

フォン・ヒッペルリンドウ病における中枢神経系血管芽腫の病態について

研究報告者 菅野 洋 横浜市立大学医学部脳神経外科

【研究要旨】

フォン・ヒッペルリンドウ(VHL)病は、遺伝性多発腫瘍性疾患で、中枢神経系血管芽腫、網膜血管腫、腎細胞癌、褐色細胞腫、膵病変などを発症する。約3万6千人に1人にみられるが、本邦におけるVHL病の病態はまだ不明な部分が多い。

中枢神経系血管芽腫は本邦のVHL病患者では最も高率にみられる種類の腫瘍である。ここでは、本年度に集計した全国アンケート結果を解析し、中枢神経系血管芽腫の病態について報告する。

A. 研究目的

VHL病は常染色体優性遺伝性で各種の腫瘍が多発する難治性疾患である。主に中枢神経系と網膜血管芽腫、腎細胞癌、副腎褐色細胞腫、膵腫瘍、内耳リンパ嚢腫、精巣上体嚢腫が発症する。発症頻度は欧米では約3万6千人に1人とされる。本邦の正確な発症頻度、各腫瘍の好発年齢、発症関連因子の実態は解明されていない。

本研究では、本年度に集計した全国アンケート結果を解析して、本邦のVHL病患者では最も高率にみられる中枢神経系血管芽腫の病態について報告する。

B. 研究方法

平成21年度に行った全国疫学調査では実際にVHL病患者さんの診療を行っている脳神経外科、眼科、泌尿器科、内科（膵臓学会会員）221名の医師にアンケートを依

頼し、106名から回答が得られアンケートの回収率は48%であった。本年度は、新たに調査項目を増やし、同医師に追加調査を行った。

C. 研究結果

1. VHL症例における中枢神経系血管芽腫を伴う割合と腫瘍の部位・個数

全国アンケートで集計されたVHL症例は294例であったが、このうち中枢神経系血管芽腫を伴っていたものは200例(68.1%)、伴っていなかったものは94例(31.9%)であった。中枢神経系血管芽腫は合計で440個認められ、このうち小脳血管芽腫は274個(62.3%)、脳幹血管芽腫は60個(13.6%)、脊髄血管芽腫は106個(24.1%)であった(図1, 2)。

2. VHL症例における脊髄血管芽腫の病態

全登録VHL症例294例中で脊髄血管芽腫

を有する症例は 59 例 (20.1%) であり、逆に脊髄血管芽腫のない症例は 235 例 (79.9%) であった (図 3)。

脊髄血管芽腫の初回診断時年齢は、12 歳から 61 歳におよび、平均 25.4 歳であった。年代別では、20~29 歳が最も多く、次に 10~19 才であり、ついで 30~39 歳、40~49 歳、50 歳以上の順であった (図 4)。

脊髄血管芽腫 60 個の高位は、頸椎 50%、胸椎 38.8%、腰椎 12.2% であった (図 5)。

脊髄血管芽腫の症例ごとの個数は、1 個認めたものが、35 症例、2 個が 9 症例、3 個が 5 症例、4 個が 2 症例であった (図 6)。

VHL 症例で脊髄血管芽腫を伴う 59 例のうち、他の部位の中中枢神経系血管芽腫との合併例は 80% であり、合併しない例は 20% であった (図 7)。このことから VHL 症例で脊髄血管芽腫を認められれば高率に他の部位の中中枢神経系血管芽腫を認めることが明らかとなった。

3. 脊髄血管芽腫に対する手術に関する検討

脊髄血管芽腫に対する手術は計 85 回行われ、脊髄血管芽腫を有する 59 例中手術を受けた症例は 50 例で、手術を 1 回受けた症例は 33 例、2 回は 11 例、3 回は 5 例、4 回は 1 例であり、受けた手術の平均は 1.6 回であった (図 8)。

脊髄血管芽腫を有する例の performance status (PS) は PS0 (まったく症候がないか、症候はあっても明らかな障害はない) が 42.9%、PS1 (軽度の障害：発症以前の活動がすべて行えるわけではないが、自分の身の回りのことは介助なしに行える) が 40.7%、PS2 (中等度の障害：何らかの介助を必要とするが歩行は介助なしに行える)

が 3.3%、PS3 (中等度の障害：歩行や身体的要求には介助が必要) が 6.6%、PS4 (重度の障害：寝たきりで常に介護と見守りが必要) が 6.6% であった (図 9)。また、脊髄血管芽腫症例の手術回数と PS との関係については、有意な相関を認めなかった ($P=0.39$) (図 10, 11)。

4. VHL 症例における脳幹血管芽腫の病態
全登録 VHL 症例 294 例中、脳幹血管芽腫を伴う症例は 26 例 (8.8%) であり、全中枢神経系血管芽腫計 440 個中では 57 個 (13.0%) が脳幹血管芽腫であった (図 12)。脳幹血管芽腫と他の部位の中中枢神経系血管芽腫を合併した症例は 21 例 (80.8%) で、脳幹血管芽腫だけ認められた症例は 5 例 (19.2%) であった (図 13)。脳幹血管芽腫と performance status (PS) との関連では、PS0 は 11 例 (42.3%)、PS1 は 10 例 (38.5%)、PS2 は 1 例 (3.8%)、PS4 は 3 例 (11.6%) であった (図 14)。

D-E. 考察と結論

VHL 症例に伴う中枢神経系血管芽腫の病態、特に脊髄血管芽腫、脳幹血管芽腫について 2010 年におこなった全国アンケート結果を解析して、明らかにした。その結果、VHL 症例では中枢神経系血管芽腫の合併は 68.1% に認められ、脊髄血管芽腫の合併は 20.1%、脳幹血管芽腫の合併は 8.8% に認められた。Performance Status に関しては脊髄血管芽腫および脳幹血管芽腫を伴う症例でも、PS0 と 1 が大多数を占め、Performance Status は概ね保たれていることがあきらかとなった。手術との関連では、脊髄血管芽腫症例は平均 1.6 回の手術を受けていたが、手術回数と Performance

Status には有意な相関はなかった。

F. 参考文献

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

外国語論文

1. Yamazaki Y, Kanno H, Maeda K, et al.
Engrafted VHL peptide-delivered bone marrow stromal cells promote spinal cord repair in rats. Neuroreport. 2010;21(4):287-92.

和文書籍

1. 菅野 洋、von Hippel-Lindau 病、日本臨床増刊号、日本臨床社、東京、2010; 214-214.

2. 菅野 洋、von Hippel-Lindau 病：どのように治療方針を説明するか？ 宮本享ほか編集、EBM 脳神経外科疾患の治療 2010-2011、中外医学社、東京、2010;206-210.

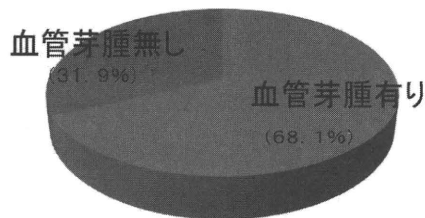
2. 学会発表

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

図 1



全登録例数	294
血管芽腫有り	200
血管芽腫無し	94

図 2

中枢神経系血管芽腫: 440個

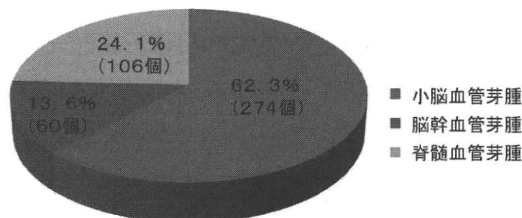


図 3

全登録VHL症例中で脊髄血管芽腫を有する症例: 20.1%

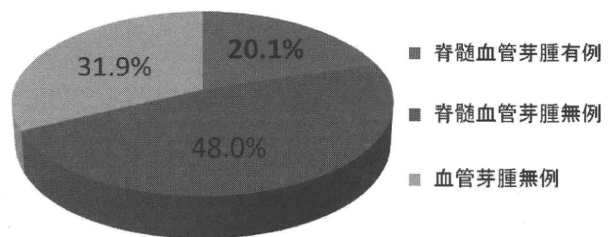


図 4

脊髄血管芽腫の初回診断時年齢

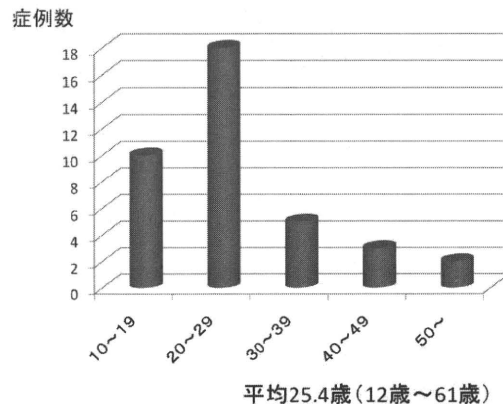


図 5

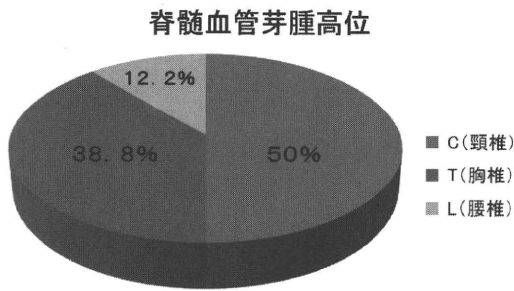


図 8

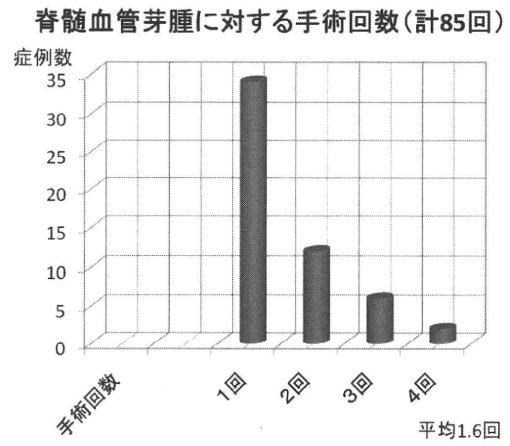


図 6

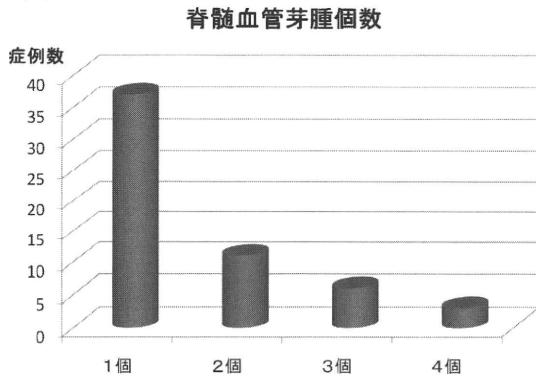


図 9

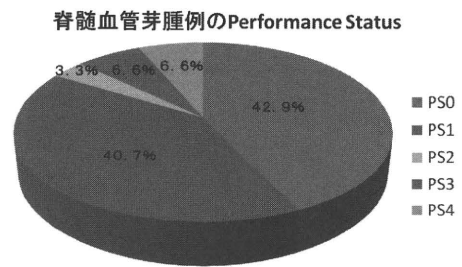


図 7

脊髄血管芽腫は小脳・脳幹血管芽腫を大部分伴う

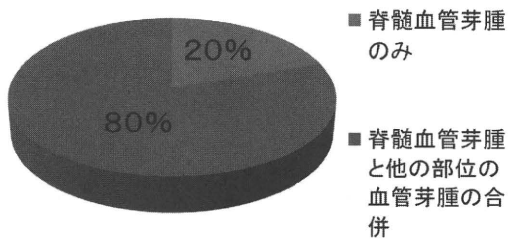


図 10

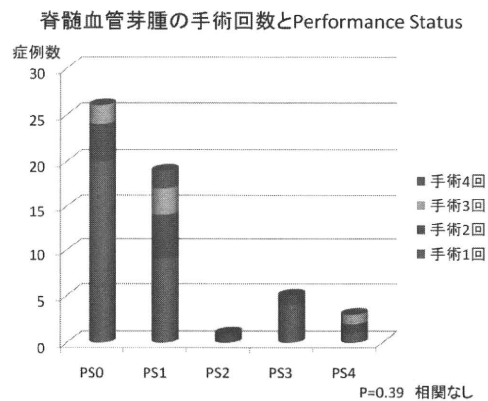


図 11

脊髄血管芽腫に対する手術回数と Performance Statusとの関係

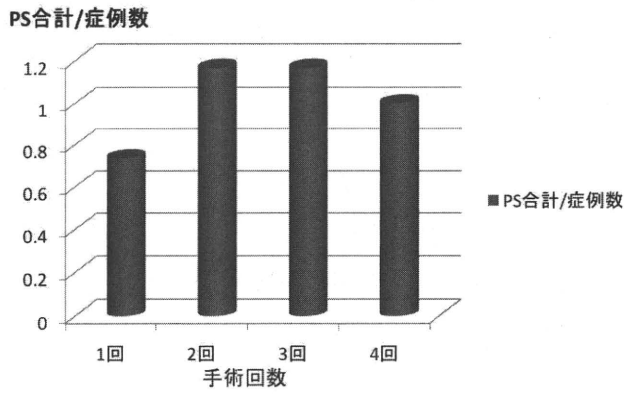


図 14

脳幹血管芽腫とPerformance Status

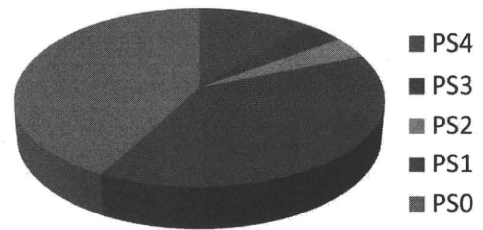
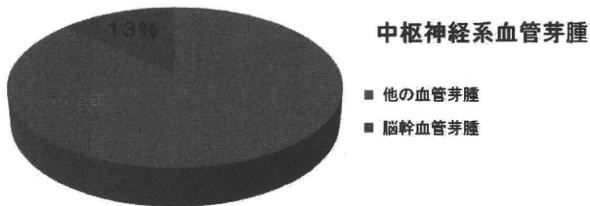
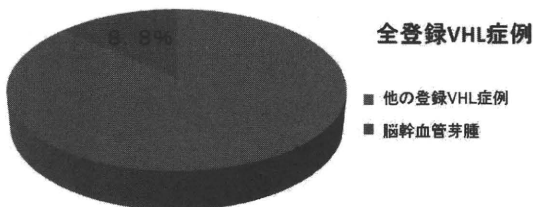


図 12

脳幹血管芽腫



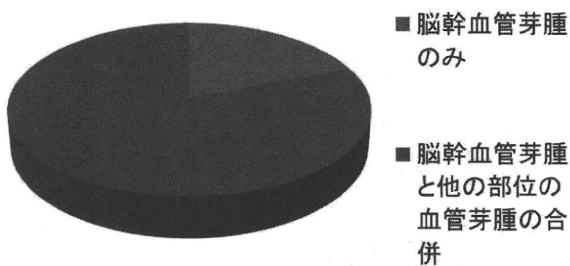
中枢神経系血管芽腫



全登録VHL症例

図 13

脳幹血管芽腫と他の中枢神経血管芽腫との合併



厚生労働科学研究費補助金（難治性疾患克服研究事業）

分担研究報告書

フォン・ヒッペルリンドウ病全国疫学調査の解析およびまとめ：
中枢性神経血管芽腫

研究報告者 倉津 純一 熊本大学大学院医学薬学研究部先端生命医療科学部門
脳・神経科学講座脳神経外科学分野
森岡 基浩 熊本大学大学院医学薬学研究部先端生命医療科学部門
脳・神経科学講座脳神経外科学分野

【研究要旨】

フォン・ヒッペルリンドウ病（VHL病）における中枢神経系血管芽腫の治療指針を確立することを目的として、全国調査の結果から、発生数、発症年齢、その他の関連因子について解析した。

中枢性神経血管芽腫の存在部位などの詳細が明らかとなっている167例について解析した。発生部位として小脳138例、脳幹部35例、脊髄64例であり（重複を含める）、3部位すべてに発生した例は11例であった。それぞれの合併率について検討すると、脳幹に発生した場合には単独部位発生が少なく（14.3%）、逆に小脳に発生した場合は、脳幹との合併率18.1%、脊髄との合併率29.0%と他部位に比べ低く単独部位発生が多い（60.9%）ことが明らかとなった。

次に同一部位発生の腫瘍数と初発年齢について検討を行った。小脳については単発の症例においては初発時平均年齢30.8 +/- 12.7（ +/- SD）歳、2個以上の複数個発生例では24.2 +/- 11.2歳と有意差をもって若年の傾向が見られた（ $P < 0.05$ ）。同様に脊髄内に発生した血管芽腫についても同様の解析を行ったが、小脳発生例と同様の傾向が見られた。

VHL病において20歳代の若年者に中枢性血管芽腫が発生した場合は多発性の可能性が高く、他の部位に発生する可能性を考慮し定期的な検査が必要であると考えられた。

A. 研究目的

フォン・ヒッペルリンドウ病（VHL病）は各種の腫瘍が多発する難治性疾患である。主に中枢神経系と網膜血管腫、腎細胞癌、副腎褐色細胞腫、膝腫瘍、内耳リンパ嚢腫、精巣上体嚢腫が発症するがわが国における発生状況は明らかではない。本研究では中

枢神経系血管芽腫の発生頻度、発症年齢、発症関連因子について解析しその治療指針を確立することを目的とする。

B. 研究方法

VHL病の主要な病態（中枢神経系血管芽腫、網膜血管腫、褐色細胞腫、腎細胞癌、

腓神経内分泌腫瘍、腓嚢胞、内耳リンパ嚢腫、精巣上体嚢腫)について発症年齢を中心に調査し、各家系における患者実数を調査した。今回は過去の調査をもとに、実際に VHL 病患者さんの診療を行っている脳神経外科、眼科、泌尿器科、内科(膵臓学会会員) 221 名の医師にアンケートを依頼した。106 名から回答が得られアンケートの回収率は 48%であった。その情報をもとに中枢神経系血管芽腫の発生部位、発生個数、発症年齢などの解析を行った。

C. 研究結果

登録された VHL 患者のうち、中枢性神経血管芽腫の存在部位などの詳細が明らかとなっている 167 例について解析を行った。発生部位として小脳 138 例、脳幹部 35 例、脊髄 64 例であり(重複を含める)それらの合併状況を図-1 に示す。3 部位すべて発生した例は 11 例(図 1 A)であり、それぞれの合併率について検討すると、脳幹部に発生した場合には単独発生の可能性が低く小脳に 71.4%と高率に合併するが、小脳に発生した場合は、脳幹部との合併率 18.1%、脊髄との合併率 29.0%と他部位に比べ低く単独発生の可能性が高いことが明らかとなった(図 1 B, C, D)。

次に同一部位発生の腫瘍数と初発年齢について検討を行った。小脳については単発の症例においては初発時平均年齢 30.8 +/- 12.7 (SD)歳、2 個以上の複数個発生例では 24.2 +/- 11.2 歳と有意差をもって若年の傾向が見られた($P < 0.05$; 図 2)。これは経過観察期間の長さ由来する可能性も考えられたが初発時の平均の西暦は 1998 年と 1994 年であり十分な経過観察期間の中での

発生腫瘍数の違いと考えられた。また複数個発生した症例では 2 個のみの症例と 3 個以上の症例で発症年齢に差はみられなかった。

同様に脊髄内に発生した血管芽腫についても同様の解析を行ったが、単発症例では平均発症年齢 29.7 歳、多発例では平均 23.2 歳と小脳発生例と同様の傾向が見られた(図 3)。

脊髄血管芽腫について初発部位と後発部位との発生部位について検討した。初発部位は頸髄に多く見られたが、後発部位では過半数が胸髄に発生しており頸髄の発生頻度は低下する傾向が見られた。また全体的に腰仙椎の発生頻度は 101 総腫瘍中 10 腫瘍(9.9%)と低いことが明らかになった(図 4)。

D. 考察

従来の VHL 病における血管芽腫の発生に関する大規模な疫学調査としては Neumann ら(1) Maddock ら(2) Richard ら(3)の報告があるが、多発性腫瘍の頻度は 40-70%と報告されており、本邦の結果もほぼ同程度のもと考えられる。また発生部位として後頭蓋窩(小脳、脳幹部を含む)に 80-90%、脊髄に 20-37%の発生頻度と報告されている(1-4)が、本研究の結果も腫瘍の発生数は、小脳:脊髄:脳幹部の発生比が 4:2:1 という結果となり、これも欧米の従来の報告とほぼ近似した結果と考えられる。各々の発生部位間の腫瘍の合併率を検討した結果からは、小脳の血管芽腫は他の部位の腫瘍を合併する確率が比較的 low、反面脳幹部の血管芽腫は他の部位に腫瘍が発生する確率が高いことが明らかとなった。今回の調査ではそれぞれの腫瘍発生の時間経過などの

詳細は不明であるが、こういった問題に対する大規模な報告はいままでなされておらず、長期間の経過観察においては重要な事実であると考えられる。

従来(1-3)ではVHL病における中枢神経系の血管芽腫の初発年齢は平均30-33歳と報告されている。今回の結果も全体の平均値は同様の結果であったが、同一部位に多発する症例では初発時年齢が小脳では24.2歳、脊髄では21.8歳と明らかに低年齢であった。経過観察期間の長さが影響する可能性は否定できないが経過観察期間は単発例、多発例ともに十分な期間があると考えられることから、20歳前半で発症した症例は多発性となる可能性を十分考慮すべきと考えられる。

脊髄の発生部位別の比較では全体的に頸髄、胸髄に多く腰仙髄には少ない結果でありこれは従来(1,5)の報告と同様の結果であった。今回の結果では初発腫瘍は頸髄に多くその後続発腫瘍は胸髄に多くなる傾向にあったがこれは脊髄の検索が上位から行われる傾向があることなどの影響も考えられるが、症例数も少ないことから今後の更なる検討が必要と考えられる。

E. 結論

本邦におけるVHL病中枢性血管芽腫の発生状況は欧米の従来(1)の報告に類似し、小脳が最も多く、平均30歳で初発することが多くその3分の1が他部位発生腫瘍を合併していた。小脳以外に発生した血管芽腫は他の部位に発生する確率が高く、20歳代前半の若年者に中枢性血管芽腫が発生した場合は同一部位での多発性の可能性が高く、厳重な定期的検査が必要であると考えられた。

F. 参考文献

1. Neumann HPH, Eggert HR, Scherement R, Schumacher M, Mohadjer M, Wakhloo AK Central nervous system lesions in von Hippel-Lindau syndrome. J, Neurol Neurosurg Psychiatr 1992; 55:898-901.
2. Maddock IR, Moran A, Maher ER, Teare MD, Norman A, Payne SJ A genetic register for von Hippel-Lindau disease. J Med Genet 1996; 33: 120-127
3. Richard S, Campello C, Taikkandier L, Parker F, Resche F Haemangioblastome of the central nervous system in von Hippel-Lindau disease. J Intern Med 1998;243:547-553.
4. Neumann HPH, Lips CJM, Hsia YE, Zbar B von Hippel-Lindau syndrome. Brain Pathol 1996; 5:181-93.
5. Lonser RR, Weil RJ, Wanebo JE, DeVroom HL, Oldfoeld EH: Surgical management of spinal cord hemangioblastomas in a patients woth von Hippel-Lindau disease. J Neurosurg 2003; 98:106-116.

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

図 1

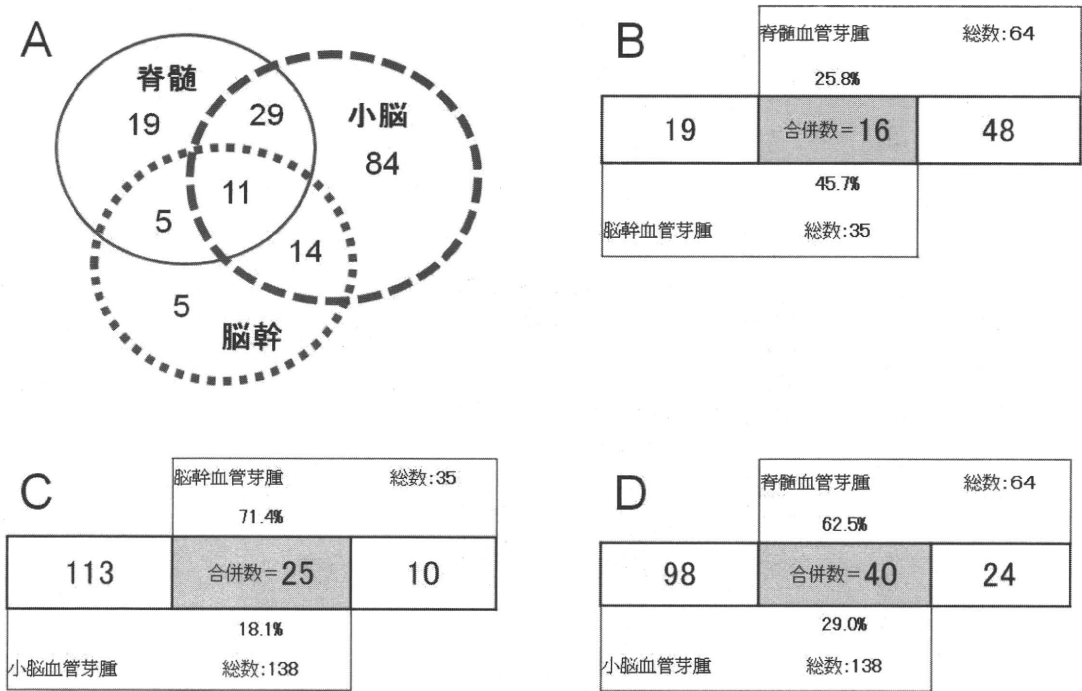


図 2

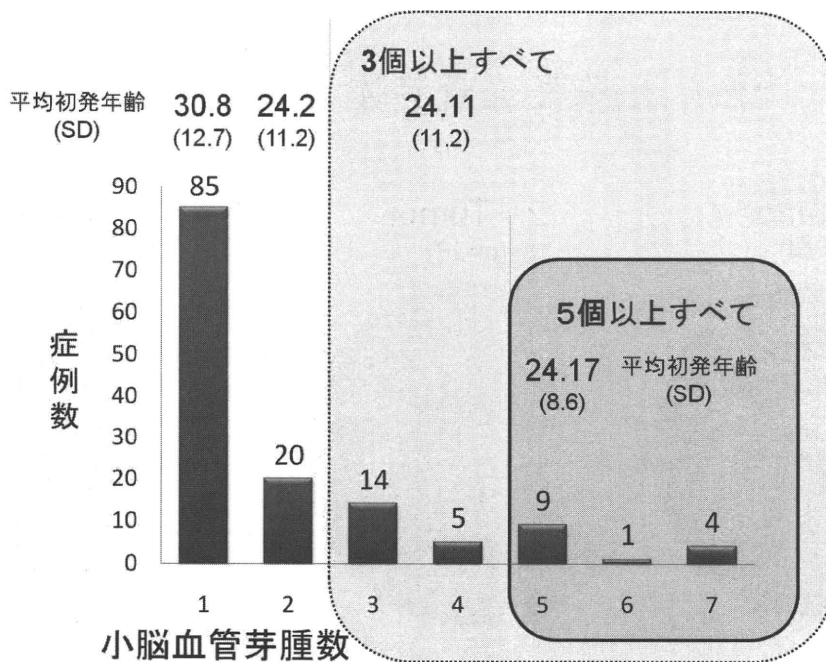


图 3

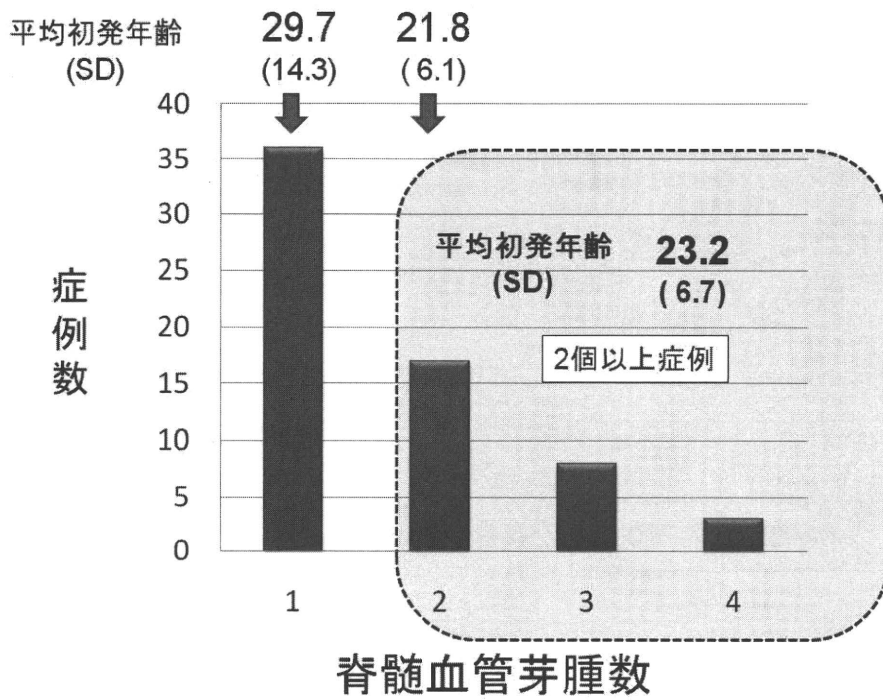
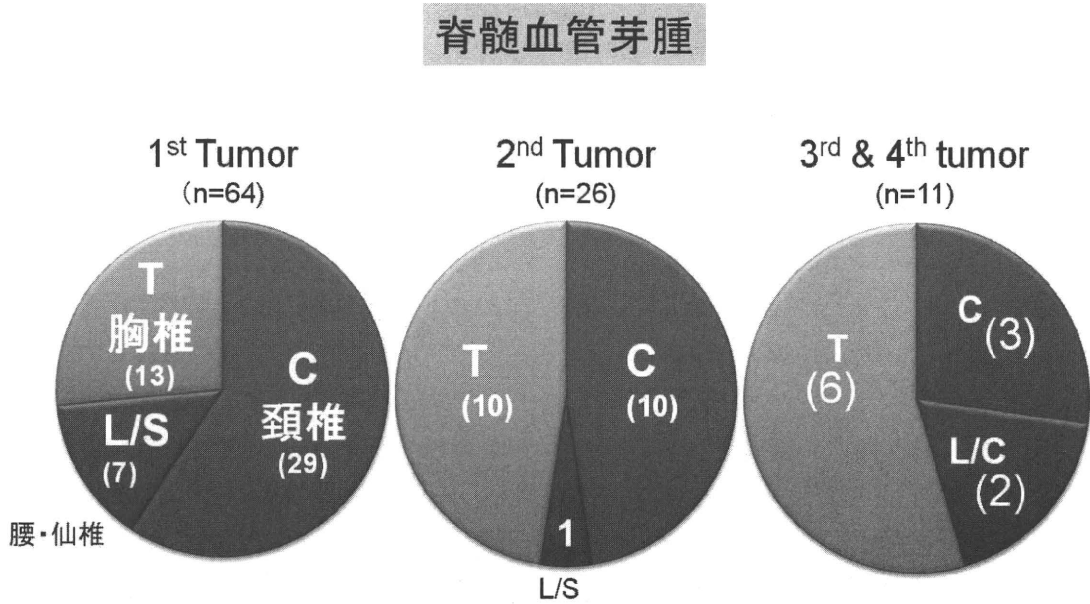


图 4



中枢神経系血管芽腫に対する放射線治療

研究報告者 宝金 清博 北海道大学大学院医学研究科脳神経外科
寺坂 俊介 北海道大学大学院医学研究科脳神経外科

【研究要旨】

放射線治療は、症候性となったものあるいは増大傾向を続ける腫瘍に対して、手術摘出リスクが高く適応でないと判断される時に第2選択肢として用いられる。約90%の症例に定位照射行われ、約80%が再発腫瘍に対する照射であった。文献上の報告例では定位放射線治療による局所腫瘍制御率（少なくとも腫瘍が増大しない）は治療後5年で80%以上であるが、2010年にAsthagiriらは治療後10年では61%、15年では51%まで局所腫瘍制御率が低下することを報告している。脊髄血管芽腫の治療成績は頭蓋内病変と同様である。拡大するのう胞成分が問題となる例には放射線治療の選択は適切ではない。VHL特有の問題は、定位放射線治療をした腫瘍に近接した部位に新たに腫瘍が増大した場合に、追加の照射では放射線照射野の重複が生じることである。よって無症候性病変に対する予防照射は勧められない。

A. 研究目的

脳脊髄に発生した血管芽腫への放射線治療は手術摘出のリスクが高く手術適応でないと判断されるときに第2選択肢として用いられる。脳脊髄に発生した血管芽腫への放射線治療の方法・照射時期・治療効果を検討する。

B. 研究方法

VHL病患者に発生する中枢神経系血管芽腫について放射線治療の方法や照射時期に関してアンケート調査を行った。また文献から放射線治療の代表的な治療成績を検索した。

C. 研究結果

アンケート結果から中枢神経系血管芽腫62症例82病変に対して何らかの放射線治療がおこなわれていたことが判明した。

1) 照射方法：定位照射が標準治療になりつつあるが、アンケート結果でも定位照射が73病変(89%)に行われていた。定位照射には一回照射と分割照射があるが、文献的にはどちらが優れているという結論はない。

2) 照射時期：放射線治療が初回治療として用いられたものは16病変と少なく、多くは再発時(81%)に照射が行われていた。また照射部位は小脳病変が最も多く71%で脳幹病変と脊髄病変は各々14%ずつであった。

3) 治療効果：文献上の報告例では定位放

放射線治療による腫瘍制御率（少なくとも腫瘍が増大しない）は治療後5年で80%以上である。2009年のMossらの報告では、定位放射線治療をされた31例82病変での局所制御率は、3年で85%、5年で82%であったとされる。5例で放射線壊死（平均腫瘍辺縁線量28.2Gy）が発生し、その内の2例が症候性であった。照射前に症候性であった41病変中の36病変（88%）で臨床症状が改善した。2010年にAsthagiriらが治療後5年の腫瘍制御率はMossらの報告同様83%であるが、10年では61%、15年では51%まで低下することを報告した。

小脳血管芽腫への定位放射線治療は比較的安全性が高い。脳幹部血管芽腫は遅発性放射線障害が生じた場合に重篤な症状を呈することが懸念されたが、定位放射線治療による遅発性合併症の頻度はきわめて低い。脊髄血管芽腫の治療成績は頭蓋内病変と同様であった。

拡大するのう胞成分が問題となる症例には単独放射線治療の選択は適切ではない。このような場合には手術によってのう胞を縮小せしめて、残った結節性病変へ放射線治療を行う方法がある。

VHL特有の問題としては、定位放射線治療をした腫瘍に隣接して新たな腫瘍が発生する場合がある。照射野の重複を防ぐためにも無症候性腫瘍に対しての予防的照射は勧められない。

D-E. 考察と結論

中枢神経系血管芽腫に対する定位放射線治療の局所腫瘍制御率は良好である。症候性となり手術リスクが高度あるいは手術不能な病巣に対しては積極的に検討されるべ

き治療方法である。無症候性腫瘍への予防的照射は本疾患の特性から極力回避すべきである。

F. 参考文献

1. Annerman JM, Lonser RR, Dambrosia J, et al. Long-term natural history of hemangioblastomas in patients with von Hippel-Lindau disease: implication for treatment. *J Neurosurg* 105: 248-55, 2006
2. Asthagiri AR, Mehta GU, Zach L, et al. Prospective evaluation of radiosurgery for hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease. *Neuro-Oncology* 12(1):80-86, 2010.
3. Chang SD, Meisel JA, Hancock SL, et al. Treatment of hemangioblastomas in von Hippel-Lindau disease with linear accelerator-based radiosurgery. *Neurosurgery* 43: 28-35, 1998
4. Jawahar A, Kondziolka D, Garces YI, et al. Stereotactic radiosurgery for hemangioblastomas of the brain. *Acta Neurochir (Wien)* 142(6): 641-4, 2000
5. Kano H, Niranjan A, Mongia S, et al: The role of stereotactic radiosurgery for intracranial hemangioblastomas. *Neurosurgery* 63(3): 443-451, 2008
6. Koh ES, Nichol A, Millar BA, et al. Role of fractionated external beam radiotherapy in hemangioblastoma of the central nervous system. *Int*

- J Radiat Oncol Biol Phys 69: 1521-6, 2007
7. Matsunaga S, Shuti T, Inomori S, et al. Gamma knife radiosurgery for intracranial haemangioblastoma. Acta Neurochir (Wien) 149: 1007-13, 2007
 8. Moss JM, Choi CY, Adler JR, et al. Stereotactic radiosurgical treatment of cranial and spinal hemangioblastomas. Neurosurgery 65: 79-85, 2009
 9. Niemelä M, Lim YJ, Söderman M, et al. Gamma knife radiosurgery in 11 hemangioblastomas. J Neurosurg. 85: 591-6, 1996
 10. Park YS, Chang JH, Chang JW, et al. Gamma knife surgery for multiple hemangioblastomas. J Neurosurg. 102: 97-101, 2005
 11. Patrice SJ, Sneed PK, Flickinger JC, et al. Radisurgery for hemangioblastoma: results of a multiinstitutional experience. Int J Radiat Oncol Biol Phys 35: 493-9, 1996
 12. Smalley SR, Schomberg PJ, Earle JD, et al. Radiotherapeutic considerations in the treatment of hemangioblastomas of the central nervous system. Int J Radiat Oncol Biol Phys 18: 1165-1171, 1990
 13. Tago M, Terahara A, Shin M, et al. Gamma knife surgery for hemangioblastomas. J Neurosurg. 102: 171-4, 2005
 14. Wang EM, Pan L, Wang BJ, et al. The long-term results of gamma knife radiosurgery for hemangioblastomas of the brain. J Neurosurg. 102: 225-9, 2005
- G. 研究発表
1. 論文発表 該当なし
 2. 学会発表 該当なし
- H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）
1. 特許取得 該当なし
 2. 実用新案登録 該当なし
 3. その他 該当なし

脳腫瘍における O6-methylguanine-methyltransferase メチル化の 新しい測定法

研究報告者 西川 亮 埼玉医科大学国際医療センター脳神経外科

【研究要旨】

DNA 修復酵素の 1 つである O6-methylguanine-methyltransferase (MGMT) は脳腫瘍の temozolomide に対する高感受性を規定する因子とされていたが、近年、より広く genome-wide な methylation のマーカーとしての位置づけがされるようになった。これは CPG-island methylator phenotype と呼ばれ、腫瘍がよりおとなしい性格であることを示すとされる。今回は脳腫瘍における MGMT methylation をより正確に再現性をもって測定する方法の確立を目的として、メチル化感受性高解像能融解曲線分析を行った。166 例の脳腫瘍について解析を行い、神経膠腫 45/117(38%)、悪性リンパ腫 23/45(51%) といった MGMT のメチル化頻度であった。本方法の有用性が示された。

A. 研究目的

DNA 修復酵素の 1 つである O6-methylguanine-methyltransferase

(MGMT) は脳腫瘍の temozolomide に対する感受性を規定する因子とされていたが、近年、より広く genome-wide な methylation のマーカーとしての位置づけがされるようになった。これは CPG-island methylation phenotype と呼ばれ、腫瘍がよりおとなしい性格であることを示すとされる。しかし一方、MGMT methylation の測定においてはいくつかの方法があり、測定方法によってデータにばらつきがあることが知られ、その信頼性に問題があった。そこで、今回は脳腫瘍における MGMT methylation をより正確に再現性を持って測定する方法の確立を目的として以下の研究を行った。

B. 研究方法

手術の際に採取した脳腫瘍の新鮮凍結標本あるいはホルマリン固定後のパラフィン包埋標本から genomic DNA を抽出した。DNA メチル化スタンダードは 100%メチル化コントロール DNA を用い、非メチル化正常組織 DNA で 100%~0% まで 10% ずつ段階希釈したものをコントロールとして調整した。500ng の genomic DNA をまず bisulfite 処理した。

MGMT プロモーターのメチル化の評価には real-time PCR 法を応用した、メチル化感受性高解像能融解曲線分析法にて定量的に行った。CpG rich な MGMT プロモーター 18 カ所を増幅するプライマーをデザインした (表 1)。反応容量 20 μ l として、DNA インターカラー色素を含む 2 X LightCycler480High Resolution Melting

マスターミックス、200 nmol/l の各プライマー、2 μ l の bisulfite 処理した DNA、最終濃度 4nmol/l の MgCl₂ とした。PCR のサイクル条件は 95°C10 分 x 1 サイクル、95°C10 秒-60°C20 秒-72°C20 秒 x 45 サイクル、メチル化感受性高解像能融解曲線分析へのステップとして、95°C 1 分、50°C1 分、72°C5 秒の後、95°C へ向かって 1°Cにつき 30 回、連続して蛍光を取得した。尚、全ての反応は 2 重測定とした。

2007 年 4 月以降、当科で手術を行った脳腫瘍 166 例を対象とした。内訳は表 2 に示すように、神経膠腫 117 例、髄芽腫 4 例、悪性リンパ腫 45 例であった。

C. 研究結果

MGMT プロモーターメチル化の頻度について、腫瘍別の結果 (表 2) と代表症例の解析結果 (図 1) を示す。

D. 考察

今回用いたメチル化感受性高解像能融解曲線分析によって広く再現性のある MGMT プロモーターメチル化の測定が可能であった。特に中枢神経原発悪性リンパ腫におけるメチル化頻度が 51%であったことから、この腫瘍に対する temozolomide の有効性が示唆されたことは注目に値すると考える。一方腫瘍の悪性度とメチル化頻度とに明確な相関が見られなかったことは、

temozolomide に対する感受性のみならず腫瘍の悪性度が多数の因子で制御されていることを示しているとも考えられ、複合的な解析の必要性が示唆された。

E. 結論

MGMT プロモーターメチル化の測定においてメチル化感受性高解像能融解曲線分析は有用である。

F. 参考文献

1. Wojdacz TK, et al. Methylation-sensitive high resolution melting (MS-HRM): a new approach for sensitive and high-throughput assessment of methylation. *Nucleic Acids Res* 35:e41, 2007

G. 研究発表

1. 論文発表 該当なし
2. 学会発表 該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 該当なし
2. 実用新案登録 該当なし
3. その他 該当なし

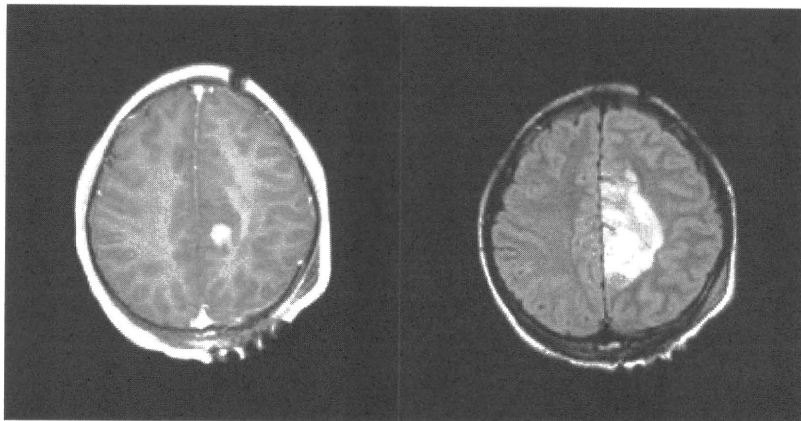
表1. メチル化感受性高解像能融解曲線分析に用いたプライマー(参考文献 1)

Primer sequences	Position (UCSC Genome Browser, Mmarch 2006)	Screened CpGs/ amplicon
F-GCGTTTCGGATATGTTGGGATAGT	Chr 10:131,155,459-131,155,631	18 / 173bp
R-CCTACAAAACCACTCGAAACTACCA		Z

表2. 解析した脳腫瘍の組織型, 症例数とメチル化症例数(%)

組織型	症例数	メチル化症例(%)
神経膠腫	117	45(38)
Pilocytic astrocytoma	5	1(20)
Diffuse astrocytoma	9	4(44)
Oligodendroglioma	10	3(30)
Oligoastrocytoma	6	1(17)
Anaplastic astrocytoma	7	5(71)
Anaplastic oligodendroglioma	6	2(33)
Anaplastic oligoastrocytoma	1	1(100)
Anaplastic ependymoma	4	0(0)
Glioblastoma	69	28(41)
髄芽腫	4	0(0)
悪性リンパ腫	45	23(51)
総計	166	

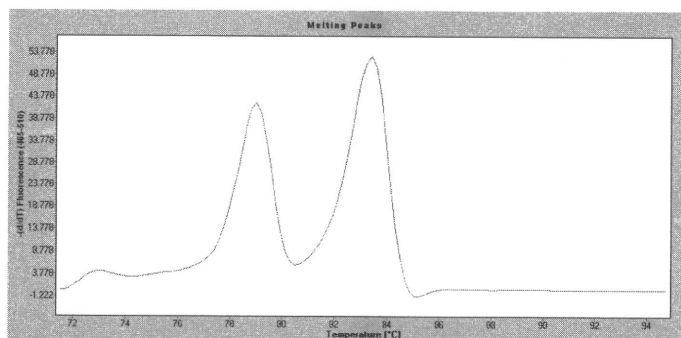
図1 代表症例. Anaplastic astrocytoma



左ピーク: MGMT 非メチル化 DNA が示す Tm 値

右ピーク: MGMT メチル化 DNA が示す Tm 値

Tm 値: melting temperature



MGMT methylation 55%

中枢神経系血管芽腫の血管新生における Akt 結合タンパク Girdin の役割

研究報告者 夏目 敦至 名古屋大学大学院医学系研究科 脳神経病態制御学講座
脳神経外科

【研究要旨】

VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) として認識されており、遺伝的または体細胞的変異によってその遺伝的機能が消失し、腫瘍化がおこると考えられている。VHL 遺伝子から翻訳される VHL 蛋白 (pVHL) は主に、E3 ubiquitin ligase 複合体としての機能を持ち、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) の分解制御を行っている。低酸素状態において、pVHL による HIF のユビキチン化と分解が抑制され、VEGF (VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor) 遺伝子の転写を促進する。

Girdin は、VEGF を介した生体の血管新生 (postnatal angiogenesis) に Akt 依存的に関わっていることから、本研究では、低酸素下の状態での Girdin の脳腫瘍幹細胞の幹細胞性の維持と、その役割を検討した。低酸素の状態で、Girdin の発現上昇が示された。

A. 研究目的

フォン・ヒッペル・リンドウ (VHL) 病の原因は、染色体の 3p25 領域に存在する von Hippel-Lindau 病 (VHL) 遺伝子の変異であることが分かっている。

VHL 遺伝子は癌抑制遺伝子 (tumor suppressor gene) として認識されており、遺伝的または体細胞的変異によってその遺伝的機能が消失し、腫瘍化がおこると考えられている。VHL 遺伝子から翻訳される VHL 蛋白 (pVHL) は主に、E3 ubiquitin ligase 複合体としての機能を持ち、転写因子 HIF (hypoxia-inducible factor) (低酸素誘導因子) の分解制御を行っている。低酸素状態において、pVHL による HIF のユビキチン化と分解が抑制され、様々な遺伝子の転写を促進する。VEGF (VEGF: Vascular

Endothelial Growth Factor) もそれらの遺伝子の一つであり、血管の新生・成熟・維持などの作用を持つ。VHL 病で特徴的な血管芽腫や淡明細胞型腎癌では腫瘍血管の造成が顕著であり、VEGF も高発現している。

VEGF は、血管内皮細胞の細胞分裂の促進、血管透過性の亢進に関与するサイトカインで、正常な組織の血管新生にも不可欠な調節因子であるが、一方で、種々の癌細胞でも発現亢進が認められている。癌細胞内では、VEGF が血管新生を促すことで栄養や酸素の供給を高め、癌細胞の増殖、浸潤、転移に関与しているものと考えられている。

VEGF 発現による血管新生と、それに伴う細胞運動は、ホスファチジルイノシトール 3-キナーゼ (PI3K) 経路によるセリンスレオニンキナーゼ AKT (PKB) のリン酸化活性に

より制御されている。その結果、低酸素誘導性因子 1 α (HIF1 α)などの転写因子の合成促進、様々な下流基質の活性化が認められ、血管新生・細胞運動が促進されることが分かっているが、詳細なメカニズムは未だに不明な点が多い。

近年、新規 Akt 基質として同定された Girdin はアクチン細胞骨格の結合分子であり、アクチン線維と細胞膜との架橋の役割を果たし、Akt によるリン酸化によって細胞運動を制御することが分かっている。更なる研究によって、Girdin が、VEGF を介した生体の血管新生 (postnatal angiogenesis) に Akt 依存的に関わっていることから、Girdin の機能が悪性腫瘍細胞の血管新生、細胞運動、浸潤性に重要な役割を果たしている可能性が明らかにされた。

本研究では、Girdin の脳腫瘍幹細胞の低酸素状態での幹細胞性の維持と、その役割を検討した。

B. 研究方法

脳腫瘍の組織検体を特殊な培養培地 (EGF, bFGF, N2, B27 を加えた Neurobasal Medium) と、ノンコーティング培養皿内で、組織培養し、Sphere 形成能、自己複製能、多分化能を有し、Nod-Scid マウスの脳内に 10³ 個の細胞を移植することで腫瘍生着能を確認できる細胞を brain tumor stem cell (BTSC) として、複数の脳腫瘍幹細胞系を樹立してきた。本研究では、その内の BTSC0222、BTSC0125 の系を用いて、1%O₂ の低酸素状態で 14 日間培養し、BTSC における Girdin と CD133 の発現を検討した。

C. 研究結果

1. BTSCを1% O₂の状態では14日間培養をすると、CD133の発現上昇とともにGirdinの発現も上昇した。(図1)
2. CD133 と Girdin は共局在する。(図 2)

D. 考察

Girdin は、Akt の新基質として血管内皮細胞や、悪性腫瘍の細胞運動のキーファクターとして注目を浴びている。これまでの本研究の結果により、脳腫瘍幹細胞において分化を誘導させれば、Girdin の発現は低下し、逆に Girdin 遺伝子の発現を抑制すると、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を保てなくなることが示された。そして脳腫瘍幹細胞の細胞運動能、浸潤性、腫瘍形成能に深く関わっていることが示唆された。また Girdin の上流因子 Akt は VEGF を介した血管新生に深く関与していることから、VHL 病においても、Girdin が新たな治療法開発において注目されるべき因子であることは本研究から示唆されることであり、更なる Girdin の分子機構解明を進める予定である。

E. 結論

脳腫瘍幹細胞において低酸素状態にすると Girdin の発現は上昇し、脳腫瘍幹細胞はその幹細胞性を増強されることが示唆された。

F. 参考文献

1. Yuki K, Natsume A, Yokoyama H, et al. Induction of oligodendrogenesis in glioblastoma-initiating cells by IFN-mediated activation of STAT3 signaling. *Cancer Lett.* 2009; 284: 71-9.

2. Singh SK, Hawkins C, Clarke ID, et al. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature*. 2004; 432: 396-401.
3. Hemmati HD, Nakano I, Lazareff JA, et al. Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 15178-83.
4. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al. Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444: 756-60.
5. Castellino RC, Durden DL. Mechanisms of disease: the PI3K-Akt-PTEN signaling node--an intercept point for the control of angiogenesis in brain tumors. *Nat Clin Pract Neurol*. 2007; 3: 682-93.
6. Enomoto A, Murakami H, Asai N, et al. Akt/PKB regulates actin organization and cell motility via Girdin/APE. *Dev Cell* 2005; 9: 389-402.
7. Kitamura T, Asai N, Enomoto A, et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin. *Nat Cell Biol*. 2008; 10: 329-37.
8. Enomoto A, Asai N, Namba T, et al. Roles of disrupted-in-schizophrenia 1-interacting protein girdin in postnatal development of the dentate gyrus. *Neuron* 2009; 63: 774-87.
9. Kim JY, Duan X, Liu CY, et al. DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212. *Neuron*. 2009; 63:761-73.
10. Sonoda Y, Ozawa T, Aldape KD, Deen DF, Berger MS, Pieper RO. Akt pathway activation converts anaplastic astrocytoma to glioblastoma multiforme in a human astrocyte model of glioma. *Cancer Res*. 2001; 61: 6674-8.
11. Brazil DP, Park J, Hemmings BA. PKB binding proteins. Getting in on the Akt. *Cell*. 2002; 111: 293-303.
12. Datta SR, Brunet A, Greenberg ME. Cellular survival: a play in three Acts. *Genes Dev*. 1999; 13: 2905-27.
13. Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-Kinase AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2: 489-501.
14. Jiang P, Enomoto A, Jijiwa M, et al. An actin-binding protein Girdin regulates the motility of breast cancer cells. *Cancer Res* 2008; 68: 1310-8.
15. Uchida N, Buck DW, He D, et al. Direct isolation of human central nervous system stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97: 14720-5.
16. Gunther HS, Schmidt NO, Phillips HS, et al. Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene*. 2008; 27: 2897-909.
17. Eyler CE, Foo WC, LaFiura KM, McLendon