

悪性神経膠芽腫（グリオーマ）以外の脳腫瘍における O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) 抗体の染色性の検討

西脇 崇裕貴¹⁾ 竹中 勝信¹⁾ 加藤 雅康¹⁾ 野中 裕康¹⁾ 趙 振新¹⁾ 岡本 清尚²⁾

1) 高山赤十字病院 脳神経外科

2) 高山赤十字病院 検査部・病理診断科

Immunohistochemical study of O6-methylguanine DNA methyltransferase in brain tumors except glioma

Nishiwaki Takayuki, MD¹⁾ Takenaka Katsunobu, MD PhD¹⁾ Kato Masayasu, MD PhD¹⁾
Nonaka Yuko, MD PhD¹⁾ Cho Shinshin, MD¹⁾ Kiyohisa Okamoto, MD PhD²⁾

1) Japanese Red Cross Takayama Hospital, Department of neurosurgery

2) Japanese Red Cross Takayama Hospital, Department of Clinical Laboratories, Diagnostic pathology

【BACKGROUND】

A lot of studies of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) protein expression have been reported in glioma. However, there are few reports assessed the protein expression in other brain tumors except glioma.

METHODS: Five brain tumors except glioma (two primary central nervous system lymphomas; PCNSLs, one germinoma, one hemangioblastoma, and one Rathke's cleft cyst) were immunostained using a commercial anti-MGMT antibody (Chemicon international: MAB16200; clone MT3.1). Three glioblastomas were also immunostained with the same antibody. We assessed MGMT protein expression semiquantitatively (low expression was defined as 20~50% immunostained tumor cells, and high expression was defined as >50% immunostained tumor cells).

RESULTS: Two PCNSLs were assessed as high expression. Germinoma was also assessed as high expression. In contrast, Hemangioblastoma was assessed as low expression and Rathke's cleft cyst was no expression.

CONCLUSIONS: By using immunohistochemical assessment of MGMT protein expression, it might help us to understand the features in brain tumors except glioma.

【Key Words】 MGMT, lymphoma, immunostaining

I 研究の目的

グリオーマ細胞においては、その治療薬であるテモゾロミド（TMZ）などのアルキル化剤がDNA構造の変化をもたらすことで、抗腫瘍効果を発揮するが、DNAの修復酵素であるO6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT)の蛋白が多く発現している場合には、TMZに抵抗性を示し予後が悪いことも摘されている^{1) 2) 3)}。グリオーマに対してTMZが標準治療となっていることから腫瘍とMGMTとの関連を調べた研究

は多い。しかしグリオーマ以外の脳腫瘍細胞においては、その検討（4, 5）が十分でないため本研究を計画した。

II 対象

高山赤十字病院にて手術により摘出された原発性悪性リンパ腫（PCNSL）（2例）、germinoma（1例）、hemangioblastoma（1例）、ラトケ嚢胞（1例）の摘出標本を対象とし、免疫染色を実施した。なお、3例のグリオーマ症例も

No.	病理診断 (WHO grade)	性別	年齢	初診時 KPS	摘出率	再発	生死	観察期間	Chemo (使用期間/継続)	MGMT 免疫
1	GBM(IV)	F	73	90	STR	±	生	4年10か月	TMZ(継続)	陽性
2	GBM(IV)	M	73	90	GTR	+	生	2年	TMZ(継続),Bev,BCNU	陽性
3	GBM(IV)	M	60	70	STR	+	死	2年8か月	TMZ(2年4か月),Bev	陰性
4	PCNSL,DLB(IV)	M	65	90	STR	-	生	10年	MTX+RT	陽性
5	PCNSL,DLB(IV)	M	66	90	GTR	-	生	2年2か月	MTX+RT	陽性
6	Germinoma(IV)	M	17	90	STR	-	生	1年	CARE+RT	陽性
7	Hemangioblastoma(I)	M	78	90	GTR	-	生	1年	なし	弱陽性
8	Rathke cleft cyst	M	43	90	開放術	-	生	2年	なし	陰性

図1 染色腫瘍一覧・結果

同様の染色を行った(図1)。脳腫瘍の病理標本を用いたこの研究は、高山赤十字病院倫理委員会の承認を得て実施された。

Ⅲ 抗体と染色法

MGMTの免疫染色法は、脳腫瘍患者からの摘出標本をホルマリン固定後のパラフィンブロックを用いた。脱パラフィン後、抗原賦活化は、0.01Mクエン酸緩衝液(pH6.0)処理をオートクレーブ中で10分間(121℃)行った。一次抗体はマウス抗MGMTモノクローナル抗体(Chemicon internatinoal社;MAB16200:Anti-MGMT Antibody,clone MT3.1)を500倍に希釈して使用し、4℃で一夜(12~16時間)をかけて十分に反応させた。二次抗体には、ペルオキシダーゼ標識抗ウサギIgGポリクローナル抗体(ニチレイ #424144)を用いて、室温下で30分反応させ、可視化のために3'-3'-Diaminobezidine-4HCl(DAB社)で発色反応を行った。HE染色を同時に行い、連続切片には、HE染色のみを単独で行うことで、対比観察を可能にした。免疫染色の評価は、血管内皮細胞をpositive controlとして、腫瘍細胞の染色性を、適切な視野の中での陽性率で判断した(<20%:陰性、20~50%:弱陽性、>50%:陽性)。

Ⅳ 結果

PCNSLの2例はいずれも、異常リンパ球と思われるN/C比の高い、核の大きな細胞に染色性を認めた。弱拡大でみると、特に右側の組織写真(図2;No.5)では染色範囲が少ない印象を受けるが、強拡大でみると、perivascular cuffingにみられる腫瘍性リンパ球に一致して、染色性を示

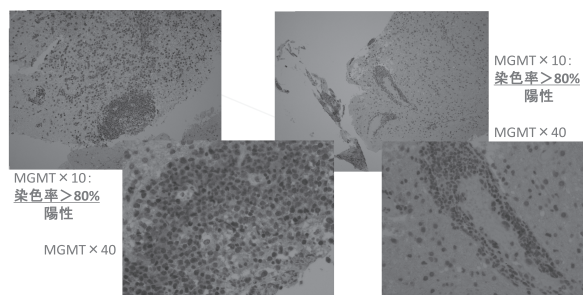
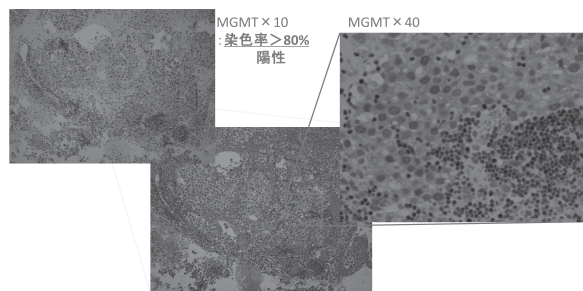
図2 【病理所見】 No.4:PCNSL;DLB
No.5:PCNSL;DLB

図3 【病理所見】 No.6: Germinoma

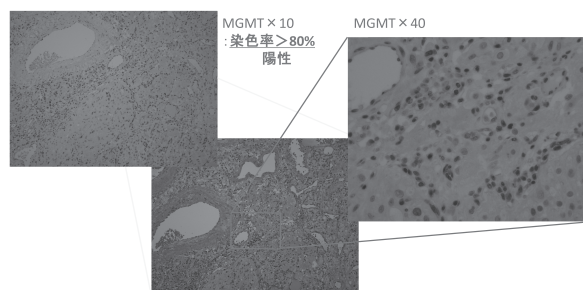


図4 【病理所見】 No.7: Hemangioblastoma

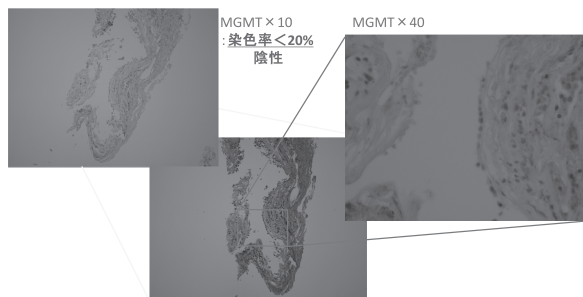


図5 【病理所見】 No.8: Rathke cleft cyst

No.	病理診断 (WHO grade)	再発	生死	観察期間	MGMT 免疫	(MGMT陽性率)
1	GBM(IV)	±	生	4年10か月	陽性	GBM:2/3 (67%)
2	GBM(IV)	+	生	2年	陽性	
3	GBM(IV)	+	死	2年8か月	陰性	
4	PCNSL,DLB(IV)	-	生	10年	陽性	PCNSL:2/2 (100%)
5	PCNSL,DLB(IV)	-	生	2年2か月	陽性	
6	Germinoma(IV)	-	生	1年	陽性	Malignant glioma以外の 脳腫瘍でも陽性例が 多いことが予想される
7	Hemangioblastoma(I)	-	生	1年	弱陽性	
8	Rathke cleft cyst	-	生	2年	陰性	

図6 染色腫瘍一覧・結果

しており、ほとんどすべての細胞が染まっているため、陽性と判断した。

Germinoma (図3 ; No.6) では、two cell patternのいずれの細胞にも染色性を示しており、染色率も高いため陽性とした。

Hemangioblastoma (図4 ; No.7) でも豊富な血管網内に存在するstromal cell(間質細胞=核が濃く、大小不同、細胞質は抜けている)の大半が染色されており、こちらもMGMT陽性と判断した。

ラトケ嚢胞では、上皮が配列した部分で薄く染まっている部分も認めるが、全体としては染色率が2割に満たないため、MGMT陰性と判断した。

V 考察

悪性リンパ腫ではMGMT非高発現例でTMZが有効であるという報告(6)もある一方で、今回、自験例での悪性リンパ腫のMGMT陽性率は100%という結果であった。(図6) この手法を用いて染色性の相違から治療選択を行う可能性が導かれた。今後我々の施設では、悪性リンパ腫のsecond line、third lineの化学療法として、TMZを考慮する判断材料になると考えている。また、その際には、MGMTなど分子病理学的評価も可能な範囲で引き続き評価していく必要があると考えた。

VI まとめ

原発性悪性リンパ腫の2例、germinoma、hemangioblastoma、ラトケ嚢胞を、それぞれ1例ずつMGMT染色性を検討した。結果は、ラトケ嚢胞を除いて、原発性悪性リンパ腫、germinoma、hemangioblastomaで100%という結果で、MGMT陽性という結果を得た。

IV 謝辞

免疫組織染色の評価においては、岐阜大学大学院 脳神経外科 准教授 矢野大仁博士にご指導をいただいたことを深謝いたします。この研究の一部は、岐阜県医師会勤務医部会における「学術奨励賞(研究助成)」により実施された。

VII 文献:

- 1) Levin N., Lavon I. et al.: Progressive low-grade oligodendrogliomas: response to temozolomide and correlation between genetic profile and O6-methylguanine DNA methyltransferase protein expression. *Cancer* 106(8): 1759-65, 2006
- 2) Everhard S., Kaloshi G. et al.: MGMT methylation: a marker of response to temozolomide in low-grade gliomas. *Ann Neurol* 60(6): 740-3, 2006
- 3) Chamberlain MC: Salvage therapy with lomustine for temozolomide refractory recurrent anaplastic astrocytoma: a retrospective study. *J Neurooncol* 122(2): 329-38, 2015
- 4) Bengtsson D., Schröder HD. et al.: Long-term outcome and MGMT as a predictive marker in 24 patients with atypical pituitary adenomas and pituitary carcinomas given treatment with temozolomide. *J Clin Endocrinol Metab.* 100(4): 1689-98, 2015
- 5) Wang Y., Li J. et al.: The expression profile of Dopamine D2 receptor, MGMT and VEGF in different histological subtypes of pituitary adenomas: a study of 197 cases and indications for the medical therapy. *J Exp Clin Cancer Res.* 16:33:56, 2014
- 6) Jiang X., Reardin DA. et al.: O6-methylguanine-DNA methyltransferase (MGMT) immunohistochemistry as a predictor of resistance to temozolomide in primary CNS lymphoma. *J Neurooncol.* 114(1):135-40, 2013