必要な場合がある。特に悪性神経膠腫においては治療感受性を判定するには、組織型ごとに *O⁶-MGMT* をはじめ複数の因子を解析することによって最適の治療を選択できると考えられた。

交付額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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:glioblastoma, glioma, heterogeneity, chemotherapy, *O⁶-MGMT*, temozolomide

1. 研究開始当初の背景

神経膠腫 (glioma) は形態学的に多彩な組織像を呈するが、特に乏突起神経膠腫 (oligodendroglioma) では診断に特異的なマーカーがなく、星状細胞腫 (astrocytic tumor) との混合腫瘍と明確な診断基準もないことから、施設によりその頻度や治療法も一定の見解が得られていない。一方、第 1 番染色体短腕 (1p) および第 19 番染色体長腕 (19q) の loss of heterozygosity (LOH) を示す乏突起神経膠腫

(oligodendroglial tumor) では、procarbazine, CCNU, vincristine (PCV) 療法が有効であることが示され、病理組織の一部にでも乏突起神経膠腫の成分 (oligodendroglial component) があると、確定診断が得られる前に PCV 療法を施行する傾向が出てきた。

筆者は膠芽腫 (glioblastoma, WHO grade IV) における genetic および epigenetic な変異を網羅的に解析し、病理組織学的に phenotype が同じでも *de*

novo 発生する primary glioblastoma と、悪性転化して発生する secondary glioblastoma があり、その genotype は異なることを立証し、glioma の病理診断には従来の組織形態学的な診断基準に加えて、遺伝子変異の解析も必要な場合があると提唱してきた。

しかし、glioma は病理診断が困難なことに加えて、glioblastoma をはじめ多くの glioma は治療抵抗性で、いまだ有効な治療法の確立には至っていない。

2. 研究の目的

組織学的に診断困難症例や、組織多様性を示す glioma に対してそれぞれの部位における遺伝子変異を検索する。著者は glioma の構成組織ごとの遺伝子変異は、同様の組織型であっても遺伝子変異の形式は異なり、その機序として各段階における腫瘍幹細胞に違った遺伝子修飾が加わることで組織学的多様性や遺伝子変異の多様性を示すと考えている。

従って、それぞれの組織型における遺伝子変異と抗癌剤感受性など、その臨床病理学的意義を明らかにすることで、遺伝子解析が個々の症例の病理組織診断や治療法の選択に有用であることを示す。

3. 研究の方法

Glioma 150 例の DNA の解析にはパラフィンブロックを使用し、LOH などの解析に必要なコントロール DNA は、患者の血液または腫瘍細胞の含まれないブロックから摘出する。更に、18 年度から本邦でも認可された新規抗癌剤 temozolomide (TMZ) を投与された malignant glioma (40 例) についても解析を行う。全症例の臨床データは奈良県立医科大学 脳神経外科のデータベースから検索する。

(1) マイクロダイセクションによる遺伝子抽出：

Laser Capture Microdissection Systems (Arcturus) を用いて各症例において組織型の異なる複数の部位から DNA を抽出する。特に悪性 glioma においては偽柵状配列部分や血管内皮増生部に加えて小型細胞 (small cell) や巨細胞 (giant cell) など個々の細胞成分や、oligodendroglial

component あるいは星細胞腫成分 (astrocytic component) にも着目して別々に検索する。

(2) LOH の解析：

コントロール DNA とマイクロダイセクションで抽出した DNA を 4 種類の蛍光色素で標識した micro satellite marker を用いて Genetic Analyzer 3100 (ABI) で泳動する。検索する染色体は、1p、19q の他にこれまで著者が glioma において高頻度に LOH が検出されることを示した 9p、10p、10q、13q、22q を検索する。データの解析は GeneMapper™ software version 3.0 (ABI) を用いる。

(3) 癌関連遺伝子変異の検索：

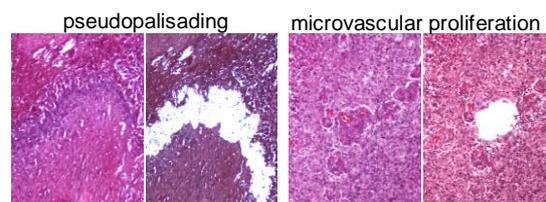
腫瘍組織の各部位や組織型について、抗癌剤耐性に関わる *O⁶-MGMT* をはじめ glioma における変異を報告してきた *p53*、*p73*、*p14^{ARF}*、*p16^{INK4a}*、*PTEN*、*RBI*、*TIMP-3*、*HRK*、*mdm2*、*cyclin D1*、*CDK4* を中心に点突然変異や増幅あるいは欠失、ならびに genetic・epigenetic な変異の検索を行う。

(4) 遺伝子変異と診断・治療への有用性の検討：

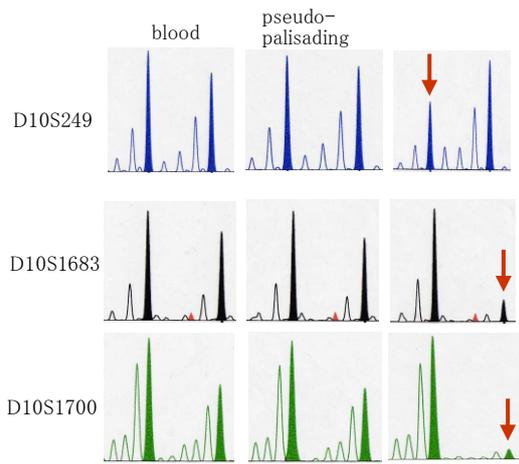
各症例の遺伝子変異の検索結果から、genotype に従った分類と従来の診断基準による組織診断に相違があるかどうか検討する。1p、19q の LOH の有無をはじめ、それぞれの組織型、部位における遺伝子変異の有無が治療反応性への指標となるか否かを解析する。

4. 研究成果

(1) (2) (3) 多様な組織型を示す悪性 glioma でも多くの症例ではいずれの組織型においても同一の genotype を示し、モノクローナルに発生することが明らかとなった。しかし、各組織で異なる genotype を示す症例もあり、組織学的多様性だけでなく、glioma に関しては genetic にも発生の各段階で生じる遺伝子変異の違いを反映すると考えられた。

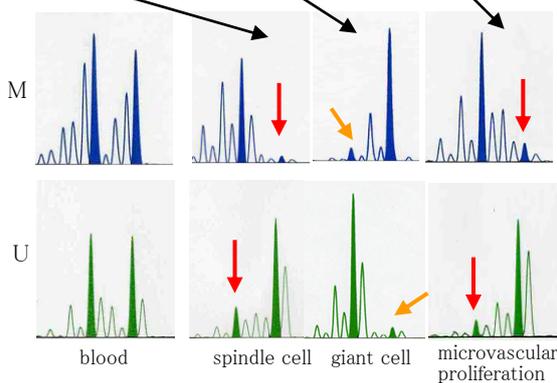
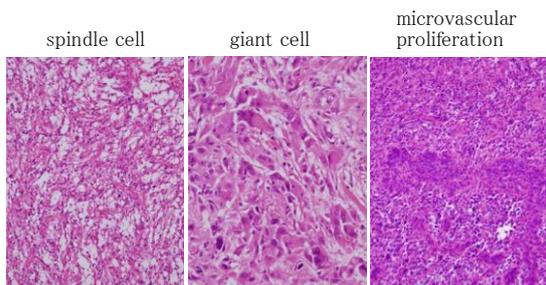


左の pseudopalisading の形態を示す腫瘍細胞群および右の microvascular proliferation の部分からそれぞれマイクロダイセクションを用いて DNA を抽出する。



Pseudopalisading を示す部分では、D10S249 (10p)、101683 および 10S1700 (いずれも 10q) の座位にLOHは検出されないが、microvascular proliferation の組織型を示す細胞では全てに LOH が検出される。

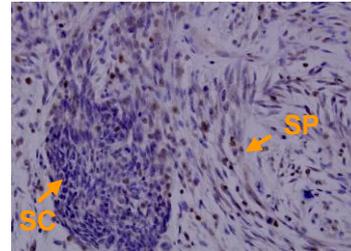
また、X 染色体不活化を *HUMURA* 遺伝子のメチル化によって検出したところ、いずれの組織型においても腫瘍細胞はモノクローナルな増殖を示した。一方、各組織型の比較では異なるメチル化のパターンを示す場合があり、各々 independent に発生する症例もあることが示された。



上段の各組織型における *HUMURA* 遺伝子のメチル化をメチル化特異的プライマー (M) および非メチル化特異的プライマー (U) を用いて検出。3 種類のいずれの組織型も腫瘍細胞はモノクローナルな増殖を示すが giant cell の部分は他の spindle cell や microvascular proliferation の部位とは異なるメチル化のパターンであり、各々 independent に発生することを示す。

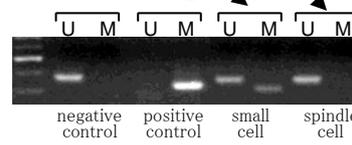
(4) 各組織型における治療反応性因子の変異も均一ではなく、特に *O⁶-MGMT* のメチル化や発現はモザイク状に検出されるが、部分的であっても *O⁶-MGMT* のメチル化および 1p/19q の LOH がみられる症例では、無増悪生存期間および全生存期間ともに延長し、奏効率も有意に良好であった。

O⁶-MGMT 免疫組織化学染色



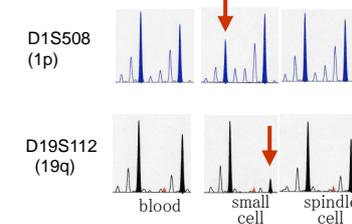
Small cell (SC) の密な増殖を示す組織型の部分では多くの細胞が *O⁶-MGMT* 陰性であるが Spindle cell (SP) の組織型を示す部分では *O⁶-MGMT* が発現する部分が混在する。

O⁶-MGMT メチル化



Small cell が増殖する部分では、positive control と同様に *O⁶-MGMT* メチル化が検出されるが (M)、spindle cell の部分では、negative control と同様に、U のみに PCR バンドが出現し、メチル化陰性。

1p/19q LOH



SC の部分では、正常の DNA に比べて 1p および 19q のマーカーともに LOH が認められるが、SP の部分では、LOH は検出されない。

悪性神経膠腫では各組織型における治療反応性因子としての遺伝子変異が異なる症例があった。標準治療となった TMZ の感受性を判定するには組織型ごとに *O⁶-MGMT* のメチル化や発現の違いも検索する必要があるが、1p/19q LOH をはじめ特定の因子の検索を追加することにより TMZ の治療効果が期待できる症例を判定することができる。一方、TMZ の感受性が乏しい腫瘍を診断することも可能となり、かかる症例では *O⁶-MGMT* を枯渇化させるなど、TMZ の作用を増強する治療を追加する必要性が示された。

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 17 件)

1. Shimada K, Nakamura M (2番目), Konishi N

他 5名. A novel human AlkB homologue, ALKBH8, contributes to human bladder cancer progression. *Cancer Res*, 69: 3157-3164, 2009 (査読 有)

2. Ishida E, Nakamura M (2番目), Konishi N 他 2名. Immunohistochemical analysis of neuroendocrine differentiation in prostate cancer. *Pathobiology* 76: 30-38, 2009 (査読 有)

3. Matsuda R, Nakamura M (13番目) 他12名. Co-transplantation of mouse embryonic stem cells and bone marrow stromal cells following spinal cord injury suppresses tumor development. *Cell Transplant*, in press, (査読 有)

4. Sasaoka N, Nakamura M (3番目), Konishi N 他 2名. Isoflurane exerts a short-term but not a long-term preconditioning effect in neonatal rats exposed to a hypoxic-ischaemic neuronal injury. *Acta Anaesthesiol Scand* 53: 46-54, 2009

5. Nakamura M, Shimada K, Konishi N. The role of *HRK* gene in human cancer. *Oncogene* in press, (査読 無)

6. 中村光利, 小西 登. Genotype 解析からみたグリオーマの診断. *BRAIN and NERVE*, 印刷中 (総説、査読 無)

7. Konishi N, Nakamura M (3番目) 他 5名. Function of JunB in transient amplifying cell senescence and progression of human prostate cancer. *Clin Cancer Res*, 14(14):4408-16, 2008 (査読 有)

8. Shimada K, Nakamura M (2番目), Konishi N 他 4名. Prostate cancer antigen-1 contributes to cell survival and invasion through discoidin receptor 1 in human prostate cancer. *Cancer Sci*, 99:39-45, 2008 (査読 有)

9. Shimada K, Nakamura M (2番目) 他 4名. Cytologic feature by squash preparation of pineal parenchyma tumor of intermediate differentiation. *Diagn Cytopathol*, 36:749-53, 2008 (査読 有)

10. Higuchi T, Nakamura M (2番目) 他 4名. HRK inactivation associated with promoter methylation and LOH in prostate cancer. *Prostate*, 68:105-13, 2008 (査読 有)

11. Horiuchi, T, Nakamura M (6番目), Konishi N 他5名. Effects of delta-opioid agonist SNC80 on white matter injury following spinal cord ischemia in normothermic and mildly hypothermic rats. *J Anesth*, 22:32-7, 2008 (査読 有)

12. 中村光利, 小西 登. グリオーマ治療観点からの病理診断の意義. *病理と臨床* 26:86-7, 2008 (総説、査読 無)

13. 中村光利, 小西 登 他5名. 脳腫瘍の病理診断における遺伝子解析の有用性. *Neuro-Oncologyの進歩* 16:7-11.2007 (総説、査読 有)

14. Shimada K, Nakamura M (2番目), Konishi N 他 4名. c-Jun NH2 terminal kinase activation and decreased expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 play important roles in invasion and angiogenesis of urothelial carcinomas. *Am J*

Pathol, 171: 1003-12, 2007 (査読 有)

15. Shin K, Nakamura M (3番目), Konishi N 他 3名. c-Jun NH2 terminal kinase activation and decreased expression of mitogen-activated protein kinase phosphatase-1 play important roles in invasion and angiogenesis of urothelial carcinomas. *Neurol Res*, 29:727-33, 2007 (査読 有)

16. Taomoto, K, Nakamura M (9番目) 他 8名. A rare case of malignant glioma suspected to have arisen from a cavernous sinus. *Brain Tumor Pathol*, 24:75-80, 2007 (査読 有)

17. Iwata M, Nakamura M (4番目), Konishi N 他 3名. Effects of delta-opioid receptor stimulation and inhibition on hippocampal survival in a rat model of forebrain ischaemia. *Br J Anaesth*, 99: 538-46. 2007 (査読 有)

[学会発表] (計 15件)

1. 中村光利, 島田啓司, 小西 登 他 1名. 前立腺癌治療後の上皮細胞および間質細胞における遺伝子変異の検討. 第98回日本病理学会総会 2009年 5月 3日 京都

2. 中村光利, 島田啓司, 石田英和, 小西 登. O⁶-MGMT status as a marker for response to temozolomide in malignant gliomas with histological heterogeneity. 第67回日本癌学会総会 2008年 10月 30日 名古屋

3. 島田啓司, 中村光利(2番目), 小西 登 他 4名. Human ABH-8 is a new molecule for the development of bladder cancer. 第67回日本癌学会総会 2008年 10月 29日 名古屋

4. 田崎正人, 中村光利(2番目), 小西 登他 3名. Expression of human ABH families in non-small cell lung carcinoma. 第67回日本癌学会総会 2008年 10月 29日 名古屋

5. 石田英和, 中村光利(2番目), 小西 登 他 2名. DNA microarray analysis of multicentric prostate cancer based on the computer-assisted three-dimensional model. 第67回日本癌学会総会 2008年 10月 29日 名古屋

6. 中村光利, 小西 登 他 4名. 組織多様性を示す悪性神経膠腫における TMZ 感受性因子としての O⁶-MGMT 遺伝子の検索. 第97回日本病理学会総会 2008年 5月 17日 金沢

7. 島田啓司, 中村光利(2番目), 小西 登 他 2名. 前立腺 progenitor cell の生物学的特性と病理組織学的意義について. 第 97 回日本病理学会総会 2008年 5月 17日 金沢

8. 田崎正人, 中村光利(2番目), 小西 登 他 3名. 組織多様性を示す glioblastoma における genotype 解析の有用性. 第97回日本病理学会総会 2008年 5月 17日 金沢

9. 中村光利, 小西 登 他 3名. 組織多様性を示す悪性神経膠腫における temozolomide 感受性因子の検索. 第28回日本脳腫瘍学会 2008年 11月 30日 愛媛

10. 中村光利, 小西 登 他 3名. 組織多様性を示す脳神経膠腫における genotype 解析の有用性. 第28回日本脳腫瘍学会 2008年 12月

9日 東京

11. 中村光利, 小西 登 他 3名. 組織多様性を示す悪性神経膠腫におけるTMZ感受性因子としての O^6 -MGMT 遺伝子の検索. 第28回日本脳腫瘍学会 2008年 12月 9日 東京

12. 中村光利, 小西 登 他 3名. 組織多様性を示す神経膠腫におけるテモゾロミド感受性因子としての O^6 -MGMT 遺伝子メチル化検索. 第66回日本癌学会総会 2007年 10月 3日 横浜

13. 樋口 智紀, 中村光利(2番目), 小西 登他2名. 組織多様性を示す脳神経膠腫におけるgenotype 解析. 第66回日本癌学会総会 2007年 10月 3日 横浜

14. 樋口 智紀, 中村光利(2番目), 小西 登他3名. 組織多様性を示す脳神経膠腫におけるgenotype 解析の有用性. 第96回日本病理学会総会 2007年 3月 15日 大阪

15. 中村光利, 小西 登他 4名. Oligodendroglioma における病理組織学的診断と遺伝子解析の有用性. 第96回日本病理学会総会 2007年 3月 15日 大阪

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 光利 (NAKAMURA MITSUTOSHI)

奈良県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：305715