

学 位 論 文 題 名

# 悪性グリオーマおよび髄膜腫の臨床病理学的解析

## 学位論文内容の要旨

### (1) 悪性グリオーマの臨床病理学的解析

【背景と目的】ヒト神経膠腫 glioma は神経膠細胞に起源を有する原発性脳腫瘍のうち最も頻度の高い腫瘍の一つである。WHO 分類では悪性度に応じて WHO grade I から IV に区分され、grade III および grade IV の腫瘍は malignant glioma と称される悪性度の高い腫瘍である。近年、1 番染色体短腕および 19 番染色体長腕の共欠損 (1p/19q co-deletion)、isocitrate dehydrogenase 1 (IDH1) の点突然変異、O<sup>6</sup>-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) のプロモーター領域のメチル化など、malignant glioma の遺伝子背景が明らかになりつつある一方で、WHO 分類第 4 版(2007)より glioblastoma multiforme (GBM、WHO grade IV) の亜分類として glioblastoma with oligodendroglioma component (GBMO) が追加され、組織学的な oligodendroglioma component (OC) の存在が予後良好因子として注目を集めている。本研究では当教室における 133 例の malignant glioma を WHO 第 4 版に則って診断の再評価を行い、GBMO を含む各組織型の生存解析を行った。さらに OC の臨床病理学的意義を評価した。

【対象と方法】北海道大学病院脳神経外科およびその関連施設で 2000 年から 2009 年の間に治療を受けた 133 例の malignant glioma を用い、WHO 第 4 版に則った診断の再評価を行った。核周囲明暈 perinuclear halo を有する腫瘍細胞集塊が認識される腫瘍を OC ありと定義した。診断再評価を行った後、除外症例を除く 111 例を用いて全生存期間(overall survival、OS)の解析を、78 例を用いて無増悪生存期間(progression-free survival、PFS)の解析を行った。

【結果】診断再評価の結果、30 例の組織診断が変更された。診断再評価後の生存解析では、GBMO は GBM に比して OS に有意差を認めなかったが、PFS の有意な延長を認めた。OC を含む malignant glioma (anaplastic oligodendroglioma、AO、anaplastic oligoastrocytoma、AOA、GBMO) は OC を含まない純粋な astrocytic tumor (anaplastic astrocytoma、AA および GBM) に比し、有意に良好な PFS および OS を示した。AA はこれまでの報告に反し、GBM とほぼ同様の不良な予後曲線を示した。

### (2) 髄膜腫における CD163 発現と機能解析

【背景と目的】CD163 はヒト単球およびマクロファージ表面に発現する約 130 kDa の膜タンパクで、診断病理学領域では CD163 に対する免疫染色が単球、マクロファージのマーカー

ーとして用いられている。腫瘍における CD163 の発現に関しては Fibrous histiocytoma や Histiocytic sarcoma などの単球、マクロファージ系の腫瘍に限られるという報告がある一方で、乳癌と直腸癌の一部において CD163 の発現が見られ、かつ早期再発や生存期間の短縮と相関があるという報告がある。本研究では最も頻度の高い頭蓋内腫瘍である髄膜腫において CD163 の発現解析と機能解析を行った。

【対象と方法】50 例の髄膜腫切除検体（Grade I 33 例、Grade II 14 例、Grade III 3 例）を用いて免疫染色による CD163 の発現解析を行い、WHO grade、MIB-1 index、組織学的異型度との相関を検討した。次に髄膜腫細胞株である HKBMM および髄膜腫初代培養細胞を用いて CD163 過剰発現株を樹立し、増殖能の解析、アポトーシスの定量、ヌードマウス皮下異種移植片の形成による腫瘍形成能の評価を行った。さらに CD163 の下流因子の探索を目的にサイトカイン群の mRNA 発現解析を行った。

【結果】免疫染色による検討の結果、50 例中 26 例(52.0%)の髄膜腫が CD163 陽性を示した。CD163 陽性症例の割合は Grade I (33 例中 16 例、48.5%)に比して Grade II (14 例中 10 例、71.4%)で高かったが、Grade III の髄膜腫では全 3 例が CD163 陰性を示した。CD163 陽性率は組織学的異型度と正の相関を示したが、WHO grade および MIB-1 index との相関は見られなかった。分子生物学的検討においては CD163 過剰発現株で陰性対照に比し、増殖能の上昇とアポトーシスの抑制、ヌードマウス皮下異種移植片の増大が見られた。さらに CD163 過剰発現株では granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)の mRNA 発現およびタンパク産生の亢進が見られ、CD163 が G-CSF の発現亢進を介して腫瘍細胞のアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

【考察】(1) 古典的 GBM と GBMO との予後の差については GBMO で良好な予後を示すという報告と有意差を認めないという報告の両者が存在するが、本検討では GBMO で有意に良好な PFS を示した。また、OC を含む oligodendroglial tumor (AO、AOA、GBMO) で顕著に良好な予後が示され、組織学的な OC の存在が予後因子として WHO grading とほぼ同等の有意性をもつことが示された。

(2) 本研究では免疫染色および RT-PCR 法により初めて髄膜腫における CD163 発現が証明され、また、CD163 の腫瘍促進性の機能を初めて実験的に示した。今後は Grade III の症例数を増やした検討とともに G-CSF リコンビナントタンパクや抗 G-CSF 抗体を用いた追加検討が必要と考えられる。

【結論】(1) Malignant glioma において組織学的な OC の認識が予後因子として重要であることが示された。

(2) 髄膜腫において CD163 は G-CSF を介し、アポトーシスを抑制する。本研究結果から CD163 分子が新規の予後予測因子として有用であることが示唆され、さらには治療標的分子としての可能性が期待される。

【結語】本研究を通して診断、治療方針の決定、病理研究における形態観察の重要性が再認識された。今後も病理組織学的評価を基盤とし、分子生物学的手法を統合した研究の展開が重要と考えられる。

# 学位論文審査の要旨

主査	教授	福田	諭
副査	教授	田中	伸哉
副査	教授	松野	吉宏
副査	准教授	飛驒	一利

## 学位論文題名

### 悪性グリオーマおよび髄膜腫の臨床病理学的解析

原発性脳腫瘍のうち最も頻度の高い腫瘍は髄膜腫で、グリオーマ、下垂体腺腫がこれに続く。申請者は髄膜腫および悪性グリオーマにおける予後予測因子、治療標的因子の探索を目的とし、臨床病理学的・分子生物学的解析を行った。

グリオーマはグリア細胞に起源を有する頭蓋内腫瘍で、悪性度に応じ、WHO Grade I から IV に区分され、Grade III および Grade IV の腫瘍は悪性グリオーマと称される悪性度の高い腫瘍である。形態学的には星細胞系腫瘍 astrocytic tumor と乏突起膠細胞系腫瘍 oligodendroglial tumor に大別される。2007 年、WHO 第 4 版に Grade IV の Glioblastoma (GBM) の亜型として新たに乏突起膠腫成分を含む GBM (Glioblastoma with oligodendroglioma component, GBMO) が追加された。この改訂により oligodendroglioma component (OC) を有する症例が予後良好の傾向を示す可能性が言及されたが、いまだ一定の見解は得られていない。本研究では病理組織学的予後因子の探索を目的に、GBMO の加わった WHO 第 4 版に則った悪性グリオーマの診断再評価を行い、各組織型の生存解析を行った。

北海道大学病院脳神経外科およびその関連施設で 2000 年から 2009 年の間に治療を受けた 111 例の悪性グリオーマの診断を再評価したところ、30 例の組織診断が変更され、うち 17 例が GBMO の診断に至った。再評価後の生存解析では、GBMO は GBM に比して OS に有意差を認めなかったが、PFS の有意な延長を認めた。OC を含む悪性グリオーマは OC を含まない純粋な astrocytic tumor に比し、有意に良好な PFS および OS を示した。Anaplastic astrocytoma (AA) はこれまでの報告に反し、GBM とほぼ同様の不良な予後曲線を示した。本研究結果より HE 標本において同定される OC の存在が予後規定因子であることが示された。AA と GBM がほぼ同様の予後曲線を示したことは、WHO grading の概念に反しており、今後の治療戦略を考える上で重要な知見と考えられるが、今回検討した AA は 13 例と症例数が少なく、さらに症例数を増やした検討が必要と考えられた。

一方、最も頻度の高い頭蓋内腫瘍である髄膜腫は悪性度に応じて WHO grade I から III

に分類される。大部分の髄膜腫は Grade I の良性腫瘍であるが、一部の髄膜腫は Grade II あるいは III の高悪性度腫瘍に相当する。Grade II、III の悪性髄膜腫に対する治療として外科的切除に加え、術後放射線療法、化学療法などが施行されるが、再発率は 40-80% と高く、標準治療は未だ確立されていないため、新たな治療標的分子の探索が期待されている。CD163 は診断病理学領域で単球、マクロファージマーカーとして頻用される膜タンパク質である。腫瘍における CD163 発現は Fibrous histiocytoma や Histiocytic sarcoma などの組織球系腫瘍に限られるとされていたが、近年になって直腸癌と乳癌の一部において CD163 の発現が見られ、かつ早期再発や生存期間の短縮と相関があるという報告がなされた。本研究では髄膜腫における新規の治療標的分子の探索を目的とし、髄膜腫における CD163 発現と機能解析を行った。

50 例の髄膜腫切除検体を用い、免疫染色による CD163 の発現解析を行った結果、50 例中 26 例(52.0%)の髄膜腫が CD163 陽性を示した。CD163 陽性症例の割合は Grade I (33 例中 16 例、48.5%)に比して Grade II (14 例中 10 例、71.4%)で高かったが、Grade III の髄膜腫では全 3 例が CD163 陰性を示した。CD163 陽性率は組織学的異型度と正の相関を示したが、WHO grade および MIB-1 index との相関は見られなかった。分子生物学的検討においては CD163 過剰発現株で陰性対照に比し、増殖能の上昇とアポトーシスの抑制、ヌードマウス皮下腫瘍形成能の増大が見られた。さらに CD163 過剰発現株では granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)の mRNA 発現およびタンパク産生の亢進が見られ、CD163 が G-CSF の発現亢進を介して腫瘍細胞のアポトーシスを抑制している可能性が示唆された。

審査員から OC の定義について、GBMO と GBM の生存曲線の前半部分が重なる理由について、OC の判定に病理医 4 人のコンセンサスは得られたかどうか、OC が良好な予後を規定する理由について、Grade III の髄膜腫において CD163 発現が確認されなかった理由について、CD163 発現と上皮間葉移行・癌幹細胞形質の相関についてなどの質問があった。申請者はこれらの質問に対して自らの研究結果や先行研究の研究成果に基づいて概ね妥当な回答を行った。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（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。