

Glioma における Anaplasia と GFAP, Vimentin の染色態様との関連

— GFAP, Vimentin による免疫組織学的検討 —

鎌田 一、荒 清次、伊東民雄、岡田好生
堀田隆史、中村順一、末松克美*

Relationship Between the Anaplasia in Glioma and Its Staining Attitude of GFAP, Vimentin

— Immunohistological examination with GFAP and Vimentin —

Hajime KAMADA, Seiji ARA, Tamio ITO, Yoshio OKADA, Takashi HOTTA,
Jun-ichi NAKAMURA and Katsumi SUEMATSU*

Department of Neurosurgery, Nakamura Memorial Hospital, Sapporo, Japan and
*Hokkaido Brain Research Foundation, Sapporo, Japan.

Summary : The authors have already reported that vimentin is a marker of immature glial cells. The study was performed by the immunohistological examination of developing human and rat embryonic spinal cord. The purpose of the present study is to investigate how the attitude of GFAP and vimentin in developing human and rat embryonic spinal cord reflects upon the anaplastic process of gliomas. Surgical specimens (astrocytoma Grade- II : 21, astrocytoma Grade- III : 28, astrocytoma Grade- IV : 4, oligodendroglioma : 6, medulloblastoma : 3, subependymoma : 1) were fixed in ethanol and embedded in paraffin. Paraffin sections were stained with anti- GFAP rabbit serum, anti vimentin mouse monoclonal antibody according to PAP methods and ABC methods. In astrocytoma Grade- II, many tumor cells were GFAP and vimentin positive. In astrocytoma Grade- III and IV, GFAP and vimentin positive tumor cells were less frequent and the attitude of vimentin staining was various. In medulloblastoma, tumor cells were GFAP and vimentin negative and stained cells were identified only among suspected reactive astrocytes. These results indicate that vimentin is not considered to be a marker of anaplasia in gliomas and that morphological variability within malignant gliomas is attributed to Cataplastic changes.

Key words :

- GFAP
- vimentin
- glioma
- anaplasia

はじめに

すべての真核細胞は繊維状構造物を持っており、これは細胞骨格と呼ばれている。細胞骨格には線維径により微小管 (25nm)、ミオシン線維 (15nm)、中間径線維 (10nm)、アクチン線維 (6 nm) の4種が知られている。

中間径線維は他の細胞骨格とは異なり、細胞の分化の程度、発生胚葉の起源を反映し、細胞種によって異なり、現在 glial filament⁸⁾, neurofilament³⁵⁾, vimentin filament¹¹⁾, desmin filament²¹⁾, prekeratintonofilament⁴¹⁾, lamin A,C²⁷⁾ の6種が知られている。この中で glial filament, neurofilament, vimentin filament は中枢神経系細胞に深く関与し、とりわけ astrocyte の発生、

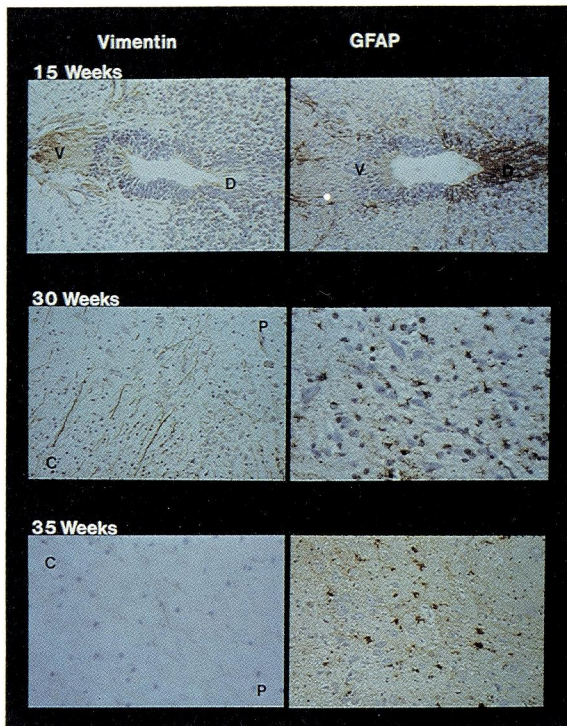


Fig.1 Human developing spinal cord : Vimentin positive cytoplasm and processes are less frequent as development, on the contrary GFAP positive structures become definite as development.

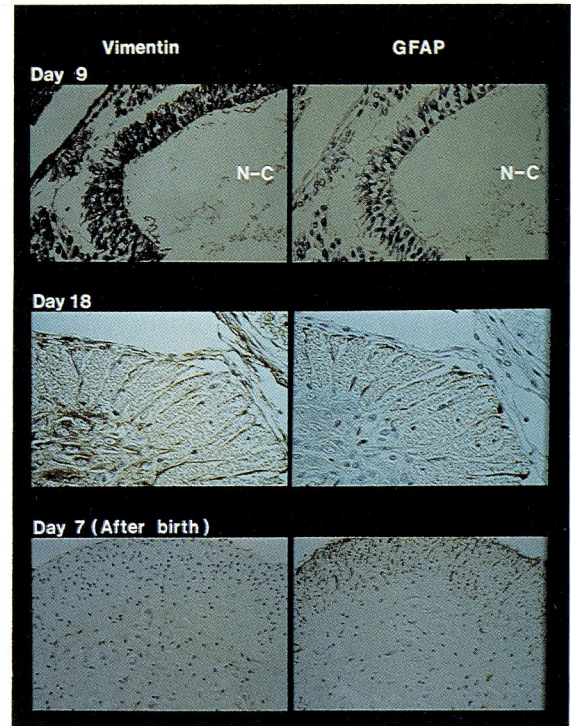


Fig.2 Rat embryonic spinal cord : Vimentin appears firstly in the immature cells circulating central canal and continues till postnatal day 7. GFAP appears on day 18 and becomes definite as development.

分化過程における、GFAP と vimentin の態様に関しては興味ある多数の報告がなされている⁴⁾¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾³⁸⁾⁴³⁾。著者らも developing human spinal cord および rat embryo における spinal cord の免疫組織学的検索において immature astrocyte の中間径線維の主体は vimentin であり、成熟度が増加するにつれ GFAP が astrocyte における中間径線維の主体なることを報告してきた¹⁹⁾²⁰⁾ (**Fig. 1, 2**)。著者らはこの結果を踏まえ抗 vimentin mouse monoclonal 抗体、抗 GFAP ウサギ血清による glioma の免疫組織学的検索を通じて glioma における anaplasia と中間径線維との関連を検索することを試みた。すなわち、neoplastic transformation に際しては一般的に再生組織内の replicating stem cell が target cell とされると考えられているが、中枢神経系組織にあっては胎生期の precursor cell、生後においてはその遺残細胞および differentiated astrocyte が target cell となると想定されている³⁾²³⁾³²⁾³³⁾。他方、GFAP は differentiated astrocytoma において多数の陽性細胞をみとめるが anaplasia が増加するにつれ陽性細胞は減少するとする報告が多い⁶⁾¹⁸⁾⁴⁴⁾⁴⁶⁾。これらのことより normal developing immature glia における GFAP, vimentin の態様が glioma の anaplastic pro-

cess にどのように反映されるか?に関する検討は中間径線維の anaplastic process of glioma における役割の手掛かりを、そして vimentin が anaplastic marker of glioma たり得るか否かを知るうえで重要である。

Vimentin の glioma における分布に関する報告は少なく一定の見解は得られていない²⁵⁾²⁶⁾³⁶⁾³⁷⁾⁴⁸⁾。

著者らは1984.4~1986.4までの glioma 63例について、免疫組織学的検索を行ない、上記検討事項について考察を加える。

材料と方法

1984.4~1986.4までの2年間に手術にて採取し得た glioma は63例である。組織型の内訳は Astrocytoma G-II 21例、Astrocytoma G-III 28例、Astrocytoma G-IV 4例、Oligodendroglioma 6例、Medulloblastoma 3例、Subependymoma 1例である。なお、動静脈奇形周囲の gliosis 組織も1例検索対象とした。手術にて採取した腫瘍組織を95%エタノールにて固定し、パラフィン包埋切片を作成した。抗 GFAP ウサギ血清(群馬大学第一病理学教室中里洋一博士御恵与)による各切片の染色は PAP 法に従い施行した。抗 vimentin mouse monoc-

lonal 抗体 (TRI, USA) による各切片の染色は ABC 法に従い施行した。

結 果

1) Reactive gliosis

GFAP, vimentin とともに多数の細胞胞体および突起に陽性所見を認める。しかしその反応性は vimentin においてより強調されている (Fig. 3)。

2) Subependymoma

GFAP は腫瘍細胞にわずかに陽性所見を認めるのみである。他方 vimentin は多数の腫瘍細胞に陽性所見をみとめるが、間質の線維構造物には陽性所見を認めない。

3) Medulloblastoma

GFAP, vimentin とともに腫瘍細胞に陽性所見は認めず、少数の reactive astrocyte に相当する細胞胞体および突起に陽性所見を認める。

4) Oligodendroglioma

GFAP, vimentin とともに perinuclear halo を示す腫瘍細胞に陽性所見は認めず、GFAP において astrocyte 様細胞胞体およびその突起に陽性所見を認める。他方 vimentin においては前記 astrocyte 様細胞は陰性であり血管内皮に陽性所見を認めるのみである。

5) Astrocytoma G-II

GFAP, vimentin とともに多数の腫瘍細胞および線維構造物に陽性所見を認めるが、両者に著明な染色性の差は認めない (Fig. 4)。

6) Astrocytoma G-III

GFAP 陽性所見を示す腫瘍細胞は G-II に比べ少なく、vimentin のみ陽性所見を示す領域も認められる (Fig. 5)。

7) Astrocytoma G-IV

GFAP, vimentin 陽性細胞は G-III に比べ少ないが、vimentin のみ陽性所見を示す腫瘍細胞を認める。しかし、vimentin 陽性細胞に形態的特徴はなく、polynuclear giant cell が GFAP, vimentin とともに陽性所見を示す領域も認められ (Fig. 6)、染色性は多様である。

考 察

中間径線維は微小管、ミオシン線維、アクチン線維とともにすべての真核細胞に存在する細胞骨格と呼ばれる繊維状構造物である。Ishikawa ら¹⁷⁾により細胞内構造物として明確に定義されて以後数多くの研究の積み重ねにより中間径線維は現在、glial

filament⁸⁾, neurofilament³⁵⁾, vimentin filament¹¹⁾, desmin filament²¹⁾, prekeratintonofilament⁴¹⁾, lamin A,C²⁷⁾の6種が知られている。これら6種の間径線維はSteinertら⁴²⁾によれば共通構造(ドメイン説)を持つとされる。すなわち、中間径線維蛋白質には2つのらせんドメインと、これらをはさむ3つの非らせんドメインとがあり、らせんドメインは各中間径線維において酷似したアミノ酸配列を示す¹²⁾³⁰⁾³¹⁾。他方、非らせんドメインは各中間径線維固有のアミノ酸配列を有し、分子量、抗原性の差異を生じさせていると考えられている¹³⁾。また、中間径線維は細胞分化の程度、発生胚葉の起源を反映し細胞種によりことなり、とりわけ脊椎動物の中樞神経系細胞においては極めて細胞特異的に存在することが知られている⁵⁾⁹⁾²⁸⁾⁴⁰⁾⁴⁵⁾。その中でglial cell, neuronal cellの分化過程におけるGFAP, neurofilament protein, vimentinの態様に関する報告は興味深い⁴⁾¹⁵⁾¹⁹⁾²⁰⁾³⁸⁾⁴³⁾。著者らはhuman developing spinal cord, rat embryoの中樞神経系におけるGFAP, neurofilament protein, vimentinの分布について検討をおこない、immature astrocyte, immature neuronal cellにおける中間径線維の主体はvimentinであり、maturationに従いastrocyte, neuronal cellの中間径線維はそれぞれGFAP, neuronal filament proteinが主体となることを示してきた¹⁹⁾²⁰⁾。このような中樞神経系の発生分化過程におけるGFAP, vimentinの態様がgliomaのanaplasiaあるいはdedifferentiationにどの様に反映され得るかの検索は、細胞骨格の一要素である中間径線維のみによる腫瘍細胞へのapproachであるという限りで、限定されてはいるものの興味あるところである。すなわち、neoplastic transformationにおいて再生組織内のreplicating stem cellが一般的にtarget cellとなるとされているが、中樞神経系においてはdifferentiated astrocyte, 胎生期のprecursor cellおよびその遺残細胞がtarget cellとなると考えられている³⁾²³⁾³²⁾³³⁾。遺残細胞の5 main lociとしてLewisら²³⁾は、①subependymal layer, ②glial proliferation in the cortex, ③fetal external granular layer of cerebellum, ④dentate fascia of the hippocampus, ⑤subpial granular layer of cerebral hemisphereを報告している。また、これらtarget cellとなる細胞が発生分化過程のどの段階でfirst hit of neoplastic transformationをうけるかにより腫瘍型は決定されるものとRubinstein³²⁾は考えている。したがってgliomaにおけるanaplasiaあるいはdedifferentiationに正常gliaの発生分化過程でのGFAP, vimen-

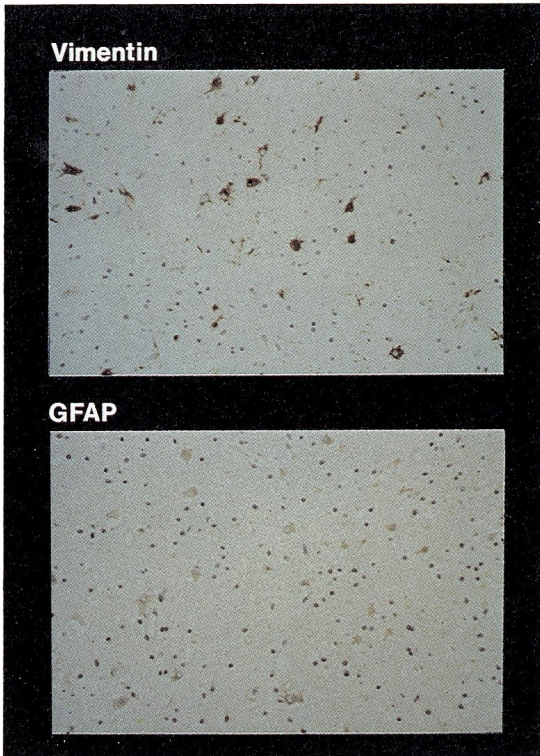


Fig.3 Reactive gliosis : Many cell are GFAP,vimentin positive, but GFAP is less stained.

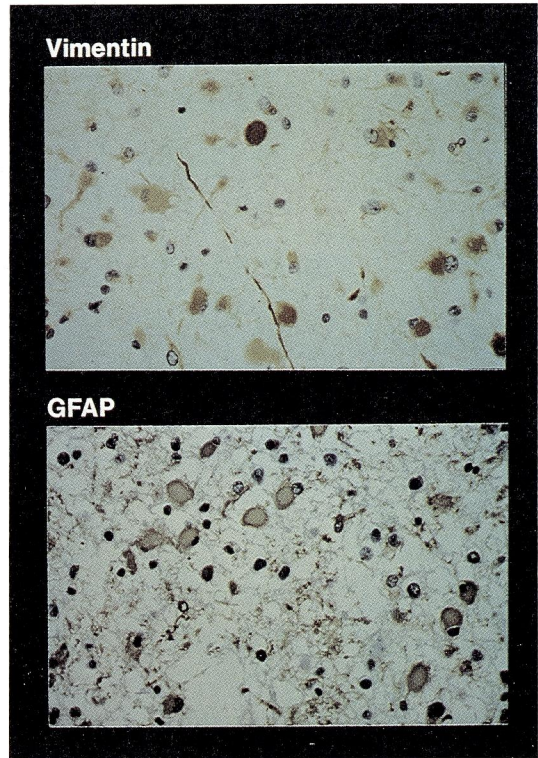


Fig.4 Astrocytoma G- II : Many neoplastic cells are GFAP,vimentin positive, but the significant difference between GFAP and vimentin stained attitude is not present.

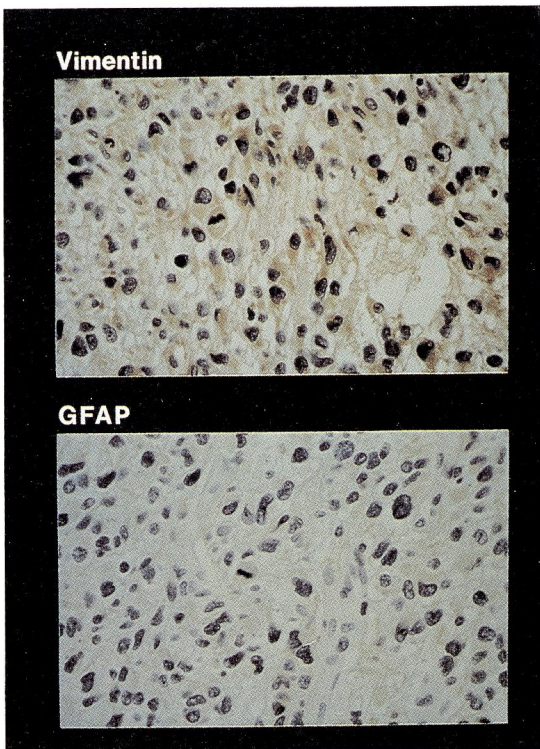


Fig.5 Astrocytoma G- III : Neoplastic cells are only vimentin positive, GFAP is negative.

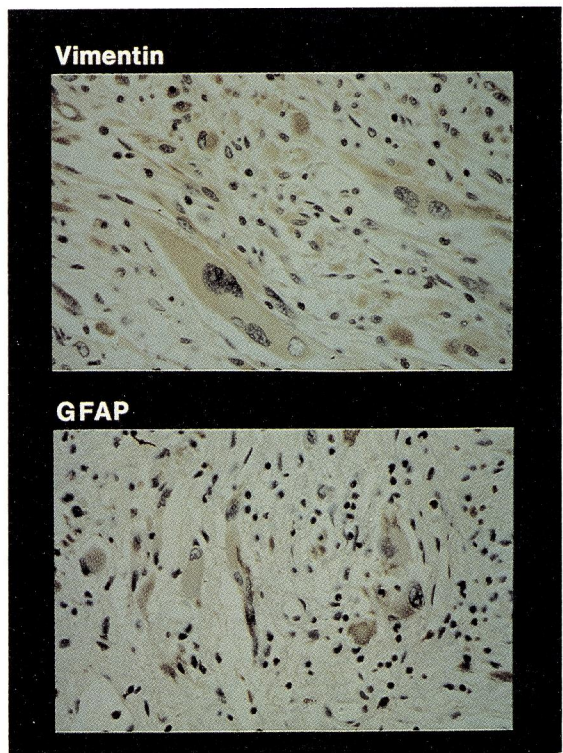


Fig.6 Astrocytoma G- IV : Giant polynuclear cells are GFAP,vimentin positive.

tin の態様が反映されるとすれば、vimentin は glioma の anaplasia につれ腫瘍細胞の主要な中間径線維となるであろうことが推測される。著者らの検索結果では low grade astrocytoma においては vimentin, GFAP とともにほぼ同様の染色態様を示し、Wang ら⁴⁷⁾ の言うように astroglial filament が GFAP, vimentin よりなる heteropolymer であることを示すものと考えられる。一方、high grade astrocytoma においては明らかに GFAP, vimentin 陽性細胞数は減少するが、vimentin 陽性細胞数は GFAP 陽性細胞数より多い傾向を示す。しかし vimentin 陽性細胞は形態的特徴はなく染色性も多様である。さらに glioma において増殖主体と考えられている small round cell⁴⁴⁾ に対する染色性は殆ど認められない。この結果は Schiffer ら³⁶⁾³⁷⁾ の報告とも一致し、vimentin は glioma における immaturity の marker たりえないことを示すものと考えられる。また、中間径線維を通じて glioma における anaplasia を見た場合、正常 glial cell の発生分化過程での GFAP, vimentin の態様は反映されているとは言い難い。すなわち、anaplasia が本来意味する「先祖がえり」が glioma において一般的に存在すると考えるより、GFAP, vimentin の high grade astrocytoma における染色性の多様性は腫瘍性増殖による形態変化 (kataplasia) が high grade astrocytoma においては主体となることを示すものと考えられる。また腫瘍性増殖による形態変化は proliferating cell の増加によるものと考えられるが、石田¹⁶⁾ が述べるように glioma における構成細胞の多態性のみではかならずしも悪性の指標とは言えず、組織診断に際しては慎重な配慮が必要である。したがって glioma における「悪性」の診断に際しては BUdR, Ki 67 などを用いた proliferating cell の算定が必須となる。

用語上の問題をのこすものの Rubinstein ら³²⁾³³⁾ は、anaplasia とは proliferating cell pool の増大を意味するとし、これをもって glioma における malignancy の増加と考えている。したがって今後 proliferating cell の種々のマーカーを用いた免疫組織電顕的検索を含め多方面からのアプローチが必要とされる。

最後に、現在多領域において用いられている免疫組織学的手法はその有用性ととも問題および限界も明らかになってきており、そのなかでも使用抗体の問題に関しては多数の報告がなされてきている^{1) 2) 7) 10) 22) 24) 29) 34) 39)}。とりわけ 6 種の中間径線維に対する抗体については前述したように各中間径線維が酷

似したアミノ酸配列を示すらせんドメインを基本構造としてもつため、らせんドメインをエピトープとする抗体は種々の問題をはらむことになる。したがって使用抗体に対しては慎重な配慮が必要とされる。

まとめ

Glioma 63例において、Vimentin および GFAP に対する特異抗体を用いて免疫組織学的検討をおこなった。

Low grade astrocytoma では、Vimentin, GFAP とともにほぼ同様の染色態様を示したが、high grade astrocytoma では GFAP 陽性細胞、Vimentin 陽性細胞とも減少する傾向が示された。Vimentin 陽性細胞では形態的特徴はなく、染色性も多様であった。

その結果、正常 glia 細胞の発生分化過程における Vimentin, GFAP の発現様式が glioma の anaplastic process に反映されているとは言い難く、high grade astrocytoma では、腫瘍性増殖による形態学的変化が主体をなしていると考えられた。

文 献

- 1) Albrechtsen M, Gerstenberg CV, Bock E: Mouse monoclonal antibodies reacting with human glial fibrillary acidic protein. *J Neurochem* 42: 86-93, 1984
- 2) Autilio-Gambetti L, Velasco ME, Sippl J, Gambetti P: Immunochemical characterization of antisera to rat neurofilament subunits. *J Neurochem* 37: 1260-1265, 1981
- 3) Bigner DD, Pederson HB: A proposed basis for the therapeutic resistance of gliomas. *Semin Neurol* 1: 169-179, 1981
- 4) Dahl D, Rueger DC, Bignami A: Vimentin, the 57000 molecular weight protein of fibroblast filament, is the major cytoskeletal component in immature glia. *Eur J Cell Biol* 24: 191-196, 1981
- 5) Deck JHN, Eng LF, Bigbee J: The role of glial fibrillary acidic protein in the diagnosis of central nervous system tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 40: 183-190, 1978
- 6) Duffy PE, Huang YY, Rapport MM: Glial fibrillary acidic protein in giant cell tumors of brain and other gliomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 52: 51-57, 1980
- 7) Edwards PAW: Some properties and applications of monoclonal antibodies. *J Biochem* 200: 1-10, 1981
- 8) Eng LF, Vanderhaeghen JJ, Bignami A: An acidic protein isolated from fibrous astrocytes. *Brain Res* 28: 351-354, 1971
- 9) Eng LF, Rubinstein LJ: Contribution of immunohistochemistry to diagnostic problems of human cerebral tumors. *J Histochem Cytochem* 7: 513-522, 1978
- 10) Eng LF, Dearmond SJ: Immunocytochemistry of the glial fibrillary acidic protein. in *Neuropathology* (Zimmerman

- HM ed), Raven press, New York, 1983, pp 19-39
- 11) Franke WW, Schmid E, Osborn M : Different intermediate-sized filaments distinguished by immunofluorescence microscopy. *Proc Natl Acad Sci USA* 75 : 5034-5038, 1978
 - 12) Geisler N, Weber K : The amino acid sequence of chicken muscle desmin provides a common structural model for intermediate filament protein. *EMBO J* 1 : 1649-1656, 1982
 - 13) Geisler N, Plessmann U, Weber K : Related amino acid sequences in neurofilaments and non-neural intermediate filaments. *Nature* 296 : 448-450, 1982
 - 14) Hoshino T, Wilson CB, Ellis WG : Gemistocytic astrocytes in gliomas. An autoradiographic study. *J Neuropathol Exp Neurol* 34 : 263-281, 1975
 - 15) Houle J, Fedoroff S : Temporal relationship between the appearance of vimentin and neural tube development. *Develop Brain Res* 9 : 189-195, 1983
 - 16) 石田陽一 : 脳腫瘍マーカー. *神経進歩* 31 : 346-355, 1987
 - 17) Ishikawa H, Bischoff R, Holtzer H : Mitosis and intermediate-sized filaments in developing skeletal muscle. *J Cell Biol* 38 : 538-555, 1968
 - 18) Jacque CM, Vinner C, Kujas M : Determination of glial fibrillary acidic protein (GFAP) in human brain tumors. *J Neurol Sci* 35 : 147-155, 1978
 - 19) 鎌田 一, 荒 清次, 堀田隆史, 中村順一, 末松克美 : Developing human spinal cord の免疫組織学的検索. *脳神経* 36 : 229-255, 1984
 - 20) 鎌田 一, 荒 清次, 堀田隆史, 中村順一, 末松克美 : Rat embryo の免疫組織学的検索. *脳神経* 40 : 211-218, 1988
 - 21) Lzarides E, Hubbard BD : Immunological characterization of the subunit of the 100Å filaments from muscle cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 73 : 4344-4348, 1976
 - 22) Lee VMY, Page CD, Wu HL : Monoclonal antibodies to gel-excised glial filament protein. *J Neurochem* 42 : 25-32, 1984
 - 23) Lewis PD : Cell proliferation in the postnatal nervous system and its relationship to the origin of glioma. *Semin Neurol* 1 : 181-187, 1981
 - 24) Liem RKH, Yen SH, Salomon GD : Intermediate filaments in the nervous system. *J Cell Biol* 79 : 637-645, 1978
 - 25) 丸野元彦, 吉峰俊樹, 生塩之敬 : Vimentin および astroprotein (GFAP) による ENU 誘発ラット脳腫瘍の免疫組織化学的研究. *脳神経* 37 : 1173-1179, 1985
 - 26) 丸野元彦, 吉峰俊樹, 生塩之敬 : ヒト脳腫瘍における中間径 filament の発現様式. *脳神経* 39 : 579-585, 1987
 - 27) McKeon FD, Kirschner MW, Caput D : Homologies in both primary and secondary structure between nuclear envelope and intermediate filament proteins. *Nature (Lond)* 319 : 463-468, 1986
 - 28) Mori H, Kurokawa M : Morphological and biochemical characterization of neurofilaments isolated from the rat peripheral nerve. *Biochem Res* 1 : 24-31, 1980
 - 29) Osborn M, Geisler N, Shaw G : Intermediate filaments. *Cold Spring Harbor Symp Quant Biol* 46 : 413-429, 1981
 - 30) Pruss RM, Mirsky R, Raff MC : All classes of intermediate filaments share a common antigenic determinant defined by a monoclonal antibody. *Cell* 27 : 419-428, 1981
 - 31) Quax-Jeuken YEFM, Quax WJ, Bloemendal H : Primary and secondary structure of hamster vimentin predicted from the nucleotide sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* 80 : 3548-3552, 1983
 - 32) Rubinstein LJ, Herman MM, Vandenberg SR : Differentiation and anaplasia in central neuroepithelial tumors. *Prog Exp Tumor Res* 27 : 32-48, 1984
 - 33) Rubinstein LJ : A commentary on the proposed revision of the World Health Organization classification of brain tumors for childhood brain tumors. *Cancer* 56 : 1887-1888, 1985
 - 34) Rueger DC, Gardner EE, Simonian HD : Purified glial fibrillary acidic protein and desmin are distinct intermediate filament proteins exhibiting similar properties. *J Biol Chem* 256 : 10606-10612, 1981
 - 35) Schhlaepfer W, Freeman LA : Neurofilament protein of rat. Peripheral nerve and spinal cord. *J Cell Biol* 78 : 653-662, 1978
 - 36) Schiffer MT, Giordana A, Mauro A : Immunohistochemical demonstration of vimentin in human cerebral tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 70 : 209-219, 1986
 - 37) Schiffer MT, Blfome A, Giaccone G : Vimentin compared to GFAP, in glioma and reactive glia. X th International Congress of Neuropathol : 434, 1986
 - 38) Schnitzer J, Franke WW, Schachner M : Immunocytochemical demonstration of vimentin in astrocytes and ependymal cells of developing and adult mouse nervous system. *J Cell Biol* 90 : 435-447, 1976
 - 39) Sharp G, Osborn M, Weber K : Occurrence of two different intermediate filament proteins in the same filament in situ within a human glioma cell line. *Exp Cell Res* 141 : 385-395, 1982
 - 40) Shaw G, Weber K : Differential expression of neurofilament triplet proteins in brain development. *Nature* 298 : 277-279, 1982
 - 41) Steinert P, Idler WW, Zimmerman SB : Self-assembly of bovine epidermal keratin filament in vitro. *J Mol Biol* 108 : 547-567, 1976
 - 42) Steinert PM, Idler WW, Goldman RD : Intermediate filaments of baby hamster kidney (BHK-21) cells and bovine epidermal keratinocytes have similar ultrastructures and subunit domain structures. *Proc Natl Acad Sci USA* 77 : 4534-4538, 1980
 - 43) Tapscott SJ, Bennett GS, Toyama Y : Intermediate filament protein in the developing chick spinal cord. *Dev Biol* 86 : 40-54, 1981
 - 44) Tascos NA, Parr J, Gonatas NK : Immunocytochemical study of the glial fibrillary acidic protein in human neoplasms of the central nervous system. *Hum Pathol* 13 : 454-458, 1982

- 45) Van der Meulen JDM, Houthoff HJ, Ebels EJ : Glial fibrillary acidic protein in human gliomas. *Neuropathol Appl Neurobiol* 40 : 177-190,1978
- 46) Velasco ME, Dhal D, Gambetti P : Immunohistochemical localization of glial fibrillary acidic protein in human glial neoplasms. *Cancer* 45 : 484-494,1980
- 47) Wang E, Cairncross JG, Liem RK : Identification of glial filament protein and vimentin in the same intermediate filament system in human glioma cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 81 : 2102-2106,1984
- 48) Yung WA, Luna M, Borit A : Vimentin and glial fibrillary acidic protein in human brain tumors. *J Neuro-Oncol* 3 : 35-38,1985