

# 総説

## 脳腫瘍における遺伝子変異の解析

奈良県立医科大学病理病態学教室

中村 光利, 小西 登

奈良県立医科大学脳神経外科学教室

榊 寿右

### GENETIC ALTERATIONS IN BRAIN TUMORS

MITSUTOSHI NAKAMURA and NOBORU KONISHI

*Department of Pathology, Nara Medical University*

TOSHISUKE SAKAKI

*Department of Neurosurgery, Nara Medical University*

Received June 4, 2004

抄録：多形性膠芽腫 (glioblastoma, WHO grade IV) の発生には臨床経過並びに *p53*, *EGFR* 等の遺伝子異常の検索から, *de novo* に発生する primary glioblastoma (WHO grade IV) と, 星状細胞腫 (diffuse astrocytoma, WHO grade II) や 退形成星状細胞腫 (anaplastic astrocytoma, WHO grade III) から悪性転化して secondary glioblastoma (WHO grade IV) に至る2通りの経路があることが明らかとなってきた. 著者らは primary glioblastoma と secondary glioblastoma における既知および未知の遺伝子変異をジェネティックおよびエピジェネティックの両面から解析し, 形態的には類似した多形性膠芽腫であっても, その原因遺伝子は異なったものであることを立証してきた. また, diffuse astrocytoma と 乏突起神経膠腫 (oligodendroglioma, WHO grade II) との鑑別や, 神経膠腫 (glioma) の中での悪性度の評価など組織形態学だけでなく, 遺伝子解析による分子病理学的な観点からその発生メカニズムの検討と治療への応用をめざし多くの報告がなされてきている. これら glioma を中心とする脳腫瘍において, 我々がこれまで検索してきた遺伝子変化を紹介するとともに, 脳腫瘍の発生や悪性転化, 再発においてどのようにこれらの遺伝子変異が関わるのか, 臨床病理学的な側面を加えて検討した.

**Key words** : primary glioblastoma, secondary glioblastoma, oligodendroglioma, diffuse astrocytoma

#### はじめに

Glioblastoma は, 成人脳腫瘍の中でも最も頻度が高く悪性の腫瘍である. その治療成績は近年の進歩した手術

法や放射線・化学療法においても, 腫瘍の浸潤性や放射線・抗癌剤耐性などのため, 平均生存期間は2年以下である<sup>1-6)</sup>. 最近この glioblastoma には臨床的, 分子生物学的に異なる2つの subtype があることが明らかにさ

れ、それぞれに特徴のある癌関連遺伝子変異が検索されている<sup>6-8)</sup>。大多数(90%以上)は臨床的・病理組織学的に前病変なく、主に高齢者(平均 55 才)に短期間で急激に発症し、予後不良の転機をとる primary (*de novo*) glioblastoma である<sup>9)</sup>。一方、若年層(平均 40 才)で low grade diffuse astrocytoma または anaplastic astrocytoma から悪性転化する secondary glioblastoma があり、これらの glioblastoma subtype は異なる genetic pathway を経て発生することを著者らも示してきた<sup>9,10)</sup>。

他の glioma においても diffuse astrocytoma と oligodendroglioma とでは治療法が異なるが、形態学的に類似するものが多く、遺伝子解析による分子病理学的な観点からもその発生メカニズムを含め検討する必要があると考えられてきている<sup>11,12)</sup>。また、反応性の星状細胞と腫瘍との鑑別も困難な症例が多く、悪性度の評価なども含めて従来の組織形態学だけでは不十分な点も指摘されている。

本稿においては、著者らがこれまで Dr. Kleihues らとの共同研究(WHO 国際癌研究機関, Zürich 大学脳神経外科の症例)や、奈良県立医科大学脳神経外科における glioma を中心とする自験例における遺伝子変化を紹介するとともに、その発生の差異などについても臨床病理

学的に考察したい。

Primary glioblastoma と Secondary glioblastoma  
1. Genetic pathways to glioblastoma

元来, glioblastoma は臨床的に短期間(平均 7 週間)に症状が進行し、経過中に組織診断されるのが一般的(90% 以上)である。しかし, low grade diffuse astrocytoma と診断された後(平均 4.5 年),あるいは anaplastic astrocytoma の診断後(平均 2 年)に再発した腫瘍の多くは悪性の経過をたどり, glioblastoma と診断される症例も経験される。後者の glioblastoma では, 前者に比べ性差はみられず, 比較的若年で発症し若干予後が良い傾向があり, 両 glioblastoma の間には組織学的に鑑別がつかないもののそれらの発生機序は異なると考えられる様になってきた(図 1)。

Kleihues らのグループは, 分子生物学的な手法を用いて, primary glioblastoma では代表的な癌抑制遺伝子である *p53* 変異率は低いが(〜 15%), *EGFR* の overexpression や amplification が高頻度(〜 50%)でみられ, secondary glioblastoma では逆に *p53* 変異が高頻度(65% 以上)でみられるが, *EGFR* の overexpression は稀であるということを示した<sup>9)</sup>。その後, *MDM2* の

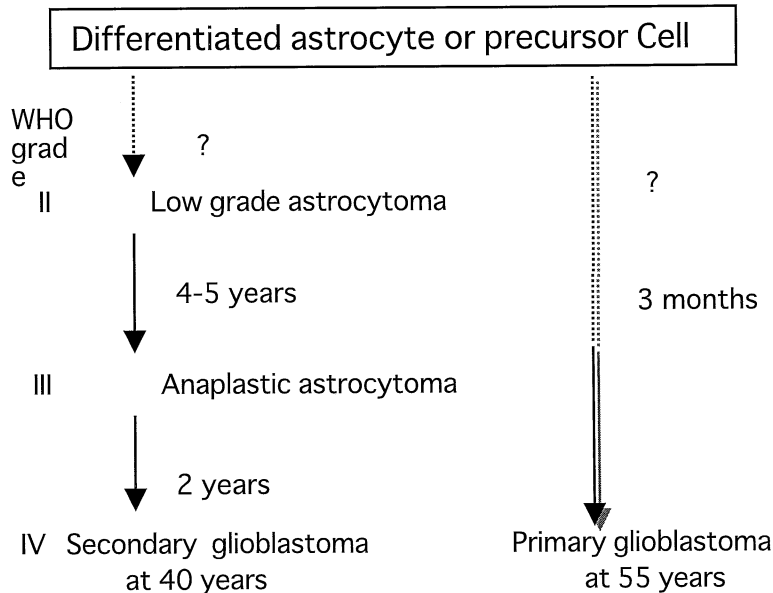


図 1. 臨床的に推定された 2 つの glioblastoma subtype. Primary glioblastoma は短期間(平均 7 週間)に症状が進行し、診断される。一方, secondary glioblastoma は low grade diffuse astrocytoma と診断された後(平均 4.5 年),あるいは anaplastic astrocytoma の診断後(平均 2 年), 再発する。

Table 1. Genetic and clinicopathological character in primary glioblastoma and secondary glioblastoma

	Primary glioblastoma		Secondary glioblastoma
Age at GBM diagnosis	55 years	>>	40 years
M/F ratio	1.4	>	0.8
<i>EGFR</i> amplification	39%	>>	0%
<i>EGFR</i> overexpression	63%	>>	10%
<i>MDM2</i> overexpression	52%	>>	7%
<i>p16</i> deletion	36%	>>	4%
<i>PTEN</i> mutation	30%	>>	5%
Fas expression	95%	>>	11%
Large areas of necrosis	100%	>>	45%
<i>p53</i> mutation	11%	<<	67%
Loss of DCC expression	23%	<<	53%
<i>CDK4</i> amplification	4%	<	13%
Loss of <i>RB</i> expression	14%	<	23%

amplification/overexpression, *PTEN* 変異, *p16<sup>INK4a</sup>* homozygous deletion など primary glioblastoma で高頻度にみられる変異であることも報告した<sup>13-15)</sup> (表 1). 著者らも同時期に, restriction landmark genomic scanning (RLGS) 法<sup>16,17)</sup>を用いて primary glioblastoma と secondary glioblastoma では増強・減弱するスポット (DNA 断片)に違いがみられ, 特に第 6 番, 第 13 番, 第 16 番, 第 18 番染色体に座位する遺伝子の変異がそれぞれの glioblastoma に至る genetic pathway に関わることを見出した<sup>1,10,18,19)</sup>.

著者らは, Zürich 大学の症例を用いて primary glioblastoma では第 10 番染色体の entire loss が高頻度に認められ, 10 番染色体長腕 (10q)・19 番染色体長腕 (19q) の loss of heterozygosity (LOH) は secondary glioblastoma で有意に多いことを報告した<sup>20,21)</sup>. 更に, *p14<sup>ARF</sup>* の

homozygous deletion の頻度はこれらの glioblastoma subtypes の間で差がないが, methylation specific PCR<sup>22-24)</sup>を用いた検索で *p14<sup>ARF</sup>* の methylation が secondary glioblastoma で有意に検出された<sup>25)</sup>. また, 対応する low grade diffuse astrocytoma では *p14<sup>ARF</sup>* の homozygous deletion は認めないが, すでに methylation の認められる例があり, astrocytoma progression に関わる遺伝子変異であることが示唆され, low grade diffuse astrocytoma から secondary glioblastoma への progression を制御できる可能性も示唆された. 更に他の癌抑制

遺伝子の retinoblastoma gene (*RBI*) や O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (*O<sup>6</sup>-MGMT*) などでも secondary glioblastoma においてプロモーター領域のメチル化が高頻度に検出され, primary glioblastoma と secondary glioblastoma に至る異なった genetic pathway を制御する遺伝子であることを見出した<sup>26,27)</sup> (図 2).

一方で, Kleihues らは二つのサブタイプの glioblastoma には組織学的構成成分に差が認められないとしながらも, glioblastoma の診断根拠となる壊死巣のなかで広範囲の虚血性壊死巣に関しては primary glioblastoma でより高頻度にみられることも指摘している (表 2). 虚血性壊死をきたすのも *VEGF* などの遺伝子変異が関わりとされているので, genetic pathway の違いを反映しているとも考えられるが, 著者らの自験例ではこれらの因子は両 glioblastoma の間で優位差はみられなかった. 以上のことから primary glioblastoma と secondary glioblastoma では, phenotype は同じでありながら, genotype は異なるものと考えられる.

以下に, 診断や治療の観点から primary glioblastoma と secondary glioblastoma の間で優位の差がみられる代表的な癌抑制遺伝子である *p53* と, 最近の自験例で見出した第 22 番染色体の LOH について概説する.

## 2. *p53* 遺伝子変異

WHO の data base によると脳腫瘍においても *p53* 遺

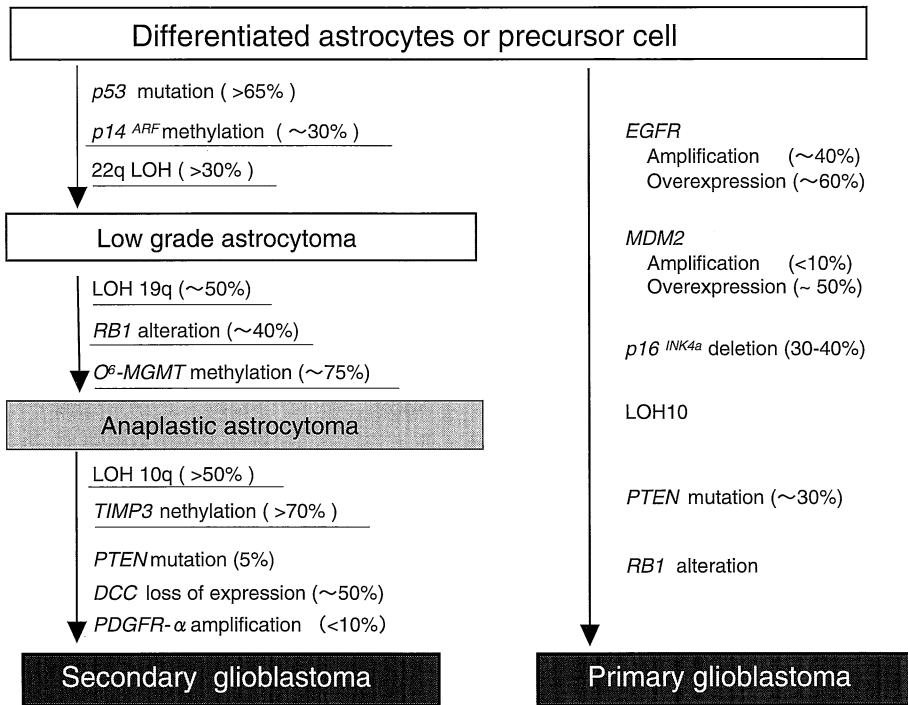


図 2. Genetic pathways to glioblastoma

Primary glioblastoma, secondary glioblastoma それぞれに至る遺伝子変異の違いを示す。著者らによって見出された遺伝子変異の違いは下線を施し明示している。(文献 6 より改変)

Table 2. Histological character in primary glioblastomas and secondary glioblastomas

	No. of cases	Necrosis		Microvascular proliferation
		Large ischemic	Pseudopalisading	
Primary glioblastoma	18	18 (100%)*	8 (44%)	18 (100%)
Secondary glioblastoma	19	10 (53%)	5 (26%)	18 (95%)

\* Significantly higher frequency than in secondary glioblastomas ( $P=0.0004$ )

伝子の変異は 52% (389/749) という高頻度で見られるが (www.iarc.fr/p53/index.html), 特に secondary glioblastoma においては 65% 以上と報告されている。加えて注目すべき事は、この遺伝子変異はその前病変である low grade astrocytoma でも半数以上で見られる変化である。

*p53* 遺伝子は細胞に与えられたストレスに応じて活性化され、細胞周期を停止して DNA 修復を引き起こした

り、あるいは損傷が大きい場合はアポトーシスを誘導する。また、標的遺伝子の特異的な DNA 配列に結合し転写活性化させるが、その遺伝子は 100 を越えると言われており、その中でも *WAF1* は *p53* の細胞周期停止作用の重要な部分を担っていると考えられている。我々は glioblastoma 細胞株を用いて、この *p53* 遺伝子型が治療効果や予後予測の指標となり得ることを示してきた<sup>28)</sup>。

しかし、実際の臨床材料において *p53* が予後因子や治療効果を左右するかについては、*p53* 遺伝子型は予後に関与しないという報告や、逆に変異型 *p53* 遺伝子型の glioblastoma の方が予後が良いという報告もあり、その臨床的意義ははまだ一定の見解を得ていない。Tada ら<sup>29)</sup> は yeast *p53* functional assay を用いて、*p53* 変異のある glioblastoma の方が予後良好とし、*p53* 野生型のものには *WAF1* による G1 期停止が優位に起こってしまい apoptosis を起こしにくいことが原因であると報告している。逆に *p53* 変異型では G2M 期を通り、アポトーシスに至る *p53* 非依存性アポトーシスの経路が残り、*p53* の変異のため細胞周期の停止が起こらず、アポトーシスが起こりやすくなっているとしている。

Kleihues らは、15 カ国にわたる多施設から WHO に収集した 987 例の glioblastoma の *p53* 変異を検索し、予後因子としての *p53* 変異の意義を検討し、uni-variant analysis では *p53* 変異がみられる glioblastoma の方が優位に予後良好であったという興味深い結果を示した(印刷中)。しかし、年齢、治療法の違い、更には手術摘出度・患者の performance status などを加味した multi-variant analysis では優位差は消失し、*p53* 変異だけでは十分な予後因子とは言い難いとしている。また、他の癌関連遺伝子と予後との相関も数多く報告され、これらの遺伝子変異との総合的な判断が必要と思われる。

### 3. 第 22 番染色体長腕の LOH

現在、22 番染色体の全シーケンスが解読され data base による利用が可能となり<sup>30)</sup>、glioma でも高頻度で 22q LOH が認められることが報告されている<sup>31)</sup>。著者らは、自験例において low grade diffuse astrocytoma, anaplastic astrocytoma, primary glioblastoma, secondary glioblastoma における 22q LOH を検索し、primary glioblastoma では 22q12.3-13.2 と 22q13.31 に、secondary glioblastoma では 22q12.3 に共通欠失領域を見出した。22q12.3 にある癌抑制遺伝子候補としては、human tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (*TIMP-3*) 遺伝子があり、secondary glioblastoma では 22q12.3 領域に LOH がみられた症例では *TIMP-3* のプロモーター領域のメチル化により、その発現が抑制されていた(中村 他 投稿中)

#### Diffuse astrocytoma と Oligodendroglioma

Oligodendroglioma は glioma の約 6% を占める腫瘍で、組織学的に円形の中心性核と淡明な細胞質をもち、核周囲の細胞質が明るく抜けてみえる蜂巣構造

honey-combed structure という特徴的な所見を呈すれば、診断は比較的容易である。しかし、小形～大型の gemistocytic cell や通常の astrocytoma に移行するものなど diffuse astrocytoma との鑑別が困難な症例も多い。実際、Burger ら<sup>12)</sup> も diffuse astrocytoma と診断された症例を retrospective に再検討するとその半数以上が oligodendroglioma とすべきであったとし、2010 年には glioma の半数以上が oligodendroglioma と診断されるであろうと推察している。Genetic な観点から、oligodendroglioma は 1p および 19q の LOH を示す例が多く、*p53* の変異は稀であるが、diffuse astrocytoma は上記のごとく *p53* 変異が高頻度で生じ、第 1 番染色体短腕 (1p) および 19q の LOH は稀であるとされている<sup>12)</sup>。Oligodendroglioma, diffuse astrocytoma, とともに WHO の grade II であるが、1p と 19q の LOH を示す症例では、優位に化学療法が有効で予後良好であることが明らかとなり 11, 両者の明確な鑑別が要求されるようになった。著者らの検索では oligodendroglioma の 79% で 1p と 19q の LOH が検出されたが、*p53* は 21% で変異するのみであり、特に典型的な honey-combed structure を示す症例では 93% で 1p と 19q の LOH を示していた<sup>32)</sup>。一方、diffuse astrocytoma では 1p と 19q の LOH は 13% の頻度であったが、*p53* 変異は 43% で検出できた。興味深いことに、1p と 19q の LOH が生じているが、*p53* が変異していない diffuse astrocytoma と診断した 3 例はいずれも、一部に oligodendroglioma への分化がみられた<sup>32)</sup>。以上のことから、diffuse astrocytoma と診断された症例でも 1p と 19q の LOH を示し、*p53* 変異がない場合は、oligodendroglioma の可能性を念頭におきながら、oligodendroglial component の存在の有無を確認する必要があると考えられた。

### おわりに

Primary glioblastoma では、広範囲の虚血性壊死果がしばしばみられる場合もあるが、その他の phenotype は secondary glioblastoma と同じであると考えられる。しかし、その genotype はまったく異なるものであり、それぞれの glioblastoma に至る genetic pathways を制御する遺伝子の異常により、2つの subtypes の glioblastoma が発生すると考えられる。

典型的な honey-combed structure を呈さない oligodendroglioma や、oligodendroglial component の存在がある diffuse astrocytoma では形態学的な診断だけでなく、1p や 19q の LOH および *p53* 変異の検索も行う必要があるとことが示唆された。

## 文 献

- 1) Nakamura, M, Konishi, N, Hiasa, Y, et al.: Frequent alterations of cell-cycle regulators in astrocytic tumors as detected by molecular genetic and immunohistochemical analyses. *Brain Tumor Pathol.* **15**: 83-88, 1998.
- 2) Nakamura, M, Konishi, N, Tsunoda, S, et al.: Retinoblastoma protein expression and MIB-1 correlate with survival of patients with malignant astrocytoma. *Cancer* **80**: 242-249, 1997.
- 3) Nakamura, M, Konishi, N, Tsunoda, S, et al.: Analysis of Prognostic and Survival Factors Related to Treatment of Low-Grade Astrocytomas in Adults. *Oncology* **58**: 108-116, 2000.
- 4) Nakamura, M, Tsunoda, S, Sakaki, T, et al.: Immunohistochemical study of glutathione S-transferase-pi in meningiomas. *Neurol. Med. Chir. (Tokyo)* **35**: 787-790, 1995.
- 5) Nakamura, M, Tsunoda, S, Watabe, Y, et al.: [Immunohistochemical study of placental form of glutathione S-transferase in human brain tumors and fetal brains]. *No To Shinkei* **42**: 965-970, 1990.
- 6) Kleihues, P, Cavenee, W K, : Pathology and genetics of tumours of the nervous system. Lyon, IARC Press, 9-70, 2000.
- 7) Lang, F F, Miller, D C, Koslow, M, et al.: Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J. Neurosurg.* **81**: 427-436, 1994.
- 8) von Deimling, A, von Ammon, K, Schoenfeld, D, et al.: Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* **3**: 19-26, 1993.
- 9) Watanabe, K, Tachibana, O, Sata, K, et al.: Overexpression of the EGF receptor and *p53* mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* **6**: 217-223; discussion 223-214, 1996.
- 10) Nakamura, M, Konishi, N, Tsunoda, S, et al.: Genomic alterations of human gliomas detected by restriction landmark genomic scanning. *Brain Tumor Pathol.* **14**: 13-17, 1997.
- 11) Cairncross, J G, Ueki, K, Zlatescu, M C, et al.: Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J. Natl. Cancer Inst.* **90**: 1473-1479, 1998.
- 12) Burger, P C: What is an oligodendroglioma? *Brain Pathol.* **12**: 257-259, 2002.
- 13) Tohma, Y, Gratas, C, Biernat, W, et al.: PTEN (MMAC1) mutations are frequent in primary glioblastomas (de novo) but not in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **57**: 684-689, 1998.
- 14) Biernat, W, Tohma, Y, Yonekawa, Y, et al.: Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol. (Berl)* **94**: 303-309, 1997.
- 15) Biernat, W, Kleihues, P, Yonekawa, Y, et al.: Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **56**: 180-185, 1997.
- 16) Konishi, N, Hiasa, Y, Nakamura, M, et al.: Different patterns of DNA alterations detected by restriction landmark genomic scanning in heterogeneous prostate carcinomas. *Am. J. Pathol.* **150**: 305-314, 1997.
- 17) Nakamura, M, Konishi, N, Tsunoda, S, et al.: Genomic alterations in human glioma cell lines detected by restriction landmark genomic scanning. *J. Neurooncol.* **34**: 203-209, 1997.
- 18) Nakamura, M, Konishi, N, Inui, T, et al.: Genetic variations in recurrent astrocytic tumors detected by restriction landmark genomic scanning. *Brain Tumor Pathol.* **15**: 1-6, 1998.
- 19) Nakamura, M, Konishi, N, Tsunoda, S, et al.: Analyses of human gliomas by restriction landmark genomic scanning. *J. Neurooncol.* **35**: 113-120, 1997.
- 20) Fujisawa, H, Reis, R M, Nakamura, M, et al.: Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab. Invest.* **80**: 65-72, 2000.
- 21) Nakamura, M, Yang, F, Fujisawa, H, et al.: Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp.*

- Neurol. **59**: 539-543., 2000.
- 22) Nakamura, M, Sakaki, T, Hashimoto, H, et al.: Frequent Alterations of the *p14<sup>ARF</sup>* and *p16<sup>INK4a</sup>* Genes in Primary Central Nervous System Lymphomas. *Cancer Res.* **61**: 6335-6339., 2001.
- 23) 中村光利, 小西 登: ヒト癌における *p14<sup>ARF</sup>* と *p16<sup>INK4a</sup>* の変異: 細胞周期異常と癌. *実験医学*, **21**: 176-181, 2003.
- 24) Konishi, N, Nakamura, M, Kishi, M, et al.: Heterogeneous methylation and deletion patterns of the *INK4a/ARF* locus within prostate carcinomas. *Am. J. Pathol.* **160**: 1207-1214, 2002.
- 25) Nakamura, M, Watanabe, T, Klangby, U, et al.: *p14<sup>ARF</sup>* deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol.* **11**: 159-168, 2001.
- 26) Nakamura, M, Watanabe, T, Yonekawa, Y, et al.: Promoter methylation of the DNA repair gene *MGMT* in astrocytomas is frequently associated with G:C → A:T mutations of the *TP53* tumor suppressor gene. *Carcinogenesis* **22**: 1715-1719, 2001.
- 27) Nakamura, M, Yonekawa, Y, Kleihues, P, et al.: Promoter hypermethylation of the *RBI* gene in glioblastomas. *Lab. Invest.* **81**: 77-82, 2001.
- 28) Aoki, H, Ohnishi, K, Wang, X, et al.: *p53*-independent WAF1 induction by ACNU in human glioblastoma cells. *Mol. Carcinog.* **21**: 171-176, 1998.
- 29) Tada, M, Matsumoto, R, Iggo, R D, et al.: Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastomas harboring *p53* mutations. *Cancer Res.* **58**: 1793-1797, 1998.
- 30) Dunham, I, Shimizu, N, Roe, B A, et al.: The DNA sequence of human chromosome 22. *Nature* **402**: 489-495, 1999.
- 31) 中村 光利, 小西 登: がんゲノム欠失領域の検索. *血液・腫瘍科* **48**: 147-155, 2004.
- 32) Watanabe, T, Nakamura, M, Kros, J M, et al.: Phenotype versus genotype correlation in oligodendrogliomas and low-grade diffuse astrocytomas. *Acta Neuropathol. (Berl)* **103**: 267-275, 2002.