

脳腫瘍の分子生物

杏林大学医学部付属病院 病理部

小松 京子

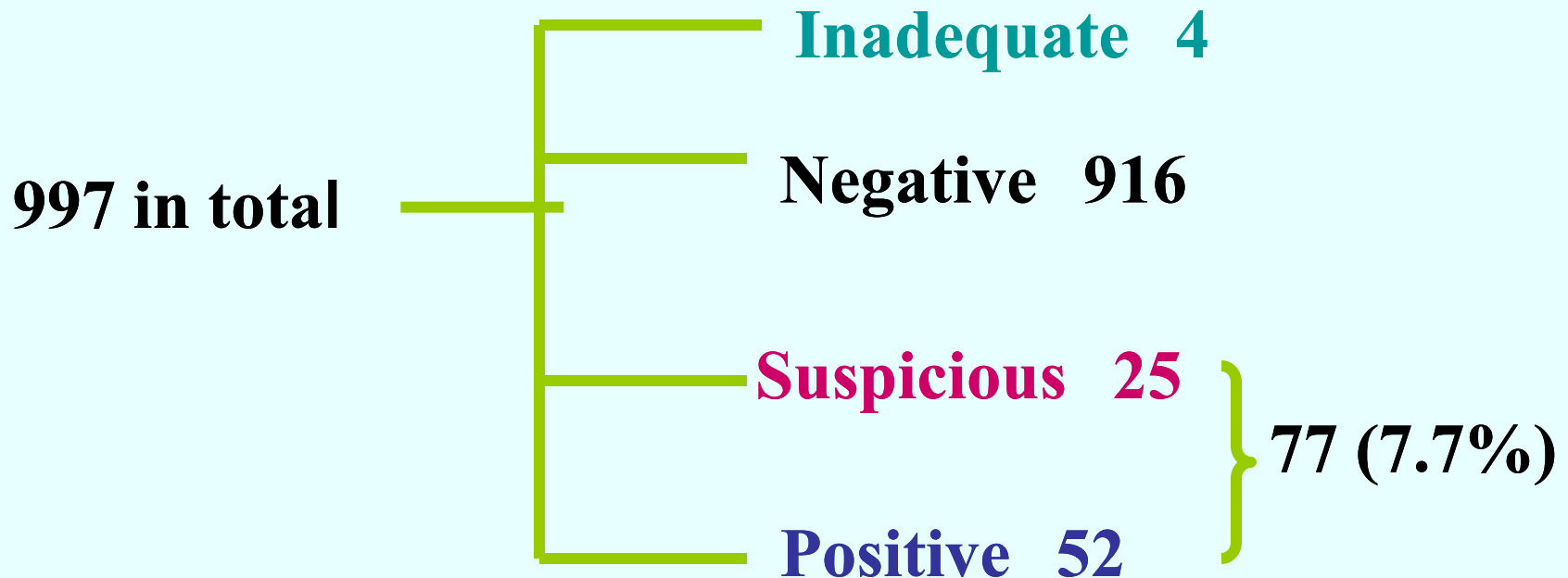
第49回日本臨床細胞学会 神戸

【目的】脳腫瘍の迅速診断において細胞診や免疫染色の併用は有効であるが、検体が少量の場合には、組織標本の作製・細胞診の圧座標本作製・免疫染色の併用等の全てを行うことが難しい場合もある。

また、脳脊髄液は、脳腫瘍のうち悪性リンパ腫や転移性腫瘍の診断には最も有効な手段であり、組織検体の採取が難しく、細胞診が唯一の情報源となることも少なくない。我々は脳腫瘍検体や脳脊髄液を有効に活用することを目的として、器具の洗浄による集細胞での免疫染色や遺伝子増幅、を併用し、診断への有用性を検討しているので報告する。

脳脊髄液検体に関する免疫染色と遺伝子解析

2000年から2005 までの脳脊髄液検体の検体数と陽性率である。997 症例中7.7%が細胞診陽性であった。



Categories of Positive Cases

Malignant Lymphoma 22
Leukemia 11 } 65%

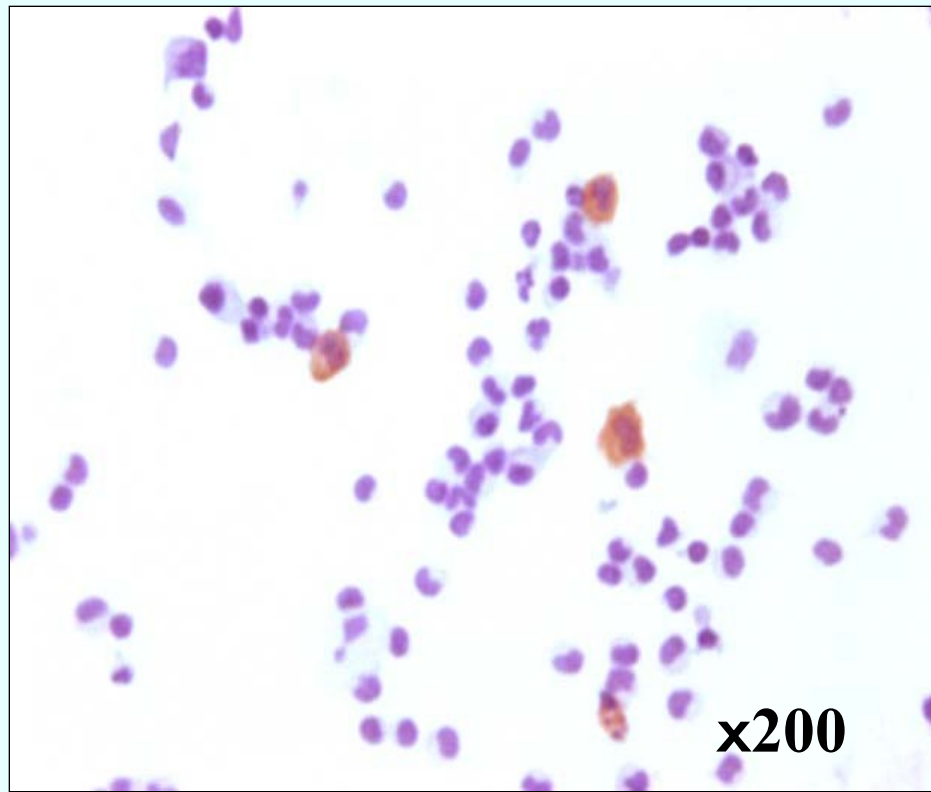
Metastatic carcinoma 17

Lung(adenocarcinoma 10, small cell carcinoma 1), Stomach 3, Renal cell ca 1, Breast 2

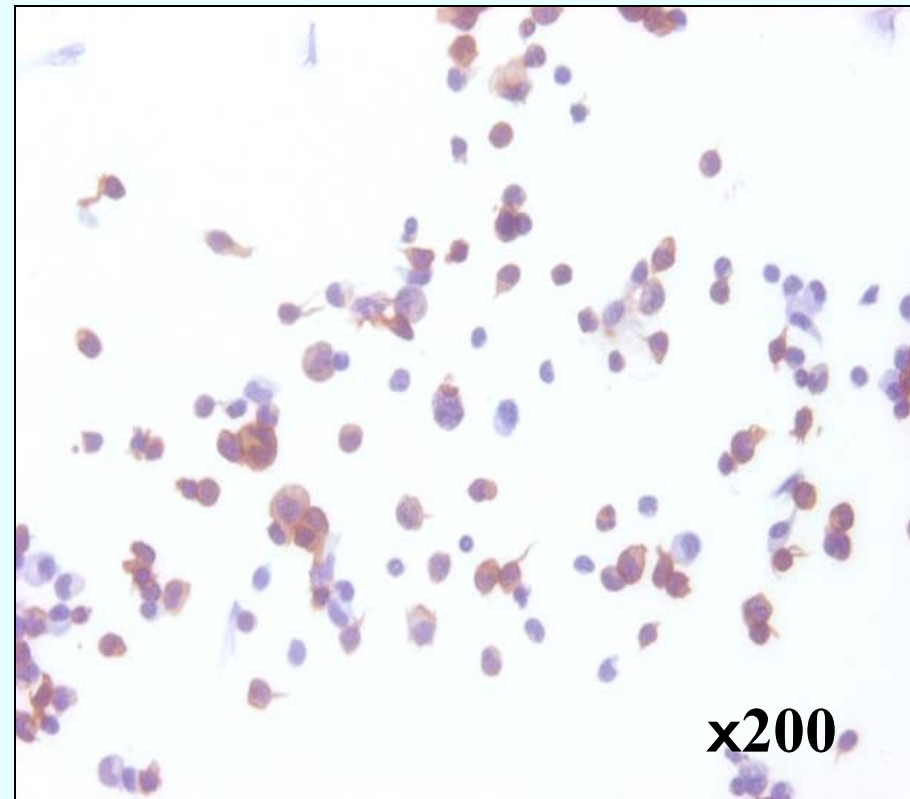
Brain Tumor 2

Glioblastoma 1, Medulloblastoma 1

Immunocytochemical staining for meningitis

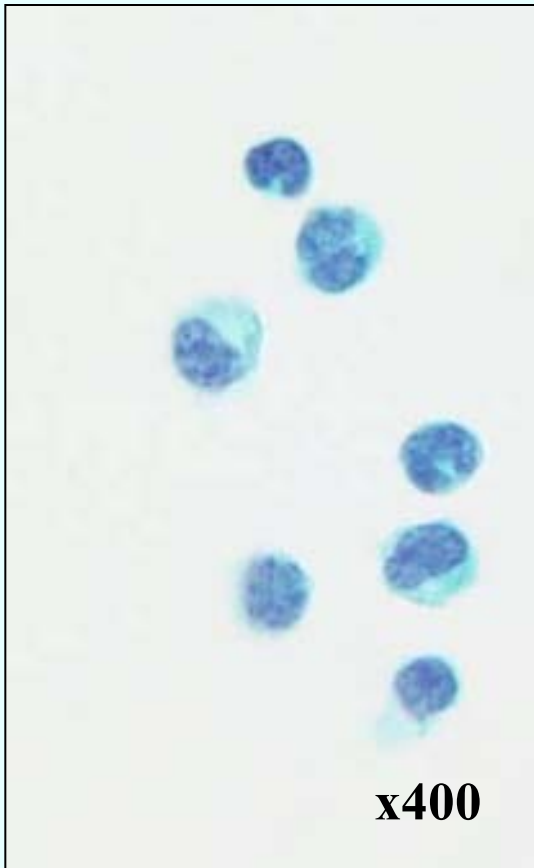


B CELL Marker (L26)

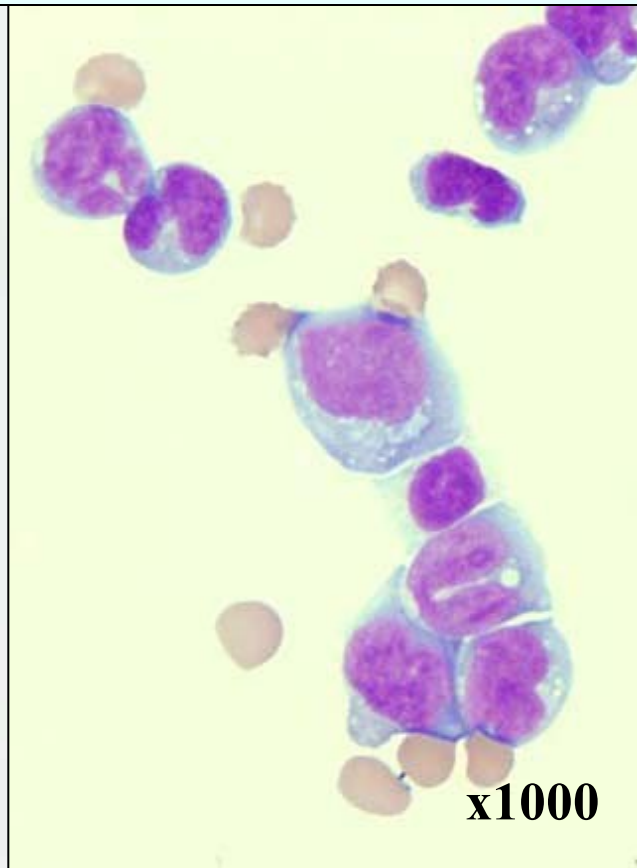


T cell Marker (Uchl-1)

Cytology of ATL



**Papanicolaou
Stain**



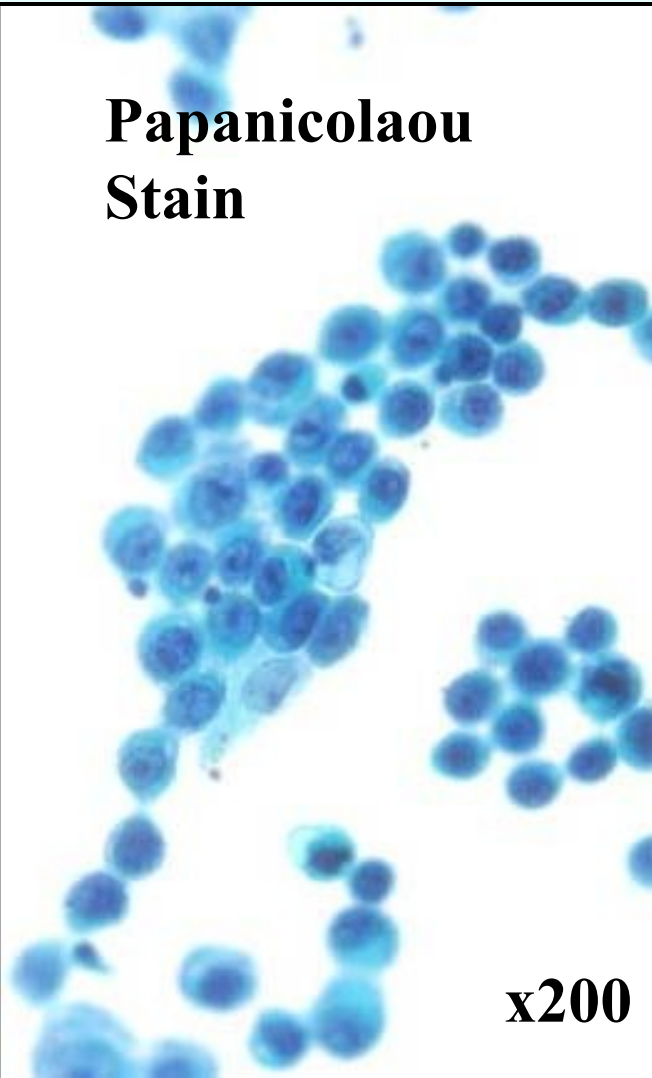
Giemsa Stain



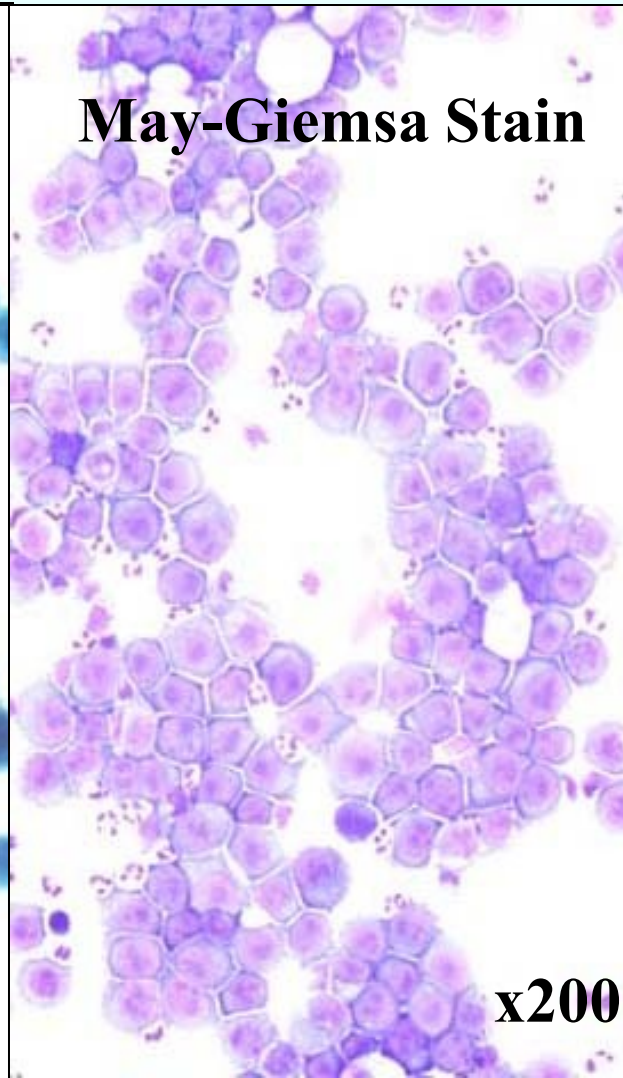
**Immunocytochemical
staining**

Metastatic carcinoma (Lung : adenocarcinoma)

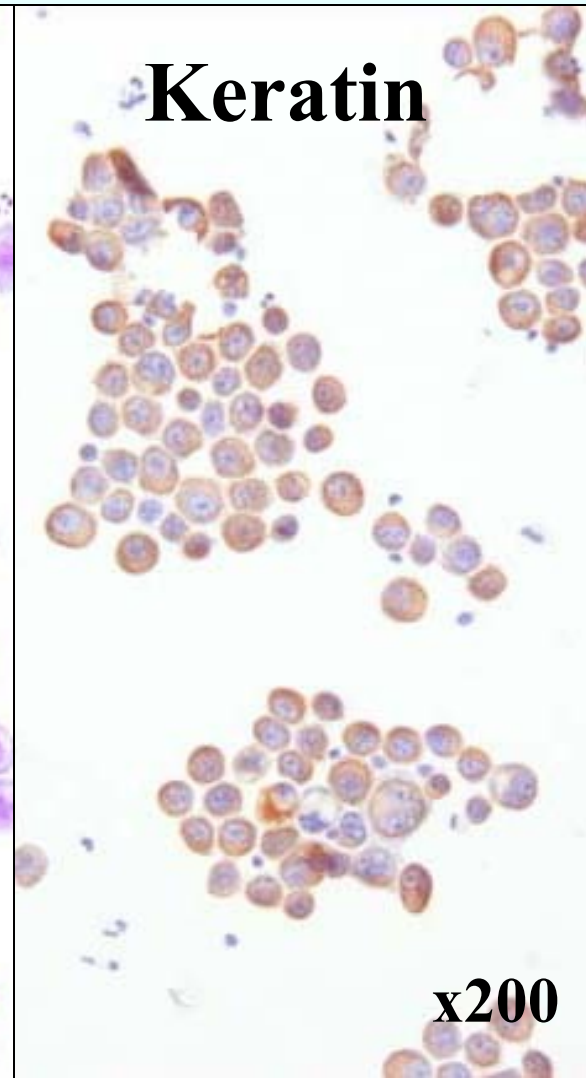
**Papanicolaou
Stain**



May-Giemsa Stain



Keratin



脳腫瘍において有用な免疫染色と遺伝子解析

脳腫瘍関連における免疫染色は有用であるが、特定の腫瘍型だけに特異的なマーカーは存在せず、推定される鑑別診断として活用し、臨床情報も加味しながら判定することが望ましい。

Astrocytic tumor : GFAP(分化が低くなると染色性が悪くなる。), S-100、

Oligodendroglioma : Olig-2(特異性は完全ではない), GFAP, S-100, etc

Medulloblastoma : シナプトフィジン,

遺伝子: 50%にisochromosome [i(17q)]

Central neurocytoma : シナプトフィジン, NeuN, Class III β -tubulin, NSE

Olfactory neuroblastoma : シナプトフィジン、NSE、MAP

Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT)

: EMA, α -smooth muscle actin, vimentin, *hSNFS/INI1* 遺伝子産物

遺伝子: 22番染色体の欠失ないしモノソミー

Meningioma : vimentin, EMA, cytokeratin, etc

遺伝子: 22番染色体の欠失、NF2 gene mutation

Hemangioblastoma : VEGF (Glioma等でも陽性)

DNA変異解析

- DNA抽出
- PCR法による標的遺伝子の増幅
(方法はRNAの場合と同じ)
- PCR-SSCP法による変異の検出
泳動装置：AE-6510 ゴルマックス・二連ミニスラブ
(ATTO)
ゲル：e-パジェル(12.5%ポリアクリルアミドゲル)
(ATTO)
銀染色：2D銀染色試薬・Ⅱ「第一」(第一化学)
- DNAダイレクトシーケンス法による変異の解析：
ダイターミネータ法による。
システム：ABI PRISM 310(Applied Biosystems Inc.)

RNA発現解析

○RNA抽出

グアニジン系の溶解液を使用

○RT-PCR法

抽出したRNAから逆転写酵素を用いてcDNAを合成
サーモスクリプト RT-PCRシステム(Gibco BRL)

※ 得られたcDNAを用いてPCRを行う

プライマー： β -actin mRNA (内部標準)

およびMMP-2、MMP-9 mRNA

※ Taq polymerase :

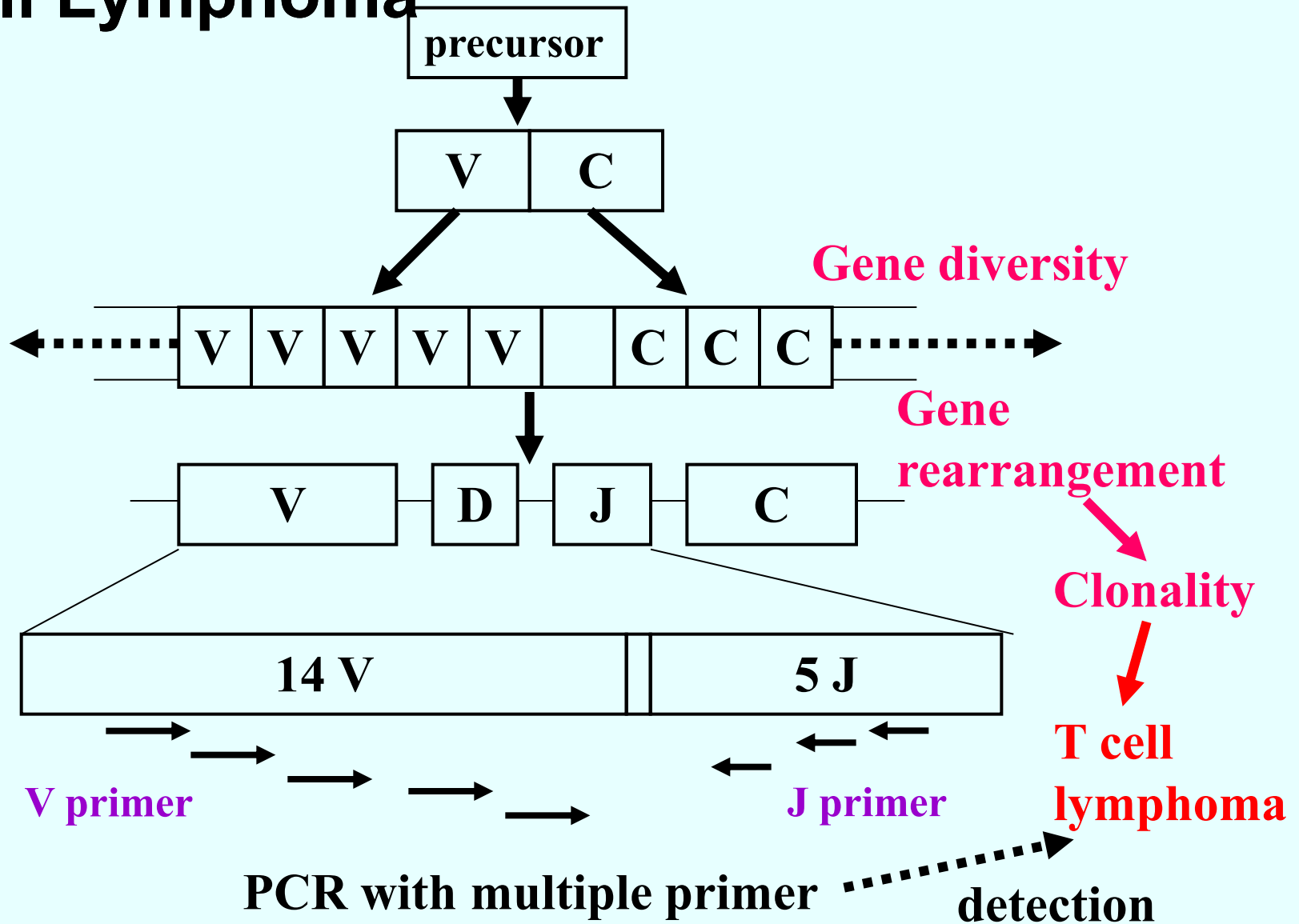
AmpliTaq Gold™ (Applied Biosystems Inc.)

サーマルサイクラー：PC-808(ASTEC)

※ ゲル染色：

SYBR Green I (フナコシ)を用いて染色

T cell receptors gene rearrangement and T cell Lymphoma

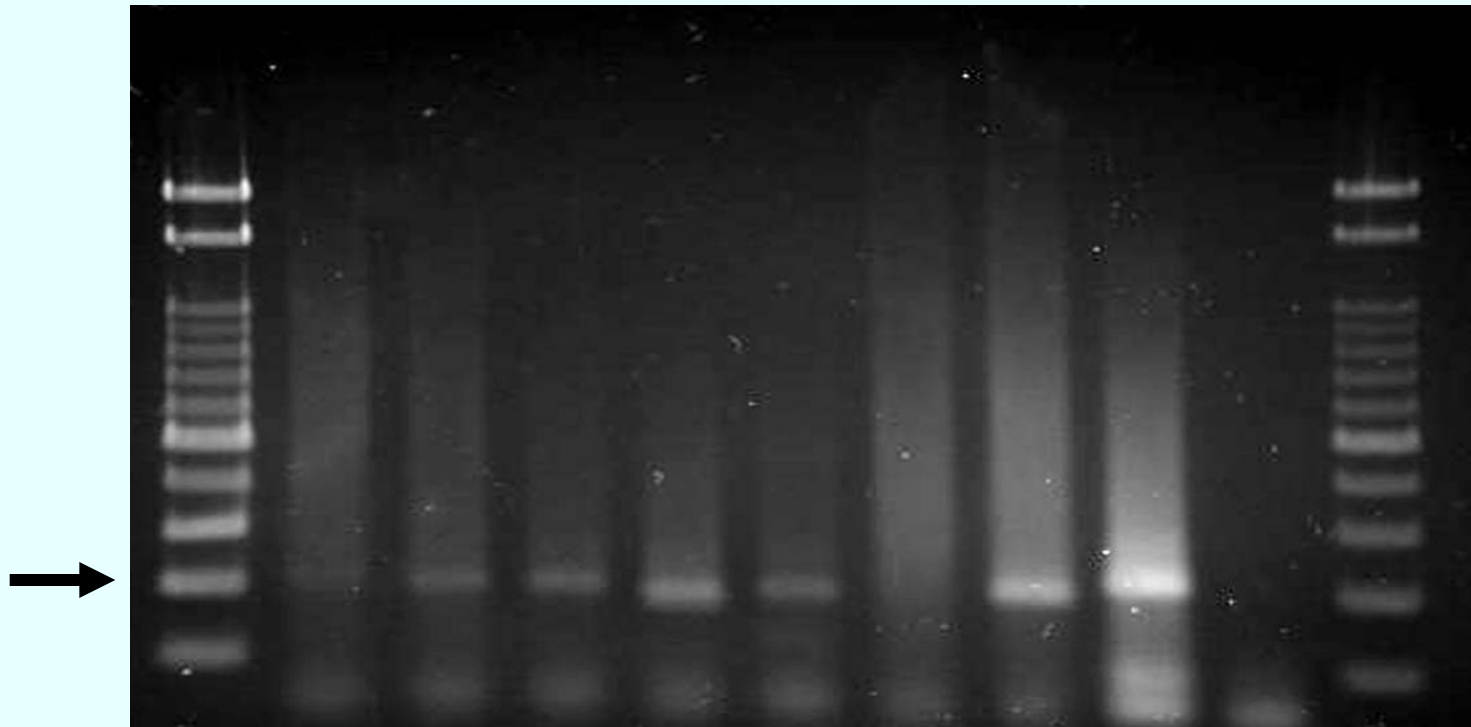


Detection of T cell receptor gene rearrangement by PCR

Paraffin
embedded section

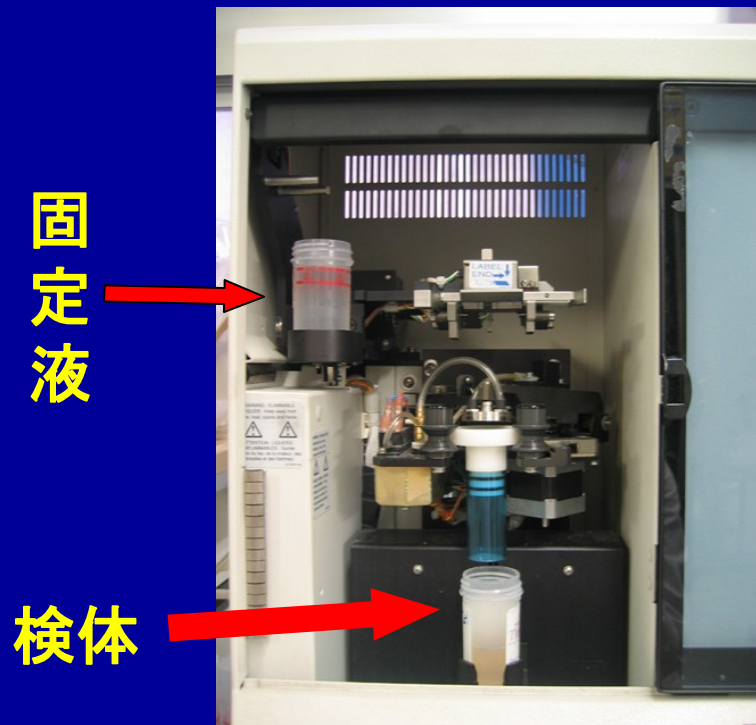
Cytology
samples

M 1 2 3 4 5 6 7 P N M



LBCを用いた場合の細胞形態学的な変化と免疫染色への影響

Cytic CorporationのThinPrepを用いた 細胞診標本作製法



残りの検体で遺伝
子解析を行う

検体の採取



CytoLyt液あるいは
PreservCyt液中で洗う

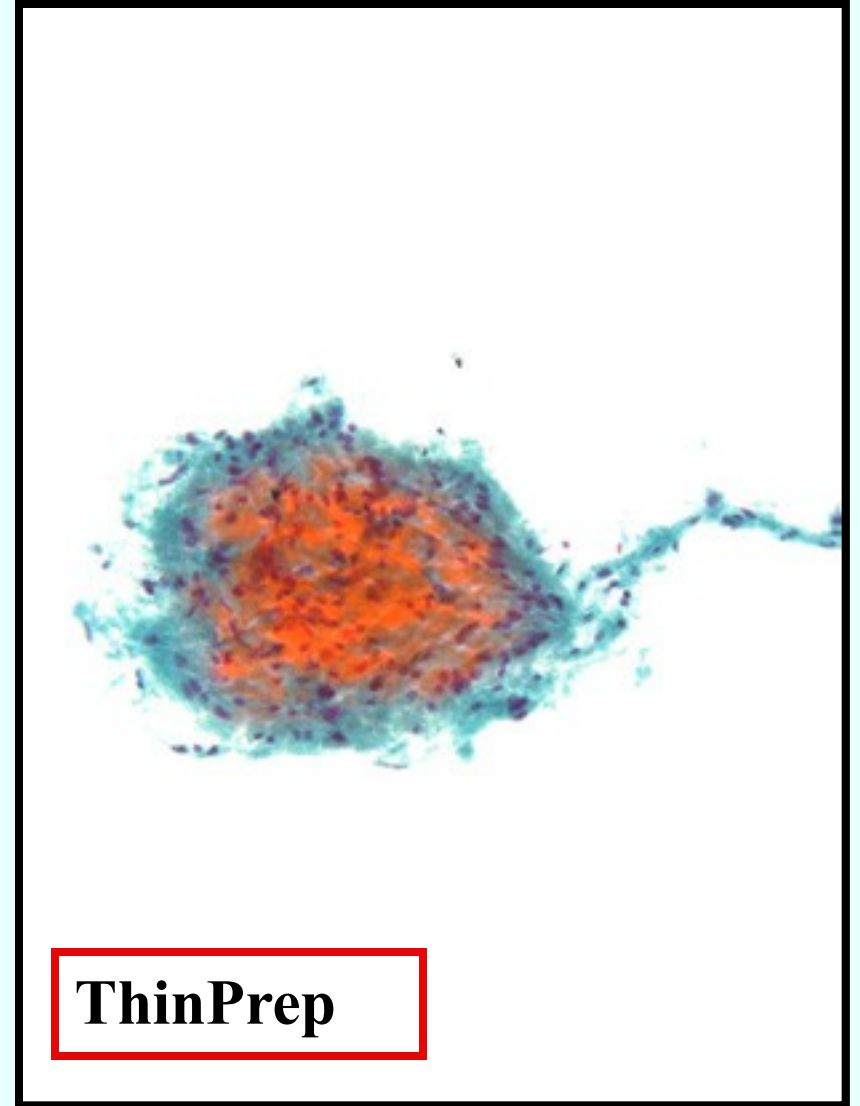
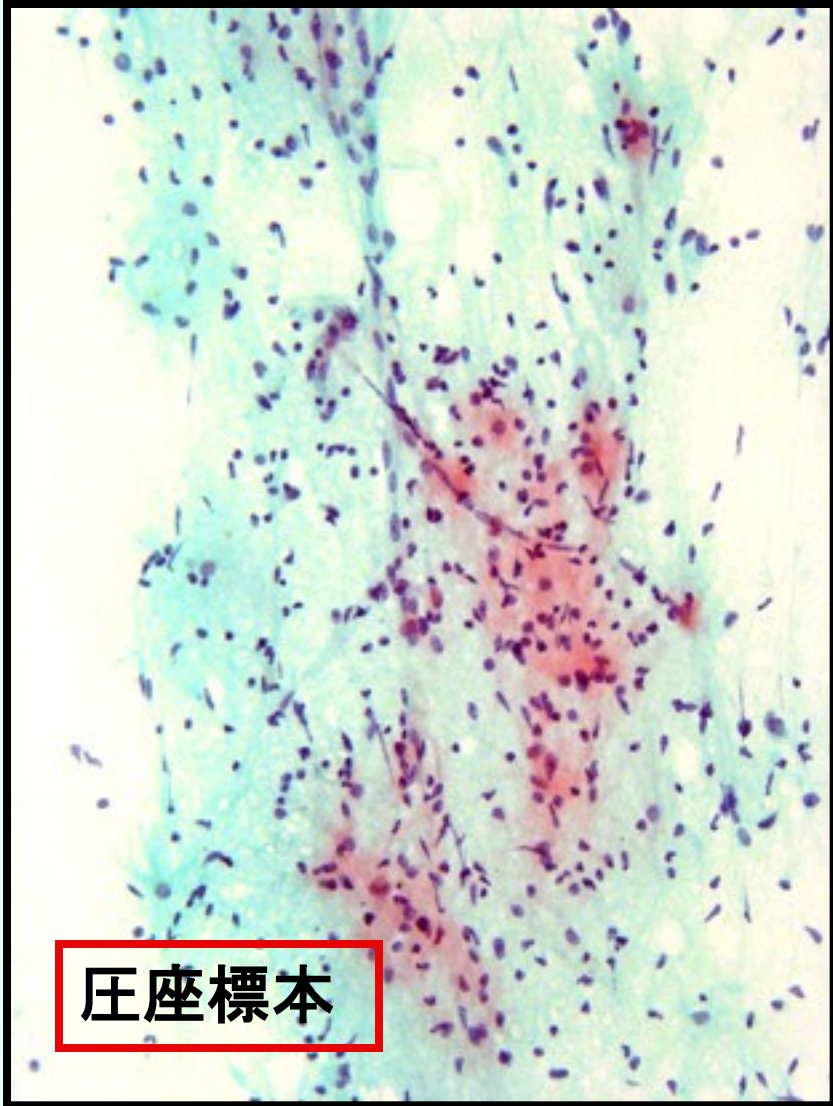


ThinPrepで標本作製

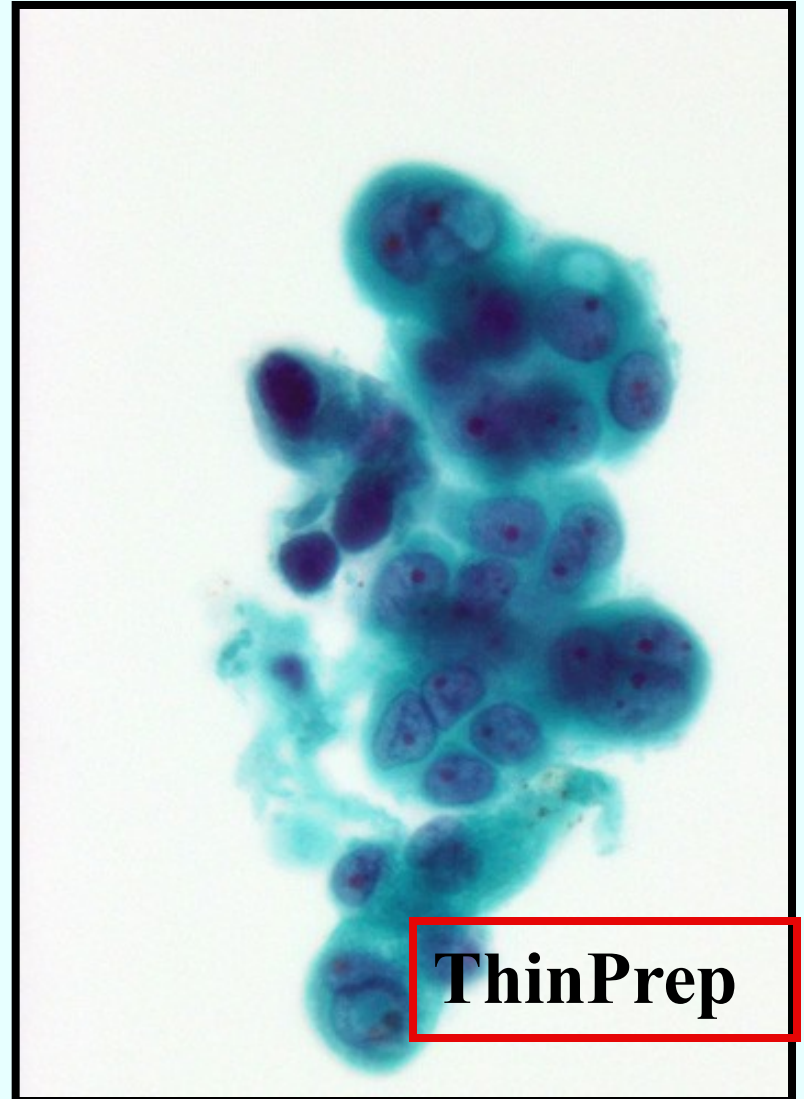
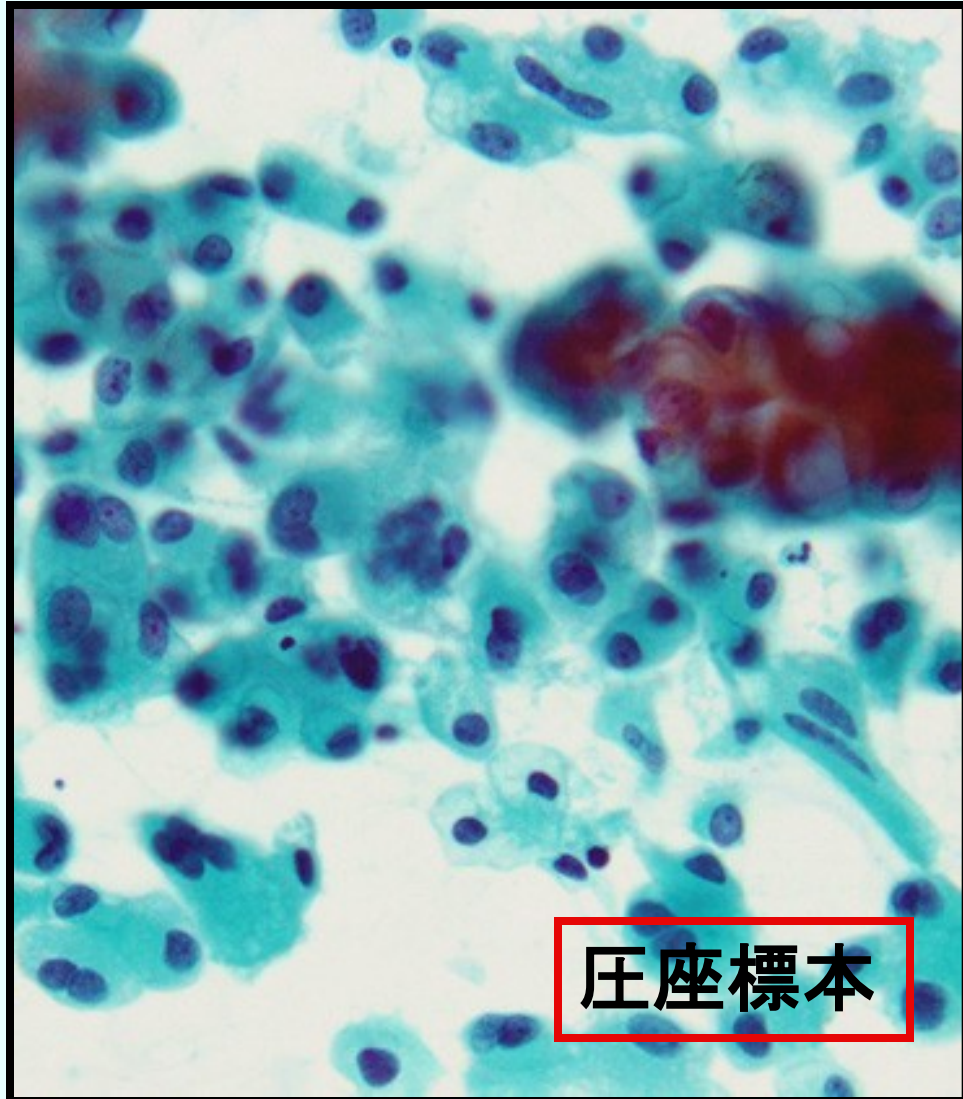


固定・染色・封入

脳腫瘍(G2)



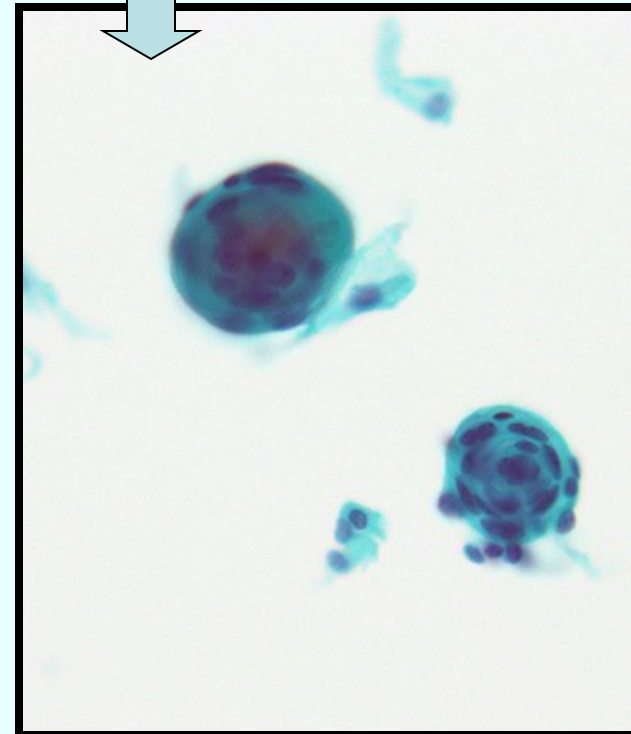
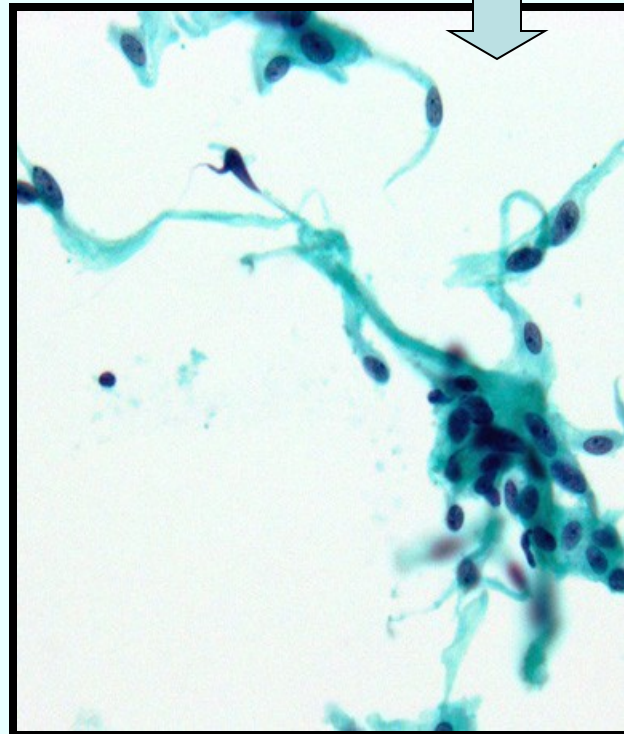
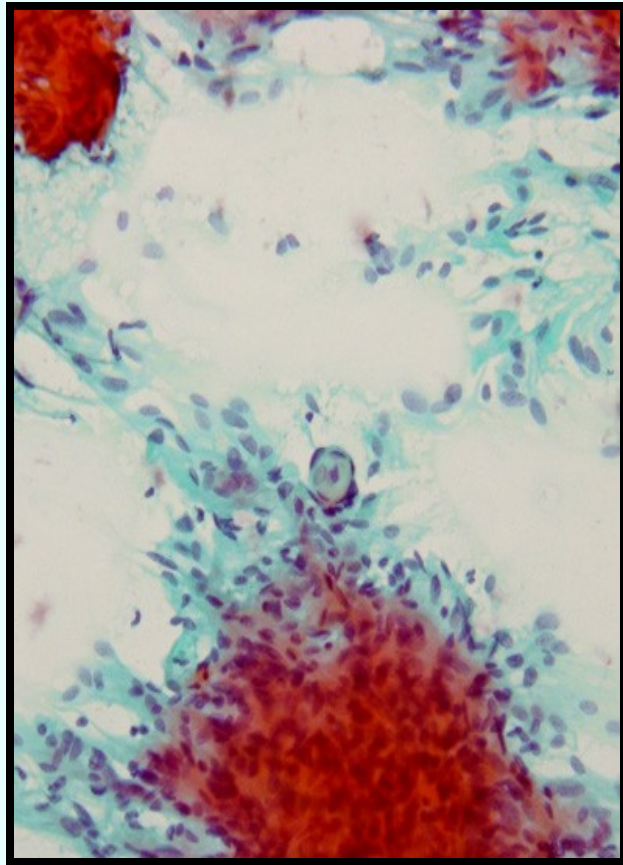
Metastatic carcinoma



Meningioma

ThinPrep

压座标本



脳腫瘍における液状処理は、

- ①集細胞の手段として有用である。。
- ②神経線維は明瞭であるが、血管との関係は圧座標本が優れている。
- ③転移性の癌に有用である。
- ④検体が微量であることが多いので、特にbiopsyには効果的な手段となる可能性が示唆された。

LBCを使用した遺伝子の抽出と解析

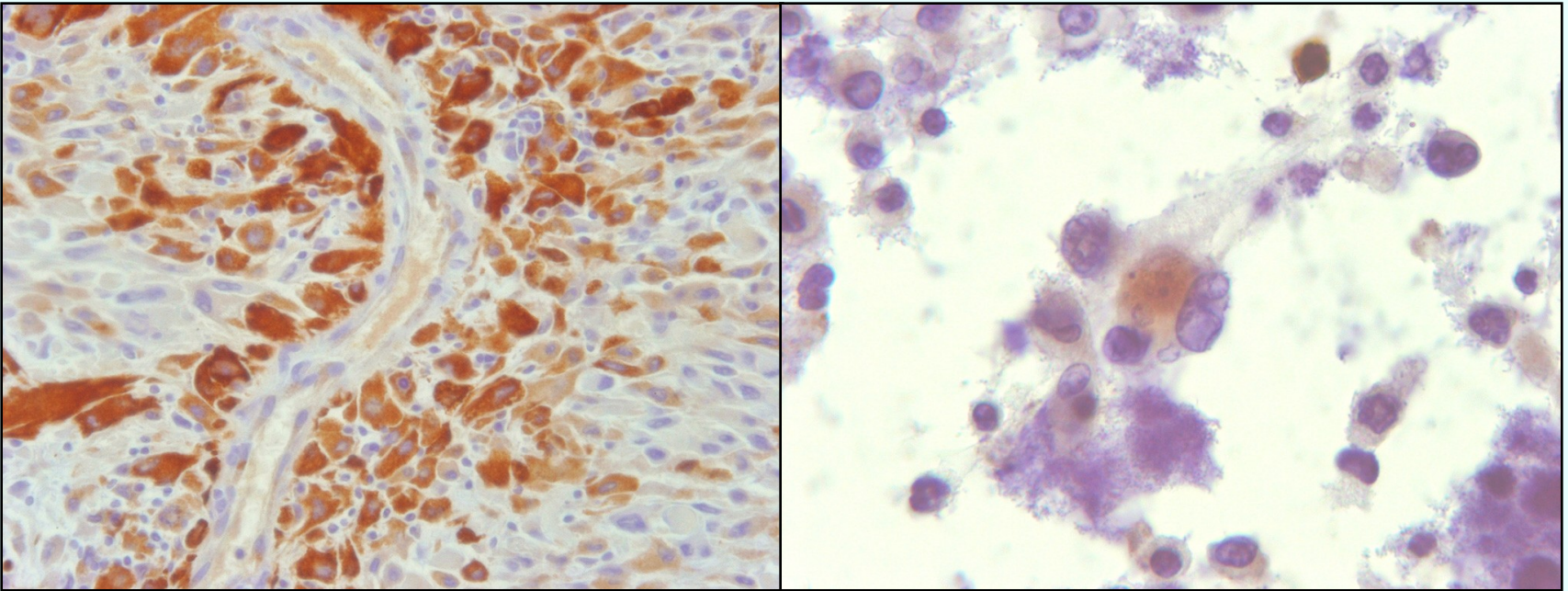
〔方法〕

脳腫瘍標本作製後の残りLBCの保存液中でピンセットやガーゼ等を洗い、圧座標本との形態学的な比較検討ならびに免疫染色を行った後の検体から遺伝子抽出を行い、Matrix metalloprotenases-2(MMP-2)とMatrix metalloprotenases-9(MMP-9)のmRNAの定量ならびにその有用性を検討した。また、これらの抗体を使用した免疫染色の検討も行った。

MMPs(matrix metalloprotenases)

MMPs(matrix metalloprotenases)は、間質マトリックスの代謝に関与する一群の酵素群であり、ドメイン構造と基質特異性から5群に分類される。MMP-2と9は、ゼラチンやIV型コラーゲンを分解するゼラチナーゼ群で、癌の浸潤や転移に関与していると言われている。我々は脳腫瘍において、MMP-2、9の過剰発現及びp53遺伝子変異の有無を検索し、組織型・生物学的悪性度等との関連性を検討している。

Anti MMP-2 : mono, x10, Daiichi Fine Chemical



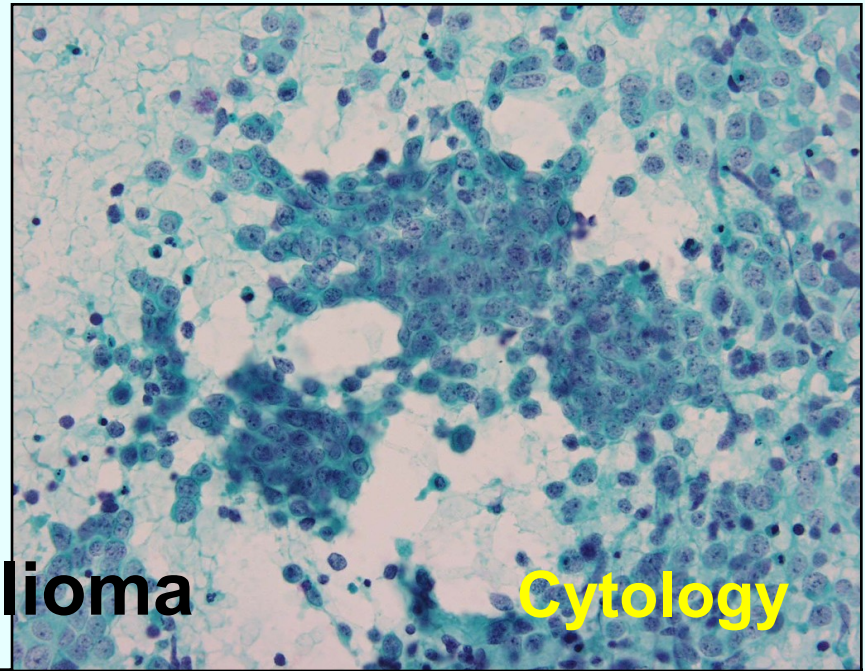
Histology

LBC

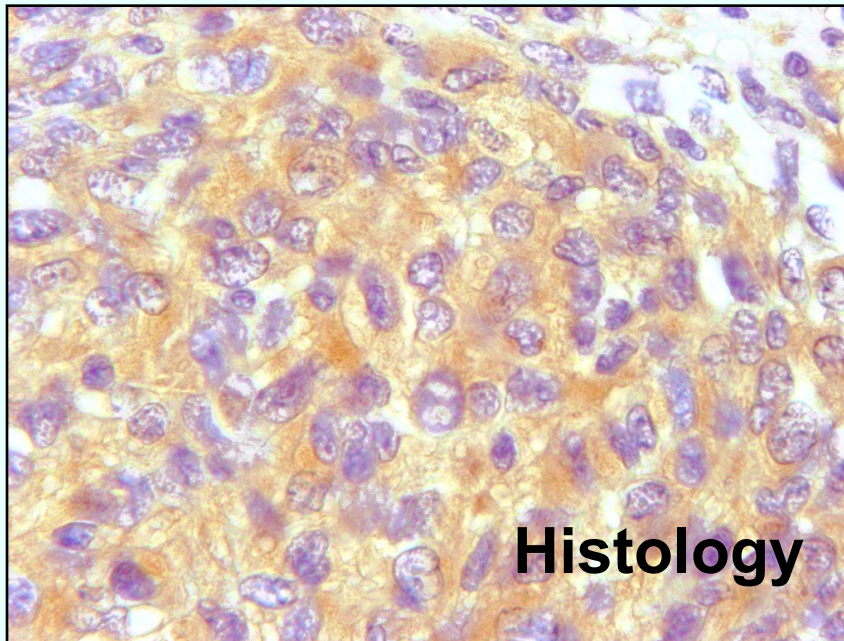
Glioblastoma症例

Anti MMP-9 : mono, x100, Daiichi Fine Chemical

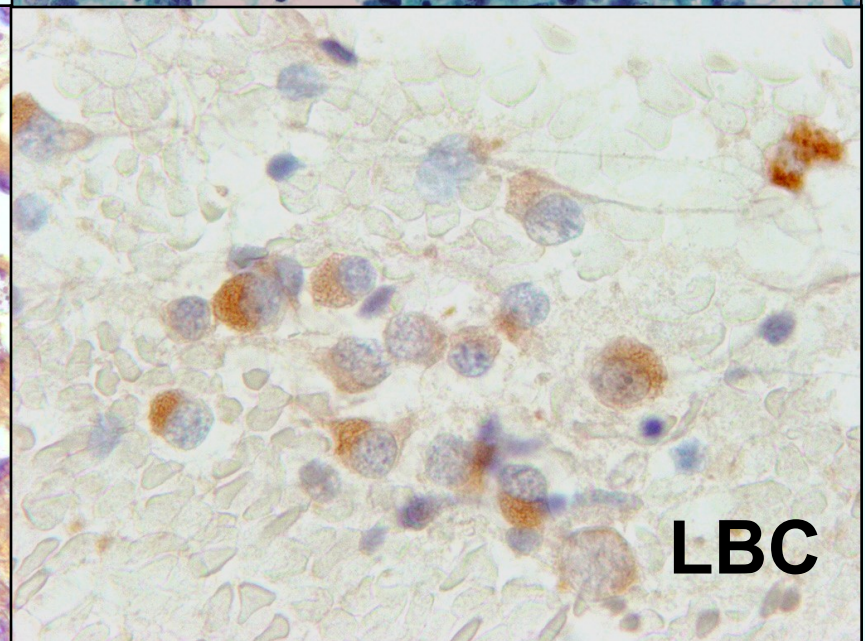
Anaplastic oligodendroglioma



Cytology



Histology

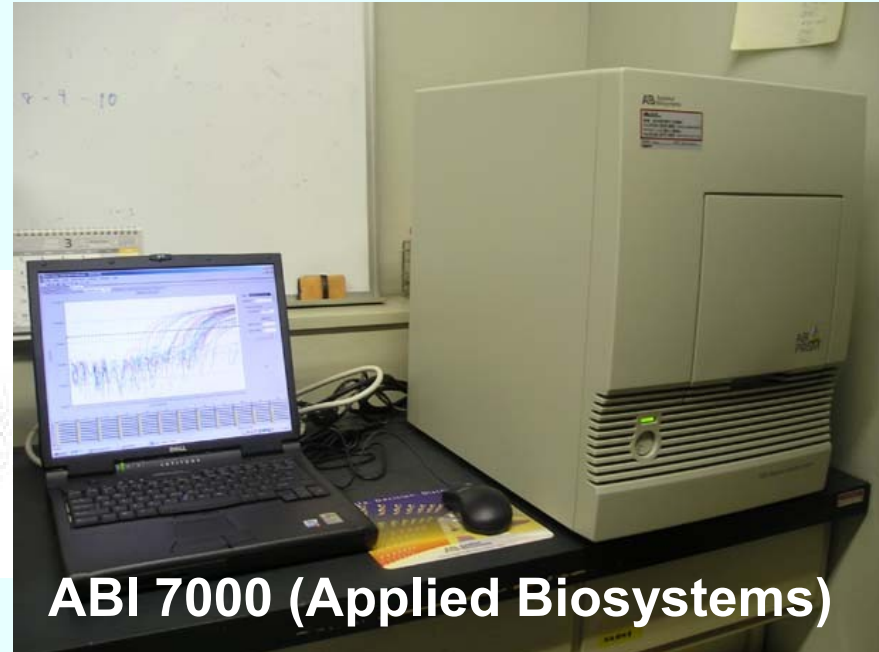
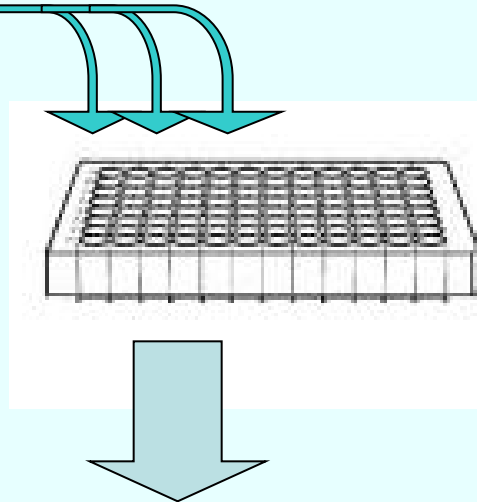


LBC

Real-time PCR

Gene expression is determined quantity relatively or absolutely by real-time PCR method.

96 well plate **total 25 μ l**
Master Mix
Forward primer
Reverse primer
TaqMan probe
Water
Template DNA



95°C 5 min
95°C 30 sec
60°C 1 min } 40–50 cycles

Data is analyzed automatically by computer software.

Total time: 2.5 hrs

Primers used for RT-PCR of MMP-2 and MMP-9

		Sequence	Length(bp)
MMP-2	Forward	5' – TTGACGGTAAGGACGGACT	153
	Reverse	5' – CTTGCAGTACTCCCCATCG	
MMP-9	Forward	5' – TTGACAGCGACAAGAAGTGG	148
	Reverse	5' – CCCTCAGTGAAGCGGTACAT	

Standard samples for real time quantitative PCR

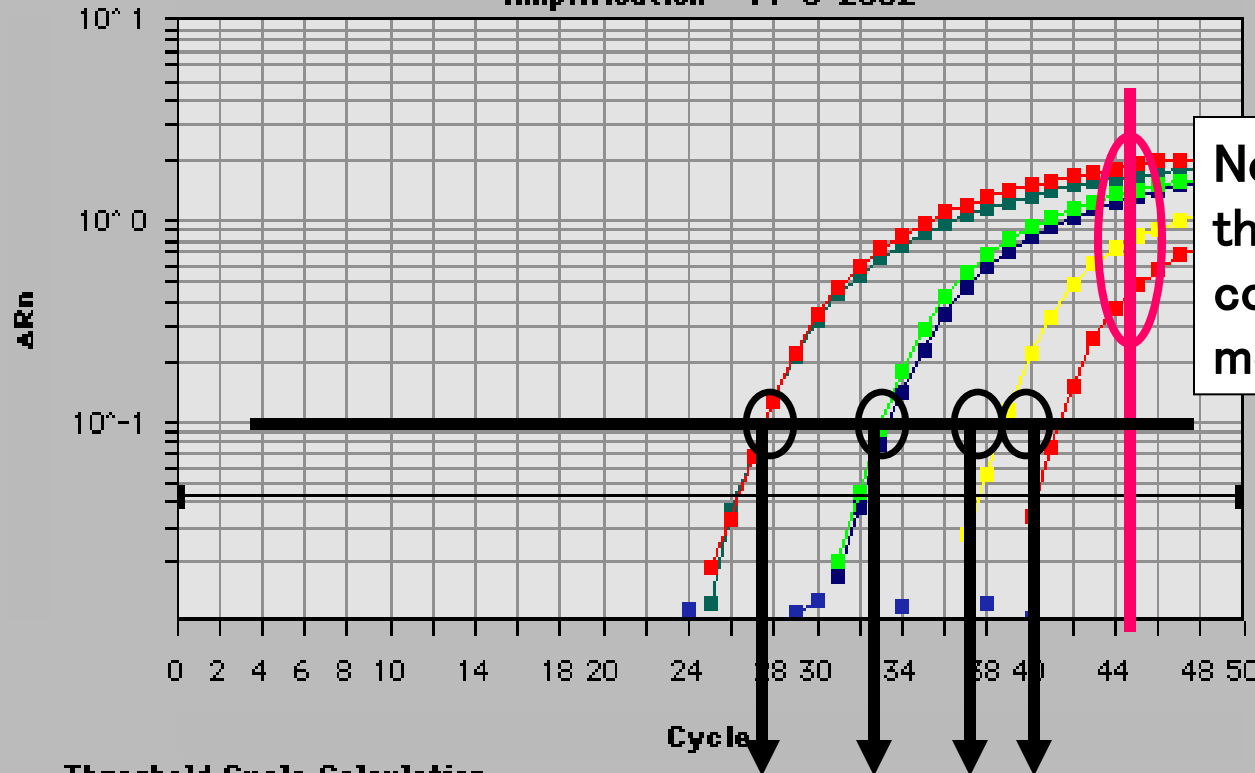
Sample: PCR products of **GAPDH** and **MMP-2,9**

Quantity = Concentration of PCR products

/Molecular weight of target sequences

They were diluted from 10^6 to 10^3 copies/ μ l.

Amplification - 17-5-2002



No difference among the data by conventional PCR method

Samples

- JOE - A1 ■
- JOE - B1 ■
- JOE - B2 ■
- JOE - B3 ■

Viewer:

Reporter:

Well correlation between the starting quantity of the target fragment and the cycle time achieve the same fluorescent intensity.

Threshold Cycle Calculation

Thres

Use Thre

Mult. * S

Omit Thre

Base

Start: Stop:

JOE - A4	50.000	0.001	▲
JOE - A5	50.000	0.002	▼

Quantitative analysis for MMP-2、9mRNA

Sample	diagnosis	Control	MMP-2	MMP-9
		Quantity(copies/ μ l)		
組織1	GBM	24221.4	0.10	1.26
細胞1	GBM	118.7	0.06	0.93
組織2	G3	199398.6	0.37	0.87
細胞2	G3	420.1	0.68	2.70
組織3	G3	3831.2	0.15	1.38
細胞3	G3	4044.2	0.12	1.02

【結果】我々の組織学的なデータでは、MMP-9は定量値と組織型とに相関が見られ ($p < 0.05$)、MMP-2の定量値と広汎な浸潤広汎な浸潤・播種・再発が認められた症例との間に相関が認められている ($p < 0.05$)。

細胞診検体でのmRNA定量データは組織でのデータと相関していた。

遺伝子抽出は腫瘍細胞十数個単位でも遺伝子の抽出は可能であり、冷蔵保存1年後でも可能であった。

結論

MMP-2の過剰発現は広汎な浸潤・播種・再発と相関し、MMP-9の過剰発現は組織型と相関した。

中枢神経組織では、astrocyteなどの胞体や突起などで充満しておりマトリックスは一定で20nmであるといわれている。細胞外マトリックスは脳浮腫により、発達する。

MMPの細胞内に存在する量MMPがmRNAから前駆体(pro)型のタンパク質として合成され細胞外に分泌され、活性型のプロテアーゼになる。細胞質内のMMPの量と活性化とは異なる。

MMP-9は血管との関連がみられ、blood brain burrierやサイトカインとの関連が示唆される。

MMP-2、9の免疫染色による局在の観察とRT-PCRによるmRNAの発現解析と定量化、p53遺伝子変異解析などは、形態学的検索とともに再発・浸潤に関する有用な情報を提供すると考えられる。