



Soluble protein tyrosine phosphatase receptor type Z(PTPRZ) in cerebrospinal fluid is a potential diagnostic marker for glioma

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2022-10-11 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 山ノ井, 優 メールアドレス: 所属:
URL	https://fmu.repo.nii.ac.jp/records/2000410

学 位 論 文

Soluble protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ) in
cerebrospinal fluid is a potential diagnostic marker for glioma
(ヒト脳脊髄液の可溶性 PTPRZ は神経膠腫の診断マーカーとなりうる)

福島県立医科大学大学院医学系研究科

医学部脳神経外科学講座

山ノ井 優

Soluble protein tyrosine phosphatase receptor type Z (PTPRZ) in cerebrospinal fluid is a potential diagnostic marker for glioma

(ヒト脳脊髄液の可溶性 PTPRZ は神経膠腫の診断マーカーとなりうる)

山ノ井 優¹、藤井 正純¹、村上 友太¹、長井 健一郎¹、星 京香²

橋本 康弘²、本多 たかし³、齋藤 清¹、北爪 しのぶ⁴

¹福島県立医科大学医学部脳神経外科学講座、²福島県立医科大学医学部生化学講座

³福島県立医科大学看護学部生命科学部門、⁴福島県立医科大学新医療系学部設置準備室

概要

背景 高悪性度神経膠腫は、すべての脳腫瘍の中でも悪性度の高く致死的な疾患である。画像診断技術の進歩に関わらず、神経鞘腫や多発性硬化症(MS)などの他の脳疾患の鑑別には、しばしば侵襲的な脳生検が必要となる。いくつかの報告では、チロシンホスファターゼ受容体 typeZ (PTPRZ) が膠芽腫で高発現していることが示されており、我々は可溶性の soluble PTPRZ (sPTPRZ) が脳脊髄液に多く存在するという仮説を立てた。本研究の目的は、脳脊髄液中の sPTPRZ レベルが神経膠腫の診断マーカーとして有用であるかを明らかにすることである。

方法 正常脳組織と脳腫瘍のマイクロアレイデータを Gene Expression Omnibus (GEO) から引用し、比較検討した。臨床検体における PTPRZ タンパクの発現を、免疫組織化学的に評価した。半定量的ウェスタンブロットティングにより、神経膠腫、神経鞘腫、多発性硬化症(MS)などの非腫瘍性疾患の患者からの脳脊髄液内における sPTPRZ レベルを測定し比較検討した。

結果 PTPRZ の mRNA およびタンパク質の発現は、対照脳組織と比較し、神経膠芽腫、星細胞腫、乏突起膠腫、神経鞘腫で顕著に高値であった。神経膠腫(grade 1-4)患者の脳脊髄液内の sPTPRZ は、対照群と比較し有意に高値を示したが、神経鞘腫および MS の患者では有意差はなかった。ROC 曲線では、CSF 中の sPTPRZ は神経膠腫と MS 患者において AUC 0.9676; $P < 0.0001$ の強い有意差を認めた。

結論 脳脊髄液中の sPTPRZ は神経膠腫の有望な診断バイオマーカーであり、外科的生検の必要性を低減できる可能性がある。

序論

神経膠腫は頭蓋内腫瘍の約 25%を占める脳実質性腫瘍であり、その約 40%は膠芽腫などの悪性腫瘍である^{1, 2}。脳腫瘍の多くは CT、MRI、PET などの画像検査により、大まかな大きさや位置、腫瘍の性格を把握することができるが、その診断能力には限界があり、確定診断を得るためには開頭脳生検術、そして病理学的診断を要するのが現状である。悪性神経膠腫と多発性硬化症(MS)などの炎症性疾患との鑑別は、時に困難を伴う³。

腫瘍の生検を避けるためには、血清または髄液中に存在する診断バイオマーカーを用いることが理想である。頭蓋内胚細胞腫瘍における β HCG、や AFP、placental alkaline phosphatase⁴、中枢神経系原発悪性リンパ腫(PCNSL)における sIL-2R⁵などが挙げられるが、脳腫瘍の中では限定的なものである。

チロシンホスファターゼ受容体 typeZ (PTPRZ)は中枢神経系で主に発現する膜結合型タンパク質で⁶、最近のトランスクリプトーム解析では、アストロサイトとオリゴデンドロサイト前駆細胞で特に高い発現が確認されている⁷。PTPRZ は、コンドロイチン硫酸⁸、ケラタン硫酸^{9, 10}、N-結合型糖鎖、O-マンノース(O-Man)糖鎖で修飾された重グリコシル化タンパク質である¹¹。糖鎖で修飾された細胞外領域は切断されて脱落し、可溶型は soluble PTPRZ (sPTPRZ)またはホスファカンと呼ばれる¹²。最近、我々は脳脊髄液(CSF)中に sPTPRZ が検出されることを発見し、CSF 中の sPTPRZ がある疾患の診断マーカーとして有用である可能性を提起している。いくつかのグループは、正常脳と比較して神経膠腫組織で PTPRZ の発現が有意に高いことを報告しているが¹³⁻¹⁵、他のいくつかのマイクロアレイ解析では、PTPRZ が神経膠腫で発現が上昇する遺伝子の一つであることは確認されていない^{16, 17}。

本研究では、PTPRZ および sPTPRZ が神経膠腫の診断バイオマーカーとして価値があるかどうかを、脳組織の PTPRZ mRNA データセットの解析や免疫組織化学的検討、CSF 中の sPTPRZ のウエスタンブロット分析などを用いて比較検討した。

方法

対象

本研究は、福島県立医科大学の倫理委員会(承認番号 2466、2478)の承認を得ており、地域の方針、国内法、世界医師会ヘルシンキ宣言の指導を受けている。2004 年 9 月から 2019 年 5 月にかけて、福島県立医科大学の患者 75 名と、高崎総合医療センターの患者 11 名から CSF 試料を採取した。その内訳は、神経膠腫 24 名、神経鞘腫 14 名、MS27 名、対照となる非腫瘍性疾患(特発性正常圧水頭症[iNPH]、未破裂脳動脈瘤、顔面痙攣、三叉神経痛)21 名であった。腫瘍は現行の WHO 分類に従って診断され、分類された^{2, 18}。MS の診断は McDonald 基準に基づいて行われた^{19, 20}。iNPH は iNPH ガイドライン²¹に基づき、Evans' index が 0.3 以上の側脳室拡大を認める症例を該当とした。患者の臨床プロフィールを Table 1 にまとめた。

CSF 採取

髄液採取は、疾患に応じて、科学的品質基準および倫理的配慮を満たすように、可能な限り非侵襲的に行うよう努めた。神経膠腫、神経鞘腫、顔面痙攣、三叉神経痛、未破裂脳動脈瘤では、腰椎穿刺を避け、開頭手術中に髄液採取を行った。MS の場合は、診断目的で腰椎穿刺を施行した際に採取した。神経膠腫は、

腫瘍外の脳溝や脳裂、脳槽などから、硬膜切開直後、腫瘍摘出操作を行う前に採取した。神経鞘腫、顔面痙攣、三叉神経痛は腫瘍や神経の接触操作を行う前に小脳延髄槽から採取した。iNPH は脳室腹腔シャント時には側脳室から、腰椎穿刺時に腰髄腔から、MS は iNPH 同様腰椎穿刺時に採取した。サンプルは 1,500rpm で 5 分間遠心分離して細胞および残渣を除去し、-80℃で冷凍保存した。

Table 1. Clinical characteristics of subjects for CSF analysis

Tumor/disease type	No. of patients	Male/female	Age range (yr)
Glioma ^{*1}	24	14/10	3-78
Schwannoma	14	2/12	18-80
Multiple sclerosis	27	11/16	18-69
Control ^{*2}	21	8/13	32-88

^{*1}Subtypes of gliomas (no. of patients) were as follows: pilocytic astrocytoma (3), diffuse astrocytoma (1), anaplastic oligodendroglioma (4), anaplastic astrocytoma (8), glioblastoma (6), gliosarcoma (1), and unclassified glioma (1).

^{*2}Control samples were obtained from patients with iNPH, unruptured cerebral aneurysm, facial spasm, and trigeminal neuralgia.

試薬

抗体は以下のものを使用した。

マウス IgM 抗 PTPRζ (sc-33664; Santa Cruz Biotechnology、以下”抗 PTPRZ [Santa Cruz]”)、マウス IgM 抗コンドロイチン硫酸プロテオグリカン (MAB1581; Merck Millipore、クローン名”Cat-315”)、マウスモノクローナル Anti-AggreCAN 抗体 (6-B-4; Abcam)、ウサギポリクローナル抗 PTPRZ1 (HPA015103; 以下、”抗 PTPRZ1 (Sigma)”)、抗パンカドヘリン (ab16505; Abcam)、ポリクローナル羊抗トランスサイレチン (ab9015; Abcam)、西洋わさびペルオキシダーゼ (HRP) 標識ヤギ抗マウス IgM (SAB-110; Stressgen)、ヤギ抗ウサギ IgG (NA934; GE Healthcare)、ロバ抗ヒツジ IgG-HRP (A16041; Thermo Fisher Scientific)

マイクロアレイによる発現解析

3 つの遺伝子発現マイクロアレイデータセット (GSE15824²²、GSE4290²³、GSE108524²⁴) は、National Center of Biotechnology Information Gene Expression Omnibus からダウンロードした。GSE15824 および GSE4290 データセットは、[HG-U133_Plus_2] Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array (Affymetrix) の GPL570 プラットフォームで取得し、GSE108524 データセットは [HTA-2_0] Affymetrix Human Transcriptome Array 2.0 (Affymetrix) の GPL17586 プラットフォームで取得した。各データセットから *PTPRZ* と、γ アイソフォームである *PTPRG* の mRNA 発現値を正規化し、解析した。*PTPRG* 遺伝子の発現は複数のプローブ (GPL570 プラットフォームでは 1569323_at, 204944_at, 227126_at, 244574_at, GPL17586 プラットフォームでは TC03000384.hg.1, TC03002363.hg.1, TC03002364.hg.1, TC03002365.hg.1) で表されるので、それぞれの発現値を合計した。

Table 2. List of NCBI-GEO datasets used in this study

GEO ID	Control	Glio-blastoma	Astro-cytoma	Oligodendro-glioma	Schwa-nnoma	References
GSE15824	5 ^{*1}	12	8	7	-	20
GSE4290	23 ^{*2}	77	26	50	-	21
GSE108524	4 ^{*3}	-	-	-	27	22

^{*1}Normal brain tissues and astrocytes

^{*2}Diagnosed as epilepsy

^{*3}Normal vestibular nerve

ウェスタンブロット解析

(1) 試料調製と実験プロトコール

神経膠腫組織は、ダウンス型ホモジナイザーを用いて、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Roche) を含む7容量のTBSでホモジナイズした。ホモジネートを 100,000×g、4°Cで 30 分間遠心し、得られたペレットをプロテアーゼ阻害剤カクテルを含む T-PER Tissue Extraction Reagent (Thermo) で溶解し、マイクロソーム分画とした。マイクロソーム画分(6μgタンパク質)とCSFサンプル(10μl)を、プロテアーゼ阻害剤カクテル (Nacalai) を含むトリス-酢酸緩衝液 (pH7.4) 中0.2mUコンドロイチナーゼABC (Sigma) で37°C、1時間消化させた。一部のサンプルは、さらに3 μLのエンドβ-ガラクトシダーゼ (R&D Systems) を加え、sodium-citrate buffer (pH 6.0) で37°C、16時間消化した。

消化したサンプル中のタンパク質をSDS-PAGE (3-10% gradient gels, Atto)で分離し、ニトロセルロース膜に移した。リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の1%ウシ血清アルブミンで一晩ブロッキングした後 (pH7. 4)、膜を抗PTPRZ (Santa Cruz, 1:200), Cat-315 (1:5000), 抗PTPRZ1 (Sigma, 1:750), 抗aggrecan (1:500), 抗カドヘリン (1:500), または抗TTR (1:2000) 抗体で25°Cにて2時間プローブし、次に適切なHRPコンジュゲート二次抗体 (1:10,000 希釈) で25°Cにて2時間プロービングを行った。ブロットは、PTPRZ と Cat-315 の検出には SuperSignal West Femto maximum sensitivity substrate (Thermo Fisher Scientific) で、アグリカン、カドヘリン、TTR の検出には SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific) で現像した。シグナルはEZ-Capture MG (Atto) で検出し、CS Analyzer ver3.0 (Atto) を用いて定量した。

(2) 探索実験

PTPRZの発現が神経膠腫で上昇していることから、神経膠腫患者のCSF中のsPTPRZレベルは、対照被験者やMS患者よりも高いかもしれないと予想された。そこで、少数の患者から採取したCSFやマイクロソームサンプルを用いて、PTPRZタンパク質の発現とCSFへの排出を特徴付けるために、探索実験を行った。CSFサンプリングの異なる部位でのsPTPRZレベルを比較するために、1人のiNPH患者の側脳室、腰髄腔の2部位のCSFサンプルを調査した。手術中の髄液採取のタイミングが結果に及ぼす影響を評価するため、硬膜開存直後(腫瘍摘出術前)と腫瘍摘出術後の2回髄液採取が行われた膠芽腫患者1名の髄液を分析した。

(3) 神経膠腫、神経膠腫、MS、コントロールの CSF における sPTPRZ の半定量評価

sPTPRZの定量は、神経膠腫 (n=24)、MS (n=27)、神経鞘腫 (SW, n=14)、コントロール (n=21) 患者のCSFサンプルを用いて、抗PTPRZ (Santa Cruz) を用いた半定量ウェスタンブロット分析を実施した。CSFサンプル中のTTR濃度は、内部標準をELISAで測定した。内部標準タンパク質TTRのレベルと比較したsPTPRZ-LongおよびsPTPRZ-Shortのシグナル強度の比率を算出した。CSF中のsPTPRZ-LongとTTRのシグナル強度比の値のROC (Receiver Operating Characteristic) 曲線解析は、神経膠腫とMS患者間で行われた。

TTR サンドイッチ ELISA

PreAlbumin (Transthyretin) ELISA kit (ab108895; Abcam) を用い、推奨プロトコールに従ってCSF中のTTRを測定した(1:4,000希釈)。

免疫組織化学と組織学

組織はホルマリン固定、パラフィン包埋し、4 μ m 厚の切片にスライスし、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色するか、以下のように免疫組織化学染色に処理した。内因性ペルオキシダーゼを 0.3%過酸化水素溶液とのインキュベーションによりクエンチし、次に切片を抗 PTPRZ1 (Sigma, 1:400)または Cat-315 (1:2500) 抗体とともに 4°Cで一晩インキュベーションした。洗浄後、切片をやぎ抗マウス IgM-HRP (1:200)でインキュベートし、結合した抗体を Histofine SAB-PO (M) キット(ニチレイバイオサイエンス)で可視化した。免疫組織化学的染色は、患者の臨床情報を知らない独立したオブザーバーによって評価された。

統計解析

データは平均値 $\pm$ SEM で示した。2 群間の平均値の比較は、Mann-Whitney U 検定で行った。多重比較は、正規分布のデータについては Dunnett の検定による一元配置分散分析(ANOVA)により、それ以外のデータについては Dunn の検定による Kruskal-Wallis 検定により行った。すべての解析は GraphPad Prism 8.21 (Statcon)を用いて行った。

結果

PTPRZ の mRNA 発現量

まず、脳で発現している PTPR の ζ と γ アイソフォーム (PTPRZ と PTPRG²⁵) の発現を、GEO の RNA マイクロアレイデータセットで解析して比較した²⁶。3 つのデータセット (GSE15824、GSE4290、GSE108524) は、膠芽腫 89 人、星細胞腫 34 人、乏突起膠腫 57 人、神経鞘腫 27 人の患者、および対照 32 人の検体で構成されている (Figure. 1A)。Figure 1A-C では、すべての脳腫瘍で PTPRZ mRNA レベルが対照群と比較して有意に高いことが示された。特に神経膠腫では、対照群と比較して、GSE15824 で 4 倍、GSE4290 で 2 倍高い発現が見られた。一方、PTPRG の発現は、乏突起膠腫でわずかに上昇していたが、その他の神経膠腫では上昇していなかった (Figure. 1D, E)。興味深いことに、神経鞘腫サンプルでは、PTPRG の発現は対照サンプルと比較して有意に低かった (Figure. 1F)。

Fig.1

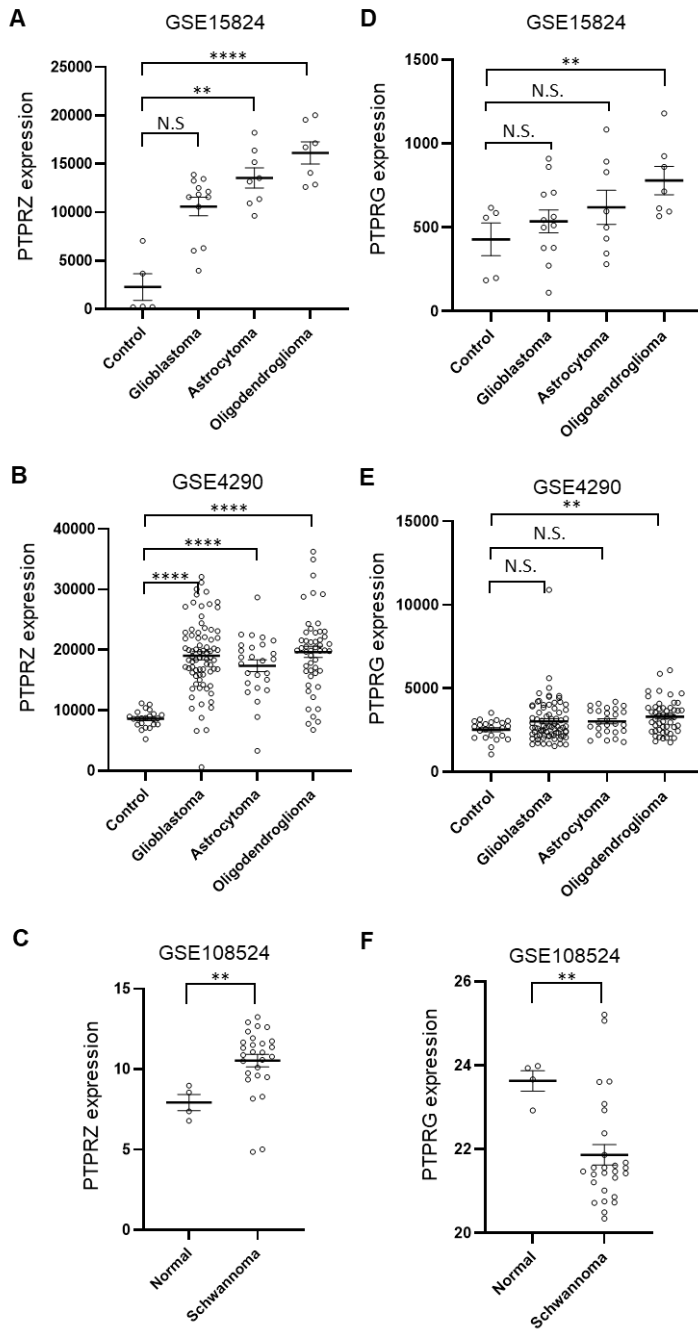


Figure 1. *PTPRZ* mRNA is highly expressed in brain tumors.

(A–F) *PTPRZ* (A–C) and *PTPRG* (D–F) mRNA levels in the GSE15824 (A, D), GSE4290 (B, E), and GSE108524 (C, F) RNA microarray datasets. All data, corresponding with the gene expression levels, are normalized signals and are presented as the mean $\pm$ SEM, with individual data points represented by circles. ** $P < 0.01$, **** $P < 0.0001$ by Mann-Whitney U test (C, F), one-way ANOVA with Dunnett's test (B), and Kruskal-Wallis test with Dunn's test (A, D, E).

PTPRZ タンパク質の組織学的発現

神経膠腫における *PTPRZ* の発現上昇が神経膠腫細胞由来なのか、それとも他の腫瘍関連細胞由来なのかを明らかにするために、組織切片の免疫組織化学染色により *PTPRZ* 蛋白の発現を評価した。*PTPRZ* ペプチドに対する抗 *PTPRZ*1 抗体 (Sigma) と、脱髄脳病変の反応性アストロサイトにおいて以前から報告されている、異常 HNK-1 キヤップ O-Man 糖鎖と *PTPRZ* ペプチド領域に結合する Cat-315 抗体を使用した^{11, 27, 28, 29} (Figure. 2A)。組織切片 (glioblastoma, IDH-wildtype) の H&E 染色では、微小血管の増殖や核異型性を有する腫瘍細胞など、膠芽腫の典型的な組織学的特徴を示した³⁰ (Figure. 2B)。免疫組織化学的染色により、一部の腫瘍細胞は *PTPRZ* 陽性であったが、内皮細胞は *PTPRZ* 陰性であった (Figure. 2C)。腫瘍

細胞は、Cat-315 抗体でも陽性染色を示した (Figure. 2D)。Oligodendroglioma, *IDH*-mutant, 1p/19q-codeleted のサンプルは、均一に丸い核と比較的豊富な細胞質を持つグリア腫瘍細胞からなる中程度の細胞性の腫瘍を示し、線維性のバックグラウンドで増殖していた。(Figure. 2E)。組織学的所見は乏突起膠腫の典型的なものではないかもしれないが、遺伝子/染色体プロファイル (*IDH1* mutation+, 1p/19q-codeletion) で診断は確定された。一部の腫瘍細胞は、抗 PTPRZ1 抗体 (Sigma) で陽性染色、Cat-315 抗体で弱く陽性染色を示した (Figure. 2F, G)。神経鞘腫のサンプルでは、紡錘形細胞が波状または交錯した束に配列しており、腫瘍細胞の多くは抗 PTPRZ1 (Sigma, Figure. 2I) で陽性に染色されたが、Cat-315 では陰性に染色された (Figure. 2J)。これらの結果は、遺伝子発現マイクロアレイのデータとよく一致しており、神経膠腫細胞における PTPRZ タンパク質の増加、特に Cat-315 抗体で検出された異常にグリコシル化された形態の増加を示していた。このような脳腫瘍間の発現の違いは、おそらく糖化酵素の細胞種特異的な発現を反映していると考えられる。

Fig.2

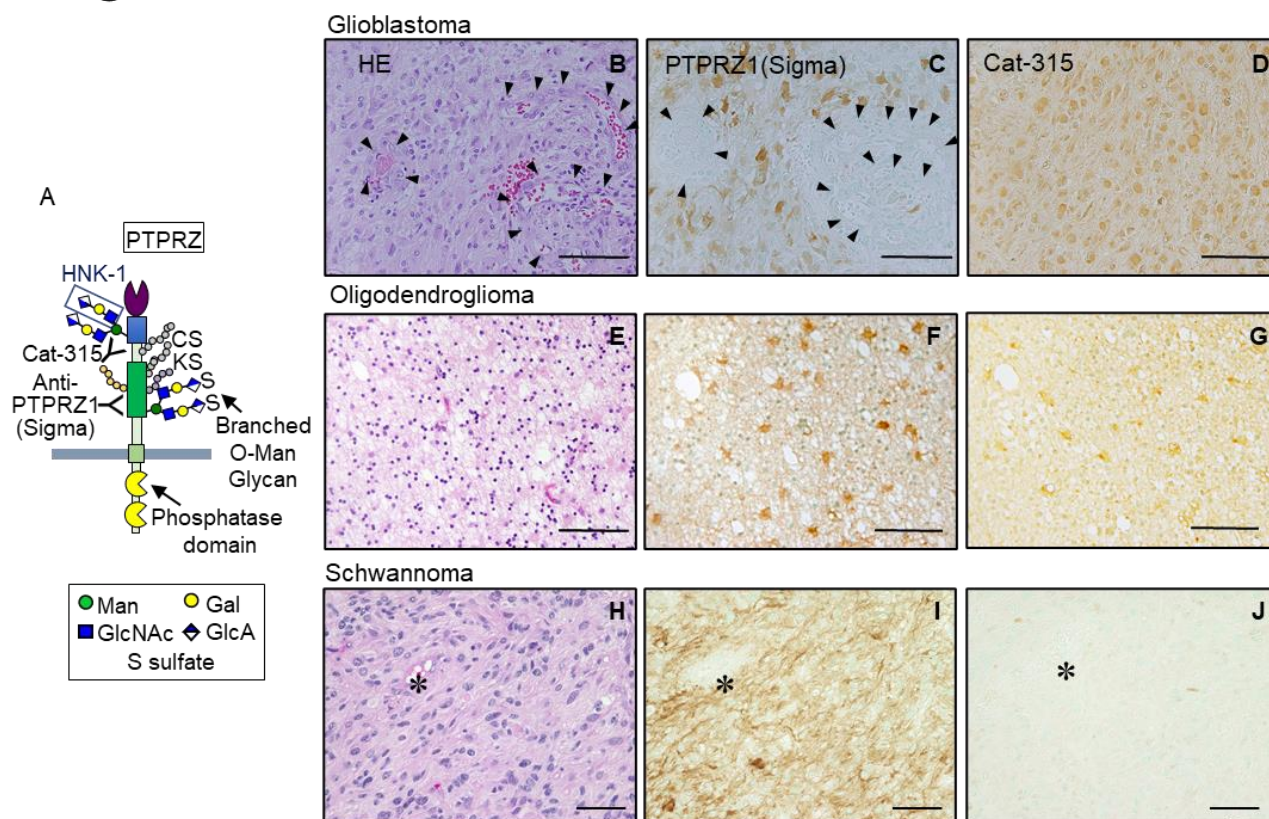


Figure 2. PTPRZ protein is expressed in glioma cells.

(A) Schematic structure of PTPRZ, showing the position of chondroitin sulfate (CS), keratan sulfate (KS), N-glycan, and the unusual HNK1-capped branched O-Man glycan. Regions recognized by the anti-PTPRZ (Sigma) and Cat-315 antibody used in these analyses are indicated. (B-J) Glioblastoma (B-D), oligodendroglioma (E-G), and schwannoma (H-J) sections analyzed by H&E staining (B, E, H), in addition to immunohistochemical staining using anti-PTPRZ (C, F, I) and Cat-315 (D, G, J) antibodies. (B, C), (E, F), and (H-J) are derived from serial sections. Arrowheads indicate “microvascular proliferation”, one of the characteristic findings of glioblastoma. Asterisks indicate vessels on the schwannoma sections. Please note that glioma cells are both PTPRZ- and Cat-315-positive, while schwannoma cells are only PTPRZ-positive. Vascular structures of both glioblastoma and schwannoma are PTPRZ-negative. Scale bars, 100 μm.

神経膠腫患者の CSF における sPTPRZ の濃度上昇

(1) 探索実験

a) 神経膠腫患者の CSF における異なる sPTPRZ アイソフォームの存在

ヒト PTPRZ は 5 つのアイソフォームを持っており、アイソフォーム 1 は 2,315 アミノ酸(aa)、アイソフォーム 4 は 2,308 aa、アイソフォーム 5 は 2,301 aa からなる(Figure. 3B)。PTPRZ アイソフォーム 2 (1455 aa)と 3 (1448 aa)は共に 755-1614 残基の重グリコシル化を欠いている³¹。

神経膠腫患者の CSF サンプルをコンドロイチナーゼ処理すると、抗 PTPRZ (Santa Cruz) で検出された約 400kDa (sPTPRZ-Long) の長鎖型と約 190kDa (sPTPRZ-Short) の短鎖型の 2 つの sPTPRZ バンドが形成された(Figure. 3A 及び Supplementary Data. 1A)。一方でヒト PTPRZ の 755-1613 ペプチド配列に対して上昇させた抗 PTPRZ 抗体(Sigma)で CSF サンプルを染色したところ、上部バンドのみが反応した(Figure. 3A)。

b) 神経膠腫組織における膜結合型 PTPRZ の検出

次に、神経膠腫組織のミクロソーム分画と神経膠腫患者の CSF サンプルを用いて、それぞれ全長 PTPRZ と sPTPRZ を検出するためにウエスタンブロット分析を行った。Cadherin と transthyretin (TTR) は、ミクロソームと CSF サンプルの内部標準として検出された(Figure. 3C)。抗 PTPRZ (Santa Cruz) によりミクロソーム分画を分析したところ、300-500kDa に相当する上部バンド(sPTPRZ-Long)と 200kDa に相当する下部バンド(sPTPRZ-Short)が検出された。PTPRZ-Long と PTPRZ-Short は、膜結合領域がないためか、CSF の切断型よりも 70-100 kDa 高い分子量であった。Cat-315 抗体も、同様に 2 つのバンドを検出した。

c) Cat-315 抗体と抗 PTPRZ 抗体で CSF の sPTPRZ を検出

次に、クロス免疫沈降ウエスタンブロット試験を行った。Cat-315 免疫沈降物を抗 PTPRZ (Santa Cruz) で染色し、逆に Cat-315 が sPTPRZ タンパク質を検出することを明らかにした(Supplementary Figure 1B)。Cat-315 抗体はアグリカンを検出することが知られている³²が、Cat-315 陽性シグナルはアグリカンのシグナルと異なり、CSF サンプルにはアグリカンが観察されなかった(Figure 3C)。Cat-315 抗体が上側のバンドを優先的に検出する理由は、HNK-1 がキャップした O-マンノース化糖鎖が 755-1614 残基に濃縮されているためであると思われる。コンドロイチナーゼ消化に加えて、エンド-β-ガラクトシダーゼで処理すると、sPTPRZ の分子量は減少し(Figure. 3D)、ケラタン硫酸を含んでいることが示唆された¹⁰。

d) iNPH、神経鞘腫、MS 患者の CSF sPTPRZ の検出のためのパイロット実験

次に、神経膠腫、iNPH、神経鞘腫、MS 患者の CSF サンプル(各 1 サンプル)のウエスタンブロット分析を行った。その結果、神経膠腫の CSF では、sPTPRZ-Long および sPTPRZ-Short の強いシグナルが再び観察された(Figure. 4A)。一方、iNPH、MS、神経鞘腫患者の CSF は、同様に強い sPTPRZ-Short のシグナルを示したが、sPTPRZ-Long を表すシグナルは弱かった。Cat-315 抗体を用いても同様の結果が得られた。

e) CSF 採取の場所とタイミングが sPTPRZ 量に与える影響

上記の結果に対する採液部位とタイミングの影響を評価するために、追加の実験を行った。iNPH 患者 1 名の脳室と腰部の髄液を採取したところ、両者の sPTPRZ 濃度はほぼ同様の数字を示した

(Supplementary Figure 1C)。一方、神経膠腫患者 1 名の髄液の sPTPRZ 濃度(sPTPRZ/TTR)は、手術中の 2 つのサンプリングタイミングの間で有意差が見られ、腫瘍操作前に採取されたサンプルは、対照群のサンプルの約 7 倍であった(Figure 4B)。腫瘍摘出後に採取したサンプルは明らかに血液が混入していたが、最初のサンプルの 6 倍のレベルを示した。同じ量の CSF サンプルをウェスタンブロット分析に使用したにもかかわらず、2 番目の CSF サンプルは著しく高いレベルの TTR を示し、これは CSF サンプル中の汚染された血液が原因である可能性が最も高いと思われた。

(2) 神経膠腫、神経鞘腫、MS、対照群の CSF における sPTPRZ の半定量的な評価

神経膠腫、MS、神経鞘腫および対照群から採取した 86 の CSF サンプルを用いた半定量的ウェスタンブロット解析により、神経膠腫患者の CSF では MS や神経鞘腫の患者に比べ、sPTPRZ-Long のシグナルが 10 倍以上の高値を示した(Figure. 5A)。一方 sPTPRZ-Short のシグナルはすべての対象者で同様であった(Figure. 5B)。興味深いことに、マイクロアレイ解析と免疫組織化学的解析の両方で神経鞘腫組織での PTPRZ の高い発現が認められたにもかかわらず、神経鞘腫患者と対照被験者の CSF での sPTPRZ レベルは同等であった。グレード 1、2、3、4 の患者の CSF では、sPTPRZ-Long レベルに有意な差は見られなかった(Figure. 5C)。神経膠腫と MS 患者の ROC 曲線下面積は 0.9676($P<0.0001$)であり、sPTPRZ は優れた識別力を持つことが示唆された(Figure. 5D)。

Fig.3

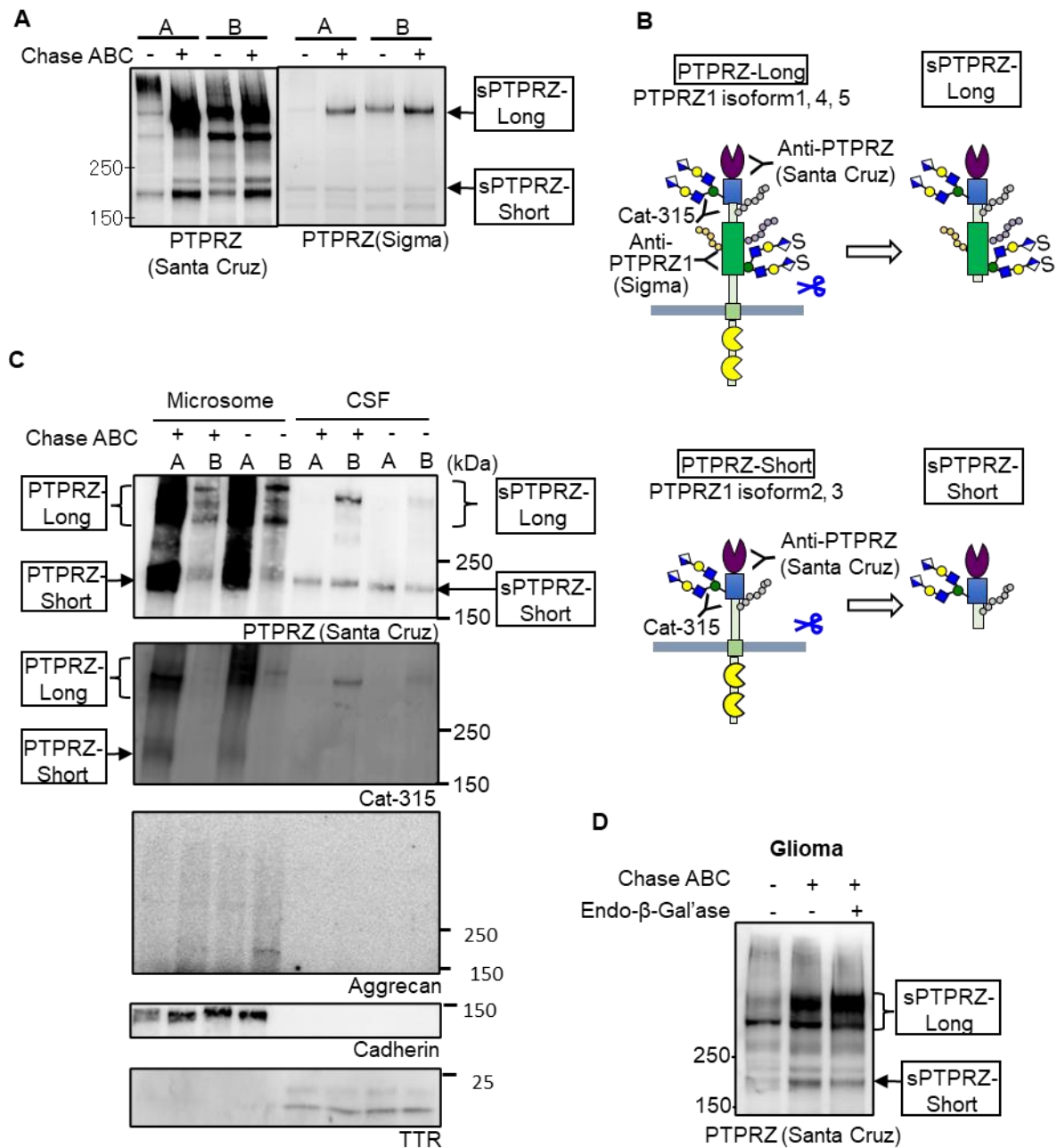
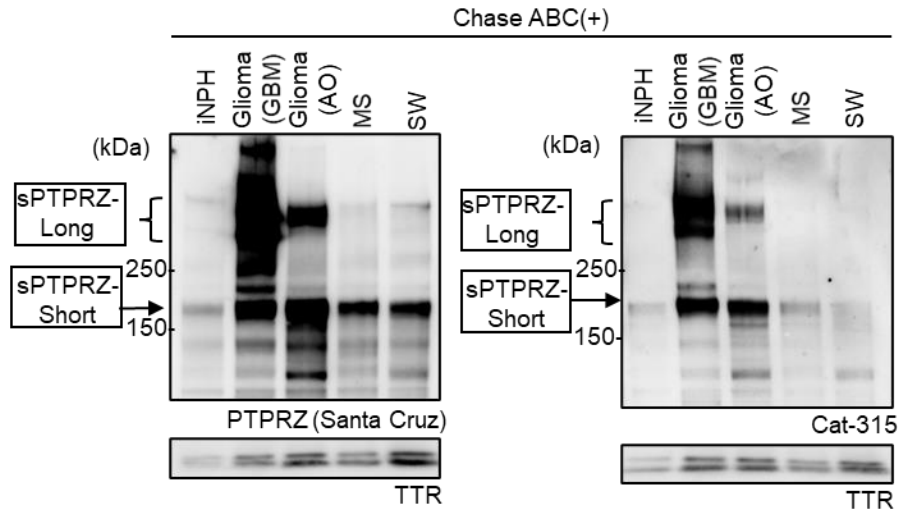


Figure 3. Western blot analysis of PTPRZ and sPTPRZ in microsomal fractions and CSF from glioma patients reveals two forms.

(A) CSF samples from glioma patients A and B were treated with or without chondroitinase ABC (Chase ABC) and probed with Santa Cruz or Sigma anti-PTPRZ antibodies. (B) Schematic of the structures of PTPRZ-Long, PTPRZ-Short, and their proteolytic cleaved forms, sPTPRZ-Long and sPTPRZ-Short, respectively. Regions recognized by the anti-PTPRZ1 (Sigma), anti-PTPRZ (Santa Cruz) and Cat-315 antibodies used are indicated. (C) Microsomal fractions prepared from glioma tissues and CSF samples were treated with or without chondroitinase ABC (Chase ABC) and used for western blot analysis with anti-PTPRZ (Santa Cruz), Cat-315, and anti-aggrecan antibodies. Cadherin and TTR were probed as loading controls for microsomal fractions and CSF, respectively. A and B are from different patients. (D) Western blot analysis of CSF samples from a glioma patient treated with chondroitinase ABC (Chase ABC) or endo-β-galactosidase and probed with anti-PTPRZ (Santa Cruz).

Fig.4

A



B

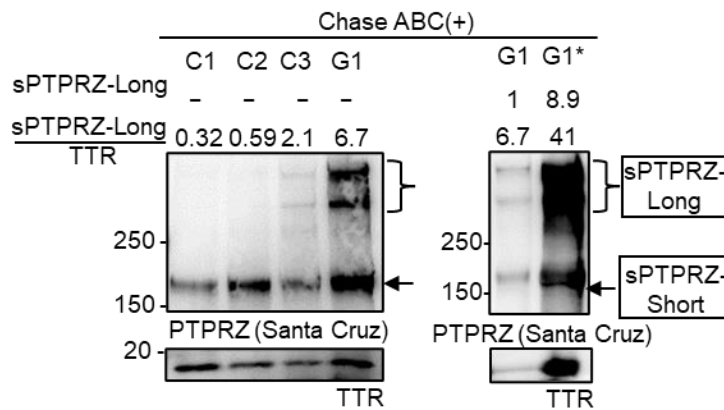


Figure 4. Western blot analysis shows elevated levels of sPTPRZ in the CSF of glioma patients.

(A) Western blot analysis of CSF samples from patients with iNPH, glioma (glioblastoma (GBM) and anaplastic oligodendroglioma (AO)), multiple sclerosis (MS), or schwannoma (SW). Blots were probed with anti-PTPRZ (Santa Cruz, upper) or with Cat-315 antibody (lower). Transthyretin (TTR) was probed as a loading control. (B) Western blot analysis of CSF samples from control subjects (C1, facial spasm; C2, unruptured cerebral aneurysm; and C3, iNPH) and from glioma patients collected from cerebral cisterns before surgery (G1) and from ventricles after surgery (G1*) for sPTPRZ and TTR. Relative signal intensities of sPTPRZ and sPTPRZ/TTR are shown.

Fig. 5

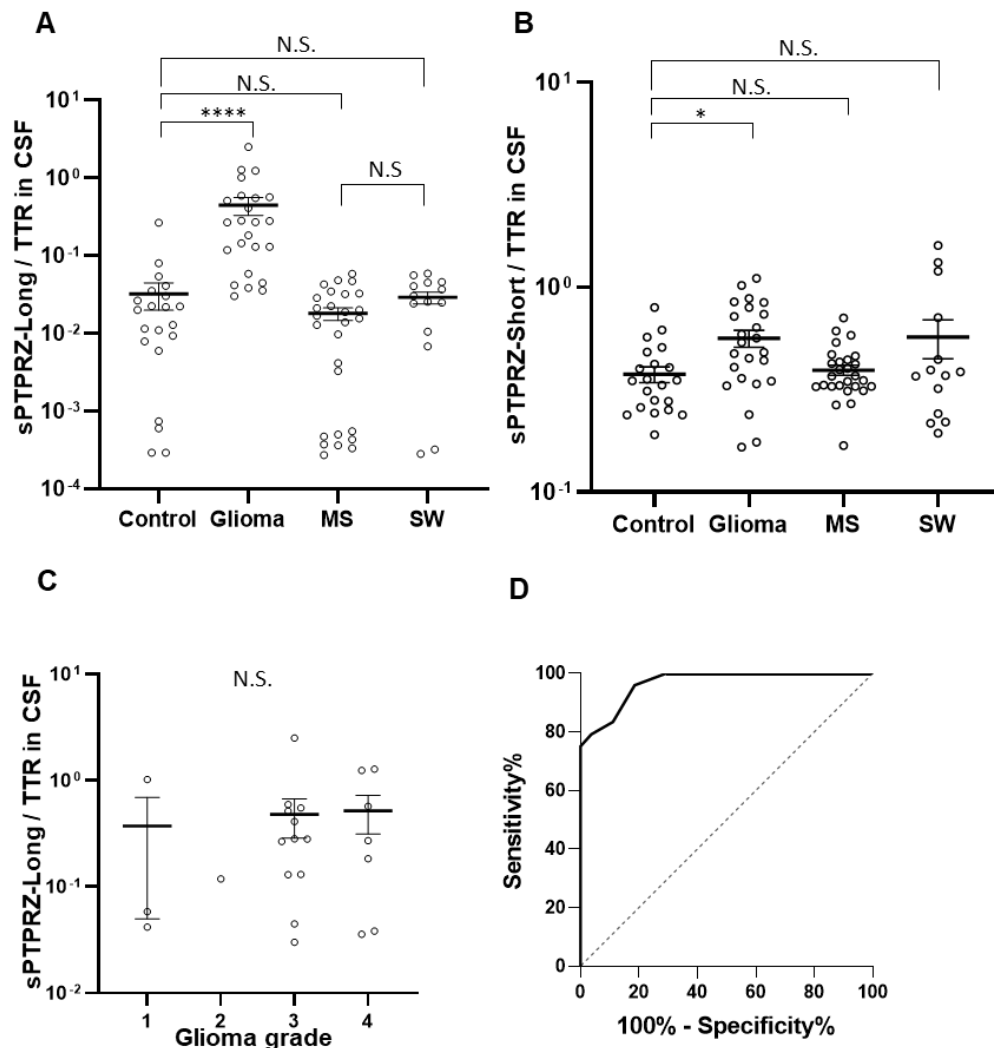


Figure 5. Quantitative analysis shows elevated sPTRZ in the CSF of glioma patients.

(A, B) For quantification of cleaved PTRZ, semi-quantitative western blot analysis was performed using CSF samples from glioma (n=24), MS (n=27), schwannoma (SW, n=14), and control (n=21) patients. TTR levels in CSF samples were determined by ELISA. Data show the ratio of signal intensities of sPTRZ-Long (A) and sPTRZ-Short (B) compared with the levels of the internal standard protein TTR. Data are presented as the mean $\pm$ SEM, with individual data points represented by circles. N.S. not significant, * $P < 0.05$, **** $P < 0.0001$ by Kruskal-Wallis test with Dunn's test. (C) As described for sPTRZ-Long in (A) except the CSF samples were from patients with grade 1 (n=3), 2 (n=2), 3 (n=12), and 4 (n=7) glioma. N.S. Not significant by Kruskal-Wallis test with Dunn's test. (D) Receiver operating characteristic curve analysis of the value of the sPTRZ-Long to TTR signal intensity ratio in CSF for discriminating between glioma and MS patients. The area under the curve was 0.9676 ($P < 0.0001$).

考察

神経膠腫バイオマーカーの臨床的意義

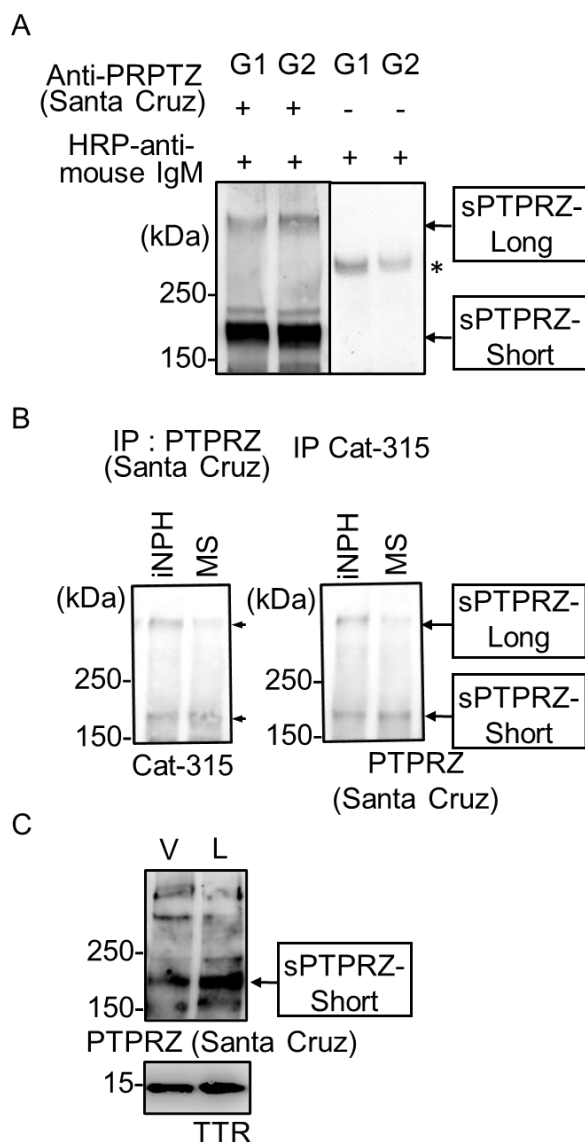
脳腫瘍の治療は、感染症や MS のような炎症性疾患とは著しく異なるため、脳疾患の術前診断は、適切な治療プロトコルを設計する上で極めて重要である。同様に、根治的切除が一般的な神経膠腫と、生検が外科的選択肢である PCNSL などの他の腫瘍では、外科的戦略が異なる。しかし、様々な脳腫瘍を識別するための術前バイオマーカーは画像診断以外に確立されておらず、画像診断で神経膠腫や他の疾患との鑑別を要する異常所見に遭遇することはよくあることであり、このような場合、生検は避けられない³³。脳生検には定位針生検、内視鏡生検、開頭術などいくつかの方法があるが、いずれも侵襲性が高く、脳内出血などの合併症の可能性がある。また、生検から確定診断までの時間が数日から数週間かかることも欠点である。したがって、神経膠腫と他の脳疾患を区別できる術前バイオマーカーの確立は、早急に必要とされている。今回の予備的研究では、CSF 中の sPTPRZ が神経膠腫の有望な診断バイオマーカー候補であることを初めて明らかにした。神経膠腫の sPTPRZ のレベルは、対照サンプルの 10 倍以上と驚くほど高値を示した。この結果は、PCNSL や転移性脳腫瘍、その他の軸索内脳腫瘍を含む、様々な脳腫瘍における CSF sPTPRZ レベルのプロファイルを調べる大規模臨床研究で確認されなければならない。このバイオマーカーは、神経膠腫だけでなく、神経膠腫との鑑別が必要な様々な中枢神経系疾患の診断に役立つと予想される。また、異なる時期のデータを比較することで、治療効果の評価や腫瘍の再発を検出するための有用な診断マーカーとなることにも期待される。さらに、PTPRZ-pleiotrophin シグナル軸³⁴が腫瘍の成長と浸潤を促進することを示すデータも蓄積されている³⁵⁻³⁶。従って、CSF 中の sPTPRZ も神経膠腫の予後マーカーとして有用である可能性も秘めている。

科学的品質と倫理的配慮のバランス

今回私たちは、この研究プロトコルが科学的な品質基準を満たすだけでなく、すべての倫理的配慮を満たすように慎重に設計した。本研究の開始当初は、神経膠腫患者（または神経膠腫が疑われる患者）やその他の疾患に対して、研究目的のためだけに腰椎穿刺を行うことは、その手順自体が侵襲的であるため非倫理的であると考えられていた。そこで疾患に応じて、できるだけ非侵襲的に患者から髄液を採取することを心掛けた。神経膠腫、神経鞘腫、顔面痙攣、三叉神経痛、未破裂脳動脈瘤などでは、腫瘍、神経、脳動脈を操作する前の手術中に脳槽から髄液を採取した。しかし、MS の全例と iNPH の一部では、臨床的診断に腰椎穿刺を行う際に腰髄腔から CSF を採取することが行われていた。そのため、今回の結果は手術中の髄液採取の部位やタイミングに影響された可能性がある。しかし、我々は以下に述べる理由により、神経膠腫における CSF sPTPRZ レベルの上昇は依然として重要であると考えます。第一に、神経膠腫の CSF sPTPRZ レベルは、脳槽からの CSF サンプルのみを比較した場合でも、神経鞘腫や他の対照サンプルよりもはるかに高く、少なくとも脳槽からの CSF では我々の知見が真実であることが示唆される。第二に、CSF の蛋白質濃度は脳室より腰髄腔で高く、脳槽はその中間に位置することが知られている³⁷。上記と異なり、脳槽からの神経膠腫の sPTPRZ レベルは腰髄腔からの MS のものよりもはるかに高いという今回の結果は、CSF サンプリング部位の違いがこれらの観察を説明できないことを示している。実際、ある iNPH 患者の脳室からのと腰髄腔からの CSF を分析したところ、両者の sPTPRZ レベルはかなり相似しており（Supplementary Figure 1C）、sPTPRZ レベルは 2 つの部位間で顕著な違いはないことが示唆された。これ

らを総合すると、今回の知見は CSF の採取部位に関係なく基本的に正しいと考えるのが妥当であろう。しかし、神経膠腫の手術中に髄液採取を行うタイミングには注意が必要である。私たちは、手術中に硬膜開存直後(腫瘍摘出術前)と腫瘍摘出術後の 2 回髄液採取を行った患者を経験した。腫瘍摘出手術そのものが、手術中の CSF 中の PTPRZ 上昇を促進するようであった。この汚染を避けるために、グリオーマでは、手術中に CSF を採取する場合は、腫瘍の外科的操作の前に CSF サンプルを採取する必要がある。脳腫瘍からの細胞成分による CSF 汚染の可能性を排除するため、すべての CSF サンプルを遠心分離し細胞および残骸を除去すべきと思われた。

Supplementary Fig.1



Supplementary Fig.1 Validation of sPTPRZ in CSF by western blot analysis

(A) CSF from glioma patients G1 and G2 were analyzed by western blot using anti-PTPRZ mouse IgM antibody. Right Blot was probed with only secondary antibody as control. * shows non-specific band. (B) CSF sample were used for cross-immunoprecipitation-western blot studies with anti-PTPRZ and Cat-315 antibodies. (C) Western blot analysis was performed for sPTPRZ and TTR from a single iNPH patient using CSF samples collected from different sites, lateral ventricles (V) and from the lumbar sac (L).

PTPRZ のアイソフォームとそのグリコシル化

ウェスタンブロット解析により、sPTPRZ の長鎖型と短鎖型(それぞれ 400 kDa と 190 kDa)が検出された。この 2 つの形態の sPTPRZ は、交互にスプライシングされた mRNA アイソフォームに由来する可能性が高い (Figure. 3B)。また、それぞれの PTPRZ アイソフォームのアミノ酸残基数を考慮すると、sPTPRZ-Long はアイソフォーム 1、4、5 からなり、sPTPRZ-Short はアイソフォーム 2、3 からなることが示唆された。150-200kDa に観察されるいくつかの抗 PTPRZ (Sigma) 反応性バンドは、sPTPRZ-Long の分解産物である可能性が高いと思われる。興味深いことに、神経膠腫患者の髄液では、MS、神経鞘腫、対照群と比較して、sPTPRZ-Long のみが上昇していた。現在、CSF 中の sPTPRZ-Long を

より迅速かつ定量的に検出する方法を開発中である。また sPTPRZ は、全長 PTPRZ と比較しコンドロイチン硫酸で高度に修飾されていることが判明した。sPTPRZ に対する高親和性抗体を開発するためには、このような糖鎖修飾を考慮する必要があるかもしれない。PTPRZ はいくつかの脳腫瘍で高発現していることが分かったが、Cat-315 抗体を用いた免疫組織化学的解析では、異常な糖鎖修飾型の存在は神経膠腫に

限られることが示された。神経鞘腫でも PTPRZ の発現は高いが、これらの異常なグリコシル化がなく、その切断の増加の証拠もなかった。神経膠腫で観察された sPTPRZ の特異的な上昇は、PTPRZ の切断がこの腫瘍タイプで最も顕著であることを示唆しているのかもしれない。PTPRZ の切断と放出に関与するプロテアーゼに関する情報は限られており、更なる調査が必要である¹²。

MS 患者の脳組織とキュプリゾン誘発脱髄マウスの免疫組織化学的解析²⁹ から、反応性アストロサイトは PTPRZ 上の異常な HNK-1 キヤップ付き分岐 O-Man 糖鎖を発現していることが示されている。特に、O-Man 糖鎖の分岐を担う糖鎖修飾酵素 N-アセチルグルコサミントランスフェラーゼ IX (*MGAT5B*) の遺伝子欠損は、PTPRZ の不安定性を高め、アストロサイトでの PTPRZ 発現を低下させ、アストログリオシスを抑制する²⁹。この点から、異常な PTPRZ の糖鎖形成は、病態におけるアストロサイトの活性化を抑制する治療ターゲットとなりうる可能性がある。

資金提供

本研究は、AMED(助成番号 JP18am0101036)および科研費(助成番号 16K08601)により資金を受け行われた。

謝辞

髄液サンプルを提供頂いた金井光康氏(高崎総合医療センター神経内科)、脳組織を提供頂いた橋本優子教授および福島県立医科大学病理診断学講座の先生方、脳組織の切片作成を教授頂いた矢橋あつ子氏(福島県立医科大学解剖学・組織学講座)、統計解析の助言を頂いた森山信彰氏(福島県立医科大学公衆衛生学講座)に感謝申し上げます。

参考文献

1. Committee-of-Brain-Tumor-Registry-of-Japan. Brain Tumor Registry of Japan (2005-2008). Neurol Med Chir (Tokyo) 2017;57:9-102.
2. Louis DN, Perry A, Reifenberger G, et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. Acta Neuropathol 2016;131:803-820.
3. Lucchinetti CF, Gavrilova RH, Metz I, et al. Clinical and radiographic spectrum of pathologically confirmed tumefactive multiple sclerosis. Brain 2008;131:1759-1775.
4. Bagshawe KD, Harland S. Immunodiagnosis and monitoring of gonadotrophin-producing metastases in the central nervous system. Cancer 1976;38:112-118.
5. Wagner DK, Kiwanuka J, Edwards BK, Rubin LA, Nelson DL, Magrath IT. Soluble interleukin-2 receptor levels in patients with undifferentiated and lymphoblastic lymphomas: correlation with survival. J Clin Oncol 1987;5:1262-1274.

6. Maeda N, Hamanaka H, Shintani T, Nishiwaki T, Noda M. Multiple receptor-like protein tyrosine phosphatases in the form of chondroitin sulfate proteoglycan. *FEBS Lett* 1994;354:67-70.
7. Zhang Y, Chen K, Sloan SA, et al. An RNA-sequencing transcriptome and splicing database of glia, neurons, and vascular cells of the cerebral cortex. *J Neurosci* 2014;34:11929-11947.
8. Kuboyama K, Fujikawa A, Suzuki R, Tanga N, Noda M. Role of Chondroitin Sulfate (CS) Modification in the Regulation of Protein-tyrosine Phosphatase Receptor Type Z (PTPRZ) Activity: PLEIOTROPHIN-PTPRZ-A SIGNALING IS INVOLVED IN OLIGODENDROCYTE DIFFERENTIATION. *J Biol Chem* 2016;291:18117-18128.
9. Rauch U, Gao P, Janetzko A, et al. Isolation and characterization of developmentally regulated chondroitin sulfate and chondroitin/keratan sulfate proteoglycans of brain identified with monoclonal antibodies. *J Biol Chem* 1991;266:14785-14801.
10. Narentuya, Takeda-Uchimura Y, Foyez T, et al. GlcNAc6ST3 is a keratan sulfate sulfotransferase for the protein-tyrosine phosphatase PTPRZ in the adult brain. *Sci Rep* 2019;9:4387.
11. Abbott KL, Matthews RT, Pierce M. Receptor tyrosine phosphatase beta (RPTPbeta) activity and signaling are attenuated by glycosylation and subsequent cell surface galectin-1 binding. *J Biol Chem* 2008;283:33026-33035.
12. Chow JP, Fujikawa A, Shimizu H, Suzuki R, Noda M. Metalloproteinase- and gamma-secretase-mediated cleavage of protein-tyrosine phosphatase receptor type Z. *J Biol Chem* 2008;283:30879-30889.
13. Krueger NX, Saito H. A human transmembrane protein-tyrosine-phosphatase, PTP zeta, is expressed in brain and has an N-terminal receptor domain homologous to carbonic anhydrases. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89:7417-7421.
14. Muller S, Kunkel P, Lamszus K, et al. A role for receptor tyrosine phosphatase zeta in glioma cell migration. *Oncogene* 2003;22:6661-6668.
15. Wang S, Jin F, Fan W, et al. Gene expression meta-analysis in diffuse low-grade glioma and the corresponding histological subtypes. *Sci Rep* 2017;7:11741.
16. Rickman DS, Bobek MP, Misek DE, et al. Distinctive molecular profiles of high-grade and low-grade gliomas based on oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res* 2001;61:6885-6891.
17. Hu G, Wei B, Wang L, et al. Analysis of gene expression profiles associated with glioma progression. *Mol Med Rep* 2015;12:1884-1890.
18. Louis D, Ohgaki H, Wiestler O. World Health Organization Histological Classification of Tumours of the Central Nervous System. International Agency for Research on Cancer 2007.
19. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121-127.
20. Polman CH, Reingold SC, Edan G, et al. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 2005;58:840-846.
21. Mori E, Ishikawa M, Kato T, et al. Guidelines for Management of Idiopathic Normal Pressure Hydrocephalus: Second Edition. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 2012;52:775-809.
22. Grzmil M, Morin P, Jr., Lino MM, et al. MAP kinase-interacting kinase 1 regulates SMAD2-

dependent TGF-beta signaling pathway in human glioblastoma. *Cancer Res* 2011;71:2392-2402.

23. Sun X, He G, Qing H, et al. Hypoxia facilitates Alzheimer's disease pathogenesis by up-regulating BACE1 gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:18727-18732.

24. Zhao Y, Liu P, Zhang N, et al. Targeting the cMET pathway augments radiation response without adverse effect on hearing in NF2 schwannoma models. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2018;115:E2077-E2084.

25. Tonks NK. Protein tyrosine phosphatases: from genes, to function, to disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2006;7:833-846.

26. Bouyain S, Watkins DJ. The protein tyrosine phosphatases PTPRZ and PTPRG bind to distinct members of the contactin family of neural recognition molecules. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:2443-2448.

27. Dino MR, Harroch S, Hockfield S, Matthews RT. Monoclonal antibody Cat-315 detects a glycoform of receptor protein tyrosine phosphatase beta/phosphacan early in CNS development that localizes to extrasynaptic sites prior to synapse formation. *Neuroscience* 2006;142:1055-1069.

28. Sakuda K, Kizuka Y, Yamaguchi Y, et al. Reactivity of anti-HNK-1 antibodies to branched O-mannose glycans associated with demyelination. *Biochem Biophys Res Commun* 2017;487:450-456.

29. Kanekiyo K, Inamori K, Kitazume S, et al. Loss of branched O-mannosyl glycans in astrocytes accelerates remyelination. *J Neurosci* 2013;33:10037-10047.

30. Rong Y, Durden DL, Van Meir EG, Brat DJ. 'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis. *J Neuropathol Exp Neurol* 2006;65:529-539.

31. Hillier LW, Fulton RS, Fulton LA, et al. The DNA sequence of human chromosome 7. *Nature* 2003;424:157-164.

32. Matthews RT, Kelly GM, Zerillo CA, Gray G, Tiemeyer M, Hockfield S. Aggrecan Glycoforms Contribute to the Molecular Heterogeneity of Perineuronal Nets. *J Neurosci* 2002;22:7536-7547.

33. Kuhlmann T, Miron V, Cui Q, Wegner C, Antel J, Bruck W. Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 2008;131:1749-1758.

34. Meng K, Rodriguez-Peña A, Dimitrov T, et al. Pleiotrophin signals increased tyrosine phosphorylation of beta catenin through inactivation of the intrinsic catalytic activity of the receptor-type protein tyrosine phosphatase beta/zeta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:2603-2608.

35. Qin EY, Cooper DD, Abbott KL, et al. Neural Precursor-Derived Pleiotrophin Mediates Subventricular Zone Invasion by Glioma. *Cell* 2017;170:845-859.e819.

36. Shi Y, Ping YF, Zhou W, et al. Tumour-associated macrophages secrete pleiotrophin to promote PTPRZ1 signalling in glioblastoma stem cells for tumour growth. *Nat Commun* 2017;8:15080.

37. Fishman RA, Ransohoff J, Osserman EF. Factors influencing the concentration gradient of protein in cerebrospinal fluid. *J Clin Invest* 1958;37:1419-1424.