

頭蓋内胚細胞性腫瘍における細胞周期制御因子の発現とその遺伝子異常の解析

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/2297/9465

頭蓋内胚細胞性腫瘍における細胞周期制御因子の発現とその遺伝子異常の解析

金沢大学医学部脳神経外科学講座 (主任: 山下純宏教授)

岩 戸 雅 之

頭蓋内胚細胞性腫瘍は、組織学的には、精巢胚細胞性腫瘍と極めて類似している。精巢胚細胞性腫瘍における分子生物学的背景としてp53およびmdm2 (murine double minute2) の異常が報告されているが、頭蓋内胚細胞性腫瘍における、p53, mdm2に関しては未だ解明されていない。本研究では、頭蓋内胚細胞性腫瘍の腫瘍化のメカニズムを明らかにするために、p53遺伝子変異、mdm2遺伝子増幅、INK4a/ARF (inhibitor of cyclin dependent kinase 4a/alternative reading frame) 遺伝子異常を蛍光1本鎖DNA 高次構造多型PCR法、弁別的PCR法および直接シーケンス法を用いて検討した。さらに、p53蛋白およびmdm2蛋白の発現を免疫組織化学的に検討した。手術標本より得られた頭蓋内胚細胞性腫瘍21例 (胚細胞腫10例、奇形腫7例、卵黄嚢腫瘍2例、絨毛癌2例) を対象とした。21例中1例においてp53遺伝子エクソン5に点突然変異を認めた。mdm2遺伝子増幅は、21例中3例に認めた。p53蛋白は、Pab1801 (抗p53抗体) で20例中2例に、DO7 (抗p53抗体) で20例中15例に陽性反応を示し、mdm2蛋白は、IF2 (抗mdm2抗体) で20例中16例に陽性反応を示した。INK4a/ARF 遺伝子異常は、21例中14例に相同的欠失が認められ、1例に点突然変異を認めた。INK4a/ARF 遺伝子異常は、胚細胞腫群 (10例中9例) の方が、非胚細胞腫群 (11例中6例) より高頻度に存在する傾向にあった ($p=0.09$)。p53遺伝子、mdm2遺伝子およびINK4a/ARF 遺伝子の遺伝子群の中で、少なくともひとつ以上の遺伝子に異常を認めたものは21例中17例であった。以上より、頭蓋内胚細胞性腫瘍におけるp53およびmdm2の発現および遺伝子異常のパターンは精巢胚細胞性腫瘍と類似しており、両者は、組織由来が同一であることが推察され、p14^{ARF} (p14 alternative reading frame)-mdm2-p53腫瘍抑制経路に関わる遺伝子異常を高頻度に認めることから、この腫瘍抑制経路の崩壊が頭蓋内胚細胞性腫瘍の腫瘍化に関与していることが示唆された。

Key words intracranial germ cell tumors, p53, mdm2, INK4a/ARF locus, cell cycle regulator

頭蓋内胚細胞性腫瘍 (intracranial germ cell tumors, ICGT) は、比較的稀な頭蓋内原発の脳腫瘍である。全脳腫瘍中におけるその発生頻度は、欧米では0.3%から3.4%、本邦では2.1%から12.7%と報告され、本邦で発生頻度が高いのが一つの特徴となっている^{1)~8)}。組織学的に生殖器原発の腫瘍群と極めて類似の像を呈し、その特徴から5型 [胚細胞腫 (germinoma)、奇形腫 (teratoma)、卵黄嚢腫瘍 (yolk sac tumor)、胎児性癌 (embryonal carcinoma)、絨毛癌 (choriocarcinoma)] に分類されている⁷⁾⁹⁾。これらの腫瘍群に対しては手術、化学療法、放射線療法を含む集学的治療が行われているが、その治療反応性および臨床的予後は、その組織型に依存して異なっている³⁾¹⁰⁾。すなわち、胚細胞腫の大部分は、化学療法および放射線療法にて完全寛解となるが、一方で胚細胞腫以外の胚細胞性腫瘍 (奇形腫、卵黄嚢腫瘍、胎児性癌、絨毛癌) は、化学療法および放射線療法に抵抗性を示す⁹⁾。しかし、ICGTの細胞増殖、発生原因の分子生物学的背景に関しては、不明な部分が多く、その分子生物学的背景の相違が、胚細胞腫と胚細胞腫以外の胚細胞性

腫瘍間の治療反応性に関与していると考えられる。

近年、悪性腫瘍の分子生物学的研究の進歩により、様々な腫瘍化の機構が解明されつつある。特に、p53と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}) を中心とした細胞周期制御因子の異常が腫瘍化、すなわち増殖能および不死化の獲得に深く関与していることが明らかになってきた^{11)~16)}。細胞周期におけるG1期からS期への移行は、網膜芽細胞腫蛋白質 (retinoblastoma protein, pRB) のリン酸化に伴い、pRBから転写因子E2Fが解離することによって進行する¹⁷⁾¹⁸⁾。p53, p16^{Ink4a}などは、pRBのリン酸化を制御することで細胞周期を制御すると考えられている^{19)~21)}。さらに、p53は多機能性の蛋白質であり、その過剰発現によりアポトーシスを誘発することが知られている^{11)~13)}。最近になりp16^{Ink4a}をコードするINK4a遺伝子の遺伝子座 [9番染色体短腕 (9p) 21] には、この遺伝子のエクソン2とエクソン3を共有する他の遺伝子、ARF (alternative reading frame) 遺伝子も存在することが明らかになった²²⁾²³⁾ (図1)。ヒトにおいて、p16^{Ink4a}

平成11年11月25日受付, 平成12年1月14日受理

Abbreviations: APRT, adenine phosphoribosyl transferase; ARF, alternative reading frame; DR, dopamine receptor; ICGT, intracranial germ cell tumors; INK4a, inhibitor of cyclin dependent kinase 4a; mdm2, murine double minute 2; NGGCT, non-germinomatous germ cell tumors; PG, pure germinomas; pRB, retinoblastoma protein; p14^{ARF},

は156のアミノ酸からなる蛋白であり、ARF遺伝子がコードするp14^{ARF} (p14 alternative reading frame) は132のアミノ酸からなる蛋白である。その遺伝子座は、INK4a/ARF遺伝子座と呼ばれており、多くの種類の腫瘍において、その遺伝子座の異常が高頻度であることが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。最初p14^{ARF}はマウスp19^{ARF} (p19 alternative reading frame) のヒト相同体として発見された。この蛋白はp16^{INK4a}とは異なるプロモーター領域を有し、その機能は、mdm2蛋白 (murine double minute 2) がp53をユビキチン化し、p53の分解を進める作用を抑制することによりp53の活性レベルを上げることである^{24)~28)}。この一連の相互関係を示す経路 (p14^{ARF}-mdm2-p53 pathway) の異常が腫瘍化に関与している考えられている²⁹⁾。

本研究では、ICGTを対象としてp53蛋白およびmdm2蛋白の発現を免疫組織化学法を用いて検討し、さらにp53遺伝子、mdm2遺伝子およびINK4a/ARF遺伝子の異常を弁別的PCR法、1本鎖DNA高次構造多型 (single strand conformation polymorphism, SSCP) PCR法および直接シーケンス法を用いて検討した。

対象および方法

I. 対象

1988年から1998年までに金沢大学脳神経外科学教室で外科的切除されたICGT21例を対象とした。その病理組織学的分類については、世界保健機構 (WHO) 脳腫瘍分類に従った³⁰⁾。内訳は胚細胞腫10例、奇形腫7例、卵黄嚢腫瘍2例、絨毛癌2例であった。免疫組織化学法には、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て包埋した。

II. 免疫組織化学

1. 各種蛋白質に対する抗体

抗p53抗体、抗mdm2抗体には、以下のものを用いた。抗ヒトP53モノクローナル抗体2種 (マウスIgG1, クローンPab1801, Oncogene Research Products, Cambridge, USAおよびマウスIgG2b, クローンDO-7, グコ・ジャパン, 京都); 抗ヒトmdm2モノクローナル抗体 (マウスIgG2b, クローンIF2, Oncogene Research Products, Cambridge, USA)。抗p53抗体は、いずれも野生型p53および変異型p53の両者を認識する抗体である。

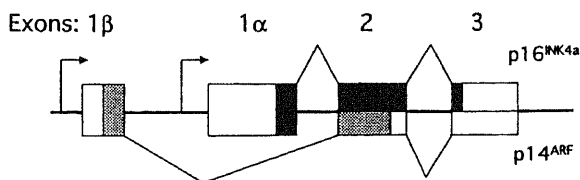


Fig. 1. The INK4a/ARF locus. Genomic sequences encoding p16^{INK4a} are defined by completely filled regions within the boxes designating exons 1, 2 and 3, whereas the segments of exons 1 β and 2 that encode ARF are defined by shaded areas. Unfilled portions of the exons correspond to noncoding 5' and 3' regions. Splicing between the exons is indicated by the connecting lines, and exon 1 and 1 β are indicated to have separate promoters.

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 μ mの切片を作製し、ポリ-L-リジン (和光純薬, 大阪) 処理スライドガラス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、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で500W, 3分間のマイクロウェーブ処理を7回繰り返し、抗原性の賦活化を行った。0.3%過酸化水素加メタノールで内因性ペルオキシダーゼを失活させ、PBSで洗浄後、非特異的反応抑制のため、ブロッキング抗体 (正常ウサギ血清) を室温で20分作用させた。次に、抗体希釈用緩衝液 (DAKO) で抗ヒトP53モノクローナル抗体 (クローンPab1801) は100倍に希釈、抗ヒトP53モノクローナル抗体 (クローンDO-7) は100倍に希釈、抗ヒトmdm2モノクローナル抗体 (クローンIF2) は20倍に希釈し、これら一次抗体を室温で2時間反応させた。さらに、二次抗体のビオチン化ウサギ抗マウスIgG抗体 (Vector Laboratories Inc., Burlingame, USA) を室温で10分反応させた。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, St. Louis, USA) 処理により発色させ、ヘマトキシリンで核染色を行った。抗ヒトP53モノクローナル抗体の陽性コントロールとしては、肺癌の頭蓋内転移の標本を用い、抗ヒトmdm2モノクローナル抗体の陽性コントロールとしては、軟部組織肉腫の標本を用いた。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計測し、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。

III. 弁別的PCR法および1本鎖DNA SSCP-PCR法および直接シーケンス法による遺伝子異常の解析

1. DNAの抽出

腫瘍標本からのDNAの抽出は、Neubauerら³¹⁾、Hruzaら³²⁾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 μ mの切片をHE染色し、腫瘍細胞巣が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、スライドガラス上より切片を剥がし、キシレンにて脱パラフィンをした。上清を捨てた後99.5%エタノール (和光純薬) で再浮遊させ洗浄後、微量高速冷却遠心器 (トミー精工, 東京) にて10000rpm, 5分間, 4 $^{\circ}$ 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、10000rpm, 2分間, 4 $^{\circ}$ Cで遠心分離した。上清を可及的に除去後、50 $^{\circ}$ 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 $^{\circ}$ Cで3時間振盪後、98 $^{\circ}$ Cで10分振盪させプロテナーゼKを失活させた。一部を取り260nm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5mlを採取し、室温で4000rpm, 10分間遠心分離した。中間層 (リンパ球層) を採取し、QIAamp Tissue Kit (QIAGEN) を用いてDNAを抽出した。一部を取り260nmの吸光度を測定してDNA濃度を計算した。

p14 alternative reading frame; p16^{INK4a}, p16 inhibitor of cyclin dependent kinase 4a; SSCP, single strand conformation polymorphism; TGT, testicular germ cell tumors

2. プライマーの作成

p53 遺伝子, mdm2 遺伝子および INK4a/ARF 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²¹⁾から引用した. また PCR プライマーは文献^{33)~36)}より引用し, プライマーの合成は Amersham Pharmacia Biotech (東京) に委託し, 各プライマーは 5'末端にヨードジカルボチアミン (indodicarbocyanine, Cy5, Amersham Pharmacia Biotech, 東京) の蛍光色素にて標識した. 表1に使用したプライマーの部位, 塩基配列, PCR産物の大きさを一覧にして示す.

3. 弁別的 PCR 法³⁷⁾

mdm2 遺伝子増幅および INK4a/ARF 遺伝子欠失の解析を行った. 内部コントロールは, mdm2 遺伝子に対しては, ドーパミン受容体 (dopamine receptor, DR) 遺伝子を用い, INK4a/ARF 遺伝子に対しては, アデノリボシル転移酵素 (adenine phosphoribosyltransferase, APRT) 遺伝子を用いた. 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.

PCR反応には, 抽出した染色体DNAのうち2ngを1回の反応の鋳型として用いた. 反応液は, 終濃度が5pmolの標的遺伝子のプライマーと内部コントロール遺伝子のプライマーの2セット, 200 μ 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 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, Norwalk, USA), PCR反応緩衝液 [終濃度10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 0.01%ゼラチン] (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) および1.5mM MgCl₂ (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) に, 滅菌蒸留水を加え全量10 μ lに調整した. これに15 μ lのミネラルオイル (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) を重層させ, 核酸増幅装置タカラサーマルサイクラー (Takara Thermal Cycler) 480 (宝酒造, 大津) でPCR反応を行った. 反応は, 95 $^{\circ}$ Cで3分間の熱変性し, 各プライマーセットのアニーリング温度に応じたサイクルプログラムを行い, 最後に72 $^{\circ}$ C10分間の伸長反応を行った. 表2に標的遺伝子と内部コントロールの各プライマーセットの組み合わせ, サイクル条件とサイクル数を一覧にして示す. 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. シーケンスゲルはLongRanger 50% Gel Solution (FMC BioProducts, 宝酒造, 東京) と尿素 (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45 $^{\circ}$ Cの定温にした. 1 \times Tris-ホウ酸-EDTA (TBE) 緩衝液にて34W定電圧で泳動した.

Table 1. Oligonucleotide primers used for the analyses of the p53, mdm2, INK4a/ARF, DR and APRT genes

Gene	Sense primer sequences	Antisense primer sequences	Product size (bp)
p53 ex5a	5'-TCAACTCTGTCTCCTTCCTC-3'	5'-CTGTGACTGCTGTAGATGG-3'	155
p53 ex5b	5'-GTGGGTTGATCCACACCCC-3'	5'-AACCAGCCCTGTCGTCTCTC-3'	162
p53 ex6	5'-AGGCCTCTGATTCCTCACTG-3'	5'-AGAGACCCCAAGTTGCAAACC-3'	168
p53 ex7	5'-GGGCCTCATCTGGGCCTGTG-3'	5'-AGAGGCTGGGGCACAGCAGGCCAGTG-3'	191
p53 ex8	5'-AAATGGGACAGGTAGGACCTG-3'	5'-ACCGCTTCTGTCTCTGCTTG-3'	225
mdm2	5'-GAGGGCTTTGATGTTCTCTGA-3'	5'-GCTACTAGAAGTTGATGGC-3'	143
INK4a/ARF ex1 α	5'-GGGAGCAGCATGGAGCCG-3'	5'-AGTCGCCCCCATCCCCCT-3'	204
INK4a/ARF ex2A	5'-AGCTTCCTTTCCGTCAATGC-3'	5'-GCAGCACACCAGCGTG-3'	204
INK4a/ARF ex2B	5'-AGCCCAACTGCGCCGAC-3'	5'-CCAGGTCCACGGGCAGA-3'	147
INK4a/ARF ex2C	5'-TGGACGTGCGCGATGC-3'	5'-GGAAGCTCTCAGGGTACAAATTC-3'	189
INK4a/ARF ex3	5'-CCGGTAGGGACGGCAAGAGA-3'	5'-CTGTAGGACCCTCGGTGACTGATGA-3'	169
INK4a/ARF ex1 β A	5'-TCCCAGTCTGCAGTTAAGGG-3'	5'-ACCACGAAAACCCTCACTCG-3'	174
INK4a/ARF ex1 β B	5'-TGCGCAGGTTCTGGTGACC-3'	5'-GACTTTTCGAGGGCCTTTCC-3'	212
DR	5'-CCACTGAATCTGTCTGTTATG-3'	5'-GTGTGGCATAGTAGTTGTAGTGG-3'	113
APRT	5'-CAGGGAACACATTCCTTTGC-3'	5'-TGGGAAAGCTGTTTACTGCG-5'	134

mdm2, murine double minute 2; INK4a/ARF, inhibitor of cyclin dependent kinase 4a/alternative reading frame; DR, dopamine receptor; APRT, adenine phosphoribosyl transferase; ex, exon.

Table 2. Conditions for differential PCR

Gene	Denaturation [Temperature ($^{\circ}$ C) /Duration (sec)]	Annealing [Temperature ($^{\circ}$ C) /Duration (sec)]	Extension [Temperature ($^{\circ}$ C) /Duration (sec)]	Cycle
mdm2 and DR	94/30	57/40	72/40	25
INK4a/ARF ex2A and APRT	94/30	56/40	72/40	28

DR, dopamine receptor; ex, exon; APRT, adenine phosphoribosyl transferase.

mdm2 遺伝子増幅の判定は、DNA 定量ソフト (Allelinks version 1.0, Pharmacia Biotech, Milwaukee, USA) を用いた。mdm2 遺伝子および DR 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。健常人の DNA を対照として mdm2 遺伝子と DR 遺伝子の PCR 増幅産物量の比 (mdm2/DR) の平均値 ($\bar{x} = 0.97$) および標準偏差 ($SD = 0.22$) を求め、 $\bar{x} + 4SD$ 以上を遺伝子増幅ありとした。

同様に、INK4a/ARF 遺伝子欠失の判定は、INK4a/ARF 遺伝子エクソン 2 と APRT 遺伝子の PCR 増幅産物量の比 (エクソン 2/APRT) の平均値 ($\bar{x} = 0.99$) および標準偏差 ($SD = 0.18$) を求め、 $\bar{x} - 4SD$ 以下を遺伝子に相対的欠失ありとした。また、遺伝子の相対的欠失の陽性コントロールには、グリオーマ培養細胞系列 U251 を用いた。

4. 蛍光 SSCP-PCR 法³⁵⁾³⁸⁾

1 本鎖の DNA はその塩基配列に従って独自の立体構造をとる。このため、1 塩基でも異なるものがあれば、たとえ同じ長さの DNA 断片であっても、非変性ゲルで電気泳動を行うと異なる泳動度を示す。この原理を利用して p53 遺伝子および INK4a/ARF 遺伝子に多型性があるかどうかを検討した。各プライマーセットはセンスプライマー、アンチセンスプライマーともに蛍光色素で標識した。

PCR 反応には、抽出した染色体 DNA のうち 2ng を 1 回の反応の鋳型として用いた。反応液は終濃度が 5pmol のプライマー 1 セット、200 μ 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 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division), PCR 反応緩衝液 [終濃度 10mM Tris-HCl (pH8.3), 50mM KCl, 0.01%ゼラチン] (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division) および p53 エクソン 5, エクソン 7 および エクソン 8 の場合は終濃度 1.25mM の MgCl₂, p53 エクソン 6 と INK4a/ARF 遺伝子の場合は終濃度 1.5mM の MgCl₂ に、滅菌蒸留水を加え全量 10 μ l に調整した。また、INK4a/ARF 遺伝子の PCR に対しては、終濃度 10% ジメチルスルホキシド [dimethyl sulfoxide, DMSO (和光純薬)] を加えた。これに 15 μ l のミネラルオイル (Perkin-Elmer Applied

Biosystems Division) を重層させ、核酸増幅装置タカラサーマルサイクラー 480 (宝酒造) で PCR 反応を行った。94 $^{\circ}$ C で 3 分間の熱変性後、各プライマーのアニーリング温度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。表 3 に各プライマーのサイクル条件とサイクル数を一覧にして示す。PCR 反応後、増幅産物を反応停止液 (amersham pharmacia biotech) に希釈し、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、オートシーケンサー (ALFred DNA Sequencer, Pharmacia Biotech) にて解析した。シーケンスゲルは、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 16 $^{\circ}$ C の定温にし、1 \times TBE 緩衝液にて 40W 定電圧で泳動した。

5. PCR 直接シーケンス法による塩基配列の決定³⁹⁾⁴⁰⁾

PCR 法により増幅した DNA 断片のうち、蛍光 1 本鎖 DNA 高次構造多型 PCR 法で異なる泳動度を示した症例対し、PCR 直接シーケンス法による塩基配列の決定を行った。DNA サイクルシーケンスキット (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) を用いてシーケンス反応を行い、DNA シーケンサー 373 (Perkin-Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) にて解析した。シーケンスプライマーには各 PCR プライマーをそのまま使用し、鋳型には反応後の PCR 反応液より、マイクロコン-100 (宝酒造, 東京) にて過剰なプライマーや塩を除去したものを使用した。反応は核酸増幅装置タカラサーマルサイクラー 480 (宝酒造) を使用し、95 $^{\circ}$ C で 3 分間の熱変性後、変性 95 $^{\circ}$ C 30 秒、アニーリング 50 $^{\circ}$ 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。反応後はフェノール/クロロホルム抽出にて過剰なプライマー、蛍光色素を除去し、エタノール沈殿にて反応産物を回収した。シーケンシングゲルは LongRanger (AT Biochem, 東洋紡績, 東京) を用い 1 \times TBE 緩衝液にて 40W 定電圧で泳動した。

Table 3. Conditions for SSCP-PCR

Gene	Denaturation [Temperature ($^{\circ}$ C) /Duration (sec)]	Annealing [Temperature ($^{\circ}$ C) /Duration (sec)]	Extension [Temperature ($^{\circ}$ C) /Duration (sec)]	Cycle
p53 ex5a	94/30	61/40	72/40	35
p53 ex5b	94/30	63/40	72/40	35
p53 ex6	94/30	61/40	72/40	35
p53 ex7	94/30	61/40	72/40	35
p53 ex8	94/30	61/40	72/40	35
INK4a/ARF ex1 α	94/30	60/40	72/40	40
INK4a/ARF ex2A	94/30	56/40	72/40	40
INK4a/ARF ex2B	94/30	60/40	72/40	40
INK4a/ARF ex2C	94/30	52/40	72/40	40
INK4a/ARF ex3	94/30	58/40	72/40	40
INK4a/ARF ex1 β A	94/40	58/55	72/55	40
INK4a/ARF ex1 β B	94/40	56/55	72/55	40

SSCP, single strand conformation polymorphism; sec, second; ex, exon.

IV. 統計学的検討

統計学的検討は、胚細胞腫 (pure germinomas, PG) 群と胚細胞腫以外の胚細胞性腫瘍 (non-germinomatous germ cell

tumors, NGGCT) 群に分け、両者の比較検討を行った。2群間の比較はフィッシャー法 (Fisher's exact probability test) の検定を行い、5%未満を有意差ありとした。

Table 4. p53 expression and gene status, mdm2 expression and gene amplification, and INK4a/ARF locus alterations in intracranial germ cell tumors

Tumor type	Case ID	Age/Sex/Site	Diag.	p53 IHC [Pab1801/DO7]	p53 gene status	mdm2 IHC [IF2]	mdm2 gene amp. [mdm2/DR]	INK4a/ARF locus alteration
PG	2665	16/M/P	PG	-/+	WT	-	0.58	HD
	2832	16/F/S	PG	-/+	WT	+	0.22	HD
	2853	21/M/S	PG	-/-	WT	+	0.39	HD
	2962	16/M/P	PG	-/-	WT	-	0.14	HD
	2985	20/M/P	PG	-/-	WT	+	1.14	HD
	3241	19/M/P	PG	-/+	WT	+	4.35*	WT
	3408	60/M/P	PG	-/+	WT	+	1.32	HD
	3437	18/M/P	PG	+/+	WT	+	2.48*	HD
	3477	19/M/P	PG	-/+	WT	-	0.02	HD
	3573	7/M/P	PG	-/+	WT	+	2.63*	HD
NGGCT	3516	11/M/P	MT	NE	WT	NE	1.53	HD
	3378	15/M/P	MT	-/+	WT	+	0.21	WT
	2626	25/M/P	MT	-/+	WT	+	0.81	HD
	2633	15/M/P	MT	-/-	WT	+	0.34	WT
	2630	4/M/P	IT	-/+	WT	+	0.08	WT
	3384	5/M/P	IT	-/+	WT	-	0.29	HD
	3413	14/M/P	IT	+/+	exon5 c451(C->T)P1515	+	1.01	HD WT
	2577	10/F/P	YS	-/+	WT	+	0.78	HD
	3475	18/M/P	YS	-/+	WT	+	1.55	INK4a: c226insT/D76x ARF: c293insT/R 98fs->160x
	2591	12/M/S	CH	-/-	WT	+	0.83	HD
	3234	7/M/P	CH	-/+	WT	+	0.67	WT

PG, pure germinomas; NGGCT, non-germinomatous germ cell tumors; mdm2, murine double minute2; INK4a, inhibitor of cyclin dependent kinase 4a; ARF, alternative reading frame; Diag., diagnosis; amp., amplification; P, pineal region; S, suprasellar region; PG, pure germinoma; MT, mature teratoma; IT, immature teratoma; YS, yolk sac tumor; CH, choriocarcinoma; NE, not examined; -, immunonegative; +, immunopositive; DR, dopamine receptor; WT, wild type; HD, homozygous deletion. *Case of mdm2 gene amplification.

Table 5. Summary of p53 expression and gene status, mdm2 expression and gene amplification, and INK4a/ARF locus alterations frequencies in 21 intracranial germ cell tumors

Tumor type	p53 IHC [Pab1801(%) / DO7(%)]	p53 mutation(%)	mdm2 IHC [IF2(%)]	mdm2 gene amplification(%)	INK4a/ARF locus alteration(%)
ICGT (n=21)	10/75	4.8	80	14.3	71.4
PG (n=10)	10/70	0	70	30.0	90.0
NGGCT (n=11)	10/80	9.1	90	0	54.5

ICGT, intracranial germ cell tumors; PG, pure germinomas; NGGCT, non-germinomatous germ cell tumors.

成 績

表4, 表5に全症例の免疫組織化学, p53 遺伝子変異, mdm2 遺伝子増幅およびINK4a/ARF 遺伝子異常の解析結果を示す。

I. 免疫組織化学

正常コントロールとしてp53 蛋白は, 肺癌の頭蓋内転移巣の腫瘍細胞核に, mdm2 蛋白は, 軟部組織肉腫の腫瘍細胞核に陽性反応を認めた。ICGTにおいて腫瘍細胞核にp53 蛋白の発現が認められ, Pab1801 抗体では20例中2例(10%) (胚細胞腫1例, 未熟奇形腫1例)に陽性反応が認められ, DO7では20例中15例(75%) (胚細胞腫7例, 奇形腫2例, 未熟奇形腫3例, 卵黄囊腫瘍2例, 絨毛癌1例)に陽性反応が認められた。Pab1801 抗体に陽性を示した2例は, DO7 抗体においても陽性を示した。一方, mdm2 蛋白の発現は, 同様に腫瘍細胞核に認められ, 20例中16例(80%) (胚細胞腫7例, 成熟奇形腫3例, 未熟奇形腫2例, 卵黄囊腫瘍2例, 絨毛癌2例)に陽性反応が認められた。図2に抗p53 抗体および抗mdm2 抗体に陽性反応を示した代表例の組織像を示す。ICGTにおいてp53 蛋白およびmdm2 蛋白は高頻度に発現しており, p53 蛋白およびmdm2 蛋

白両者の発現が, 20例中12例に認められたが, p53 蛋白の発現とmdm2 蛋白の発現に統計学的相関関係は認められなかった。成熟奇形腫の1例で標本が極微量のために, 免疫組織化学的検討を加えることができなかった。

II. p53 遺伝子変異の検出

ICGT 21例に蛍光SSCP-PCR法を用いてp53 遺伝子の変異を解析した。ICGT 21例のうち, 抗p53 抗体のPab1801とDO7の両者に陽性反応を示した未熟奇形腫の1例(4.8%)のみ, エクソン5に異常バンドのピークが認められた。同症例に直接シー

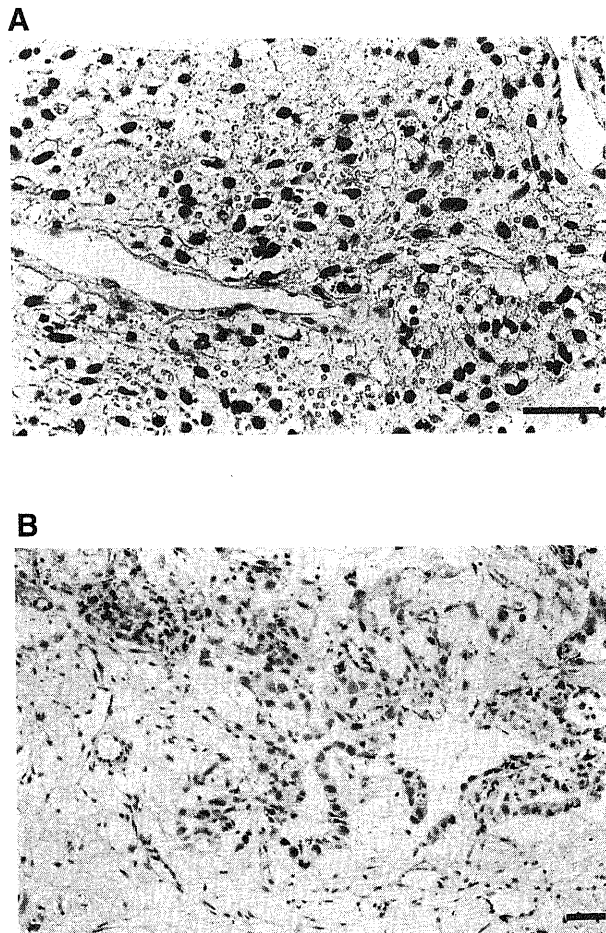


Fig. 2. Representative cases of immunoreactivity against anti-p53 and anti-mdm2 antibodies. (A) Immunostaining of p53 (DO7) in a pure germinoma (case 2665). (B) Immunostaining of mdm2 with IF2 in a yolk sac tumor (case 3475). Immunoreactivity is restricted to the nuclei of the tumor cells in both cases. The scale bars at the bottom indicate 20 μm.

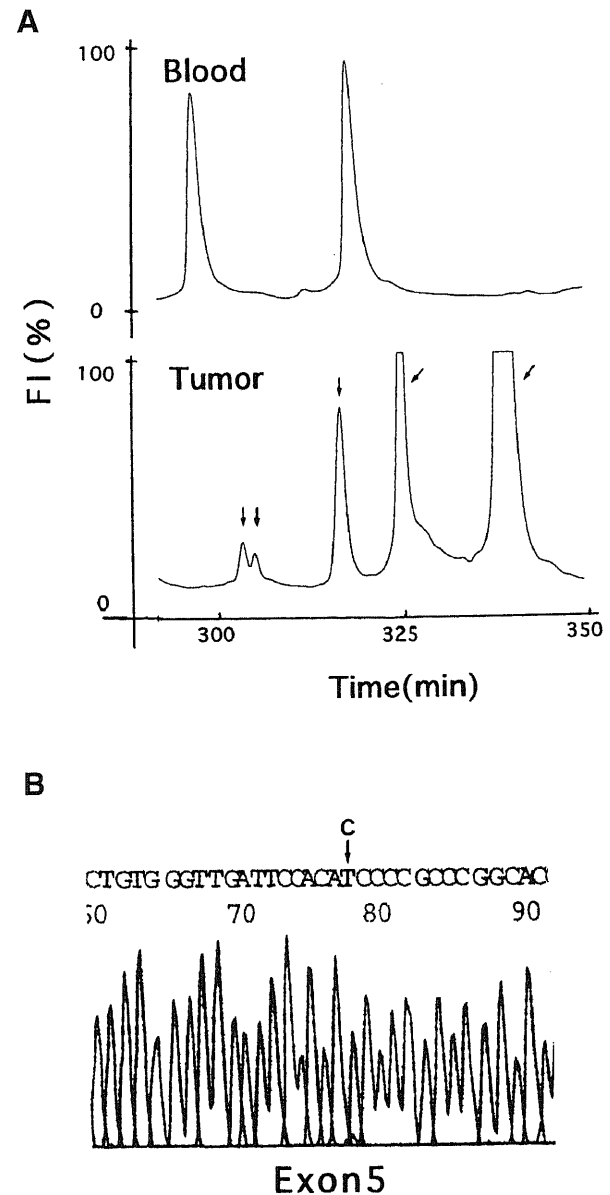


Fig. 3. A case carrying p53 mutation (case 3413, immature teratoma). (A) Fluorescence-based single strand conformation polymorphism both from the same patient shows a different mobility shift (arrows) in exon5 in the tumor as compared with blood. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%). (B) The sequencing analysis of the tumor DNA reveals a one-base substitution from C to T.

クエンス法により遺伝子変異配列を決定した。対照の血液と比較した異常バンドのピークとp53エクソン5の直接シークエンスの解析結果を図3に示した。p53蛋白の151番目のプロリン (proline, Pro) をコードするCCCがセリン (serine, Ser) をコードするTCCへと変異していた。

Ⅲ. mdm2遺伝子増幅の検出

弁別的PCR法を用いてmdm2遺伝子増幅を解析した。ICGT 21例のうち、抗mdm2抗体に陽性反応を示した16例中3例 (14.3%) [胚細胞腫3例] にmdm2/DR値の高値 (症例3241; 4.35, 症例3437; 2.48, 症例3537; 2.63) を示し、この3例にmdm2遺伝子増幅を認めた。遺伝子増幅の解析結果の代表例を図4に示した。抗mdm2抗体に陰性反応を示した4例中にmdm2遺伝子増幅は認められなかった。また、mdm2遺伝子増幅を認めた3例は全例抗p53抗体 (DO7) に陽性反応を示した。しかし、mdm2遺伝子増幅とp53蛋白の発現に統計学的相関関係は認められなかった。mdm2蛋白の発現が認められた症例の一部にmdm2遺伝子増幅を認めた。

Ⅳ. INK4a/ARF遺伝子異常の検出

弁別的PCR法および蛍光SSCP-PCR法を用いてINK4a/ARF遺伝子異常を解析した。弁別的PCR法において、ICGT 21例中14例 (67.7%) [胚細胞腫9例, 成熟奇形腫1例, 未熟奇形腫

2例, 卵黄嚢腫瘍1例, 絨毛癌1例] に相同的欠失が認められた。相同的欠失の解析結果を図5に示した。また蛍光SSCP-PCR法において、卵黄嚢腫瘍1例 (4.8%) でエクソン2に異常バンドのピークが認められた。同症例において直接シークエンス法により遺伝子変異配列を決定した。対照の血液と比較した異常バンドのピークとINK4a/ARF遺伝子エクソン2の直接シークエンスの解析結果を図6に示した。1塩基Tの挿入が認められ、INK4a蛋白の76番目のアスパラギン酸 (asparaginic acid, Asp) をコードするGACがストップコドンにコードするTGAへと変異していた。さらに、ARF蛋白の98番目のアルギニン (arginine, Arg) をコードするCGAがフレームシフトし、ロイシン (leucine, Leu) をコードするCTGへと変異し、98番目から全く異なるアミノ酸配列に変化し、本来132個のアミノ酸からなる蛋白が、160番目にストップコドンにコードするTAGを有するものへと変異していた。

INK4a/ARF遺伝子異常に関し、PG群では10例中9例 (90%) に遺伝子欠失が認められ、NGGCT群では11例中6例 (54.5%) に遺伝子欠失または変異が認められた。両群におけるINK4a/ARF遺伝子異常の比較において統計学的有意差は認められなかった ($p=0.09$)。しかし、PG群の方がNGGCT群よりINK4a/ARF遺伝子異常の頻度が高い傾向にあった。

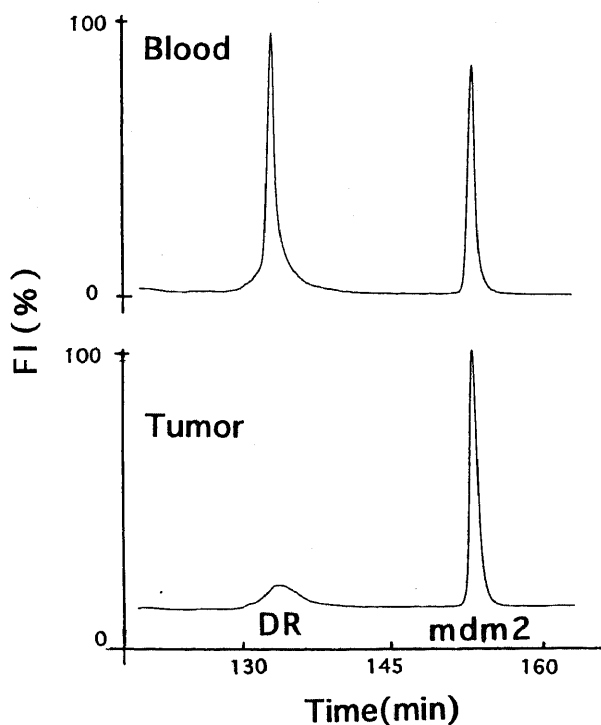


Fig. 4. A representative case carrying mdm2 gene amplification (case 3241, pure germinoma, mdm2/DR=4.35). Note the data from blood (upper panel) and tumor (lower panel) were obtained from respective samples of the same patient that were diluted in different volumes. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%).

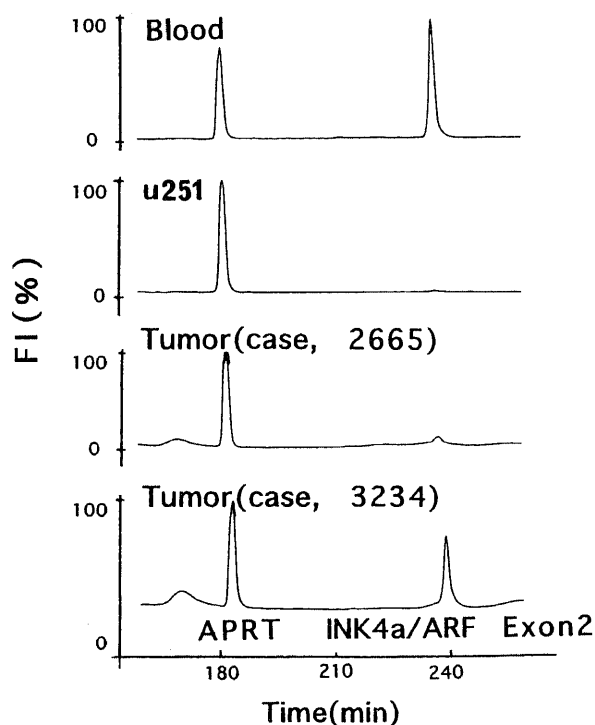


Fig. 5. Differential PCR-analysis for homozygous deletions of the INK4a/ARF genes. Representative case with (case 2665, pure germinoma) or without (case 3234, choriocarcinoma) the INK4a/ARF genes homozygous deletions with blood as negative control and u251 glioma cell line of positive control. Note the data from blood, glioma cell line u251 and two tumors were obtained from respective samples that were diluted in different volumes. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%).

考 察

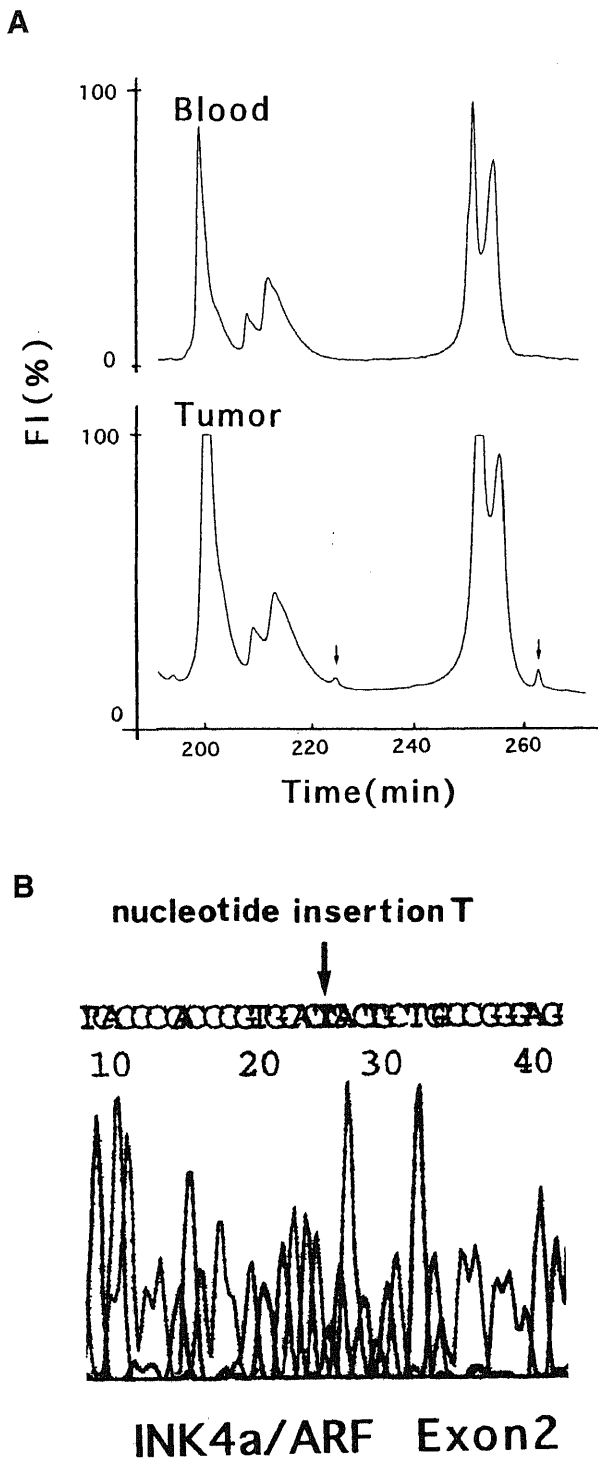


Fig. 6. A case carrying INK4a/ARF exon2 mutation (case 3475, yolk sac tumor). (A) Fluorescence-based single strand conformation polymorphism both from the same patient showed a different mobility shift (arrows) in INK4a/ARF exon2 in the tumor as compared with blood. The horizontal axis shows electrophoretic time (min). The vertical axis shows fluorescent intensity (FI) (%). (B) The sequencing analysis of the tumor DNA revealed a one-base nucleotide insertion T.

ICGTは組織学的にその特徴から5型(胚細胞腫, 奇形腫, 卵黄嚢腫瘍, 胎児性癌, 絨毛癌)に分類されている⁷⁹⁾。またその組織由来は原始生殖細胞から分化すると考えられており, 精巣胚細胞性腫瘍 (testicular germ cell tumors, TGT) と同じ起源であると推測されている^{43)~45)}。Nakagawaら⁴⁶⁾は, 免疫組織化学的研究においてICGTは, 組織学的所見からTGTと区別することは難しいと報告している。

近年, Fleischhackerら⁴⁷⁾やRiouら⁴⁸⁾やGuillouら⁴⁹⁾は, TGTにおけるp53およびmdm2の分子生物学的異常を報告した。それらは, p53蛋白の発現頻度は高いがp53遺伝子変異は稀であり, mdm2の遺伝子増幅を伴う場合も含めmdm2蛋白の発現頻度が高い傾向にあると述べている。

一般的に多くの腫瘍の病態に, p53蛋白の不活性化が重要な役割を担っているが, ほとんどのタイプの腫瘍では, その原因はp53遺伝子の異常であることが報告されている⁵⁰⁾。p53蛋白の不活性化の他の原因として野生型p53蛋白に対するmdm2蛋白, ヒトパピローマウイルスE6蛋白, アデノウイルスE1B蛋白などの作用による場合が確認されている⁵⁰⁾。その中でもとくに, mdm2蛋白は野生型p53蛋白に対しユビキチンリガーゼとして働き, 野生型p53蛋白と結合し速やかにそれを分解することで不活性化する⁵¹⁾⁵²⁾。さらにmdm2蛋白は, 野生型p53蛋白を転写活性化因子として有しており, p53とmdm2の間に自己調節フィードバックループを形成している^{53)~56)}。Momandら⁵⁷⁾は, 肺癌や乳癌など代表的な悪性腫瘍は, p53遺伝子変異(30.0-70.0%)よりもmdm2遺伝子増幅(0-6.0%)の頻度が低いが, TGTおよび軟部組織腫瘍はp53遺伝子変異(0-14.0%)よりもmdm2遺伝子増幅(10.0-33.0%)の頻度が高いという特徴的な性格を有すると報告している。

本研究において, ICGT 21例中p53遺伝子変異が1例(4.8%), mdm2遺伝子増幅が3例(14.3%)に認められた(表5)。p53遺伝子変異よりもmdm2遺伝子増幅の頻度が高いという結果は, 上述した如く多くの腫瘍組織型のなかでも特異的であり, Riouら⁴⁸⁾やGuillouら⁴⁹⁾がTGTのp53遺伝子変異は0-4%⁴⁸⁾⁴⁹⁾, mdm2遺伝子増幅は12%⁴⁸⁾と報告している点と類似していた。さらに免疫組織化学的検討の結果, ICGTはp53とmdm2の発現頻度[抗p53抗体(Pab1801)で10%, 抗p53抗体(DO7)で75%, 抗mdm2抗体(IF2)で80%]に関してもTGTのそれら[抗p53抗体(Pab1801)で35%⁴⁹⁾, 抗p53抗体(DO7)で67%⁴⁸⁾, 抗mdm2抗体(IF2)で73%⁴⁹⁾]と類似の傾向を示していた。これらの結果はICGTとTGTが同一の組織由来であるという仮説^{43)~45)}を支持するものと考えられた。

これまでに, ICGTにおけるp53の遺伝子異常に関し, Fengら⁵⁸⁾やNozakiら⁵⁹⁾が次のように報告している。Fengら⁵⁸⁾は, p53遺伝子変異が33%と高頻度に認めると報告している。この報告の中の症例の多くは放射線治療後の抽出サンプルでの, p53遺伝子変異であり, 放射線治療後に遺伝子の損傷が加わった結果をとらえている可能性を否定できない。Nozakiら⁵⁹⁾は, ICGTにp53遺伝子変異は認めておらず, この点では本研究結果と合致する。また, いずれの報告もmdm2蛋白の発現やmdm2遺伝子増幅に関して検索されておらず, その点で本研究とは比較不能であった。

多くの腫瘍組織型の免疫組織化学的検索において, 細胞内で

変異型p53蛋白の蓄積が報告されている。これは、変異型p53蛋白が野生型に比べより安定した状態であるためである⁶⁰⁾⁶¹⁾。しかし、TGTを含むいくつかの腫瘍組織型においては不安定な野生型p53蛋白の発現を高頻度に認めている^{47)~49)62)~65)}。本研究においてもp53遺伝子変異は4.8%と稀であったが、p53蛋白の発現は、Pab1801(抗p53抗体)で10%、DO7(抗p53抗体)で75%と遺伝子変異に比べて高頻度であった。このことよりICGTにおいても野生型p53蛋白の発現が主であると考えられた。2種類の抗体による陽性率の相違の理由は、Riouら⁴⁸⁾やGuillouら⁴⁹⁾やSerthら⁶⁰⁾が述べているように、2つの抗p53抗体の感受性の違いによるものと考えられた。

一方、mdm2蛋白は、mdm2遺伝子増幅を認めた3例(14.8%)を含め、ICGTの80%に発現していた。Keletiら⁶⁷⁾は、横紋筋肉腫細胞系列において、mdm2蛋白の発現は野生型p53蛋白の蓄積により自己調節フィードバックループが働いたことによると報告している。本研究における免疫組織化学の結果は、p53とmdm2の間の自己調節フィードバックループの働きによりp53蛋白とmdm2蛋白の両者の発現をみたものと考えられる。しかしながら、4例(20%)でmdm2蛋白の発現を認めるが、p53蛋白の発現を認めず、3例(15%)でmdm2蛋白の発現を認めないが、p53蛋白の発現を認める症例があった(表4)。mdm2蛋白は、p53蛋白に対しユビキチンリガーゼとして機能し、野生型p53蛋白はmdm2蛋白により速やかに分解される⁵¹⁾⁵²⁾という最近の報告から前者の4例については説明できる。しかし、後者の3例については、p53蛋白とmdm2蛋白の相互関係の機序では説明困難であり、両因子の相互関係における未知の作用機序の存在が考えられる。

以上よりICGTにおいては、p53蛋白とmdm2蛋白の相互関係の生理的バランスの崩壊が示唆され、そのことがp53蛋白を中心とする腫瘍抑制の機序に悪影響を及ぼしていると考えられる。

INK4a/ARF遺伝子座は2つのプロモーター領域を持ち、全く異なる2つの蛋白(p16^{INK4a}蛋白、p14^{ARF}蛋白)をコードすることが報告されている²²⁾²³⁾²⁹⁾。p16^{INK4a}蛋白は、サイクリン依存性キナーゼの機能を阻害することでpRBのリン酸化を抑制し細胞周期をG1期で停止させ^{19)~21)}、p14^{ARF}蛋白は、p53蛋白の分解に関与するmdm2蛋白の機能を阻害することで、p53蛋白の働きを安定化する役割を担っている^{23)~26)}。肺癌、メラノーマおよび神経膠芽腫などにおいてこのINK4a/ARF遺伝子座の遺伝子異常が高頻度(43~86%)に存在し、その多くが相同的欠失であることが報告されている¹⁵⁾¹⁶⁾。Kamijoら²⁸⁾⁶⁸⁾は、p14^{ARF}蛋白の腫瘍抑制機能は野生型p53が存在することが必要条件であり、さらに、ARF遺伝子ノックアウトマウスでは中枢神経系に腫瘍(神経膠腫、神経鞘腫、髄膜腫)が発生しやすい傾向にあると報告している。

本研究において、ICGTの21例中15例(71.4%) (PG 10例中9例、NGGCT 11例中6例)でINK4a/ARF遺伝子異常が認められた。その内訳は、PGの10例中9例(90%)、NGGCTの11例中5例(45.5%)で遺伝子の相同的欠失、NGGCTの11例中1例(9.1%)で1塩基挿入の遺伝子変異であった。

Miyakoshiら⁶⁹⁾は、INK4a遺伝子が欠失しているマウスの線維芽細胞に遺伝子導入しp16^{INK4a}蛋白を強制発現させると、放射線に対する感受性が増強すると報告している。この報告は、ICGTにおいては、INK4a/ARF遺伝子異常を高頻度に認めるPGの方が、NGGCTより放射線療法または化学療法に良好に反

応するという事実と反するものである。しかし、一方、Tadaら⁷⁰⁾は、悪性脳腫瘍においては、変異型p53蛋白を有する方が、放射線療法に対しての感受性が高いと報告している。本研究において、PGでは高頻度にINK4a/ARF遺伝子異常を認めるということは、それに引き続く野生型p53蛋白の速やかな失活を意味し、この点において、Tadaらの報告と一致すると考えられる。以上より、PGにおける高い放射線感受性の原因のひとつの解釈として、PGにおいては、p14^{ARF}蛋白からp53蛋白に至る腫瘍抑制経路の異常が放射線感受性に関しては優位に働いているものと考えられた。

ICGTは、p53とmdm2の発現、p53遺伝子異常、mdm2遺伝子増幅の頻度に関しTGTと極めて類似⁴⁸⁾⁴⁹⁾しており、その結果は両者の同一組織由来に関する説^{43)~45)}を支持するものである。しかし、INK4a/ARF遺伝子異常に関しては、TGTはICGTと異なり遺伝子の相同的欠失や遺伝子変異は稀(0~5%)である^{71)~73)}。この結果と、ARFノックアウトマウスでは中枢神経系に腫瘍(神経膠腫、神経鞘腫、髄膜腫)が発生しやすい傾向にある⁶⁸⁾という報告から考えて、INK4a/ARF遺伝子異常が胚細胞性腫瘍における発生部位に影響を与えている可能性が考えられた。

p14^{ARF}蛋白からp53蛋白に至る腫瘍抑制経路に関わる蛋白の遺伝子異常はPGで10例中10例(INK4a/ARF遺伝子異常、9例；mdm2遺伝子増幅、3例)、NGGCTで11例中7例(INK4a/ARF遺伝子座の異常、6例；p53遺伝子異常1例)に認められた(表4)。

また、遺伝子異常を認めなかった4例中3例は、免疫組織化学法にてmdm2蛋白の発現を認め、蛋白レベルでの異常を含めると21例中20例(95.2%)にこの経路に何らかの異常を認めることになる。このことより、ICGTの発生に関しては、p14^{ARF}-mdm2-p53経路の異常が、重要な役割を担っていることが示唆された。

結 論

ICGT21例(胚細胞腫10例、奇形腫7例、卵黄囊腫瘍2例、絨毛癌2例)におけるp53遺伝子異常、mdm2遺伝子増幅、p53およびmdm2の発現、INK4a/ARF遺伝子異常を免疫組織化学法、弁別的PCR法、蛍光SSCP-PCR法、直接シーケンス法にて検討し、以下の結論を得た。

1. ICGTにおいてp53蛋白およびmdm2蛋白の発現を高頻度に認めた。p53遺伝子変異は極めて稀であり、mdm2遺伝子増幅よりも頻度が低かった。
2. ICGTにおいてINK4a/ARF遺伝子異常を高頻度(15/21, 71.4%)に認めた。また、INK4a/ARF遺伝子異常は、NGGCT群よりPG群の方が高頻度であった(p=0.09)。
3. ICGTにおいてp14^{ARF}蛋白からp53蛋白に至る腫瘍抑制経路に関与する蛋白をコードする遺伝子(INK4a/ARF遺伝子、mdm2遺伝子、p53遺伝子)の異常が、極めて高頻度(17/21, 80.9%)に認められた。

以上の結果より、ICGTの組織由来は、TGTと同一であることが示唆された。またp14^{ARF}蛋白からp53蛋白に至る腫瘍抑制経路の相互関係の生理的バランスの崩壊が腫瘍化に関与している可能性が示された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導と御校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、ならびに東馬康郎助手、病理標本作成に御協力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、厚生省がん研究助成金(松谷班)により助成された。

本論文の要旨は第7回日本脳腫瘍カンファレンス(1998, 金沢), 第17回日本脳腫瘍病理学会(1999, 前橋)ならびに第58回日本脳神経外科学会総会(1999, 東京)において発表した。

文 献

- 1) Araki C, Matsumoto S. Statistical reevaluation of pinealoma and related tumors in Japan. *J Neurosurg* 30: 146-149, 1969
- 2) Jellings K. Primary intracranial germ cell tumors. *Acta Neuropathol (Berl)* 25: 291-306, 1973
- 3) Jennings MT, Gelman R, Hochberg F. Intracranial germ cell tumors: natural history and pathogenesis. *J Neurosurg* 63: 155-167, 1985
- 4) Koide O, Watanabe Y, Sato K. A pathogenic survey of intracranial germinoma and pinealoma in Japan. *Cancer* 45: 2119-2130, 1980
- 5) Sato K. Pinealoma in children. *Childs Brain* 2: 67-72, 1976
- 6) Yamashita J, Handa H. Diagnosis and treatment of pineal tumors: Kyoto University experience (1941-1984). *Acta Neurochir (Wien)* 42: 137-141, 1988
- 7) Hoffman H, Otsubo H, Humphreys R, Drake J, Becker L, Greenberg M, Jenkin D. Intracranial germ-cell tumors in children. *J Neurosurg* 74: 545-551, 1991
- 8) Kazuhiro N. Special report of brain tumor registry of Japan (1969-1993). Report of Brain Tumor Statistics in Japan, 10th ed, p5, The Committee of Brain Tumpr Registry of Japan, Tokyo, 2000
- 9) Bjornsson J, Scheithauer BW, Okazaki H, Leech RW. Intracranial germ cell tumor: Pathobiological and immunohistochemical aspects of 70 cases. *J Neuropathol Exp Neurol* 44: 32-46, 1985
- 10) Brodeur G, Howarth C, Pratt C. Malignant germ cell tumors in 57 children and adolescents. *Cancer* 48: 1890-1898, 1981
- 11) Kasten MB, Onyekewre O, Sidransky D, Vogelstein B, Craig W. Participation of p53 protein in the cellular response to DNA damage. *Cancer Res* 51: 6304-6311, 1991
- 12) Mercer WE, Shields MT, Amin M, Sauve GJ, Appella E, Romano JW, Ullrich SJ. Negative growth regulation in a glioblastoma tumor cell line that conditionally expresses human wild-type p53. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6166-6170, 1990
- 13) Chang F, Syrjanen S, Tervahauta A, Syrjanen K. Tumorigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer* 68: 653-661, 1993
- 14) Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Science* 274: 1672-1677, 1996
- 15) Kamb A, Gruis N, Weaver-Feldhaus J, Liu Q, Harshman K, Tavitigian S, Stocket E, Day III R, Johnson B, Skolnick M. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types. *Science* 264: 436-440, 1994
- 16) Cairns P, Polascik T, Eby Y, Tokino K, Califano J, Merlo A, Mao L, Herath J, Jenkins R, Westra W, Rutter J, Buckler A, Gabrielson E, Tockman M, Cho K, Hedrick L, Bova G, Issacs W, Schwab D, Sidransky D. Frequency of homozygous deletion at p16/CDKN2 in primary human tumours. *Nat Genet* 11: 210-212, 1995
- 17) Dynlacht BD, Flores O, Less JA, Harlow ED. Differential regulation of E2F transactivation by cyclin/cdk2 complexes. *Genes Dev* 8: 1772-1786, 1994
- 18) Takahashi IS, Kitagawa M, Saijo M, Higashi H, Ogino H, Matsumoto H, Taya Y, Nishimura S, Okumura A. The interaction of E2F with pRB and p107 are regulated via the phosphorylation of pRB and p107 by a cyclin-dependent kinase. *Oncogene* 10: 1691-1698, 1995
- 19) Medema R, Herrera R, Lam F, Weinberg R. Growth suppression by p16INK4a requires functional retinoblastoma protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 6289-6293, 1995
- 20) Otterson G, Kratzke R, Coxon A, Kim Y, Kaya F. Absence of p16INK4a protein is restricted to the subset of lung cancer lines that retains wild-type RB. *Oncogene* 9: 3375-3378, 1994
- 21) Sherr C, Roberts J. Inhibitors of mammalian G1 cyclin-dependent kinases. *Genes Dev* 9: 1149-1163, 1995
- 22) Mao L, Merlo A, Bedi G, Shapiro G, Edwards C, Rollins B, Sidransky D. A novel p16INK4a transcript. *Cancer Res* 55: 2995-2997, 1995
- 23) Stone S, Jiang P, Dayananth P, Tavitigian S, Katcher H, Parry D, Peter G, Kamp A. Complex structure and regulation of the p16 (MTS) locus. *Cancer Res* 55: 2988-2994, 1995
- 24) Pomerantz J, Schreiber-Agus N, Liegeois N, Silverman A, Alland L, Chin L, Potes J, Chen K, Orlow I, Lee H, Cordon-Cardo C, DePinho R. The INK4a tumor suppressor gene product, p19ARF, interacts with MDM2 and neutralizes MDM2's inhibition of p53. *Cell* 92: 713-723, 1998
- 25) Honda R, Yasuda H. Association of p19 (ARF) with Mdm2 inhibits ubiquitin ligase activity of Mdm2 for tumor suppressor p53. *EMBO J* 18: 22-27, 1999
- 26) Kamijo T, Weber J, Zambetti G, Zindy F, Roussel M, Sherr C. Functional and physical interactions of the ARF tumor suppressor with p53 and Mdm2. *Proc Natl Acad Sci USA* 95: 8292-8297, 1998
- 27) Stott F, Bates S, James M, McConnell B, Starborg M, Brookes S, Palmero I, Ryan K, Hara E, Vousden K, Peter G. The alternative product from the human CDKN2A locus, p14ARF, participates in a regulatory feedback loop with p53 and MDM2. *EMBO J* 17: 5001-5014, 1998
- 28) Kamijo T, Zindy F, Roussel M, Quelle D, Downing J, Ashmun R, Grosveld G, Sherr C. Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19^{ARF}. *Cell* 91: 649-659, 1997
- 29) Sherr CJ. Tumor surveillance via the ARF-p53 pathway. *Genes Dev* 12: 2984-2991, 1998
- 30) Kleihues P, Burger PC, Scheithauer BW. Histological typing of tumours of the central nervous system. World Health Organization International Histological Classification of Tumours, 2nd ed, p45-47, Springer-Verlag, Berlin, 1993
- 31) Neubauer A, Neubauer B, He M. Analysis of gene

- amplification in archival tissue by differential polymerase chain reaction. *Oncogene* 7: 1019-1025, 1992
- 32) 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
- 33) Biernat W, Kleihues P, Yonekawa Y, Ohgaki H. Amplification and overexpression of MDM2 in primary (de novo) glioblastoma. *J Neuropathol Exp Neurol* 56: 180-185, 1997
- 34) Hunter S, Abbot K, Varma V, Oson J, Barnett D, James C. Reliability of differential PCR for the detection of EGFR and MDM2 gene amplification in DNA extracted from FFPE glioma tissue. *J Neuropathol Exp Neurol* 54: 57-64, 1995
- 35) Sugano K, Nakashima Y, Yamaguchi K, Fukayama N, Maekawa M, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Sensitive detection of loss of heterozygosity in the TP53 gene in pancreatic adenocarcinoma by fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis using blunt-end DNA fragments. *Genes Chromosomes Cancer* 15: 157-164, 1996
- 36) Hayashi Y, Ueki K, Waha A, Wiestler OD, Louis DN, von Deimling A. Association of EGFR gene amplification and CDKN2 (p16/MTS1) gene deletion in glioblastoma multiforme. *Brain Pathol* 7: 871-875, 1997
- 37) Waha A, Rollbrocker B, Wiestler OD, Deimling A von. A polymerase chain reaction-based assay for the rapid detection of gene amplification in human tumors. *Diagn Mol Pathol* 5: 147-150, 1996
- 38) Orita M, Iwahara H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T. Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770, 1989
- 39) Kelly JM. Automated Dye-Terminator DNA Sequencing. In Adams MD, Fields C, Venter C (eds), *Automated DNA Sequencing and Analysis*, 1st ed, p175-181, Academic Press, London, 1994
- 40) Tracy TE, Mulcahy LS. A Simple Method for Direct Automated Sequencing of PCR Fragments. In Elligboe J, Gyllensten UB (eds), *The PCR technique: DNA Sequencing*, 1st ed, p145-152, Eaton Publishing Co, Massachusetts, 1992
- 41) Matsutani M, Sano K, Takakura K, Fujimaki T, Nakamura O, Furuta N, Seto T. Primary intracranial germ cell tumors: a clinical analysis of the 153 histologically verified cases. *J Neurosurg* 86: 446-455, 1997
- 42) Matsutani M, Sano K, Takakura K, Fujimaki T, Nakamura O. Combined treatment with chemotherapy and radiation therapy for intracranial germ cell tumors. *Childs Nerv Syst* 14: 59-62, 1998
- 43) Glenn AO, Barkovich JA. Intracranial germ cell tumors: a comprehensive review of proposed embryologic derivation. *Pediatr Neurosurg* 24: 242-251, 1996
- 44) Friedman NB. Germinoma of the pineal. Its identity with germinoma ("seminoma") of the testis. *Cancer Res* 7: 363-368, 1946
- 45) Takai Y, Pearl GS. Ultrastructural study of intracranial yolk sac tumor: with special reference to the oncologic phylogeny of germ cell tumors. *Cancer* 15: 157-164, 1980
- 46) Nakagawa Y, Perentes E, Ross GW, Ross AN, Rubinstein LJ. Immunohistochemical differences between intracranial germinomas and their gonadal equivalents: an immunoperoxidase study of germ cell tumors with epithelial membrane antigen, cytokeratin, and vimentin. *J Pathol* 156: 67-72, 1988
- 47) Fleischhacker M, Strohmeyer T, Imai Y, Slamon DJ, Koeffler HP. Mutation the p53 gene are not detectable in human testicular tumors. *Mod Pathol* 7: 435-439, 1994
- 48) Riou G, Barrois M, Prost S, Terrier MJ, Theodore C, Levine AJ. The p53 and mdm-2 genes in human testicular germ cell tumors. *Mol Carcinog* 12: 124-131, 1995
- 49) Guillou L, Estreicher A, Chaubert P, Hurlimann J, Kurt A-M, Metthez G, Iggo R, Gray AC, Jichlinski P, Leisinger H-J, Benhattar J. Germ cell tumors of the testis overexpress wild-type p53. *Am J Pathol* 149: 1221-1228, 1996
- 50) Levine A, Perry M, Chang A, Silver A, Dittmer D, Wu M, Welsh D. The 1993 Walter Hubert Lecture: the role of the p53 tumor-suppressor gene in tumorigenesis. *Br J Cancer* 69: 409-416, 1994
- 51) Maki CG, Huibregtse JM, Hwley PM. In vivo ubiquitination and proteasome-mediated degradation of p53. *Cancer Res* 56: 2649-2654, 1996
- 52) Honda R, Tanaka H, Yasuda H. Oncoprotein MDM2 is a ubiquitin ligase E3 for tumor suppressor p53. *FEBS Lett* 420: 25-27, 1997
- 53) Barak Y, Juven T, Haffner R, Oren M. MDM-2 expression is induced by wild-type p53 activity. *EMBO J* 12: 461-468, 1993
- 54) Momand J, Zambetti G, Olson D, George D, Levine A. The mdm2 oncogene product forms a complex with the p53 protein and inhibits p53-mediated transactivation. *Cell* 69: 1237-1245, 1992
- 55) Oliner J, Kinler K, Meltzer P, George D, Vogelstein B. Amplification of a gene encoding a p53-associated protein in human sarcoma. *Nature* 358: 80-83, 1992
- 56) Wu X, Bayle H, Olson D, Levine A. The p53-mdm2 autoregulatory feedback loop. *Genes Dev* 7: 1126-1132, 1993
- 57) Momand J, Jung D, Wilczynski S, Niland J. The MDM2 gene amplification database. *Nucleic Acids Res* 26: 3453-3459, 1998
- 58) Feng X, Zhang S, Ichikawa T, Koga H, Washiyama K, Motoyama T, Kumanishi T. Intracranial germ cell tumors: detection of p53 gene mutation by single-strand conformation polymorphism analysis. *Jpn J Cancer Res* 86: 555-561, 1995
- 59) Nozaki M, Tada M, Matsumoto R, Sawamura Y, Abe H, Iggo RD. Rare occurrence of inactivating p53 gene mutations in primary non-astrocytic tumors of the central nervous systems: reappraisal by yeast functional assay. *Acta Neuropathol* 95: 291-296, 1998
- 60) Iggo R, Gatter K, Bartek J, Lane D. Increased expression of mutant form of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet* 335: 675-679, 1990
- 61) Legros Y, Meyer A, Ory K, Soussi T. Mutation in p53

produce a common conformational effect that can be detected with a panel of monoclonal antibodies directed toward the central part of the protein. *Oncogene* 9: 3689-3694, 1994

62) Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, Merlo G, Chella A, Angeletti C. MDM-2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in absence of p53 gene mutation. *Diagn Mol Pathol* 4: 93-97, 1994

63) Pruneri G, Pignataro L, Carboni N, Luminari S, Capaccio P, Neri A, Buffa R. Mdm-2 oncoprotein overexpression in laryngeal squamous cell carcinoma: association with wild-type p53 accumulation. *Mod Pathol* 10: 785-792, 1997

64) Schenkman N, Sesterhenn I, Washington L, Tong Y, Weghorst C, Buzard G, Srivastava S, Moul J. Increased p53 protein does not correlate to p53 gene mutations in microdissected human testicular germ cell tumors. *J Urol* 154: 617-621, 1995

65) Zhou M, Yeager A, Smith S, Findley H. Overexpression of the MDM-2 gene by childhood lymphoblastic leukemia cells expressing the wild-type p53 gene. *Blood* 85: 1608-1614, 1995

66) Serth J, Kuczyk M, Derendorf L, Jonasson J, Allhoff E, Jonas U. Identification of frequent p53 gene alterations in testicular cancer by in situ molecular genetic and immunohistochemical analysis. *J Urol* 151: 408A, 1994

67) Keleti J, Quezado MM, Abaza MM, Raffeld M, Tsokos M.

The mdm2 oncoprotein is overexpressed in rhabdomyosarcoma cell lines and stabilizes wild-type p53 protein. *Am J Pathol* 149: 143-151, 1996

68) Kamijo T, Bodner S, van de Kamp E, Randle DH, Sherr CJ. Tumor spectrum in ARF-deficient mice. *Cancer Res* 59: 2217-2222, 1999

69) Miyakoshi J, Kitagawa K, Yamagishi N, Ohtsu S, III RD, Takebe H. Increased radiosensitivity of p16-deleted human glioma cells after transfection with wild-type p16 gene. *Jpn J Cancer Res* 88: 34-38, 1997

70) Tada M, Matsumoto R, Iggo RD, Shirato H, Sawamura Y, Shinoh E. Selective sensitivity to radiation of cerebral glioblastomas harboring p53 mutations. *Cancer Res* 58: 1793-1797, 1998

71) Chaubert P, Guillou L, Kurt A, Bertholet M, Mettetz G, Leisinger H, Bosman F, Shaw P. Frequent p16INK4 (MTS1) gene inactivation in testicular germ cell tumors. *Am J Pathol*, 151: 859-865, 1997

72) Hatta Y, Hiramata T, Takeuchi S, Melmed S, Koeffler H. Alterations of p16 (MTS1) gene in testicular, ovarian, and endometrial malignancies. *J Urol* 154: 1954-1957, 1995

73) Axel H, Java PG, Judd WM, Shiv S. Molecular analysis of p16^{ink4}/CDKN2 and p15^{ink4b}/MTS2 genes in primary human testicular germ cell tumors. *J Urol* 159: 1725-1730, 1998

Molecular Genetical Analysis of Cell Cycle Regulators in Intracranial Germ Cell Tumors Masayuki Iwato, Department of Neurosurgery, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Juzen Med Soc.*, 109, 48 — 59 (2000)

Key words intracranial germ cell tumors, p53, mdm2, INK4a/ARF locus, cell cycle regulator

Abstract

Intracranial germ cell tumors (ICGT) are uncommon neoplasms. The histological appearance of an ICGT is indistinguishable from that of the usual testicular germ cell tumor (TGT). Recently, several reports have related molecular abnormalities of p53 and mdm2 in TGT to the malignancy. However, little is known about these molecular abnormalities and the molecular mechanisms responsible for the development of ICGT. We analyzed a series of 21 ICGTs (germinoma 10, teratoma 7, yolk sac tumor 2, choriocarcinoma 2) for p53 and mdm2 gene alterations, protein expression and INK4a/ARF gene alterations. Fifteen (75%) of 20 ICGT reacted with an anti-p53 antibody (DO7), and 1 (4.8%) of 21 ICGTs carried a TP53 gene mutation. Sixteen (80%) of 20 ICGT reacted with an anti-mdm2 antibody (IF2), and 3 (14.3%) of 21 ICGT exhibited mdm2 gene amplification. Fifteen (71.4%) of 21 ICGT displayed INK4a/ARF gene alterations, including 14 homozygous deletions and 1 frameshift mutation. The frequency of the alterations was higher in pure germinomas (9 of 10, 90%) than in non-germinomatous germ cell tumors (6 of 11, 54.5%) ($p=0.09$). Seventeen (80.9%) of 21 ICGT displayed gene alterations in at least one of the three genes, TP53, mdm2 and INK4a/ARF. The low frequency of the TP53 gene mutation compared with the mdm2 gene amplification, and the frequency of expression of p53 and mdm2 proteins, are similar to cases of TGT. It is tempting to speculate that ICGT might have the same cellular origins as TGT with abnormalities in p53 and mdm2, and that abrogation of the ARF-mdm2-p53 pathway could play an important role in the tumorigenesis of ICGT.