

示されており、その活性化により化学療法の効果が減弱する可能性が指摘されている⁴¹⁾。NF- κ B は proteasome 阻害剤の主要な標的であり、bortezomib などの臨床試験が既に行われている。

2. 個別化化学療法

前項で述べたように、化学療法の有効性は、定型的薬剤関連因子や細胞死・生存制御因子など多数の因子により規定されている。しかし、腫瘍の種類・悪性度や使用する抗癌剤によってはその感受性を規定する主要な因子が存在することも明らかであり、そのような因子解析をあらかじめ行うことで個々の症例における使用抗癌剤・プロトコルを選定する個別化化学療法(=テイラーメイド治療, individualized adjuvant therapy: IAT)は、全体としての化学療法反応性を高め、予後の改善に寄与する可能性が考えられる。

a. 抗癌剤感受性試験(drug sensitivity test: DST)

手術により摘出された腫瘍標本からの初代培養細胞を使用し、主として *in vitro* の系で種々の抗癌剤による治療を行い、感受性・低感受性を評価することで臨床効果を予測する方法である。DST には幾つかのアッセイ法があるが、最も広く使用されている方法は、ミトコンドリア活性を標的とした succinic dehydrogenase inhibition (SDI) 法(別名 MTT アッセイ)であり、簡便・安価に 90% 以上の判定可能率を有する特徴をもつが、細胞の成長アッセイではなく、また間質の線維芽細胞の混入による underestimation などの短所もある。次いでコラーゲンゲル包埋法による成長アッセイである collagen gel droplet embedded drug sensitivity test (CD-DST) が行われており、微量検体でも可能で、画像解析装置による癌細胞だけの解析ができ、キットが販売されている。これらの DST による臨床効果予測率は約 75% とされるが、臨床奏効例の多くは PR にとどまり、生存期間の延長にはつながっていない⁴²⁾。最近岩立らは、腫瘍組織から単離細胞を調整し、30 種類の抗癌

剤で治療した後フローサイトメトリー (FCM) を用いてアポトーシスを検出する DST を開発し、GBM 40 症例に対して DST の結果を基に化学療法プロトコルを選定して、60 Gy の放射線治療と併用治療を行い、26% の症例で PR となり、中間生存期間が 20.5 カ月と延長がみられたと報告している⁴³⁾。DST による IAT は臨床的に無効な薬剤を除外し、耐性機序が不明な薬剤でも対象とし得る利点を有するが、初代培養細胞を使用することによるアーチファクトの評価と耐性克服の解決に貢献できない点などが問題となろう。

b. MGMT 発現解析によるニトロソウレア剤選択

悪性 glioma に対する標準的治療薬は血液脳関門の透過性が比較的高いとされているニトロソウレア剤であり、本邦においても ACNU が通常化学療法の第一選択剤として使用されてきている。前述のように、DNA 修復酵素の MGMT が ACNU 耐性の主要な因子であると考えられており、MGMT の発現量に基づいた IAT の試みが検討されている⁴⁴⁻⁴⁶⁾。著者らの施設では手術摘出腫瘍標本から腫瘍細胞蛋白を抽出し、Western blot 法による MGMT 蛋白発現の解析を行っている(図 3)⁴⁶⁾。悪性 glioma での MGMT 蛋白発現量を β -actin 発現量で標準化し、ACNU 耐性で MGMT を高発現しているヒト glioma T98G 細胞での MGMT 発現量を基準として、MGMT が低発現(T98G の MGMT 発現量の 20% 以下)の腫瘍には ACNU を含む併用化学療法を、高発現(同 20% 以上)の腫瘍には ACNU を含まない併用化学療法(主としてプラチナ系抗癌剤を使用)を放射線治療と併用して施行している。2003 年までの AA および GBM の 31 例では、MGMT 低発現腫瘍で再発までの期間が有意に長く、GBM 症例では MGMT 発現量が多変量解析でも最も有意な再発予後因子であった。一方で MGMT 高発現腫瘍に対しては ACNU を使用しない代替プロトコルを使用したか、早期の腫瘍再発・増大を示した症例が過半数を占めた⁴⁷⁾。Tanaka らは、悪性 glioma 手術標本から抽出した mRNA を用いて MGMT mRNA 発現量

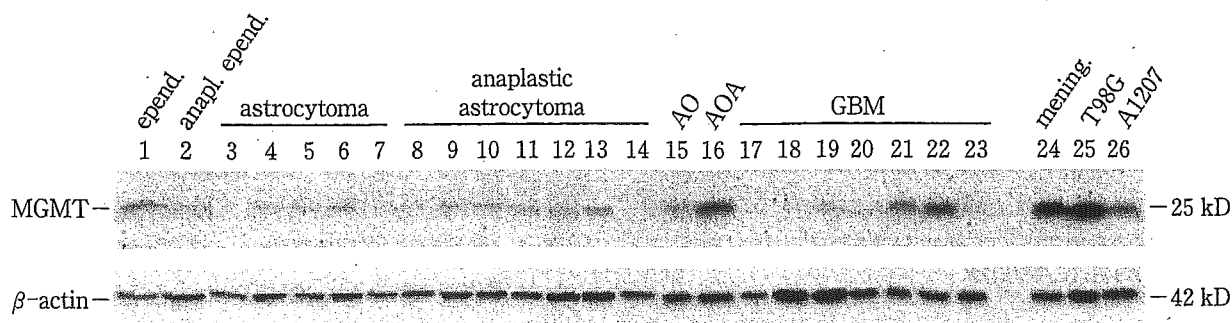


図3 Western blot法によるMGMT蛋白の発現検出(文献⁴⁶⁾より一部改変引用)

神経膠腫腫瘍標本から抽出した蛋白を電気泳動し、PVDF膜にtransfer後、抗MGMTモノクローナル抗体を用いて約25kDのMGMT蛋白を検出した。β-actinの発現を内部対照として用いた。

epend.: ependymoma, anapl.: anaplastic, AO: anaplastic oligodendroglioma, AOA: anaplastic oligoastrocytoma.

をreal-time RT-PCR法により測定し、一定レベル以上のMGMT mRNA発現を示す腫瘍に対してはACNUを使用せずプラチナ系抗癌剤を用いたプロトコルで治療をするIATを施行した。MGMT mRNA発現量がACNUを用いた初期治療の反応性と生存期間の有意な予見因子であり、IAT施行例では53%の治療奏効率(CR+PR)が認められたとしている^{44,45)}。このほかのMGMT活性評価法として、MGMT遺伝子promoterのメチル化解析、腫瘍組織片を用いた免疫染色、non-RI法によるMGMT酵素活性測定法などが試みられているが、定量性の程度、正常脳組織の混入、血管内皮におけるMGMT発現、悪性gliomaのheterogeneityなどの問題があり、免疫染色を含めた複数の測定法を用いることが望ましい。現在進行中のJapan Clinical Oncology Group(JCOG)脳腫瘍研究グループによる多施設共同臨床試験(phase II/III)において、MGMT発現解析の意義を検討中である⁴⁸⁾。

c. ニトロソウレア耐性克服

MGMTが高発現の腫瘍ではニトロソウレア剤の感受性が低いことが予想され、その場合にMGMT活性を抑制することで感受性化を図る耐性克服法もIATとして期待される。現在、O⁶-benzylguanine(BG)が最も重点的に検討されており、ニトロソウレア耐性再発悪性gliomaを対象としたphase II臨床試験が施行された⁴⁹⁾。またO⁶-BGによる不活化に耐性を示すMGMT

遺伝子変異が発見され、逆にこの変異MGMT遺伝子を血液幹細胞に遺伝子導入することで、O⁶-BGとニトロソウレア併用療法から強度の骨髄抑制を予防する試みも検討されている¹⁷⁾。

d. 化学療法反応性としての遺伝子異常マーカー

Anaplastic oligodendroglioma(AO)は、染色体1番短腕(1p)および19番長腕(19q)に遺伝子欠失(ヘテロ接合性の欠失(loss of heterozygosity: LOH))がある場合、化学療法、特にprocarbazine, CCNU, VCR(PCV)併用療法に対して感受性を示し、これらのLOHを認めない群と比べ有意に生存期間の延長が認められている。LOHを示す遺伝子領域にこれまでのところ薬剤感受性に関連する遺伝子は明らかにされていないが、AOにおいてはこれらの遺伝子マーカーの異常パターンにより、1p LOH/19q LOHが陽性の場合にはPCV療法などの化学療法を先行し、一方LOH陰性の場合にはより強力な集学的治療を施行するなどのIATが合理的と考えられる⁵⁰⁾。

e. 遺伝子発現プロファイリングと予後分類

近年のDNAマイクロアレイ技術の飛躍的な発展に伴い、包括的な遺伝子発現解析が可能となり、その結果、多数の遺伝子マーカーを用いた分子プロファイリングによる腫瘍組織分類、予後分類の可能性が様々な癌腫で報告されてきた。脳腫瘍においても髄芽腫や悪性gliomaで

DNAマイクロアレイによるプロファイリングの有用性が示唆されているが^{51,52)}、発現蛋白質を用いたプロテオーム・プロファイリング解析による予後予測が glioma において報告され⁵³⁾、化学療法治療反応性の予測や IATへ応用されることが大いに期待される。一方で乳癌におけるこれまでのマイクロアレイ・プロファイリングの報告をみると、異なる施設から発表された同様のマーカー遺伝子群間に重複する遺伝子が極めて少なく、選択された遺伝子自体の薬剤耐性への関与や組み合わせの意義に関して不確定な面も指摘されている。今後マーカー遺伝子・蛋白質の有用性をいかに立証していくかが重要な課題と考えられる。

f. SNP 解析

同じ抗癌剤の治療でもその副作用の程度に個人差があるため、そのような‘体質’をあらかじめ把握し患者ごとに適切な薬剤と投与量を決定することは重要であり、薬剤代謝酵素の遺伝子などにも多く存在する SNP の研究が大規模に進められている¹⁰⁾。しかし、ニトロソウレア剤などに関する SNP 解析の報告はまだなく、また大規模な遺伝子解析施設を要するため、悪性脳腫瘍の治療への応用はこれからの課題といえよう。

g. 分子標的治療の耐性機構

近年の癌化学療法の大きな流れとして、分子生物学で明らかにされてきた腫瘍関連分子の阻害を目的とする分子標的治療薬の開発が進められている。特に PTK の EGFR に対する gefitinib や Bcl-Abl に対する STI571 などがそれぞれ非小細胞肺癌や慢性骨髄性白血病・GISTなどで

効果を上げている。最近これらの分子標的薬が無効となる耐性の原因として、標的分子の遺伝子変異の存在が明らかにされてきた。特に gefitinib の場合は、標的である EGFR 遺伝子の ATP 結合領域に遺伝子変異が検出され、その結果 tyrosine kinase 活性が亢進するとともに gefitinib への感受性が増加することが示された^{54,55)}。すなわち gefitinib の有効性が、標的となる EGFR 遺伝子の状態で予測できる可能性が示唆されたことを意味しており、現在精力的に非小細胞肺癌においてその検証が行われている。EGFR 遺伝子変異は悪性 glioma でも高頻度で見られるが、同様の遺伝子変異は glioma では認められておらず、また再発 GBM を対象とした phase II 臨床試験では gefitinib の有効性は認められず、EGFRvIII を発現している腫瘍に対しても同様であった⁵⁶⁾。

おわりに

化学療法耐性の分子機序につき、定型的な耐性機構に加え腫瘍細胞での増殖・細胞死制御に、関与する分子による新たな耐性機構について概説するとともに、そのような知見を基にした個別化化学療法の可能性を主として悪性 glioma を中心に紹介した。いかに標準的治療法であれ、化学療法への感受性は個々の腫瘍・症例により異なることは自明であり、個々の症例における治療感受性の予見およびその際の代替治療法の選択を組とした個別化化学療法は、これまでの化学療法の治療効果を劇的に改善する可能性を秘めていると考えられ、今後ますますの基礎的・臨床的検討が進められることを期待したい。

■ 文 献

- 1) 竹村 譲：抗癌剤耐性形質の細胞薬理学的・生化学的機構。癌の薬剤耐性とその克服—基礎と臨床—(大沼尚夫, 竹村 譲編), p41-51, 宇宙堂八木書店, 2001.
- 2) Guo W, et al: Mechanisms of methotrexate resistance in osteosarcoma. Clin Cancer Res 5: 621-627, 1999.
- 3) Gottesman MM, et al: Multidrug resistance in cancer: role of ATP-dependent transporters. Nat Rev Cancer 2: 48-58, 2002.
- 4) Goldman B: Multidrug resistance: can new drugs help chemotherapy score against cancer? J Natl Cancer Inst 95: 255-257, 2003.
- 5) Ashmore SM, et al: Does P-glycoprotein play a role in clinical resistance of malignant astrocytoma? Anticancer Drugs 10: 861-872, 1999.

- 6) Feun LG, et al: Drug resistance in brain tumors. *J Neurooncol* 20: 165-176, 1994.
- 7) Meijer C, et al: Relationship of cellular glutathione to the cytotoxicity and resistance of seven platinum compounds. *Cancer Res* 52: 6885-6889, 1992.
- 8) Nagane M, et al: Expression pattern of chemoresistance-related genes in human malignant brain tumors: a working knowledge for proper selection of anticancer drugs. *Jpn J Clin Oncol* 29: 527-534, 1999.
- 9) Grant R, Ironside JW: Glutathione S-transferases and cytochrome P450 detoxifying enzyme distribution in human cerebral glioma. *J Neurooncol* 25: 1-7, 1995.
- 10) Pirmohamed M, Park BK: Genetic susceptibility to adverse drug reactions. *Trends Pharmacol Sci* 22: 298-305, 2001.
- 11) Barnes MJ, et al: Impact of polyglutamation on sensitivity to raltitrexed and methotrexate in relation to drug-induced inhibition of de novo thymidylate and purine biosynthesis in CCRF-CEM cell lines. *Clin Cancer Res* 5: 2548-2558, 1999.
- 12) Longley DB, et al: 5-fluorouracil: mechanisms of action and clinical strategies. *Nat Rev Cancer* 3: 330-338, 2003.
- 13) Jansen WJ, et al: Anti-tumor activity of CPT-11 in experimental human ovarian cancer and human soft-tissue sarcoma. *Int J Cancer* 73: 891-896, 1997.
- 14) Friche E, et al: Decreased DNA topoisomerase II in daunorubicin-resistant Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 51: 4213-4218, 1991.
- 15) Dumontet C, Sikic BI: Mechanisms of action of and resistance to antitubulin agents: microtubule dynamics, drug transport, and cell death. *J Clin Oncol* 17: 1061-1070, 1999.
- 16) 永根基雄ほか: ACNU 耐性と MGMT の発現. *Mebio* 10: 107-113, 1993.
- 17) Gerson SL: MGMT: its role in cancer aetiology and cancer therapeutics. *Nat Rev Cancer* 4: 296-307, 2004.
- 18) Nagane M, et al: Expression of *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase and chloroethylnitrosourea resistance of human brain tumors. *Jpn J Clin Oncol* 22: 143-149, 1992.
- 19) Belanich M, et al: Retrospective study of the correlation between the DNA repair protein alkyltransferase and survival of brain tumor patients treated with carmustine. *Cancer Res* 56: 783-788, 1996.
- 20) Silber JR, et al: *O*⁶-methylguanine-DNA methyltransferase activity in adult gliomas: relation to patient and tumor characteristics. *Cancer Res* 58: 1068-1073, 1998.
- 21) Stupp R, et al: Concomitant and adjuvant temozolomide (TMZ) and radiotherapy (RT) for newly diagnosed glioblastoma multiforme (GBM). Conclusive results of a randomized phase III trial by the EORTC Brain & RT Groups and NCIC Clinical Trials Group. *J Clin Oncol* 22: 2, 2004.
- 22) Esteller M, et al: Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *N Engl J Med* 343: 1350-1354, 2000.
- 23) Fink D, et al: The role of DNA mismatch repair in drug resistance. *Clin Cancer Res* 4: 1-6, 1998.
- 24) Plumb JA, et al: Reversal of drug resistance in human tumor xenografts by 2'-deoxy-5-azacytidine-induced demethylation of the hMLH1 gene promoter. *Cancer Res* 60: 6039-6044, 2000.
- 25) Fedier A, et al: Resistance to topoisomerase poisons due to loss of DNA mismatch repair. *Int J Cancer* 93: 571-576, 2001.
- 26) Friedman HS, et al: DNA mismatch repair and *O*⁶-alkylguanine-DNA alkyltransferase analysis and response to Temodal in newly diagnosed malignant glioma. *J Clin Oncol* 16: 3851-3857, 1998.
- 27) 永根基雄ほか: 再発悪性神経膠腫に対する temozolomide 療法の経験および治療感受性の検討. *Neuro-Oncology* (Tokyo). (in press)
- 28) Furuta T, et al: Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells. *Cancer Res* 62: 4899-4902, 2002.
- 29) Kleihues P, Cavenee WK (ed): *Pathology and Genetics of Tumors of the Nervous System*, IARC press, Lyon, 2000.
- 30) Iwade Y, et al: Association of p53 gene mutation with decreased chemosensitivity in human malignant gliomas. *Int J Cancer* 69: 236-240, 1996.
- 31) Shiraishi S, et al: Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer* 95: 249-257, 2002.

- 32) Kyritsis AP, et al: Prognostic significance of p53 immunoreactivity in patients with glioma. *Clin Cancer Res* 1: 1617-1622, 1995.
- 33) Wang Y, et al: BASC, a super complex of BRCA1-associated proteins involved in the recognition and repair of aberrant DNA structures. *Genes Dev* 14: 927-939, 2000.
- 34) Nagane M, et al: Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res* 60: 847-853, 2000.
- 35) Velculescu VE, et al: Analysis of human transcriptomes. *Nat Genet* 23: 387-388, 1999.
- 36) Blume-Jensen P, Hunter T: Oncogenic kinase signalling. *Nature* 411: 355-365, 2001.
- 37) Nagane M, et al: Drug resistance of human glioblastoma cells conferred by a tumor-specific mutant epidermal growth factor receptor through modulation of Bcl-X_L and caspase-3-like proteases. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 5724-5729, 1998.
- 38) Page C, et al: Overexpression of Akt/AKT can modulate chemotherapy-induced apoptosis. *Anticancer Res* 20: 407-416, 2000.
- 39) Yu H, Jove R: The STATs of cancer—new molecular targets come of age. *Nat Rev Cancer* 4: 97-105, 2004.
- 40) Lin A, Karin M: NF- κ B in cancer: a marked target. *Semin Cancer Biol* 13: 107-114, 2003.
- 41) Baldwin AS: Control of oncogenesis and cancer therapy resistance by the transcription factor NF- κ B. *J Clin Invest* 107: 241-246, 2001.
- 42) 久保田哲朗: 癌細胞の抗癌剤感受性試験. 癌の薬剤耐性とその克服—基礎と臨床—(大沼尚夫, 竹村 譲編), p33-40, 宇宙堂八木書店, 2001.
- 43) Iwade Y, et al: Promising survival for patients with glioblastoma multiforme treated with individualised chemotherapy based on in vitro drug sensitivity testing. *Br J Cancer* 89: 1896-1900, 2003.
- 44) Tanaka S, et al: O⁶-methylguanine-DNA methyltransferase gene expression in gliomas by means of real-time quantitative RT-PCR and clinical response to nitrosoureas. *Int J Cancer* 103: 67-72, 2003.
- 45) Tanaka S, et al: Preliminary individual adjuvant therapy for gliomas based on the results of molecular biological analyses for drug-resistance genes. *J Neurooncol* 46: 157-171, 2000.
- 46) 永根基雄ほか: 薬剤耐性関連遺伝子の蛋白発現量によるグリオーマの個別化化学療法の試み. ポストシークエンス時代における脳腫瘍の研究と治療(田淵和雄, 白石哲也編), p375-381, 九州大学出版, 2002.
- 47) 永根基雄ほか: 杏林大学における悪性神経膠腫の治療戦略. *Neuro-Oncology(Tokyo)* 12(2): 51-58, 2002.
- 48) Shibui S: Randomized controlled trial on malignant brain tumors—activities of the Japan Clinical Oncology Group-Brain Tumor Study Group. *Neurol Med Chir(Tokyo)* 44: 220-221, 2004.
- 49) Quinn JA, et al: Phase II trial of carmustine plus O⁶-benzylguanine for patients with nitrosourea-resistant recurrent or progressive malignant glioma. *J Clin Oncol* 20: 2277-2283, 2002.
- 50) Van Den Bent MJ: Guidelines for the treatment of oligodendroglioma: an evidence-based medicine approach. *Forum(Genova)* 13: 18-31, 2003.
- 51) Pomeroy SL, et al: Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415: 436-442, 2002.
- 52) Nutt CL, et al: Gene expression-based classification of malignant gliomas correlates better with survival than histological classification. *Cancer Res* 63: 1602-1607, 2003.
- 53) Iwade Y, et al: Molecular classification and survival prediction in human gliomas based on proteome analysis. *Cancer Res* 64: 2496-2501, 2004.
- 54) Paez JG, et al: EGFR mutations in lung cancer: correlation with clinical response to gefitinib therapy. *Science* 304: 1497-1500, 2004.
- 55) Lynch TJ, et al: Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 350: 2129-2139, 2004.
- 56) Rich JN, et al: Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 22: 133-142, 2004.

脳神経外科速報

第15巻 3 号 2005年 3 月10日発行

MC メディカ出版

脳腫瘍

Gliomaの分子生物学

永根基雄¹⁾ Motoo NAGANE

1) 杏林大学医学部脳神経外科 〒181-8611 東京都三鷹市新川6-20-2

I. はじめに

腫瘍細胞とは、発生母地の分化した正常細胞から逸脱し、無秩序な増殖を示す細胞と定義される。腫瘍細胞の発生・悪性転化には細胞の増殖、細胞死、ゲノム安定性、血管新生、浸潤、転移などさまざまな細胞機能の制御に直接・間接的にかかわっている遺伝子の異常が関与し、さらにそのような遺伝子異常が蓄積することが必要であると考えられている。

脳腫瘍、特に悪性脳腫瘍の代表的疾患である神経膠腫 (glioma) での遺伝子異常とその分子生物学的効果についてはこれまで多くの研究がなされてきており、gliomaの発生と悪性化の分子機序の解明が進められてきた。本稿では、これらの最近の知見についてレビューする。

II. Gliomaにおける遺伝子異常

1. Astrocytic gliomaにおける遺伝子異常と悪性化

Astrocytic gliomaでは多くの遺伝子異常が検出されているが、その大多数は悪性gliomaであるWHO分類のgrade III以上で認められる¹⁹⁾ (表1)。低悪性度のgrade II astrocytomaでは主にTP53遺伝子異常とplatelet-derived growth factor receptor (PDGFR)- α の高発現が認められ、その頻度は高悪性度のものでもほぼ同じであることから、これらの異常は腫瘍の発生段階

に関与している可能性が考えられている。

一方、grade III以上の悪性gliomaではRB1遺伝子座を含む染色体13番長腕 (13q) の欠失 (ヘテロ接合性の喪失: loss of heterozygosity, LOHとよばれる)、染色体9番短腕 (9p) にあるCDKN2A遺伝子 (座) の欠失、染色体7pにあるepidermal growth factor receptor (EGFR) 遺伝子増幅、染色体10q (PTEN遺伝子を含む) LOHが、grade IIIでは約10%、grade IVではその頻度がさらに高く認められ、gliomaの悪性進展 (progression) に関与する重要な遺伝子異常と考えられている。

染色体19q, 11p, 22qのLOHは30%程度の悪性gliomaに検出されるが、grade III, IV間での頻度差はみられず、またこれらの部位に存在すると考えられる責任遺伝子はいまだ同定されていない¹⁴⁾。

2. Primary (de novo) glioblastomaとsecondary glioblastoma

このような遺伝子異常はランダムにではなく一定の組み合わせをもって発生し、gliomaの悪性化パターンと緊密に関連していることが明らかになってきた。WHO grade IVの膠芽腫 (glioblastoma: GBM) は、発見段階からすでにGBMとして存在する“primary (de novo)”GBMと、先行するlow gradeのastrocytoma病変が経過とともに進行し、grade IIIからGBM

表1 Gliomaにみられる遺伝子異常 (文献¹⁹⁾ より引用)

遺伝子異常	Grade II	Grade III	Grade IV
Astrocytic tumor			
TP53遺伝子異常	～30%	～30%	～30%
PDGFR- α 高発現	80%	80%～	～70%
13q LOH (RB1異常)	まれ	～5%	20～30%
CDK4遺伝子増幅	まれ	まれ	5～10%
CDKN2A遺伝子欠失	まれ	～10%	40～60%
19q LOH	まれ	40%	～30%
EGFR遺伝子増幅	まれ	10%	40%
10q LOH	まれ	10%	75～90%
PTEN遺伝子異常	まれ		30～40%
11p LOH	まれ	30%	30%
22q LOH	～20%	30%	40%
Oligodendroglial tumor			
1p LOH	60～80%	60～80%	
19q LOH	60～80%	50～60%	

へ悪性転化した“secondary” GBMに臨床経過上大別し得る。

EGFRの遺伝子増幅は“primary (de novo)” GBMに主として検出されるのに対し、TP53の異常（あるいは17pのLOH）は“secondary” GBMに高頻度で認められ、いずれの遺伝子異常も他方のGBM経路ではほとんど認められず、互いに排他的な関係が示された^{33, 34)}。

さらに、primary GBMではEGFRの増幅・異常に加えてCDKN2A (p16/p14) の欠失、10pおよび10q LOH、PTEN異常が高頻度で認められるのに対し、secondary GBMではTP53異常のほか、PDGF/PDGFR- α の高発現に加えて悪性化とともにRB1異常、19q LOH、CDK4遺伝子増幅、10q LOHが多く認められる¹⁴⁾ (図1)。

しかしいずれの経路においても、生じている遺伝子異常の結果、後述する三つの主要な細胞内分子機構の障害・異常が惹起されていると考えられ¹²⁾、単にTP53遺伝子の異常/EGFR遺伝子異常の有無パターンだけによる分類は多分に

単純化されすぎた模式の可能性があると考えられる。

3. Oligodendroglial tumorにおける遺伝子異常

Astrocytic tumorと異なり、oligodendroglomaで最も高頻度に認められる遺伝子異常は染色体1p (1p32-36) および19q (19q13) のLOHであり、grade IIおよびgrade IIIのanaplastic oligodendroglomaにおいても概ね6～8割の腫瘍で陽性となる。また、70%以上に1p、19qのLOHが同時に認められ²⁷⁾、これらのLOHの存在はoligodendroglomaの分子マーカーとして病理診断上有用であると考えられている。

またGBMで高頻度に見られる10q LOHの出現率は低く、1p LOHがあり10q LOHがなければoligodendroglomaあるいはoligoastrocytomaである確率は90%に近い³⁰⁾。さらに重要な点は、1p LOHが陽性の腫瘍は化学療法 (PCV療法) への反応が良好で、1p LOHを認めない場合と比べ有意に高い生存率を示すことであり^{3, 13)}、

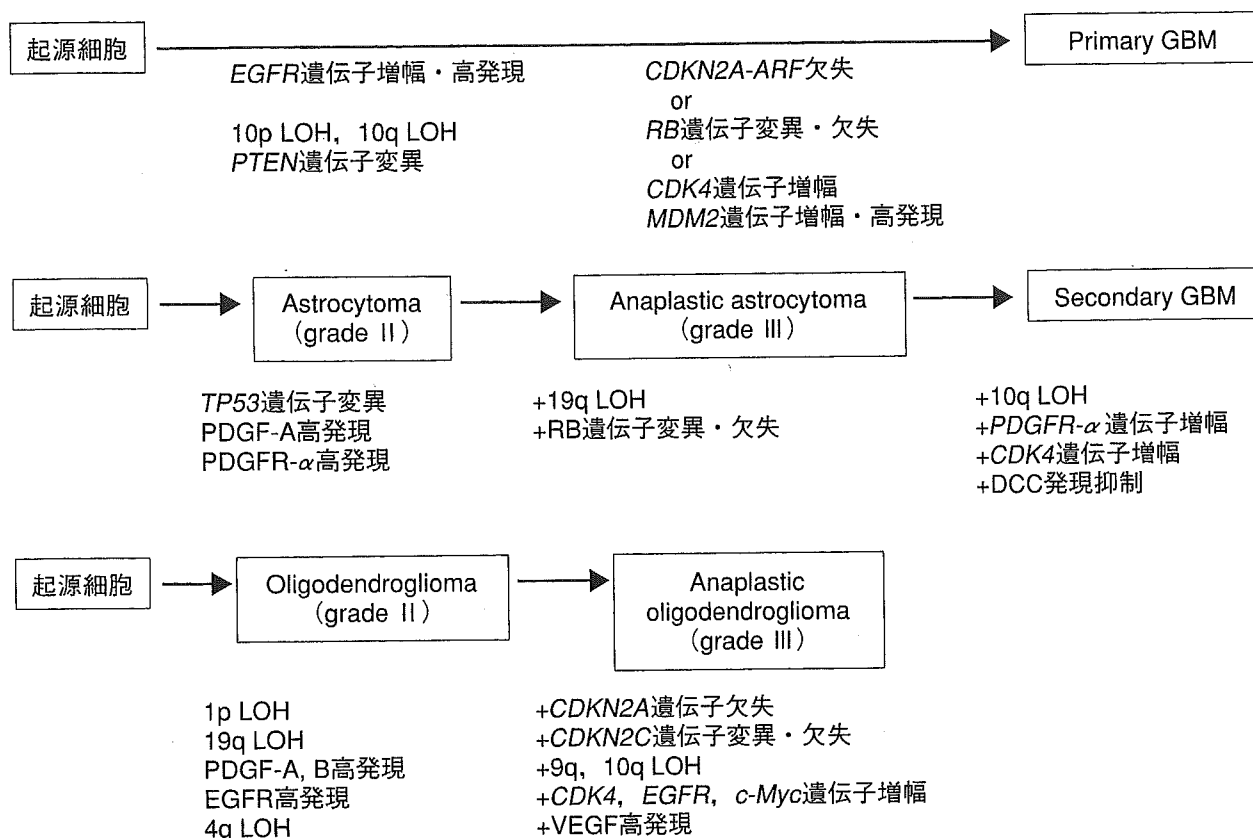


図1 神経膠腫でみられる遺伝子異常と悪性化経路 (文献¹⁴⁾より改変)

EGFR異常、p16欠失、PTEN異常がみられる膠芽腫は臨床的にprimary typeが主であるのに対し、TP53異常が認められる膠芽腫は低悪性度の腫瘍が悪性転化したsecondary typeが主と考えられている。また、oligodendrogliomaはastrocytic gliomaとは異なる遺伝子異常の経路をたどる。

遺伝子解析が臨床的に重要な意義をもつことを示したものといえる。LOHを示す1p上にあり、化学療法反応性に関与する可能性のある遺伝子はいまだ同定されておらず、今後の研究課題の一つとなっている¹⁷⁾。

そのほかの遺伝子異常としては、EGFRの高発現は約半数で、またPDGF/PDGFRの高発現がほとんどのoligodendrogliomaで認められる。TP53変異が低頻度であるものの1p LOHのない腫瘍に認められ、grade IIIではCDKN2Aの欠失、EGFR増幅、PTEN異常や血管新生因子vascular endothelial growth factor (VEGF)の高発現も生じる¹⁴⁾ (図1)。

Ⅲ. Glioma形成における主要な生物学的分子経路

前項で述べた遺伝子異常は細胞周期制御の異常(RB経路とp53経路)とtyrosine kinase (TK)型細胞膜受容体(receptor TK: RTK)からのシグナル伝達の異常に深く関与することが明らかになってきた。

1. RB経路(RB-CDK4/6-p16経路)

細胞分裂にかかわる細胞周期は正常細胞では厳密に制御されており、その破綻は無秩序な細胞増殖・腫瘍化の主要な因子となる。Gliomaではlow gradeからhigh gradeへの悪性転化に際し腫瘍細胞の示す増殖能の劇的な亢進が認められ、それに伴う遺伝子異常として染色体9p,

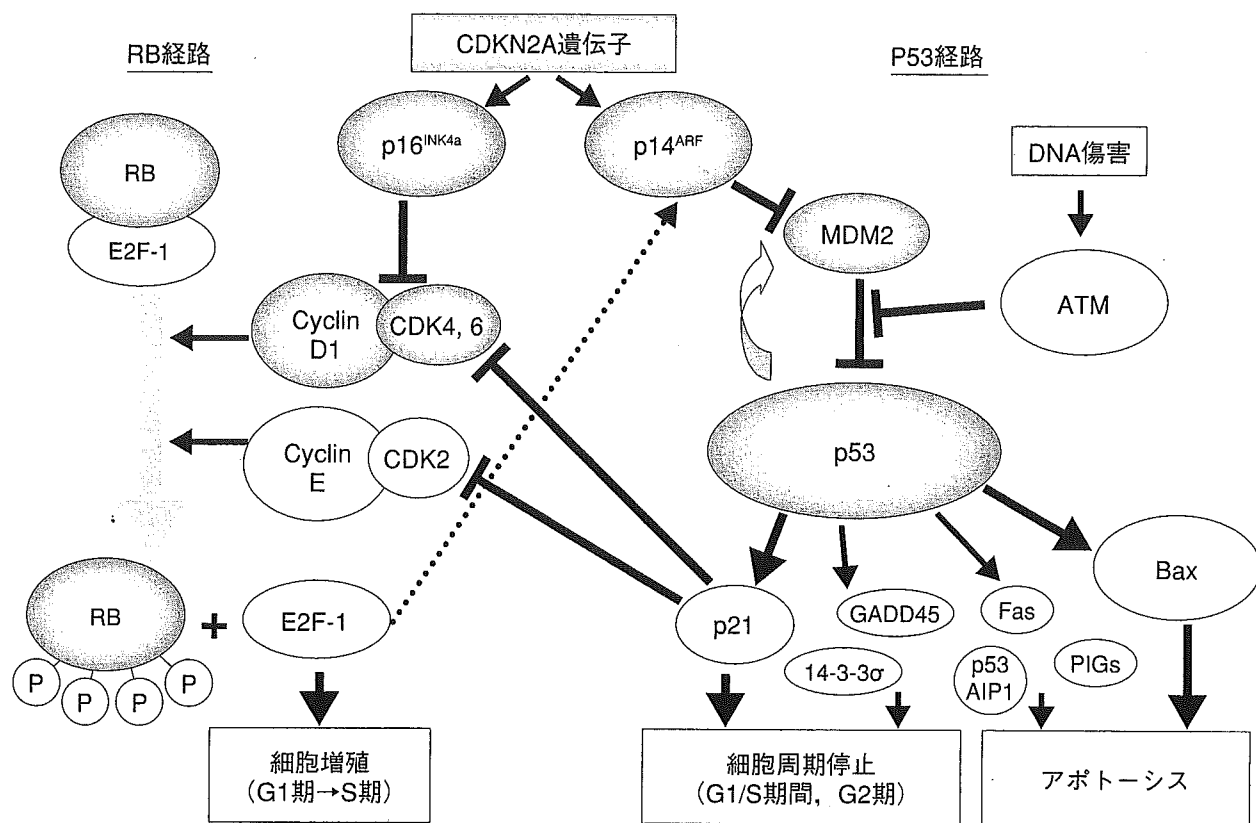


図2 Glioma形成に重要なRB経路とp53経路 (文献¹⁰⁾より改変)

RBはG1サイクリン・CDK (Cyclin-dependent kinase) 複合体により複数のリン酸化を受けることで転写因子のE2Fと解離し、E2Fによるサイクリンなどの細胞周期進行に必要な遺伝子の発現誘導を介して細胞周期回転が進行する。転写因子のp53は、CDK活性を抑制するp21などを介し細胞周期進行を抑制する。また、Baxなどアポトーシス関連遺伝子の転写などにより細胞死を誘導する。CDKN2A遺伝子はp16とp14の二つの蛋白質をコードし、RBとp53の両方の経路を直接・間接的に抑制する。影のついた分子はグリオーマで異常をきたすことが報告されている。矢印は促進、止線は抑制効果を示す。

13qの欠失および頻度はやや低いながら12qの遺伝子増幅が検出されている。染色体13q14には細胞周期の進行を制御する主因子であるRB蛋白をコードする網膜芽細胞腫の原因遺伝子 *retinoblastoma* 遺伝子 (*RB1*) が存在する。RBは細胞周期の進行、特にG1期からS期への移行に必要な蛋白の転写促進因子であるE2Fと結合し、その作用を抑制することでG1期停止を誘導し、細胞の増殖を抑制する²⁵⁾。

このRBは、cyclin D1とcyclin-dependent kinase 4 (CDK4) あるいはCDK6との複合体によりリン酸化を受ける。さらにcyclin E/CDK2複合体の作用によりRBのリン酸化が完成する

ことでE2FがRBから遊離・活性化し、G1期からS期へ細胞周期が進行する。

RB1 遺伝子の mutation は high grade glioma の25%近くに認められる。染色体12q13-14に存在する *CDK4* 遺伝子は、同じく約15%に遺伝子増幅がみられる¹⁴⁾。染色体9p21には、cyclin DとCDK4/6との結合を阻害することでRBのリン酸化を抑制するCDK inhibitor (CKI) であるp16^{CDKN2A}をコードする *CDKN2A* 遺伝子と、それに隣接するCKIのp15^{CDKN2B}をコードする *CDKN2B* 遺伝子が存在する。

p16の欠失によりCDK4/6の活性が高まり、RBの高度リン酸化が進み、S期への無秩序な

進入をすることになる。CDKN2A遺伝子はp16以外に異なるexon 1 (β) を使用する別の蛋白p14^{ARF}も同時にコードしており²²⁾、後述のようにRB経路と同時にp53経路をも制御していることになる(図2)。p16の不活化はhigh grade gliomaの60%近くに認められ、またGBMの細胞株では9割にその欠失がみられる。その多くはhomozygous deletionの型を示すが、メチル化による発現抑制のことも報告されている。

このように、細胞周期制御の中心的役割を果たすRB-CDK4/6-p16経路はgliomaで高頻度に障害されており、その頻度は悪性度によく相関し、grade IV GBMでは50~90%で認められ、primaryとsecondary GBM間の頻度差はみられない^{12, 31)}。

ただし、p16欠失の頻度は後述のEGFR遺伝子異常とともにprimary GBMに有意に高い¹⁴⁾。これらの遺伝子異常はそのどれ一つの異常でもRB経路の障害という共通した形質を惹起するため、通常個々の腫瘍においてはどれか一つの遺伝子異常のみが認められる^{12, 31)}。

2. p53経路 (p53-MDM2-p14^{ARF}経路)

固形癌で最も高頻度に異常が認められる代表的腫瘍抑制遺伝子であるTP53遺伝子の変異、およびTP53が存在する染色体17pのLOHがastrocytic gliomaではgradeにかかわらずほぼ同頻度で認められることから、転写因子であるp53の不活化はglioma形成の初期に生じる遺伝子異常と考えられている¹⁴⁾。

GliomaにおいてTP53のmutationは主に転写因子として重要なDNA結合ドメインをコードするexon 5, 7, 8でのmissense mutationであることから、p53の転写活性の障害が腫瘍化に重要と考えられる²⁾。p53は主としてその転写標的分子を介して細胞周期制御および細胞死

誘導能という細胞にとってきわめて重要な機能を発揮し、特にDNA損傷の際の細胞の運命(修復か死か)を決定する「ゲノムの守護神」と考えられている。細胞周期制御は主としてCDK活性を抑制するp21^{WAF1}遺伝子の転写促進による。p21はcyclin D1と結合するCDK4/6およびcyclin Eと結合するCDK2に作用することで、G1期からS期への細胞周期移行を抑制する。また、p53は分子シャペロンの14-3-3 σ を介してG2期でのarrestにも関与している。

一方、p53による細胞死はBax, Fasなどアポトーシス関連遺伝子の転写促進などにより誘導される(図2)。p53の活性化により細胞周期停止(その間にDNA傷害の修復が生じる)、あるいはアポトーシス(傷害細胞の除去)のどちらが誘導されるかはDNA傷害の程度や細胞の種類によりさまざまである。

p53の標的遺伝子の一つにMDM2がある。MDM2はp53に直接結合することでp53の転写活性を抑制し、かつp53のubiquitin/proteosomeによる分解を助長する作用をもつことでp53/MDM2の間にnegative feedbackの系が成り立っている。MDM2にはCDKN2A遺伝子がコードするp14^{ARF}が結合し、そのp53阻害作用を抑制することから²⁶⁾(図2)、p14^{ARF}-MDM2-p53は直接関連しながら上記のp53転写機能を制御していると考えられる。

Gliomaにおいては、TP53遺伝子異常に加えて、MDM2遺伝子増幅やCDKN2A遺伝子の欠失(p14^{ARF}の欠失を通常伴う)が認められる。Grade IIではTP53遺伝子異常のみがみられるが、grade IIIではさらにp14^{ARF}の欠失が低頻度でみられ、grade IVではp14^{ARF}欠失の頻度が高まるとともに、MDM2遺伝子増幅も検出される。したがって、astrocytic gliomaでは70%以上もの高頻度でp53経路の異常が生じているも

のと考えられる¹²⁾。TP53遺伝子異常がまれな primary GBMにおいても CDKN2A 遺伝子と MDM2 遺伝子の異常の頻度が高く¹⁵⁾、p53 経路の障害が腫瘍形成に重要な役割を果たしていることが推察される。

これら 3 種類の遺伝子異常は RB 経路の遺伝子異常と同様に同時に存在することはまれで、通常そのうちの一つの異常のみが認められる¹²⁾。

3. 増殖因子—受容体からのシグナル伝達経路 (PDGFR, EGFR および PTEN)

PDGF はグリア形成に、また EGF は神経幹細胞の増殖と生存に重要な役割を果たしている¹⁶⁾。Grade II astrocytoma での PDGF/PDGFR や GBM における EGFR の遺伝子増幅・高発現の事実は、これらの細胞膜増殖因子受容体 (RTK) からのシグナル経路が glioma 形成の主要な因子の一つであることを示している¹⁴⁾。

Glioma における増殖因子受容体経路の活性化の機序として、①増殖因子あるいはその受容体の過剰発現 (例: PDGF/PDGFR における autocrine/paracrine 刺激)、②遺伝子増幅や増殖因子との結合なしで恒常的な活性化が生じる変異型受容体の発現 (例: EGFR)、③受容体からのシグナル経路にある蛋白分子の恒常的な活性化 (例: PTEN 異常) が挙げられる。

Glioma では PDGF-A 鎖、B 鎖の発現に加え、PDGFR は oligodendroglioma を含めた腫瘍細胞で α 型が高発現がみられ、GBM では腫瘍血管で β 型受容体の過剰発現が認められる¹⁴⁾。したがって、PDGF/PDGFR 系の活性化は腫瘍細胞の増殖作用に加え、悪性化に伴う腫瘍血管新生作用により腫瘍増殖を加速するものと考えられる。また、phosphoinositol-3 kinase (PI3K) や PLC- γ を介した浸潤能亢進作用も示唆されている⁷⁾。

EGFR 遺伝子増幅・過剰発現は GBM の半数

以上に認められる一方、低悪性度の grade II, III ではまれで¹⁴⁾、ほとんどが primary GBM に生じ³⁴⁾、GBM 形成に重要な遺伝子異常と考えられる。EGFR 遺伝子増幅がみられる腫瘍の約半数で EGFR 遺伝子の再配列が生じており、受容体の一部に欠失のある変異型受容体がつくられている。最も多いのは細胞外ドメインの EGF 結合部位に欠失が生じる変異 (Δ EGFR あるいは EGFRvIII とよばれる) で、リガンドに無関係に恒常的な受容体の活性化が起こり、細胞内に持続的なシグナルを送り続ける²¹⁾。

この Δ EGFR を高発現したグリオーマ細胞はヌードマウスの皮下および脳内に移植されると急速に腫瘍を形成し²¹⁾、その腫瘍では細胞増殖の亢進と細胞死の抑制が認められた。また、抗癌剤への耐性や脳内への浸潤能の増強などさまざまな悪性徴候が示され、 Δ EGFR 発現のもつ生物学的意義が明らかにされてきている²⁰⁾。

PDGFR や EGFR などの RTK からのシグナル伝達は、Ras/Raf/MAPK (ERK) 系、PI3K/PTEN/Akt 系、STAT 系など多数の経路を辿りながら最終的には目的となる遺伝子の転写発現を促進し (cyclin D1 もその一つ)、結果として細胞自体の増殖や生存力を高めるのみならず、細胞外環境との相互作用を介して浸潤や腫瘍血管新生に作用している可能性が考えられている。

GBM に高頻度で欠失が認められる染色体 10q23 に局在する腫瘍抑制遺伝子 PTEN/MMAC1 の産物は²⁹⁾、phosphatase (脱リン酸化酵素) としての機能をもち、細胞増殖と生存に関与し PI3K により活性化される Akt/PKB 経路を阻害する²⁸⁾。したがって PTEN の欠失により間接的に Akt 経路の活性化が生じることになる。Akt 遺伝子と同様に Ras 遺伝子の変異は glioma ではまれであるが、RTK の活性化により adaptor 分

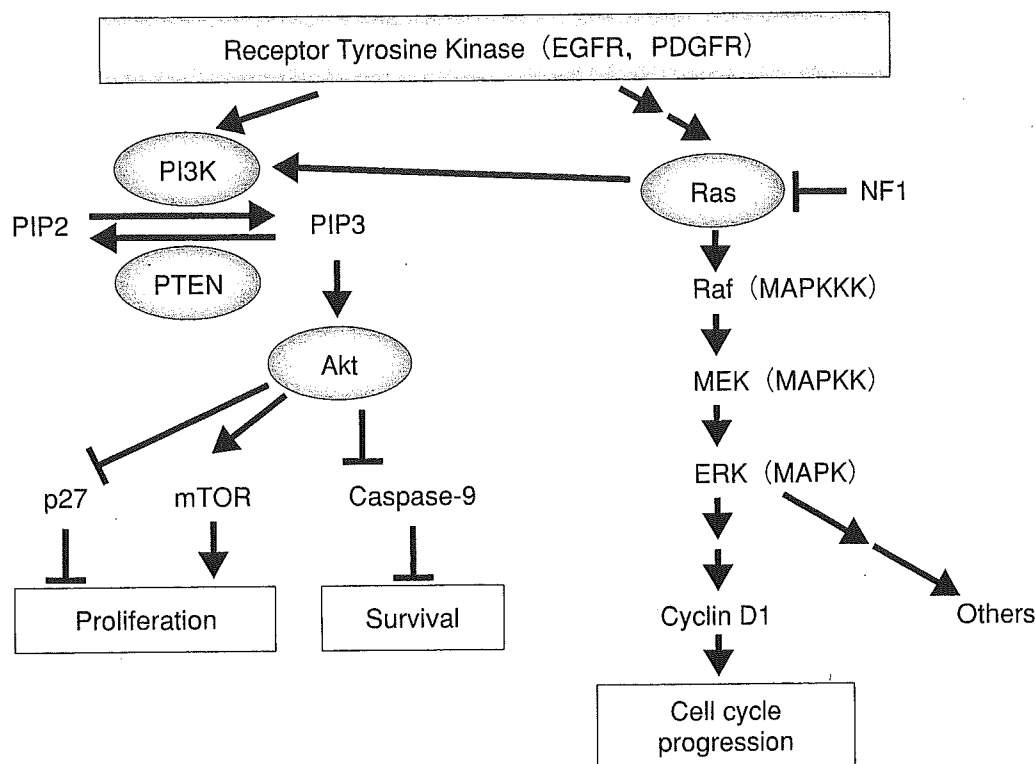


図3 増殖因子受容体からのシグナル経路

受容体tyrosine kinase (RTK) は直接PI3Kを活性化するが、Rasの活性化には細胞内アダプター蛋白の介在が必要である。PI3KからのシグナルはAktを活性化し、その結果細胞増殖を刺激するとともに細胞死にかかわる蛋白機能を抑制する。PTENはPI3KからのAkt活性化を抑制する。Rasの活性化は最終的にMAPK (ERK1, 2) の活性化と核内移行を誘導し、細胞増殖にかかわる蛋白の転写亢進を促す。

子Grb2, SOSを介するRas経路が高頻度で活性化し、その下流のRaf, MAPK (ERK) の活性化が生じている (図3)。

IV. Glioma形成のマウスモデル

この数年来、transgenicやknockoutなどマウス胚細胞における遺伝子操作技術の発展により、脳実質のみあるいは神経幹細胞 (neural stem cell: NSC)、グリア前駆細胞にのみ選択的に遺伝子の異常をもつマウスモデルが作製され、ヒトgliomaにみられる遺伝子異常のマウスへの導入によるglioma形成誘導が検証されつつある^{8, 10)} (表2)。このようなモデルシステムにより、前項に述べた分子生物学的経路の異常が組み合わさることで、さまざまなgliomaが形成されること、マウスの脳に備わるNSC

やastrocyteが腫瘍細胞の起源となることが明らかとなってきた。

1. Astrocytomaモデル

GFAP陽性のグリア前駆細胞にシグナル伝達経路を活性化する恒常的活性Ras (V12Ha-Ras) を導入したマウスでは高率にgrade II, III astrocytomaの形成がみられた⁵⁾。また、tyrosine kinaseのoncogene, v-srcをGFAP陽性astrocyteに発現することでも低率ながら各悪性度のastrocytic tumorの発生が報告された³⁶⁾。さらに、細胞周期を標的にRB family蛋白 (pRB, p107, p130) に結合してその機能を阻害する変異型SV40 T抗原 (T₁₂₁) を発生後期に発現することでgrade III astrocytomaが形成されている³⁷⁾。

最近、grade II astrocytomaで検出されるTP53遺伝子変異とPDGF-B鎖高発現をマウス

表2 脳腫瘍発生動物モデル

病理組織型	変異遺伝子	起源細胞	プロモーター	文献
Astrocytomas	<i>Src</i>	Astrocytes	GFAP	36)
Astrocytomas	<i>Ras</i>	Astrocytes	GFAP	5)
High-grade gliomas	<i>EGFR, Ink4/ARF</i>	Astrocytes	GFAP	1)
High-grade gliomas	<i>EGFR, Ink4/ARF</i>	NSC	Nestin	1)
High grade astrocytomas	<i>RB1, Pten</i>	Astrocytes	GFAP	37)
GBM	<i>NF1, TP53</i>	Astrocytes	GFAP	23)
GBM	<i>Ras, Akt</i>	NSC	Nestin	11, 32)
GBM	<i>Ras, Akt</i>	Astrocytes	GFAP	32)
Oligodendrogliomas, oligoastrocytomas	<i>PDGF-B</i>	Astrocytes	GFAP	4)
Oligodendrogliomas, oligoastrocytomas	<i>PDGF-B</i>	NSC	Nestin	4)
Oligodendrogliomas, oligoastrocytomas	<i>Ras, EGFR</i>	Astrocytes	GFAP	6)
Grade II, III oligodendrogliomas	<i>EGFR, EGFR+Ink4/ARF</i>	Oligodendrocytes	S100	35)
Grade II, III oligodendrogliomas	<i>EGFR, EGFR+Ink4/ARF</i>	Astrocytes	S100	35)

GFAP: glial fibrillary acidic protein, EGFR: epidermal growth factor receptor, NSC: neural stem cells, PDGF-B: platelet derived growth factor-B

に導入することによりより早期にまた高頻度に glioma が形成される (むしろ GBM に近い腫瘍型ではあるが) ことが報告され, この二つの遺伝子異常の glioma 形成における協調効果が初めて示唆された⁹⁾.

2. Oligodendroglioma モデル

Oligodendroglioma では高頻度で PDGF-A, -B および PDGFR- α , - β を共発現しており, また EGFR の高発現が約半数の grade II, III 腫瘍で認められることから, これらの遺伝子導入による glioma 形成の可能性が検証されてきた.

PDGF-B 遺伝子を NSC に導入すると, 約 60% に grade II oligodendroglioma が発生し, GFAP 陽性 astrocyte に導入すると, 加えて mixed oligoastrocytoma の発生が認められた. さらに, *Ink4a (=CDKN2A)-Arf null* のマウスを交差すると, より悪性化した grade III oligodendroglioma が形成された⁴⁾.

EGFR に関しては, その活性型のホモログであり oncogene である *v-erbB* を S-100 β プロモーターを用いて前駆細胞に発現すると, やはり

oligodendroglioma の発生が観察されている³⁵⁾. また EGFRvIII を GFAP 陽性 astrocyte に発現させても腫瘍を形成しないが, 上記の Ras-transgenic mice と交差すると腫瘍形成促進効果と oligodendroglioma に近い病理像が観察された⁶⁾.

3. GBM モデル

Nestin 発現 NSC に恒常的活性化 K-Ras と Akt を共発現させることで組織学的に明瞭な GBM の形成が認められた¹¹⁾. これらの単独のみ, あるいは GFAP 発現 astrocyte では GBM は発生せず, RTK からのシグナル伝達経路と PI3K-PTEN-Akt 経路の同時活性化が, ヒト GBM で高率で認められるのと同様, マウス GBM 発生に重要な因子であることが示唆された.

腫瘍抑制因子の *TP53* 欠失と *NF1* 欠失による GBM 形成の事実は²³⁾, *NF1* の産物 neurofibromin が Ras の活性化を抑制する機能をもつことから, Ras 経路の活性化の意義を示すものといえよう. また, *Ink4a-Arf* 欠失と, K-Ras あるいは EGFR の発現により NSC および GFAP 陽性 astrocyte の双方とも GBM 形成を認めたことか

ら^{1, 32)}, p16/ARF lossは悪性glioma形成の促進因子と考えられる。

V. 治療への応用

Glioma形成に重要な分子経路が明らかとなるに伴い、そのなかで特に重要な機能を発揮する中心的分子がいまだ難治性GBMへの治療の新規標的になる可能性が期待される。受容体TKを標的とする小分子化合物による分子標的治療がその一つで、EGFR阻害剤のgefitinib (Iressa) やerlotinib (Tarceva), PDGFRやc-Kitを阻害するimatinib (Gleevec) などが臨床試験にて検討されている²⁴⁾。またPI3K/Akt経路の下流にあるmTORを標的としたCCI-779や、Ras/Raf/MAPK経路を標的とするR115777, さらには血管新生増殖因子のVEGF阻害剤も臨床試験が行われている⁸⁾。細胞周期関連分子を標的とする阻害剤も多数開発されており、今後これら分子標的阻害剤の悪性gliomaに対する有効性の検証が待たれる。

究極的には、複数のglioma形成分子経路の阻害剤や既存の化学療法剤などの併用療法が悪性gliomaの克服に必要なものと考えられ、可能性の高い治療法の選択に上述のマウスglioma発生モデルが前臨床試験への応用として期待される。

VI. おわりに

Gliomaにおける遺伝子異常とglioma形成に関与する分子生物学的経路につき、最近の知見を概説した。Comparative genomic hybridization (CGH) array, microarrayによる遺伝子profilingやproteome解析など、近年のバイオテクノロジーの発展に伴いgliomaにおいても多数の新規遺伝子異常の検出や遺伝子cluster分類による分子病理診断の有用性が提唱されてきてお

り、gliomaの分子病態解明は飛躍的に進歩してきたといえる。しかしながら、GBMは現在の集学的治療によっても依然難治であり、このような情報を基にしたトランスレーショナル・リサーチが結実することが期待される。

文 献

- 1) Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL, et al: Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 1: 269-277, 2002
- 2) Bogler O, Huang HJ, Kleihues P, et al: The p53 gene and its role in human brain tumors. *Glia* 15: 308-327, 1995
- 3) Cairncross JG, Ueki K, Zlatescu MC, et al: Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *J Natl Cancer Inst* 90: 1473-1479, 1998
- 4) Dai C, Celestino JC, Okada Y, et al: PDGF autocrine stimulation dedifferentiates cultured astrocytes and induces oligodendrogliomas and oligoastrocytomas from neural progenitors and astrocytes in vivo. *Genes Dev* 15: 1913-1925, 2001
- 5) Ding H, Roncari L, Shannon P, et al: Astrocyte-specific expression of activated p21-ras results in malignant astrocytoma formation in a transgenic mouse model of human gliomas. *Cancer Res* 61: 3826-3836, 2001
- 6) Ding H, Shannon P, Lau N, et al: Oligodendrogliomas result from the expression of an activated mutant epidermal growth factor receptor in a RAS transgenic mouse astrocytoma model. *Cancer Res* 63: 1106-1113, 2003
- 7) Heldin CH: Protein tyrosine kinase receptors. *Cancer Surv* 27: 7-24, 1996
- 8) Hesselager G, Holland EC: Using mice to decipher the molecular genetics of brain tumors. *Neurosurgery* 53: 685-694, 2003
- 9) Hesselager G, Uhrbom L, Westermarck B, et al: Complementary effects of platelet-derived growth factor autocrine stimulation and p53 or Ink4a-Arf deletion in a mouse glioma model. *Cancer Res* 63: 4305-4309, 2003
- 10) Holland EC: Gliomagenesis: genetic alterations and mouse models. *Nat Rev Genet* 2: 120-129, 2001
- 11) Holland EC, Celestino J, Dai C, et al: Combined activation of Ras and Akt in neural progenitors induces glioblastoma formation in mice. *Nat Genet* 25: 55-57,

- 2000
- 12) Ichimura K, Bolin MB, Goike HM, et al: Deregulation of the p14ARF/MDM2/p53 pathway is a prerequisite for human astrocytic gliomas with G1-S transition control gene abnormalities. *Cancer Res* 60: 417-424, 2000
 - 13) Ino Y, Betensky RA, Zlatescu MC, et al: Molecular subtypes of anaplastic oligodendroglioma: implications for patient management at diagnosis. *Clin Cancer Res* 7: 839-845, 2001
 - 14) Kleihues P, Cavenee WK (eds): Pathology and genetics of tumors of the nervous system. IARC press, Lyon, 2000, pp 9-69
 - 15) Kleihues P, Ohgaki H: Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro-oncol* 1: 44-51, 1999
 - 16) Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM, et al: Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15: 1311-1333, 2001
 - 17) Mukasa A, Ueki K, Matsumoto S, et al: Distinction in gene expression profiles of oligodendrogliomas with and without allelic loss of 1p. *Oncogene* 21: 3961-3968, 2002
 - 18) 永根基雄: 脳腫瘍関連遺伝子異常. *Clinical Neuroscience* 21: 518-519, 2003
 - 19) 永根基雄: 脳腫瘍の分子生物学, pp 64-89 (山浦晶: 脳腫瘍 I, 脳神経外科学大系 6, 中山書店, 東京, 2004)
 - 20) Nagane M, Lin H, Cavenee WK, et al: Aberrant receptor signaling in human malignant gliomas: mechanisms and therapeutic implications. *Cancer Lett* 162 Suppl: S17-S21, 2001
 - 21) Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, et al: A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 7727-7731, 1994
 - 22) Quelle DE, Zindy F, Ashmun RA, et al: Alternative reading frames of the INK4a tumor suppressor gene encode two unrelated proteins capable of inducing cell cycle arrest. *Cell* 83: 993-1000, 1995
 - 23) Reilly KM, Loisel DA, Bronson RT, et al: Nf1, Trp53 mutant mice develop glioblastoma with evidence of strain-specific effects. *Nat Genet* 26: 109-113, 2000
 - 24) Rich JN, Reardon DA, Peery T, et al: Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *J Clin Oncol* 22: 133-142, 2004
 - 25) Sherr CJ: Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996
 - 26) Sherr CJ: Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 12: 2984-2991, 1998
 - 27) Smith JS, Perry A, Borell TJ, et al: Alterations of chromosome arms 1p and 19q as predictors of survival in oligodendrogliomas, astrocytomas, and mixed oligoastrocytomas. *J Clin Oncol* 18: 636-645, 2000
 - 28) Stambolic V, Suzuki A, de la Pompa JL, et al: Negative regulation of PKB/Akt-dependent cell survival by the tumor suppressor PTEN. *Cell* 95: 29-39, 1998
 - 29) Steck PA, Pershouse MA, Jasser SA, et al: Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers. *Nat Genet* 15: 356-362, 1997
 - 30) Ueki K, Nishikawa R, Nakazato Y, et al: Correlation of histology and molecular genetic analysis of 1p, 19q, 10q, TP53, EGFR, CDK4, and CDKN2A in 91 astrocytic and oligodendroglial tumors. *Clin Cancer Res* 8: 196-201, 2002
 - 31) Ueki K, Ono Y, Henson JW, et al: CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56: 150-153, 1996
 - 32) Uhrbom L, Dai C, Celestino JC, et al: Ink4a-Arf loss cooperates with KRas activation in astrocytes and neural progenitors to generate glioblastomas of various morphologies depending on activated Akt. *Cancer Res* 62: 5551-5558, 2002
 - 33) 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
 - 34) 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, 1996
 - 35) Weiss WA, Burns MJ, Hackett C, et al: Genetic determinants of malignancy in a mouse model for oligodendroglioma. *Cancer Res* 63: 1589-1595, 2003
 - 36) Weissenberger J, Steinbach JP, Malin G, et al: Development and malignant progression of astrocytomas in GFAP-v-src transgenic mice. *Oncogene* 14: 2005-2013, 1997
 - 37) Xiao A, Wu H, Pandolfi PP, et al: Astrocyte inactivation of the pRb pathway predisposes mice to malignant astrocytoma development that is accelerated by PTEN mutation. *Cancer Cell* 1: 157-168, 2002

頭蓋内 peripheral type-primitive neuroectodermal tumor (pPNET) に対する放射線化学療法の経験

杏林大学医学部 脳神経外科¹⁾、同病理学²⁾、公立阿伎留病院 脳神経外科³⁾

田中 雅樹¹⁾、永根 基雄¹⁾、大西 晶子¹⁾、中村 正直¹⁾、
永山 和樹¹⁾、背山 英徳³⁾、伊藤 宣行³⁾、藤岡 保範²⁾、塩川 芳昭¹⁾

【はじめに】

未分化な神経原性と考えられる small round cell となる peripheral type-primitive neuroectodermal tumor (pPNET) は比較的稀な疾患であり、現在は骨軟部腫瘍である Ewing's sarcoma (ES) と同一範疇の疾患とみなされ、WHO 分類では ES/PNET group として包括されている。今回我々は、頭蓋内硬膜に発生した pPNET と考えられる頭蓋内腫瘍に対し放射線治療に加え、軟部肉腫に使用される化学療法を施行した一例を経験したので報告する。

【症 例】

症 例：60才、女性。

主 訴：複視、頭痛。

既往歴：特記事項なし。

現病歴：2003年12月1日、眼精疲労自覚、12月18日近医脳神経外科を受診し、左下方視時の複視を認めた。頭部CT上、トルコ鞍から鞍上部にかけて腫瘍影を認め、水頭症を呈していた。2004年1月4日、歩行不能となり近医脳神経外科へ緊急入院した。入院時は意識清明で、軽度頭痛、左下方視にて複視を訴え、明らかな片麻痺は認めないが、歩行障害を認めた。1月7日、水頭症の増悪により意識障害が進行し、緊急脳室ドレナージ術が施行され、1月28日に開頭腫瘍部分摘出術が施行された。2月10日、後療法目的に当院当

科転院となった。

当科入院時現症：意識レベルI-1、両耳側半盲を認めたが、明らかな片麻痺は認めなかった。水頭症に対し腰椎ドレナージが挿入中であり、髄液ドレナージ依存状態であった。

神経放射線学的所見：発症時の頭部CTではトルコ鞍から鞍上部にかけてと、左小脳テント切痕に境界鮮明、辺縁不整で、ほぼ均一に造影増強される腫瘍影を認め、水頭症も認めた (Fig.1)。頭部MRIでも同部位に Gadolinium 造影 T1 強調画像にてほぼ均一に造影増強される腫瘍影を認め、主腫瘍はトルコ鞍内、鞍背後部へも進展し、鞍上部は前頭葉下面に陥入する形で存在した (Fig.1)。

病理組織学的所見：Hematoxylin/eosin (H/E) 染色にて、腫瘍細胞は細胞質に乏しく、hyperchromatic な部分を持ち、比較的淡明で核小体の目立つ卵円形を示す核をもつ細胞が多く、特異的な構造は目立たなかった。一部に collagen 繊維が豊富な部分が有り、rhabdoid な細胞は認めず、mitosis を認めた。MIB1 SI は部位によっては 50% 以上認め、GFAP, S-100, cytokeratin (AE1/AE3 & CAM5.2), CD34, synaptophysin, LCA, CD68 は全て陰性であった。一部の腫瘍細胞では myoglobin, NSE が陽性であり、vimentin 染色、PAS 染色も陽性であった。MIC2 (CD99) は陽性であり、WT1 は強陽性を示した (Fig.2)。

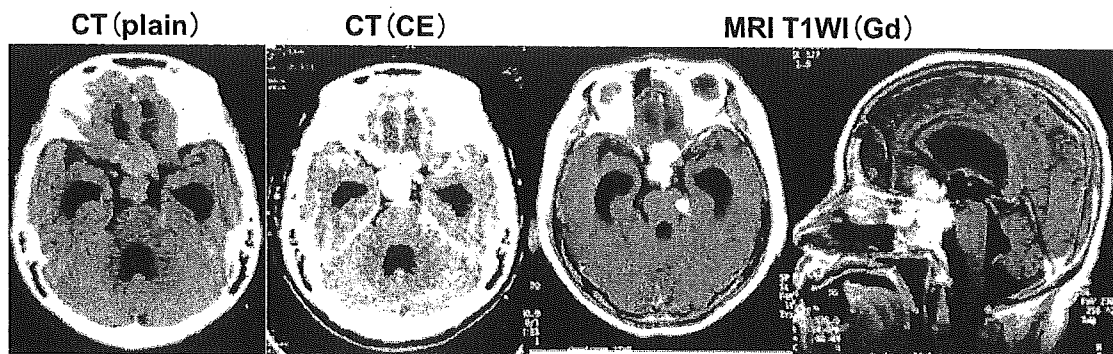
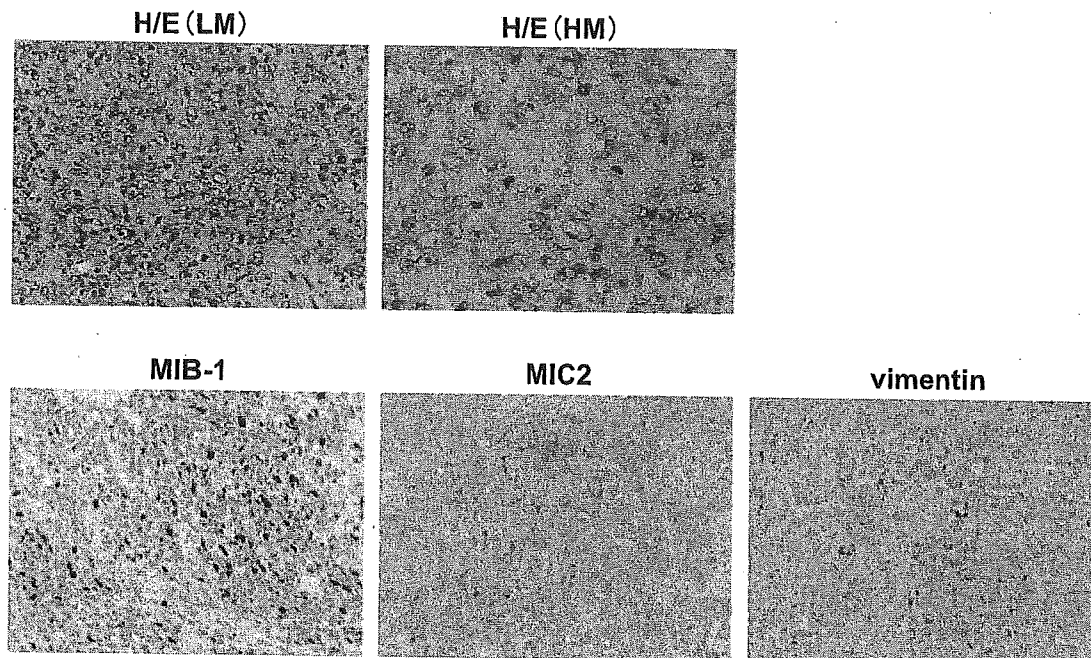


Fig.1

Preoperative neuroradiological findings showing heterogeneously enhanced solid tumors located at the sellar~parasellar region extending upward to the base of the frontal lobes, and at the free edge of the right tentorium.

**Fig.2**

Microphotographs of the resected tumor. The tumor cells comprised of mostly “blue cells” with round nuclei carrying prominent nucleoli. No specific microstructures were evident. MIB-1 staining index exceeded more than 50% at the highly proliferative areas. The tumor cells were positive for both MIC2/CD99 and vimentin...

入院後経過：頭蓋底硬膜付近より発生した高い増殖能を持つsmall round cell tumorであり、MIC2 (CD99) 陽性腫瘍である事、vimentin染色、PAS染色、NSE陽性であり、GFAPを含めたその他のマーカーが陰性であることからpPNETと診断し、2004年2月18日より鞍上部、小脳テント病変に対し、局所放射線療法(60Gy)を施行した。放射線照射後、照射部位病変の消失を認めたが、照射野外の左頭頂葉部硬膜下に髄膜播種性小病変が出現した。合併する水頭症に対しては2月25日L-Pshunt術施行し、自立生活が可能となった。化学療法は軟部肉腫に使用されているprotocolのひとつであり、軟部肉腫に対するkey drugであるdoxorubicinとifosfamideを含むMAID療法{mesna(2000mg/m² x 4) + Dox(20mg/m² x 3) + IFO(2000mg/m² x 3) + DTIC(300mg/m² x 3)}¹⁾をG-CSFの予防的投与を併用し施行した。投与量は60歳という年齢を考慮して50%減量とした。5月18日より1コース目を施行し、9月8日より2コース目を施行した。副作用としてはgrade3の好中球減少、grade1貧血、grade2肝機能障害が認められたが、特殊な治療は要さなかった。左頭頂葉部の硬膜下髄膜播種性病変は消失し、初発部位のトルコ鞍近傍および小脳テント切痕部の腫瘍もほぼ消失した。しかし、新たに腰椎(L2~3)硬膜内に播種性病巣が出現し、同部に対し9月21日より局所放射線療法(46Gy)を施行した。腰椎部病変は軽度縮小し、以後現在まで再増大を認めていない。新規播種病巣は認めたものの、

明らかな治療反応性が認められた病巣があったため、10月20日よりMAID療法(50%減量)3コース目、12月1日よりMAID療法(40%投与量)4コース目を施行した。副作用としては、grade3の好中球減少、grade1血小板減少、grade1貧血、grade3肝機能障害が認められた。4コース終了後、左小脳、大脳鎌に播種性病変が出現したため、12月22日に両病変に対しLINACによるstereotactic radiosurgery(SRS)を辺縁線量25Gyで施行し、両病変とも消失(CR)した(Fig.3)。しかし、2005年1月には左sylvius裂内に新たに播種性病変が出現し、増大傾向が明らかため、second lineの化学療法としてEwing sarcomaに対するVAIA療法{VCR(1.5mg/m² x 4) + Dox(30mg/m² x 4) + IFO(3000mg/m² x 6) + ActD(0.5mg/m² x 3)}²⁾を改変したmodified VAI療法{VCR(1.5mg/m² x 3) + Dox(30mg/m² x 2) + IFO(3000mg/m² x 2)}を2005年3月10日より施行した。副作用として約1週間遷延するgrade4の好中球減少及びgrade2の血小板減少を認め、積極的支持療法を要したが、画像上病巣は軽度の縮小を認めたに過ぎず、治療反応性は良好ではなかった。modified VAI療法施行中水頭症の増悪認めたが、治療後のADLの改善に伴い自然軽快した。自宅退院後、左sylvius裂の残存病巣が急速に増大したため、既照射範囲内ではあったが、6月7日にLINAC SRS(18Gy)を施行し、同病巣は著明に縮小、現在も入院加療中である。

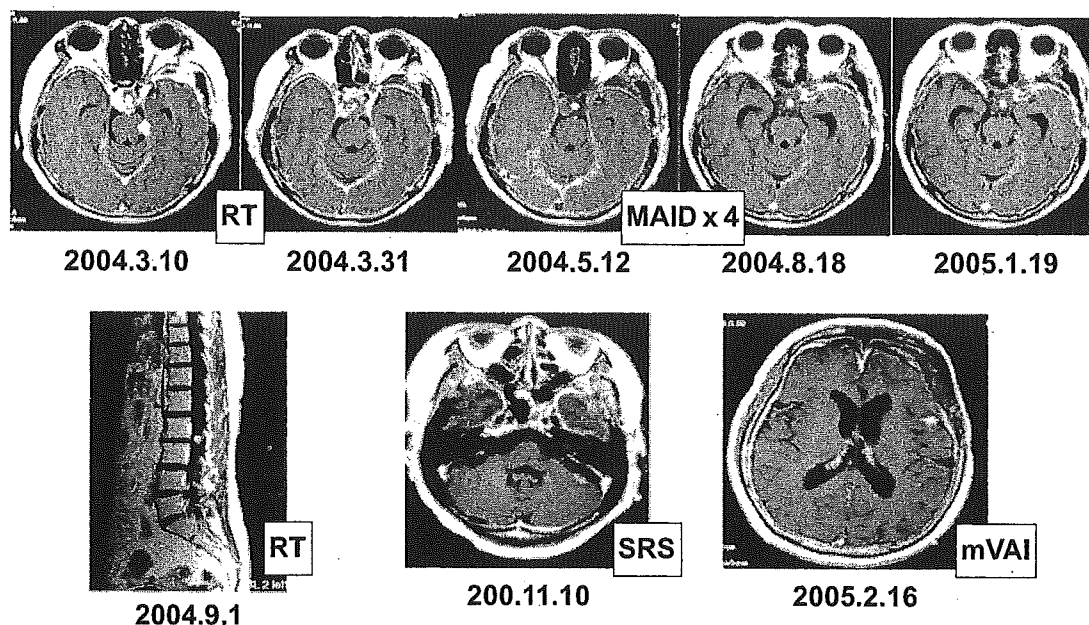


Fig.3

Serial postoperative MR images and the applied adjuvant therapies.

【考 察】

Supratentorial PNETはHart&Earleが小児の大脳半球に発生する未分化な神経外胚葉性細胞からなる腫瘍として提唱したが³⁾、近年中枢神経系から発生した腫瘍(central nervous system PNET; cPNET)と末梢神経や軟部組織から発生する末梢性PNET(pPNET)とに分類する概念が提唱されていた⁴⁾。pPNETは軟部組織に発生するESと同一範疇のsmall round cell tumor群を形成し、臨床病理学的に近縁疾患とされ、新WHO分類(2002)でもES/pPNET groupとして包括されている。pPNETは、比較的男子に多く、若年者に好発し、30歳以上では稀である。長幹骨骨幹端に好発し、頭蓋原発は稀とされている。病理所見としては、中型類円形の核を持ち、核細胞比が高く、H/E染色にてhematoxylinに良く染まり、肉眼的には青く見えることから組織全体としていわゆるblue cell tumorの像を呈する。PAS染色が陽性であることやHomer-Wright rosettesが認められることもある。免疫組織化学的にはvimentin陽性やNSEが陽性となることが多いが、synaptophysinやchromogranin Aは陰性である。特徴的な所見は、MIC2抗原(CD99)が97%で腫瘍細胞膜に陽性となることで、画像所見や病理組織像が類似する他の頭蓋内腫瘍で鑑別が通常困難なcPNET, medulloblastoma, pineoblastoma, neuroblastomaではMIC2は陰性となることから鑑別診断に有用とされている^{5,6)}。ES/pPNET腫瘍のほとんどで染色体転座(t(11;22)(q24;q12))を伴うキメラ遺伝子EWS/FLI1をはじめとする特異的fusion geneの存在が明らかとされ、その証明が確定診断上重要とされている(WHO 2002)。

鑑別診断としては、その他のblue tumorである、lymphoma, embryonal/alveolar rhabdomyosarcoma, undifferentiated small round cell sarcoma, neuroblastoma, Wilms' tumor, desmoplastic small cell tumor, small cell osteosarcoma, mesenchymal chondrosarcomaや、その他のMIC2/CD99陽性腫瘍であるIslet cell/carcinoid tumors, thymoma/thymic carcinoma, ependymoma, glioblastoma, leiomyosarcoma, fibrosarcoma, malignant peripheral nerve sheath tumor, synovial sarcoma, malignant fibrous histiocytomaなどが挙げられている。今回の症例では、確定診断上重要なEWS-FLI1キメラ遺伝子の証明は腫瘍検体量が不十分なため検索できなかったが、免疫組織化学所見にてNSE陽性、vimentin陽性、PAS染色陽性で、リンパ球系や上皮系マーカーは陰性であった上に、MIC2/CD99が陽性となった頭蓋底硬膜付近から発生したblue cell tumorであり、頭蓋内に発生しうる上記鑑別診断が必要な腫瘍に該当するものが無いことから、pPNETと診断された。

cPNETは予後が極めて不良であり、集学的治療が行われても生存期間が1年に満たないことが多いとされている⁷⁾。一方、頭蓋外に発生するES/pPNETでは、転移なしの症例で5年生存率が65%、転移のある症例では35%、予後因子としてstage分類、腫瘍局在、大きさが挙げられており、診断時に転移があり、骨盤に発生し、大きい腫瘍が予後不良因子であり⁸⁾、type 1のEWS/FLI1キメラ遺伝子(EWSのexon 7とFLI1のexon 6のfusion)の存在は他のタイプのfusion geneと比べ予後良好とされている⁹⁾。しかし、頭蓋内に発生す

るpPNETはまとまった報告のない比較的稀な疾患であり¹⁰⁻¹⁵⁾、一般に中枢神経系腫瘍が他臓器腫瘍に比べ治療が困難であることを考慮すると、予後不良の可能性もある。

ES/pPNETは易転移性の腫瘍であり、手術の他に強力な全身化学療法が施行される。また放射線治療は切除が不能あるいは部分切除の場合や局所に進展する悪性の場合に主として行われている¹⁶⁾。化学療法としては、VACA (VCR+Dox+CPA+ActD)、VAC (VCR+ActD+CPA)、IFO単独、MAID (mesna+Dox+IFO+DTIC)や、予後不良群に対しては更にAI (Dox+IFO)、VAIA (VCR+Dox+CPA+ActD)、VDC-IE (VCR+Dox+CPA/IFO+ETO)の併用療法が使用されている。頭蓋内PNETに対しては標準的治療法が確立しておらず、大脳半球性cPNETでは、近縁疾患であるmedulloblastomaに対する治療法に準じた治療法、即ち手術による摘出後、全脳・全脊髄照射に化学療法の併用が試みられているが、頭蓋内pPNETへも同様の治療が施行された報告が散見される。宇都宮らは前頭蓋底硬膜から発生したpPNETの小児例に対し開頭術による摘出後、全脳全脊髄照射とICE (IFO+CDDP+Eto)療法を併用し、2年間再発を認めていないと報告している¹⁵⁾。

今回の症例では発症時より多発性病変であり、また頭蓋底硬膜に浸潤性に発育していたことから手術による根治的治療を得ることは極めて困難であり、補助療法として放射線・化学療法を施行した。放射線治療としては、60歳という年齢を考慮して全脳全脊髄照射は行わず、トルコ鞍近傍からテント切痕部の播種性病巣を含むやや広範な局所照射を施行した。照射野内の病巣はいずれも良好な反応を示し、ほぼCRの状態が得られた。しかしESでは遠隔転移の頻度も高く、予後不良因子となっているため、化学療法による全身治療の必要性が高いと考えられ、ESを含めた軟部肉腫に対するプロトコルの一つであるMAID療法を施行した¹⁾。これらの併用化学療法は通常若年者のES症例に施行されることが多く、本症例ではやはり高齢であることから投与量を半量に減量し、投与直後からG-CSFの予防投与を施行した。局所放射線治療の照射野外の左頭頂部に出現した播種性病巣はMAID療法のみによりCRとなったが、腰髄部、小脳、大脳鎌に次々と新規播種性病巣が出現し、再発・播種予防効果は不十分であったと考えられる。これらの新規病巣に対しては腰髄部は局所分割照射を、その他の部位にはSRSを施行し、いずれもPR~CRと治療反応がみられた。更にその後出現した左sylvius裂内病巣には、ESに対するCESS86臨床試験で使用されたVAIA療法を改変したmodified VAI療法を50%投与量で施行したが、著明な骨髄抑制が認められたにもかかわらず、十分な腫瘍縮小効果は得られなかった²⁾。即ち、本症例では、放射線治療は明らか

に局所制御効果を認めたが、照射野以外の播種予防効果はみられず、化学療法は一応の治療効果も認めるものの、期待される予防効果は不良であった。その原因として、年齢による減量と、治療間隔が本来の設定である3週間ではなく1ヶ月半から3ヵ月以上とdose intensityがかなり低い治療となったことが考えられる。しかし、減量・G-CSFの予防的投与にもかかわらずgrade3以上の高度の骨髄抑制を伴ったことから、投与量の増量や期間短縮はADLの維持や安全性の観点から施行困難と判断された。また、水頭症コントロールという他の要因が関与した事も治療に影響を与えたと考える。Retrospectiveに検討すると、腫瘍の良好な制御を得るためには、やはり術後の全脳全脊髄照射と可及的範囲での化学療法が必要であった可能性が考えられた。

【まとめ】

傍トルコ鞍部、テント切痕部に初発した頭蓋内pPNETが疑われた高齢の一例を経験した。補助療法として放射線局所照射に加え、ESを含む軟部肉腫に対する併用化学療法を施行した。各々一定の成果を挙げたが、再発、播種予防効果に対しては不十分であった。頭蓋内pPNETは中枢神経系に広範な播種性病巣を来しやすく、予後不良な疾患の可能性が考えられ、全脳全脊髄照射や強力な化学療法を含む集学的治療が生存期間の延長に必要であると考えられたが、高齢者の場合は困難なことが多く、治療方針については更なる検討を要する。

【文 献】

- 1) Bui BN, Chevallier B, Chevreau C, Krakowski I, Peny AM, Thyss A, Maugard-Louboutin C, Cupissol D, Fargeot P, Bonichon F, et al.: Efficacy of lenograstim on hematologic tolerance to MAID chemotherapy in patients with advanced soft tissue sarcoma and consequences on treatment dose-intensity. *J Clin Oncol* 13 : 2629-2636, 1995
- 2) Paulussen M, Ahrens S, Dunst J, Winkelmann W, Exner GU, Kotz R, Amann G, Dockhorn-Dworniczak B, Harms D, Muller-Wehrich S, Welte K, Kornhuber B, Janka-Schaub G, Gobel U, Treuner J, Voute PA, Zoubek A, Gadner H, Jurgens H : Localized Ewing tumor of bone: final results of the cooperative Ewing's Sarcoma Study CESS 86. *J Clin Oncol* 19 : 1818-1829, 2001
- 3) Hart MN, Earle KM: Primitive neuroectodermal tumors of the brain in children. *Cancer* 32 : 890-897, 1973
- 4) Dehner LP: Peripheral and central primitive neuroectodermal tumors. A nosologic concept