各種 glioma における estrogen receptor の組織化学的検討

栗坂 昌宏・森 惟明・園部 宏*

Cytochemical Detection of Estrogen Receptors in Human Gliomas

Masahiro KURISAKA, Koreaki MORI and Hiroshi SONOBE*

Departments of Neurosurgery and *Pathology, Kochi Medical School, Nankoku, Kochi

Abstract

Cellular estrogen receptors in cryostat sections of human glioma tissue were determined in 34 patients by a histochemical method with 17β -estradiol-6-carboxymethyl oxime-bovine serum albumin-fluorescein isothiocyanate conjugate. Estrogen receptor protein was found in all cases of glioblastoma multiforme (7), anaplastic astrocytoma (5), benign astrocytoma (7), pilocytic astrocytoma (2), ependymoma (5), and a case of mixed oligodendroglioma, but in no cases of medulloblastoma (5) or pure oligodendroglioma (2). These findings suggest the possibility of hormone therapy for human glioma.

Key words: glioma, glial fibrillary acidic protein, estrogen receptor, cryostat section, cytochemistry

I はじめに

脳腫瘍のなかには妊娠を契機として急性増悪するものがある。その大部分は髄膜腫と膠芽腫であるが、このような現象は髄膜腫においてより顕著である¹⁵⁾。したがって、このような腫瘍の発生および増殖には性ホルモンの関与している可能性が強い。Kasantikul ら⁹⁾は女性に好発する神経鞘腫や髄膜腫の腫瘍組織に estrogen receptor (以下 ER) が存在することを直接蛍光法を用いて証明している。一方、悪性神経膠腫は男性に多発する腫瘍の一つであるが、最近我々は妊娠を契機として急性増悪を示した悪性星細胞腫例を経験し、その腫瘍細胞に ER を組織化学的に証明し、報告した¹⁶⁾。このことから、各種 glioma における ER の有無を Lee's conjugate¹²⁾を用いて組織化学的に検索し、興味ある知見を得たので報告する。

II 対象および方法

今回対象とした症例は、多形性膠芽腫 7 例、異形性星細胞

腫 5 例、良性星細胞腫 7 例、毛様星細胞腫 2 例、上衣腫 5 例、乏突起細胞腫 3 例、髄芽腫 5 例の合計 34 症例である (Table 1)。このうち上衣腫は 3 例が小児で 2 例が成人であり、乏突起細胞腫は 3 例中 1 例が星細胞腫との混合型であった。また、髄芽腫 5 例のうち 1 例は青年男性であった。男女比は 11:6 で、年齢は 5 才から 72 才で平均 34.1 才であった。腫瘍の局在は、膠芽腫が前頭葉、側頭葉、頭頂葉、基底核部、脳幹、小脳と広汎に分布し、異形性星細胞腫においては前頭葉と側頭葉に存在していた。良性星細胞腫は前頭葉、側頭葉および小脳に分布し、毛様星細胞腫は視床下部と小脳にみられた。また、上衣腫は側脳室 2 例と第四脳室 3 例であり、乏突起細胞腫は全例前頭葉に、髄芽腫は全例小脳に発生したものであった。

方法は、まず手術時に摘出した腫瘍組織を 0.5~1.0 cm² の大きさで厚さ 2~5 mm に切り、クライオスタットで厚さ 3~4 μ m の連続凍結切片を作製した。4°C で 1 時間ほど風乾したのち、その 1 枚をエタノール固定して hematoxyline eosin 染色し、細胞の同定に供した。他の 1 枚は風乾

高知医科大学脳神経外科 *同病理

Address reprint requests to: M. Kurisaka, M.D., Department of Neurosurgery, Kochi Medical School, Kohasu, Okoh-cho, Nankoku, Kochi 781-51.

受稿 1985年3月18日 受理 1985年8月10日

後, 2% bovine serum albumin(以下BSA)を含む0.01 M phosphate buffer saline(以下PBS)(pH 7.4)数滴を組織面に滴下して数秒間洗滌したのちPBSを拭い取り, 約20 μ l/

Table 1 Cases of glioma

Case No.	Age	Sex	Localization
Glioblastoma multiforme (7 cases):			
1	68	M	bil. frontal
2	72	F	bil. frontal
3	58	M	lt. parietal
4	23	M	rt. frontal
5	68	M	lt. temporal
6*	29	F	rt. pontocerebellar
7	54	F	lt. thalamus
Anaplastic astrocytoma (5 cases):			
8	34	F	rt. frontal
9	48	M	rt. temporal
10	34	M	rt. frontal
11	32	F	lt. frontal
12	57	M	lt. temporal
Benign astrocytoma (7 cases):			
13	42	M	lt. temporal
14	43	M	rt. frontal
15	33	F	rt. frontal
16	52	M	lt. temporal
17	41	F	rt. cerebellar
18	53	M	rt. temporal
19	49	M	lt. frontal
Oligodendroglioma (3 cases):			
20	23	M	rt. frontal
21	54	F	rt. frontal
22	27	M	rt. frontal
Pilocytic astrocytoma (2 cases):			
23	14	M	hypothalamus
24	6	M	cerebellum
Medulloblastoma (5 cases):			
25	6	M	cerebellum
26	28	M	cerebellum
27	9	F	cerebellum
28	5	F	cerebellum
29	11	F	cerebellum
Ependymoma (5 cases):			
30	7	M	IVth ventricle
31	9	F	lateral ventricle
32	10	M	IVth ventricle
33	29	M	lateral ventricle
34	32	M	IVth ventricle

*Pregnant case.

cm²の17 β -estradiol-6-carboxymethyl oxime(以下CMO)-BSA-fluorescein isothiocyanate(以下FITC), すなわちLee's conjugate¹²⁾と20°Cにて2時間にわたり加湿遮光箱内で反応させ, その後PBSで5分ごと2回洗滌し, 30%グリセリン緩衝液で封入した. 陰性コントロール(染色阻止テスト)は, 凍結切片をPBSで洗滌後, 50 $\times$ 10⁻³のphosphate-diethylstilbestrol(以下DES)溶液と4°C下に加湿遮光箱内で一昼夜反応させ, PBSで洗滌してERと結合していないDESを除去し, 以下前記同様にLee's conjugate¹²⁾と反応させた. 陽性コントロールには手術によって摘出した乳腺症例の組織を使用した. また, glial fibrillary acidic protein(以下GFAP)²¹⁾がestrogenのcarrier proteinであるか否かを検討する目的で, 神経膠腫切片の一部をGFAP抗血清と室温で60分間反応させたのちLee's conjugate¹²⁾と反応させ, 以下同様の操作を行い, グリセリン緩衝液で封入し, 蛍光顕微鏡下に観察した. ERの陽性度は腫瘍細胞を100個算定し, 陽性細胞が何個存在するかを3カ所について検索してその平均値を指標とした. 腫瘍細胞のER陽性率が30%以下を(+), 31~60%を(++) , 61%以上を(+++)とし, 腫瘍組織中に混在するreactive astrocyteのみが陽性を示すものは(±)とした.

III 結 果

各種瘍におけるER陽性率をTable 2に示す. 多形性膠芽腫では7例全例に陽性所見が得られ, 異形性星細胞腫, 良性星細胞腫, 毛様星細胞腫, 上皮腫においても多少の差はあるものの全例にその局在が認められた. しかし, 乏突起細胞腫においては星細胞腫との混合型のものにのみ陽性所見があり, 純型の例ではその間質に存在するreactive astrocyteにのみERが証明された. 髄芽腫においても間質細胞にのみ陽性所見を認め, 腫瘍細胞それ自体にはERの

Table 2 Results of ER staining

Histological diagnosis	ER count*	Positivity ratio
Glioblastoma multiforme	++~+++	7/ 7 (100%)
Anaplastic astrocytoma	++~+++	5/ 5 (100%)
Benign astrocytoma	++~+++	7/ 7 (100%)
Ependymoma	++~+++	5/ 5 (100%)
Oligodendroglioma	±~+	1/ 3 (33%)
Pilocytic astrocytoma	+~++	2/ 2 (100%)
Medulloblastoma	-~±	0/ 5
Total		27/34 (79%)

*Average counts of estrogen receptor (ER) positive cells are related as +++ (more than 60%), ++ (31-60%), + (less than 31%), and ± (positive ER only in reactive astrocyte).

局在を認めず、間質組織でERを有するのはreactive astrocyteと内皮細胞であった。ERの局在は細胞質を中心に、まれに核や細胞膜にもみられることがあった。

多形性膠芽腫はERの高い陽性率を示したが、壊死に陥った組織や変性しつつある細胞にはERの局在を認めず、pseudopalisadeを形成する細胞やperivascular tumor cellおよびendothelial proliferationを示す細胞に陽性所見が得られ、妊娠女性に発生した腫瘍組織により多くのERが存在していた(Fig. 1)。ERの保有率は性差や腫瘍の局在による差を認めず、腫瘍細胞自身の状態に依存しており、異形性星細胞腫ではperivascular rosetteを形成する細胞に豊富なERが認められた(Fig. 2)。上衣腫においてもrosette構成細胞に強い陽性所見が得られた(Fig. 3)が、年齢差や側脳室、第四脳室といった局在の差に起因したと思われるERの含有差は認めなかった。良性星細胞腫においてもほぼ同様の所見を得たが、これらでは腫瘍細胞の突起にも多くのERが存在し、各細胞突起が交叉して作る格子模様が描出された(Fig. 4)。また、毛様星細胞腫では腫瘍細胞のみならずRosenthal fiberにも大量のERが証明され(Fig. 5)、視床下部や小脳といった局在差に基づく陽性率あるいは染色性の変化はみられなかった。乏突起細胞腫では性差、腫瘍の大小あるいは石灰沈着の多少などとER保有率との間に相関関係はなく、混合型の場合には星細胞腫の部分(Fig. 6)、純型の場合にはreactive astrocyteにのみERの局在を認めた。髄芽腫においては性差、年齢差、転移の有無などとER陽性率との間にも有意差を認めず、reactive astrocyteやその突起にのみ陽性所見が得られた(Fig. 7)。

一方、DESで前処理した陰性コントロールではERの局在はみられず(Fig. 8A)、陽性コントロールとして用いた乳腺症の組織ではその腺細胞に強い陽性所見を認めたが間質細胞にはERを認めなかった(Fig. 8B)。また、GFAP抗血清を作用させたのちconjugateと反応させた切片ではGFAP抗血清を反応させなかったものとまったく同じ結果が得られた。つまり、腫瘍細胞やreactive astrocyteはGFAP抗血清によるERの阻止を受けなかったということである。

IV 考 察

ステロイドホルモンの結晶が純粹抽出されるよりも10年程前の1896年、Beaton¹⁾は乳癌患者に卵巣摘出術を行って寛解が得られたと報告した。この結果はただちに乳癌患者に応用され、その20~30%に効果が得られたという^{5,18)}。その後、1962年になってJensenら⁸⁾が組織あるいは臓器にERが存在することを初めて報告し、以後、子宮や下垂

体、乳腺などestrogenの標的となる臓器や組織にERの存在することが証明されていった。沈降定数9SのERを子宮から分離して細胞質receptorと命名したのはGorskiら⁴⁾である。

1974年になってJensen⁶⁾は進行乳癌患者の連続的な研究結果を発表しているが、その内容は内分泌療法の臨床的効果と腫瘍組織におけるERの含有率との相関関係に関するものであり、大変驚異的な結果を報告している^{6,7)}。その後多くの研究室で乳癌組織におけるERの測定が開始され、内分泌療法がホルモン依存性の癌治療に導入されていた。現在ERの測定にはbiochemical assay法とhistochemistry法とがあり、前者ではdextran-coated charcoal(以下DCC)法(scatchard analysisによる)が代表的であり、後者では17 β -estradiol-6-CMO-BSA-FITC(Lee's conjugate¹²⁾)やBSAを用いずにestradiolとFITCとを結合させたconjugateが用いられている。DCC法にはKingら¹⁰⁾が指摘しているごとく、大量の資料を必要とすること、操作に伴う誤差が生じやすいこと、また間質組織など腫瘍細胞以外の組織に存在するERを測定してしまい、純粹に腫瘍細胞のみのER量を測定しえないことなどの問題点があり、これらを解決するためには癌細胞のみを純粹分離して測定する必要がある。特に脳腫瘍ではreactive astrocyteを除去して測定しなければ腫瘍細胞自体におけるERの定量はできず、また血管の豊富な腫瘍ではその中に含まれている血液や血管内皮細胞のERと一緒に測定してしまう危惧がある。一方、histochemical techniqueにもChamnessら³⁾の指摘するごとく、染色阻止検査時にERをブロックするのに要するestrogen量が多かったり、染色性からER I~IIIのうちのtype IIのみを観察しているのではないかといった疑問点があったが、これらは解決されつつあり¹³⁾、ERのtype I~IIIの概念もいまだ万人に認められてはいない。このため我々は、個々の腫瘍細胞と間質組織とを明確に分離して検索できる直接蛍光法を使用し¹⁷⁾、Lee's conjugate¹²⁾が結合するbinding siteをERと断定する^{12,13)}。

今回の検索において、多形性膠芽腫や異形性星細胞腫、良性星細胞腫などの腫瘍細胞のうちその細胞質を中心に、まれには核や細胞膜にも豊富な量のERが存在し、組織学的悪性度とER保有率との間に明らかな相関関係がみられなかったこと、および乏突起細胞腫や髄芽腫の腫瘍細胞にERを認めえなかったことは、細胞の分化の方向性とER獲得との間に相関関係が存在することを示唆している。また、上衣腫の腫瘍細胞に多量のERが含有されることは、多くの細胞が胎生期にsubependymal germinal layerから α -fetoproteinとestrogenの協力を得て分化していくこと

に関係しているのであろう^{14,15)}。ER が GFAP 陽性細胞に多く含まれることから GFAP²³⁾ が estrogen の carrier protein として存在しているのではないかという疑念が生じたため、GFAP 抗血清でそれをマスクして conjugate と反応させたり conjugate を GFAP で吸収したのち反応させたりしたが、結果はいずれも同じであり、ER の染色性はまったく阻止されなかった。また、正常脳においては GFAP を含まない神経細胞にも ER の局在が証明されている事実¹¹⁾より、GFAP は ER の carrier protein でないことが明らかにされたと考える。したがって conjugate が結合したのは各細胞に含まれる ER そのものであり、その特異性は前述のごとく DES を用いた染色阻止テストで証明されている。これらの結果は estrogen が細胞の発育や分化に大きく関与していることを示唆しており、分化の方向と程度により ER が消失したり増加したりするようにみえる。多形性膠芽腫や異形性星細胞腫が妊娠を契機として急性増悪すること、およびこれらの腫瘍細胞に ER が豊富に証明されたことは、estrogen が腫瘍の発育や増殖に促進的に作用する可能性を示唆している。このことを実証するためにはヒト脳腫瘍をヌードマウスに移植して増殖させ、これに対して ER 阻止剤や estrogen がどう作用するのかを検討し、その結果に基づいて臨床への応用が考慮されなければならないと考え、現在、各種悪性脳腫瘍について検討中である。

V ま と め

各種 glioma の凍結切片に Lee's conjugate¹²⁾ を作用させた直接蛍光法により ER の局在を検索し、以下の結論を得た。

1. 多形性膠芽腫、異形性星細胞腫、良性星細胞腫、上衣腫には多量の ER が存在しており、内分泌療法の可能性が期待される。

2. 髄芽腫や純型の乏突起細胞腫には ER の局在がなく、内分泌療法は期待できない。

3. ER 陽性細胞はしばしば GFAP 陽性細胞と良く一致

していたが、GFAP は estrogen の carrier protein ではないことが証明された。

終稿に臨み、凍結切片の作製に御協力頂きました高橋 保 技官に深謝致します。

本論文の要旨は、第41回日本脳神経外科学会総会(1982年10月、東京)において発表した。

文 献

- 1) Beatson GT: On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: Suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases. *Lancet* 2: 104-107, 1896
- 2) Bignami A, Dahl D: Astrocyte-specific protein and radial glia in the cerebral cortex of newborn rat. *Nature* 252: 55-56, 1974
- 3) Chamness GC, Mercer WD, McGuire WL: Are histochemical methods for estrogen receptor valid? *J Histochem Cytochem* 28: 792-798, 1980
- 4) Gorski JJ, Toft D, Shyamala G, Smith D, Notides A: Hormone receptors: Studies on the interaction of estrogen with uterus. *Recent Prog Horm Res* 24: 45-80, 1968
- 5) Harris HS, Spratt JS: Bilateral adrenalectomy in metastatic mammary cancer: An analysis of sixty-four cases. *Cancer* 23: 145-151, 1969
- 6) Jensen EV: Some newer endocrine aspects of breast cancer. *N Engl J Med* 291: 1252-1253, 1974
- 7) Jensen EV, Blick GE, Smith S, Kyser K, Desombre ER: Estrogen receptors and breast cancer response to adrenalectomy. *Natl Cancer Inst Monogr* 34: 55-70, 1971
- 8) Jensen EV, Jacobson HI: Basic guides to the mechanism of estrogen action. *Recent Prog Horm Res* 18: 387-414, 1962
- 9) Kasantikul V, Brown J: Estrogen receptors in acoustic neurilemmomas. *Surg Neurol* 15: 105-109, 1981
- 10) King RJB, Darnes DM, Hawkins RA, Leake RE, Maynard PV, Millis RM, Robertson MM: Measurement of oestrogen receptors by five institutions on common tissue samples, in King RJB (ed): *Steroid Receptor Assays in Human Breast Tumours: Methodological and Clinical Aspects*. Cardiff, Alpha Omega, 1979, pp 7-15
- 11) Kurisaka M, Kagawa H: Estrogen receptors in the human

Fig. 1 Estrogen receptors in cryostat section of a glioblastoma multiforme. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 2 Estrogen receptors in cryostat section of an anaplastic astrocytoma. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 3 Estrogen receptors in cryostat section of an ependymoma. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 4 Estrogen receptors in cryostat section of a benign astrocytoma. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 5 Estrogen receptors in cryostat section of a pilocytic astrocytoma. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 6 Estrogen receptors in cryostat section of a mixed oligodendroglioma. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 7 Estrogen receptors in cryostat section of a medulloblastoma. Fluorescein, $\times 200$.

Fig. 8 A: Negative estrogen receptor in cryostat section of an anaplastic astrocytoma which was treated with diethylstilbestrol before incubation with the conjugate. Fluorescein, $\times 200$. B: Estrogen receptors in cryostat section of a mastopathy. Fluorescein, $\times 160$.

- brain cells. *Nihon Univ J Med* 27: 337-347, 1985
- 12) Lee SH: Cytochemical study of estrogen receptor in human mammary cancer. *Am J Clin Pathol* 70: 197-203, 1978
 - 13) Lee SH: The histochemistry of estrogen receptors. *Histochemistry* 71: 491-500, 1981
 - 14) McEwen BS, Plapinger L, Chaptal C, Gerlach J, De Casse JJ: Role of fetoneonatal estrogen binding proteins in the associations of estrogen with neonatal brain cell nuclear receptors. *Brain Res* 96: 400-406, 1975
 - 15) Raynaud JP, Moguilewsky M: Steroid competition for estrogen receptors in the central nervous system. *Progress in Reproductive Biology and Medicine (Basel)* 2: 78-87, 1977
 - 16) 清家真人, 栗坂昌宏, 森 惟明: 妊娠を契機として発生し組織中にエストロゲン受容体を証明しえた脳幹部 glioblastoma の 1 例. *日内分泌会誌* 60: 1124, 1984
 - 17) 滝川決男: エストロゲンレセプターの蛍光法. *臨病理* 47: 127-131, 1981
 - 18) Therapeutic Trials Committee, American Medical Association: Androgens and estrogens in the treatment of disseminated mammary carcinoma. *JAMA* 172: 1271-1283, 1960
- [別刷請求先: 〒781-51 高知県南国市岡豊町小蓮, 高知医科大学脳神経外科, 栗坂昌宏]