

# 神経膠芽腫における染色体12番長腕12q22-23のヘテロ接合性の喪失とApaf-1の不活化

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	<a href="http://hdl.handle.net/2297/4520">http://hdl.handle.net/2297/4520</a>

## 神経膠芽腫における染色体12番長腕12q22-23の ヘテロ接合性の喪失とApaf-1の不活化

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

渡 邊 卓 也

神経膠芽腫 (glioblastoma) においては *p53* 遺伝子の点突然変異, 上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 遺伝子増幅や, 染色体10番長腕のヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity, LOH) などの様々な遺伝子異常が報告され, それぞれの遺伝子異常に関連する神経膠芽腫内でのサブグループの存在が報告されている. 近年, ある種の腫瘍においてはアポトーシスの主要な実行因子である Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) の低発現と Apaf-1 が位置する染色体12q22-23LOH が腫瘍の悪性度と関連することが報告されている. しかし神経膠芽腫における染色体12qLOH や Apaf-1 の発現に関する報告は少ない. 本研究では神経膠芽腫における染色体12q22-23LOH と Apaf-1 の発現の関与を検討するため, Apaf-1 遺伝子の位置する染色体12q22-23LOH に関してマイクロサテライト解析を行い, 一方 Apaf-1 の発現について逆転写 (reverse transcription, RT)-PCR 法および免疫組織化学法により評価した. さらに神経膠芽腫における代表的な遺伝子異常である *p53* 遺伝子異常と *EGFR* 遺伝子増幅の両者と染色体12q22-23LOH との関連を検討した. 手術標本により得られた神経膠芽腫33例のうち染色体12q22-23LOH は14例 (42%) と高率に認められた. この14例のうち Apaf-1 mRNA の低発現は9例 (69%), また免疫組織化学において Apaf-1 陰性反応を示したものは12例 (86%) であり, 染色体12q22-23LOH と Apaf-1 mRNA および蛋白の低発現は有意に相関した ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$ ). *p53* 遺伝子変異は13例 (39%), *EGFR* 遺伝子増幅は8例 (24%) に認められ, 両者は従来報告されているように互いに相容れない関係 (mutually exclusive) であった. 染色体12q22-23LOH と, *p53* および *EGFR* 遺伝子異常との間にはどちらにも相関関係がなかったが, *p53*, *EGFR* 遺伝子異常を両者とも有しないものの中で, 染色体12q22-23のアレル情報が得られた9例中6例 (67%) に LOH を認めた. 更に, *p53* 遺伝子異常あるいは染色体12q22-23LOH のいずれかを有するものは33例中23例 (70%) に上った. 以上より神経膠芽腫においては染色体12q22-23LOH が高率 (42%) であり, 従来報告されている *p53* 遺伝子異常と *EGFR* 遺伝子増幅によって分けられる神経膠芽腫の代表的な2つのサブタイプには属さない, 染色体12q22-23LOH を有する新たなサブタイプの存在が疑われた. また染色体12q22-23LOH が Apaf-1 の低発現に寄与していることが示された. 更に, 神経膠芽腫においては「*p53*-Apaf-1」アポトーシス経路が破綻している可能性が示唆された.

**Key words** chromosome 12q22-23 LOH, apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), *p53*, *EGFR*, glioblastoma

神経膠芽腫 (glioblastoma) は WHO 脳腫瘍悪性度分類IV度に分類される. その浸潤性に発育する特性により全摘出は極めて困難であり, 補助療法として行われる放射線療法および化学療法に対して強い抵抗性を示す<sup>1)2)</sup>. 近年の研究では, 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おり, その代表的な遺伝子異常として, 腫瘍遺伝子として知られる上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor, *EGFR*) 遺伝子の増幅や, 細胞周期やアポトーシスに関連する *p53* 遺伝子の異常があげられる. その他にも網膜

芽細胞腫 (retinoblastoma, *Rb*) 遺伝子の異常, サイクリン依存性キナーゼ4a (cyclin dependent kinase 4a, *CDK4a*) 遺伝子の増幅, *MDM2* (murine double minute 2) 遺伝子の増幅, *PTEN* (phosphatase and tensin homology) 遺伝子の異常などが報告されている<sup>1)3)~5)</sup>. 上述した特定の遺伝子異常の他にも, 染色体上のヘテロ接合性の喪失 (loss of heterozygosity, LOH) が多数報告されている. 染色体1番短腕 (1p), 10番短腕 (10p), 10番長腕 (10q), 11番短腕 (11p), 17番短腕 (17p), 19番長腕 (19q), 22番長腕 (22q) などにおいて高頻度に認められるが, 中でも染

平成14年11月18日受付, 平成15年1月9日受理

Abbreviations : Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1; EGFR, epidermal growth factor receptor; IFNG, interferon gamma; IHC, immunohistochemistry; LOH, loss of heterozygosity; p14<sup>ARF</sup>p14 alternative reading frame; p16<sup>INK4a</sup>, p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a; PFS, progression free survival; RT, reverse transcription; Rb, retinoblastoma; SSCP, single strand conformation polymorphism; TBE, tris-borate EDTA

染色体10番のLOHは神経膠芽腫において特異的に高頻度に認められる<sup>3)-7)</sup>.

近年、組織学的には同一の腫瘍の中でも特定の遺伝子異常に基づく分類がなされるようになり、それらが臨床像に反映する場合も数多く報告されている<sup>11)-12)</sup>. 神経膠芽腫においてはp53遺伝子異常とEGFR遺伝子増幅が同一の腫瘍で同時に見られることはまれであることより、それぞれの変異を有する腫瘍は異なる二つのサブタイプに属するものと考えられている<sup>5)13)14)</sup>. 悪性度の低い星状細胞腫から進行して神経膠芽腫

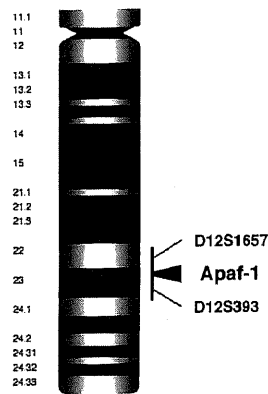


Fig. 1. Schematic drawings of chromosome 12q. Positions of the microsatellite markers used are located on both ends of Apaf-1 locus (bar).

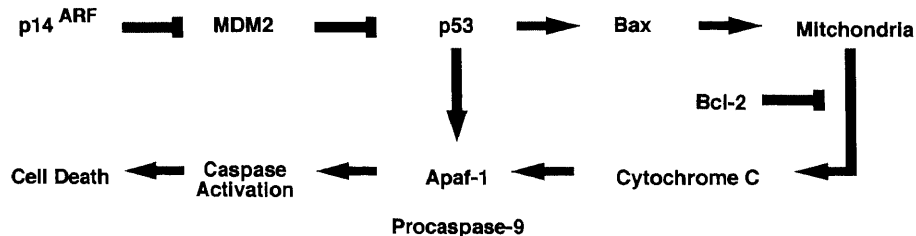


Fig. 2. Apaf-1 mediated cell death pathway. Closed arrow indicates activating effect to the following target and closed bar indicates inactivating effect. p14<sup>ARF</sup>, p14 alternative reading frame; MDM2, murine double minute 2; Bax, bcl-2-associated X protein; Bcl-2, B cell lymphoma/leukemia-2; Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1.

になる二次性神経膠芽腫 (secondary glioblastoma) は前者のサブタイプに属し、前駆病変なしに発生する原発性神経膠芽腫 (primary glioblastoma) は後者に属するという臨床的特徴や、前者は後者に比べ若年者に多いことが明らかとなっている<sup>5)6)13)15)16)</sup>. しかしながら神経膠芽腫の診断後ではp53遺伝子異常とEGFR遺伝子増幅に基づくサブタイプの違いによる予後や治療反応性などの差は現時点では一定の見解が得られていない<sup>12)17)-19)</sup>.

Apaf-1 (apoptotic protease activating factor-1) はミトコンドリアから放出されたチトクロームCをリガンドとして蛋白分解酵素カスパーゼ (caspase) を活性化するアダプター分子である。線虫から哺乳動物まで種を超えて保存されたアポトーシス誘導経路における主要因子として1997年に同定された<sup>20)</sup>. Apaf-1は染色体12番長腕12q22-23に位置し、27のエクソンから構成され<sup>21)22)</sup>, その発現は成人脳, 肺, 肝, 小腸, 腎, 末梢血, など生体のあらゆる臓器で認められる<sup>20)23)</sup> (図1). また, p53を介するアポトーシス経路においては, p53よりも下流に存在し癌抑制遺伝子として機能している可能性が示唆されている<sup>23)-30)</sup> (図2). ある種の腫瘍においては染色体12q22-23LOHとApaf-1の低発現が密接に関連し, かつApaf-1の低発現に由来するアポトーシス誘導機構の破綻により強い化学療法抵抗性を示すという報告がなされている<sup>31)-33)</sup>. しかしながら神経膠芽腫におけるp53とApaf-1の関連についてはほとんど解明されておらず, またApaf-1遺伝子座の存在する染色体12番長腕のLOHに関してもわずかな報告が認められるのみである<sup>6)34)-36)</sup>.

Table 1. Oligonucleotide primers used for the analysis

Gene	Sense primer sequences	Antisense primer sequences	Product size (bp)
SHGC-17541 (D12S393)	5'-ATTAATGCCAGGACATTAACG-3'	5'-CCTCACACAATGTTGTAAGGG-3'	249
AFMb293ye5 (D12S1657)	5'-TCCTAAAGATGGTGTGCAT-3'	5'-AAGTTCCAATGTTAGTGAACC-3'	150-160
p53 Exon 5a	5'-TCAACTCTGTCTCCTTCTCTC-3'	5'-CTGTGACTGCTTGTAGATGG-3'	155
p53 Exon 5b	5'-GTGGGTTGATTCCACACCCC-3'	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC-3'	162
p53 Exon 6	5'-AGGCCTCTGATTCCTCACTG-3'	5'-AGAGACCCCAGTTGCAAACC-3'	168
p53 Exon 7	5'-GGCCTCATCTTGGGCCTGTG-3'	5'-GAGGCTGGGGCACAGCAGGCCAGTG-3'	191
p53 Exon 8	5'-AATGGGACAGGTAGGACCTG-3'	5'-ACCGTCTCTGTCTGCTGCTG-3'	225
EGFR	5'-AGCCATGCCCGCATTAGCTC-3'	5'-AAAGGAATGCAACTTCCAA-3'	110
IFNG	5'-GCAGAGCCAAATTGTCTCT-3'	5'-GGTCTCCACTCTTTTGA-3'	85
Apaf-1 (for RT-PCR)	5'-GATGGAACAGTGAAGGTATGG-3'	5'-CTCCAGATCTTTGCACTTGTGC-3'	149
Beta Actin	5'-TCATGAGGTAGTCAGTCAGG-3'	5'-AGCCATGTACGTTGCTATCC-3'	182

EGFR, epidermal growth factor receptor; IFNG, interferon gamma; Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1.

本研究では神経膠芽腫における染色体12番長腕 (12q22-23) の LOH と Apaf-1 の関与を解明するためマイクロサテライトマーカーによる LOH 解析を行い, Apaf-1 mRNA の発現の程度, および Apaf-1 蛋白の発現の程度をそれぞれ逆転写 PCR 法, および免疫組織化学法を用いて比較検討した. 加えて神経膠芽腫での染色体12q22-23 LOH と p53 遺伝子異常との関連性を EGFR 遺伝子異常を含めて検討した.

対象および方法

I. 組織標本

1986年から2002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33例の神経膠芽腫を対象とした. 病理組織学的分類はWHOの脳腫瘍分類(2000)に従った<sup>37)</sup>. 標本採取後すみやかに液体窒素にて凍結し, -130℃にて保存しRNA抽出に供した. DNA抽出および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. 染色体12q22-23のLOH解析

1. DNAの抽出

組織標本からのDNAの抽出は, Neubauerら<sup>38)</sup>, Hruzaら<sup>39)</sup>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4μm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を4枚用い, 未染の切片をスライドガラス上から顕微鏡下に腫瘍細胞部を剥がして, キシレンを用いて脱パラフィンを行った. 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, 洗浄を行った後, 微量高速冷却遠心機器(トミー精工, 東京)を使用し, 10,000rpm, 5分間, 4℃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, 10,000rpm, 2分間, 4℃で遠心分離した. 上清を可及的に除去後, 50℃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℃で3時間振盪後98℃で10分間振盪させてプロテナーゼKを失活させた. 対照DNAは, 患者血液200μlよりQIAamp DNA Blood Mini Kit

Table 2. Clinical, genetic and immunohistochemical findings in patients with glioblastoma

No.	Age	Gender	Site	Region	12q22-23		Apaf-1		EGFR Amplification	p53 mutation				
					S393	S1657	RT-PCR	IHC		Exon	Codon	Nucleotide	Amino Acid	
1	34	M	L	F	-	NI	-	+	-	-				
2	78	M	R	O/T	NI	-	+	+	-	Mut	6	218	CTG->GCG	Val->Ala
3	52	M	L	F	-	NI	+	-	-	Mut	5a	137	CTG->CAG	Leu->Gln
4	51	F	R	O	-	-	+	+	Amp	Mut	5a	137	CTG->CAG	Leu->Gln
5	8	F	L	BG	NI	NI	+	-	-	Mut	8	267	CGG->TGG	Arg->Trp
6	25	M	L	O/T	NI	LOH	NE	-	-	-				
7	57	M	R	F	NI	-	+	+	Amp	-				
8	50	F	L	F	-	-	NE	+	-	-				
9	34	M	L	P/T	LOH	NI	+	-	-	-				
10	43	F	L	F	LOH	-	-	-	Amp	-				
11	50	M	R	T/F	-	-	+	+	-	Mut	5a	151	CCC->TCC	Pro->Ser
12	51	F	R	T	-	-	+	+	Amp	-				
13	66	M	L	T/F	-	-	+	+	-	-				
14	74	M	L	F	-	-	NE	+	Amp	-				
15	56	F	R	T	-	NI	NE	+	-	-				
16	44	F	R	T/O	NI	LOH	-	+	Amp	-				
17	76	F	L	P/O	NI	LOH	+	+	-	Mut	6	198	GGA->TGA	Gln->stop
18	57	F	L	BG/T	-	LOH	-	-	Amp	-				
19	69	F	R	T	-	-	+	+	-	Mut	8	273	CGT->CAT	Arg->His
20	78	M	L	F/P	-	-	+	+	-	-				
21	59	M	L	T	-	NI	+	+	-	Mut	5a	146	TGG->TGA	Trp->stop
22	24	F	R	T	LOH	-	-	-	-	Mut	8	274	GTT->GCC	Val->Ala
23	43	M	R	F/P	LOH	-	-	-	-	Mut	5a	149	TCC->ACC	Ser->Thr
24	29	M	L	F/P	-	LOH	-	-	Amp	-				
25	44	F	L	F	LOH	-	+	-	-	-				
26	34	M	L	F	-	NI	NE	+	-	Mut	6	213	CGA->CGG	Arg->Arg
27	46	F	L	T	NI	LOH	-	-	-	-				
28	33	M	L	T	-	NI	-	-	-	Mut	7	249	AGG->AAG	Arg->Lys
29	24	F	L	F	LOH	NI	-	-	-	Mut	7	248	CGG->CAG	Arg->Gln
30	30	M	R	F	NI	LOH	+	-	-	-				
31	32	F	R	F	-	NI	-	-	-	-				
32	39	M	L	F	-	-	+	+	-	-				
33	74	F	L	F/P	LOH	-	-	-	-	-				

Apaf-1, apoptotic protease activating factor-1; IHC, immunohistochemistry; EGFR, epidermal growth factor receptor; M, male; F, female; L, left; R, right; F, frontal lobe; O, occipital lobe; T, temporal lobe; P, parietal lobe; NI, not informative; LOH, loss of heterozygosity; NE, not examined; Amp, amplification; Mut, mutation.

(QIAGEN)を用いて抽出, または手術時に摘出した腫瘍周囲の正常組織より抽出した。

## 2. LOH解析

染色体12q22-23のLOHはマイクロサテライトマーカを用いて解析した。使用したマイクロサテライトマーカはD12S393およびD12S1657で(シグマジェノシスジャパン, 北海道), それぞれApaf-1遺伝子座のテロメア側(D12S393), セントロメア側(D12S1657)に隣接する(表1)<sup>31)</sup>。PCRには腫瘍および血液より抽出したDNA溶液のうちそれぞれ1 $\mu$ l(約10ng)ずつを一回の反応の鋳型として用いた。反応液は5 pmolの蛍光色素Cy5標識プライマー1セット, 10 $\times$ PCR反応緩衝液(Perkin-Elmer Applied Biosystem Division) 1 $\mu$ l, 最終濃度200 $\mu$ Mの各デオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25単位のTaq DNAポリメラーゼ, 2.0mMのMgCl<sub>2</sub>に滅菌蒸留水を用いて全量10 $\mu$ lに調製した。これを用い核酸増幅装置GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems, Foster city, USA)でPCRを行った。95 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変性後, 変性95 $^{\circ}$ C 30秒, アニール60 $^{\circ}$ C 40秒, 伸長反応72 $^{\circ}$ C 40秒のプログラムで30サイクル行った後, 最後に72 $^{\circ}$ C 10分間の伸長反応を行った。PCR反応後, 増幅産物を反応停止液(アマーシャム ファルマシア バイオテック, 東京)にて希釈し, オートシーケンサー(ALFred DNA sequencer, Pharmacia Biotech, Milwaukee, USA)にて解析した。シーケンシングはLong Ranger 50% Gel Solution(FMC BioProducts, 宝酒造, 東京) 尿素(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて作成し, ゲル板は恒温循環装置(MultiTemp III, Pharmacia Biotech)にて27 $^{\circ}$ Cの定温にした。TBE緩衝液にて34W定電圧で泳動した。

## 3. 判定

LOHの判定はDNA定量ソフト(Allelinks version 1.0, Pharmacia Biotech)を用いた。各アレルのDNA断片の泳動距離に相当する蛍光強度ピーク領域の面積を各々測定し, PCR増幅産物量とした。患者血液DNAの2つのアレルのPCR増幅産物量をN1, N2とし, 腫瘍DNAのそれをT1, T2とした場合に, アレル比(allelic rate, AR = N1 $\times$ T2/N2 $\times$ T1)の値が0.75未満あるいは1.33を超える場合をLOHありと判断した<sup>40)~43)</sup>。

## III. 逆転写(reverse transcription, RT) RT-PCR法

### 1. 総RNAの分離およびcDNAの合成

凍結標本からの総RNAの抽出, 精製はRNeasy Mini Kit(QIAGEN)を用いて行った。RTはFirst strand cDNA synthesis kit(Amersham)を用いて行った。60ngの総RNAを鋳型とし, ランダムヘキサマーをプライマーとして逆転写酵素によりcDNAを合成した。

### 2. プライマーの作成およびPCR反応

Apaf-1遺伝子の塩基配列はゲノムデータベース(Genome

Data Base, Baltimore, USA)および文献から引用した(表1)<sup>29)</sup>。内部コントロールとして $\beta$ アクチン(beta actin, BA)遺伝子を用いた。RT-PCRにはcDNA溶液の1 $\mu$ l(約10ng)を一回の反応の鋳型として用いた。反応液は5 pmolのプライマー2セット, 10 $\times$ PCR反応緩衝液(Perkin-Elmer Applied Biosystem Division) 1 $\mu$ l, 最終濃度200 $\mu$ Mの各デオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP), 0.25単位のTaq DNAポリメラーゼ, 2.5mMのMgCl<sub>2</sub>に滅菌蒸留水を用いて全量10 $\mu$ lに調製した。これを核酸増幅装置GeneAmp PCR system 9700(Applied Biosystems)でPCRを行った。95 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変性後, 変性95 $^{\circ}$ C 30秒, アニール55 $^{\circ}$ C 40秒, 伸長反応72 $^{\circ}$ C 40秒のプログラムで32サイクル行った後, 最後に72 $^{\circ}$ C 10分間の伸長反応を行った。その後, PCR増幅産物を2%アガロースゲル(和光純薬)に, 鎖長マーカとしてpUC Mix(シグマジェノシスジャパン)と共に泳動してエチジウムブロマイドにて染色し断片長を確認した。

## 3. 判定

撮像装置FAS II(東洋紡, 東京)で表示したアガロースゲルをデジタル画像として取り込み, マッキントッシュコンピュータ上でパブリックドメインソフトNIH Image(NIH, USA,

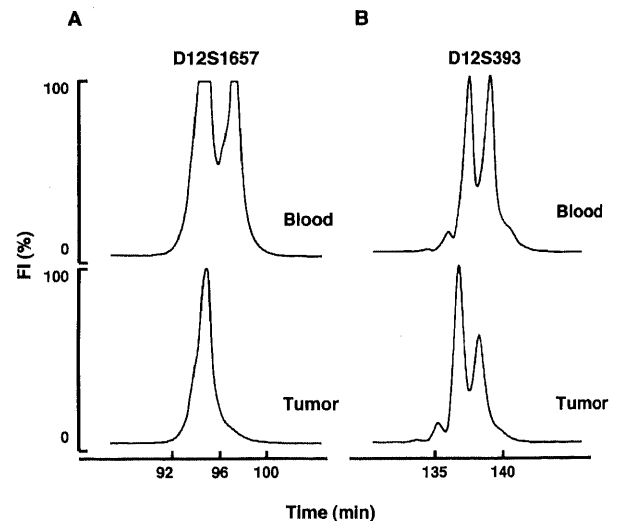


Fig. 3. LOH analysis for two microsatellite markers. Representative samples of case 27 (A) and case 29 (B) showing LOH at D12S1657 and D12S393, respectively. Note the data from blood (upper panel) and tumor (lower panel) were obtained from the same patient. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%).

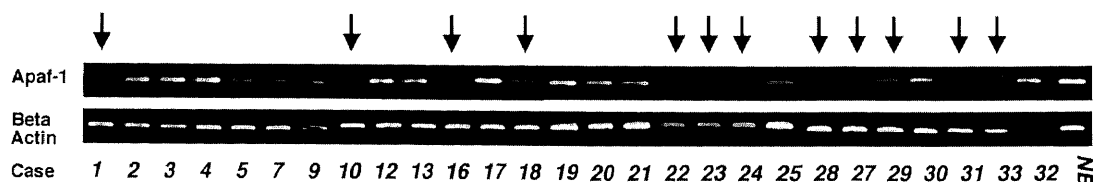


Fig. 4. Differential RT-PCR analysis shows deletion or low expression of Apaf-1. Arrows (case 1, 10, 16, 18, 22, 23, 24, 27, 28, 29, 31, 33) indicate the case with Apaf-1 inactivation. NB, normal brain

http://rsb.info.nih.gov/nih-image/) を用いて分析した。発現量の判定は腫瘍 RT-PCR 産物とコントロール産物との信号強度比 (Apaf-1/BA) を算出し、正常脳 (非腫瘍部) における同信号強度比と比較してその値が 30% 未満のものを mRNA の低発現と判定した<sup>44)</sup>。

IV. 免疫組織化学

1. Apaf-1 に対する抗体

抗ヒト Apaf-1 モノクローナル抗体 (ラット IgG2a, Silenus, Australia) 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 $\mu$ m の切片を作製し、シランコートしたスライドガラス (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、0.1M 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。圧力鍋を用いて 0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中に 120 $^{\circ}$ C で 25 分間振盪させ、抗原性の賦活化を行った。0.1M PBS (pH 7.4) で洗浄した後、非特異的反応阻止のためブロッキング用血清と反応させた。抗ヒト Apaf-1 抗体を抗体希釈用緩衝液 (DAKO, Glostrup, Denmark) で 100 倍に希釈し、室温で 1 時間反応させた。ビオチン標識抗ラット IgG と反応させた後、アビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ複合体 (Vecstain ABC kit, Vector Laboratories) を用い、最後に 0.02% 過酸化水素加ジアミノベンチジン (3-3'-diaminobenzidine) (Sigma, St. Louis, USA) にて発色を行った。陽性コントロールとしては大腸を用い、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

免疫組織標本について腫瘍細胞巢を含む 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 20% 以上、20% 未満の標本をそれぞれ陽性、陰性と定義した。

V. 一本鎖 DNA 高次構造多型 (single strand conformation polymorphism, SSCP)-PCR 法、直接シークエンス法による p53 遺伝子異常の解析および弁別的 PCR 法による EGFR 遺伝子増幅の検出

1. 蛍光 SSCP-PCR 法

p53 遺伝子の変異解析は変異の集中するエクソン 5~8 を解析した<sup>46)</sup>。Cy5 による蛍光標識プライマーの作成は Amersham Pharmacia Biotech に委託した (表 1)。PCR には抽出した DNA 溶液のうち 1 $\mu$ l (約 10 $\mu$ l) を一回の反応の鋳型として用いた。反応液は 5 pmol のプライマー 1 セット、10 $\times$  PCR 反応緩衝液 (Perkin-Elmer Applied Biosystem Division) 1 $\mu$ l、最終濃度 200 $\mu$ M の各デオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、0.25 単位の Taq DNA ポリメラーゼ、1.5mM の MgCl<sub>2</sub> に滅菌蒸留水を用いて全量 10 $\mu$ l に調製した。これを核酸増幅装置 GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems) で PCR を行った。95 $^{\circ}$ C で 3 分間の熱変性後、各プライマーに応じたサイクルプログラムを行い、最後に 72 $^{\circ}$ C 10 分間の伸長反応を行った。PCR 反応後、増幅産物を反応停止液 (Amersham Pharmacia Biotech) にて希釈し、95 $^{\circ}$ C 5 分間の熱変性を行った。熱変性後氷水にて急速冷却し、オートシークエンサー (ALFred DNA sequencer, Pharmacia Biotech) にて解析した。シークエンスゲルは、2% NN'-メチレンビスアクリルアミド溶液

(Amersham Pharmacia Biotech) と 40% アクリルアミド IEF 溶液 (Amersham Pharmacia Biotech) を用いてビスアクリルアミドとアクリルアミドの比が 1 対 99 の 8~14% ポリアクリルアミド濃度勾配ゲルを作成した。ゲル板は恒温循環装置 (MultiTemp III) にて 27 $^{\circ}$ C の定温にした。TBE 緩衝液にて 40W 定電圧で泳動した。

2. PCR 直接シークエンス法による塩基配列の決定

蛍光 SSCP-PCR 法で異なる泳動度を示した症例に対して、PCR 直接シークエンス法による塩基配列の決定を行った。サンプルは Big Dye Terminator Cycle Sequencing FS Ready Reaction Kit (Applied Biosystems) を用いて調製し、3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystem) にて解析した。シークエンスプライマーには PCR 増幅用プライマーを使用し、鋳型には過剰なプライマーや塩を除去した PCR 反応液を使用した。シークエ

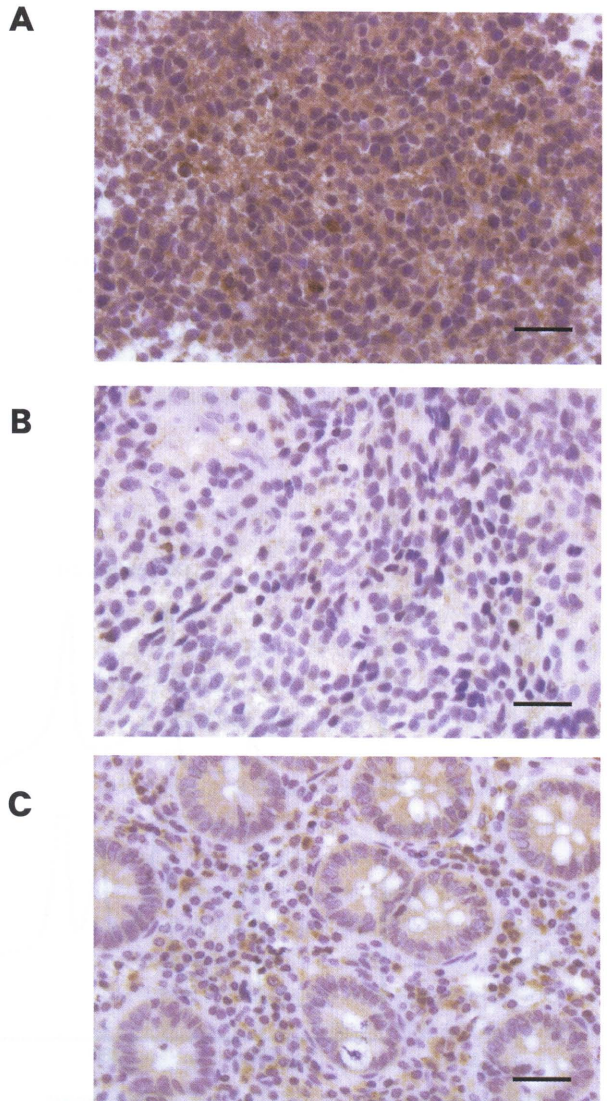


Fig. 5. Representative cases of immunoreactivity against anti Apaf-1 antibody. (A) Immunoreactivity is restricted to the cytosol of the tumor cells (case 13). (B) Immunoreactivity is not seen (case 6). (C) positive control (colon). The scale bars at the bottom indicate 20 $\mu$ m.

ンス反応は95℃で5分間の熱変性後、変性95℃10秒、アニーリング50℃5秒、伸長反応60℃4分のプログラムで25サイクル行った。

### 3. 弁別的PCR法

弁別的PCR法によるEGFR遺伝子増幅の検出はWahaら<sup>47)</sup>に従った。内部コントロールはインターフェロン $\gamma$  (interferon gamma, IFNG) を用いた。各プライマーセットはセンスプライマーのみ蛍光色素で標識し、アンチセンスプライマーは非標識とした(表1)。PCRには抽出したDNA溶液のうち1 $\mu$ l(約10ng)を一回の反応の鋳型として用いた。反応液は5 pmolの標的遺伝子の蛍光色素Cy5標識プライマーと、10 pmolの内部コントロール遺伝子のプライマーの2セット、10 $\times$ PCR反応緩衝液(Perkin-Elmer Applied Biosystem Division) 1 $\mu$ l、最終濃度200 $\mu$ Mの各デオキシリボヌクレオチド(dATP, dCTP, dGTP, dTTP)、0.25単位のTaq DNAポリメラーゼ、1.5mMのMgCl<sub>2</sub>に滅菌蒸留水を用いて全量10 $\mu$ lに調製した。これを核酸増幅装置GeneAmp PCR system 9700 (Applied Biosystems)でPCRを行った。95℃で3分間の熱変性後、変性95℃30秒、アニーリング58℃55秒、伸長反応72℃40秒のプログラムで26サイクル行った後、最後に72℃10分間の伸長反応を行った。PCR反応後、増幅産物を反応停止液(Amersham Pharmacia Biotech)にて希釈し、オートシーケンサー(ALFred DNA sequencer, Pharmacia Biotech, Milwaukee, USA)にて解析した。シーケンシングゲルはLong Ranger 50%Gel Solution (FMC BioProducts, 宝酒造, 東京)、尿素(Amersham Pharmacia Biotech)を用いて作成し、ゲル板は恒温循環装置(MultiTemp III, Pharmacia Biotech)にて27℃の定温にした。TBE緩衝液にて34W定電圧で泳動した。EGFR遺伝子増幅の判定はDNA定量ソフト(Allelinks version 1.0, Pharmacia Biotech)を用いた。EGFR遺伝子およびIFNG遺伝子のDNA断片の泳動距離に相当する蛍光

強度ピーク領域の面積を各々測定し、PCR増幅産物量とした。健康人の血液DNA56例を対照としてEGFR遺伝子とIFNG遺伝子の比(EGFR / IFNG)の平均値(x=1.015)および標準偏差(SD=0.115)を求め、x+3SD以上を遺伝子増幅ありと判断した。

### VI. 統計学的検討

統計学的検討は、LOH群と非LOH群に分け、それぞれにつき免疫組織染色およびRT-PCRの結果の比較検討を行った。2群間の比較はFisher直接確率計算法の検定を行い、5%未満を有意差ありとした。EGFR遺伝子増幅の有無、p53遺伝子異常の有無についても同様の比較検討を行った。

### 成 績

表2に症例の染色体12q22-23LOH解析、Apaf-1 mRNAの発現、免疫組織化学、p53遺伝子異常、EGFR遺伝子増幅の結果を示す。

#### I. LOH解析

全33症例に対し染色体12q22-23における2つのマイクロサテライトマーカー(D12S393およびD12S1657)についてそれぞれ解析を行った。アレル情報は66座のうち46座(46/66, 70%)で得られた。少なくともどちらか1つにLOHを認めたものは14例(14/33, 42%)であった(図3)。14例の平均年齢は42.4歳であり、その年齢分布は12q22-23LOHのない19例(平均年齢51.1歳)と比して若年の傾向を認めた(p=0.169)(表2, 表3A)。

#### II. Apaf-1 mRNAの発現

摘出標本の保存状態によりmRNAを抽出できたものは28例であり、それらに対してRT-PCRを行った。Apaf-1 mRNAの低発現と判定した例は12例(12/28, 43%)であった(図4)。染色体12q22-23LOHを認めた14例のうちRT-PCRを行ったものは13例であり、そのうちmRNAの低発現と判定された例は9例(9/13, 69%)であった。

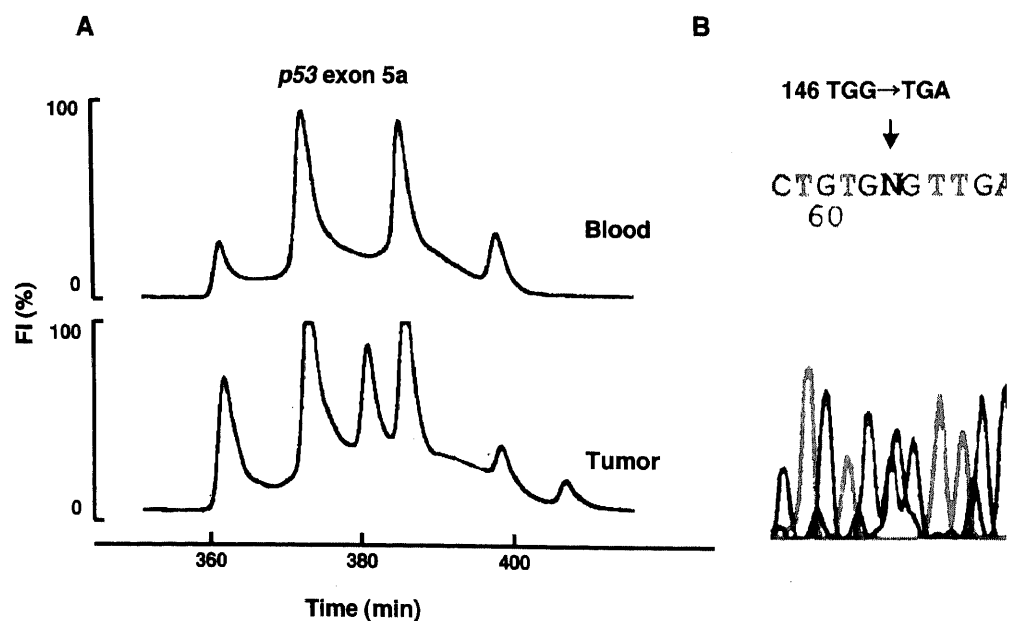


Fig. 6. (A) Representative case carrying p53 mutation (case 21). Fluorescence-based single strand conformation polymorphism both from the same patient shows a different mobility shift in exon 5a in the tumor as compared with blood. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%). (B) The sequence analysis of the tumor DNA reveals a one-base substitution from G to A.

Table 3. Chromosome 12q22-23 LOH and Apaf-1 expression in glioblastomas

12q22-23	Average age*	Apaf-1 mRNA**		Apaf-1 protein***	
		RT-PCR(-)	RT-PCR(+)	IHC(-)	IHC(+)
LOH(+)	42.36±16.97	9	4	12	2
LOH(-)	51.11±18.14	3	12	4	15

LOH, loss of heterozygosity; Apaf-1, apoptotic protease activating factor -1; IHC, immunohistochemistry.  
\*p=0.169, \*\*p<0.05, \*\*\*p<0.01.

Table 4. Chromosome 12q22-23 LOH, p53 and EGFR analysis in glioblastomas

12q22-23	p53*		EGFR**	
	Mut	Wt	Amp	Not amp
LOH(+)	4	10	4	10
LOH(-)	9	10	4	15

LOH, loss of heterozygosity; EGFR, epidermal growth factor receptor; Mut, mutation; Wt, wild type; Amp, amplification.  
\*p=0.310, \*\*p=0.695.

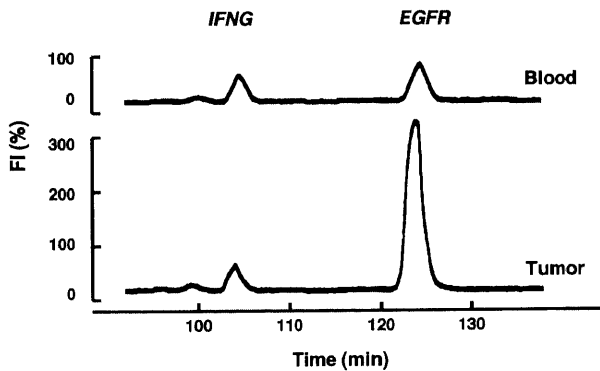


Fig. 7. Differential PCR-analysis for EGFR/IFNG genes. Representative case from a glioblastoma carrying EGFR amplification (case 7, lower panel). The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%). IFNG, interferon gamma; EGFR, epidermal growth factor receptor.

III. Apaf-1 蛋白の発現

全33症例に対し免疫組織化学を行った。陽性反応を呈した例は17例 (17/33, 52%) であり、陰性反応を呈した例すなわち Apaf-1 蛋白の低発現と判定した例は16例 (16/33, 48%) であった。陽性反応は腫瘍細胞の細胞質に認められた (図5)。LOH を認めた14例のうち免疫組織化学にて陰性反応を呈した例は12例 (12/14, 86%) であった。

IV. p53 遺伝子変異の検出

全33症例に対し蛍光SSCP-PCR法を行った。p53 遺伝子変異を認めた例は13例 (13/33, 39%) であった。変異部位はエクソン5, 6, 7, 8についてそれぞれ5例, 3例, 2例, 3例であり、これらの13例については直接シーケンス法により遺伝子変異を確認した (図6)。

V. EGFR 遺伝子増幅の検出

全33症例に対し弁別的PCR法を行った。EGFR 遺伝子増幅

を認めた例は8例 (8/33, 24%) であった (図7)。

VI. 統計学的結果

染色体12q22-23LOHと Apaf-1 mRNA および Apaf-1 蛋白の低発現は両者とも有意な相関関係を認めた (それぞれ p<0.05, p<0.001) (表3B,C)。p53 遺伝子異常, EGFR 遺伝子増幅はほぼ互いに相容れない関係 (mutually exclusive) であった (p=0.053)。12q22-23LOHと p53 遺伝子異常, EGFR 遺伝子増幅とはいずれも相関関係を認めなかった (それぞれ p=0.310, p=0.695) (表4A, B, C)。

考 察

近年の分子生物学的解析により神経膠芽腫はその遺伝子異常に基づいていくつかのサブタイプに分類できることがわかってきた。中でも代表的なサブタイプは p53 遺伝子異常を有するが EGFR 遺伝子増幅を有さない群と、p53 遺伝子異常を有さないが EGFR 遺伝子増幅を有する群である。それぞれ神経膠芽腫の約1/3に相当する<sup>5)13)14)</sup>。これらのサブタイプは臨床的にも異なる性質を有し、前者は一般的に若年者に多く、また悪性転化により神経膠芽腫となった患者に多い。また後者は一般に前者と比べ高齢者に多く、発症時より神経膠芽腫であった患者に多い<sup>5)7)9)13)14)</sup>。神経膠芽腫における、その他の代表的な遺伝子異常の中には p16<sup>INK4a</sup> (p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a)/p14<sup>ARF</sup> (p14 alternative reading frame) 遺伝子の相対的欠失や Rb 遺伝子の異常のように p53 遺伝子異常や EGFR 遺伝子増幅と何らかの相関関係をもつものが報告されている<sup>44)47)~52)</sup>。すなわち遺伝学的解析に基づく神経膠芽腫の分類は、それぞれ関連する遺伝子ネットワークの生物学的性質を反映し、臨床的に極めて有用な指標となりうると考えられる。今回我々は、p53 経路の下流に位置するアポトーシスの主要因子 Apaf-1 に注目し、その遺伝子座である染色体12q22-23の異常 (LOH) と従来のサブタイプとの関連性を検討するとともに、神経膠芽腫における Apaf-1 の発現を mRNA および蛋白レベルで解析した。

神経膠芽腫における染色体12番長腕の LOH に関する報告は



少なく、von Deimlingらの用いたマイクロサテライトマーカーによるLOHの頻度は5~6%と低率である<sup>6)</sup>。しかしながら本研究で用いたApaf-1遺伝子座に近接する染色体12q22-23のマイクロサテライトマーカーによる解析ではLOHの頻度が42%と高率に認められた。染色体12q22-23LOHが神経膠芽腫やある種の腫瘍において特異的な遺伝子異常であるかどうかは不明であるが、神経膠芽腫と同様、発生学的に外胚葉由来と考えられる転移性の悪性黒色腫においても高率に報告されている<sup>31)</sup>。従来報告されている染色体12qLOHの頻度(5~6%)との相違については、この部分のLOHが極めて限局したものであり染色体12番長腕全体に及ぶゲノムワイドなものではないためか、あるいは、我々の用いた蛍光プライマーにて標識された反応物をシーケンサーにて解析する方法が従来のもとの感度が異なることなどが理由として考えられる。転移性悪性黒色腫においては染色体12q22-23LOHを示す例は全例対立遺伝子座のApaf-1遺伝子のメチル化によるApaf-1の不活化を伴っている<sup>31)</sup>。我々の神経膠芽腫のシリーズにおいても染色体12q22-23LOHを有する例とApaf-1のmRNAおよび蛋白の低発現は有意な相関関係を示した。神経膠芽腫においても対立遺伝子のメチル化によりApaf-1が不活化されるかどうかに関しては現在検討中である。33例の神経膠芽腫のシリーズにおいて染色体12q22-23LOHを有さない例の中で3例にApaf-1 mRNAの低発現、4例にApaf-1蛋白の低発現を認めた。これらの例においては2つの対立遺伝子の両方のメチル化を含めた何らかのエピジェネティックな発現抑制機構が関与している可能性が考えられた。また、染色体12q22-23LOHを認めた14例のうち1例のみApaf-1 mRNA、蛋白ともに低発現と判断できなかった。本例においては対立遺伝子座のApaf-1のメチル化が免れている可能性があり、また本研究で使用したmRNA、蛋白発現の評価はあくまで相対的評価であることなどが原因として考えられた。

神経膠芽腫における代表的な抑制癌遺伝子であるp16<sup>INK4a</sup>やp14<sup>ARF</sup>もそれらの遺伝子異常(相同的欠失)とメチル化による発現抑制機構が報告されている<sup>53)54)</sup>。Apaf-1を含めて、何故これらの特定の遺伝子が腫瘍細胞において高頻度に遺伝子の構造的変異とメチル化を同時に有するのかが明らかではないが、CpGアイランド(CpG-rich island)を有する遺伝子のメチル化異常と、遺伝子の不安定性との間には密接な関連性が報告されている。すなわち神経膠芽腫の発生過程においてApaf-1の対立遺伝子を含む特定の領域のメチル化に伴い遺伝子の不安定性が増強され、染色体上の構造的変異(12q22-23LOH)が誘発された可能性が考えられる<sup>55)~59)</sup>。

我々の33例の神経膠芽腫のシリーズにおいては、p53遺伝子異常およびEGFR遺伝子増幅はその両者ともApaf-1の不活化を伴う染色体12q22-23LOHとは有意な相関関係を認めなかった。しかしながら、p53遺伝子異常およびEGFR遺伝子増幅の両者とも認めない12例においては、アレル情報が得られた9例中6例(66.7%)に染色体12q22-23LOHおよびApaf-1の不活化が認められた。すなわち神経膠芽腫におけるひとつのサブタイプとしてp53遺伝子異常とEGFR遺伝子増幅を有しないが、Apaf-1の不活化を伴う染色体12q22-23LOHを有するグループの存在が示唆された。また、染色体12q22-23LOHを有するグループの平均年齢は42.4歳であり、LOHを有さないグループの平均年齢51.1歳よりも若年の傾向を示した(p=0.169)。この結果とp53遺伝子異常を有するものは若年者に多い<sup>5)6)15)60)</sup>ということを経合

的に考えると、特に若年者の神経膠芽腫の中にはp53遺伝子異常を有するものとApaf-1の不活化を伴う染色体12q22-23LOHを有するものの2つのグループが存在することが疑われる。しかしこのことを統計学的有意差をもって示すためにはより多くの症例の蓄積が必要である。また、我々の33例のシリーズの中には、臨床的経過より6例の二次性神経膠芽腫と考えられる例が存在した。これらの例は従来報告通り高率にp53遺伝子異常を有し、EGFR遺伝子増幅を伴わなかった。また二次性神経膠芽腫6例すべてに染色体12q22-23LOHを認めた。従来、二次性神経膠芽腫は若年者に多いということが背景にあり<sup>5)6)8)37)</sup>、本研究での染色体12q22-23LOHが若年者に多かったということがこの偏りに影響を及ぼしたものと考えられた。

アポトーシス経路の破綻は神経膠芽腫を含む様々な腫瘍の発生に関与する重要な因子の一つである<sup>30)61)~63)</sup>。「p14<sup>ARF</sup>-p53-Apaf-1」経路を介するアポトーシスにおいて、p14<sup>ARF</sup>、p53の不活化と同様にApaf-1の不活化が腫瘍発生へ関与することが報告されている<sup>27)30)31)33)</sup>。神経膠芽腫細胞株では、Apaf-1およびカスパーゼ9のアデノウイルスを用いた形質導入により、腫瘍細胞にアポトーシスを誘導することが報告されているが、実際の神経膠芽腫でのApaf-1の動態に関する報告は少ない<sup>64)</sup>。p14<sup>ARF</sup>、p53は両者ともに神経膠芽腫において高率に認められる遺伝子異常のターゲットであり<sup>1)37)50)</sup>、また、p14<sup>ARF</sup>の相同的欠失とp53遺伝子異常は互いに相容れない関係にある<sup>49)50)</sup>。更にはp14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4a</sup>の相同的欠失はEGFRの活性化と共存して初めて神経膠芽腫の発生に関与することがわかってきた<sup>62)</sup>。かつ、EGFR遺伝子増幅を有するものはp14<sup>ARF</sup>/p16<sup>INK4a</sup>の相同的欠失を高頻度に伴うと報告されている<sup>49)51)</sup>。すなわち、神経膠芽腫においてはp53遺伝子異常を有するグループとEGFR遺伝子増幅を有するグループ、さらには今回我々が呈示した染色体12q22-23LOHを有しApaf-1の不活化を示すグループを統合すると、ほとんどの例において「p14<sup>ARF</sup>-p53-Apaf-1」のアポトーシス経路のいずれかに異常を有することが疑われる。本研究においても染色体12q22-23LOH、p53遺伝子異常、のいずれかを認めた症例は33例中23例(69.7%)と高率であり、更にEGFR遺伝子増幅を含めると33例中29例(87.9%)と極めて高率であった。

以上より神経膠芽腫において高率に認められるApaf-1の不活化と密接に関連している染色体12q22-23LOHの遺伝子異常は、従来の遺伝子異常のサブグループには属さず、またApaf-1の不活化はアポトーシス経路の破綻を介して神経膠芽腫の発生あるいは悪性化に関与する重要な因子のひとつであると考えられた。

p53遺伝子異常やEGFR遺伝子増幅などの遺伝子異常が生命予後にどのような影響を及ぼすかについては未だ一定の見解が得られておらず<sup>12)17)~19)</sup>、神経膠腫における臨床的に有用な遺伝子マーカーは現時点では存在しない。この染色体12q22-23LOHが何らかの遺伝子マーカーの役割を果たすかについて、生存期間(overall survival)および無再発期間(progression free survival, PFS)をKaplan-Meier生存曲線を用いて検討した(データは示していない)。染色体12q22-23LOHもしくはp53遺伝子異常の少なくともどちらかをもつグループではPFSが短い傾向は認められた(Wilcoxon検定, p=0.183)ことより、p53およびApaf-1を介するアポトーシス経路が神経膠芽腫の治療抵抗性に関与している可能性は否定できない。神経膠芽腫の予後に対する影響を単一の遺伝子異常のみに求めることは、症例ごとに異なる

腫瘍部位, 発症段階での腫瘍の大きさや, 予後と密接に関連する年齢など, 単純に比較できない要素も多数含まれるため難しいと考えられる。しかしながら今後新たな抗腫瘍剤や遺伝子治療などが開発された場合には, このような LOH の有無により異なる治療効果を生む遺伝子マーカーとなりうるかもしれない。

結 論

神経膠芽腫 33 例における染色体 12q22-23LOH, Apaf-1 mRNA および Apaf-1 蛋白の発現, p53 遺伝子異常, EGFR 遺伝子増幅をそれぞれ LOH 解析, RT-PCR, 免疫組織化学法, 蛍光 SSCP-PCR 法, 直接シーケンス法, 弁別的 PCR 法, を用いて検討し, 以下の結論を得た。

1. 神経膠芽腫において染色体 12q22-23 の LOH を約 40% (14/33) と高頻度に認めた。この LOH は若年者に多い傾向を示した。
2. 染色体 12q22-23 の LOH は Apaf-1 の mRNA および Apaf-1 蛋白の欠失, ないし低発現に寄与していることが示された。
3. 神経膠芽腫における 2 つの重要な遺伝子異常である p53 遺伝子異常と EGFR 遺伝子増幅については互いに相容れない関係であった。染色体 12q22-23LOH は p53 遺伝子異常および EGFR 遺伝子増幅のいずれの異常とも相関しなかった。神経膠芽腫の中で p53, EGFR いずれの遺伝子異常も有さず染色体 12q22-23LOH を有するサブタイプの存在が示唆された。
4. 染色体 12q22-23 の LOH または p53 遺伝子異常の少なくともどちらか一方の異常を認める頻度は約 70% にも及んだ。大部分の神経膠芽腫では Apaf-1 および p53 を介するアポトーシス経路のいずれかに異常を認める可能性が高いことが考えられた。

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林 裕助手, 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, 本研究の一部は, 日本学術振興会科学研究費補助金基盤研究 B-2 (課題番号 13470290), C-2 (課題番号 12671345) および金沢大学重点化経費により助成された。

尚, 本研究の一部は第 20 回日本脳腫瘍学会 (熊本, 2002) において発表された。

文 献

- 1) Maher EA, Furnari FB, Bachoo RM. Malignant glioma: genetics and biology of a grave matter. *Genes Dev* 15: 1311-1333, 2001
- 2) Deen DF, Chiarodo A, Grimm EA. Brain Tumor Working Group Report on the 9th International Conference on Brain Tumor Research and Therapy. Organ System Program, National Cancer Institute. *J Neurooncol* 16: 243-272, 1993
- 3) Libermann TA, Nusbaum HR, Razon N. Amplification, enhanced expression and possible rearrangement of EGF receptor gene in primary human brain tumours of glial origin. *Nature* 313: 144-147, 1985
- 4) Louis DN, Article J. A molecular genetic model of astrocytoma histopathology. *Brain Pathol* 7: 755-764, 1997
- 5) von Deimling A, von Ammon K, Schoenfeld D. Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis.

- Brain Pathol 3: 19-26, 1993
- 6) von Deimling A, Fimmers R, Schmidt MC. Comprehensive allelotype and genetic analysis of 466 human nervous system tumors. *J Neuropathol Exp Neurol* 59: 544-558, 2000
- 7) Fujisawa H, Reis RM, Nakamura M. Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab Invest* 80: 65-72, 2000
- 8) Muller MB, Schmidt MC, Schmidt O. Molecular genetic analysis as a tool for evaluating stereotactic biopsies of glioma specimens. *J Neuropathol Exp Neurol* 58: 40-45, 1999
- 9) Kunwar S, Mohapatra G, Bollen A. Genetic subgroups of anaplastic astrocytomas correlate with patient age and survival. *Cancer Res* 61: 7683-7688, 2001
- 10) Shipp MA, Ross KN, Tamayo P. Diffuse large B-cell lymphoma outcome prediction by gene-expression profiling and supervised machine learning. *Nat Med* 8: 68-74, 2002
- 11) Pomeroy SL, Tamayo P, Gaasenbeek M. Prediction of central nervous system embryonal tumour outcome based on gene expression. *Nature* 415: 436-442, 2002
- 12) Schmidt MC, Antweiler S, Urban N. Impact of genotype and morphology on the prognosis of glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 321-328, 2002
- 13) von Deimling A, Louis DN, Wiestler OD. Molecular pathways in the formation of gliomas. *Glia* 15: 328-338, 1995
- 14) Louis DN, Gusella JF. A tiger behind many doors: multiple genetic pathways to malignant glioma. *Trends Genet* 11: 412-415, 1995
- 15) Watanabe K, Tachibana O, Sata K. Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol* 6: 217-224, 1996
- 16) Sung T, Miller DC, Hayes RL. Preferential inactivation of the p53 tumor suppressor pathway and lack of EGFR amplification distinguish de novo high grade pediatric astrocytomas from de novo adult astrocytomas. *Brain Pathol* 10: 249-259, 2000
- 17) Nieder C, Petersen S, Petersen C. The challenge of p53 as prognostic and predictive factor in gliomas. *Cancer Treat Rev* 26: 67-73, 2000
- 18) Shiraishi S, Tada K, Nakamura H. Influence of p53 mutations on prognosis of patients with glioblastoma. *Cancer* 95: 249-257, 2002
- 19) Rasheed A, Herndon JE, Stenzel TT. Molecular markers of prognosis in astrocytic tumors. *Cancer* 94: 2688-2697, 2002
- 20) Zou H, Henzel WJ, Liu X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome c-dependent activation of caspase-3. *Cell* 90: 405-413, 1997
- 21) Bala S, Oliver H, Renault B. Genetic analysis of the APAF1 gene in male germ cell tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 28: 258-268, 2000
- 22) Murty VV, Montgomery K, Dutta S. A 3-Mb high-resolution BAC/PAC contig of 12q22 encompassing the 830-kb consensus minimal deletion in male germ cell tumors. *Genome Res* 9: 662-671, 1999

- 23) Cecconi F, Alvarez-Bolado G, Meyer BI. Apaf1 (CED-4 homolog) regulates programmed cell death in mammalian development. *Cell* 94: 727-737, 1998
- 24) Soengas MS, Alarcon RM, Yoshida H. Apaf-1 and caspase-9 in p53-dependent apoptosis and tumor inhibition. *Science* 284: 156-159, 1999
- 25) Chu ZL, Pio F, Xie Z. A novel enhancer of the Apaf1 apoptosome involved in cytochrome c- dependent caspase activation and apoptosis. *J Biol Chem* 276: 9239-9245, 2001
- 26) Jones PA: Cancer. Death and methylation. *Nature* 409: 141, 143-144., 2001
- 27) Cecconi F, Gruss P: Apaf1 in developmental apoptosis and cancer: how many ways to die? *Cell Mol Life Sci* 58: 1688-1697, 2001
- 28) Robles AI, Bemmels NA, Foraker AB. APAF-1 is a transcriptional target of p53 in DNA damage-induced apoptosis. *Cancer Res* 61: 6660-6664, 2001
- 29) Rozenfeld-Granot G, Krishnamurthy J, Kannan K. A positive feedback mechanism in the transcriptional activation of Apaf-1 by p53 and the coactivator Zac-1. *Oncogene* 21: 1469-1476, 2002
- 30) Zornig M, Hueber A, Baum W. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochim Biophys Acta* 1551: F1-37, 2001
- 31) Soengas MS, Capodici P, Polsky D. Inactivation of the apoptosis effector Apaf-1 in malignant melanoma. *Nature* 409: 207-211, 2001
- 32) Satyamoorthy K, Bogenrieder T, Herlyn M. No longer a molecular black box—new clues to apoptosis and drug resistance in melanoma. *Trends Mol Med* 7: 191-194, 2001
- 33) Jia L, Srinivasula SM, Liu FT. Apaf-1 protein deficiency confers resistance to cytochrome c-dependent apoptosis in human leukemic cells. *Blood* 98: 414-421, 2001
- 34) Bigner SH, Mark J, Burger PC. Specific chromosomal abnormalities in malignant human gliomas. *Cancer Res* 48: 405-411, 1988
- 35) Rollbrocker B, Waha A, Louis DN. Amplification of the cyclin-dependent kinase 4 (CDK4) gene is associated with high cdk4 protein levels in glioblastoma multiforme. *Acta Neuropathol (Berl)* 92: 70-74, 1996
- 36) Wooten EC, Fults D, Duggirala R. A study of loss of heterozygosity at 70 loci in anaplastic astrocytoma and glioblastoma multiforme with implications for tumor evolution. *Neuro-oncol* 1: 169-176, 1999
- 37) Kleihues P, Burger PC, Collins VP, Newcomb EW, Ohgaki H.: Glioblastoma. *In* Kleihues P, Cavenee WK (eds), *Pathology and Genetics. Tumours of the Nervous System 2<sup>nd</sup>*, p29-39, IARC Press, Lyon, 2000
- 38) Neubauer A, Neubauer B, He M. Analysis of gene amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 7: 1019-1025, 1992
- 39) Hruza C, Dobianer 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
- 40) Tong CY, Zheng PP, Pang JC. Identification of novel regions of allelic loss in ependymomas by high-resolution allelotyping with 384 microsatellite markers. *J Neurosurg* 95: 9-14, 2001
- 41) Canzian F, Salovaara R, Hemminki A. Semiautomated assessment of loss of heterozygosity and replication error in tumors. *Cancer Res* 56: 3331-3337, 1996
- 42) Wang G, Zhao Y, Liu X. Allelic loss and gain, but not genomic instability, as the major somatic mutation in primary hepatocellular carcinoma. *Genes Chromosomes Cancer* 31: 221-227, 2001
- 43) Skotheim RI, Diep CB, Kraggerud SM. Evaluation of loss of heterozygosity/allelic imbalance scoring in tumor DNA. *Cancer Genet Cytogenet* 127: 64-70, 2001
- 44) Ueki K, Ono Y, Henson JW. CDKN2/p16 or RB alterations occur in the majority of glioblastomas and are inversely correlated. *Cancer Res* 56: 150-153, 1996
- 45) Ono Y, Tamiya T, Ichikawa T. Malignant astrocytomas with homozygous CDKN2/p16 gene deletions have higher Ki-67 proliferation indices. *J Neuropathol Exp Neurol* 55: 1026-1031, 1996
- 46) Iwato M, Hayashi Y. Molecular analysis for p53 and mdm2 in intracranial germ cell tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 99: 21-25, 2000
- 47) Waha A, Rollbrocker B, Wiestler OD. A polymerase chain reaction-based assay for the rapid detection of gene amplification in human tumors. *Diagn Mol Pathol* 5: 147-150, 1996
- 48) Hegi ME, zur Hausen A, Ruedi D. Hemizygous or homozygous deletion of the chromosomal region containing the p16<sup>INK4a</sup> gene is associated with amplification of the EGF receptor gene in glioblastomas. *Int J Cancer* 73: 57-63, 1997
- 49) Hayashi Y, Ueki K, Waha A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 7: 871-875, 1997
- 50) Fulci G, Labuhn M, Maier D. p53 gene mutation and ink4a-*arf* deletion appear to be two mutually exclusive events in human glioblastoma. *Oncogene* 19: 3816-3822, 2000
- 51) Holland EC, Hively WP, DePinho RA. A constitutively active epidermal growth factor receptor cooperates with disruption of G1 cell-cycle arrest pathways to induce glioma-like lesions in mice. *Genes Dev* 12: 3675-3685, 1998
- 52) Bachoo RM, Maher EA, Ligon KL. Epidermal growth factor receptor and Ink4a/Arf: convergent mechanisms governing terminal differentiation and transformation along the neural stem cell to astrocyte axis. *Cancer Cell* 1: 269-277, 2002
- 53) Costello JF, Berger MS, Huang HS. Silencing of p16/CDKN2 expression in human gliomas by methylation and chromatin condensation. *Cancer Res* 56: 2405-2410, 1996
- 54) Nakamura M, Watanabe T, Klangby U. p14<sup>ARF</sup> deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain Pathol* 11: 159-168, 2001
- 55) Esteller M, Herman JG: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J*

Pathol 196: 1-7, 2002

56) Garinis GA, Patrinos GP, Spanakis NE. DNA hypermethylation: when tumour suppressor genes go silent. *Hum Genet* 111: 115-127, 2002

57) Hawkins N, Norrie M, Cheong K. CpG island methylation in sporadic colorectal cancers and its relationship to microsatellite instability. *Gastroenterology* 122: 1376-1387, 2002

58) Ehrlich M: DNA methylation in cancer: too much, but also too little. *Oncogene* 21: 5400-5413, 2002

59) Baylin SB, Esteller M, Rountree MR. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer. *Hum Mol Genet* 10: 687-692, 2001

60) Rasheed BK, McLendon RE, Herndon JE. Alterations of the *p53* gene in human gliomas. *Cancer Res* 54: 1324-1330, 1994

61) Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV: Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 73: 2013-2026, 1994

62) Tohma Y, Gratas C, Van Meir EG. Necrogenesis and Fas/APO-1 (CD95) expression in primary (de novo) and secondary glioblastomas. *J Neuropathol Exp Neurol* 57: 239-245, 1998

63) Steinbach JP, Supra P, Huang HJ. CD95-mediated apoptosis of human glioma cells: modulation by epidermal growth factor receptor activity. *Brain Pathol* 12: 12-20, 2002

64) Shinoura N, Sakurai S, Shibasaki F. Co-transduction of Apaf-1 and caspase-9 highly enhances p53-mediated apoptosis in gliomas. *Br J Cancer* 86: 587-595, 2002

### Frequent LOH at Chromosome 12q22-23 and Apaf-1 Inactivation in Glioblastoma

Takuya Watanabe, Department of Neurosurgery, Graduate School of Medical Science, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 111, 337 — 347 (2002)

**Key words** chromosome 12q22-23 LOH, apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), p53, EGFR, glioblastoma

#### Abstract

Glioblastoma (GB), a deadly intracranial neoplasm, can be divided into a few genetic subsets based both on structural alteration of specific genes, including p53 and EGFR, and on chromosomal instability such as loss of heterozygosity (LOH). Although the LOHs on several chromosomes, such as 1p, 10p, 10q, 11p, 19q and 22q occur frequently, details of the 12q state are still unknown. Apoptotic protease activating factor-1 (Apaf-1), located at chromosome 12q22-23, is a major effector of the p53 mediated apoptosis pathway, and Apaf-1 inactivation due to both chromosome 12q22-23 LOH and hypermethylation would be involved in some neoplasms in their malignancy. However, little is known about the frequency of 12q22-23 LOH and the state of Apaf-1 in GB. To elucidate their involvement in GB, we analyzed a series of 33 GBs for chromosome 12q22-23 LOH, Apaf-1 mRNA expression and Apaf-1 protein expression, using microsatellite analysis, reverse transcription (RT)-PCR analysis and immunohistochemical (IHC) analysis. Additionally we evaluated correlations between 12q22-23 LOH and both p53 gene mutation and EGFR gene amplification. Chromosome 12q22-23 LOH was detected in 14 of 33 cases (42%). Low expression of Apaf-1 mRNA was detected in 9 (69%) of 13 cases, and low expression of Apaf-1 protein was detected in 12 (86%) of 14 cases. The 12q22-23 LOH was significantly correlated with low expression of mRNA and protein ( $p < 0.05$ ,  $p < 0.001$  respectively). P53 gene mutation and EGFR gene amplification were found in 13 cases (39%) and 8 cases (24%), respectively, and these gene alterations were mutually exclusive. However 12q22-23 LOH showed no correlation with p53 gene mutation or EGFR gene amplification. Six of 9 GBs (67%) with neither p53 gene mutation nor EGFR gene amplification had 12q22-23 LOH. It is thus likely that these GBs belong to another subset independent from the common two subsets (one with p53 gene mutation and without EGFR gene amplification, and the other with EGFR gene amplification and without p53 gene mutation). The number of GBs carrying 12q22-23 LOH with Apaf-1 inactivation or p53 gene mutation reached to 23 of 33 cases (70%). This high frequency of alterations in the apoptosis-associated factors leads to a speculation that abrogation of the Apaf-1 and p53 mediated apoptosis pathway could play an important role in the tumorigenesis of GB.