



Expressions of NeuroD and GAP43 as diagnostic markers for olfactory neuroblastoma

古川, 竜也

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2022-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8484号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482232>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

学位論文の内容要旨

Expressions of NeuroD and GAP43 as diagnostic markers for olfactory neuroblastoma

嗅神経芽細胞腫における診断マーカーとしての NeuroD 及び GAP43 の発現

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻
耳鼻咽喉科頭頸部外科学分野
(指導教員: 丹生 健一教授)

古川竜也

【背景】

嗅神経芽細胞腫（ONB）は1924年にBergerらが報告した、副鼻腔悪性腫瘍の約3%と稀な嗅上皮由来の悪性腫瘍である。初期症状は鼻閉や鼻出血などの非特異的な鼻症状であるため、進行した段階で診断されることが多い。ONBは進行すると、眼窩や前頭蓋底などの隣接臓器に容易に浸潤するため、治療に難渋することが稀ではない。開頭・内視鏡下での頭蓋底手術と術後放射線治療（全身化学療法を含む）が現在の標準治療であり、比較的良好な生命予後をもたらす。しかし、長期的には局所再発や遠隔転移が起り、生命予後及びQOLの低下を招くことがある。

治療方針決定には正確な進行度の評価が不可欠である。ONBの臨床病期分類には、広く用いられている2つの臨床病期分類がある。Kadishらは、局所進行度に基づき3段階（Grade A-C）に分類した。その後Moritaらはこの分類に転移陽性例をGrade Dとして4段階に分類する案を提案した。一方、Dulguerovらの病期分類はTNM分類を用いた表記を提唱している。こちらはT分類を4段階に分類され、T3、T4はKadish分類のGrade Cに相当する。転移はN（頸部リンパ節転移）とM（遠隔転移）の有無に分けられる。

一方でONBは、腫瘍が同じ病期として分類されても、明らかに異なる悪性度の経過をたどることが知られている。この問題を解決するために、Hyamsらは組織学的グレーディングを提案し、このシステムは大規模施設において大きな有用性を持っていることが示されている。しかし、このグレーディングシステムはいくつかの主観的・定性的要素から構成されているため、病理医の経験や生検部位によって判断が異なる場合がある。また、ONBは、小細胞癌、未分化癌、神経内分泌腫瘍など、鼻腔内に発生する他のSmall Round Cell Tumor (SRCT)と病理学的鑑別に難渋することが知られている。ONBの鑑別診断に用いられる診断マーカーには、NSE、シナプトフィジン、クロモグラニンA、CD56などがあるが、これらは様々な神経細胞由来の腫瘍にも発現しているため確定診断が難しい場合がある。

ONBの起源とされている嗅上皮は、中枢神経系の中でもユニークな再生能力を有している。嗅神経の基底部に位置する前駆細胞は、分化した成熟嗅覚受容体ニューロン（ORN）に向かって、NCAM、NeuroD、GAP43、OMPの順で発現する。先行研究により、hASH1がONB、特に高悪性度腫瘍で発現していることが報告されている。また、嗅覚に特異的な感觉伝達蛋白がONBで免疫組織化学的に検出されることも報告されている。これらの知見に基づき、本研究では、ONBおよび他の鼻副鼻腔原発のSRCTにおけるNeuroD、GAP43、OMPの発現を調べ、ONBの鑑別診断のためのマーカーとしてこれらの因子の役割を検討した。

【対象と方法】

対象患者

1997年から2017年の間に神戸大学医学部附属病院でONBと診断され、治療を受けた30症例を対象とした。このうち26症例でホルマリン固定パラフィン包埋標本が使用可能であった。これら26検体において、NeuroD、GAP43、OMPの発現を検討した。26人の患者のカル

テ記録もレトロスペクティブに分析した。すべての ONB は、サイトケラチン、S-100、NSE、シナプトフィジン、クロモグラニン A、CD56 などの免疫組織化学染色を用いて病理学的に確認された。Hyams の病理学的グレードは、独立した 2 人の病理診断医によってレビューされた。本研究は神戸大学医学部附属病院倫理委員会の承認を得ており（No.B200029）、ヘルシンキ宣言に準拠して実施された。

NeuroD、GAP43、OMP の免疫組織化学染色

OMP、GAP43、NeuroD の発現確認は、既報のように免疫組織化学染色を実施した。当院で外科的切除を行った症例では切除標本の腫瘍中心部を、外科的切除を行わない症例では生検標本を使用した。OMP (019-22291, Wako, Japan)、GAP43 (MAB347, Millipore, USA)、NeuroD1 (ab60704, Abcam, USA) に対する抗体をそれぞれ 1:4000, 1:500, 1:400 の希釈率で使用した。

ONB との比較として、神経内分泌腫瘍 4 症例、未分化癌 4 症例、小細胞癌 3 症例、悪性末梢神経鞘腫 1 症例、横紋筋肉腫 1 症例についても OMP、GAP43、NeuroD の発現を検討した。NeuroD については、ヒトの卵巣の明細胞癌を陽性コントロールとした。GAP43 と OMP については、マウス嗅上皮を陽性コントロールとした。明確な免疫反応のみを陽性とみなし、時折見られる微弱な細胞質染色は陰性として扱った。NeuroD、GAP43、OMP の染色は、それぞれ腫瘍細胞の 0%、5%未満、5～10%、10%以上に明確な染色が検出された場合、negative, focal, patchy, marked positive と判定した。NeuroD、GAP43、OMP の発現の関係を比較した。

【結果】

患者背景の特徴を示す。患者数は男性 15 名、女性 11 名であった。平均年齢は 53.8 歳（32-73 歳）であった。ONB26 検体中、NeuroD の染色は、4 検体、3 検体、9 検体でそれぞれ focal, patchy, marked positive が認められた。GAP43 の染色は、同様に 5 検体、3 検体、11 検体に陽性が認められた。その結果、ONB の 54%（14/26）で NeuroD または GAP43 のいずれかに著明な陽性染色が観察された。その他の SRCT13 例では、小細胞癌 2 例、未分化癌 1 例、神経内分泌癌 1 例に NeuroD の著明な染色が認められたが、GAP43 は未分化癌 1 例にのみ著明な陽性染色が認められた。NeuroD や GAP43 の発現と臨床的・病理的要因との間に特別な傾向は認められなかった。陽性対照として用いたマウス嗅上皮では OMP 染色が観察されたが、本研究ではどの検体でも OMP 染色は観察されなかった。

【考察】

NeuroD は、神経系の分化に関与する塩基性 helix loop helix (bHLH) 転写因子である。GAP43 は神経組織特異的な細胞質タンパク質であり、神経軸索の形成、再生、可塑性に重要な役割を果たす。OMP は、成熟した ORN に見られるタンパク質で、シグナル伝達に関与しているとされる。

ONB の生物学的発がんメカニズムはまだ不明だが、嗅上皮由来と考えられ、ONB が ORN と同じ系譜を持つことが示唆されている。例えば、ONB は、Golf、アデニルシクラーゼ III、環状ヌクレオチドゲートチャネル A2 などの嗅覚特異的な感覺伝達タンパク質を発現していると報告されている。さらに、ONB は、神経内分泌分化に重要な役割を果たす bHLH 転写因子である hASH1 を発現している。さらに ONB は多種多様な匂い受容体遺伝子を発現していることが報告されており、ONB 細胞に塩基性線維芽細胞増殖因子を投与すると、分化やアポトーシスが誘導される。

これらの知見に基づき、我々は ONB 標本における NeuroD、GAP43、OMP の発現を検討した。興味深いことに、より分化した ORN で発現している NeuroD と GAP43 の明瞭な染色が、局所的な発現を除いて半数以上の症例で観察された。嗅上皮と同様に、GAP43 の発現はびまん性で、NeuroD の発現は斑状であった。OMP はどの検体にも発現していなかったが、これらの結果から、NeuroD および/または GAP43 陽性の ONB は ORN に部分的に分化していることが示唆された。

さらに、本研究では、GAP43 を発現している非 ONB の SRCT は 1 症例だけであったが、NeuroD の発現は複数で観察された。これらの結果は、NeuroD が ONB に特異的に発現することはほとんどないものの、GAP43 が ONB の診断マーカーとして機能する可能性を示唆している。ONB の診断マーカーとしての GAP43 の信頼性を検証するためには、さらに多くの症例を用いた検討が必要である。現在、本研究の限界を解消し、予後因子としての NeuroD と GAP43 の役割の可能性も検討するため、ONB と他の種類の鼻副鼻腔悪性腫瘍に関する多施設共同研究を準備中である。

【結語】

今回の結果からは、GAP43 が ONB の鑑別診断のためのバイオマーカーとして機能する可能性を示唆していると考えられた。

神戸大学大学院医学(系)研究科(博士課程)

論文審査の結果の要旨			
受付番号	甲 第 3227 号	氏名	吉川 竜也
論文題目 Title of Dissertation	<p>Expressions of NeuroD and GAP43 as diagnostic markers for olfactory neuroblastoma</p> <p>嗅神経芽細胞腫における診断マーカーとしての NeuroD 及び GAP43 の発現</p>		
審査委員 Examiner	<p>主査 Chief Examiner 篠山 隆司</p> <p>副査 Vice-examiner 竹内 邦子</p> <p>副査 Vice-examiner 吉川 竜也</p>		

(要旨は1,000字～2,000字程度)

【目的】

嗅神経芽細胞腫(ONB)は1924年にBergerらが報告した、稀な嗅上皮由来の悪性腫瘍である。初期症状は非特異的な鼻症状で、眼窩や前頭蓋底などに浸潤して診断されることが多い。前頭蓋底手術と術後放射線治療が標準治療であり、生命予後は比較的良好であるが、長期的な再発率は高く、QOL低下や原病死につながる。

臨床病期分類には、Kadish-Morita分類(4段階に分類)とDulguerov分類(TNMを用いた表記)が確立している。一方ONBは明らかに異なる悪性度の症例を含み、Hyamsらは病理Gradeを提案したが、主観的・定性的要素で構成されることが課題である。また、ONBの診断には、シナプトフィジン、クロモグラニンAなどを用いるが、これらは様々な神経細胞由来の腫瘍にも発現するため、小細胞癌、神経内分泌腫瘍など、鼻腔内に発生する他のSmall Round Cell Tumor(SRCT)と鑑別に難渋する。

ONBの起源とされる嗅上皮は、中枢神経系の中でもユニークな再生能力を有している。基底部に位置する前駆細胞は、分化した成熟嗅覚受容体ニューロンに向かって、NeuroD、GAP43、OMPの順で発現していく。また、嗅覚に特異的な感覚伝達蛋白がONBで免疫組織化学的に検出されることも報告されている。これらの知見に基づき、ONBおよび他の鼻副鼻腔原発のSRCTでNeuroD、GAP43、OMPの発現を調べ、鑑別診断のための役割を検討した。

【方法】

1997年から2017年の間に当院で治療を受け、ホルマリン固定パラフィン包埋標本が使用可能であった26検体において、免疫組織化学染色でNeuroD、GAP43、OMPの発現を検討した。ONBは病理学的に診断され、Hyams gradeは、独立した2人の病理診断医によりレビューされた。

手術例では切除標本の腫瘍中心部を、外科的切除を行わない症例では生検標本を使用した。OMP(019-22291, Wako, Japan)、GAP43(MAB347, Millipore, USA)、NeuroD1(ab60704, Abcam, USA)に対する抗体をそれぞれ1:4000, 1:500, 1:400の希釈率で使用した。

ONBとの比較として、神経内分泌腫瘍4症例、未分化癌4症例、小細胞癌3症例、悪性末梢神経鞘腫1症例、横紋筋肉腫1症例についても同様に検討した。NeuroD、GAP43、OMPの染色は、それぞれ腫瘍細胞の0%、5%未満、5~10%、10%以上に明確な染色が検出された場合、negative, focal, patchy, marked positiveと判定した。

【結果】

患者は男性15名、女性11名であった。平均年齢は53.8歳(32~73歳)であった。26検体中、NeuroDの染色は、4検体、3検体、9検体でそれぞれfocal, patchy, marked positiveが認められた。GAP43の染色は、同様に5検体、3検体、11検体に陽性が認められた。その結果、ONBの54%(14/26)でNeuroDまたはGAP43のいずれかに著明な陽性染色が観察された。その他のSRCT13例では、合計4例にNeuroDの著明な染色が認められたが、GAP43は未分化癌1例のみ陽性染色が認められた。NeuroDやGAP43の発現と予後には特別な傾向は認められなかった。OMPは全検体で陰性であった。

【考察および結論】

NeuroD は、神経系の分化に関する bHLH 転写因子である。GAP43 は神経組織特異的な細胞質タンパク質であり、神経軸索の形成、再生、可塑性に重要な役割を果たす。OMP は、成熟した ORN に見られるタンパク質で、シグナル伝達に関するとされる。ONB は、匂い受容体遺伝子や神経内分泌分化に重要な役割を果たす bHLH 転写因子である hASH1 を発現していることが報告されている。

興味深いことに、NeuroD と GAP43 の明瞭な染色が、局所的な発現を除いて半数以上の症例で観察された。OMP は全検体で陰性であった。これらの結果から、NeuroD および/または GAP43 陽性の ONB は ORN に部分的に分化していることが示唆された。

さらに、GAP43 を発現している非 ONB の SRCT は 1 症例だけであったが、NeuroD の発現は複数で観察された。よって NeuroD の発現は ONB に特異的ではないものの、GAP43 が ONB の診断マーカーとして機能する可能性を示唆しているが、GAP43 の信頼性を確立するには、さらに多くの症例を用いた検証が必要である。

【結語】

今回の結果からは、GAP43 が ONB の鑑別診断のためのバイオマーカーとなる可能性が示唆された。

よって、本研究者は、博士(医学)の学位を得る資格があると認める。