

星細胞系腫瘍におけるデコイレセプター3の遺伝子増幅と遺伝子発現の解析

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/4580

星細胞系腫瘍におけるデコイレセプター 3 の遺伝子増幅と 遺伝子発現の解析

金沢大学医学部医学科脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

荒 川 泰 明

デコイレセプター 3 (decoy receptor 3, DcR3) は、腫瘍壊死因子 [tumor necrosis factor (TNF)] 受容体ファミリーに属し、肺癌や大腸癌においては高率に DcR3 の遺伝子増幅を認めることが知られている。その遺伝子産物は Fas リガンド (Fas ligand, FasL) に対して Fas (CD95) と競合することにより、アポトーシスに対する負の調節因子として作用する。本研究では、星細胞系腫瘍 (astrocytic tumor) において、DcR3 遺伝子の増幅の有無を半定量的 PCR 法を用い、DcR3 mRNA の発現をリアルタイム半定量的逆転写 (reverse transcription, RT) -PCR 法を用い、さらに、Fas 蛋白および FasL 蛋白の発現を免疫組織化学法を用いて、それぞれ検討した。手術標本より得られた 57 例の星細胞系腫瘍 (星細胞腫 7 例、退形成星細胞腫 16 例、神経膠芽腫 34 例) を対象とした。DcR3 遺伝子増幅は、星細胞腫 (7 例) では 1 例も認めず、退形成星細胞腫では 16 例中の 1 例 (6.3%) に、神経膠芽腫では 34 例中の 7 例 (20.6%) に認めた。DcR3 mRNA の発現は、神経膠芽腫群でより高い傾向にあった。さらに、DcR3 遺伝子増幅を含むコピー数の異常と mRNA 発現量は有意に相関した ($p=0.02$)。Fas 蛋白は星細胞腫群では陽性反応を呈するものは 1 例も認めなかったが、退形成星細胞腫では 16 例中 3 例に、神経膠芽腫では 34 例中 21 例において、それぞれ腫瘍細胞中に発現を認めた。FasL 蛋白は星細胞腫 7 例中 3 例、退形成星細胞腫 16 例中 9 例、神経膠芽腫では 34 例中 29 例において腫瘍細胞中に発現を認めた。DcR3 遺伝子増幅を認めた神経膠芽腫 7 例中 5 例に Fas の陽性反応を、6 例に FasL の陽性反応を認めた。以上より、星細胞系腫瘍においては、DcR3 遺伝子増幅を含む DcR3 の高発現が Fas/FasL 依存性の腫瘍細胞死を競合的に阻害することにより、腫瘍の悪性化に関与していることが示唆された。

Key words decoy receptor 3 (DcR3), glioma, Fas, FasL

神経膠芽腫 (glioblastoma, GB) は世界保健機構 (World Health Organization, WHO) 脳腫瘍悪性度分類 IV 度に分類され、外科的治療のみでは完全治癒が期待できない悪性腫瘍である。この腫瘍に対しては手術に加えて放射線療法、化学療法、免疫療法を含む集学的治療が行われているが、その長期治療成績は依然としてきわめて不良であり、診断確定後の平均生存期間は約 1 年とされる¹⁾²⁾。これまでの研究により、神経膠芽腫の腫瘍化や悪性化には、複数の遺伝子異常が複雑に関与していることが判明してきている。増殖因子受容体である上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) の遺伝子増幅^{3)~6)}、細胞周期関連遺伝子として p53 遺伝子の異常⁷⁾⁸⁾や p16 サイクリン依存性キナーゼ 4a 阻害因子 (p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a, p16/INK4a) 遺伝子^{9)~11)}、網膜芽細胞腫 (retinoblastoma, RB) 遺伝子¹²⁾¹³⁾の異常、サイクリン依存性キナーゼ 4a (cyclin dependent kinase 4a, CDK4) 遺伝子の増幅^{14)~21)}、MDM2 (murine double minute 2) 遺伝子増幅^{22)~27)}などが報告されている。また近年特に、神経膠芽腫の不死化に関連したアポトーシス制御機構が注目されている。Tachibana ら²⁸⁾²⁹⁾は、神経膠芽腫においてアポトーシス (自爆死, apoptosis)³⁰⁾³¹⁾を誘

導する膜受容体の一つである Fas/APO-1 (CD95) の発現が見られ、また壊死巣周囲の腫瘍細胞に Fas の発現が認められることにより、神経膠芽腫の細胞死における Fas/Fas リガンド (Fas Ligand, FasL) 系の関与を示唆した³²⁾。また神経膠芽腫では、壊死巣以外の腫瘍細胞にも FasL の発現が認められており^{33)~36)}、神経膠芽腫を含めて、悪性腫瘍における Fas/FasL の同時発現の生物学的な意味に関しては不明な点が多い。近年、一つの解釈として、腫瘍細胞を攻撃する活性化型リンパ球は Fas を発現するものが多く、腫瘍細胞が FasL を発現することにより、免疫系から回避することが、悪性化の原因として報告されている³⁷⁾。

デコイレセプター (decoy receptor, DcR) -3 は腫瘍壊死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 受容体ファミリーに属し、Fas と競合的に FasL と結合し、FasL を介するアポトーシスを阻害する分子として報告された³⁸⁾。興味深いことに、約半数もの肺癌や大腸癌で DcR3 の遺伝子増幅が認められ、DcR3 は Fas/FasL を介したアポトーシスの阻害に関与している可能性が示唆された。最近、様々な腫瘍や臨床検体で、DcR3 の発現とアポトーシス抑制に関する研究^{39)~41)}が進められている。しかし、DcR3

平成 12 年 11 月 27 日受付、平成 13 年 1 月 23 日受理

Abbreviations : AA, anaplastic astrocytoma; BG, betaglobin; CDK4, cyclin dependent kinase 4; DcR, decoy receptor; EGFR, epidermal growth factor receptor; FasL, Fas ligand; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate

遺伝子はヒト脳ではほとんど発現がみられず、その星細胞系腫瘍(astrocytic tumor)における関与はほとんど解明されていない。

本研究では星細胞系腫瘍を対象として、DcR3遺伝子の増幅の有無を半定量的PCR法で、またDcR3 mRNAの発現をリアルタイム半定量的逆転写(reverse transcription, RT)-PCR法にて検討した。さらに、FasおよびFasL蛋白の発現を免疫組織化学法を用いて検討した。

対象および方法

I. 組織標本

1984年から2000年までに金沢大学医学部附属病院脳神経外科および関連施設にて外科的切除された57例の星細胞系腫瘍を対象とした。病理組織学的分類はWHOの脳腫瘍分類(1993)¹⁾に従った。内訳は星細胞腫(low grade astrocytoma, LGA)(WHO脳腫瘍悪性度分類Ⅱ度)7例、退形成星細胞腫(anaplastic astrocytoma, AA)(WHO脳腫瘍悪性度分類Ⅲ度)16例、神経膠芽腫(WHO脳腫瘍悪性度分類Ⅳ度)34例である。いずれの材料も標本採取後すみやかに液体窒素にて凍結し、 -130°C にて保存し、RNAの抽出に供した。免疫組織化学用には、4%パラホルムアルデヒドにて標本を固定後、パラフィンに包埋した。

Ⅱ. 半定量的PCR法による遺伝子増幅の解析

1. DNAの抽出

腫瘍標本からのDNAの抽出は、Neubauerら⁴²⁾、Hruza⁴³⁾らの方法に従った。4%パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋した厚さ $4\mu\text{m}$ の切片をHE染色し、腫瘍細胞巣が多数切片上に含まれていることを確認した。1標本あたり未染の連続切片3枚を用い、未染の切片をスライドガラス上から剥がして、キシレンを用いて脱パラフィンをおこなった。上清を捨てた後、99.5%エタノール(和光純薬、大阪)を加えて再浮遊させ、洗浄をおこなった後、微量高速冷却遠心機器(トミー精工、東京)を使用し、10,000 rpm、5分間、 4°C の遠心分離を2回行った。上清を捨てた後、99.8%アセトン(和光純薬)を加え、10,000 rpm、2分間、 4°C で遠心分離した。上清を可及的に除去後、 50°C で10分間振盪乾燥させた。プロテナーゼK(QIAGEN, Hilden, Germany)を加え、 55°C で3時間振盪後 98°C で10分間振盪させてプロテナーゼKを失活させた。一部をとり260 nmの吸光度を測定してDNA濃度を計算した。

対照として健常人のDNAを用いた。DNAの抽出は末梢血5 mlを採取し、室温で4,000 rpm、10分間遠心分離した。中間層(リンパ球層)を採取し、QIA amp Tissue Kit(QIAGEN)を用いてDNAを抽出した。一部をとり260 nmの吸光度を測定してDNA濃度を計算した。

2. プライマーの作成

DcR3遺伝子の塩基配列はゲノムデータベース(Genome Data Base, Baltimore, USA)または、文献^{38)~40)}から引用した。内部標準としてヒトベータグロビン(beta globin, BG)遺伝子を用いた。各PCRプライマーと、センスおよびアンチセンスプライマー増幅断片に特異的にハイブリダイゼーションするTaqManTMプローブは文献³⁸⁾⁴⁰⁾より引用した。DcR3遺伝子のセ

ンスプライマーは5'-CTTCTTCGCGCACGCTG-3'、アンチセンスプライマーは5'-ATCACGCCGGCACCAG-3'を使用し、これらの合成はAmersham Pharmacia Biotechに委託した(東京)。DcR3遺伝子のTaqManTMプローブは、5'末端のリポーター蛍光色素をファム、3'末端のクエンチャー蛍光色素をタムラとした5'-(FAM)-ACACGATGCGTGCTCCAAGCAGAA-(TAMRA)-3'を使用し、合成をApplied Biosystems Japan(千葉)に委託した。同様に人BG遺伝子のセンスプライマーは5'-ACCCTTAGGCTGGTGG-3'、アンチセンスプライマーは5'-GGAGTGGACAGATCCCCAAA-3'を使用し、TaqManTMプローブは5'-(VIC)-CTACCCTTGACCCAGAGGTTCTTTGAGTC-(TAMRA)-3'を使用した。プライマーの合成はAmersham Pharmacia Biotechに、TaqManTMプローブの合成はApplied Biosystems Japanに委託した。

3. 半定量的PCR法

DcR3遺伝子の増幅を調べるために、Hollandら⁴⁴⁾のTaqManTMケミストリーの理論に基づき、ABI PRISM 7700シーケンスディテクター(Applied Biosystems, California, USA)を用いて解析した⁴⁵⁾。PCR反応には、抽出した染色体DNAのうち2 ngを一回の反応の鋳型として用いた。反応液は、終濃度が500 nMのプライマー、終濃度が200 nMのTaqManTMプローブ、TaqManTM Universal PCR Master Mix(Applied Biosystems)および滅菌蒸留水を加え全量を $30\mu\text{l}$ に調整した。PCR反応は、 50°C で2分間を1サイクルのあと、 95°C で10分間の熱変性を行い、 95°C で15秒、 60°C で1分の2ステップを1サイクルとして40回増幅した。データの解析はSequence Detectionソフトウェア(Applied Biosystems)を用い、増幅産物をリアルタイムに検出し、未知量鋳型DNAの初期量を測定した。この操作をDcR3遺伝子、BG遺伝子のそれぞれに行い、DcR3遺伝子の初期量をBG遺伝子に対する比として計算した。半定量的PCRは各検体につき3回を行い、その平均値を用いた。

DcR3遺伝子増幅の判定は、健常人12例のDNAを対照として、DcR3遺伝子と遺伝子のPCR増幅産物量の比(DcR3/BG)の平均値($\bar{X}=1.02$)および標準偏差($SD=0.18$)を求めた。次に、少なくとも一方の対立遺伝子が2倍以上に増幅している場合を遺伝子増幅と仮定し、健常人のDcR/BG値が全て含まれる危険率(2.5SD)を考慮した。即ち、 $1.5 \times \bar{X} + 2.5SD = 1.98$ 以上を遺伝子増幅ありとした。

Ⅲ. 総RNAの分離と半定量的RT-PCR法

Chomczynskiら⁴⁶⁾の方法に基づき、ISOGEN(ニッポンジーン、東京)を用いて、凍結組織から総RNAの抽出、精製を行った。DcR3 mRNAの発現を調べるために、ABI PRISM 7700シーケンスディテクター(Applied Biosystems)を用いて、TaqManTMケミストリーによる半定量的RT-PCR法を行った。RT反応はFirst strand cDNA synthesis kit(Amersham)を用いて行った。すなわち、60 ngの総RNAを鋳型としてランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素にてcDNAを合成した。DcR3のPCRプライマーと、TaqManTMプローブは文献³⁸⁾より引用した。また内部標準として、グリセルアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) Pre-Developed TaqManTM endogenous control

Reagents (Applied Biosystems) を使用した。反応液は, DcR3 が終濃度 500 nM のプライマー, 終濃度が 200 nM の TaqMan™ プローブ, TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) および滅菌蒸留水を加え全量を 30 μ l に調整した。GAPDH は, 20 倍のプライマー & プローブソリューション,

TaqMan™ Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems) および滅菌蒸留水を加え全量を 30 μ l に調整した。PCR 反応は, 50 $^{\circ}$ C で 2 分間を 1 サイクルのあと, 95 $^{\circ}$ C で 10 分間の熱変性を行い, 95 $^{\circ}$ C で 15 秒, 60 $^{\circ}$ C で 1 分の 2 ステップを 1 サイクルとして 40 回増幅した。データの解析は Sequence Detection ソフ

Table 1. DcR3 gene amplification and mRNA expression, Fas and Fas ligand expression in human astrocytic tumors

Tumor type	ID	Age	Sex	Location	DcR3/globin	DcR3m/GAPDH	Fas, IHC	FasL, IHC
Low grade astrocytoma	3778	31	M	RF	0.50	2.22	—	—
	3728	15	F	RF	0.43	1.33	—	+
	3726	32	M	RFT	0.68	2.65	—	+
	3569	7	M	LPO	0.97	2.79	—	—
	3472	42	M	LF	1.01	2.92	—	—
	3442	18	M	RFT	0.60	2.78	—	—
	3420	65	M	LF	1.11	NE	—	+
Anaplastic astrocytoma	3800	46	F	RBG	0.53	1.37	—	+
	3793	24	F	LF	0.41	1.97	+	+
	3769	44	M	LFT	0.94	1.40	—	—
	3748	29	M	LFP	0.95	1.30	—	—
	3733	51	M	RF	0.48	2.20	+	+
	3625	36	M	RF	1.09	NE	—	—
	3459	35	M	LF	0.78	NE	—	+
	3394	43	F	RF	0.76	NE	+	—
	3067	7	M	LBG	1.42	NE	—	—
	3011	25	M	pons	1.19	NE	—	+
	2981	57	M	LF	1.61	NE	—	+
	2976	34	F	R, LF	1.26	NE	—	+
	2866	62	M	pons	1.39	NE	—	+
	2864	25	M	RF	2.52*	NE	—	—
	2666	24	M	LOP	1.28	NE	—	—
	2307	50	M	RP	1.37	NE	—	+
Glioblastoma	3822	51	F	RO	0.84	NE	+	+
	3801	52	M	LF	0.61	2.13	+	+
	3792	78	M	RP	0.85	3.05	+	+
	3757	66	F	RF	0.96	5.21	+	+
	3753	72	F	RF	1.03	2.51	+	+
	3747	34	M	LF	0.60	1.32	+	+
	3722	66	F	R, LF	1.07	1.62	+	+
	3705	57	M	LFTP	2.25*	2.18	+	+
	3678	70	M	LFT	1.13	14.69	+	+
	3677	72	F	RT	0.61	NE	—	+
	3658	30	M	LT	1.00	NE	—	+
	3626	66	F	RT	0.71	NE	+	+
	3616	55	F	LT	1.14	3.09	+	+
	3562	22	M	RTP	1.08	1.10	+	—
	3521	8	M	RT	1.33	NE	+	+
	3499	39	F	RT	2.02*	9.72	+	—
	3425	64	F	LF	0.71	NE	—	+
	3367	41	M	LT	2.35*	NE	+	+
	3355	48	M	RT	2.12*	3.24	+	+
	3352	73	F	LFT	2.21*	7.92	—	+
	3290	59	M	RT	0.88	1.26	+	+
	3119	11	M	RBG	1.75	NE	—	+
	2986	68	M	RT	2.13*	NE	+	+
	2974	63	M	LT, BG	1.41	NE	+	+
	2969	31	F	LT	1.04	NE	+	+
	2917	70	M	R, LF	1.02	NE	—	—
	2878	73	F	RFT	1.16	NE	—	—
	2855	55	F	RF	1.37	NE	—	+
	2826	80	M	RTP	5.36*	NE	—	+
	2786	51	M	R, LT	1.32	NE	—	+
	2776	79	M	LFT	1.02	NE	—	+
	2616	42	F	pons	1.95	NE	—	—
	2602	65	M	RT	1.07	NE	+	+
	S1	56	F	RT	1.37	NE	—	+

DcR3, decoy receptor 3; DcR3m, DcR3 mRNA; globin, β -globin gene; IHC, immunohistochemistry; FasL, Fas ligand; R, right; L, left; F, frontal; t, temporal; p, parietal; o, occipital; BG, basal ganglia; a, alive; —, immunonegative; +, immunopositive; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; NE, not examined; s1, specimen from associate hospital. * Case of DcR3 gene amplification.

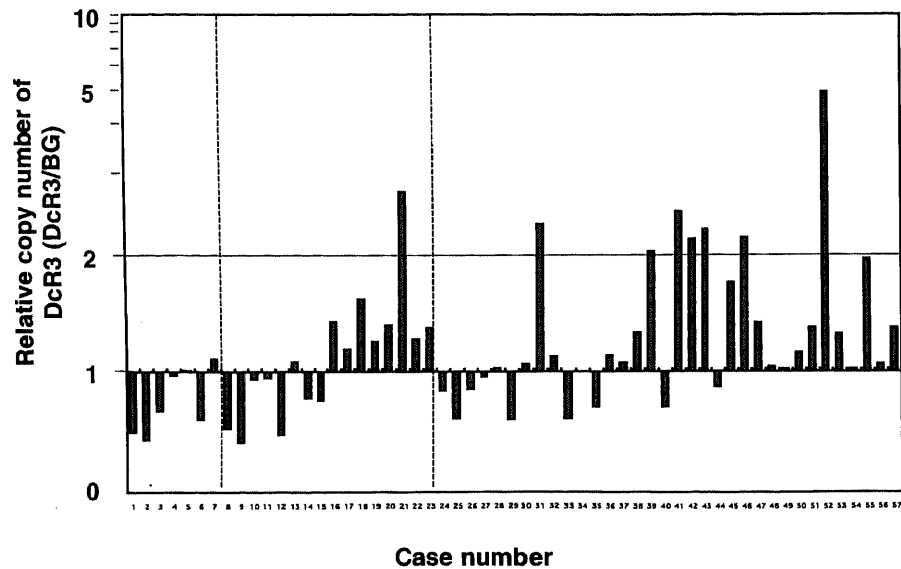


Fig. 1. Genomic amplification of DcR3 in astrocytic tumors. Lane 1-7, seven astrocytomas; Lane 8-23, 16 anaplastic astrocytomas; Lane 24-57, 34 glioblastomas. Data are means of 3 experiments.

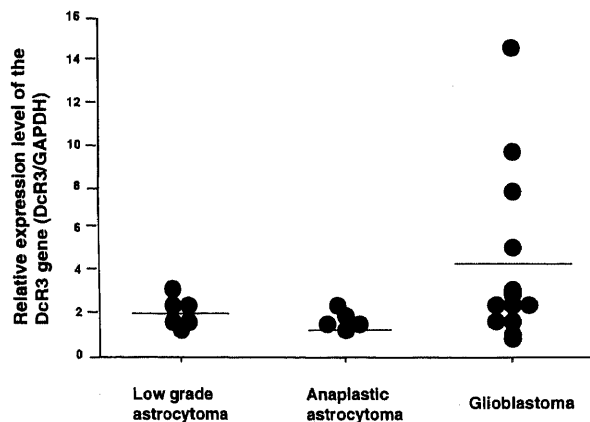


Fig. 2. Relative expression level of the DcR3 gene in astrocytic tumors. Significant differences were not detected between each groups ($p=0.16$). Bars indicate the mean value. DcR3, decoy receptor 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

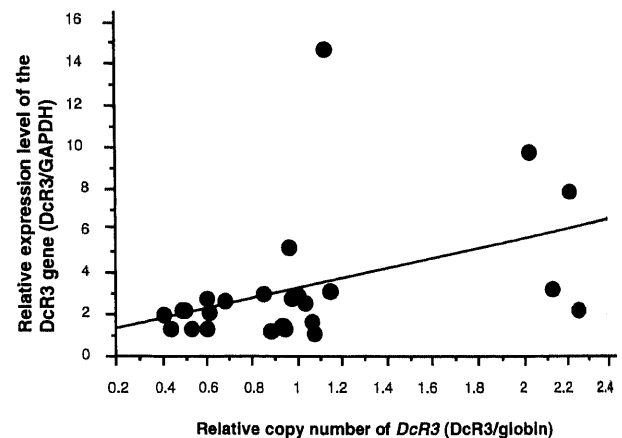


Fig. 3. Positive correlation between the relative copy number of DcR3 and relative expression level of the DcR3 gene ($\rho=0.468$, $p=0.02$). DcR3, decoy receptor 3; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase.

トウェア (Applied Biosystems) を用い、増幅産物をリアルタイムに検出して、未知量鋳型 mRNA の初期量を測定した。この操作を DcR3, GAPDH のそれぞれに行い、DcR3 mRNA の初期量を GAPDH に対する比として計算した。半定量的 RT-PCR は各検体につき 3 回行い、その平均値を使用した。

Ⅳ. 免疫組織化学

1. 各種蛋白質に対する抗体

抗 Fas 抗体、抗 FasL 抗体には、抗ヒト Fas/CD95 モノクローナル抗体 (マウス IgG1, クローン APO-1, ダコ・ジャパン, 京都), および抗ヒト FasL ポリクローナル抗体 (ウサギ, Santa-Cruz Inc., California, USA) を用いた。

2. 免疫組織染色

4% パラホルムアルデヒドで固定後、パラフィンに包埋して厚さ $4\mu\text{m}$ の切片を作製し、シランコーティングスライドガラス (ダコ・ジャパン, 京都) 上に貼り付け乾燥させた。キシレ

ン (和光純薬) を用いて脱パラフィンし、0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄後、0.3% 過酸化水素水加メタノールで処理し内因性ペルオキシダーゼを失活させた。抗原性の賦活化のため、抗 Fas モノクローナル抗体の免疫染色には 0.1% トリプシン (pH 7.8) (Sigma, St. Louis, USA) にて 37°C , 15 分間温浴処理を行った。また抗 FasL 抗体の免疫染色には、0.01 M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で、 120°C で 15 分間のオートクレーブ処理を行った。0.1 M PBS (pH 7.4) で洗浄後、非特異的反応抑制のため 5% スキムミルク (Difco Laboratories, Detroit, USA) を室温で 1~2 時間反応させた。次に抗体希釈用緩衝液 (DAKO) で、抗 Fas モノクローナル抗体 (APO-1) は 5 倍に希釈、抗 FasL 抗体 (N20) は 500 倍に希釈し、これら一次抗体を 4°C で一晩反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) を室温で 30 分間反応させた。アビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体 (avidin-biotin-peroxidase complex) 法と

0.005% 過酸化水素加 0.02% ジアミノベンチジン (Sigma) 処理により発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。抗 Fas モノクローナル抗体 (APO-1) の陽性コントロールとしては肝臓を、抗 FasL ポリクローナル抗体 (N20) の陽性コントロールとして口蓋扁桃を用いた。また陰性コントロールは、一次抗体を抜いたものとした。

3. 免疫組織染色の評価

各抗体の免疫組織標本について腫瘍細胞巣を含む 200 倍の鏡検視野 3 箇所においてそれぞれ 100 個の細胞中の陽性細胞数を

測定し、その平均を百分率で評価した。陽性率が 10 % 以上、10 % 未満の標本をそれぞれ陽性、陰性と定義した。

V. 統計学的検討

DcR3 遺伝子増幅の出現率について、LGA 群、AA 群、および GB 群とに分け、 χ^2 検定法を用いて比較検討を行った。また DcR3 mRNA の相対的発現量については、LGA 群、AA 群、および GB 群に分け、Kruskal-Wallis 検定を行い、5 % 未満を有意差ありとした。また DcR3 遺伝子増幅と DcR3 mRNA の発現との相関を、Spearman の順位相関の検定を行い、5 % 未満を有

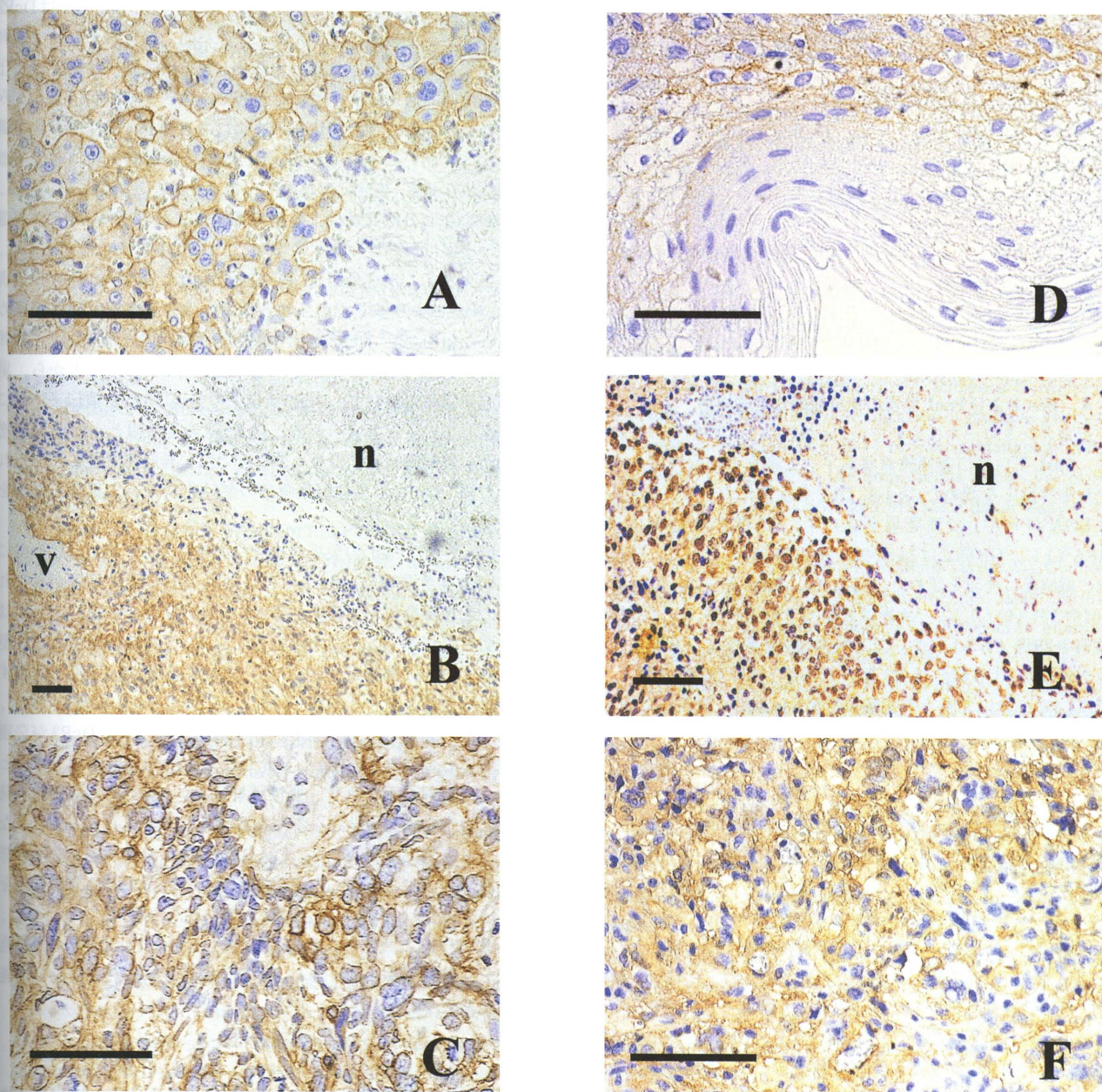


Fig. 4. Immunohistochemical staining of Fas and Fas ligand (FasL) in control specimen and human glioblastomas. (A) In control liver, immunoreactivity to Fas is seen in the cytoplasmic membrane of hepatocyte. (B) Fas expression predominates in the cytoplasmic membrane of glioblastoma cells and, (C) absent in vascular endothelial proliferation (v), and necrotic tumor tissue (n). (D) FasL immunoreactivity is seen in the cytoplasmic membrane and the cytoplasm of basal layer of tonsil mucosa (E), (F) A large number of glioblastoma cells are immunoreactive to FasL. The scale bars at the bottom indicate 40 μ m.

意な相関とした。

成 績

表1に全症例のDcR3遺伝子増幅、DcR3 mRNA発現、FasおよびFasLの免疫組織化学的検出の結果を示す。

I. DcR3遺伝子増幅の検出

半定量的PCR法を用いてDcR3遺伝子増幅を解析した(図1)。星細胞系腫瘍57例中8例でDcR3/BGの高値(症例3705, 2.25; 症例3499, 2.02; 症例3367, 2.35; 症例3355, 2.12; 症例3352, 2.21; 症例2986, 2.13; 症例2826, 5.36; 症例2864, 2.52)を認め、遺伝子増幅ありと判定した。各群における結果は、LGA群が7例中遺伝子増幅ありと判定した。AA群は16例中1例(6.3%)に、GB群は34例中7例(20.6%)にDcR3遺伝子増幅がみられた。各群間で、DcR3遺伝子増幅の出現率に統計学的有意差は認めなかった($p=0.13$)が、特にGB群において遺伝子増幅の出現率が高い傾向にあった(図1)。

II. DcR3 mRNAの発現量の解析

半定量的RT-PCR法を用い、DcR3のmRNAの初期量をGAPDHに対する比として求め、LGA6例、AA5例およびGB14例の各群間のmRNA発現量を検討した(図2)。DcR3のmRNAの発現量(DcR3/GAPDH)は、LGA群では平均値2.45、AA群では1.65、GB群では4.22であり、統計学的有意差は認めなかったが、GB群で発現がより高い傾向にあった($p=0.16$)。さらに、DcR3遺伝子増幅の指標としたDcR3/BG値とDcR3 mRNAの発現の指標としたDcR3/GAPDH値との間には、統計学的相関関係を認めた($p=0.02$)(図3)。

III. FasおよびFasL発現の免疫組織化学的検討

正常コントロールにおいて、Fas蛋白は主に肝細胞の細胞膜に、FasL蛋白は口蓋扁桃重層扁平上皮細胞の細胞膜に、それぞれ陽性反応を認めた(図4-A, D)。各症例において、Fas蛋白はLGA(7例中)では発現を認めず、AA群では16例中3例(18.8%)に、GB群では34例中21例(61.8%)において、腫瘍細胞の細胞膜に発現を認めた(図4-B, C)。FasL蛋白は、LGA群の7例中3例(42%)に、AA群は16例中9例(56%)に、GB群は34例中29例(85%)において、腫瘍細胞の膜および細胞質に発現を認めた。GB群のDcR3遺伝子増幅を認めた7例中では、5例(71.4%)において多くの腫瘍細胞がFas蛋白を発現しており、また、6例(85.6%)でFasLの発現がみられた。

考 察

星細胞系腫瘍のなかでも最も悪性度の高い神経膠芽腫における癌遺伝子の増幅は、EGFR遺伝子、CDK4遺伝子、MDM2遺伝子などにおいて知られている。なかでも、EGFR遺伝子は、GBにおいて約1/3の症例に遺伝子増幅がみられ²⁰⁻²¹⁾、CDK4は約15%¹⁴⁾⁻²¹⁾、MDM2は10%以下に遺伝子増幅を認めるとされる²²⁾⁻²⁷⁾。GBにおけるEGFR遺伝子のように、特定の遺伝子増幅がこれほど高頻度にみられることはまれであり、EGFR遺伝子増幅が認められる食道癌⁴⁷⁾⁻⁴⁹⁾においても、10%程度の出現率である。発症過程における遺伝子の不安定性が、特定の遺伝子異常に集中することは極めて興味深い。本研究において、GBではDcR3の遺伝子増幅が約21%と高頻度に認められ、EGFR遺伝子増幅に次ぐGBに特徴的な遺伝子異常と考えられた。

近年、TNFファミリーのひとつであるTRAIL⁵⁰⁾⁵¹⁾(TNF related apoptosis-inducing ligand)に対する、膜結合性のデコイ

レセプター(decoy receptor, DcR)が見つかり、このDcR1およびDcR2はTRAILと結合してアポトーシスを防御する役割を有すると報告されている⁵²⁾⁻⁵⁵⁾。DcR1やDcR2は脳を含む多くの正常組織に発現し、TRAILからの細胞死シグナルを膜レベルで防御していると考えられている⁵²⁾⁻⁵⁵⁾。一方、Pittiら³⁸⁾は、Fas/FasL系を介するアポトーシスを阻害する可溶性(soluble)DcRをクローニングし、DcR3と命名した。DcR3は分子量35000 kDaのTNF受容体ファミリーの一員で、Fasと競合的にFasLと結合し、FasLを介するアポトーシスを阻害する分子として同定された³⁸⁾³⁹⁾。さらに、肺癌や大腸癌の約50%でDcR3の遺伝子増幅が認められ、DcR3 mRNAの発現も認められた。よって、ある種の悪性腫瘍ではDcR3を発現することによりFasLを阻害し、免疫系のFasLを介した細胞傷害作用を回避するのではないかとしている。これに対して、Baiら⁴⁰⁾はDcR3 mRNAが正常組織の胃、大腸、リンパ節、気管および肺で過剰発現すること、胃、食道、大腸癌にてDcR3蛋白が免疫組織化学的検討で過剰発現を呈した症例で、遺伝子増幅がほとんどみられなかったこと、消化器系腫瘍におけるFas陽性が正常組織に比べて弱いことなどから、DcR3蛋白の過剰発現は遺伝子増幅に依存せず、癌化に関与するのではないかと結論づけている。しかし今回の研究では、星細胞系腫瘍においては、DcR3の遺伝子増幅は、悪性度と共に増加し、GBの約21%に認められた。リアルタイム半定量的RT-PCR法を用いたDcR3 mRNAの発現も、GBでより多く認められ、両者には有意な相関関係が認められた($p=0.02$)。DcR3 mRNA発現と悪性度との関係は、GB群の方がLGAやAA群より高い傾向を示した。このことから、星細胞系腫瘍において、DcR3遺伝子の発現はDcR3遺伝子増幅に依存していると考えられる。DcR3遺伝子増幅とmRNA発現増加が、星細胞系腫瘍の最も悪性度の高い神経膠芽腫に認められたため、DcR3は星細胞系腫瘍の悪性化において重要な役割を果たしていると考えられた。

FasおよびFasLの免疫組織化学的検討では、Fasは悪性度に従い発現が増加し、FasLは過半数以上の症例で発現がみられた。悪性腫瘍におけるFas/FasLの同時発現の意味に関しては不明な点が多く、一つの可能性として、Fasを発現する活性型リンパ球を、腫瘍がFasLを用いて逆に攻撃し、免疫を回避するということが考えられている³⁷⁾。しかしBaiらの報告の如く、ある種の腫瘍ではたとえFasを発現していても、DcR3が発現することによりFas/FasLを介したアポトーシスが生じないという可能性が示され⁴⁰⁾、悪性腫瘍においてFas/FasLの同時発現に対する、生物学的な新たな解釈として考えられるようになった。本研究においても、FasおよびFasLを発現している神経膠芽腫の中に、DcR3遺伝子増幅およびDcR3 mRNAの発現を伴っているものが存在した。このような腫瘍においては、DcR3がFasと競合的にFasLと結合し、Fas/FasLを介した細胞死を回避させることにより、腫瘍の悪性化に関与している可能性が考えられた。

結 論

星細胞系腫瘍57例(星細胞腫7例、退形成星細胞腫16例、神経膠芽腫34例)におけるDcR3遺伝子増幅、DcR3のmRNAの発現、Fas蛋白、FasL蛋白の発現を、それぞれ、半定量的PCR法、半定量的RT-PCR法、免疫組織化学法にて検討し、以下の結論を得た。

1. 星細胞系腫瘍 57 例中 8 例で, DcR3 遺伝子増幅を認めた。とくに神経膠芽腫においては, 約 21 % の症例に DcR3 遺伝子増幅を認めた。

2. 星細胞腫 (6 例), 退形成星細胞腫 (5 例) および神経膠芽腫 (14 例) の DcR3 mRNA 発現量は, 各群間での統計学的有意差を認めなかったが, 神経膠芽腫で発現がより高い傾向にあった。

3. DcR3 遺伝子増幅を含むコピー数の異常と mRNA 発現量は有意に相関した ($p=0.02$)。

4. 星細胞系腫瘍において, Fas 蛋白は神経膠芽腫での発現がより高く, FasL 蛋白は星細胞系腫瘍の多くの症例で発現を認めた。神経膠芽腫では, DcR3 遺伝子増幅症例の 7 例中 5 例で Fas 蛋白の発現を認め, 7 例中 6 例で FasL の発現がみられた。

以上の結果より, 星細胞系腫瘍においては, DcR3 遺伝子増幅を含む DcR3 の高発現が, Fas/Fas L 依存性の腫瘍細胞死を競合的に阻害することにより, 腫瘍の悪性化に関与していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり, 御指導と御高閲を賜りました恩師山下純宏教授に深甚なる謝意を表します。また, 本研究の遂行に際し, 終始直接の御指導を賜りました同教室の立花 修講師, 林 裕助手, ならびに病理標本の作製にご協力を頂いた今村明子文部技官に心から感謝の意を捧げます。さらに, 御支援と御協力を頂きました金沢大学脳神経外科学講座の皆様にも深く感謝致します。なお本研究は, 日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 C-2 (課題番号 12671346) により助成された。

文 献

- 1) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Histological typing of tumors of the central nervous system. WHO International Classification of Tumors, 2nd ed, p11-30, Springer Verlag, Berlin, 1993
- 2) Deen DF, Chiarodo A, Grimm EA, Fike JR, Israel MA, Kun LE, Levin VA, Marton LJ, Packer RJ, Pegg AE, Rosenblum ML, Suit HD, Walker MD, Wikstrand CJ, Wilson CJ, Wong AJ, Yang WKA. Brain tumor working group report on the 9th international conference on brain tumor research and and therapy. *J Neuro Oncol* 16: 243-272, 1993
- 3) Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N et al. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumors of glial origin. *Nature*, 313: 144-147, 1985
- 4) Wong AJ, Bigner SH, Bigner DD, Kinzler KW, Hamilton SR, Vogelstein B. Increased expression of the epidermal growth factor receptor gene in malignant gliomas is invariably associated with gene amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* 84(19): 6899-6903, 1987
- 5) Ekstrand AJ, Sugawa N, James CD, Collins VP. Amplified and rearranged epidermal growth factor receptor genes in human glioblastomas reveal deletions of sequences encoding portions of the N- and/or C-terminal tails. *Proc Natl Acad Sci USA* 89(10):4309-13, 1992
- 6) Hurtt MR, Moosy J, Donovan-Peluso M, Locker J. Amplification of epidermal growth factor receptor gene in gliomas: histopathology and prognosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 51(1):84-90, 1992

- 7) Newcomb EW, Madonia WJ, Pisharody S, Lang FF, Koslow M, Miller DC. A correlative study of p53 protein alteration and p53 gene mutation in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 3(3):229-235, 1993
- 8) Hunter SB, Bandea C, Swan D, Abbott K, Varma VA. Mutations in the p53 gene in human astrocytomas: detection by single-strand conformation polymorphism analysis and direct DNA sequencing. *Mod Pathol* 6(4):442-445, 1993
- 9) Giani C, Finocchiaro G. Mutation rate of the CDKN2 gene in malignant gliomas. *Cancer Res* 54(24):6338-6339, 1994
- 10) Jen J, Harper JW, Bigner SH, Bigner DD, Papadopoulos N, Markowitz S, Willson JK, Kinzler KW, Vogelstein B. Deletion of p16 and p15 genes in brain tumors. *Cancer Res* 54(24):6353-6358, 1994
- 11) Moulton T, Samara G, Chung WY, Yuan L, Desai R, Sisti M, Bruce J, Tycko B. MTS1/p16/CDKN2 lesions in primary glioblastoma multiforme. *Am J Pathol* 146(3):613-9, 1995
- 12) Tsuzuki T, Tsunoda S, Sakaki T, Konishi N, Hiasa Y, Nakamura M. Alterations of retinoblastoma, p53, p16(CDKN2), and p15 genes in human astrocytomas. *Cancer* 78(2):287-293, 1996
- 13) Ueki K, Ono Y, Henson JW, Efird JT, von Deimling A, Louis DN. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56(1):150-153, 1996
- 14) Reifenger G, Reifenger J, Ichimura K, Meltzer PS, Wechsler W, Collins VP. Amplification of multiple genes from chromosomal region 12 q 13-14 in human malignant gliomas: preliminary mapping of the amplifcons shows preferential involvement of CDK4, SAS, and MDM2. *Cancer Res* 54: 4299-4303, 1994
- 15) He J, Allen JR, Collins VP, Allalunis-Turner MJ, Godbout R, Day RS 3rd, James CD. CDK4 amplification is an alternative mechanism to p16 gene homozygous deletion in glioma cell lines. *Cancer Res* 54(22): 5804-5807, 1994
- 16) Schmidt EE, Ichimura K, Reifenger G, Collins VP. CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion or CDK4 amplification occurs in the majority of glioblastomas. *Cancer Res* 54(24):6321-6324, 1994
- 17) Reifenger G, Reifenger J, Ichimura K, Collins VP. Amplification at 12q13-14 in human malignant gliomas is frequently accompanied by loss of heterozygosity at loci proximal and distal to the amplification site. *Cancer Res* 55(4): 731-734, 1995
- 18) He J, Olson JJ, James CD. Lack of p16INK4 or retinoblastoma protein (pRb), or amplification-associated overexpression of cdk4 is observed in distinct subsets of malignant glial tumors and cell lines. *Cancer Res* 55(21):4833-4836, 1995
- 19) Sonoda Y, Yoshimoto T, Sekiya T. Homozygous deletion of the MTS1/p16 and MTS2/p15 genes and amplification of the CDK4 gene in glioma. *Oncogene* 11(10):2145-2149, 1995
- 20) Ichimura K, Schmidt EE, Goike HM, Collins VP. Human glioblastomas with no alterations of the CDKN2A (p16INK4A,

MTS1) and CDK4 genes have frequent mutations of the retinoblastoma gene. *Oncogene* 13(5):1065-1072, 1996

21) Rollbrocker B, Waha A, Louis DN, Wiestler OD, von Deimling A. Amplification of the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) gene is associated with high cdk4 protein levels in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 92(1):70-74, 1996

22) Reifenger G, Liu L, Ichimura K, Schmidt EE, Collins VP. Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer Res* 53(12):2736-2739, 1993

23) He J, Reifenger G, Liu L, Collins VP, James CD. Analysis of glioma cell lines for amplification and overexpression of MDM2. *Genes Chromosomes Cancer* 11(2):91-96, 1994

24) Westermarck B, Nister M. Molecular genetics of human glioma. *Curr Opin Oncol* 7(3):220-225, 1995

25) Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 56(2):180-5, 1997

26) Biernat W, Tohma Y, Yonekawa Y, Kleihues P, Ohgaki H. Alterations of cell cycle regulatory genes in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *Acta Neuropathol (Berl)* 94(4):303-309, 1997

27) Galanis E, Buckner J, Kimmel D, Jenkins R, Alderete B, O'Fallon J, Wang CH, Scheithauer BW, James CD. Gene amplification as a prognostic factor in primary and secondary high-grade malignant gliomas. *Int J Oncol* 13(4):717-724, 1998

28) Tachibana O, Nakazawa H, Lampe J, Watanabe K, Kleihues P, Ohgaki H. Expression of Fas/APO-1 during the progression of astrocytomas. *Cancer Res* 55(23):5528-5530, 1995

29) Tachibana O, Lampe J, Kleihues P, Ohgaki H. Preferential expression of Fas/APO1 (CD95) and apoptotic cell death in perinecrotic cells of glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 5: 431-434, 1996

30) Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 4: 239-257, 1972

31) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 8: 2013-2026, 1994

32) Tohma Y, Gratas C, Van Meir EG, Desbaillets I, Tenan M, Tachibana O, Kleihues P, Ohgaki H. Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57(3):239-245, 1998

33) Gratas C, Tohma Y, Van Meir EG, Klein M, Tenan M, Ishii N, Tachibana O, Kleihues P, Ohgaki H. Fas ligand expression in glioblastoma cell lines and primary astrocytic brain tumors. *Brain Pathol* 7(3):863-9, 1997

34) Husain N, Chiocca EA, Rainov N, Louis DN, Zervas NT. Co-expression of Fas and Fas ligand in malignant glial tumors and cell lines. *Acta Neuropathol (Berl)* 95(3):287-290, 1998

35) Weller M, Kleihues P, Dichgans J, Ohgaki H CD95 ligand: lethal weapon against malignant glioma? *Brain Pathol* 8(2):285-

293, 1998

36) Saas P, Walker PR, Hahne M, Quiquerez AL, Schnuriger V, Perrin G, French L, Van Meir EG, de Tribolet N, Tschopp J, Dietrich PY. Fas ligand expression by astrocytoma in vivo: maintaining immune privilege in the brain? *J Clin Invest* 99(6):1173-1178, 1997

37) Hahne M, Rimoldi D, Schroter M, Romero P, Schreier M, French L E, Schneider P, Bornand T, Fontana A, Lienard D, Cerottini J-C, Tschopp J. Melanoma cell expression of Fas(Apo-1/CD95) ligand: implications for tumor immune escape. *Science* 274: 1363-1366, 1996

38) Pitti RM, Marsters SA, Lawrence DA, Roy M, Kischkel FC, Dowd P, Huang A, Donahue CJ, Sherwood SW, Baldwin DT, Godowski PJ, Wood WI, Gurney AL, Hillan KJ, Cohen RL, Goddard AD, Botstein D, Ashkenazi A. Genomic amplification of a decoy receptor for Fas ligand in lung and colon cancer. *Nature* 396: 699-703, 1998.

39) Yu KY, Kwon B, Ni J, Zhai Y, Ebner R, Kwon BS. A newly identified member of tumor necrosis factor receptor superfamily (TR6) suppresses LIGHT-mediated apoptosis. *J Biol Chem* 274: 13733-13736, 1999

40) Bai C, Connolly B, Metzker ML, Hilliard CA, Liu X, Sandig V, Soderman A, Galloway SM, Liu Q, Austin CP, Caskey CT. Overexpression of M68/DcR3 in human gastrointestinal tract tumors independent of gene amplification and its location in a four-gene cluster. *Proc Natl Acad Sci USA* 97: 1230-1235, 2000

41) Otsuki T, Tomokuni A, Sakaguchi H, Aikoh T, Matsuki T, Isozaki Y, Hyodoh F, Ueki H, Kusaka M, Kita S, Ueki A. Overexpression of the decoy receptor 3 (DcR3) gene in peripheral blood mononuclear cells (PBMC) derived from silicosis patients. *Clin Exp Immunol* 119: 323-327, 2000

42) Neubauer A, Neubauer B, He M. Analysis of gene amplification in archival tissues by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 7: 1019-1025, 1992

43) Hruza C, Dobinaner K, Beck A. Her-2 and INT-2 amplification estimated by quantitative PCR in paraffin-embedded ovarian cancer tissue samples. *Eur J Cancer* 29A: 1593-1597, 1993

44) Holland PM, Abramson RD, Watson R, Gelfand DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'-3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc. Natl Acad Sci USA* 88(16): 7276-7280, 1991

45) Gelmini S, Orlando C, Sestini R, Vona G, Pinzani P, Ruocco L, Pazzagli M. Quantitative polymerase chain reaction-based homogeneous assay with fluorogenic probes to measure c-erbB-2 oncogene amplification. *Clin Chem* 43(5):752-758, 1997

46) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-159, 1987

47) al-Kasspoles M, Moore JH, Orringer MB, Beer DG. Amplification and over-expression of the EGFR and erbB-2 genes in human esophageal adenocarcinomas. *Int J Cancer* 54(2):213-219, 1993

48) Itakura Y, Sasano H, Shiga C, Furukawa Y, Shiga K, Mori S, Nagura H. Epidermal growth factor receptor overexpression in

esophageal carcinoma. An immunohistochemical study correlated with clinicopathologic findings and DNA amplification. *Cancer* 74(3):795-804, 1994

49) Kitagawa Y, Ueda M, Ando N, Ozawa S, Shimizu N, Kitajima M. Further evidence for prognostic significance of epidermal growth factor receptor gene amplification in patients with esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2(5): 909-914, 1996

50) Robert M. Pitti, Scot A. Marsters, Siegfried Ruppert, Christopher J. Donahue, Alison Moore, and Avi Ashkenazi. Induction of Apoptosis by Apo-2 Ligand, a New Member of the Tumor Necrosis Factor Cytokine Family. *J Biol Chem*. 271: 12687-12690, 1996

51) Pan G, O'Rourke K, Farlane M, Ahmad M, Srinivasula SM, Fernandes-Alnemri T, Cohen GM, Alnemri ES. Identification and

molecular cloning of two novel receptors for the cytotoxic ligand TRAIL. *J Biol Chem*. 272: 25417-25420, 1997

52) Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: Signaling and modulation. *Science* 281: 1305-1308, 1998

53) Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM. An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*. 277: 815-818, 1997

54) Sheridan JP, Marsters SA, Pitti RM, Gurney A, Skubatch M, Baldwin D, Ramakrishnan L, Gray CL, Baker K, Wood WI, Goddard AD, Godowski P, Ashkenazi A. Control of TRAIL-induced apoptosis by a family of signaling and decoy receptors. *Science* 277: 818-821, 1997

55) Ashkenazi, A. & Dixit, V. M. Apoptosis control by death and decoy receptors. *Curr. Opin. Cell Biol.* 11: 255-260, 1999

Decoy Receptor 3 Gene Amplification and Expression in Human Astrocytic Tumors Yasuaki Arakawa, Department of Neurosurgery, School of medicine, Kanazawa University, 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **110**, 117 — 125 (2001)

Key words decoy receptor 3 (DcR3), glioma, Fas, FasL

Abstract

Decoy receptor 3 (DcR3), a secreted member of the tumor necrosis factor receptor superfamily, and known as a negative regulator of Fas-mediated apoptosis, is often found to be amplified in human lung and colon cancers. In this study, DcR3 gene amplification was examined by semi-quantitative genomic PCR in 57 human astrocytic brain tumors, including 34 glioblastomas, and DcR3 mRNA expression was examined by real-time semi-quantitative reverse transcription-PCR in 25 astrocytic brain tumors, including 14 glioblastomas. DcR3 gene amplification was detected in none of 7 (0%) low grade astrocytomas, 1 of 16 (6.3%) anaplastic astrocytomas, and 7 of 34 (20.6%) glioblastomas. DcR3 mRNA tended to be expressed higher in glioblastomas than in low grade astrocytomas. A good correlation between DcR3 gene amplification and mRNA expression was found in 25 astrocytic tumors. Expression of DcR3 mRNA in human astrocytic tumors was dependent on gene amplification. Immunoreactivity to Fas and FasL was observed in a large number of glioblastoma cases. These results suggest that high DcR3 expression with gene amplification is responsible for malignant features in high grade astrocytic tumors, and that this may be attributed to escape from Fas-FasL mediated cell death.