

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23500429

研究課題名(和文) IDH1 変異体を有するグリオーマの細胞多様性と治療応答性・抵抗性分画の同定

研究課題名(英文) Study on cellular diversity and treatment-sensitive/resistant fraction in IDH1-mutant gliomas

研究代表者

鈴木 諭 (Satoshi, Suzuki)

九州大学・医学(系)研究科(研究院)・准教授

研究者番号：90294917

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000 円、(間接経費) 1,200,000 円

研究成果の概要(和文)：グリオーマ組織内の細胞の多様性を検討するために、種々のヒトグリオーマ組織においてグリオーマにみられる代表的な遺伝子異常のマーカーであるイソクエン酸脱水素酵素1変異体およびその他のグリオーママーカー(MAP-2e、p53、DCX、nestin)、増殖マーカー(Ki67)、細胞系譜特異的マーカー(GFAP、Olig2、Iba-1)に対する免疫染色を行った。この結果、同一腫瘍組織内において遺伝子背景の異なる腫瘍細胞あるいは腫瘍細胞様の振る舞いを示す反応性コンポーネントが存在する可能性が示唆され、真の治療ターゲットとなる腫瘍幹細胞を組織切片上に同定する試みの端緒となる知見を得た。

研究成果の概要(英文)：To evaluate heterogeneity among cells in glioma tissues, we performed immunohistochemistry against mutant isocitrate dehydrogenase 1, a marker for a representative gene alteration in gliomas, together with other glioma markers (MAP-2e, p53, DCX, nestin), a proliferation marker (Ki-67) and lineage-specific markers (GFAP, Olig2, Iba-1). The results suggest existence of different tumor cell components with different genetic backgrounds and/or reactive components with a similar biological behavior to tumor cells even in one same tumor tissue. The findings would lead to the identification of tumor initiating cells, potentially a genuine therapeutic target, in tissue sections.

研究分野：総合領域

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 グリオーマ イソクエン酸脱水素酵素1 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

2008年、びまん性グリオーマに高率に認められる遺伝子変化として、イソクエン酸脱水素酵素1 (IDH1) 遺伝子の点変異 (IDH1R132H) が発見された。さらにこの変異遺伝子産物に対するモノクローナル抗体が開発され、組織切片上でも特異的にグリオーマ細胞を検出できるようになり、この遺伝子異常の検出はグリオーマの確定診断の強力なツール、さらには予後規定因子としても注目されている。

一方で、IDH1R132Hはこの遺伝子異常をもたない症例ではマーカーとして用いることができない。また、申請者の抗 IDH1R132H 抗体を用いたグリオーマ標本の検討では、同一の切片の中でもしばしば部位により陽性率や染色強度に違いが認められた。

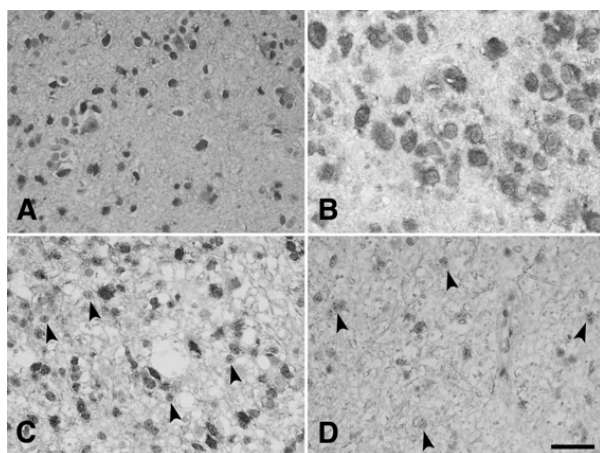


図1：オリゴアストロサイトーマの一例におけるIDH1R132H染色。皮質浸潤部(A)や大型異型細胞(B)では高い陽性率を示すが、白質深部のオリゴエンドログリオーマ成分(C)、アストロサイトーマ成分(D)では陽性細胞と形態上の区別のつかない陰性細胞(矢頭)も数多く認める。

申請者はこれまでに、微小管関連蛋白 MAP2-e がグリオーマに比較的特異的なマーカーであることを見だし、他の既存のマーカーの特性の検討も含めた診断学的研究を行って来た。

さらに、申請者はこれまで、レトロウイルスベクターを用いて血小板由来増殖因子 (PDGF) をラット脳のグリア前駆細胞に過剰発現させることにより、ヒト悪性グリオーマに酷似した腫瘍モデルを作製して来た。このモデルでは、レトロウイルスによって形質転換された腫瘍細胞が、PDGFのパラクライン機序により形質転換を受けていない多数の既存のグリア前駆細胞を腫瘍組織内に動員することが観察され、動員された細胞が形態、増殖能、浸潤能の面で腫瘍細胞同様の振る舞いを示すことが確認された。

ヒトグリオーマにおいても PDGF を始めとする様々な増殖因子やそのレセプターの発現が亢進していることが古くから知られており、我々のラットモデルと同様の現象が起きている可能性が十分にある。この現象がヒ

トグリオーマでも確認されれば、腫瘍進展機序の理解や治療の戦略、治療応答性の解釈に大きな転換をもたらす可能性がある。

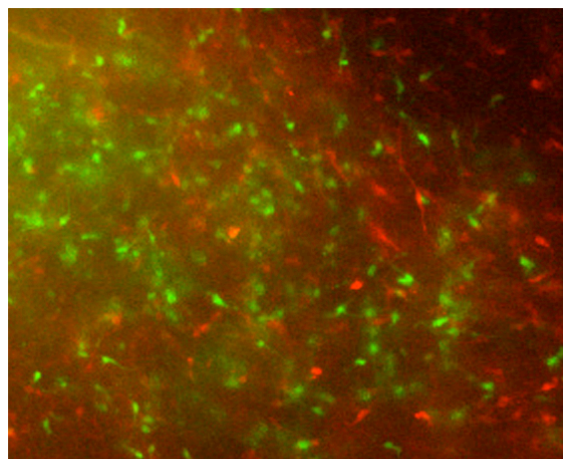


図2：PDGFとDsRedを発現する腫瘍細胞(赤)とGFPのみを発現するグリア前駆細胞(緑)が混在した腫瘍。両者は同様の形態、増殖能、浸潤能を示す (Assanah 2009より)

近年グリオーマでも腫瘍幹細胞が分離され、治療抵抗性と再発を担う細胞分画として注目されているが、治療応答性細胞の中には、こうした動員された細胞も含まれ、見かけの治療効果に影響を及ぼしているかも知れない。上述のように、抗 IDH1R132H 抗体は同一組織上の全ての腫瘍細胞を染色するとは限らない。一般的にこうした染色性の違いは細胞間におけるマーカー蛋白の発現レベルの多様性によるものと考えられるが、一方でまた、陰性細胞の中には上述のように腫瘍内に動員された遺伝子異常を持たない既存の細胞が含まれている可能性がある。

グリオーマ細胞の多様性についてはすでに知られているところであるが、非腫瘍成分も含めたグリオーマ組織の詳細な構成については見解が乏しく、今後の検討が必要である。

2. 研究の目的

IDH1R132H のグリオーママーカーとしての特性を検討し、グリオーマの病理診断の精度向上に寄与する。さらに、申請者らの動物モデルで確認されたグリオーマ組織構成細胞の多様性をヒト標本において検討し、その生物学的意義を明らかにし、グリオーマ増大機序の理解と新たな治療戦略開発の端緒とする。

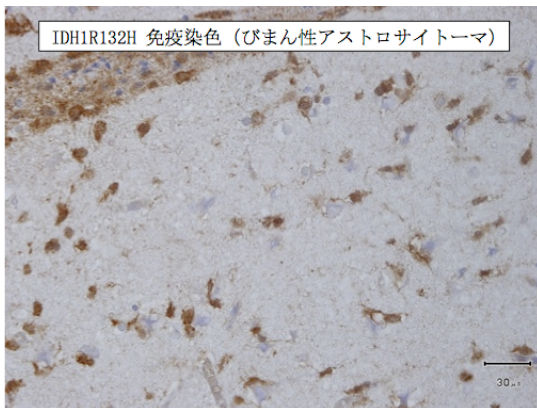
3. 研究の方法

グレード II から IV のさまざまな組織型のヒトびまん性グリオーマ組織において IDH1R132H およびその他のグリオーママーカー (MAP-2e、p53、DCX、nestin)、増殖マーカー (Ki67)、細胞系譜特異的マーカー (GFAP、Olig2、Iba-1) に対する免疫染色を行った。

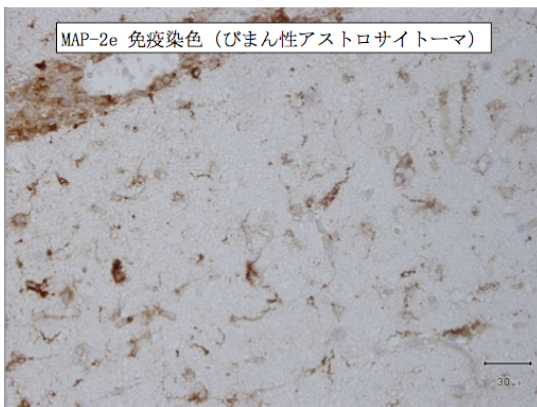
4. 研究成果

症例の内訳は、びまん性アストロサイトーマ (WHO grade II) 2 例、オリゴデンドログリオーマ (WHO grade II) 6 例、退形成性アストロサイトーマ (WHO grade III) 2 例、グリオブラストーマ (WHO grade IV) 11 例、オリゴデンドログリオーマ成分を含むグリオブラストーマ (WHO grade IV) 2 例であった。

このうち、IDH1R132H に陽性となった症例はびまん性アストロサイトーマ 0 例 (0%)、オリゴデンドログリオーマ 6 例 (100%)、退形成性アストロサイトーマ 0 例 (0%)、グリオブラストーマ a (WHO grade IV) 1 例 (9%)、オリゴデンドログリオーマ成分を含むグリオブラストーマ (WHO grade IV) 1 例 (50%) であった。



MAP-2e に対する免疫染色では全症例が陽性となり、ほぼ腫瘍細胞特異的な染色が得られた。



IDH1R132H 陽性症例において、MAP-2e に対する免疫染色と比較したところ、陽性細胞は概ね一致する傾向にあったが、一部 MAP-2e 陽性でありながら IDH1R132H 陰性の細胞が存在することが明らかになった。MAP-2e は広くグリオーマ細胞に発現する蛋白であるため、同一腫瘍組織内において遺伝子背景の異なる腫瘍細胞あるいは腫瘍細胞様の振る舞いを示す反応性コンポーネントが存在する可能

性が考えられた。

その他のマーカーについても、その多くが IDH1 変異体と共発現したが、これらマーカーと MAP-2e を共発現し、腫瘍細胞と区別つかない形態を示す細胞の中に、IDH1 変異体陰性の細胞が存在した。このことは、同一腫瘍組織内において遺伝子背景の異なる腫瘍細胞あるいは腫瘍細胞様の振る舞いを示す反応性コンポーネントが存在することをさらに裏付ける所見であると考えられた。

以上の結果から、ヒトグリオーマ組織における腫瘍性および非腫瘍性分画の存在パターンにつき形態学的な基礎的知見を得ることができた。また、グリオーマの病理診断の精度向上に寄与するとともに、真の治療ターゲットとなる腫瘍幹細胞を組織切片上に同定する試みの端緒となる知見を得ることができた。

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 10 件)

1. Togao O, Yoshiura T, Keupp J, et al. (15 人中 8 番目) Amide proton transfer imaging of adult diffuse gliomas: correlation with histopathological grades. *Neuro Oncol*. 2014;16:441-8. doi: 10.1093/neuonc/not158. 査読有
2. Kikkawa Y, Suzuki SO, Nakamizo A, et al. Radiation-induced spinal cord glioblastoma with cerebrospinal fluid dissemination subsequent to treatment of lymphoblastic lymphoma. *Surg Neurol Int*. 2013;4:27. doi: 10.4103/2152-7806.107905. 査読有
3. Mizoguchi M, Hata N, Suzuki SO, et al. Pediatric glioblastoma with oligodendroglioma component: Aggressive clinical phenotype with distinct molecular characteristics. *Neuropathology*. 2013;33(6):652-7. doi: 10.1111/neup.12029. 査読有
4. Yamashita K, Yoshiura T, Hiwatashi A, et al. (12 人中 6 番目) Differentiating primary CNS lymphoma from glioblastoma multiforme: assessment using arterial spin labeling, diffusion-weighted imaging, and 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography. *Neuroradiology*. 2013;55(2):135-43. doi: 10.1007/s00234-012-1089-6. 査読有
5. Amano T, Suzuki SO, Mizoguchi M, et al. Fibrotic nodule arising from the cerebellopontine angle. *Brain Tumor Pathol*. 2013 ;30(2):122-7. doi:

- 10.1007/s10014-012-0105-1. 査読有
6. Nishio M, Hamada K, Kawahara K, et al. (25人中8番目) Cancer susceptibility and embryonic lethality in Mob1a/1b double-mutant mice. *J Clin Invest.* 2012;122(12):4505-18. doi: 10.1172/JCI63735. 査読有
7. Kikkawa Y, Nakamizo A, Suzuki SO, et al. Spinal endodermal cyst resembling an arachnoid cyst in appearance: Pitfalls in intraoperative diagnosis of cystic lesions. *Surg Neurol Int.* 2012;3:78. doi: 10.4103/2152-7806.98518. 査読有
8. Horiguchi M, Koyanagi S, Okamoto A, et al. (6人中4番目) Stress-regulated transcription factor ATF4 promotes neoplastic transformation by suppressing expression of the INK4a/ARF cell senescence factors. *Cancer Res.* 2012;72(2):395-401. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-11-1891. 査読有
9. Yamashita K, Yoshiura T, Hiwatashi A, et al. (10人中6番目) Arterial spin labeling of hemangioblastoma: differentiation from metastatic brain tumors based on quantitative blood flow measurement. *Neuroradiology.* 2012;54(8):809-13. doi: 10.1007/s00234-011-0977-5. 査読有
10. Nakamizo A, Suzuki SO, Shimogawa T, et al. Concurrent spinal nerve root schwannoma and meningioma mimicking single-component schwannoma. *Neuropathology.* 2012;32(2):190-5. doi: 10.1111/j.1440-1789.2011.01239.x. 査読有

〔学会発表〕（計5件）

- 鈴木 諭. 臨床病理検討会指定討論. 第32回日本脳腫瘍病理学会, 2014年5月, 徳島
- 鈴木 諭. 教育セミナー「神経鞘腫および遺伝性腫瘍の病理」. 第32回日本脳腫瘍病理学会, 2014年5月, 徳島
- 鈴木 諭. 臨床病理検討会指定討論. 第31回日本脳腫瘍病理学会, 2013年5月, 東京
- 鈴木 諭. 教育セミナー「神経鞘腫および遺伝性腫瘍の病理」. 第31回日本脳腫瘍病理学会, 2013年5月, 東京
- 鈴木 諭. 臨床病理検討会指定討論. 第30回日本脳腫瘍病理学会, 2012年5月, 名古屋

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鈴木 諭 (Suzuki, Satoshi)
九州大学大学院医学研究院神経病理学
研究者番号：90294917

(3) 連携研究者

岩城 徹 (Iwaki, Toru)