

機関番号：12301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2010

課題番号：19300123

研究課題名（和文）脳腫瘍の形態・遺伝子分類の確立－腫瘍の生物活性をよく反映する病理診断をめざして

研究課題名（英文）Establishment of a novel morphologic and genetic classification of brain tumors for aiming at better diagnosis that corresponds to the biologic activity of tumors.

研究代表者

中里 洋一（NAKAZATO YOICHI）

群馬大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：10106908

研究成果の概要（和文）：

脳腫瘍の組織・細胞形態、形質発現、遺伝子異常の観点から、脳腫瘍の特性を解析した。この中で diffuse astrocytoma, oligoastrocytoma, oligodendroglioma, pilocytic astrocytoma, glioneuronal tumor などの腫瘍に小型円形細胞が存在し、これが共通して核内転写因子 Olig2 を発現することを示し、これらの脳腫瘍の発生母細胞であることを指摘した。蛋白発現では GFAP, Olig2, nestin, NFP など、遺伝子異常では IDH1, p53, EGFR, 1p/19q, INI-1 が重要であり、これらの蛋白発現および遺伝子異常の組み合わせと従来の病理組織学的分類を融合させることにより、脳腫瘍の形態・遺伝子分類の基礎を確立することができた。

研究成果の概要（英文）：

We analyzed the features of brain tumors from the view point of tissue and cellular morphology, phenotypic expression, and genetic alterations. We found that small round cells expressing nuclear transcription factor Olig2 are commonly exist in diffuse astrocytoma, oligoastrocytoma, oligodendroglioma, pilocytic astrocytoma, and glioneuronal tumors. These cells are presumed to be the progenitor cells of brain tumors. As molecular biologic markers, our analysis has shown that GFAP, Olig2, nestin, and NFP are important at protein level, and IDH1, p53, EGFR, 1p/19q, and INI-1 are crucial in genetic alterations. We have established the basis of morphologic molecular classification of brain tumors by fusion of the molecular events and histopathological diagnosis.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	6,900,000	2,070,000	8,970,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	2,100,000	630,000	2,730,000
2010年度	2,000,000	600,000	2,600,000
年度			
総計	14,400,000	4,320,000	18,720,000

研究分野：神経病理学

科研費の分科・細目：脳神経科学・神経解剖学・神経病理学

キーワード：脳腫瘍, 画像解析, 遺伝子異常, 病理診断, 生物活性

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍の代表であるグリオーマは、最新鋭のがん治療法をもってしてもなお治癒の困難な腫瘍であり、たとえば glioblastoma 患者の術後生存期間は1～2年である。これはヒトの腫瘍の中でも最も悪性度の高い腫瘍の1つということができる。さらに人間の創造性や精神の源である脳を破壊するため、生き残っても患者の人間性や能力は著しく失われてしまう。この原因には、グリオーマの生物学的特性に未知のことがらが多く、現行の分類法も腫瘍の生物活性とは異なる観点から構築されているため、真に有益な病理診断や効果的な治療がなされていないことが一因として挙げられる。これを克服するためには診断・治療の基盤である脳腫瘍分類を見直し、腫瘍の生物学的活性をよく反映する新たな分類体系を作る必要がある。すなわち、組織由来と分化度を反映する腫瘍形態をX軸とし、腫瘍の生物活性と密接に関係する遺伝子異常および遺伝子発現をY軸とする2次元平面の上で、個々の腫瘍型を位置づける分類法（これを「形態・遺伝子分類」と呼ぶ）の開発が必要である。

他の腫瘍に比べて発生頻度が低い脳腫瘍を、ひとつの施設で多くの症例を集めて解析することは容易ではない。これまで脳腫瘍の病態に迫る優れた業績は、Mayo Clinic やドイツ癌研究センターなど、欧米の施設における多数例の解析研究からもたらされてきた。本研究では治療の経過と予後がよくわかった日本人患者の組織ライブラリーを構築し研究対象とする。これにより欧米の施設に匹敵する規模の組織ライブラリーを用いた研究を実践することが本研究の特徴である。これまで、個別の症例報告と少数例での病理学的解析に終始してきた、本邦の脳腫瘍病理学研究の枠から脱皮して、新しい診断基準の策定と、腫瘍の生物学的活性を良く反映する分類の構築を目指している。

2. 研究の目的

本研究の目的はヒト脳腫瘍の組織ライブラリーを用いて、形態と遺伝子の2つの観点から、腫瘍の持っている生物学的活性を正しく反映する新しい分類「形態・遺伝子分類」を構築し、より良い病理診断の基礎を確立することである。本研究では予後が良く分かっている脳腫瘍の組織ライブラリーを材料として、既に開発した組織マイクロアレイ法を使って分子レベルの解析を行い、腫瘍の生物学的活性と組織形態および遺伝子発現を関連づけた新しい脳腫瘍分類を構築しようとしている。脳腫瘍の領域では遺伝子解析の結果が分類に直接反映されたことはまだなく、本研究により、腫瘍の生物学的特性が良く反映された分類が作られることが期待される。

この分類に基づいて脳腫瘍診断を行うことにより、腫瘍の増殖能、浸潤能、薬剤感受性、放射線感受性などが診断名に直接に反映されることになり、脳腫瘍の基礎的・臨床的研究をさらに推進させるうえで役立つ。さらには個々の症例の治療や予後予測に応用されると考えられる。

3. 研究の方法

脳腫瘍の新しい「形態・遺伝子分類」を確立するにあたり、脳腫瘍症例の収集と解析、組織マイクロアレイの作製、遺伝子レベル・蛋白レベルでの解析手段の開発をおこなった。その具体的な方法は以下の通りである。

- (1) 検索症例の収集・選択と臨床的解析
- (2) 腫瘍の形態情報のデジタル化と解析
- (3) 組織マイクロアレイの作製
- (4) Monoclonal 抗体の作製と免疫組織化学
- (5) FISH 法、CISH 法標識プローブの作製
- (6) 遺伝子情報の収集と解析
- (7) 統計学的情報処理と診断基準の策定

4. 研究成果

脳腫瘍組織・細胞の形態、形質発現、遺伝子異常の観点から、脳腫瘍の特性を解析した。またモデル動物を使った解析も追加して、ヒト腫瘍との比較を試みた。従来の脳腫瘍分類の検討も行いその問題点を指摘してきた。さらに、腫瘍発生母細胞の解析を進めて、脳腫瘍の形態・遺伝子分類の基礎を構築することができた。

- (1) 脳腫瘍の症例を関連施設より収集し、病理学的ならびに臨床的解析をおこなった。症例はデータベースに登録し、病理標本を作製をして臨床的ならびに病理学的解析を行ない、特徴のある症例については学会報告・論文発表を行った。特に polar spongioblastoma の細胞遺伝学的解析を行ったこと、rosette forming glioneuronal tumor が第4脳室以外に脊髄にも発生することを証明したことが注目される。
- (2) び慢性膠腫および毛様突起星細胞腫の腫瘍細胞について、形態学的、免疫組織化学的ならびに細胞遺伝学的解析を行なった。び慢性膠腫については核の形態情報をデジタル化して解析し、diffuse astrocytoma と oligodendroglioma の間には核形態に関する conditional entropy において有意差があることを証明した。毛様突起星細胞腫では、海綿状領域に存在する小型円形細胞が Olig2 を発現し、形態は oligodendroglia progenitor cell に類似しているが、FISH 法による解析では 1p LOH を欠くことを証明した。
- (3) グリオーマの発生母細胞に関する解析を行い、脳内の Olig2 陽性細胞は小型円形の核と狭いあるいは淡明な細胞質をもち、免疫組織化学的には GFAP, NFP, nestin との共発

現はみられず、電顕的には細胞小器官の乏しい狭い細胞質を持っている。この小型細胞がグリオーマの共通母細胞であることが示唆されるとともに pilocytic astrocytoma や glioneuronal tumor の母細胞としての役割があることを明らかにした。また grade II, III のグリオーマでは増殖能を持つ細胞の大部分が Olig2 陽性であることを示し、この細胞のグリオーマ母細胞としての役割を明らかにした。

(4) 中枢神経系に発生する一群のラブドイド腫瘍を本邦より収集し、その臨床病理学的解析を行ない、本腫瘍群の中には INI1/hSNF5 遺伝子の不活性化により発生する異型奇形腫様ラブドイド腫瘍と、この遺伝子異常を伴わない一群が存在し、ともに極めて悪性度の高い脳腫瘍であることを明らかにした。

(5) 世界保健機構との共同研究により、S100 β /v-erbB トランスジェニックラットに発生する脳腫瘍の病理学的解析を行い、この腫瘍が悪性膠腫、退形成性乏突起膠腫および乏突起膠腫に分類されることを明らかにした。

(6) グリオーマにおける isocitrate dehydrogenase の変異について検討し、この遺伝子変異の解析には LAMP 法が有益であることを示した。さらに免疫組織化学的解析では tissue microarray 法が優れていることを示した。この遺伝子変異は低異型度びまん性グリオーマにおいて高頻度に見られることを示し、この変異を持たない例では RB1 シグナル伝達系の異常が見られることを証明した。

(7) 脳腫瘍の病理学的研究を進める上で優れた抗体を得ることが重要であることを示し、具体的には松果体の hydroxyindole-0-methyltransferase に対する抗体が松果体実質腫瘍の解析、分類に有益であることを示した。

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 31 件)

- ① Kim YH, Lachuer J, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nobusawa S, Nakazato Y, Tanaka Y, et al.: Alterations in the RB1 pathway in low-grade diffuse gliomas lacking common genetic alterations. Brain Pathology (DOI: 10.1111/j.1750-3639.2011.00492.x) 2011. 査読有
- ② Ikota H, Nobusawa S, Tanaka Y, Yokoo H, Nakazato Y. High-throughput immunohistochemical profiling of primary brain tumors and

non-neoplastic systemic organs with a specific antibody against the mutant isocitrate dehydrogenase 1 R132H protein. Brain Tumor Pathol 28: 107-114, 2011. 査読有

- ③ Nagaishi M, Yokoo H, Hirato J, Yoshimoto Y, Nakazato Y.: Clinico-pathological feature of pilomyxoid astrocytomas: Three case reports. Neuropathology 31: 152-157, 2011. 査読有
- ④ Ikota H, Tanaka Y, Yokoo H, Nakazato Y. Clinicopathological and immunohistochemical study of 20 choroid plexus tumors: their histological diversity and the expression of markers useful for differentiation from metastatic cancer. Brain Tumor Pathol (DOI: 10.1007/s10014-011-0024-6) 2011. 査読有
- ⑤ Nagaishi M, Arai M, Osawa T, Yokoo H, Hirato J, Yoshimoto Y, Nakazato Y.: An immunohistochemical finding in glioneuronal lesions associated with epilepsy: The appearance of nestin-positive, CD34-positive and tau-accumulating cells. Neuropathology (doi: 10.1111/j.1440-1789.2010.01188.x.) 2011. 査読有
- ⑥ Kim YH, Nobusawa S, Mittelbronn M, Paulus W, Brokinkel B, Keyvani K, Sure U, Wrede K, Nakazato Y, Tanaka Y, et al.: Molecular classification of low-grade diffuse gliomas. Am J Pathol 177: 2708-2714, 2010. 査読有
- ⑦ Fukuda T, Akiyama N, Ikegami M, Takahashi H, Sasaki A, Oka H, Komori T, Tanaka Y, Nakazato Y, et al.: Expression of hydroxyindole-0-methyltransferase enzyme in the human central nervous system and in pineal parenchymal cell tumors. J Neuropathol Exp Neurol 69: 498-510, 2010. 査読有
- ⑧ Nagaishi M, Tanaka Y, Iwatate K, Yokoo H, Ueki K, Hyodo A, Nakazato Y: Polar spongioblastoma: A high-grade glioma that does not contain the IDH1 mutation or 1p/19q LOH. Neuropathology 30: 547-552, 2010. 査読有
- ⑨ Rhee W, Ray S, Yokoo H, et al.: Quantitative analysis of mitotic Olig2 cells in adult human brain and gliomas: implications for glioma histogenesis and biology. Glia 57: 510-523, 2009.

- 査読有
- ⑩ Ohba S, Yoshida K, Hirose Y, Ikeda E, Nakazato Y, Kawase T.: Cerebral tumor with extensive rhabdoid features and a favorable prognosis. J Neurosurg 111: 492-496, 2009. 査読有
 - ⑪ Anan M, Inoue R, Ishii K, Abe T, Fujiki M, Kobayashi H, Goya T, Nakazato Y: A rosette-forming glioneuronal tumor of the spinal cord: the first case of a rosette-forming glioneuronal tumor originating from the spinal cord. Hum Pathol 40: 898-901, 2009. 査読有
 - ⑫ Rhee W, Ray S, Yokoo H, et al.: Quantitative analysis of mitotic Olig2 cells in adult human brain and gliomas: implications for glioma histogenesis and biology. Glia 57: 510-523, 2009. 査読有
 - ⑬ Yokoo H, Tanaka Y, Nobusawa S, Nakazato Y, Ohgaki H: Immunohistochemical and ultrastructural characterization of brain tumors in S100 beta-v-erbB transgenic rats. Neuro-pathology, 28: 591-598, 2008. 査読有
 - ⑭ Tanaka Y, Sasaki A, Ishiuchi S, Nakazato Y: Diversity of glial cell components in pilocytic astrocytoma. Neuropathology, 28: 399-407, 2008. 査読有
 - ⑮ Kinjo S, Hirato J, Nakazato Y: Low grade diffuse gliomas: Shared cellular composition and morphometric differences. Neuro-pathology, 28: 455-465, 2008. 査読有
 - ⑯ Ishiuchi S, Yoshida Y, Sugawara K, Aihara M, Ohtani T, Watanabe T, Saito N, Tsuzuki K, Okado H, Miwa A, Nakazato Y, Ozawa S.: Ca²⁺-permeable AMPA receptors regulate growth of human glioblastoma via Akt activation. J Neurosci 27: 7987-8001, 2007. 査読有

[学会発表] (計 38 件)

- ① 中里洋一: 脳腫瘍のWHO分類 - その特徴と問題点 - 脳腫瘍2010 2010年6月18日 (大阪市)
- ② 平戸純子、金城佐和子、宮永朋実、新井秀雄、横尾英明、中里洋一: 再発を繰り返し、最終的に偽乳頭状構造が明瞭となった中枢神経系hemangiopericytomaの1剖検例. 第28回日本脳腫瘍病理学会 2010年5月22日 (大阪市)
- ③ 中里洋一: 脳腫瘍のWHO分類 (WHO2007) 第28回日本脳腫瘍病理学会 2010年5月22日 (大阪市)
- ④ 横尾英明、田中優子、信澤純人、永石雅

也、中里洋一、Hiroko Ohgaki: S100β-v-erbBトランスジェニックラットに発生するグリオーマはNG2/CSPG4を発現する. 第28回日本脳腫瘍病理学会 2010年5月21日 (大阪市)

- ⑤ 横尾英明、新井基展、中里洋一: LAMP法を用いたグリオーマにおけるIDH1遺伝子変異の検出. 第99回日本病理学会 2010年4月28日 (東京都)
- ⑥ 渋井壮一郎、嘉山孝正、中里洋一、他: 星細胞腫grade3/4に対する第II相臨床試験(JCOG0305)における病理中央診断の意義. 第27回日本脳腫瘍病理学会 2009年5月8日 (福岡市)
- ⑦ 田中優子、伊藤秀明、平戸純子、中里洋一: 脳腫瘍の摘出から17年後、骨髄への広範な転移を起し死亡したanaplastic oligo dendrogliomaの1例. 第98回日本病理学会総会 2009年5月1日 (京都市)
- ⑧ 中里洋一: 脳腫瘍分類 (WHO) とグリア系腫瘍. 第23回平野朝雄教授神経病理セミナー 2009年4月18日 (京都市)
- ⑨ Nakazato Y, Tanaka Y, Miyanaga T, Yokoo H, Hirato J: Olig2-positive small round cells in glial and glioneuronal tumors. 27th International Congress of the International Academy of Pathology. 2008年10月15日 (Athens, Greece)
- ⑩ 平戸純子、中里洋一: INI-1不活性化の無からみた中枢神経系rhabdoid tumorの臨床病理学的特徴. 第26回日本脳腫瘍病理学会 2008年5月24日 (東京都)
- ⑪ 中里洋一: 改訂された脳腫瘍WHO分類 - 新しい腫瘍型の病理を中心に - 第26回日本脳腫瘍病理学会特別講演 2008年5月23日 (東京都)
- ⑫ 中里洋一、金城佐和子、田中優子: Diffuse astrocytomaの疾患概念と病理学的多様性. 第28回日本脳神経外科コンgresシンポジウム 2008年5月9日 (横浜市)
- ⑬ 中里洋一: オリゴデンドログリオーマ細胞の形態と分化. 第25回日本脳腫瘍病理学会シンポジウム 2007年4月19日 (熊本市)

[図書] (計 11 件)

- ① 中里洋一: 「脳腫瘍の分類」、「脳腫瘍マーカー」、「細胞診」、「組織学的分類」、「TUMORS OF NEUROEPITHELIAL TISSUE 神経上皮性腫瘍」. 日本脳神経外科学会・日本病理学会 (編) 脳腫瘍取扱い規約 - 臨床と病理カラーアトラス - 第3版. 金原出版、東京 2010. pp. 2-7, 26-34, 50-53, 88-92, 93-129.
- ② 中里洋一: 脳腫瘍のWHO分類 - 現状と展

望一. 新時代の脳腫瘍学—診断・治療の最前線—(編)松谷雅生. 日本臨床社, 大阪, 2010. pp.120-126.

- ③ 中里洋一: WHO brain tumor classification 2007. Annual Review神経2010 (編) 鈴木則宏、他. 中外医学社, 東京, 2010, pp. 27-37.
- ④ 中里洋一: Gliomatosis cerebriの病態. Annual Review神経2008 (編) 柳澤信夫、他. 中外医学社, 東京, 2010, pp. 27-37.
- ⑤ 中里洋一: 「脳腫瘍の組織分類」, 「Desmoplastic infantile astrocytoma/ganglioglioma」, 「Pineocytoma」, 「Pineal parenchymal tumor of intermediate differentiation」, 「Pineoblastoma」, 「Meningioma grade III. Anaplastic, papillary, rhabdoid meningioma」, 「Paraganglioma」, 「脳腫瘍の免疫組織化学」. (編) 河本圭司, 吉田純, 中里洋一: 脳腫瘍臨床病理カラーアトラス第3版, 医学書院, 東京, 2009, pp. 7-11, 68-69, 80-81, 82-83, 84, 117-119, 143, 180-181.
- ⑥ Nakazato Y, et al.: “Diffuse astrocytoma”, “Glioblastoma”, “Papillary glioneuronal tumour”, “Pineocytoma”, “Pineal parenchymal tumour of intermediate differentiation”, “Pineoblastoma”, “Papillary tumour of the pineal region”, “CNS germ cell tumours”. In: Louis DN, et al. (eds) WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. 4th ed. International Agency for Research on Cancer, Lyon, 2007, pp. 25-29, 33-49, 113-114, 122-123, 124-125, 126-127, 128-129, 198-204.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中里 洋一 (NAKAZATO YOICHI)
群馬大学・大学院医学系研究科・教授
研究者番号: 1 0 1 0 6 9 0 8

(2) 研究分担者

平戸 純子 (HIRATO JUNKO)
群馬大学・医学部・准教授
研究者番号: 6 0 2 0 8 8 3 2

佐々木 惇 (SASAKI ATSUSHI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 8 0 2 2 5 8 6 2

横尾 英明 (YOKOO HIDEAKI)
群馬大学・大学院医学系研究科・准教授
研究者番号: 4 0 2 8 2 3 8 9

石内 勝吾 (ISHIUCHI SYOGO)
琉球大学・医学部・教授
研究者番号: 1 0 3 1 2 8 7 8