

学位論文題名

Expression of Oligodendroglial Lineage-Associated Markers Olig1 and Olig2 in Different Types of Human Gliomas

(神経膠腫におけるオリゴデンドロサイト系マーカー OLIG の発現解析)

学位論文内容の要旨

I. 緒言

多くの神経膠腫は治療抵抗性で難治である中で、乏突起膠腫には補助療法に非常に感受性の高い一群があることが近年着目されている。光顕による病理所見だけでは時としてこのような腫瘍を区別するのが困難な事もあり、有効な分子マーカーの確立が期待されている。転写因子 OLIG は中枢神経発生段階で神経前駆細胞に特異的に発現し、オリゴデンドロサイトへの分化を誘導するベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス群の転写因子として 2000 年に同定され、その後 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、メッセンジャーRNA レベルで乏突起膠腫に発現が高いことが示された。本研究では、OLIG が乏突起神経膠腫の特異的マーカーとなるか検証するために、種々の神経膠腫での Olig1 および Olig2 の発現レベルの解析、Olig 2 ポリクローナル抗体を用いた免疫組織学的検討、そして腫瘍の種類、悪性度と OLIG の発現の関連につき検討することを目的とした。

II. 方法と結果

WHO grading system に基づき分類した神経膠腫の内訳は毛様細胞性星細胞腫(Pilocytic astrocytoma: PA)10 例、びまん性星細胞腫 (Diffuse astrocytoma: AS) 5 例、乏突起膠腫/乏突起星細胞腫(Oligodendroglioma/Oligoastrocytoma: OL/OA)7 例、退形成性星細胞腫 (Anaplastic astrocytoma: AA)9 例、退形成性乏突起膠腫 (Anaplastic oligodendroglioma: AO) 6 例、退形成性上衣腫(Anaplastic ependymoma: AE) 2 例、膠芽腫(Glioblastoma multiforme: GBM)9 例、合計 48 例である。これらの凍結腫瘍組織から total RNA を抽出し、半定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて Olig1 および Olig2 の mRNA の発現レベルを検討した結果、Olig1、Olig2 共に乏突起膠腫群のみならず、種々の神経膠腫で発現が認められた。Olig1 は OL/OA、AA、AO 群で発現が比較的高く、Olig2 も Olig1 と同様の結果であるが、OL/OA 群では顕著な上昇は認められなかった。GBM では Olig1 と Olig2 の発現は他の群と比較し有意に低下していた。

抗 OLIG2 ポリクローナル抗体を作成し、免疫組織学的検討をホルマリン固定パラフィン包埋組織にて行った。OLIG2 は腫瘍細胞の核に陽性となり、mRNA を発現している検体で陽性細胞が認められた。mRNA の発現が高かった AA と AO にて陽性率を比較すると、AA

では4-66%とばらつきはあるものの平均33%であり、AOでは6例中4例で90%以上の陽性率となり、平均でも82%と高値であった。またPA、ASでは組織パターンにより陽性率に違いが見られた。OL/OAでは陽性率はおよそ50%であった。GBMでは陽性細胞はごくわずかであった。

これらの結果から、Olig2のmRNAではいずれも発現が高値であるAAとAOとの鑑別も免疫染色により可能であることが判明し、Olig2のmRNA、免疫染色により悪性神経膠腫AO、AA、GBMの鑑別が可能であることが示唆された。

III. 考察

これまで、凍結標本上でRNA probeを用いた *in situ* ハイブリダイゼーション法により、乏突起膠腫でOLIGの発現が高いことが報告されている。しかしながら、OLIG mRNAレベルを腫瘍組織より定量化し、より多くの種類の神経膠腫にてその発現を検討したのは本研究以前に報告がない。この結果、OLIGのmRNAは乏突起膠腫のみならず、多くの神経膠腫にて発現していることが明らかになった。ことに、WHOのGrade 3に相当するAAとAOで発現が高く、Grade 4にあたるGBMで発現が低いことが明らかになった。

免疫染色では、WHOのgradingが低いPAやASでは腫瘍細胞の形態により陽性細胞が異なっている傾向を認めた。細胞形態とOLIG2の発現に関連が示唆される事はこれらの腫瘍の発生母地を考える上でも重要である。Gradingの高いAOでは典型的な病理像を呈する部位ではほぼ全腫瘍細胞で均一に陽性となったが、AAでは陽性細胞が陰性細胞間に散在する傾向を示しており、明瞭に区別できた。AAの約半数の腫瘍細胞でOLIG2の発現が見られる点は、OLIG2の増幅が腫瘍前駆細胞でAOと共用しているために生じている可能性が考えられた。最も悪性であるGBMではほとんど陽性細胞を認めなかった点は、腫瘍発生系列の差を示唆しており、さらに診断における有用性と考えられた。

臨床的にはAO及びAAとGBMでは予後、治療方針も異なってくるため、これらの腫瘍を正確に診断することが重要と考えられる。これまで、オリゴデンドロサイト発生系譜のマーカーNG2、PDGFR- α 、proteolipid proteinなどが乏突起膠腫のマーカーとなるか検討されてきたが、いずれも腫瘍細胞特異的な発現を証明することが出来ていない。我々の検討したOLIG2の免疫染色は、GBMとAOの補助診断として用いることができる可能性が示唆されることから、神経膠腫でOLIG2と他の発生系譜のマーカーの発現を対比してみることも、これらの腫瘍の性質、発生母地を明らかにする手がかりとなる今後の研究課題と考えられた。

IV. 結語

種々の神経膠腫にてOLIGの発現を検討した結果、神経膠腫の発生に関する新しい視点を得られ、さらにOlig2のmRNAの発現とOLIG2の免疫染色を併用することにより、より精度の高い神経膠腫の病理診断を得ることが可能と考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 渡 邊 雅 彦
副 査 教 授 長 嶋 和 郎
副 査 教 授 岩 崎 喜 信

学 位 論 文 題 名

Expression of Oligodendroglial Lineage-Associated Markers Olig1 and Olig2 in Different Types of Human Gliomas

(神経膠腫におけるオリゴデンドロサイト系マーカー OLIG の発現解析)

多くの神経膠腫は治療抵抗性で難治である中で、乏突起膠腫には補助療法に非常に感受性の高い一群があることが近年着目されている。光顕による病理所見だけでは時としてこのような腫瘍を区別するのが困難な事もあり、有効な分子マーカーの確立が期待されている。転写因子 OLIG は中枢神経発生段階で神経前駆細胞に特異的に発現し、オリゴデンドロサイトへの分化を誘導するベーシック・ヘリックス・ループ・ヘリックス群の転写因子として2000年に同定され、その後 *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて、メッセンジャーRNAレベルで乏突起膠腫に発現が高いことが示された。本研究では、OLIG が乏突起神経膠腫の特異的マーカーとなるか検証するために、種々の神経膠腫での Olig1 および Olig2 の発現レベルの解析、Olig2 ポリクローナル抗体を用いた免疫組織学的検討、そして腫瘍の種類、悪性度と OLIG の発現の関連につき検討することを目的とした。

WHO grading system に基づき分類した神経膠腫の内訳は毛様細胞性星細胞腫 (Pilocytic astrocytoma: PA) 10 例、びまん性星細胞腫 (Diffuse astrocytoma: AS) 5 例、乏突起膠腫/乏突起星細胞腫(Oligodendroglioma/Oligoastrocytoma: OL/OA) 7 例、退形成性星細胞腫 (Anaplastic astrocytoma: AA) 9 例、退形成性乏突起膠腫 (Anaplastic oligodendroglioma: AO) 6 例、退形成性上衣腫(Anaplastic ependymoma: AE) 2 例、膠芽腫(Glioblastoma multiforme: GBM) 9 例、合計 48 例である。これらの手術的に切除し凍結保存した腫瘍組織から total RNA を抽出し、半定量的リアルタイム RT-PCR 法を用いて Olig1 および Olig2 の mRNA の発現レベルを検討した結果、Olig1, Olig2 共に乏突起膠腫群のみならず、種々の神経膠腫で発現が認められた。Olig1 は OL/OA, AA, AO 群で発現が比較的高く、Olig2 も Olig1 と同様の結果であるが、OL/OA 群では顕著な上昇は認められなかった。GBM では Olig1 と Olig2 の発現は他の群と比較し有意に低下していた。

抗 OLIG2 ポリクローナル抗体を作成し、免疫組織学的検討をホルマリン固定パラフィン包埋組織にて行った。OLIG2 は腫瘍細胞の核に陽性となり、mRNA を発現している検体で陽

性細胞が認められた。mRNA の発現が高かった AA と AO にて陽性率を比較すると、AA では 4 - 66 % と広くばらつき、平均 33 % であったが、AO では 6 例中 4 例で 90 % 以上の陽性率となり、平均でも 82 % と高値であった。また PA、AS では組織パターンにより陽性率に違いが見られた。OL/OA では陽性率はおよそ 50 % であった。GBM では陽性細胞はごくわずかであった。これらの結果から、Olig2 の mRNA ではいずれも発現が高値である AA と AO との鑑別も免疫染色により可能であることが判明し、Olig2 の mRNA、免疫染色により悪性神経膠腫 AO、AA、GBM の鑑別が可能であることが示唆された。今後、Olig2 の mRNA の発現と OLIG2 の免疫染色を併用することにより、より精度の高い神経膠腫の病理診断を得ることが可能と考えられた。

口頭発表に当たり、副査の岩崎教授より、OLIG の発現解析による OA と AA の鑑別の是非、GBM にて発現が低下する理由、主査の渡邊教授より用いたサンプルの由来、OLIG の発現と予後の関連、Olig1、Olig2 の相互作用、OLIG 1 の免疫染色を検討しなかった理由等に関する質問があった。また副査の長嶋教授より AO と GBM を OLIG 2 の免疫染色のみで鑑別可能であるか、OLIG は腫瘍の維持に関係しているのか等に関する質問があった。これらの質問に対して申請者はおおむね適切な回答を行った。

この論文は種々の神経膠腫における OLIG 遺伝子の発現解析を行い、OLIG 遺伝子の病理診断的役割を明らかにした点で優れていると判断され、今後の神経膠腫の性質、発生母地を明らかにする上で貴重な示唆を与えたものと考えられた。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、申請者が博士(医学)の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。