
原 著

ヒト脳病理切片における in situ hybridization 法を利用した ニューロンおよびグリア細胞の同定

佐藤 和彦・堀江 正男・竹林 浩秀

新潟大学医歯学総合研究科
神経生物・解剖学分野

高橋 均・柿田 明美

新潟大学脳研究所
病理学分野

Identification of Neurons and Glial Cells in Pathological Human Brain Sections by in situ Hybridization Method

Kazuhiko SATO, Masao HORIE and Hirohide TAKEBAYASHI

*Division of Neurobiology and Anatomy,
Graduate School of Medical and Dental Sciences, Niigata University*

Hitoshi TAKAHASHI and Akiyoshi KAKITA

*Department of Pathology,
Brain Research Institute, Niigata University*

要 旨

in situ hybridization (ISH) 法は、組織内 (in situ) で標的核酸配列を、核酸プローブのハイブリダイゼーションにより検出する染色法である。ISH 法は、組織内の抗原を抗体で検出する免疫染色法と比べると、標的遺伝子発現を検出する RNA プローブの作製が比較的容易である。すべてのプローブを同一の条件で使用できる、という利点がある。病理診断分野においては、ヘマトキシリン・エオジン染色など種々の染色法や免疫染色法が主に用いられている。ISH 法は、ウイルス感染を調べる、遺伝子の染色体上の位置を調べることなどに利用されているが、神経病理分野での利用は限られている。本研究では、神経病理学における ISH 法の応用を目指して、

Reprint requests to: Hirohide TAKEBAYASHI
Division of Neurobiology and Anatomy
Graduate School of Medical and Dental Sciences,
Niigata University,
1-757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951 - 8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
神経生物・解剖学分野

竹林 浩秀

脳の主要構成細胞であるニューロンとグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア）の細胞種特異的 RNA プローブを作製し、ヒト脳のパラフィン切片においてこれらの遺伝子発現の検出および各々の細胞同定を試みた。ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリアの特異的遺伝子として、ニューロフィラメント（*NF*）、グリア細胞線維性酸性タンパク（*GFAP*）、ミエリン塩基性タンパク（*MBP*）、マクロファージコロニー刺激因子1受容体（*CSF1R*）を使用した。3例のヒト側頭葉病理切片を用いてISHを行った結果、全ての検体においてISHシグナルが観察された。*NF*陽性細胞は大脳皮質全層において検出され、錐体細胞の特徴的な形態をもつ興奮性ニューロンを含む細胞群が染まっている事が観察された。また、グリア特異的分子の陽性細胞は、灰白質そして白質に特徴的なパターンを持って検出された。退形成性血管周皮腫の周囲組織では非常に強い*GFAP*発現が検出され、反応性グリア細胞の存在が示唆された。以上の結果は、ヒト脳病理切片において、ISH法を用いて脳の主要な構成細胞種が同定可能であることを示している。

キーワード：in situ hybridization, 神経細胞, グリア細胞, ヒト病理切片, 神経病理学

緒 言

in situ hybridization (ISH) 法は1980年代に開発された手法で、検出用の核酸プローブを用いて、組織中において特異的な核酸配列を検出することができる¹⁾。遺伝子発現を検出するRNAプローブを用いたISH法は免疫染色法と共に、医学生物学の分野において必須の技術となっている。免疫染色法は、組織中にある抗原の細胞内局在を詳細に可視化する事が可能であり、また、操作ステップが少なく、比較的短時間で染色可能であるという利点がある。一方、ISHは、抗体作製に比べて容易に標的遺伝子検出用RNAプローブ作製ができる、全てのRNAプローブは一定の条件下で使用できる、シグナルが主に細胞質で検出されるためタンパク分泌細胞の同定が容易である、細胞体の形態的な特徴や発現細胞数などの情報が容易に得られる、などの利点がある。そのため両法を組み合わせ使用することで、組織内の詳細な遺伝子発現、ひいては、病態の理解が深まり、より良い病理診断を行うことができると期待される。病理診断において、ヘマトキシリン・エオジン染色など種々の染色法に加えて、免疫染色法は広く利用されている²⁾。一方、ISHは、染色操作のステップが多いが幅広い応用範囲を持つ事から、主に基礎研究分野で利用されてきた。臨床病理検査室では、

蛍光色素を利用してシグナルを検出するISH法（fluorescence in situ hybridization: FISH）を用いて、細胞に感染したEBウイルスの細胞内増殖の有無を調べる、遺伝子の染色体上での位置を調べることが行われてきた³⁾。しかし、神経病理分野ではISH法の利用は限られている⁴⁾。

脳の病態を理解するためには、脳を構成する細胞であるニューロンや各種グリア細胞の遺伝子発現の動態を明らかにする事が重要である。そこで本研究では、まず、脳の主要構成細胞であるニューロンとグリア細胞（アストロサイト、オリゴデンドロサイト、ミクログリア）の細胞種特異的RNAプローブを作製し、ヒト脳のパラフィン切片において細胞種特異的遺伝子の発現を検出し、各々の細胞同定を試みた。

材料と方法

ヒト病理標本

本研究で使用したヒト病理標本は、新潟大学脳研究所脳疾患標本資源解析学分野にて管理されているパラフィン包埋脳組織検体3例を使用した（表1）。本研究は、新潟大学医学部倫理委員会の承認を得て実施された。

表1 使用したヒト脳病理標本

症例番号	死亡年	死亡年齢	性別	死因
1	2011	58	男	退形成血管周皮腫 Anaplastic hemangiopericytoma
2	2007	78	男	パーキンソン病 Parkinson disease
3	2010	10	男	突然死 Sudden death

表2 RNAプローブ

RNA プローブ	特徴
hNF human <i>neurofilament 3</i> (150 kDa medium) GenBank accession number: BC002421	ニューロンの細胞骨格分子
hGFAP human <i>glial fibrillary acidic protein</i> GenBank accession number: J04569	アストロサイトの細胞骨格分子
hMBP human <i>myelin basic protein</i> GenBank accession number: BC065248	オリゴデンドロサイトの髄鞘(ミエリン)タンパク
hCSF1R human <i>colony stimulating factor 1 receptor</i> GenBank accession number: BC047521	ミクログリア(およびマクロファージ)に発現するマクロファージコロニー刺激因子1受容体 遺伝子別名 <i>c-fms</i>
hOlig2 human <i>oligodendrocyte transcription factor 2</i> GenBank accession number: NM_005806	オリゴデンドロサイト前駆細胞に発現する転写因子

パラフィン切片の作製

パラフィン包埋した側頭葉組織ブロックを、滑走式マイクローム(大和光機)を用いて薄切し、10 μ m厚のパラフィン切片を作製した。パラフィン切片を、MASコートスライドガラス(S9441; 松浪硝子)に貼付し、伸展器(サクラファインテ

ックジャパン)を用いて37°Cで一晩乾燥させた。

細胞種特異的RNAプローブの作製

本研究で使用した細胞種特異的RNAプローブを表2にまとめた⁵⁾⁻⁸⁾。RNAプローブは、cDNAを含むプラスミドDNAから作製した。プ

表3 使用した細胞種特異的抗体

抗体	希釈倍率	特徴
マウス 抗 NF 抗体 (SMI 31) Covance 社, cat# SMI-31R	1:1000	ニューロンの細胞骨格分子 特に、リン酸化 NF-H を認識する
ウサギ 抗 GFAP 抗体 DakoCytomation 社, cat# Z0334	1:1000	アストロサイト特異的な細胞骨格 分子
ウサギ 抗 MBP 抗体 ニチレイバイオサイエンス社, cat# 412511	1:3	オリゴデンドロサイトの髄鞘(ミエリン)タンパク
ウサギ 抗 Iba1 抗体 和光純薬, cat# 019-19741	1:500	ミクログリア特異的なカルシウム 結合タンパク

ラスミド DNA を適切な制限酵素処理により直鎖化した後, digoxigenin 標識 uridine-5'-triphosphate (UTP) を含む RNA ラベリングキット (ロシュ・ダイアグノスティックス) と適切な RNA ポリメラーゼを用いて digoxigenin 標識 RNA プローブを作製した⁵⁾。

ISH

細胞種特異的 RNA プローブを用いたヒト病理脳パラフィン切片における ISH は, 以下の通りに行った⁹⁾。はじめに, パラフィン切片をキシレンに浸漬して脱パラフィンした後, エタノール (99.5%-70%), 続いて, DEPC 処理水 (Diethyl-pyrocyanate により RNase 除去処理を行った純水) に浸漬して復水した。組織中へのプローブの浸透性を向上させるため, 切片をタンパク質分解酵素のプロテイナーゼ K 処理 (5 μ g/ml, 室温 90 分) し, 続いて, 組織への標識プローブの非特異的結合を防止するために無水酢酸 (2.7 μ l/ml) を用いてアセチル化を行った。切片を DEPC 処理水で洗浄した後, RNA プローブの希釈用溶媒に浸漬して, 65 $^{\circ}$ C で 2 時間プレハイブリダイゼーションを行った後, 各種 RNA プローブを切片上に滴

下し, 65 $^{\circ}$ C で一晩 (13 時間超) ハイブリダイゼーションを行った。翌日, 切片を 50%ホルムアミドを含むクエン酸ナトリウム緩衝液, 続いて, マレイン酸緩衝液で洗浄した後, アルカリフォスファターゼ標識抗 digoxigenin 抗体を滴下し, 4 $^{\circ}$ C で一晩反応させた。本研究で使用した抗体の希釈溶媒には, 抗体の標本上のタンパクへの非特異的な結合を防ぐ目的で 0.5%スキムミルクを含む 0.01M リン酸緩衝液を用いた。翌日, 切片をマレイン酸緩衝液で洗浄した後, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate (BCIP) と nitroblue tetrazolium (NBT) を含む発色液に浸し, 暗所室温にて青紫色に可視化した。可視化した標本は Nuclear Fast Red を用いて対比染色を行った後, エタノール系列 (70%-99.5%) およびキシレンでそれぞれ脱水, 透徹し, ビオライト (応研商事) を用いて封入した。

免疫染色法

ISH で検出した組織中の mRNA と細胞種特異的な抗原タンパクとの共存性の有無を調べるため, 同一切片上で, ISH と免疫染色の二重染色を行った。ISH を行った切片に表 3 に示した抗体希

积液を滴下し、4℃で一晩反応させた。翌日、切片をリン酸緩衝液で洗浄した後、西洋ワサビペルオキシダーゼ (horseradish peroxidase: HRP) 標識した抗ウサギまたはマウス抗体 (それぞれ 200 倍希釈, MBL 社) を滴下し、37℃で 1 時間反応させた。切片を PBS で洗浄した後、0.01% ジアミノベンチジン四酢酸塩 (DAB) と 0.001% 過酸化水素を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.4) で茶色に可視化した。

顕微鏡観察

標本はオリンパス社製光学顕微鏡 (BX53) で観察し、顕微鏡用デジタルカメラ (DP72, オリンパス) で画像を取得した。得られた画像は Photoshop CS3 (アドビシステム社) を用いて、明るさの調節および画像のトリミング等の編集を行った。

結 果

成人側頭葉におけるニューロンおよびグリア細胞種特異的分子の ISH

まず最初に、症例 1 側頭葉 (退形成性血管周皮腫の周囲組織) の病理切片上で、*NF*, *GFAP*, *MBP* および *CSF1R* の各 RNA プローブによる ISH を行った。*NF* のシグナルは主として大型 (短径約 9 μm 以上) の紡錘状の核を有する細胞に大脳皮質全層的に観察された (図 1A, 1A')。一方、白質中では *NF* のシグナルは全く観察されなかった (図 1A'')。NF 以外の *GFAP*, *MBP* および *CSF1R* のシグナルは大脳皮質および白質のそれぞれにおいて小型 (直径約 7 μm 未満) の主として球形の核を有する細胞で認められた (図 1B - D)。GFAP に関しては、大脳皮質全層および白質中において、強いシグナルを呈する細胞が多数検出された (図 1B)。大脳皮質では白質に比べてよりシグナル強度の大きい細胞が多く認められた (図 1B', B'')。MBP に関しては、大脳皮質では浅層に比べて、深層の方により多くのシグナルが検出された (図 1C')。また、白質中には *MBP* シグナルが豊富に認められた (図 1C'')。

CSF1R に関しては、白質に比べて、大脳皮質においてより強度の大きいシグナルが検出された (図 1D, D', D'')。大脳皮質における *CSF1R* のシグナルは全層的にほぼ均一な分布を呈していた。一方、白質における *CSF1R* のシグナルは大脳皮質よりも低密度で検出された。

成人側頭葉のパラフィン切片における各分子の ISH と免疫染色による二重染色

ISH で得られたシグナルが目的とする細胞種に発現している事を確認するため、症例 2 の同一切片上で、ISH と免疫染色の二重染色を行い、mRNA 発現とタンパク発現を比較した。その結果、*NF* ISH と SMI31 抗体を用いた *NF* の免疫二重染色では、青色に染色された *NF* ISH シグナルと茶色に染色された SMI31 陽性シグナルが共局在する細胞が観察された (図 2A)。GFAP ISH と抗 GFAP 抗体を用いた二重免疫染色では、GFAP ISH シグナル陽性の細胞体から GFAP 陽性突起が放射状に伸びている様子が観察された (図 2B)。MBP ISH と抗 MBP 抗体を用いた免疫二重染色では、MBP ISH シグナルと MBP 陽性シグナルが共局在する小型の細胞が観察された (図 2C)。MBP はミエリンタンパクであるので、MBP の免疫染色の陽性シグナルの多くは軸索に沿って観察された。*CSF1R* ISH と抗 Iba1 抗体を用いた免疫二重染色では、*CSF1R* ISH シグナル陽性の細胞体から Iba1 免疫陽性の突起が放射状に伸びている様子が観察された (図 2D)。以上の結果から、本研究で使用した ISH プローブを用いることで、各細胞種を同定できると考えられた。

ヒト側頭葉におけるアストロサイト特異的遺伝子 GFAP の発現解析

細胞種の特異性が確認された *GFAP* プローブを用い、3 つの症例の側頭葉における *GFAP* の詳細な発現解析を試みた。成人の症例 1 (図 3A, A') および症例 2 (図 3B, B') における *GFAP* シグナルは、いずれも灰白質全層および白質中に認められたが、症例 1 では症例 2 に比べて非常に強いシグナルを呈する細胞が多数観察された。小児の

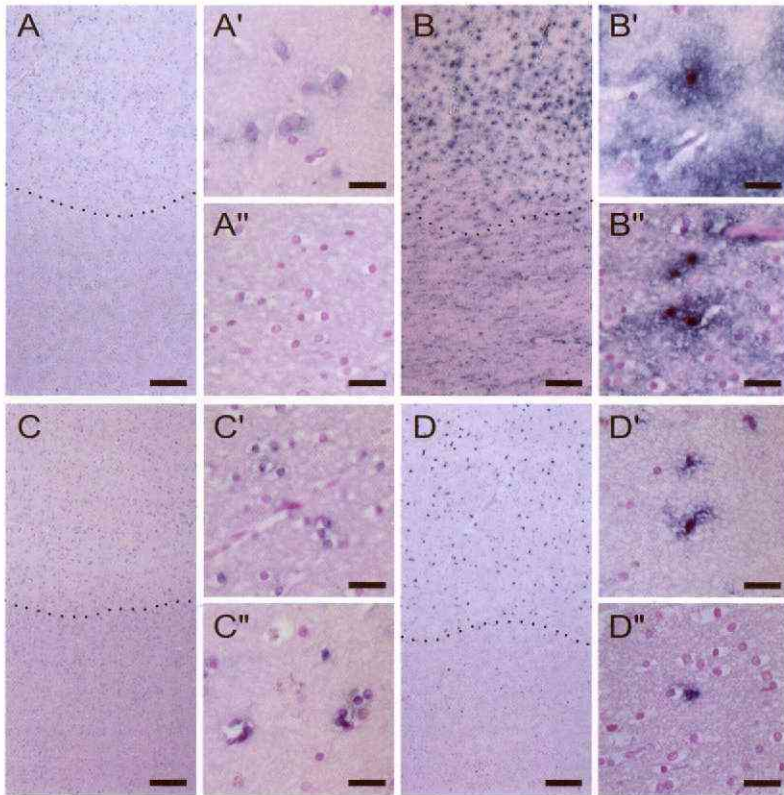


図1 細胞特異的マーカーの in situ hybridization 解析

A *NF*プロンプ、B *GFAP*プロンプ、C *MBP*プロンプ、D *CSF1R*プロンプを用いて、症例1のパラフィン切片上でISHを行った。点線は、灰白質と白質の境界を示している。A', B', C', D'は灰白質、A'', B'', C'', D''は白質。Scale bars: A-D, A'-D', A''-D'' 25 μ m

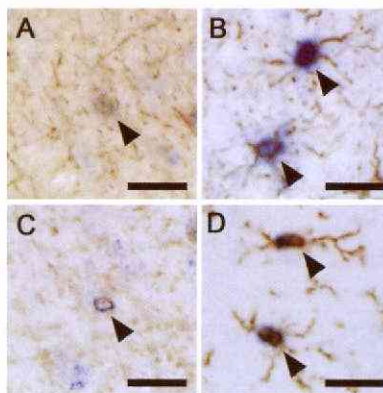


図2 ISHと免疫染色の二重染色による特異性の検討

A: *NF* ISH - SMI31 染色, B: *GFAP* ISH - *GFAP* 染色, C: *MBP* ISH - *MBP* 染色, D: *CSF1R* ISH - *Iba1* 染色の二重染色を症例2のパラフィン切片上で行った。矢頭は、二重陽性細胞を示している。Scale bars: A-D 25 μ m

症例3の側頭葉では、GFAPシグナルは灰白質浅層および白質中に症例2と同程度のシグナル強度を持って認められたが、灰白質深層にはほとんど検出されなかった(図3C, C')。次に、症例1におけるGFAP強陽性シグナルが、脳組織の固定条件や保存条件などの二次的な要因で非特異的に起こっている可能性を除外するために、脳実質全体に散在して存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞マーカー *Olig2* を用いたISHを行った。その結果、*Olig2* のシグナル強度は、いずれのサンプルでもほぼ全ての領域で観察された(図3D - F)。この結果から、症例1におけるGFAPの強陽性染色が二次的な要因によるものではないと考えられる。

ヒト側頭葉におけるミエリン化オリゴデンドロサイト特異的マーカー *MBP* の発現解析

次に、*MBP* プローブを用い、3つの症例の側頭葉における *MBP* の詳細な発現解析を試みた。その結果、すべての症例において、*MBP* シグナルは大脳皮質及び白質中に認められた(図4A - C)。成体の大脳皮質(症例1, 症例2)では、*MBP* 陽性細胞は深層により多く検出されるのに対し(図4A, B)、小児の症例3の大脳皮質では、深層の *MBP* 陽性細胞数が少なく、浅層により多くの陽性細胞が検出された(図4C)。白質中の *MBP* のシグナルは成人症例1と小児症例3において同程度の強度を持った陽性細胞が、同程度の密度を持って検出されたが、成人症例2の白質中では、成人症例1と小児症例3に比べて低密度でかつ、シグナル強度も低かった。

考 察

ヒト脳病理標本におけるISH法の有益性

本研究ではヒト脳切片において、細胞種特異的な遺伝子発現をISHにより検出し、各種細胞の同定を試みた。その結果、ISHシグナルの特徴的な分布とその形状により、それらの細胞種特異性が示唆された(図1)。また、ISH法と細胞種特異的抗体を用いた免疫染色の二重染色により、各ISHシグナルの特異性を確かめる事ができた(図2)。

以上の結果より、ヒト病理脳切片において、ISH法を用いて標的遺伝子のmRNAを特異的に検出し、ニューロンおよびグリア細胞の同定が可能である事が分かった。本実験で用いられた最も古い病理検体は2007年にパラフィン包埋ブロックが作製されたものであり、約6年経過したものである。パラフィン包埋ブロック内での高い保存性を考えれば、それ以前の病理標本についてもISHによる遺伝子発現解析を行う事ができると考えられる。また、新たな標的遺伝子に対するプローブを作製することにより、任意の遺伝子発現を組織切片上で観察できる。その際には、本研究で用いられたISHと免疫染色の二重染色は、遺伝子発現細胞種を同定するのに役立つ。このように、本法は、ヒト神経難病の病態研究に応用可能である。

病理検体の組織状態を検定する必要性と *Olig2* ISHの有益性

病理検体は、組織固定までの時間がそれぞれ異なり、また、組織検体の大きさも異なるので、組織の保存および固定状態を検定する必要があると考えられる。*Olig2* は中枢神経系全体に均一に存在するオリゴデンドロサイト前駆細胞に発現している遺伝子である¹⁰⁾。*Olig2* ISHを用いてシグナルが組織内で均一に出る事が確認できれば、*Olig2* mRNAの組織内の保存状態を検定する事につながり、他の遺伝子の発現を調べたときの内在性コントロールとして使用できると考えられる。ただし、*Olig2* の遺伝子発現に影響の与える病態(オリゴデンドログリオーマなど)¹¹⁾¹²⁾では、*Olig2* と異なる遺伝子の発現を内在性コントロールとして使用する必要がある。

退形成性血管周皮腫周囲の脳組織におけるGFAP強陽性シグナル

血管周皮腫は非常に稀な脳腫瘍で、中枢神経に生じる腫瘍全体の1%以下の発生率である¹³⁾。退形成性血管周皮腫は中でも、より侵襲性で悪性度が高く、予後不良である¹⁴⁾。退形成性血管周皮腫周囲の脳組織では、灰白質と白質共にGFAP強陽性シグナルを多数検出した。これは腫

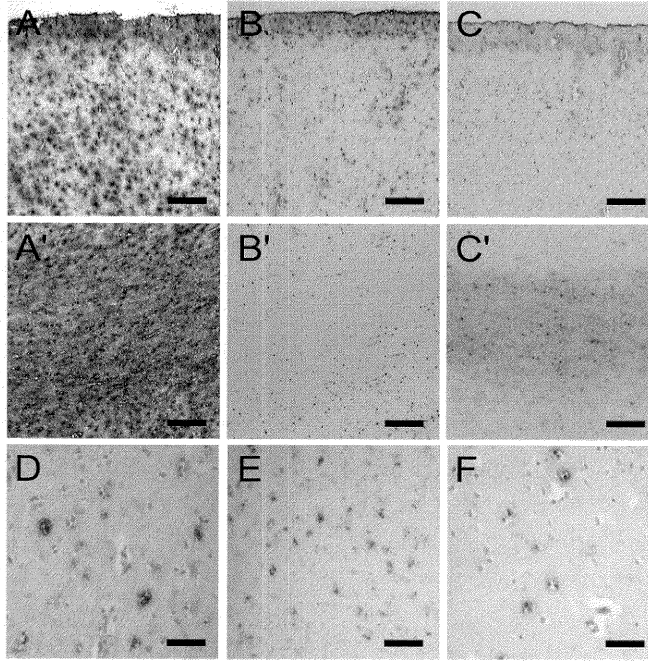


図3 ヒト側頭葉における *GFAP* と *Olig2* の発現解析

症例1 (A, A', D), 症例2 (B, B', E), 症例3 (C, C', F) のパラフィン切片上で, *GFAP* プロープ (A-C, A'-C') と *Olig2* プロープ (D-F) を用いて ISH 染色を行った。Scale bars: A-C, A'-C' 250 μ m, D-F 50 μ m

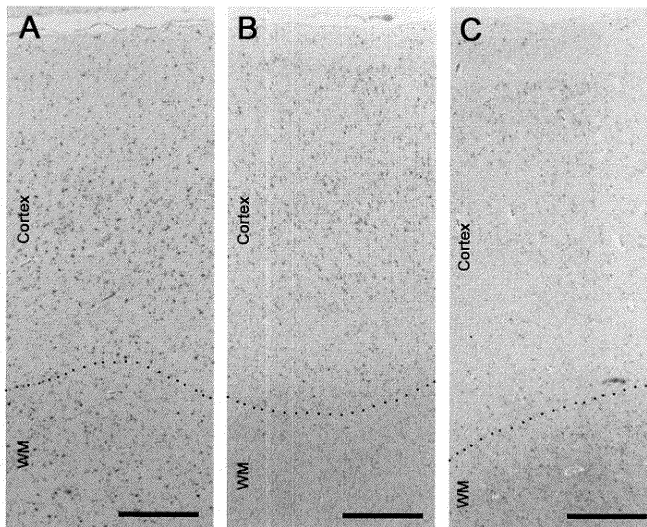


図4 ヒト側頭葉における *MBP* の発現解析

症例1 (A), 症例2 (B), 症例3 (C) のパラフィン切片上で, *MBP* プロープ (A-C) を用いて ISH 染色を行った。Cortex: 皮質, WM: white matter, 白質。点線は, 皮質と白質の境界を示している。Scale bars: A-C 200 μ m

瘍による圧迫等によりグリア細胞が反応し、反応性アストロサイトにおける GFAP の発現上昇を観察している可能性が考えられる。

側頭葉におけるグリア特異的遺伝子の発現と脳成熟

症例 3 の小児側頭葉において、大脳皮質浅層（灰白質）および白質ではアストロサイトマーカーの GFAP シグナルが多数見られたが、大脳皮質深層（灰白質）ではほとんど検出されなかった（図 3C, C'）。この事は、小児脳実質、特に大脳皮質深層においては、GFAP 陰性のアストロサイトが存在することを示唆している¹⁵⁾。

大脳皮質の髄鞘化は、大脳皮質の各領域によってその完成時期が異なる事が知られている¹⁶⁾。症例 3 の MBP の発現（図 4C）から判断すると、本症例の小児側頭葉の白質においては、ある成人側頭葉の白質と遜色ない程度に髄鞘化が進んでいることが示唆される（図 4A, B）。また、本症例の大脳皮質（灰白質）深層における髄鞘化（図 4C）は、成人脳（図 4A, B）ほどに進んでおらず発達途上である事が示唆される。

結 論

ニューロンおよびグリア細胞特異的遺伝子の RNA プローブを用いた ISH 法により、ヒト脳病理切片において、脳の主要な構成細胞種が同定可能であることを明らかにした。新潟大学・脳研究所には、ヒト脳の病理検体の膨大な蓄積があり、各種遺伝子プローブを用いた ISH 解析を行うことにより、ヒト神経難病の病態研究や病理診断に広く応用できることが期待される。

謝 辞

本研究は、第 26 回新潟大学医学研究助成金（有壬基金）および新学術領域研究「グリアアセンブリによる脳機能発現の制御と病態」による支援を受け、平成 25 年度新潟大学医学部医学研究実習の一環として行われた。実験補助を行って頂いた森由紀子氏、高崎順子氏、丹田智恵子氏に御礼申し上げます。

文 献

- 1) In situ hybridization : principles and practice. Oxford University Press, Oxford, pp1 - 247, 1990.
- 2) 最新 染色法のすべて. Medical Technology 別冊. 医歯薬出版 2011.
- 3) Shinokuma A, Hirakawa N, Tamiya S, Oda Y, Komiyama S and Tsuneyoshi M: Evaluation of Epstein - Barr virus infection in sinonasal small round cell tumors. J Cancer Res Clin Oncol 126: 12 - 18, 2000.
- 4) 田宮貞史：免疫組織染色と in situ ハイブリダイゼーション：その手法と病理組織診断における意義. 福岡医学雑誌 97: 92 - 98, 2006.
- 5) Duong T, De Rosa MJ, Poukens V, Vinters HV and Fisher RS: Neuronal cytoskeletal abnormalities in human cerebral cortical dysplasia. Acta Neuropathologica 87: 493 - 503, 1994.
- 6) Eng LF and Ghirnikar RS: GFAP and astrogliosis Brain Pathol 4: 229 - 237, 1994.
- 7) Back SA, Luo NL, Borenstein NS, Volpe JJ and Kinney HC: Arrested oligodendrocyte lineage progression during human cerebral white matter development: dissociation between the timing of progenitor differentiation and myelinogenesis. J Neuropathol Exp Neurol 61: 197 - 211, 2002.
- 8) Akiyama H, Nishimura T, Kondo H, Ikeda K, Hayashi Y and McGeer PL: Expression of the receptor for macrophage colony stimulating factor by brain microglia and its upregulation in brains of patients with Alzheimer's disease and amyotrophic lateral sclerosis. Brain Res 639: 171 - 174, 1994.
- 9) Ding L, Takebayashi H, Watanabe K, Ohtsuki T, Tanaka KF, Nabeshima Y, Chisaka O, Ikenaka K and Ono K: Short - term lineage analysis of dorsally derived Olig3 cells in the developing spinal cord. Dev Dyn 234: 622 - 632, 2005.
- 10) Takebayashi H, Yoshida S, Sugimori M, Kosako H, Kominami R, Nakafuku M and Nabeshima Y: Dynamic expression of basic helix - loop - helix Olig family members: implication of Olig2 in neuron and oligodendrocyte differentiation and identification of a new member, Olig3. Mech Dev 99:

- 143 - 148, 2000.
- 11) Marie Y, Sanson M, Mokhtari K, Leuraud P, Kujas M, Delattre JY, Poirier J, Zalc B and Hoang - Xuan K: OLIG2 as a specific marker of oligodendroglial tumour cells. *Lancet* 358: 298 - 300, 2001.
 - 12) Lu QR, Park JK, Noll E, Chan JA, Alberta J, Yuk D, Alzamora MG, Louis DN, Stiles CD, Rowitch DH and Black PM: Oligodendrocyte lineage genes (OLIG) as molecular markers for human glial brain tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 98: 10851 - 10856, 2001.
 - 13) Barton LG, Michael JE, Bernd WS and Edward GS: Meningeal Hemangiopericytoma: Histopathological Features, Treatment, and Long - Term Follow - up of 44 Cases. *Neurosurgery* 25: 514 - 522, 1989.
 - 14) Otani N, Nawashiro H, Wada K, Minamimura K, Takeuchi S and Shima K: Anaplastic heman - giopericytoma manifesting as a rapidly enlarging extracranial mass lesion. *Asian J Neurosurgery* 7: 29 - 31, 2012.
 - 15) Matyash V and Kettenmann H: Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain Research Reviews* 63: 2 - 10, 2010.
 - 16) Gogtay N, Giedd JN, Lusk L, Hayashi KM, Greenstein D, Vaituzis AC, Nugent TF 3rd, Herman DH, Clasen LS, Toga AW, Rapoport JL and Thompson PM: Dynamic mapping of human cortical development during childhood through early adulthood. *Proc Natl Acad Sci USA*. 101: 8174 - 8179, 2004.

(平成26年5月7日受付)
