マーカー蛋白からみた脳腫瘍

新潟大学脳研究所神経病理　熊　西　敏　郎

Marker proteins in brain tumors

Toshiro KUMANISHI

Dept. of Neuropath., Brain Res. Inst., Niigata Univ.

1.The immunoperoxidase findings of three astrocytic markers, S-100, GFAP and aldolase C, in glioma tissues and in glioma cultures were described and discussed in connection with the grading of glioma differentiation.

2.Marker proteins which are used frequently in brain tumor research were reviewed.

Key words: Marker proteins, Brain tumor, Glioma
マーカー蛋白，脳腫瘍，グリオーマ

I. はじめに

脳には発生母細胞を異にする多種多彩な脳腫瘍が発生する．近年マーカー蛋白の面からの研究が進み，この複雑な脳腫瘍それぞれの特性がしだいに明らかになりつつある．本稿ではまず脳腫瘍の研究，診断に重要と思われるマーカー蛋白を概説し，次に glioma に於けるマーカー蛋白についての著者らの研究結果を紹介する．

II. 各種マーカー蛋白：正常組織および脳神経系腫瘍に於ける分布

1) S-100 蛋白

S-100 蛋白（Mr. 20KD）[1)-3)] はマーカー蛋白のなかではもっとも古くから研究の進められてきたもののひとつで，中枢神経系では glia 細胞に，また末梢神経系では schwann 細胞に主として局在する．S-100 は α 鎖と β 鎖からなる3種の異なった dimer（$\alpha\alpha$, $\alpha\beta$, $\beta\beta$）として存在するが，glia では α, β 両鎖が，schwann 細胞では β 鎖が検出される．脳腫瘍では S-100 は astrocytoma と schwannoma に高率に検出される[4)]．また oligodendroglioma, ependymoma, choroid plexus papilloma, chordoma, chondroma などにも検出可能である[4)]．

2) 中間径線維（IF）蛋白

IF の構成蛋白は glia 細胞では GFAP (glial fibrillary acidic protein, Mr. 約 50KD)，神経細胞では NF (neurofilament protein, Mr. 70, 150, 200KD)，間葉系細胞では vimentin (Mr. 53KD)，上皮細胞では cytokeratin (Mr. 40～70KD)，筋細胞では desmin (Mr. 53KD) とそれぞれ免疫化学的に異なるのでこれらの細胞の重要なマーカーである[5)]．神経系の検索ではこの組織に関連の深い GFAP, NF が最も重要であるが，他の IF 蛋白もしばしば有用なマーカーとなっている．脳腫瘍では GFAP は astrocytoma に高率に検

Reprints requests to: Toshiro KUMANISHI, Dept. of Neuropath., Brain Res. Inst., Niigata Univ.

別刷請求先：〒951 新潟市旭町通1番町 新潟大学脳研究所神経病理　熊西敏郎

出される[4]. ependymoma にもしばしば認められる. NF は neuronal あるいは neuroendocrine 系腫瘍に[4], cytokeratin は choroid plexus papilloma, embryonal carcinoma, yolk sac carcinoma, choriocarcinoma, neuroendocrine tumors, chordoma, craniopharyngioma, epidermoid, pituitary adenoma, metastatic carcinoma などに[4)6)-10)] 検出される. vimentin は schwannoma, meningioma にみられるが上記各種腫瘍にも他の IF 蛋白に随伴してみられることが多い[4].

3) 酵　素

a. NSE (neuron specific enolase, Mr. 約100 KD): NSE[11)12)] は解糖系酵素 enolase の isozyme である. enolase は3種の subunit (α, β, γ) からなる dimer で,そのうち γ 鎖を含む isozyme ($\gamma\gamma$, $\alpha\gamma$) は NSE と呼ばれ, 神経細胞や neuroendocrine 系の細胞にみられる. 脳腫瘍では neuronal あるいは neuroendocrine tumors に検出されるが[4], glioma や schwannoma などにも認められ, がん化状態では必ずしもその呼称の様に neuron-specific ではない.

b. Aldolase C: 解糖系酵素 aldolase (Mr. 約150KD) には A, B, C 3種の isozyme があり, そのうちの aldolase C は神経系に特異性が高い. 正常組織では astrocyte と Purkinje cell に検出される. 脳腫瘍では astrocytoma に検出される[4)13)].

c. PLAP (placental alkaline phosphatase, 糖蛋白, Mr. 140KD): alkaline phosphatase には intestinal, liver-bone-kidney, placental の3種の isozyme がある. このうち PLAP は胎盤の合胞細胞で, 主として細胞膜に一致して, 検出される[14)]. 脳腫瘍では germ cell tumor のうち特に germinoma で高率に検出される[15)].

d. その他: 脳神経系の検索に有用と思われる酵素として TH (tyrosine hydroxylase)[16)], CAT (choline acetyltransferase)[17)], CNP (2′, 3′-cyclic nucleotide-3-phosphohydrolase)[18)19)], HIOMT (hydroxyindole O-methyltransferase)[20)] などもある. TH は catecholaminergic neuron の, CAT は cholinergic neuron の, CNP は oligodendrocyte と schwann 細胞の, HIOMT は松果体細胞のマーカーとなる. しかしいずれも腫瘍での免疫組織学的検索[21)]は未だ少ない.

4) MAG (myelin-associated glycoprotein, 糖蛋白, Mr. 約 100KD)

中枢性および末梢性 myelin の糖蛋白で oligodendrocyte や schwann 細胞に検出される[22)]. リンパ球マーカーである Leu-7 と共通の epitope をもっているので[23)] Leu-7 抗体で検出することもできる. 脳腫瘍では oligodendroglioma, schwannoma, neurofibroma で検出されている[24)25)].

5) synaptophysin (糖蛋白, Mr. 38KD)

神経細胞の presynaptic vesicle や副腎髄質細胞の vesicle にみられる糖蛋白である[26)]. 種々の神経細胞や neuroendocrine 細胞にみられる. 脳腫瘍では neuronal および neuroendocrine tumors, medulloblastoma, pituitary adenoma で検出されている[10)27)28)].

6) EMA (epithelial membrane antigen, 糖蛋白, Mr. 200～500KD)

上皮細胞の膜抗原で主として上皮細胞のマーカーとなる. 脳腫瘍では metastatic carcinoma の他, meningioma, chordoma でも検出される[9)29)].

7) S-antigen (Mr. 50KD)

網膜の光受容細胞に局在する蛋白で光変換に関与すると考えられている. 脳では松果体実質細胞に存在する. 脳腫瘍では retinoblastoma, pineocytoma, pineoblastoma で検出可能である[30)].

8) AFP (α-fetoprotein, Mr. 約 70KD)

AFP は胎生期の yolk sac, 肝, 消化管で主として産生され血中にも出現する胎児性蛋白である[14)]. 生後はしだいに検出されなくなる. 脳腫瘍では germ cell tumor のうち yolk sac carcinoma で検出される[8)15)].

9) 第 VIII 因子関連抗原

血液凝固因子の第Ⅷ因子の構成成分で血管内皮細胞, 骨髄巨核球, 血小板に認められる. 脳腫瘍では小脳 hemangioblastoma や髄膜の血管系腫瘍で検出される[31)].

10) ホルモン

a. HCG (human chorionic gonadotropin, 糖蛋白, Mr. 30～60KD): HCG は妊娠胎盤の主として合胞細胞で合成分泌される[14)]. 脳腫瘍では germ cell tumor 群の choriocarcinoma に検出される[15)].

b. 下垂体前葉ホルモン: GH (Mr. 約 22KD), PRL (Mr. 約22KD), TSH (糖蛋白, Mr. 25～28KD), FSH (糖蛋白, Mr. 約 33KD), LH (糖蛋白, Mr. 約 26KD), ACTH (Mr. 約 4.5KD) などがあり下垂体前葉のそれぞれ異なる腺細胞で産生分泌される. 下垂体腺腫のうち機能性腺腫ではこれらのホルモンが腺腫細胞で検出される[4)14)].

11) LCA（leucocyte common antigen, Mr. 150～200KD）

LCA は造血系細胞に共通して保持されている抗原である．脳腫瘍では原発性あるいは転移性の悪性リンパ腫に検出される[32]．Neoplastic angioendotheliosis の血管内腫瘍細胞にも検出される[33]．

III. マーカー蛋白からみた glioma

上記の如くマーカー蛋白には既に種々のものが知られている．これらのうち astrocyte のマーカーになりうるものとしては S-100, GFAP, aldolase C を挙げることができる．この3者はいずれも正常組織では大多数の astrocyte に検出される．しかし胎児期の未熟 glia では発現されていないと考えられる．すなわち成熟した分化型 astrocyte になってはじめて発現される蛋白である．他方，この astrocyte に由来する腫瘍，astrocytic glioma，は形態的に分化型の astrocytoma とより未分化型（あるいは異分化型）の anaplastic glioma に大別可能である．臨床的には発生部位にもよるが一般的に前者が後者よりも予後がよい．すなわちこの腫瘍の形態的分化度には重要な意義がある．しかしこの glioma 分化度の実体については不明の点が多い．われわれはこの glioma の分化度を生化学的形質発現の側面から解析する目的で上記 astrocyte のマーカー蛋白の検索を astrocytoma 10例，anaplastic glioma 24例を対象に paraffin 切片上の酵素抗体法にて施行した．それぞれのマーカー蛋白に対する polyclonal 抗体を使用した．酵素抗体法の結果の判定はそれぞれの腫瘍の主構成細胞の染色像に基づいておこなった．その結果 astrocytoma では10例中9例に S-100, GFAP, aldolase C の3抗原が揃って検出され，(+, +, +) の phenotype であった．いずれの抗原も多数の細胞にほぼ同様の分布で検出された．これに対し anaplastic glioma では3抗原の発現に種々の variety が認められた．検索した24例中6例では (+, +, +)，2例では (+, +, −)，8例では (−, +, −)，更に残る8例では (−, −, −) であった．

以上より S-100, GFAP, aldolase C の3抗原は astrocytoma では揃って発現される傾向にあるのに対し，anaplastic glioma ではこれら抗原発現に関する種々の phenotype のものが含まれているものと思われた．このことから anaplastic glioma には種々の分化段階のものが含まれる可能性が示唆された．

一方，近年培養技術の進歩と共に樹立 glioma 株も増加し，これら培養 glioma 株を利用した研究が種々の領域で次第に増加しつつある．しかし培養 glioma 株の glia としての特性に関しては不祥の場合が多い．このことから培養 glioma 株をマーカー蛋白の側面から検索しその実体を把握することが重要と思われた．

この目的のためヒト glioma 株5株（クローン株1[34]，未クローン株4[35]）と動物の glioma 株4株（クローン株）[36]-[38] を対象として S-100, GFAP, aldolase C の検索をおこなった．いずれも confluent に達した培養細胞の遠心沈査より formalin 固定 paraffin 切片を作製し酵素抗体法にて検索した．monolayer での検索も随時施行した．その結果ヒト glioma 株では5株中3株に GFAP 染色が認められた．そのうち2株では多数の細胞が，また1株では比較的少数の細胞が陽性であった．しかし S-100, aldolase C は検出されなかった．即ちこれら3株には（−, +, −）の phenotype の細胞が検出された．しかしいずれにも GFAP 陰性の細胞が混在して認められたので実際には（−, −, −）の phenotype のものも含まれるものと思われた．残る2株ではいずれの抗原も検出されず，(−, −, −) と考えられた．また動物の glioma 株でも陽性細胞と陰性細胞の混在が種々の程度にみられたが，ヒト glioma 株の場合同様に陽性細胞に注目すると，4株が抗原発現に関してそれぞれ異なった組み合わせを示し，(+, +, +) のもの1株，(+, +, −) のもの1株，(−, +, −) のもの1株，(−, −, −) のもの1株となった．

以上より培養ヒト glioma 株に於けるマーカー蛋白の発現は anaplastic glioma の pattern に対応するものと思われた．これに動物の glioma 株の結果を合わせても glioma 全体としてやはり anaplastic glioma の pattern であり，このことが培養 glioma 株の一般的傾向と考えられた．培養株でのこの結果は原腫瘍が anaplastic glioma であった可能性の他に，株化の段階での変化あるいは継代中の変化による可能性などが考えられるが，培養 glioma 株を glia 細胞のモデルとして用いる場合にはこの事実を考慮に入れて研究を進めることが重要と思われた．

IV. おわりに

本稿では各種のマーカー蛋白のうち脳腫瘍研究に重要と思われるものを中心に概説した．また astrocyte のマーカー蛋白を例にとって glioma に関する著者らの研究を紹介した．マーカー蛋白は現在日進月歩の勢いで進歩している．それにともない種々の脳腫瘍もマーカー

蛋白の面から洗いなおされて数多くの新知見が得られつつある．このため概説した内容も著者らの研究内容も共にこの大きな流れの一局面にすぎないが，本稿を通して研究の現状の一端なりを把握願えれば幸いである．

参考文献

1) **Moore, B.W.**: Chemistry and biology of the S-100 protein. Nervous-system-specific proteins (ed. Bock, E.). Scand. J. Immunol. Vol. 15, Suppl. 9, pp. 53～74, Blackwell Scientific Publications (Oxford), 1982.

2) **Kuwano, R. et al.**: Molecular cloning of cDNA of S-100 α subunit mRNA. FEBS Letters, **202**: 97～101, 1986.

3) **Kuwano, R. et al.**: Molecular cloning and the complete nucleotide sequence of cDNA to mRNA for S-100 protein of rat brain. Nucl. Acids Res., **12**: 7455～7465, 1984.

4) **熊西敏郎**: 酵素抗体法の脳腫瘍生検診断への応用. 病理と臨床, 3: 277～284, 1985.

5) **Osborn, M. and Weber, K.**: Biology of disease. Tumor diagnosis by intermediate filament typing: A novel tool for surgical pathology. Lab. Invest., **48**: 372～394, 1983.

6) **Miettinen, M. et al.**: Intermediate filament proteins in choroid plexus and ependyma and their tumors. Am. J. Pathol., **123**: 231～240, 1986.

7) **Kouno, M. et al.**: An immunohistochemical study of cytokeratin and GFAP in normal and neoplastic human choroid plexus cells. Acta neuropathol. (Berl.), in press.

8) **鷲山和雄, 他**: Germ cell tumor における腫瘍マーカー検出の意義. 脳腫瘍病理, 4: 105～109, 1986.

9) **Coindre, J.-M. et al.**: Immunohistological study in chordomas. J. Path., **150**: 61～63, 1986.

10) **Wiedenmann, B. et al.**: Synaptophysin: A marker protein for neuroendocrine cells and neoplasms. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **83**: 3500～3504, 1986.

11) **Zomzely-Neurath, C.E.**: Nervous-system-specific proteins: 14-3-2 protein, antigen alpha and neuron-specific enolase, Nerous-system-specific proteins. (ed. Bock, E.). Scand. J. Immunol., vol. 15, Suppl. 9, pp. 1～40, Blackwell Scientific Publications (Oxford), 1982.

12) **Sakimura, K. et al.**: Molecular cloning and the nucleotide sequence of cDNA for neuron-specific enolase messenger RNA of rat brain. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **82**: 7453～7457, 1985.

13) **Kumanishi, T. et al.**: An immunohistochemical study of aldolase C in normal and neoplastic nervous tissues. Acta neuropathol. (Berl.), **67**: 309～314, 1985.

14) **栗坂昌宏, 中里洋一**: 脳腫瘍の免疫染色法. 朝倉書店 (東京), 1986.

15) **Washiyama, K. et al.**: Immunohistochemical study on AFP, HCG and PLAP in primary intracranial germ cell tumors. Prog. exp. Tumor Res., **30**: 296～306, 1987.

16) **中島 茂, 他**: ヒト剖検脳の，特に黒質におけるチロシン水酸化酵素の免疫組織学的検討. 脳神経, **35**: 1023～1029, 1983.

17) **Gombos, G. and Aunis, D.**: Enzymes of neurotransmitter metabolism as neuronal markers in the central nervous system, Nervous-system-specific proteins. (ed. Bock, E.). Scand. J. Immunol., vol. 15, Suppl. 9, pp. 317～338, Blackwell Scientific Publications, (Oxford), 1982.

18) **Kurihara, T. et al.**: cDNA cloning and amino acid sequence of bovine brain 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase. J. Biol. Chem., **262**: 3256～3261, 1987.

19) **Nishizawa, Y. et al.**: Immunohistochemical localization of 2', 3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the central nervous system. Brain Res., **212**: 219～222, 1981.

20) **Kuwano, R. et al.**: Immunocytochemical demonstration of hydroxyindole O-methyltransferase (HIOMT), neuron-specific enolase (NSE) and S-100 protein in the bovine pineal gland. Brain Res., **274**: 171～175, 1983.

21) **Takahashi, H. et al.**: Paragangliomas of the craniocervical region, an immunohistochemical study on tyrosine hydroxylase. Acta neuropathol. (Berl.), **73**: 227～232, 1987.

22) **Itoyama, Y. et al.**: Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions. Ann. Neurol., **7**: 167～177, 1980.

23) **Sato, S. et al.**: Antigenic determinant shared between myelin-associated glycoprotein from human brain and natural killer cells. Biomed. Res., **4**: 489～494, 1983.

24) **Motoi, M. et al.**: Immunohistochemical studies on human brain tumors using anti-Leu 7 monoclonal antibody in paraffin-embedded specimens. Acta neuropathol. (Berl.), **66**: 75～77, 1985.

25) **Perentes, E. and Rubinstein, L.J.**: Immunohistochemical recognition of human nerve sheath tumors by anti-Leu 7 (HNK-1) monoclonal antibody. Acta neuropathol.(Berl.), **68**: 319～324, 1985.

26) **Wiedenmann, B. and Franke, W.W.**: Identification and localization of synaptophysin, an integral membrane glycoprotein of Mr 38000 characteristic of presynaptic vesicles. Cell, **41**: 1017～1028, 1985.

27) **Gould, V.E. et al.**: Synaptophysin expression in neuroendocrine neoplasms as determined by immunocytochemistry. Am. J. Pathol., **126**: 243～257, 1987.

28) **Schwechheimer, K. et al.**: Synaptophysin: a reliable marker for medulloblastomas. Virchows Arch. A, **411**: 53～59, 1987.

29) **Schnitt, S.J. and Vogel, H.**: Meningiomas; diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. Am. J. Surg. Pathol., **10**: 640～649, 1986.

30) **Perentes, E. et al.**: S-antigen immunoreactivity in human pineal glands and pineal parenchymal tumors. A monoclonal antibody study. Acta neuropathol. (Berl.), **71**: 224～227, 1986.

31) **新保義勝**: 第Ⅷ因子関連抗原の免疫組織学的検討—正常脳，グリオーマおよび血管系腫瘍について—脳神経，**35**: 395～402, 1983.

32) **Warnke, R.A. et al.**: Diagnosis of human lymphoma with monoclonal antileukocyte antibodies. N. Eng. J. Med., **309**: 1275～1281, 1983.

33) **Abe, S. et al.**: An immunohistochemical study on "neoplastic angioendotheliosis" : demonstration of B lymphocyte markers in the neoplastic cells. Acta neuropathol. (Berl.), in press.

34) **Paetau, A. et al.**: Glial fibrillary acidic protein and intermediate filaments in human glioma cells. Acta neuropathol.(Berl.), **47**: 71～74, 1979.

35) **山崎一徳**: ヒト神経膠腫細胞株の樹立と Lasat および Nude マウスへの移植—膠腫細胞の分化度および異型性との関連について．神経病理学，**3**: 29～38, 1982.

36) **Benda, P. et al.**: Differentiated rat glial cell strain in tissue culture. Science, **161**: 370～371, 1968.

37) **Shimbo, Y. et al.**: Isolation of glial fibrillary acidic protein-positive clonal mouse glioma cell line. Biomed. Res., **5**: 517～520, 1984.

38) **Tanaka, R. et al.**: Morphological studies of hamster brain cells transformed in vitro by a human papovavirus BK. Acta neuropathol. (Berl.), **41**: 235～239, 1978.