

令和元年6月5日現在

機関番号：83901

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K20047

研究課題名(和文) プロテオーム解析を用いたデスモイド腫瘍の病態と新規バイオマーカーの探索的研究

研究課題名(英文) Pathogenic analysis and Exploratory study of novel biomarkers for desmoid-type fibromatosis using proteome analysis

研究代表者

濱田 俊介 (HAMADA, Shunsuke)

愛知県がんセンター(研究所)・がん病態生理学分野・研究員

研究者番号：90747289

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：デスモイド型線維腫症の治療予測マーカーとなり得るCTNNB1遺伝子変異型毎の分子生物学的相違とその意義について研究を行った。変異型毎に核内 β -catenin蓄積や下流遺伝子の発現状態に相違が見られ、全体的な傾向としてS45F変異型細胞が全体にWNT/ β -catenin系シグナルの亢進がより著しい傾向が示唆され、各学会での報告および核内 β -catenin核内蓄積の違いについて論文として報告を行った。また蛋白発現の評価としてprotein microarrayを行い、TGF- β やEGFRの蛋白発現亢進が遺伝子変異型によってみられることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

デスモイド型線維腫症のCTNNB1遺伝子変異型は臨床的に術後再発率や薬物治療効果に影響を与えることが報告されており実際に本邦における治療アルゴリズムでも取り入れられている。本研究結果より変異型の相違が何らかの形で主にWNT/ β -catenin系シグナル発現亢進を通し下流の蛋白発現に相違を及ぼしていることが示唆され、最終的に再発や薬物治療抵抗性といった臨床的予後の相違に關与していると考えられた。今後より厳密な治療マーカーとしての確立化や新たな治療標的薬の開発につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：We investigated the molecular biological differences and their significance of each CTNNB1 gene mutation variant that could be a therapeutic predictive marker of desmoid-type fibromatosis. The differences in nuclear β -catenin accumulation and expression status of downstream genes were observed for each mutation variant, and S45F mutated cells generally tended to have a more pronounced enhancement of WNT/ β -catenin signaling. We presented these results at the academic meeting and published a paper on the difference in nuclear accumulation of β -catenin among each mutation variant. Protein microarray was performed to evaluate protein expression, and its result showed that specific gene mutation promoted the protein expression of TGF- β and EGFR.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：デスモイド型線維腫症 β -catenin CTNNB1遺伝子 遺伝子変異 Wntシグナル

1. 研究開始当初の背景

デスモイド型線維腫症は局所浸潤性が強く術後再発率の高さから近年保存治療におけるアプローチが注目されている。しかしその治療効果は症例毎に異なるため、今後早期に治療効果を予測し症例毎に有効な治療を選択するため、優れた予後予測バイオマーカーの開発が求められている。また現在安全に長期投与が可能でかつ奏功性の高い薬剤は存在していない。

2. 研究の目的

デスモイド型線維腫症に対しては機能障害の大きい広範切除手術は近年回避される傾向にあり第一選択の治療として保存治療が重要視されている。メロキシカムなどの保存治療は実臨床において症例毎に治療効果に大きな違いがあるため、治療開始前に適切な治療法が選択できるような治療効果予測マーカーを必要としている。本研究の目的は、デスモイド腫瘍の蛋白発現を解析し特異性の高い蛋白を同定することで、奏功性を予測し治療成績を向上させるような有用なバイオマーカーを開発すると同時に、治療ターゲットとなりうるような標的蛋白を同定し新規治療薬の開発における基礎的データを蓄積することである。

3. 研究の方法

変異型毎にもしくはメロキシカム治療効果で差のあるデスモイド型線維腫症の腫瘍細胞を分離・培養し *in vitro* での評価に用いた。CTNNB1 遺伝子変異は腫瘍組織および培養細胞より DNA を抽出し Sanger を用いて評価した。免疫染色による核内外の β -catenin 染色性の評価、MTS assay による増殖能の評価を行った。またデスモイド型線維腫症における WNT/ β -catenin 系シグナルの異常の原因として CTNNB1 遺伝子変異型の違いによる分子病態的な相違について注目し、抽出した mRNA より RT-PCR 法にて Wnt/ β -catenin シグナル系の下流遺伝子 (Axin-2, Cyclin-D1, C-myc, COX-2) を評価することによるシグナル活性化を行い、protein micro-array を用いた蛋白発現の評価を行った。

4. 研究成果

デスモイド型線維腫症において主な変異型である T41A 変異型、S45F 変異型および変異型のない腫瘍よりそれぞれ腫瘍細胞を分離し細胞培養を行った。それぞれ培養状態での増殖能に大きな相違はみられなかった。

腫瘍細胞内の β -catenin のリン酸化の状態を評価するため、非リン酸化 β -catenin 抗体および total β -catenin 抗体との染色性の比較を複数の臨床組織検体で行った。結果、異なる変異型細胞間で非リン酸化 β -catenin の蓄積の差が示唆されるような統計学的に有意な染色性の差を認めた。また臨床検体においても S45F 変異型腫瘍は他の変異型と比較し有意に β -catenin の核内移行が強いことを見出し報告した。

下流遺伝子 (Axin-2, Cyclin-D1, C-myc, COX-2) の発現状態についても変異型毎に相違が見られ、ばらつきがあるものの S45F 変異型細胞が全体に WNT/ β -catenin 系シグナルの亢進が強い傾向が示唆された。

また protein microarray を用いて各蛋白発現の評価を行い、TGF- β や EGFR の蛋白発現亢進が遺伝子変異型によってみられることが示唆されたものの、全体的に一元的な傾向は掴めなかった。

以上より、変異型の相違が何らかの WNT/ β -catenin 系シグナル発現亢進の相違を及ぼしており、このことが crosstalk している他のシグナル系と相まって再発や薬物治療抵抗性といった臨床的予後の相違に影響していることが示唆された。これらの結果が将来的により厳密な治療マーカーの確立化や新たな治療標的薬の開発につながることを期待される。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2件)

Koike H, Nishida Y, Kohno K, Shimoyama Y, Motoi T, Hamada S, Kawai A, Ogose A, Ozaki T, Kunisada T, Matsumoto Y, Matsunobu T, Ae K, Gokita T, Sakai T, Shimizu K, Ishiguro N

Is immunohistochemical staining for β -catenin the definitive pathological diagnostic tool for desmoid-type fibromatosis? A multi-institutional study.

Hum Pathol. 査読有 2019 Feb;84:155-163.

doi: 10.1016/j.humpath.2018.09.018

Sakai T, Nishida Y, Hamada S, Koike H, Ikuta K, Ota T, Ishiguro N.

Immunohistochemical staining with non-phospho β -catenin as a diagnostic and prognostic tool of COX-2 inhibitor therapy for patients with extra-peritoneal desmoid-type fibromatosis.

Diagn Pathol. 査読有 2017 Aug 29;12(1):66.

doi: 10.1186/s13000-017-0654-z

〔学会発表〕(計 1件)

保存的治療(による)経過観察期間中のデスマイド型線維腫症の経時的変化
濱田俊介, 西田佳弘, 浦川浩, 新井英介, 生田国大, 石黒直樹
第90回日本整形外科学会学術総会、2017年

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：西田 佳弘

ローマ字氏名：(NISHIDA Yoshihiro)

研究協力者氏名：酒井 智久

ローマ字氏名：(SAKAI Tomohisa)

研究協力者氏名：小池 宏

ローマ字氏名：(KOIKE Hiroshi)

研究協力者氏名：筑紫 聡

ローマ字氏名：(TSUKUSHI Satoshi)

研究協力者氏名：吉田 雅博

ローマ字氏名：(YOSHIDA Masahiro)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。