

髄膜腫におけるゴナドトロピン放出ホルモン受容体(GnRH-R)及びゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)の発現と細胞増殖に対するGnRHの効果 臨床病理学的ならびに培養細胞を用いた検討

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/2297/4513

髄膜腫におけるゴナドトロピン放出ホルモン受容体 (GnRH-R) およびゴナドトロピン放出ホルモン (GnRH) の発現と 細胞増殖に対する GnRH の効果

— 臨床病理学的ならびに培養細胞を用いた検討 —

金沢大学大学院医学系研究科脳医科学専攻脳機能制御学
(旧講座名：脳神経外科学)
(主任：山下純宏教授)

廣 田 雄 一

ゴナドトロピン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) およびその受容体 (GnRH receptor, GnRH-R) は、乳癌、子宮癌、前立腺癌などの性ホルモン依存性腫瘍に共に発現し、その自己分泌機構により細胞増殖の制御機構を担っているといわれている。そして、そのスーパーアゴニストを用いた癌のホルモン療法が、現在実用化されている。髄膜腫 (meningioma) は、中高年女性に好発する良性脳腫瘍であり、以前から性ホルモンの関与が示唆されている。本研究では、髄膜腫 82 例を対象に GnRH-R および GnRH の発現を免疫組織化学法と逆転写 (reverse transcription, RT) -PCR 法を用いて検討した。同時にプロゲステロン受容体 (progesterone receptor, PgR), エストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) と増殖能の指標である Ki-67 の免疫組織化学的検討および臨床病理学的事項との相関についても併せて検討した。髄膜腫における GnRH-R の機能を評価するため、髄膜腫 6 例を細胞培養し、GnRH のアゴニストおよびアンタゴニスト投与による細胞増殖解析を行った。髄膜腫における GnRH-R の mRNA および免疫組織化学的発現は、それぞれ 100% と 95% であり、GnRH の mRNA および免疫組織化学的発現は、86% と 60% であった。GnRH-R と PgR の免疫組織化学的発現間に、正の相関関係を認めた。臨床病理学的検討では、GnRH の免疫組織化学的陽性例が男性例で有意に多かった。培養細胞の 6 例全例において、アゴニスト投与により有意な増殖を認めた。また、アゴニストとアンタゴニストの同時投与を行った 3 例では有意な増殖はみられず、その作用が受容体を介するものであることが確認された。アンタゴニストの単独投与では、GnRH を発現していた 1 例において細胞増殖抑制がみられ、自己分泌機構の存在が示唆された。以上より、多くの髄膜腫は GnRH-R を発現し、GnRH が細胞増殖の調節因子の一つとして働いており、一部に自己分泌機構が存在することが示唆された。

Key words gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin-releasing hormone receptor, cell proliferation, meningioma

髄膜腫 (meningioma) は、全脳腫瘍の中で最も頻度の高い (26.4%) 良性腫瘍であり¹⁾、クモ膜顆粒の表層細胞 (arachnoid cap cell) から発生することが知られている²⁾。本腫瘍は大部分が良性ではあるが、多発性のもや頭蓋底などに発生し全摘出が困難な場合がある^{3)~5)}。また、全摘出されても 10 年後には 9-20% 再発し、亜全摘では後療法を行わない場合 10 年再発率約 40% とされており⁵⁾⁶⁾、治療困難な症例が存在する。このため局所制御を目的とした治療法が試みられてきた。放射線治療は悪性化したものには効果があるとされ^{7)~9)}、残存腫瘍に対する後療法および再発例の治療法として近年一般化しているが、腫瘍を縮小させるほどの効果は期待できない¹⁰⁾¹¹⁾。画像技術の発

展により照射計画の技術、照射精度は向上したものの、髄膜腫亜全摘例の照射後の 10 年再発率は、12-23% と依然として高い¹⁰⁾¹¹⁾。また放射線治療後の周囲正常組織への損傷を軽減するものとして、定位的放射線手術が盛んに行われつつあるが、脳神経の障害や脳浮腫などの重要な副作用の報告もある¹²⁾。再発例で、もはや手術や放射線治療が期待できないものに対して、ミフェプリストン (抗プロゲステロン剤) やタモキシフェン (抗エストロゲン剤) などのホルモン療法¹³⁾¹⁴⁾ やハイドロキシウレアを用いた化学療法¹⁵⁾ が注目されているものの、いずれも少数例に対する報告のみで、確立された治療法とはなっていない。

平成 15 年 2 月 5 日受付, 平成 15 年 3 月 5 日受理

Abbreviations : 3,3'-diaminobenzidine, DAB; epithelial membrane antigen, EMA; estrogen receptor, ER; fetal bovine serum, FBS; gonadotropin, Gn; gonadotropin-releasing hormone, GnRH; gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRH-R; leukocyte common antigen, LCA; labeling index, LI; progesterone receptor, PgR; Tris-buffered saline-Tween20, TBS-T

髄膜腫は女性に多く発生し、50-70歳と閉経後に好発する。また妊娠中の増大や産後に症状の改善がみられることがある¹⁶⁾¹⁷⁾。さらに、乳癌との関連性も指摘され¹⁸⁾¹⁹⁾、また性ホルモンの関与が以前から示唆されており²⁰⁾、性ホルモン受容体の研究が数多くなされてきた。特にプロゲステロン受容体 (progesterone receptor, PgR) とエストロゲン受容体 (estrogen receptor, ER) の発現は、それぞれ髄膜腫の60-80%、0-30%にみられると報告されている^{21) 23)}。プロゲステロンやエストロゲンの投与による増殖解析と、拮抗薬であるミフェプリストンやタモキシフェンの投与による抑制実験が行われ²⁴⁾²⁵⁾、本薬剤を用いた臨床試験が少数例に対して行われたが、十分な効果はまだ得られていない^{13) 14)}。

ゴナドトロピン放出ホルモン (gonadotropin-releasing hormone, GnRH) は哺乳類において、脳内の視索前野/中隔から視床下部にかけて散在するGnRHニューロンで合成される²⁶⁾。正中隆起に分布する終末から下垂体門脈に放出され、下垂体のゴナドトロピン (gonadotropin, Gn) 産生細胞にあるゴナドトロピン放出ホルモン受容体 (gonadotropin-releasing hormone receptor, GnRH-R) に結合してGnの合成・放出を刺激する²⁷⁾。血中に分泌されたGnは性腺に作用し、性ホルモンの合成・放出を促す。血中に放出されたエストロゲンやプロゲステロンは、下垂体前葉や脳にフィードバックすることで性腺の状態を中枢に伝える。GnRHは10個のアミノ酸からなる小さな分子の神経ペプチドである²⁸⁾。GnRHは下垂体門脈系に放出される以外に第三脳室にも、ある時期に多量に放出され、その量は血中以上に高値であるといわれている²⁹⁾³⁰⁾。GnRH産生細胞は脳以外にも、生殖腺、胎盤などでみつき、その機能は局所での調節作用を持つと考えられている³¹⁾。

GnRH-Rは主に、下垂体前葉細胞や胎盤の栄養膜細胞、脳の海馬、外側中隔核、嗅内野皮質の神経細胞などに局在する^{32) 34)}。本受容体はG蛋白を介して、MAPキナーゼ (mitogen-activated protein kinase, MAPK) カスケードによるシグナル伝達経路を活性化させ、細胞増殖およびホルモン産生、分泌をうながす³⁵⁾。正常な組織以外にも下垂体腺腫や乳癌、前立腺、卵巣、子宮、膵臓の腫瘍化したものなど多くの内分泌腫瘍やホルモン依存性腫瘍においてGnRH-Rの発現が報告されている^{31) 34)36)}。乳癌、卵巣癌、子宮筋腫、子宮内膜癌、前立腺癌などではGnRHの自己分泌による細胞増殖制御機構の存在が示唆され^{31)37) 40)}、これらの腫瘍に対してGnRHのスーパーアゴニストが細胞増殖を抑制すると報告されている³¹⁾⁴¹⁾⁴²⁾。髄膜腫は性ホルモン依存性腫瘍と考えられており、本腫瘍に対する新しいホルモン療法の可能性を模索するために、GnRH-RおよびGnRHの発現とその意義について臨床病理学的ならびに培養細胞を用いて検討した。

対象および方法

I. 対象

1990年から2002年にかけて当教室および関連施設にて外科的切除がなされた頭蓋内髄膜腫82例を対象とした。髄膜腫の病理組織学的分類は、WHOの脳腫瘍分類に従った。内訳は髄膜腫細胞性 (meningothelial, grade I) 33例、線維芽細胞性 (fibrous, grade I) 7例、移行型 (transitional, grade I) 33例、砂腫性 (psammomatous, grade I) 4例、血管腫性 (angiomatous, grade I) 1例、異型 (atypical, grade II) 3例なら

びに退形成性 (anaplastic, grade III) 1例であった。クモ膜絨毛は剖検より得られ、肺癌の転移性脳腫瘍は摘出手術時に得られた。胎盤は患者の承諾を得たものを本学分子細胞病理学教室 (旧第一病理学教室) より分与された。また、乳癌はコントロールスライドをDAKO Japan (京都) より購入した。摘出標本は、免疫組織化学用に速やかに4%パラホルムアルデヒドにて固定し、パラフィンに包埋した。髄膜腫21例は摘出後、速やかに液体窒素で凍結し、RNAを抽出するまで-130℃で保存した。また、髄膜腫6例は摘出後、直ちに無菌的に細切し培養に供した。培養には10%牛胎児血清 (fetal bovine serum, FBS) (Gibco BRL, Rockville, USA) および1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有のDulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL) 培地を使用し、湿潤37℃、5% CO₂の条件下で行った。

II. 総RNAの分離と逆転写-PCR

凍結組織およびトリプシン-EDTA (Gibco BRL) 処理にて採取した培養細胞からの総RNAの抽出と精製は、RNeasy Kit (QIAGEN K.K., 東京) を用いて行った。GnRH-RおよびGnRHのmRNAの発現を調べるため、これらを鋳型としてFirst-strand cDNA Synthesis Kit (Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) を用い、cDNAを調整した。得られたcDNAを鋳型とし、GnRH-Rは5'プライマーとして5'-GCCTCTCCTGAACAGAATCAA-3'、3'プライマーとして5'-CGGATCTTTCCAGACAAGGTCA-3'を用い、GnRHは5'プライマーとして5'-TTGGCTCTCTGCCTCTAAACAG-3'、3'プライマーとして5'-TCCACGCACCAAGTCAGTAGAAT-3'を用い、AmpliQ DNA Polymerase (Applied Biosystems Japan, 東京) にて増幅した。

III. 各種抗体

抗ヒトGnRH-R抗体 (A9E4) (Quartett, Berlin, Germany)、抗ヒトGnRH抗体 (NT109) (Affiniti Research Products, Exeter, UK)、抗ヒトPgR抗体 (PgR636) (DAKO)、抗ヒトER抗体 (1D5) (DAKO)、抗ヒトKi-67抗体 (MIB-1) (DAKO)、抗ヒト白血球共通抗原 (leukocyte common antigen, LCA) 抗体 (PD7/26 and 2B11) (DAKO)、抗 α -チューブリン抗体 (TU-02) (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) および抗ヒト上皮膜抗原 (epithelial membrane antigen, EMA) 抗体 (E29) (DAKO) を用いた。

IV. 免疫組織化学

1. 免疫染色法

パラフィンに包埋した組織より厚さ4 μ mの切片を作製し、シランコートしたスライドガラス (DAKO) 上に貼り付け乾燥させた。キシレンにて脱パラフィン後、連続希釈のエタノールにて親水しPBSで洗浄後、0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを失活させた。LCA免疫染色以外では0.01Mクエン酸緩衝液を用い、抗原賦活処理を行った。Ki-67免疫染色ではマイクロウェーブにて15分間 (3分間×5回) 加熱処理を行い、GnRH-R、GnRH、PgRおよびER免疫染色では圧力鍋にて25分間加熱処理を行った。PBSで洗浄後、非特異的反応抑制のため、ブロッキング抗体 (正常血清) を室温で30分間作用させた。一次抗体は抗GnRH-R抗体、抗GnRH抗体、抗PgR抗体、抗ER抗体、抗Ki-67抗体および抗LCA抗体を抗体希釈用緩衝液 (DAKO) にてそれぞれ100倍、200倍、50倍、50倍、50倍および50倍に希釈して用い、4℃で一晩反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories, Durham, USA)

を30分間反応させた後、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合抗体法と0.005%過酸化水素加0.02%ジアミノベンジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma, St.Louis, USA)処理により発色させ、ヘマトキシリンにて核染色を行った。陽性コントロールとしてGnRH-RおよびGnRH免疫染色では胎盤の組織標本を、PgRおよびER免疫染色では乳癌組織 (DAKO) をKi-67免疫染色では肺癌の転移性脳腫瘍の組織標本を用い、陰性コントロールとしては一次抗体を省いたものとした。また、髄膜腫の発生母地であるクモ膜絨毛において、GnRH-RおよびGnRHが発現しているか否か、免疫組織化学を行い検討した。

2. 免疫染色の評価

免疫染色標本について400倍の鏡検視野3箇所においてそれぞれ全細胞中の陽性細胞数を計測し、その平均を百分率で評価した。GnRH-RおよびGnRHについては陽性率が10%以上を陽性、10%未満を陰性とした。核に陽性反応がみられるPgR, ERおよびKi-67については、その平均の百分率を標識指数 (labeling index, LI) とした。PgRおよびER LIが70%以上を強陽性 (+++), 40%以上70%未満を陽性 (++)、10%以上40%未満を弱陽性 (+) とし、10%未満は陰性 (-) とした。Ki-67 LIが3%以上を陽性 (++)、1%以上3%未満を弱陽性 (+)、1%未満を陰性 (-) とした。

V. 細胞培養

1. 髄膜腫培養細胞の特性付け

髄膜腫は神経堤組織由来の腫瘍であるため、EMAを発現し、その有無が線維芽細胞やリンパ球との鑑別に有用であることが知られている⁴³⁾。したがって、後述する免疫細胞化学にてEMAの陽性率が90%以上であることを確認した6例の継代2代目から4代目を実験に供した。

2. 免疫細胞化学

チャンバースライド (旭テクノグラス, 東京) にて培養した細胞を冷0.1M PBS (pH 7.4) で洗浄した後、4%パラホルムアルデヒドで数分間固定した。その後、冷PBSで洗浄し0.3%過酸化水素加メタノールにて内因性ペルオキシダーゼを失活させた。抗原賦活処理のため0.1Mクエン酸緩衝液にスライドガラスを入れ、15分間のマイクロウェーブ処理を行った。非特異的反應抑制のため、ブロッキング抗体 (正常血清) を室温で20分間作用させた。一次抗体は、抗EMA抗体を抗体希釈用緩衝液 (DAKO) にて50倍に希釈して用い、4℃で一晩反応させた。対応するビオチン化二次抗体 (Vector Laboratories) を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抗体法と0.005%過酸化水素加0.02% DAB (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。

VI. ウェスタンブロット解析

培養細胞はトリプシン-EDTA処理後、冷PBSで洗浄し6,000rpmの遠心にて沈殿させ回収した後、PBS中で超音波破碎した。破碎後、直ちに各々を4℃、15,000rpmで10分間遠心し上清を回収後、10%2-メルカプトエタノールを含むSDS緩衝液を加え100℃で5分間加熱した。電気泳動はLaemmliのSDS-PAGE法により行った。4-20%ポリアクリルアミドゲル (第一化学薬品, 東京) を用い、各レーンあたり30 μ gの蛋白質を泳動した。電気泳動終了後、ポリアクリルアミドゲル上に分離された蛋白質をPVDF (polyvinylidene difluoride) メンブレン (Amersham Biosciences) に転写し、1%ゼラチン (Bio-Rad, Hercules, USA) を加えた0.1% Tween20 (和光純薬工業, 東京)

入りトリス塩酸緩衝液 (Tris-buffered saline-Tween20, TBS-T) にて1時間ブロッキングした。一次抗体は、抗GnRH-R抗体を1%ゼラチン入りTBS-Tにて500倍に希釈し、4℃で一晩反応させた。その後、アルカリフォスファターゼ標識二次抗体 (Sigma) を1時間反応させた後、Xリン酸/ニトロブルーテトラゾリウム (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate/nitroblue tetrazolium, BCIP/NBT) (Sigma) を用いて発色させた。内部コントロールとして α -チューブリン (500倍希釈) を同様に反応させた。

VII. GnRH アゴニストおよび GnRH アンタゴニスト処理と細胞増殖解析

髄膜腫の増殖におけるGnRHの役割を調べるため、培養細胞6例にGnRHアゴニスト ([D-Lys⁶]-GnRH) (Sigma) を、またそのうち3例にGnRHアンタゴニスト (Antide) (Sigma) を投与し、細胞増殖解析を行った。各症例ごと96ウェルマイクロプレートに1ウェル当たり10% FBSおよび1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有のDMEM培地100 μ l中1 \times 10⁵個の細胞をまき、プレインキュベートを24時間行った。その後GnRHアゴニスト処理を、濃度勾配をつけて(10⁻¹¹, 10⁻⁹, または10⁻⁷ M) 7日間毎日行った。そのうち3例はGnRHアゴニストおよびアンタゴニストの同時処理 (GnRH 10⁻¹¹ MおよびAntide 10⁻⁹ M, GnRH 10⁻⁹ MおよびAntide 10⁻⁷ M, またはGnRH 10⁻⁷ MおよびAntide 10⁻⁷ M), またGnRHアンタゴニストの単独処理 (Antide 10⁻⁹ MまたはAntide 10⁻⁷ M) も同様に7日間毎日行った。コントロールはGnRHアゴニストおよびアンタゴニストの希釈に用いた蒸留水で処理した。各処理を3ウェルずつ行ない、培地交換は2日毎に行った。7日間終了の後、プロモデオキシウリジン (5-bromo-2'-deoxyuridine) 標識細胞増殖ELISAシステム (Amersham Biosciences) を用い、マイクロプレートリーダーにて合計3回計測した。

VIII. 統計学的検討

髄膜腫におけるGnRH-RおよびGnRH免疫組織化学的発現の有無と、臨床病理学的パラメーターである腫瘍悪性度、組織学的亜分類、腫瘍部位、再発の有無、多発か単発か、性別、閉経前後、子宮摘出の有無、年齢50歳未満50歳以上、との間の有意差判定は χ^2 検定またはFisherの直接確率計算法による検定を行った。GnRH-RおよびGnRH免疫組織化学的発現の有無と

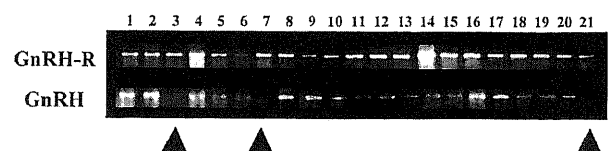


Fig. 1. RT-PCR analysis of GnRH-R mRNA and GnRH mRNA in meningiomas from 21 cases. The expected 101-bp PCR product for GnRH-R mRNA was detected in all 21 meningiomas. The expected 79-bp PCR product for GnRH mRNA was detected in 18 of 21 meningiomas. In lanes 3, 7 and 21 mRNAs from 3 meningiomas were negative for GnRH (arrow heads). Lanes 1 to 21; cases 54, 31, 53, 43, 78, 33, 42, 55, 56, 60, 63, 65, 14, 16, 49, 18, 30, 81, 25, 9 and 10, respectively.

Table 1. GnRH-R, GnRH, PgR, ER and Ki-67 expression and clinicopathological features in meningiomas from 82 patients

Case no.	Age (yr) /Sex	Tumor location	Histological type	Tumor size (cm)	Menopausal status	GnRH-R		GnRH		PgR	ER	Ki-67
						mRNA*	IHC**	mRNA*	IHC**	IHC**	IHC**	IHC**
1	20/F	Convexity	Tr	3	Pre	ND	+	ND	+	-	-	+
2	21/F	Lateral ventricle	Tr	2.5	Pre	ND	-	ND	-	-	-	-
3	27/F	Petroclival-	Me	6	Pre	ND	+	ND	+	+++	-	-
4	35/F	Tentorial	Me	3	Pre	ND	+	ND	+	-	-	-
5	41/F	Petroclival	Tr	5	Pre	ND	+	ND	+	+	-	-
6	42/F	Petroclival	Me	3	Pre	ND	+	ND	+	+++	-	-
7	42/F	C-P angle	Me	2	Pre	+	+	-	-	+++	-	-
8	45/F	Falx	Ps	4	Hysterectomy	ND	-	ND	-	+	-	-
9	45/F	Tentorial	Tr	3	Pre	+	+	+	-	+	-	+
10 †	46/F	C-P angle	Tr	1.5	Pre	+	+	-	-	+++	-	-
11	47/F	Tuberculum sellae	Fi	1.5	Pre	ND	+	ND	+	++	-	-
12	47/F	Tuberculum sellae	Me	2	Hysterectomy	ND	+	ND	+	+++	-	-
13	47/F	Tentorial	Me	2	Pre	ND	+	ND	-	++	-	-
14	48/F	Convexity	Ps	5	Hysterectomy	+	+	+	-	+	-	-
15	49/F	Convexity	Me	1.5	Post	ND	+	ND	+	++	-	-
16	49/F	Olfactory groove	Me	3	Pre	+	+	+	+	+++	-	-
17	50/F	Petroclival	Me	6	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
18 †	50/F	Tuberculum sellae	Tr	1.5	Pre	+	+	+	-	+++	-	-
19	51/F	Tentorial	At	6	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
20	52/F	Tentorial	Ang	2	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
21	54/F	Falcotentorial	Tr	3	Post	ND	+	ND	-	+	-	-
22	54/F	Tentorial	Tr	1.2	Post	ND	+	ND	+	ND	-	++
23	56/F	Falx	Fi	4	Post	ND	+	ND	-	++	-	-
24	56/F	Tentorial	Me	3	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
25 †	56/F	Tuberculum sellae	Me	1.5	Post	+	+	+	+	+++	-	-
26	57/F	Convexity	Ps	4	Hysterectomy	ND	+	ND	-	+++	-	-
27	57/F	Falx	Tr	2.5	Post	ND	+	ND	-	+	-	-
28	57/F	Tentorial	Me	3	Post	ND	-	ND	+	-	-	-
29	57/F	Convexity	Tr	2	Hysterectomy	ND	+	ND	-	++	-	-
30	57/F	Foramen magnum	Tr	3	Hysterectomy	+	+	+	-	+++	-	-
31	58/F	Convexity	Tr	5	Post	+	+	+	+	++	-	+
32	59/F	Sphenoid ridge	Me	2	Post	ND	+	ND	+	-	-	-
33	59/F	Sphenoid ridge	Tr	4	Post	+	+	+	-	+++	-	-
34	61/F	Sphenoid ridge	Me	1.5	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
35	61/F	Tuberculum sellae	Ps	3	Post	ND	+	ND	+	++	-	-
36	62/F	Petroclival	Me	5	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
37	64/F	Tentorial	Fi	2	Post	ND	+	ND	-	++	-	-
38	64/F	Foramen magnum	Tr	1.3	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
39	65/F	Tentorial	Fi	4	Post	ND	+	ND	-	++	-	-
40	65/F	Convexity	Me	2.5	Post	ND	+	ND	+	-	-	-
41	65/F	Convexity	Tr	2	Post	ND	+	ND	-	++	-	-
42	66/F	Tuberculum sellae	Me	1.8	Post	ND	+	ND	+	-	-	-
43	66/F	Tuberculum sellae	Me	4.5	Hysterectomy	+	+	+	+	+++	-	-
44	68/F	Tentorial	Tr	5	Post	ND	+	ND	-	+	-	-
45	69/F	Convexity	Fi	2	Post	ND	+	ND	-	-	-	-
46	71/F	Convexity	Tr	2.5	Hysterectomy	ND	+	ND	-	+++	-	-
47	72/F	Falx	Ana	7	Hysterectomy	ND	+	ND	+	-	-	-
48	72/F	Falx	Tr	2	Post	ND	+	ND	-	+++	-	+
49	72/F	C-P angle	Me	3.5	Hysterectomy	+	+	+	-	+	-	-
50	73/F	Sphenoid ridge	Me	5	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
51	74/F	Sphenoid ridge	Me	4.5	Post	ND	+	ND	-	++	-	-
52	74/F	Convexity	Tr	5	Post	ND	+	ND	+	+++	-	-
53	75/F	Convexity	Me	4	Hysterectomy	+	+	-	-	-	-	-
54	76/F	C-P angle	Tr	4.5	Post	+	+	+	+	+	-	-
55 †	76/F	Tentorial	Tr	5	Post	+	+	+	-	+++	-	-
56	33/M	Convexity	Tr	4		+	+	+	+	+	-	-
57	38/M	Parasagittal	Tr	4.5		ND	+	ND	+	+++	-	-
58	45/M	Tuberculum sellae	Tr	7		ND	+	ND	-	+++	-	+
59	45/M	Parasagittal	Me	5		ND	+	ND	-	+	-	-
60	45/M	Olfactory groove	Me	1.5		+	+	+	+	+++	-	-
61	48/M	Convexity	Me	6		ND	+	ND	-	++	-	-
62	49/M	Tuberculum sellae	Tr	4		ND	+	ND	+	+++	-	-
63	50/M	Falx	At	6		+	+	+	+	+++	-	++
64	56/M	Convexity	Me	3		ND	+	ND	+	++	-	-
65 †	58/M	Parasagittal	Tr	5		+	+	+	+	++	-	-
66	59/M	Falx	Tr	1.5		ND	+	ND	+	-	-	-
67	61/M	Parasagittal	Me	4		ND	+	ND	+	+++	-	-
68	63/M	Parasagittal	ND	7		ND	+	ND	-	++	-	-
69	66/M	Tuberculum sellae	Tr	1.5		ND	+	ND	+	++	-	-
70	67/M	Tuberculum sellae	Tr	2.5		ND	+	ND	+	+++	-	-
71	68/M	Convexity	Fi	4		ND	+	ND	+	+++	-	-
72	68/M	Parasagittal	Fi	4.5		ND	+	ND	+	++	-	-
73	68/M	C-P angle	Me	3.5		ND	+	ND	+	+++	-	-
74	69/M	Falx	Me	6.5		ND	+	ND	+	+	-	-
75	69/M	Convexity	Tr	6		ND	+	ND	+	-	-	-
76	71/M	Parasagittal	Me	5		ND	+	ND	+	+	-	-
77	72/M	Sphenoid ridge	Me	5		ND	+	ND	+	+++	-	-
78 †	75/M	Sphenoid ridge	Tr	3.5		+	+	+	-	++	-	-
79	76/M	Clivus	Me	3.5		ND	+	ND	+	+++	-	-
80	77/M	Falx	At	8		ND	-	ND	+	-	-	ND
81	77/M	Convexity	Tr	6		+	+	+	-	-	-	++
82	82/M	Convexity	Tr	6		ND	+	ND	+	+++	-	-

yr, years; IHC, immunohistochemistry; F, female; M, male; C-P angle, cerebellopontine angle; Me, meningothelial; Fi, fibrous; Tr, transitional; Ps, psammomatous; Ang, angiomatous; At, atypical; Ana, anaplastic; Pre, premenopose; Post, postmenopose; ND, investigation not done.

† Meningioma cells of the cases were cultured.

*+, positive; -, negative.

** Immunoreactivity were scored as described in Materials and Methods.

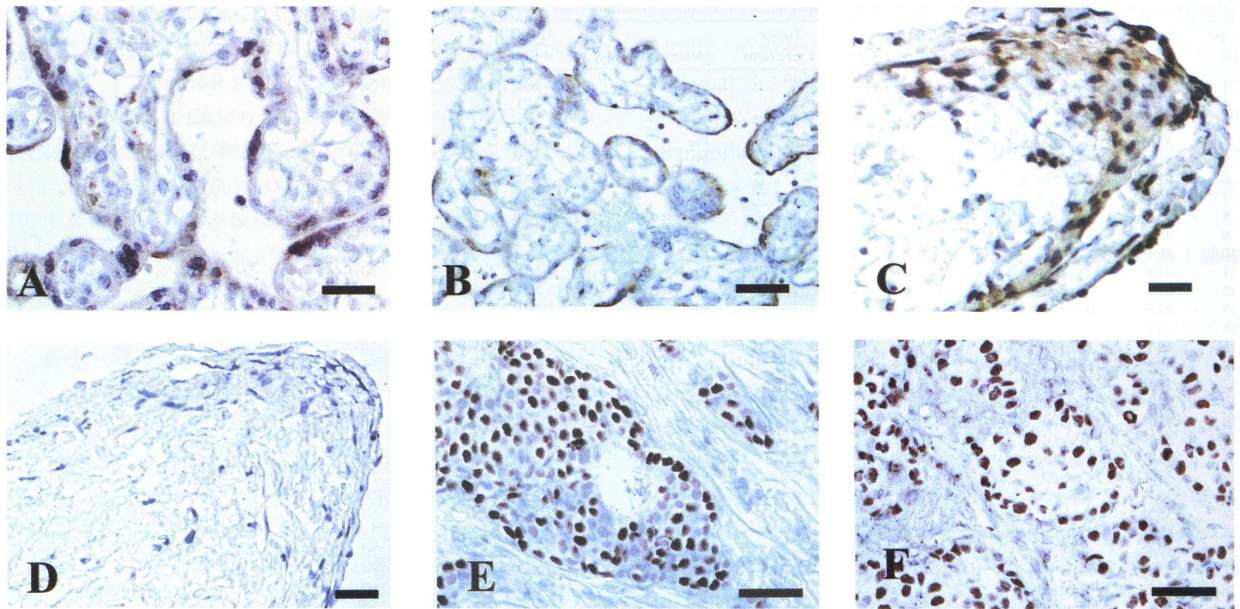


Fig. 2. Immunohistochemical staining of GnRH-R, GnRH, PgR and ER. In the positive control for GnRH-R, GnRH, PgR and ER immunostaining, immunopositive GnRH-R and GnRH were detected in the cytoplasm of placental syncytiotrophoblast (A, B). Nuclei of human breast carcinoma cells were stained for PgR and ER (E, F). A cytoplasmic immunoreactivity for GnRH-R was detected in cap cell cluster (C), but GnRH was not detectable in a human arachnoid villus (D). The scale bars indicate $50\mu\text{m}$.

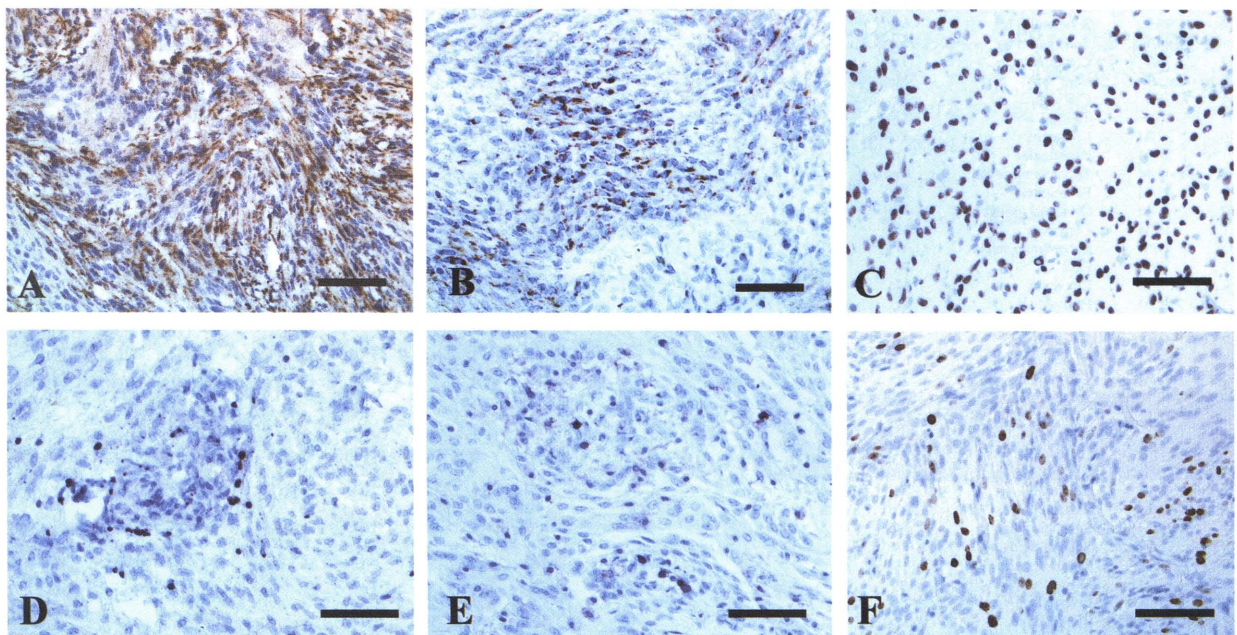


Fig. 3. Immunohistochemical staining of GnRH-R, GnRH, PgR, ER, LCA and Ki-67 in meningioma tissue specimens. A cytoplasmic immunoreactivity for GnRH-R and GnRH was detected (A, B). Nuclei of meningioma cells were stained for PgR (C). Because immunopositive ER was limited to nuclei of small cells (D) that were also stained for LCA (E), these cells were considered as lymphocytes. Nuclear staining of Ki-67 was seen (F). The scale bars indicate $50\mu\text{m}$.

年齢、腫瘍径、PgR LI、ER LI および Ki-67 LI との間の有意差判定は、Fisher の検定による等分散の検定後、Student の t 検定または Welch の t 検定を行った。

髄膜腫培養細胞における細胞増殖解析においては、一元配置分散分析法による解析後、Fisher の Protected Least Significant Difference (PLSD) 法を用いた多重比較検定を行った。

数値は平均±標準偏差で表記し、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

成 績

表1に全症例の臨床病理学的所見とGnRH-RおよびGnRHのmRNA発現、さらにGnRH-R、GnRH、PgR、ERおよびKi-67の

Table 2. Correlation between GnRH-R immunoreactivity and clinicopathological parameters in meningiomas from 82 patients

Variable	GnRH-R immunoreactivity			P value
	+(n=78)	-(n=4)	Total	
GnRH immunoreactivity				>0.999
+	47	2	49	
-	31	2	33	
PgR LI*				0.002**
$\bar{x} \pm SD$	55.58 ± 31.87	3.25 ± 6.50		
Ki-67 LI*				0.67
$\bar{x} \pm SD$	0.33 ± 1.34	0		
tumor grade				0.065
Benign	75	3	78	
Atypical	2	1	3	
Anaplastic	1	0	1	
Histological subtype				0.26
Meningothelial	32	1	33	
Fibrous	7	0	7	
Transitional	32	1	33	
Psammomatous	3	1	4	
Angiomatous	1	0	1	
Multiple/Solitary				0.141
Multiple	2	1	3	
Solitary	76	3	79	
Reccurence				>0.999
Reccurent	2	0	2	
Non-reccurent	76	4	80	
Sex				>0.999
Male	26	1	27	
Female	52	3	55	
Menoposal status				0.509
Premenopose	12	1	13	
Postmenopose	30	1	31	
Hysterectomy				>0.999
Premenopose	12	1	13	
Hysterectomy	10	1	11	
Tumor size (cm)*				0.41
$\bar{x} \pm SD$	3.66 ± 1.64	4.38 ± 2.50		
Age (yr)				0.312
<50	21	2	23	
≥50	57	2	59	
Age (yr)*				0.218
$\bar{x} \pm SD$	58.42 ± 12.68	50.00 ± 23.41		

LI, labeling index.

The data were analyzed by Chi square test or Fisher's exact test.

* The data were analyzed by Student's t-test or Welch's t-test.

** P value less than 0.05 was considered significant.

免疫組織化学の結果を示した。

I. 臨床的特徴

男性27例, 女性55例で性差は1:2と女性に多く, 平均年齢は58.01 ± 13.12歳 (20-82歳) であった。MRI上での腫瘍径の平均は3.70 ± 1.67 cm (1.2-8 cm) であった。腫瘍悪性度は良性が78例 (95.1%)で, 異型が3例, 退形成性が1例であった。女性55例中, 閉経前の発症は13例であり, 閉経後が31例, 子宮摘出後が11例であった。

II. GnRH-RおよびGnRHのmRNAの発現

髄膜腫の組織21例において, GnRH-RのmRNAの発現は21

例全例に, GnRHのmRNAは3例を除く18例 (85.7%) に認めた (図1)。

III. GnRH-R, GnRH, PgRおよびERの免疫組織化学的検討

1. 正常および陽性コントロール

GnRH-RおよびGnRHは胎盤の合胞体性栄養膜細胞の細胞質に陽性反応を認めた (図2A, B)。髄膜腫の発生母地であるクモ膜絨毛においては, 表層細胞の合胞体 (cap cell cluster) の細胞質にGnRH-Rの陽性反応を認めたが (図2C), GnRHはすべてのクモ膜絨毛細胞において陰性を呈した (図2D)。PgRおよびER

Table 3. Correlation between GnRH immunoreactivity and clinicopathological parameters in meningiomas from 82 patients

Variable	GnRH-R immunoreactivity			P value
	+(n=49)	-(n=33)	Total	
PgR LI*				0.473
$\bar{x} \pm SD$	55.21 ± 34.73	49.79 ± 30.86		
Ki-67 LI*				0.616
$\bar{x} \pm SD$	0.376 ± 1.607	0.242 ± 0.744		
tumor grade				0.243
Benign	45	33	78	
Atypical	3	0	3	
Anaplastic	1	0	1	
Histological subtype				0.12
Meningothelial	24	9	33	
Fibrous	3	4	7	
Transitional	16	17	33	
Psammomatous	1	3	4	
Angiomatous	1	0	1	
Multiple/Solitary			3	>0.999
Multiple	2	1	3	
Solitary	76	3	79	
Reccurence			2	0.513
Reccurent	2	0	2	
Non-reccurent	76	4	80	
Sex			27	0.02**
Male	21	6	27	
Female	28	27	55	
Menoposal status			13	>0.999
Premenopose	7	6	13	
Postmenopose	18	13	31	
Hysterectomy			13	0.24
Premenopose	7	6	13	
Hysterectomy	3	8	11	
Tumor size (cm)*				0.458
$\bar{x} \pm SD$	3.81 ± 1.74	3.53 ± 1.58		
Age (yr)			23	0.804
<50	13	10	23	
≥50	36	23	59	
Age (yr)*				0.846
$\bar{x} \pm SD$	57.78 ± 13.66	58.36 ± 12.89		

The data were analyzed by Chi square test or Fisher's exact test.

* The data were analyzed by Student's t-test or Welch's t-test.

** P value less than 0.05 was considered significant.

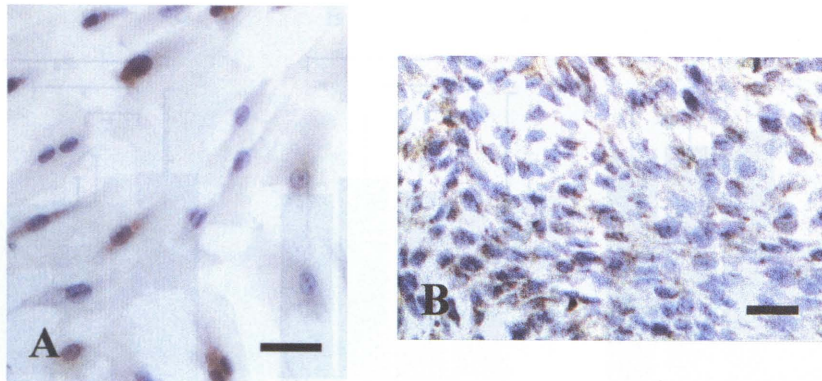


Fig. 4. Cultured meningioma cells were immunoreactive for EMA (A). Cytoplasm of meningioma cells was positive for GnRH immunostaining in case 25 (B). The scale bars indicate 50 μm.

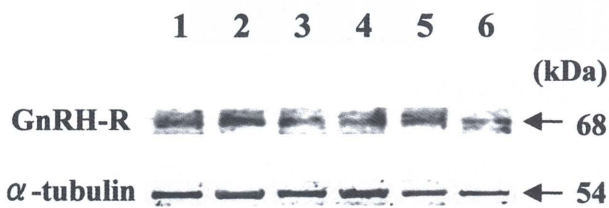


Fig. 5. Western blot analysis for GnRH-R in cultured meningioma cells. A major band of approximately 68 kDa molecular mass was identified by the A9E4 antibody in all 6 cases. Lane 1, case 78; lane 2, case 55; lane 3, case 65; lane 4, case 25; lane 5, case 10; lane 6, case 18.

は乳癌細胞の核にそれぞれ陽性反応を認めた (図2E, F).

2. 髄膜腫における検討

GnRH-Rは82例中78例(95.1%)に発現がみられ、細胞質に陽性反応を認めた(図3A)。GnRH-RのmRNA発現を認めた21例は全例陽性反応を呈した。GnRHでは82例中49例(59.8%)に発現がみられ、細胞質に陽性反応を認めた(図3B)。GnRHのmRNA発現を認めた18例中9例(50.0%)に陽性反応を認め、発現を認めなかった3例はいずれも陰性であった。PgRは82例中67例(81.7%)に陽性反応を認め(図3C)、PgR LIは平均 $53.00 \pm 33.12\%$ であった。内訳は+ (弱陽性)は14例(17.1%, LI: 28.79 ± 12.15), ++ (陽性)は17例(20.7%, LI: 48.53 ± 6.06), +++ (強陽性)は36例(43.9%, LI: 85.14 ± 2.23)であった。ERは小型細胞の核に陽性反応を認めたが(図3D)、それらはLCA陽性のリンパ球であり(図3E)、腫瘍細胞は全例陰性と判断した。Ki-67は8例(9.8%)で陽性反応を認め(図3F)、Ki-67 LIは平均 $0.32 \pm 1.32\%$ であった。内訳は+ (弱陽性)は5例(6.1%, LI: 1.80 ± 0.82), ++ (陽性)は3例(3.7%, LI: 5.68 ± 4.00)であった。

IV. GnRH-RおよびGnRHの免疫組織化学的および臨床病理学的検討

GnRH-RおよびGnRHの免疫組織化学的発現と臨床病理学的パラメーターの統計学的解析結果を、それぞれ表2および表3に示した。GnRH-Rの免疫組織化学的発現の有無と関連性を認めたものはPgR LIであり、GnRH-R陽性のものはPgR LIが有意に高かった($p=0.002$)。GnRHの免疫組織化学の結果では、臨床病理学的パラメーターのうち性差に有意差を認めた($p=0.02$)。女性のGnRH陽性が55例中28例(50.9%)に対し、男性では27例中21例(77.8%)と高い傾向を示した。上記以外に、GnRH-RおよびGnRH免疫組織化学的発現の有無と、他の免疫組織化学的発現、臨床病理学的パラメーターである腫瘍悪性度、組織学的亜分類、年齢、腫瘍径、多発か単発か、再発の有無、腫瘍部位(データ非提示)との間に関連性は認めなかった。

V. 培養髄膜腫細胞におけるGnRH-Rの発現と細胞増殖解析

培養を行った6例は、表1の症例10, 18, 25, 55, 65および78であり、女性4例、男性2例、平均年齢 60.17 ± 12.62 歳、閉経前後各2例、髄膜腫細胞性1例、移行型5例であった。髄膜腫の培養細胞であることを確認するためEMAの免疫組織化学検討を行った(図4A)。これら6例のうち、症例25と症例65においてGnRHの発現が免疫組織化学にて同定された(図4B)。症例25はGnRHアゴニストとアンタゴニストの同時処理およびGnRHアンタゴニスト単独処理を行った群(症例10, 18, 25)に含まれていた。6例の培養髄膜腫細胞すべてにおいて、ウェスタンブロット解析を用いてGnRH-R蛋白の発現を確認した(図5)。

6例の培養細胞はGnRHアゴニストの投与により、各濃度間での有意差は認めなかったものの、コントロールと比較し統計学的有意差をもって細胞増殖の促進を認めた(図6)。上記6例のうち症例10, 18, 25においてはGnRHアゴニストとアンタゴニストの同時投与、ならびにGnRHアンタゴニストの単独投与を行った。GnRHアゴニストとアンタゴニストの同時投与では、コントロールと比較しほとんど細胞増加は認めなかったが(図7)、GnRHアンタゴニストの単独投与では、興味深いことにGnRHを発現していた症例25のみ細胞増殖抑制がみられた(図8)。

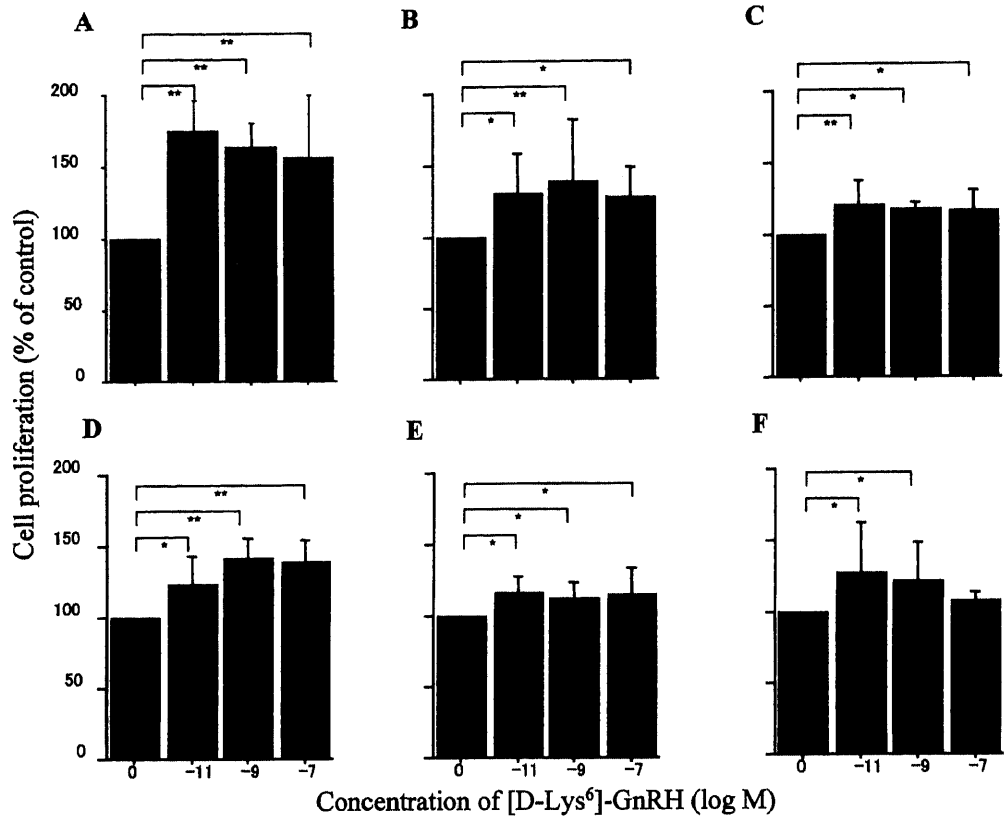


Fig. 6. Effect of GnRH on the proliferation of cultured meningeoma cells assessed by BrdU labeling ELISA. Cultured meningeoma cells were treated with different concentrations of [D-Lys⁶]-GnRH (10^{-11} , 10^{-9} or 10^{-7} M). Control cultures were treated with vehicle (distilled water). (A) Case 18; (B) Case 10; (C) Case 25; (D) Case 65; (E) Case 55; (F) Case 78. Results are shown as the means of three measurements with triplicate samples and are presented as the $\bar{x} \pm$ SD. The data were analyzed by one-way analysis of variance and Fisher's Protected Least Significant Difference (PLSD). * $P < 0.05$ vs. control, ** $P < 0.01$ vs. control.

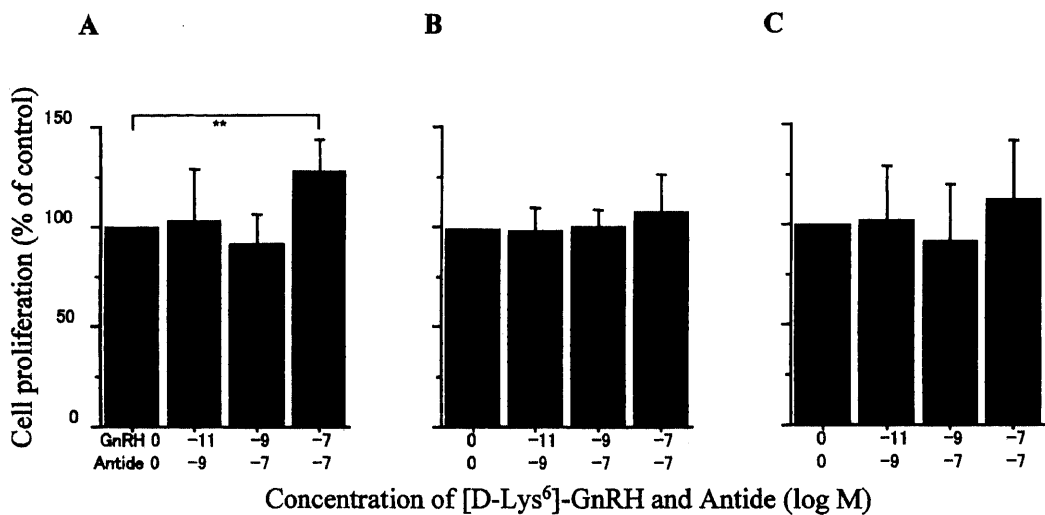


Fig. 7. Effect of GnRH and Antide on the proliferation of cultured meningeoma cells assessed by BrdU labeling ELISA. Cultured meningeoma cells were treated with different concentrations of [D-Lys⁶]-GnRH and GnRH antagonist, Antide. The cells were incubated with medium containing [D-Lys⁶]-GnRH (10^{-11} M) plus Antide (10^{-9} M), [D-Lys⁶]-GnRH (10^{-9} M) plus Antide (10^{-7} M), or [D-Lys⁶]-GnRH (10^{-7} M) plus Antide (10^{-7} M). Control cultures were treated with vehicle (distilled water). (A) Case 18; (B) Case 10; (C) Case 25. Results are shown as the means of three measurements with triplicate samples and are presented as the $\bar{x} \pm$ SD. The data were analyzed by one-way analysis of variance and Fisher's protected least significant difference (PLSD). ** $P < 0.01$ vs. control.

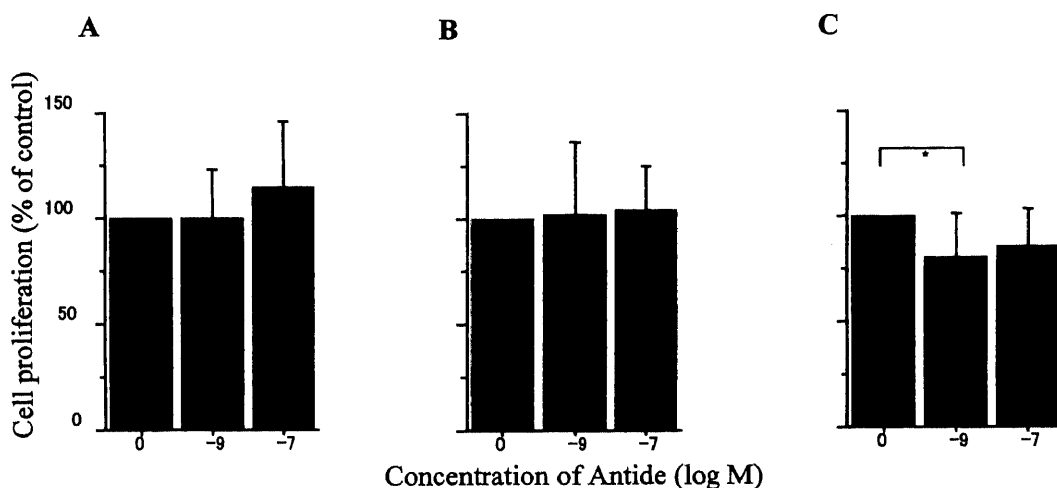


Fig. 8. Effect of Antide on the proliferation of cultured meningioma cells assessed by BrdU labeling ELISA. Cultured meningioma cells were treated with different concentrations of GnRH antagonist, Antide (10^{-9} or 10^{-7} M). Control cultures were treated with vehicle (distilled water). (A) Case 18; (B) Case 10; (C) Case 25. Results are shown as the means of three measurements with triplicate samples and are presented as the $\bar{x} \pm SD$. The data were analyzed by one-way analysis of variance and Fisher's protected least significant difference (PLSD). * $P < 0.05$ vs. control.

考 察

髄膜腫は閉経後の女性に好発する良性脳腫瘍であり、脳腫瘍の中では最も頻度が高い¹⁾。本腫瘍は大部分が良性ではあるが、頭蓋底などに発生し全摘出が困難な場合があり³⁾⁻⁵⁾、また全摘出されても10年後には9-20%再発し、治療困難な症例が存在する。難治例で、手術や放射線治療が期待できないものに対して、ホルモン療法、化学療法が注目されているが¹³⁾⁻¹⁵⁾、いずれも有効な治療法としては確立されていない。

近年、性ホルモン依存性腫瘍である乳癌、子宮癌、前立腺癌などに対してGnRHスーパーアゴニストを用いた治療が注目を浴びている。性ホルモン依存性腫瘍と考えられる髄膜腫において、本治療が効果をもたらすか否かは十分なGnRH-RおよびGnRHの発現、機能についての検討がなされなければならない。Groeninghenら⁴⁾は唯一、下垂体腺腫以外の中枢神経系腫瘍におけるGnRH-Rの発現に関して報告した。受容体結合アッセイ法を用いてGnRH-Rを測定したところ、髄膜腫の6例中3例が陽性と判断された。特に異型髄膜腫の症例においてGnRH結合濃度が最も高いこと、そして、陽性の3例はいずれもPgR陽性であることも述べている。しかし、6例という少ない症例数であること、その機能に関しては検討されていない。髄膜腫82例を検討した本研究において、GnRH-Rの免疫組織化学的発現は95.1%と高率であり、mRNAは検討した21例全例に発現していた。本研究で使用した、抗GnRH-R抗体であるA9E4モノクローナル抗体はGnRH-RのN末端の1-29エピトープを認識する⁴⁵⁾。本抗体を用いた免疫組織化学的結果は、乳癌において放射性標識リガンドの解析との比較検討から標準的生物化学アッセイとよく相関しており、GnRH-Rの発現およびGnRHとの結合を表すと考えられている⁴⁶⁾。以上より、髄膜腫におけるGnRH-Rの発現は、従来の報告よりもかなり高いものと考えられる。

髄膜腫におけるGnRH-RとPgRの同時発現は、Groeninghenら⁴⁾により報告された。今回の髄膜腫82症例の免疫組織化学的検討からGnRH-Rの発現と唯一関連性のあったものはPgRであり、GnRH-R陽性のものはPgR LIが有意に高い傾向を示した。GnRH-RとPgRの発現については、乳癌において臨床病理学的に検討されている。乳癌においてはGnRH-RとPgRが正の相関関係を示す⁴⁷⁾ものと、逆相関を示す⁴⁸⁾⁴⁹⁾とする全く相反する報告がなされている。正の相関を示す報告では、GnRH-RおよびPgRの発現は正常乳腺上皮と同様に生理学的作用を有すると考えられ、それ故に、Ki-67と逆相関を示すとされる⁴⁷⁾⁴⁸⁾。GnRH-RとKi-67が逆相関を示すことから、GnRHは乳癌の増殖を抑制すると考えられている。一方、GnRH-RとPgRが逆相関を示した報告があるが、その意義は明らかとなっていない。髄膜腫では、PgR陰性の症例は悪性で再発しやすく²³⁾⁵⁰⁾、Ki-67 LIが有意に高値を示し、PgRとKi-67は逆相関を示すとされている²²⁾。PgRにはPgR-AとPgR-Bの二つのアイソフォームが知られており⁵¹⁾、細胞増殖においてはPgR-Aが抑制に、PgR-Bが誘導に働くと考えられている⁵²⁾⁵³⁾。髄膜腫ではPgR-AとPgR-Bが同程度か⁵⁴⁾、もしくはPgR-Aが優位に発現しており⁵⁵⁾、PgR-Aを介し増殖抑制に働くのではないかと推測されている⁵⁴⁾。その一方で、PgRとKi-67は相関がないとの報告もある⁵⁶⁾。本研究では、GnRH-Rの発現はKi-67 LI ($p=0.67$) および腫瘍の悪性度 ($p=0.065$) と有意な相関はなかったが、発現例は良性である傾向がみられた。GnRH-RとPgRの両者は、髄膜腫の大部分の症例とその発生母地とされるクモ膜絨毛に発現し⁵⁷⁾、髄膜腫における両者の発現が正の相関関係を示した。以上の免疫組織化学的および臨床病理学的検討から、髄膜腫におけるGnRH-RとPgRはともに生理学的なホルモン依存性の調節機構を担っていると推測された。

髄膜腫におけるGnRH-Rの機能については興味ある報告がなされている。3例の髄膜腫の培養細胞に対してGnRHアゴニ

ストを投与し、細胞増殖が誘発されることが1999年Durmazら⁵⁰⁾⁴⁾によって報告された。しかし、GnRHアゴニストの作用がGnRH-Rを介したもののなのか、また自己分泌機構が存在するののかについては検討されていない。本研究では、GnRH-Rを発現していた6例の髄膜腫培養細胞に対してGnRHアゴニストを投与し、全例で有意に細胞増殖が促進されることを確認した。またGnRHのアゴニストとアンタゴニストの同時投与により細胞増殖の促進がみられなくなったことから、この増殖はGnRHアゴニストの投与によるGnRH-Rを介したものであることが確認された。すなわち、髄膜腫におけるGnRH-Rの機能はGnRH投与において細胞増殖を誘導すると考えられた。

多くの乳癌、子宮癌や卵巣癌などの性ホルモン依存性腫瘍においては、GnRH-Rの発現とGnRHの腫瘍からの分泌が指摘されており、これらの腫瘍ではGnRHに基づく局所制御機構を有していると考えられている³¹⁾。しかし、これまでに髄膜腫におけるGnRHの発現に関する報告はない。本研究においては髄膜腫の約60%にGnRHの免疫組織化学的発現を認めた。さらに、GnRHを発現していた1例の培養細胞において、GnRHアンタゴニスト投与で腫瘍細胞の増殖が抑制された。このことから、髄膜腫にはGnRHに基づく自己分泌機構が存在し、自己分泌による増殖機構も有すると考えられた。また、GnRHの免疫組織化学的発現は、性差と関連があり、男性において77.8%と高率に認められた。これは、男性では女性と異なり、生理的周期による血中GnRH濃度の上昇がなく、一定の低値であると考えられ、腫瘍が自己分泌機構を有して増殖に関与しているのではないかと推測された。

現在、GnRHスーパーアゴニストによる癌ホルモン療法が、性ホルモン依存性腫瘍である子宮筋腫、乳癌、および前立腺癌などに対して行われている。間接的抑制機序としては、スーパーアゴニストの持続投与が性ホルモンのネガティブフィードバックをもたらし、下垂体におけるGnRH-Rの数および感受性を低下させGnの産生および放出を抑制し、性腺から分泌される性ホルモンを減少させることによるとされている⁵⁰⁾。一方、直接的機序としては、性ホルモン依存性腫瘍の培養細胞あるいは細胞株において、アポトーシスを惹き起こすためとの報告³⁷⁾⁴²⁾⁶⁰⁾や、癌細胞の増殖を促す膜タンパクや成長因子受容体タンパクにおいて、増殖シグナルカスケードの初期段階であるこれらのタンパクのリン酸化をホスファターゼの活性化により阻害し、抗増殖作用をもたらしためとの報告がある³⁹⁾⁶¹⁾⁶²⁾。髄膜腫におけるGnRHスーパーアゴニストによる治療は、1989年van Setersら⁶³⁾によって初めて報告された。全摘出困難な鞍上部髄膜腫の1女性例にGnRHスーパーアゴニストであるブセレリンを投与して、画像上明らかな腫瘍の縮小は認めなかったものの、症状は著明に改善した。この症例では、GnRHスーパーアゴニストの投与期間において、Pgが測定感度以下に低下していたことより、GnRHスーパーアゴニストは腫瘍に対する直接の効果のみではなく、視床下部—下垂体—性腺軸を介してステロイド産生を抑制する間接的效果も重なり、髄膜腫の成長を抑制するのではないかと推測されている⁶³⁾。

本研究では、髄膜腫において、GnRH-RとGnRHおよびホルモン受容体のPgRとERの発現を免疫組織化学的および臨床病理学的に検討した。さらに、髄膜腫培養細胞を用いて、GnRHの細胞増殖への関与を検討した。その結果、髄膜腫においては多くの症例でGnRH-Rが発現しており、その細胞増殖への関与

が強く考えられ、本腫瘍に対するホルモン療法の可能性が示唆された。

結 論

髄膜腫82例(髄膜腫細胞性33例、線維芽細胞性7例、移行型33例、砂腫性4例、血管腫性1例、異型3例および退形成性1例)を対象にGnRH-RとGnRHおよびホルモン受容体のPgRおよびERの発現を免疫組織化学的および臨床病理学的に検討した。また髄膜腫におけるGnRHおよびGnRH-Rの機能評価のため、培養細胞を用いた細胞増殖解析を行い、以下の結論を得た。

1. 髄膜腫におけるmRNAの発現および免疫組織化学的発現は、GnRH-Rが100%および95%であり、GnRHが86%および60%であった。

2. GnRH-Rの免疫組織化学的発現とPgR標識指数との間に正の相関関係を認めた。臨床病理学的検討では、GnRHの発現例が男性例で有意に多かった。他の臨床病理学的パラメーターとGnRH-RおよびGnRHの発現との間には有意差は認めなかった。

3. 培養細胞においては、6例全例でGnRHアゴニストによりコントロールと比較し有意な増殖を認めた。アゴニストとアンタゴニストの同時投与を行った3例では有意な増殖はみられず、その作用が受容体を介するものであることが確認された。アンタゴニストの単独投与では、GnRHを発現していた1例において細胞増殖抑制がみられ、自己分泌機構の存在が示唆された。

以上の結果より、多くの髄膜腫はGnRH-Rを発現し、GnRHが細胞増殖の調節因子の一つとして働いており、一部の症例に自己分泌機構が存在することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御高閣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、ならびに病理標本の作製に御協力を頂いた今村明子文部技官に心から感謝の意を表します。さらに、御支援と御協力を頂きました脳機能制御学の皆様および関連施設の皆様に深く感謝致します。

文 献

- 1) 脳腫瘍全国集計調査報告. Neurol Med Chir (Tokyo). 40: Supplement, 2000
- 2) O'Rahilly R, Muller F. The meninges in human development. J Neuropathol Exp Neurol 45: 588-608, 1986
- 3) Borovich B, Doron Y, Braun J, Feinsod M, Goldsher D, Gruszkiewicz J, Guilburd JN, Zaaroor M, Levi L, Soustiel JF. The incidence of multiple meningiomas—do solitary meningiomas exist? Acta Neurochir 90: 15-22, 1988
- 4) Butti G, Assietti R, Casalone R, Paoletti P. Multiple meningiomas: a clinical, surgical, and cytogenetic analysis. Surg Neurol 31: 255-260, 1989
- 5) Mirimanoff RO, Dosoretz DE, Linggood RM, Ojemann RG, Martuza RL. Meningioma: analysis of recurrence and progression following neurosurgical resection. J Neurosurg 62: 18-24, 1985
- 6) Black PM. Meningiomas. Neurosurgery 32: 643-657, 1993

- 7) Dziuk TW, Woo S, Butler EB, Thornby J, Grossman R, Dennis WS, Lu H, Carpenter LS, Chiu JK. Malignant meningioma: an indication for initial aggressive surgery and adjuvant radiotherapy. *J Neurooncol* 37: 177-188, 1998
- 8) Coke CC, Corn BW, Werner-Wasik M, Xie Y, Curran WJ, Jr. Atypical and malignant meningiomas: an outcome report of seventeen cases. *J Neurooncol* 39: 65-70, 1998
- 9) Hug EB, Devries A, Thornton AF, Munzenrider JE, Pardo FS, Hedley-Whyte ET, Bussiere MR, Ojemann R. Management of atypical and malignant meningiomas: role of high-dose, 3D-conformal radiation therapy. *J Neurooncol* 48: 151-160, 2000
- 10) Miralbell R, Linggood RM, de la Monte S, Convery K, Munzenrider JE, Mirimanoff RO. The role of radiotherapy in the treatment of subtotally resected benign meningiomas. *J Neurooncol* 13: 157-164, 1992
- 11) Goldsmith BJ, Wara WM, Wilson CB, Larson DA. Postoperative irradiation for subtotally resected meningiomas. A retrospective analysis of 140 patients treated from 1967 to 1990. *J Neurosurg* 80: 195-201, 1994
- 12) Duma CM, Lunsford LD, Kondziolka D, Harsh GR, Flickinger JC. Stereotactic radiosurgery of cavernous sinus meningiomas as an addition or alternative to microsurgery. *Neurosurgery* 32: 699-704; discussion 704-705, 1993
- 13) Goodwin JW, Crowley J, Eyre HJ, Stafford B, Jaeckle KA, Townsend JJ. A phase II evaluation of tamoxifen in unresectable or refractory meningiomas: a Southwest Oncology Group study. *J Neurooncol* 15: 75-77, 1993
- 14) Grunberg SM. Role of antiprogesterone therapy for meningiomas. *Hum Reprod* 9: 202-207, 1994
- 15) Mason WP, Gentili F, Macdonald DR, Hariharan S, Cruz CR, Abrey LE. Stabilization of disease progression by hydroxyurea in patients with recurrent or unresectable meningioma. *J Neurosurg* 97: 341-346, 2002
- 16) Bickerstaff ER, Small JM, Guest IA. The relapsing course of certain meningiomas in relation to pregnancy and menstruation. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 21: 89-91, 1958
- 17) Roelvink NC, Kamphorst W, van Alphen HA, Rao BR. Pregnancy-related primary brain and spinal tumors. *Arch Neurol* 44: 209-215, 1987
- 18) Schoenberg BS, Christine BW, Whisnant JP. Nervous system neoplasms and primary malignancies of other sites. The unique association between meningiomas and breast cancer. *Neurology* 25: 705-712, 1975
- 19) Burns PE, Jha N, Bain GO. Association of breast cancer with meningioma. A report of five cases. *Cancer* 58: 1537-1539, 1986
- 20) Hormone dependency of meningiomas. *Lancet* 1: 1381-1382, 1989
- 21) Gabos S, Berkel J. Meta-analysis of progestin and estrogen receptors in human meningiomas. *Neuroepidemiology* 11: 255-260, 1992
- 22) Nagashima G, Aoyagi M, Wakimoto H, Tamaki M, Ohno K, Hirakawa K. Immunohistochemical detection of progesterone receptors and the correlation with Ki-67 labeling indices in paraffin-embedded sections of meningiomas. *Neurosurgery* 37: 478-482; discussion 483, 1995
- 23) Hsu DW, Ebird JT, Hedley-Whyte ET. Progesterone and estrogen receptors in meningiomas: prognostic considerations. *J Neurosurg* 86: 113-120, 1997
- 24) Fewings PE, Battersby RD, Timperley WR. Long-term follow up of progesterone receptor status in benign meningioma: a prognostic indicator of recurrence? *J Neurosurg* 92: 401-405, 2000
- 25) Jay JR, MacLaughlin DT, Riley KR, Martuza RL. Modulation of meningioma cell growth by sex steroid hormones in vitro. *J Neurosurg* 62: 757-762, 1985
- 26) Koper JW, Foekens JA, Braakman R, Lamberts SW. Effects of progesterone on the response to epidermal growth factor and other growth factors in cultured human meningioma cells. *Cancer Res* 50: 2604-2607, 1990
- 27) Setalo G, Hagino N, Dittrich E. Ontogenesis of the GnRH neuron system in the rat. A quantitative immunohistochemical study with special reference to the extra cerebral GnRH-positive cells and the occupation of intracerebral termination fields. *Neuropeptides* 21: 93-103, 1992
- 28) Conn PM, Huckle WR, Andrews WV, McArdle CA. The molecular mechanism of action of gonadotropin releasing hormone (GnRH) in the pituitary. *Recent Prog Horm Res* 43: 29-68, 1987
- 29) Burgus R, Butcher M, Amoss M, Ling N, Monahan M, Rivier J, Fellows R, Blackwell R, Vale W, Guillemin R. Primary structure of the ovine hypothalamic luteinizing hormone-releasing factor (LRF) (LH-hypothalamus-LRF-gas chromatography-mass spectrometry-decapeptide-Edman degradation). *Proc Natl Acad Sci U S A* 69: 278-282, 1972
- 30) Van Vugt DA, Diefenbach WD, Alston E, Ferin M. Gonadotropin-releasing hormone pulses in third ventricular cerebrospinal fluid of ovariectomized rhesus monkeys: correlation with luteinizing hormone pulses. *Endocrinology* 117: 1550-1558, 1985
- 31) Skinner DC, Caraty A, Malpoux B, Evans NP. Simultaneous measurement of gonadotropin-releasing hormone in the third ventricular cerebrospinal fluid and hypophyseal portal blood of the ewe. *Endocrinology* 138: 4699-4704, 1997
- 32) Grundker C, Gunthert AR, Westphalen S, Emons G. Biology of the gonadotropin-releasing hormone system in gynecological cancers. *Eur J Endocrinol* 146: 1-14, 2002
- 33) La Rosa S, Celato N, Uccella S, Capella C. Detection of gonadotropin-releasing hormone receptor in normal human pituitary cells and pituitary adenomas using immunohistochemistry. *Virchows Arch* 437: 264-269, 2000
- 34) Lin LS, Roberts VJ, Yen SS. Expression of human gonadotropin-releasing hormone receptor gene in the placenta and its functional relationship to human chorionic gonadotropin secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 580-585, 1995
- 35) Millan M, Aguilera G, Wynn PC, Mendelsohn FA, Catt KJ. Autoradiographic localization of brain receptors for peptide hormones: angiotensin II, corticotropin-releasing factor, and

- gonadotropin-releasing hormone. *Methods Enzymol* 124: 590-606, 1986
- 36) Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ. Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev* 15: 462-499, 1994
- 37) Fekete M, Zalutnai A, Schally AV. Presence of membrane binding sites for [D-TRP6]-luteinizing hormone-releasing hormone in experimental pancreatic cancer. *Cancer Lett* 45: 87-91, 1989
- 38) Kang SK, Cheng KW, Nathwani PS, Choi KC, Leung PC. Autocrine role of gonadotropin-releasing hormone and its receptor in ovarian cancer cell growth. *Endocrine* 13: 297-304, 2000
- 39) Miller WR, Scott WN, Morris R, Fraser HM, Sharpe RM. Growth of human breast cancer cells inhibited by a luteinizing hormone-releasing hormone agonist. *Nature* 313: 231-233, 1985
- 40) Imai A, Ohno T, Iida K, Fuseya T, Furui T, Tamaya T. Presence of gonadotropin-releasing hormone receptor and its messenger ribonucleic acid in endometrial carcinoma and endometrium. *Gynecol Oncol* 55: 144-148, 1994
- 41) Qayum A, Gullick W, Clayton RC, Sikora K, Waxman J. The effects of gonadotrophin releasing hormone analogues in prostate cancer are mediated through specific tumour receptors. *Br J Cancer* 62: 96-99, 1990
- 42) Kimura A, Ohmichi M, Kurachi H, Ikegami H, Hayakawa J, Tasaka K, Kanda Y, Nishio Y, Jikihara H, Matsuura N, Murata Y. Role of mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinase cascade in gonadotropin-releasing hormone-induced growth inhibition of a human ovarian cancer cell line. *Cancer Res* 59: 5133-5142, 1999
- 43) Wang Y, Matsuo H, Kurachi O, Maruo T. Down-regulation of proliferation and up-regulation of apoptosis by gonadotropin-releasing hormone agonist in cultured uterine leiomyoma cells. *Eur J Endocrinol* 146: 447-456, 2002
- 44) Jensen RL, Origiano TC, Lee YS, Weber M, Wurster RD. In vitro growth inhibition of growth factor-stimulated meningioma cells by calcium channel antagonists. *Neurosurgery* 36: 365-373; discussion 373-364, 1995
- 45) van Groeninghen JC, Kiesel L, Winkler D, Zwirner M. Effects of luteinizing-hormone-releasing hormone on nervous-system tumours. *Lancet* 352: 372-373, 1998
- 46) Karande AA, Rajeshwari K, Schol DJ, Hilgers JH. Establishment of immunological probes to study human gonadotropin-releasing hormone receptors. *Mol Cell Endocrinol* 114: 51-56, 1995
- 47) Mangia A, Tommasi S, Reshkin SJ, Simone G, Stea B, Schittulli F, Paradiso A. Gonadotropin releasing hormone receptor expression in primary breast cancer: Comparison of immunohistochemical, radioligand and Western blot analyses. *Oncol Rep* 9: 1127-1132, 2002
- 48) Moriya T, Suzuki T, Pilichowska M, Ariga N, Kimura N, Ouchi N, Nagura H, Sasano H. Immunohistochemical expression of gonadotropin releasing hormone receptor in human breast carcinoma. *Pathol Int* 51: 333-337, 2001
- 49) Paradiso A, Pezzetta A, Cellamare G, Schittulli F, Marzullo F, Reshkin SJ. GnRH receptors in human breast cancer and its contiguous not-involved breast tissue. *J Endocrinol Invest* 23: 90-96, 2000
- 50) Di Stefano D, Mingazzini PL, Scucchi L, Donnetti M, Marinozzi V. A comparative study of histopathology, hormone receptors, peanut lectin binding, Ki-67 immunostaining, and nucleolar organizer region-associated proteins in human breast cancer. *Cancer* 67: 463-471, 1991
- 51) Horwitz KB, Alexander PS. In situ photolinked nuclear progesterone receptors of human breast cancer cells: subunit molecular weights after transformation and translocation. *Endocrinology* 113: 2195-2201, 1983
- 52) Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7: 1244-1255, 1993
- 53) Tung L, Mohamed MK, Hoefler JP, Takimoto GS, Horwitz KB. Antagonist-occupied human progesterone B-receptors activate transcription without binding to progesterone response elements and are dominantly inhibited by A-receptors. *Mol Endocrinol* 7: 1256-1265, 1993
- 54) Inoue T, Akahira J, Suzuki T, Darnel AD, Kaneko C, Takahashi K, Hatori M, Shirane R, Kumabe T, Kurokawa Y, Satomi S, Sasano H. Progesterone production and actions in the human central nervous system and neurogenic tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 5325-5331, 2002
- 55) Perrot-Appianat M, Groyer-Picard MT, Kujas M. Immunocytochemical study of progesterone receptor in human meningioma. *Acta Neurochir* 115: 20-30, 1992
- 56) Verheijen FM, Sprong M, Jacobs HM, Donker GH, Amelink GJ, Thijssen JH, Blankenstein MA. Progesterone receptor isoform expression in human meningiomas. *Eur J Cancer* 37: 1488-1495, 2001
- 57) Assimakopoulou M. Human meningiomas: immunohistochemical localization of progesterone receptor and heat shock protein 27 and absence of estrogen receptor and PS2. *Cancer Detect Prev* 24: 163-168, 2000
- 58) Durmaz R, Deliorman S, Isiksoy S, Uyar R, Tel E. Luteinizing hormone releasing hormone increases proliferation of meningioma cells in vitro. *Arch Physiol Biochem* 107: 286-291, 1999
- 59) Conn PM, Crowley WF, Jr. Gonadotropin-releasing hormone and its analogues. *N Engl J Med* 324: 93-103, 1991
- 60) Imai A, Takagi A, Horibe S, Takagi H, Tamaya T. Evidence for tight coupling of gonadotropin-releasing hormone receptor to stimulated Fas ligand expression in reproductive tract tumors: possible mechanism for hormonal control of apoptotic cell death. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 427-431, 1998
- 61) Imai A, Takagi H, Furui T, Horibe S, Fuseya T, Tamaya T. Evidence for coupling of phosphotyrosine phosphatase to gonadotropin-releasing hormone receptor in ovarian carcinoma membrane. *Cancer* 77: 132-137, 1996
- 62) Grundker C, Volker P, Emons G. Antiproliferative

signaling of luteinizing hormone-releasing hormone in human endometrial and ovarian cancer cells through G protein alpha (I)-mediated activation of phosphotyrosine phosphatase. *Endocrinology* 142: 2369-2380, 2001

63) van Seters AP, van Dulken H, de Keizer RJ, Vielvoye GJ. Symptomatic relief of meningioma by busserelin maintenance therapy. *Lancet* 1: 564-565, 1989

Expression of Gonadotropin-releasing Hormone (GnRH) and Its Receptor and Effect of GnRH on Cell Proliferation of Human Meningioma Yuichi Hirota, Department of Neurosurgery, Division of Neuroscience, Graduate School of Medical Science Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, **112**, 50 — 63 (2003)

Key words gonadotropin-releasing hormone, gonadotropin-releasing hormone receptor, cell proliferation, meningioma

Abstract

Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and its receptor (GnRH-R) are present in a number of hormone-dependent tumors, including cancers of the breast, endometrium and prostate, and play a role as an autocrine regulatory system based on GnRH of cell proliferation. GnRH superagonist is in practical use as hormone therapy for these cancers. Most meningiomas are benign and predominantly occur in middle-aged and elderly women. It is suggested that they may be related to sex hormones. In the present study, the expression of GnRH-R and GnRH were investigated using immunohistochemical analysis of intracranial meningiomas from 82 patients. Reverse transcription-PCR was performed to detect the expression of GnRH-R and GnRH mRNA in 21 cases. Statistical differences between immunoreactivity for GnRH-R and estrogen receptor labeling index (LI), progesterone receptor LI, Ki-67 LI or clinicopathological parameters were evaluated. To elucidate the functional role of GnRH and GnRH-R in meningioma, cell proliferation assays in cultured meningioma cells treated with GnRH agonist and/or antagonist were performed in 6 cases. The expression of GnRH-R and GnRH mRNA was detected in 100% and 86% of 21 cases, respectively. Immunoreactivity for GnRH-R and GnRH was found in 95% and 60% of 82 cases. There was a positive correlation between GnRH-R immunoreactivity and PgR LI. GnRH-positive cases were found more in men than in women. No significant differences were detected between GnRH-R or GnRH and other parameters. A significant proliferation was detected in treatment of 6 meningiomas with GnRH agonist in comparison with control cultures. In cotreatment with GnRH agonist and antagonist, they had no effect in cultured cells of all 3 experimented cases. These results suggest that the effect of GnRH agonist may be a receptor-mediated event. In a GnRH-positive case that was treated with antagonist alone, a significant inhibition of growth was detected, suggesting that there may be an autocrine system in this case. In summary, many meningiomas express GnRH-R, and GnRH acts as a regulator of cell proliferation. An autocrine system may be present in some meningiomas.