

神経膠腫の multiplicity の発生機序に関する検討

— p53 gene の codon 72 polymorphism 検出法を用いて —

岡 亨治、伊東民雄、堀田隆史、猿田 武*
奥村智吉、西谷幹雄**、中村順一、末松克美*

Examination of mechanism of multiplicity in the glial tumor using detection of codon 72 polymorphism in the p53 gene.

Koji OKA, Tamio ITO, Takashi HOTTA, Takeshi SARUTA*, Tomoyoshi OKUMURA, Mikio NISHIYA**, Jun-ichi NAKAMURA, Katsumi SUEMATSU*

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

Summary : Mechanism of multiplicity in the glial tumor is still unknown. The p53 gene has been implicated as a tumor suppressor gene and abnormality of this gene has been reported in many human glial tumors. Codon 72 polymorphism in the p53 gene can be detected by digestion of polymerase chain reaction-amplified DNA using allele-specific restriction endonuclease (PCR-RFLP). We analyzed the DNA from the tissue in the two separated enhanced lesions of Gd-MRI in the same patient using this PCR-RFLP method and detected loss of the same allele of the p53 gene in each enhanced area. This result suggests there is a possibility that the two separated lesions originated from same progenitor cell and the multiplicity of this case resulted from metastatic mechanism.

Key words :

- glioma
- multiplicity
- P53gene
- LOH
- codon72

1. はじめに

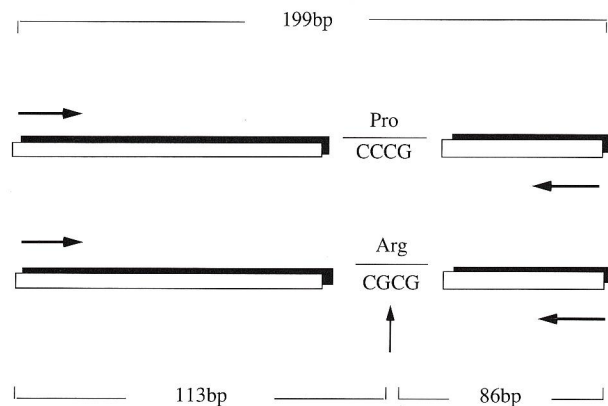
Russell and Rubinstein は、(a) spread via commissural or other pathways、(b) spread via cerebrospinal fluid channels、(c) local metastasis のいずれかの機序により multiplicity となったものを multiple glioma とし、上記のいずれの進展形式によっても説明のつかないような multiplicity を有するものを multicentric glioma とすることを提案した¹⁾。その後この提案に基づき、multicentric glioma としての症例報告が数多くなされている。しかし、神経膠腫の multiplicity の発生機序に関し

ては未だに不明な点が多いと言わざるを得ない。

H-E 染色を主体とした組織学的所見のみを根拠に論ずるしかなかった時代と異なり、現在は様々な抗体による特種染色、分子生物学的な検討も可能となっており、今一度、multiplicity の発生機序を検討する必要があると思われる。

癌抑制遺伝子として知られる p53 gene の異常は、神経膠腫の発生に深く関わっていることが推定されており、神経膠腫の約50%の症例で認められるとする報告が多い⁴⁾⁷⁾¹⁰⁾。p53 gene の codon 72 (以下 Cd 72) には

polymorphism の存在することが知られているが⁵⁾¹⁶⁾、Cd72 が CGC と arginine を code している場合は、そこに、制限酵素 ACC II で切断される部位が生じるのに対し、CCC と proline を code する場合は本酵素の切断部位とはならない。Polymerase chain reaction (以下 PCR) 法と制限酵素による digestion を併用した、PCR-RFLP 法を用いることで、この polymorphism の検出が可能となる¹⁾。Fig. 1 に示すように p53 gene



exon 4 内の 5 末端側と 3 末端側に primer (後述) を設定し PCR を施行後、その PCR 産物を ACC II で処理し電気泳動を行うことで、Cd72 の arginine の allele と proline の allele とを判別することができる。すなわち、Cd72 において arginine の homozygous である場合は、113bp と 86bp の二本の band が、proline の homozygous の場合は 199bp の一本の band が、heterozygous の場合は 113bp, 86bp, 199bp の三本の band が電気泳動上観察される。これを利用して、患者の正常リンパ球と腫瘍細胞から抽出した DNA から、p53 gene の loss of heterozygosity (以下 LOH) を検出することが可能となる¹⁰⁾¹⁸⁾。

我々は、enhanced CT、Gd-MRI では連続性の認められない 2 個の enhanced lesion を有する神経膠腫の症例を経験し、おのおのの摘出標本のパラフィン包埋切片から DNA を抽出し、前述した PCR-RFLP 法を用い、p53 gene の LOH の有無を検討した。それらの結果と共に、神経膠腫の multiplicity の発生機序について、考察を加え報告する。

2. 症 例

症例は 39 歳女性。エンハンス CT、Gd-MRI では、右

側頭葉内側面と右後頭葉に 2 個の enhanced lesion が認められるが、両 enhanced lesion の連続性は明らかではない (Fig. 2)。MRI T2 強調画像では、Gd-MRI の enhanced lesion の周囲に広がる high intensity の領域での連続性が認められた (Fig. 3)。右側頭葉、右後頭葉の病巣に対して enhanced lesion の摘出を目的に、二期的に手術を施行した。病理組織学的には、両組織とも astrocytoma grade III と診断された (Fig. 4)。

Fig.2



Fig.3

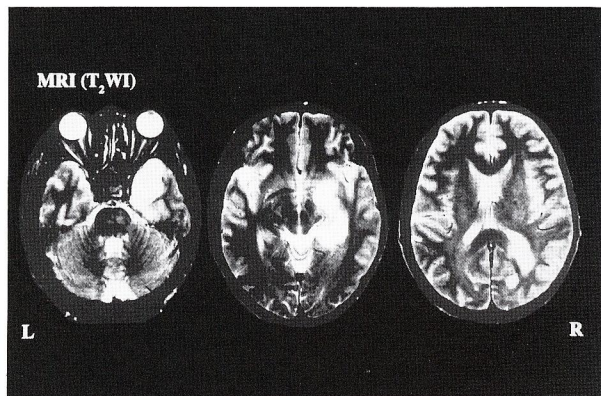
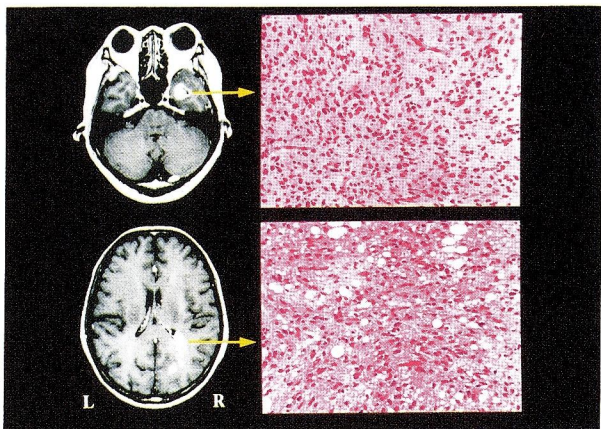


Fig.4



3. 方 法

(DNAの分離)

患者正常リンパ球からの DNA 分離は Davis らの報告に従った⁶⁾。

パラフィン包埋切片からの DNA 分離では H-E 染色にて正常細胞の混在ができるだけ少ない領域を選択し、10 μ mの厚さの切片5枚を切り出し、DNA 分離に使用した。xyleneにて脱パラフィン処理した後に、digestion buffer (50mM Tris, 5mM EDTA, 300 μ g/ml proteinase K, 1% SDS : pH8)を加え55度にて約6時間 incubateし、その後 phenol-chloroform による除蛋白、ethanol 沈澱にて genomic DNA を分離し、その内の約1 μ gの DNA を PCR に使用した。

(PCR-RFLP)

p53 gene の exon4 内に設定した、sense 鎖 5'-TTGCCGTCCCAAGCAATGGATGA-3', antisense 鎖 5'-TCTGGGAAGGGACAGAAGATGA-3'の両 primer 50 pmol と 1 μ gの分離した DNA を、1.25mM の各種 dNTP、10mM Tris-HCl (pH8.3)、50mM KCl、2mM MgCl₂、0.01% gelatin、2.5U Taq DNA polymerase からなる PCR 用溶液に加え、下記の条件で PCR を施行した。

93℃	4分間	} 30cycle
93℃	90秒間	
60℃	60秒間	
72℃	60秒間	
72℃	7分間	

PCR の増幅産物を ethanol 沈澱で回収し、制限酵素 ACC II を用い37℃で約3時間消化し、1 μ g/ml ethidium bromide を含む4% NuSieve Agarose にて電気泳動を行った後、UV trans-illuminater にて観察した。

4. 結 果

患者の末梢血リンパ球から抽出した DNA は、Cd72 において heterozygous であったが、側頭葉、後頭葉から摘出した腫瘍から抽出した DNA は共に Proline の allele が消失し、arginine の homozygous となっていることが確認された (Fig. 5)。199bp に faint な band が認められるが、明らかに50%以上の reduction があり、標本に存在する normal cell contamination によるものと考えられた。

Fig.5

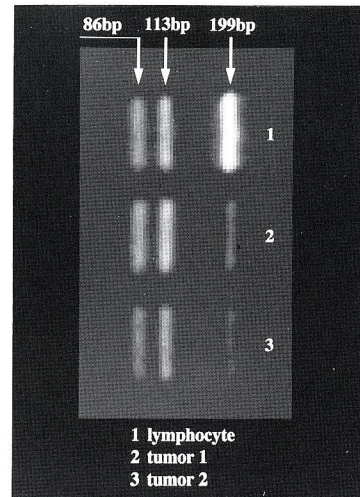
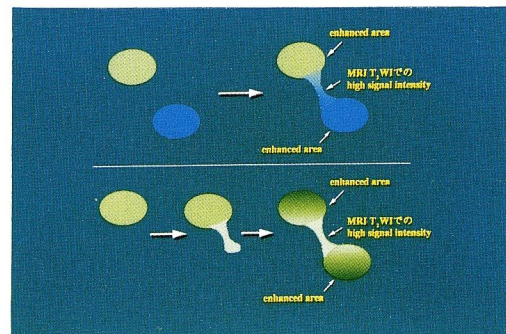


Fig.6



5. 考 察

Russell and Rubinstein は、(a) spread via commissural or other pathways, (b) spread via cerebrospinal fluid channels, (c) local metastasis のいずれかの機序により multiplicity となったものを multiple glioma とし、上記のいずれの進展形式によっても説明のつかないような multiplicity を有するものを multicentric glioma (以下狭義の multicentric glioma) とすることを提案した¹⁹⁾。これに対し Zülch は glioma の multiplicity の発生機序はあくまで脳内転移による立場をとり²¹⁾、未だに不明な点があると言わざるを得ない。

Russell and Rubinstein の狭義の意味での multicentric glioma としての過去の報告は、2つの腫瘍間の連続性を否定できる場合か、組織学的所見が異なることを根拠としているものが多い¹³⁾¹⁷⁾。しかし、狭義の意味での multicentric glioma が異なる progenitor cell から発生した腫瘍であることを意味していると考えれば、過去の報告にはいくつかの疑問点が存在する。

第一に腫瘍間の連続性についてであるが、MRI の普及に伴い、T2 強調画像で enhanced lesion の周囲に認

められる high intensity area は、CT の enhanced lesion 周囲の low density area よりも通常ひろく観察され、さらにこの T2 強調画像の high intensity area には多くの場合腫瘍細胞の浸潤が認められることが知られている⁹⁾。multiple な enhanced lesion が存在し、T2 強調画像上の high intensity の領域で overlap していたとしても、Fig. 6 上段で示すように、異なる origin から発生し、周囲への浸潤部位で重なっている場合と、Fig. 6 下段で示すように浸潤領域から focus を作るように離れた場所に enhanced lesion が形成される場合が考えられ、このことが異なる progenitor cell からの腫瘍発生を否定する根拠とはなり得ない。autopsy においても、離れた enhanced lesion を形成する腫瘍細胞を個々の level で判別できないかぎり、浸潤領域での腫瘍細胞のつながりだけを根拠に、狭義の意味での multicentric glioma を否定はできないと思われる。

第二に、異なる histological finding を根拠に multicentric glioma であるとしている文献も散見されるが、その中には astrocytoma の悪性度の違いを根拠にしているものも含まれている。colon cancer の様に臨床的にも分子生物学的な検討からも、神経膠腫では、少なくとも一部に多段階の悪性化が存在することが知られており¹¹⁾、悪性度の違いのみから異なる progenitor cell からの腫瘍化とするのは、疑問と言わざるを得ない。glioblastoma も以前の WHO 分類では胎児性腫瘍の範疇に含まれていたが、現在は glioma cell が、腫瘍の成長又は発生の段階で退形成を来し生じる腫瘍であるという概念が通念になりつつある。Fig. 6 下段で示すような機序で multiple lesion が形成され、そのなかの何れかの lesion のみが退形成を来し、より悪性度の高い glioma となることは理論上十分考えられるわけで、組織学的悪性度の違いのみを根拠に狭義の multicentric glioma であるとするには賛同できない。

glioblastoma multiforme の細胞レベルで、phenotype 並びに生物学的な heterogeneity が存在することは広く知られている。Richard らは、glioblastoma の組織を用いて、X 染色体不活化を利用した monoclonality の検出法を利用し、これらの heterogeneity は polyclonal な腫瘍化のため生じたものではなく、本腫瘍が monoclonal な neoplasm であることを証明した³⁾。このことは、同じ progenitor cell から腫瘍化したものか異なる progenitor cell から発生したものを、組織学的な

phenotype によって判別することの難しさをも示していると言える。近年の分子生物学の発展に伴い、悪性新生物の多くが遺伝子疾患としてとらえられてきている現状を踏まえると、その遺伝子変化の相違をもって multiplicity 発生の機序を考慮する必要があると思われる。

p53 gene の異常が多くの glioma で認められるとする近年の報告⁴⁾⁷⁾¹⁰⁾と、p53 gene の germ line mutation がある程度の比率で認められる Li-Fraumeni 症候群の家系で glioma が多発すること等から、glioma の発生に p53 gene の異常が深く関わっていることが推定されている。RFLP による malignant glioma の染色体17番短腕の LOH、codon 72 polymorphism による p53 gene の LOH の頻度は約50%と報告されている²⁾⁷⁾¹⁰⁾。

今回、我々が経験した症例の2個の enhanced lesion では、それぞれの部位で p53 gene の LOH が確認され、しかも消失した allele が同一のものであった。このことは、独立して発生した lesion のおのおので proline の allele の消失による p53 gene の LOH が生じた可能性を否定するものではないが、過去の報告の p53 gene の LOH の頻度を考慮すると、同一の細胞に起源を有するものである可能性が高く、Zulch のいう脳内転移が multiplicity 発生に関わっていることを強く疑わせるものといえる。

glioma における p53 gene の異常で、LOH と点突然変異のどちらが先に生じるかは未だに議論のあるところと思われる。しかし、James らが、glioma での染色体17番の LOH は、染色体自身の欠失によるものではなく、mitotic recombination により生じるものが多いと報告しており¹²⁾、Knudson がいう two hit¹⁴⁾ が glioma 細胞の p53 gene で生じていると仮定すれば、点突然変異の前に mitotic recombination が生じて、wildtype の allele が二つそのまま存在することになり、腫瘍化には新たな two hit が必要となる。以上より、glioma における p53 gene の異常は、点突然変異が先に生じ、その後 mitotic recombination 等の機序により、mutant type の p53 gene が two allele となることが多いと推定され、LOH の認められる本症例の二つの enhanced lesion ではすでに p53 gene の点突然変異が生じている可能性が高いといえる。urothelial cancer では以前より multifocal な発生が知られており、それが single progenitor cell から発生したのか否かの議論は以前より行われていた。Habuchi らは multifocal urothelial cancer の p53

gene の点突然変異を調べ、p53 gene の同じ部位に全く同じ点突然変異が認められることを示し、これらが single progenitor cell 由来のものであることを示した⁸⁾。今回の我々の報告は、p53 gene の LOH についてのみの検討となっているが、p53 gene に突然変異が認められるかどうかと、もし認められた場合、それが両組織で同じ点突然変異であるかを調べることで、single progenitor cell 由来のものかどうか、より明らかなものとなると考えられ、今後の検討課題としたい。

6. 結 語

(1)PCR を用いた本方法は、パラフィン包埋切片からでも p53 gene の LOH 検出が可能であり、通常の H-E 染色から腫瘍細胞の優れた場所を選定でき、正常細胞の混入を最小限にする意味で有用と考えられた。

(2)今回提示した症例の 2ヶ所の enhanced lesion は、共に、p53 gene codon 72において proline の allele の消失を示し、断定はできないが、腫瘍細胞の浸潤により形成された multiple lesion であることが強く疑われた。

(3)遺伝子レベルでの解析が、glioma の multiplicity の発生機序の解明に必要と思われた。

文 献

- 1) Ara S, Lee PSY, Hansen MF, Saya H : Codon 72 polymorphism of the TP53 gene. *Nucleic Acid Research* 18 : 4961, 1991
- 2) Azouzi ME, Chung RY, Farmer GE, Martuza RL, Black PM, Rouleau GA, Hettlich C, Hedley-Whyte ET, Zervas NT, Panagopoulos K, Nakamura Y, Gusella JF, Seizinger BR : Loss of distinct regions on the short arm of chromosome 17 associated with tumorigenesis of human astrocytomas. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 7186-7190, 1989
- 3) Berkman RA, Clark WC, Saxena A, Robertson JT, Oldfield EH, Ali IU : Clonal composition of glioblastoma multiforme. *J Neurosurg* 77 : 432-437, 1992
- 4) Bruner LM, Saya H, Moser RP : Immunocytochemical detection of p53 in human gliomas. *Mod Patol* 4 : 671-674, 1991
- 5) Buchman VL, Chumakov PM, Ninkina NN, Samarina OP, Georgiev GP : A variation in the structure of the protein-coding region of the p53 gene. *Gene* 70 : 245-252, 1988
- 6) Davis LG, Dibner MD, Battery JF : *Basic Methods in Molecular Biology*. Elsevier, New York, 1986.
- 7) Fults D, Tippets RH, Thomas GA, Nakamura Y,

White R : Loss of heterozygosity for loci on chromosome 17p in human malignant astrocytoma. *Cancer Res* 49 : 6572-6577, 1989

- 8) Habuchi T, Takahashi R, Yamada H, Kakehi Y, Sugiyama T, Yoshida O : Metachronous multifocal development of urothelial cancers by intraluminal seeding. *Lancet* 342 : 1087-1088, 1993
- 9) 早川徹 : 悪性脳腫瘍の臨床的病態像の特徴、悪性神経膠腫. 現代医療社 : 81-93, 1989
- 10) 飯島淳子, 佐和弘基, 椎名義雄, 星野孝夫 : PCRを用いた p53 遺伝子の codon 72 部位におけるポリモルフィズムの検索と脳腫瘍への応用. *脳神経* 45 : 43-47, 1993
- 11) James CD, Calbom E, Dumanski JP, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK : Clonal genomic alterations in glioma malignancy stages. *Cancer Res* 48 : 5546-5551, 1988
- 12) James CD, Calbom E, Nordenskjold M, Collins VP, Cavenee WK : Mitotic recombination of chromosome 17 in astrocytoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 86 : 2858-2862, 1989
- 13) 北原正和, 和田徳男, 佐藤智彦 : 多発性神経膠腫の 2 例. *脳外* 10 : 1313-1317, 1982
- 14) Knudson AG Jr : Mutation and cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* 68 : 820-823, 1971
- 15) Malkin D, Li FP, Strong LC, Fraumeni JF Jr, Nelson CE, Kim DH, Kassel J, Gryka MA, Bischoff FZ, Tainsky MA : Germ line p53 mutations in a familial syndrome of breast cancer, sarcomas, and other neoplasms. *Science* 250 : 1233-1238, 1990
- 16) Matlashewski GJ, Tuck S, Pim D, Lamb P, Schneider J, Crawford LV : Primary structure polymorphism at amino acid residue 72 of human p53. *Mol Cell Biol* 7 : 961-963, 1987
- 17) 野中信仁, 倉津順一, 三浦義一, 松角康彦 : Multicentric glioma の 1 例. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 23 : 751-754, 1983
- 18) Oka K, Ishikawa J, Bruner JM, Takahashi R, Saya H : Detection of loss of heterozygosity in the p53 gene in renal cell carcinoma and bladder cancer using the polymerase chain reaction. *Molecular Carcinogenesis* 4 : 10-13, 1991
- 19) Russell DS, Rubinstein LJ : *Pathology of tumors of the nervous system*. E Arnold Ltd, London : 152-153, 1959
- 20) Srivastava S, Zou ZQ, Pirolo K, Blattner W, Chang EH : Germ-line transmission of a mutated p53 gene in a cancer-prone family with Li-Fraumeni syndrome. *Nature* 348 : 747-749, 1990
- 21) Zülch KJ : *Brain tumors, their biology and pathology*. Springer Publishing Co Inc, New York, 1965