

EGFRvIIIを発現した膠芽腫細胞の特徴と分布

野澤孝徳

新潟大学脳研究所脳神経外科

(指導教授：藤井幸彦)

Characteristics and distribution of EGFRvIII-expressing glioblastoma cells

Takanori Nozawa,

Departments of Neurosurgery, Brain Research Institute, University of Niigata, Niigata, Japan

別刷請求先：

951-8585 新潟市中央区旭町通一番町 757

新潟大学脳研究所脳神経外科

野澤孝徳

抄録

Glioblastoma (膠芽腫) は成人原発悪性腫瘍で最も多い腫瘍であり、手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた治療を行っても、その予後は依然として不良である。Glioblastoma は明らかな前駆病変なく、新規に急速な進行を示す原発性 glioblastoma と先行する低悪性度星細胞腫から緩徐に進行し、悪性転化して発生する二次性 glioblastoma に分けられる。isocitrate dehydrogenase (IDH ; イソクエン酸脱水素酵素) が両者を特徴づける重要な遺伝子変異であることが分かっており、原発性 glioblastoma では *IDH1/2* の変異は極めてまれであり、二次性 glioblastoma では高頻度に認められる。Epidermal growth factor receptor (EGFR; 上皮成長因子受容体) 遺伝子増幅およびその変異型である Epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII) は glioblastoma, IDH wild-type に認められる代表的な遺伝子変異である。EGFRvIII は腫瘍特異的な細胞膜抗原であり、リガンド非依存的に常時活性化し、細胞内シグナリングを増強し、血管増生と腫瘍増生を促進させることが知られている。EGFRvIII はその腫瘍特異性から、これまで治療ターゲットとして注目を集めてきたが免疫組織化学的な検索が不十分であった。本研究では、Glioblastoma, IDH wild-type と診断された 48 患者の手術標本を用いて、EGFRvIII に特異的な抗体を用いて、免疫組織化学的な検索を行い、細胞形態、EGFRvIII 陽性腫瘍細胞の分布を評価した。さらには EGFRvIII 発現の予後への影響を評価した。

EGFRvIII 陽性は再発 1 症例を含む 12 標本、11 患者で認められた。免疫染色では複数の突起を有するグリオーマ細胞において EGFRvIII および glial fibrillary acidic protein (GFAP) の発現が認められた。EGFRvIII 陽性細胞は腫瘍の中心部に存在し、辺縁部には存在しなかった。再発症例が 1 例あり、腫瘍に対する治療効果を確認することができた。単変量解析を行った結果、EGFRvIII 発現の有無は生存期間に関与しないことが示された。

本研究では EGFRvIII 陽性細胞は星細胞系分化を示し、GFAP 陽性の腫瘍細胞が認められる腫瘍の中心部に存在し、浸潤領域には存在しないことが示された。この知見は、EGFRvIII は腫瘍増殖には関与するが、浸潤する glioma 細胞は EGFRvIII 発現を失っていることを示唆している。

キーワード : Glioblastoma、EGFRvIII、免疫組織化学、形態、分布、予後

序文

Glioblastoma は成人の原発性悪性脳腫瘍で最も多い腫瘍であり、臨床的には最も悪性な腫瘍の一つである。組織学的には退形成所見の著しい神経膠腫であり、高い増殖能と破壊性浸潤性増殖傾向を示し、主に星細胞系分化を示す。手術、放射線治療、化学療法を組み合わせた治療を行っても、その予後は依然として不良である¹⁾。症例の9割程度は *IDH1/2* 変異をもたない glioblastoma, *IDH wild-type* であり、1割は *IDH1/2* 変異を認める glioblastoma, *IDH mutant* である。明らかな前駆病変なく、新規に急速な進行を示す原発性 glioblastoma と先行する低悪性度星細胞腫から緩徐に進行し、悪性転化して発生する二次性 glioblastoma に分けられる。二次性 glioblastoma では *IDH1/2* 変異の頻度が高く、*de novo* に発生する原発性 glioblastoma よりも予後がやや良好である。

EGFR 遺伝子増幅および再編成は glioblastoma で高頻度に認められ、その変異型である EGFRvIII もその一つである。EGFRvIII は EGFR 遺伝子の exon2-7 に *in-frame deletion* を生じたタンパクであり、145kDa の大きさを有する腫瘍特異的な表面抗原である^{2,3,4)}。EGFRvIII はリガンド非依存的に STAT pathway や PI3K-Akt pathway を常に活性化させ、血管増生や腫瘍増殖を促進させる^{5,6,7)}。Glioblastoma においては、EGFRvIII は *IDH* 変異がなく、EGFR amplification を伴う腫瘍に発現し、初発時には認めるが再発組織では失われるという特徴を持つ^{8,9,10)}。EGFRvIII はその腫瘍特異性からこれまで治療ターゲットとして注目され、抗 EGFRvIII ペプチドワクチンを含めた治療法が臨床治験を通して行われてきた^{11,12)}。

この研究では、EGFRvIII に特異的な抗体を用いて、Glioblastoma, *IDH wild-type* と診断された腫瘍の切片を免疫組織化学的に検索し、EGFRvIII 陽性細胞の形態的な特徴やその分布、また、EGFRvIII 発現の予後への関与を調査することを目的とした。

材料と方法

対象

2012 年から 2016 年までの間に新潟大学医歯学総合病院脳神経外科に入院し、手術が行われ、Glioblastoma, *IDH wild-type* と診断された 48 名（男 26 名、女 22 名）の患者を対象とした。診断は WHO 分類に従って行い¹³⁾、*IDH* 遺伝子変異の有無については、*IDH1* 特異的免疫染色抗体および *IDH1/2* の DNA sequencing を行い、判断した¹⁴⁾。患者背景を表 1、2 にまとめた。患者 #10（表 2）では、手術 5 か月後に MRI 検査で腫瘍再発が認められ、追加の腫瘍摘出術を施行した。術後の MRI 検査は術後 48 時間以内に行われ、残存腫瘍なし、90-99% 摘出、<90% 摘出をそれぞれ、全摘出、亜全摘出、部分摘出と判定した。

免疫組織化学的検索

手術標本は 20%ホルマリンに固定され、パラフィン包埋した。組織学的検索は 4 μ m に薄切した切片を用い、hematoxylin and eosin (HE) 染色あるいは Klüver-Barrera (KB) 染色を行っ

た。免疫組織化学的検索は先行文献に従って行った¹⁴⁾。使用した抗体はEGFRvIII抗体 (clone L8A4; Absolute Antibody, Oxford, UK; 希釈率 1:200)、ヒト IDH1 R132H 抗体(clone H09; Dianova, Hamburg, Germany; 1:100)、vimentin 抗体(clone V9, Dako, Glostrup, Denmark; 1:400), GFAP 抗体 (Dako; 1:1500)である。Vimentin 陽性細胞の分布、形態を評価した。診断は“WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System”に従って行った¹³⁾。

Western blotting

EGFRvIII抗体の信頼性を確認するため、患者#9 から得られた組織を用いて Western blotting を行った¹⁵⁾。EGFRvIII抗体を用いた Western blotting で 145kDa の単一バンドを確認し、既報と矛盾がないことを確認した²⁾。

統計解析

データ解析は GraphPad Prism 7.0 statistical software (<http://graphpad-prism.software.informer.com/7.0>)を用いて行った。全生存期間は手術日から死亡日までの日数から算出し、EGFRvIII 陽性および EGFRvIII 陰性患者の予後につき、Kaplan-Meier 法および long-rank 検定で評価した。連続する変数は Unpaired Student's *t* test を用い評価し、2つのカテゴリーに分類されたデータにはフィッシャーの正確率検定を行い、 $p \leq 0.05$ を有意差ありと判定した。

結果

EGFRvIII発現

48 患者中、11 患者 (22.9%)、12 標本 (再発 1 症例) で EGFRvIII免疫染色陽性となった。腫瘍摘出範囲と標本保存状態により、5 標本で EGFRvIII分布の評価が可能であった。EGFRvIII陽性腫瘍細胞は腫瘍の中心部にのみ存在し、浸潤領域には存在しなかった。複数の突起を有し、星細胞系分化を示す細胞に EGFRvIIIおよび GFAP が共局在した (図 1)。

初発時に EGFRvIII陽性を示した 1 患者が再手術となった。再発時の手術摘出標本ではわずかに EGFRvIII陽性の腫瘍細胞が認められるのみであった (図 2)。

予後

EGFRvIII陽性患者と陰性患者で生存期間中央値に差はなかった(それぞれ 1.21 年、1.89 年、 $p=0.866$)。

考察

EGFRvIIIはリガンド非依存的に活性化しており、c-myc の活性化により血管増生を促進し⁷⁾、STAT pathway や PI3K-Akt pathway の活性化により、腫瘍細胞増殖を促進することが知られている^{3,4)}。また、EGFRvIII発現は腫瘍細胞内で不均一であることが知られているが、

これまでの研究は腫瘍の中心部（コア）を検索ものであり、浸潤領域の評価はなされていなかった^{16,17,18}。また、細胞形態についての評価も不十分であった。これには、使用できる特異的な抗体がなかったことも関与している。

この研究では、我々は初発 glioblastoma において、EGFRvIII 発現が腫瘍中心部にのみ局限し、浸潤領域には認めないことを確認した。既報では免疫不全マウスや培養細胞を用いた研究では EGFRvIII を発現した腫瘍細胞は EGFRvIII 陰性の細胞よりも浸潤能が低いことが示されている^{16,19,20}。この結果を合わせて考えると、EGFRvIII 陽性腫瘍細胞は、浸潤能の高い腫瘍細胞では、その発現が失われていることが示唆される。これまで、腫瘍細胞の移動性と増殖性は相互排他的であるという現象 (grow-or-go phenomenon) は癌において知られている。ここでは主に低酸素が増殖と浸潤の転換に関与することが示唆されている^{19,20,21,22}。我々の研究では、腫瘍細胞の浸潤・増殖において、EGFRvIII 発現が重要な役割を果たしていることを示した。Glioblastoma の中には、より分化した腫瘍細胞の集塊のなかから、円形で GFAP 陰性の腫瘍細胞が周囲とは境界明瞭な形で発生するものがあることが知られている²³。これは何らかの遺伝子発現の変化によって引き起こされるものと考えられているが、詳細なメカニズムはわかっていない。これと同様の現象が患者 #3 で認められた。分化度の高い、中心領域の腫瘍細胞を認める一方で、小型、円形で GFAP 陰性の腫瘍細胞が、浸潤領域において認められた。これら小型の細胞は EGFRvIII 陰性であった。

1 症例、再発症例を認めた。初発時認めた EGFRvIII 発現腫瘍細胞は再発時には失われていた。この結果は初発時に認めた EGFRvIII の発現が再発時には失われていたことを示した既報に矛盾がないことを示した⁸。この結果はまた、EGFRvIII を発現している中心部の腫瘍細胞は手術での摘出が比較的容易であり、放射線化学療法への感受性が高い可能性を示唆している。

EGFRvIII の予後への影響は議論の残る結果となっている。EGFRvIII を発現している glioblastoma の予後が良好であるとの報告²⁴や、その一方で、予後不良因子であるとの報告²⁵や生存期間には影響しないとの報告もある^{26,27,28}。我々の研究でも、生存期間に関与するという結果は得られなかった。Glioblastoma の摘出度が生存期間に関与するとの報告があるが²⁹、我々の研究での 2 群 (EGFRvIII 陽性と陰性) で摘出範囲に差はなかった。仮に EGFRvIII 陽性腫瘍細胞が中心部に存在し、再発時には失われているとすると、浸潤領域の EGFRvIII 陰性腫瘍細胞が予後に関与するのではないかとの考察ができる。

結論

初発 glioblastoma において、EGFRvIII は星細胞系分化度が高く、GFAP 陽性となる腫瘍細胞の存在する腫瘍中心部に存在し、浸潤領域の腫瘍には発現しないことが示された。この発見は EGFRvIII が腫瘍増殖に関与し、一方で浸潤領域の腫瘍細胞が EGFRvIII を失っていることを示唆するものである。

謝辞

今回の研究に際しご指導賜りました新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野柿田明美

教授に厚く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Stupp R, Mason WP, van den Bent MJ, Weller M, Fisher B, Taphoorn MJ, Belanger K, Brandes AA, Marosi C, Bogdahn U, Curschmann J, Janzer RC, Ludwin SK, Gorlia T, Allgeier A, Lacombe D, Cairncross JG, Eisenhauer E, Mirimanoff RO: Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* 352:987-996, 2005.
- 2) Wikstrand CJ, Hale LP, Batra SK, Hill ML, Humphrey PA, Kurpad SN, McLendon RE, Moscatello D, Pegram CN, Reist CJ, Traweek ST, Wong AJ, Zalutsky MR, Bigner DD. Monoclonal antibodies against EGFRvIII are tumor specific and react with breast and lung carcinomas and malignant glioma. *Cancer Res* 55:3140-3148, 1995.
- 3) Nishikawa R, Ji XD, Harmon RC, Lazar CS, Gill GN, Cavenee WK, Huang HJ: A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91:7727-7731, 1994
- 4) Gupta P, Han SY, Holgado-Madruga M, Mitra SS, Li G, Nitta RT, Wong AJ: Development of an EGFRvIII specific recombinant antibody. *BMC Biotechnol* 10:72-85, 2010
- 5) Padfield E, Ellis HP, Kurian KM: Current therapeutic advances targeting EGFR and EGFRvIII in glioblastoma. *Front Oncol* 5:5, 2015
- 6) Gan HK, Cvrljevic AN, Johns TG: The epidermal growth factor receptor variant III (EGFRvIII): where wild things are altered. *FEBS J* 280:5350-5370, 2013
- 7) Katanasaka Y, Kodera Y, Kitaura Y, Morimoto T, Tamura T, Koizumi F: Epidermal growth factor receptor variant type III markedly accelerates angiogenesis and tumor growth via inducing c-myc mediated angiopoietin-like 4 expression in malignant glioma. *Mol Cancer* 12:31, 2013
- 8) Wang J, Cazzato E, Ladewig E, Frattini V, Rosenbloom DI, Zairis S, Abate F, Liu Z, Elliott O, Shin YJ, Lee JK, Lee IH, Park WY, Eoli M, Blumberg AJ, Lasorella A, Nam DH, Finocchiaro G, Iavarone A, Rabadan R: Clonal evolution of glioblastoma under therapy. *Nat Genet* 48:768-776, 2016
- 9) Nobusawa S, Watanabe T, Kleihues P, and Ohgaki H: IDH1 Mutations as Molecular Signature and Predictive Factor of Secondary Glioblastomas. *Clin Cancer Res* 15:6002-6007, 2009
- 10) Maire CL, Ligon KL: Molecular pathologic diagnosis of epidermal growth factor receptor. *Neuro-Oncology* 16 (Suppl 8):viii1-6, 2014
- 11) Babu R, Adamson DC: Rindopepimut: an evidence-based review of its therapeutic potential in the treatment of EGFRvIII-positive glioblastoma. *Core Evid* 7:93-103, 2012

- 12) Gedeon PC, Choi BD, Sampson JH, Bigner DD: Rindopepimut: anti-EGFRvIII peptide vaccine, oncolytic. *Drugs Future* 38:147-155, 2013
- 13) Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD, Cavenee WK, Ellison DW, Figarella-Branger D, Perry A, Reifenberger G, von Deimling A: WHO Classification of Tumours of the Central Nervous System. IARC, Lyon, 2016
- 14) Ogura R, Tsukamoto Y, Natsumeda M, Isogawa M, Aoki H, Kobayashi T, Yoshida S, Okamoto K, Takahashi H, Fujii Y, Kakita A: Immunohistochemical profiles of IDH1, MGMT and P53: practical significance for prognostication of patients with diffuse gliomas. *Neuropathology* 35:324-335, 2015
- 15) Miyahara H, Natsumeda M, Shiga A, Aoki H, Toyoshima Y, Zheng Y, Takeuchi R, Murakami H, Masuda H, Kameyama S, Izumi T, Fujii Y, Takahashi H, Kakita A: Suppressed expression of autophagosomal protein LC3 in cortical tubers of tuberous sclerosis complex. *Brain Pathology* 23:254-262, 2013
- 16) Eskilsson E, Rosland GV, Talasila KM, Knappskog S, Keunen O, Sottoriva A, Foerster S, Solecki G, Taxt T, Jirik R, Fritah S, Harter PN, Vålke K, Al Hossain J, Joseph JV, Jahedi R, Saed HS, Piccirillo SG, Spiteri I, Leiss L, Euskirchen P, Graziani G, Daubon T, Lund-Johansen M, Enger PØ, Winkler F, Ritter CA, Niclou SP, Watts C, Bjerkvig R, Miletic H: EGFRvIII mutations can emerge as late and heterogenous events in glioblastoma development and promote angiogenesis through Src activation. *Neuro Oncol* 18:1644-1655, 2016
- 17) Biernat W, Huang H, Yokoo H, Kleihues P, Ohgaki H: Predominant Expression of Mutant EGFR (EGFRvIII) is Rare in Primary Glioblastomas. *Brain Pathology* 14:131-136, 2004
- 18) Jeuken J, Sijben A, Alenda C, Rijntjes J, Dekkers M, Boots-Sprenger S, McLendon R, Wesseling P: Robust detection of EGFR copy number changes and EGFR Variant III: technical aspects and relevance for glioma diagnostics. *Brain Pathology* 19:661-667, 2009
- 19) Lindberg OR, McKinney A, Engler JR, Koshkakarayan G, Gong H, Robinson AE, Ewald AJ, Huillard E, David James C, Molinaro AM, Shieh JT, Phillips JJ: GBM heterogeneity as a function of variable epidermal growth factor receptor variant III activity. *Oncotarget* 7:79101-79116, 2016
- 20) Talasila KM, Soentgerath A, Euskirchen P, Rosland GV, Wang J, Huszthy PC, Prestegarden L, Skaftnesmo KO, Sakariassen PØ, Eskilsson E, Stieber D, Keunen O, Brekka N, Moen I, Nigro JM, Vintermyr OK, Lund-Johansen M, Niclou S, Mørk SJ, Enger PO, Bjerkvig R, Miletic H: EGFR wild-type amplification and activation promote invasion and development of glioblastoma independent of angiogenesis. *Acta Neuropathol* 125:683-698, 2013

- 19) Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM: Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell* 3:347-361, 2003
- 20) Krishnamachary B, Berg-Dixon S, Kelly B, Agani F, Feldser D, Ferreira G, Iyer N, LaRusch J, Pak B, Taghavi P, Semenza GL: Regulation of colon carcinoma cell invasion by hypoxia-inducible factor 1. *Cancer Res* 63:1138-1143, 2003
- 21) Pàez-Ribes M, Allen E, Hudock J, Takeda T, Okuyama H, Viñals F, Inoue M, Bergers G, Hanahan D, Casanovas O: Antiangiogenic therapy elicits malignant progression of tumors to increased local invasion and distant metastasis. *Cancer Cell* 15:220-231, 2009
- 22) Kahlert UD, Suwala AK, Raabe EH, Siebzehnrubl FA, Suarez MJ, Orr BA, Bar EE, Maciaczyk J, Eberhart CG: ZEB1 Promotes Invasion in Human Fetal Neural Stem Cells and Hypoxic Glioma Neurospheres. *Brain Pathol* 25:724-732, 2015
- 23) Schmitt HP: Rapid Anaplastic Transformation in gliomas of adulthood. *Path Res Pract* 176:313-323, 1983
- 24) Montano N, Cenci T, Martini M, D'Alessandris QG, Pelacchi F, Ricci-Vitiani L, Maira G, De Maria R, Larocca LM, Pallini R: Expression of EGFRvIII in glioblastoma: prognostic significance revisited. *Neoplasia* 13:1113-1121, 2011
- 25) Shinojima N, Tada K, Shiraishi S, Kamiryo T, Kochi M, Nakamura H, Makino K, Saya H, Hirano H, Kuratsu J, Oka K, Ishimaru Y, Ushio Y: Prognostic value of epidermal growth factor receptor in patients with glioblastoma multiforme. *Cancer Res* 63:6962-6970, 2003
- 26) Heimberger AB, Suki D, Yang D, Shi W, Aldape K: The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med* 3:38-43, 2005
- 27) Heimberger AB, Hlatky R, Suki D, Yang D, Weinberg J, Gilbert M, Sawaya R, Aldape K: Prognostic effect of epidermal growth factor receptor and EGFRvIII in glioblastoma multiforme patients. *Clin Cancer Res* 11:1462-1466, 2005
- 28) Faulkner C, Palmer A, Williams H, Wragg C, Haynes HR, White P, DeSouza RM, Williams M, Hopkins K, Kurian KM: EGFR and EGFRvIII analysis in glioblastoma as therapeutic biomarkers. *Br J Neurosurg* 29:23-29, 2015
- 29) Sanai N, Polley MY, McDermott MW, Parsa AT, Berger MS: An extent of resection threshold for newly diagnosed glioblastomas. *J Neurosurg* 115:3-8, 2011

	陽性	陰性	P 値
総数	11	37	
年齢	68.8	62.8	P=0.118
手術			
全摘出	1	8	P=0.237
亜全摘出	8	14	P=0.296
部分摘出	2	15	P=0.070
放射線治療	11	36	P>0.999
テモゾロマイド治療	11	34	P>0.999
ベバシズマブ治療	5	7	P=0.113
追加切除	1	5	P>0.999
MGMT 陽性	6	20	P>0.999

表 1. EGFRvIII 陽性および陰性患者の臨床的特徴の比較

患者	年齢 (歳)	性別	手術	MGMT	全生存 期間(月)	死亡/ 生存
1	81	男	部分摘出	+	14	死亡
2	75	女	亜全摘出	-	34	死亡
3	59	男	全摘出	+	13	死亡
4	67	男	亜全摘出	-	36	死亡
5	67	女	部分摘出	-	21	死亡
6	81	男	亜全摘出	+	13	死亡
7	72	男	亜全摘出	-	8	死亡
8	76	女	亜全摘出	-	16	生存
9	48	男	亜全摘出	+	12	生存
10	69	男	亜全摘出	+	9	死亡
11	62	男	亜全摘出	+	5	生存

表 2. EGFRvIII 陽性患者の臨床的特徴の詳細

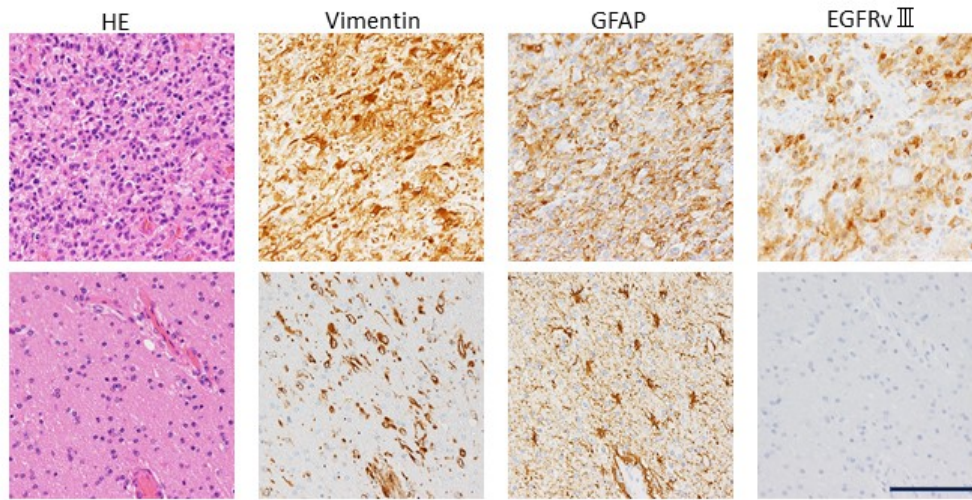


図 1. 患者 #3. 腫瘍の組織像。腫瘍中心部（上段）、浸潤領域（下段）。腫瘍中心部では、**vimentin** 陽性細胞が細胞密度高く認められ、**EGFRvIII**および **GFAP** は複数の細かい突起を有していた。その一方で浸潤領域では腫瘍細胞は **vimentin** 陽性であるが、**EGFRvIII**、**GFAP** は陰性であり、小型、円形であった。Scale bar: 100 μ m

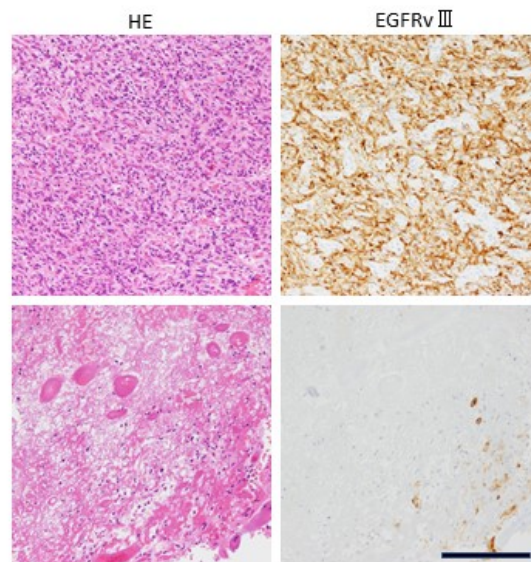


図 2. 患者 #10. 初回手術時の組織像（上段）と再発時の組織像（下段）。初回手術時、腫瘍細胞は **astrocytic** な特徴を有し、かつ **EGFRvIII**陽性像を示していた。一方で、再発時の手術標本ではわずかな **EGFRvIII**陽性細胞が認められるのみで、壊死像が認められた。Scale bar: 200 μ m