

機関番号：12301

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21700391

研究課題名（和文）EGFR遺伝子増幅を指標とした膠芽腫浸潤範囲の描出と周囲の組織反応の検討

研究課題名（英文）Visualization of the areas of glioblastoma invasion using a EGFR gene amplification as a marker of an individual tumor cell, and analysis of tissue reaction.

研究代表者

宮永 朋実 (MIYANAGA TOMOMI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号：30455951

研究成果の概要（和文）：膠芽腫は広範囲に周囲の脳に浸潤性増殖を示すため、腫瘍範囲の推定が困難な腫瘍である。ほとんど全ての腫瘍細胞が EGFR 遺伝子の増幅を示す症例に関しては、CISH 法の増幅反応を用いることにより、個々の腫瘍細胞を同定することが可能である。膠芽腫の辺縁部では、EGFR 遺伝子の増幅が腫瘍マーカーとなったが、中心部の腫瘍細胞と比較すると細胞異型が軽く、反応性に増生するグリア細胞との差異が乏しく、形態学的情報のみでは腫瘍細胞と同定する事は困難だった。

研究成果の概要（英文）：Glioblastoma is difficult to estimate the areas of tumor, because tumor cells infiltrate into the surrounding brain widely. In cases in which almost all tumor cells show amplification of the EGFR gene, CISH signals of amplification is available as a marker of isolated tumor cells. In the surrounding area of glioblastoma, it is difficult to identify the presence of tumor cells only by morphological information.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,300,000	690,000	2,990,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：神経病理学、人体病理学

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：膠芽腫、脳腫瘍、浸潤、EGFR、遺伝子増幅、chromogenic in situ hybridization

1. 研究開始当初の背景

膠芽腫 (glioblastoma) をはじめとするグリオーマの特徴の一つは、脳実質内に広範囲に浸潤性に増殖することで、画像診断学的にも病理診断学的にも腫瘍細胞の浸潤範囲の推定が困難である。

病理組織標本で、膠芽腫の腫瘍中心部の腫瘍細胞が密に増殖している部では、特徴的な組織所見や細胞異型があることのみならず、

細胞密度からも容易に腫瘍組織と判定できる。しかし、腫瘍辺縁部では、腫瘍細胞の密度が低くなり、かつ腫瘍が浸潤したためにおこる反応性グリーシスにより、腫瘍組織か否かの判定は難しくなっていく。細胞1個単位での腫瘍性グリオーマと反応性グリア細胞を細胞形態のみで区別することは至難の業である。そのため、実際の診療現場では、核の異型、GFAP (glial fibrillary acidic protein) などの免疫染色で描出される胞体

の形状、細胞密度、核分裂像を有する細胞や増殖能の指標となる MIB-1 免疫染色陽性細胞の割合などの様々な指標を総合して腫瘍組織か否かを判定している。しかし、主観的な判断になりがちで、診断する病理医間での相違があるのが現状である。そのため、腫瘍細胞のみを同定できるマーカーが切望されている。

腫瘍細胞のみを同定できるマーカーとして、腫瘍細胞特有の遺伝子異常に着目した。*EGFR* (epidermal growth factor receptor) 遺伝子は、原発性膠芽腫 (primary glioblastoma) の 40%前後に増幅がみられる。組織切片上において遺伝子情報を可視化する方法として、診療現場では fluorescence in situ hybridization (FISH) 法が使われているが、蛍光顕微鏡下での観察のため組織形態との対比が難しい。chromogenic in situ hybridization (CISH) 法は、FISH 法で蛍光色素を使うかわりに、DAB などの色素を用いるため、明視野下で組織標本の全体を観察することができる。HE 染色や、免疫染色との二重染色も施行可能なため、組織像と遺伝子情報の比較という面で大きな優位性をもっている。

以前行った研究で、群馬大学医学部附属病院と関連病院で膠芽腫と診断された症例を用いて、CISH 法による *EGFR* 遺伝子増幅、免疫染色による *EGFR* 蛋白発現、組織形態との対比を行い、CISH 法の有用性ととも、殆ど全ての腫瘍細胞が *EGFR* 遺伝子増幅を示す症例に関しては、CISH 法による *EGFR* 遺伝子増幅を指標とすることにより、腫瘍細胞を 1 個単位で同定することができることを報告した (Neuropathology. 28(2):116-26, 2008)。その結果をふまえ、*EGFR* 遺伝子増幅を腫瘍細胞のみを同定できるマーカーとして利用して膠芽腫浸潤の特徴を検討することにより、その成果を腫瘍診断に還元していくことが期待された。

2. 研究の目的

(1) 本研究では CISH 法を用い、*EGFR* 遺伝子増幅を指標とすることで、細胞一個単位で腫瘍細胞を同定し、膠芽腫細胞の浸潤範囲を確定し、浸潤細胞の特徴や浸潤様式の特徴を明らかにする。

(2) 膠芽腫細胞の浸潤に対して、脳組織がどのように破壊される、あるいは血管増生や浮腫、gliosis など、どのような組織反応を示すのかを観察し、どのように腫瘍細胞が関与しているかを明らかにする。

(3) 従来、腫瘍細胞の浸潤の有無の指標とし

てきた、細胞密度、核異型、増殖能等と、*EGFR* 遺伝子増幅細胞を指標とした浸潤範囲との対比を行い、病理組織学的診断時に腫瘍細胞の浸潤の有無を判定する際の所見の重要度を推定する。

3. 研究の方法

(1) 症例の抽出

1990 年度から 2010 年まで群馬大学医学部附属病院と関連病院で外科的摘出術が施行され、膠芽腫と診断された症例のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを用い、*EGFR* 遺伝子増幅を示す症例を抽出した。膠芽腫は腫瘍組織内で遺伝子型の多様性を示す症例の存在が知られているため、CISH 法標本の全体を観察し、形態学的に腫瘍細胞が確認できる領域にほぼ一致して、*EGFR* 遺伝子増幅を示す細胞が分布している、単クローン性増殖を示していると考えられる症例で、腫瘍と周囲の脳組織が一塊で採取された検体を中心に症例を選んだ。

(2) 染色

抽出された症例に対し、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本、*EGFR* 遺伝子の CISH 法+HE 染色標本、*EGFR* 遺伝子の CISH 法と *EGFR* 免疫染色の二重染色標本、GFAP 免疫染色標本、MIB-1 免疫染色標本の作製を行った。

(3) 画像データ化

作製した標本をバーチャルスライドシステムで高精細画像データ化を行った。CISH 法で *EGFR* 遺伝子増幅が確認された細胞と *EGFR* 遺伝子増幅のない細胞 (一部、*EGFR* 遺伝子増幅を評価できない細胞も含まれている) に分けた。後者に関しては、神経細胞や血管を構成する細胞などの形態学的に同定することが可能な細胞を抽出し、それら以外の細胞でリンパ球の核よりも大きい核を有するものを非腫瘍性のグリア細胞と判断した。画像ソフト上で、それぞれの細胞群ごとにレイヤー機能を使用し、色を分けてプロットした。

(4) 組織像の検討

EGFR 遺伝子増幅腫瘍細胞、非腫瘍性グリア細胞、血管を構成する細胞、神経細胞と、細胞群ごとに区別してプロットした画像データを利用して、セミマクロのレベルで腫瘍細胞の分布、浸潤範囲、既存の脳の構造との関係について、特徴を検討した。これらの特徴を加味して、強拡大で、膠芽腫の中心部の腫瘍細胞が密に増殖している部、膠芽腫の辺縁部、膠芽腫の周辺の浸潤部 (形態のみでは腫瘍細胞の存在が不明瞭だが、*EGFR* 遺伝子増幅腫瘍細胞の存在が確認された部) について、

腫瘍細胞の特徴や周囲の組織反応について検討を行った。

4. 研究成果

(1) 細胞一個単位での腫瘍細胞の同定

抽出された症例に関し、*EGFR* 遺伝子の CISH 法を行い、腫瘍細胞の核内にドット状の褐色顆粒を多数確認することができた。非腫瘍性細胞は核内に 2 個以下の顆粒をみるものが多いため、血管内皮細胞等における反応をみることにより、染色の妥当性の評価も標本上で可能であった。*EGFR* 遺伝子の CISH 法+HE 染色標本では、核クロマチンは標本の前処理のために変性し、クロマチンパターンの解析や核クロマチンの濃度による評価は困難となったが、細胞形態は観察可能であった。

(2) 膠芽腫の腫瘍中心部の細胞構成

形態学的に、既存の神経細胞や神経線維が消失し、腫瘍細胞で置換された領域では、CISH 法により多くの細胞の核内にドット状の褐色顆粒を多数確認できた。これらに混じて、壊死部を除く全ての領域で、血管を構成する細胞と、非腫瘍性のグリア細胞が確認された (図 1)。

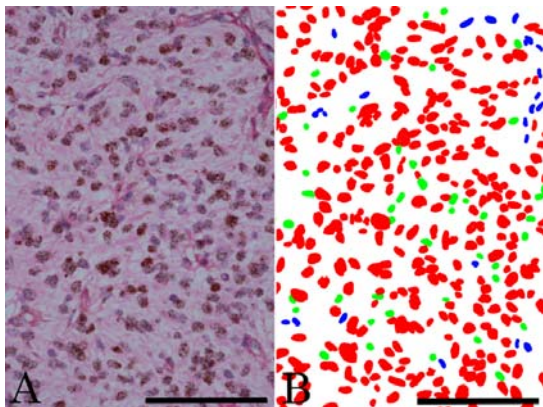


図 1. 膠芽腫の腫瘍中心部

A : *EGFR* 遺伝子の CISH 法+HE 染色標本(目盛=0.1mm)

B : 細胞群ごとに区別してプロットした画像 (赤 : *EGFR* 遺伝子増幅腫瘍細胞 4449 個/ 1mm^2 、緑 : 非腫瘍性のグリア細胞 606 個/ 1mm^2 、青 : 血管を構成する細胞 330 個/ 1mm^2 、目盛=0.1mm)

腫瘍細胞は核形の不整や核の腫大など明らかな異型を有するものが多かった。非腫瘍性のグリア細胞では乏突起膠細胞と考えられる小型円形細胞の割合が高く、時に楕円形の星細胞が混在していた。

(3) 膠芽腫の腫瘍辺縁部の細胞構成

形態学的に、腫瘍細胞の密度がやや減少し、既存の神経細胞が部分的に残存する、腫瘍の辺縁部では、非腫瘍性のグリア細胞の密度が増加する傾向がみられた。腫瘍中心部と比較すると、楕円形で若干の核形の不整を示す星細胞の割合が高く、腫瘍細胞浸潤に伴う反応性グリオシスの存在が示唆された。

(4) 膠芽腫の周辺の浸潤部の特徴

形態学的に、腫瘍細胞の浸潤の判定が困難な領域においても、*EGFR* 遺伝子増幅腫瘍細胞が細胞 1 個単位で浸潤する像が確認された (図 2)。血管や神経細胞周囲に寄りそうように浸潤する傾向が認められた。

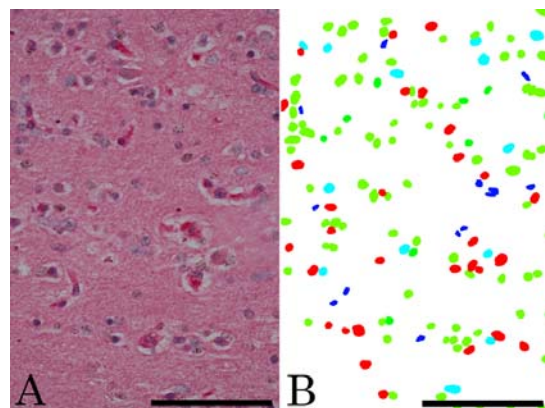


図 2. 膠芽腫の周辺の浸潤部

A : *EGFR* 遺伝子の CISH 法+HE 染色標本(目盛=0.1mm)

B : 細胞群ごとに区別してプロットした画像 (赤 : *EGFR* 遺伝子増幅腫瘍細胞 413 個/ 1mm^2 、緑 : 非腫瘍性のグリア細胞 1294 個/ 1mm^2 、青 : 血管を構成する細胞 179 個/ 1mm^2 、水色 : 神経細胞 179 個/ 1mm^2 、目盛=0.1mm)

細胞 1 個単位で浸潤する腫瘍細胞は、腫瘍中心部の腫瘍細胞とは異なり、細胞異型が軽度である。一方、非腫瘍性グリア細胞では腫瘍浸潤に伴う反応性グリオシスと考えられる細胞密度の増加と若干の核形の不整を伴っている。そのため、腫瘍細胞と非腫瘍性のグリア細胞と形態学的な差異がほとんど認められない。

GFAP 免疫染色で腫瘍細胞と非腫瘍性のグリア細胞の細胞質や突起についての差異を検討したが、GFAP で染色される構造を有さない腫瘍細胞も存在し、細胞質や突起による区別は困難であった。

増殖能について、MIB-1 免疫染色を行ったが、少数みられるのみで、腫瘍組織の判定には有用ではないと考えられた。浸潤部で細胞 1 個単位で浸潤する腫瘍細胞の核分裂像を探したが、確認できなかった。

EGFR 遺伝子増幅腫瘍細胞が全く確認されない部位と浸潤部を HE 染色標本で比較をしたが、細胞異型のみによる腫瘍細胞の判定は困難であった (図 3)。細胞密度に関しては、差異が認められるため、腫瘍浸潤部の判断材料として有用ではあるが、腫瘍細胞浸潤に伴う反応性グリオシスによる密度の増加の影響もあるため、評価は慎重にすべきである。

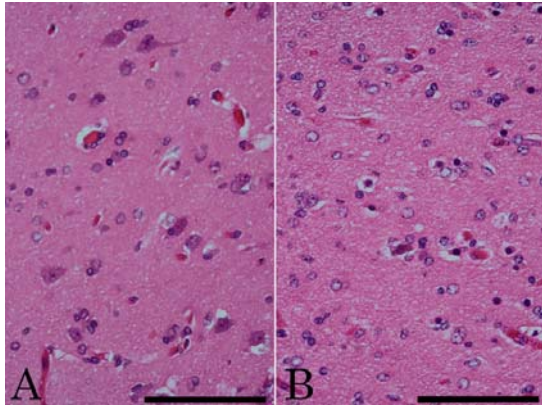


図 3. 膠芽腫の周辺の脳

A : *EGFR* 遺伝子増幅腫瘍細胞が存在しない非腫瘍浸潤部 (HE 染色標本、グリア細胞 964 個/ 1mm^2 、血管を構成する細胞 206 個/ 1mm^2 、神経細胞 247 個/ 1mm^2 、目盛=0.1mm)

B : *EGFR* 遺伝子増幅腫瘍細胞が確認された腫瘍浸潤部 (図 2 の標本の連続切片の HE 染色標本、目盛=0.1mm)

(5) 膠芽腫の腫瘍細胞と血管の関係

壁肥厚を示さない毛細血管を構成する細胞には、*EGFR* 遺伝子増幅を示す腫瘍細胞は認められない。微小血管増殖像 (microvascular proliferation、MVP) を伴う血管壁内に、*EGFR* 遺伝子増幅を示す腫瘍細胞が種々の程度で混在していた。腫瘍細胞そのものが血管壁の構成要素となっていると考えられた。

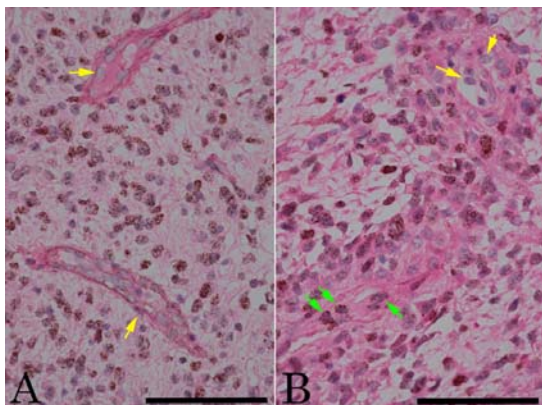


図 4. 膠芽腫と血管

A : 壁の肥厚を示さない毛細血管 (*EGFR* 遺伝子の CISH 法+HE 染色標本、目盛=0.1mm)

黄色の矢印で示す血管壁を構成する細胞には核内に 2 個の顆粒が確認される。非腫瘍性細胞から構成される血管である。

B : 微小血管増殖像 (MVP) を示す血管 (*EGFR* 遺伝子の CISH 法+HE 染色標本、目盛=0.1mm)

黄色の矢印で示す血管壁を構成する細胞は A と同様、非腫瘍性細胞であるが、緑色の矢印で示す細胞は、血管壁内に位置しているが、*EGFR* 遺伝子増幅を示しており、腫瘍細胞と考えられる。

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)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

宮永 朋実 (MIYANAGA TOMOMI)

群馬大学・医学部・助教

研究者番号 : 3 0 4 5 5 9 5 1