

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 2 日現在

機関番号：32666

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K11299

研究課題名(和文) 子宮平滑筋肉腫におけるターゲット因子の同定とその応用

研究課題名(英文) Uterine Leiomyosarcoma Target Factor Identification and Application

研究代表者

寺崎 美佳 (Terasaki, Mika)

日本医科大学・医学部・講師

研究者番号：50372785

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、破骨細胞様巨細胞を伴う平滑筋肉腫(LMS with OLGCs)の腫瘍細胞が、RUNX2と骨芽細胞関連マーカーを発現していることを明らかにした。これにより、LMS with OLGCsが、骨芽細胞分化を伴うLMSの亜型であることが示唆された。また、本腫瘍の特徴であるOLGCsは、浸潤マクロファージが、破骨細胞へと分化したもので、周囲のコラーゲン線維を分解し、組織が、易出血性を示すことが明らかとなった。加えてRUNX2が予後不良因子と報告されている肺癌や腎癌での、RUNX2発現局在を明らかにし、子宮平滑筋肉腫のみならず、予後不良なこれらの疾患の治療ターゲットになり得る可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、高悪性度の婦人科腫瘍および肺癌、腎癌におけるRUNX2および骨芽細胞分化マーカーの発現は、現在まで治療が困難で、予後不良であった症例の治療ターゲットになり得る可能性を示した。これまで、骨芽細胞にしか起こらないと考えられていた分化課程は、高悪性度肉腫や低分化および未分化な癌細胞にも生じていることが示唆され、骨芽細胞分化を起こした腫瘍という臓器を超えた疾患カテゴリーの創出と、治療戦略になりえる発見であったことに社会的意義がある。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we discovered that tumor cells of uterine leiomyosarcoma with osteoclast-like giant cells (LMS with OLGCs) express RUNX2 and osteoblast-related markers. This suggests that LMS with OLGCs represents a distinct subtype of LMS, characterized by osteoblastoid differentiation. Notably, OLGCs, a defining feature of this tumor type, derived from infiltrating macrophages into osteoclasts. These osteoclasts subsequently degrade and eliminate surrounding type IV collagen fibers, leading to a tumor tissue that is prone to hemorrhage. Furthermore, we observed RUNX2 expression in tumors of other organs without evidence of osteogenesis or osteoclast-like giant cells. We also delineated the localization of RUNX2 expression in lung and kidney cancers, where RUNX2 has been identified as a poor prognostic indicator. Consequently, RUNX2 may serve as a potential therapeutic target not only for uterine leiomyosarcoma, but also for these diseases with poor prognostic outcomes.

研究分野：腫瘍病理

キーワード：子宮平滑筋肉腫 骨芽細胞分化 RUNX2 腎癌 肺癌 破骨細胞様巨細胞

## 1. 研究開始当初の背景

子宮平滑筋肉腫は、子宮原発肉腫として最多を占め、予後不良な疾患である。術前画像診断、術後病理診断もその多彩性から良悪性の鑑別すら困難がともなうことが多い。また、子宮原発癌に比べると発生頻度が低く、詳細な発症機序解明や有効な治療法確立が難しい背景がある。様々なターゲット因子の検索がなされているが、平滑筋由来肉腫という一元的カテゴリーでの解析が中心であり、いまだ有効な治療法確立に至っていない。多彩な組織像は、発現因子の異なった腫瘍群が混在している可能性を示唆しており、個々の症例の詳細解析による腫瘍群抽出、解析が必要であり、術前血清で腫瘍を予測するバイオマーカー探索が求められていた。私たちは、破骨細胞に似た巨細胞(Osteoclast-like giant cell; OLGC)を伴う子宮平滑筋肉腫(LMS with OLGCs)では、破骨細胞分化に必須のサイトカインである receptor activator of nuclear factor B ligand (RANKL)が、腫瘍組織内に著明に増加していることを発見した(文献1)。RANKLは、正常骨組織で骨吸収を担う破骨細胞分化、成熟に必須のサイトカインとして発見され(文献2)、RANKL抗体製剤であるデノスマブは骨粗鬆症、癌の骨転移症例、骨巨細胞腫の治療薬として臨床で使用されている。OLGCを伴う癌や肉腫の報告は、全身臓器(肝、脾、前立腺、乳腺、軟部)にわたってみられ、少数ではあるがOLGCを伴う肝癌や軟部平滑筋肉腫においてRANKL発現の報告がある(文献3,4)。しかし、RANKLと腫瘍増殖の関係、RANKLの発現機序などは、未解明であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、多彩性として理理解されていた従来の概念をかえ、形態の違いが腫瘍発現因子の違いにつながるという発想のもと、類似の形態を示す腫瘍群を抽出し、RANKLを中心とした腫瘍増殖の機序を解明し、治療に直結する新しい診断の細分類や、今後の臨床応用へと発展させることを目的とする。

## 3. 研究の方法

- (1) ヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞をもちいた RANKL 過剰発現による腫瘍増殖へ直接的作用検討
- (2) 上記培養細胞で RANKL 上流および下流因子同定と腫瘍増殖へ直接的作用検討
- (3) 子宮平滑筋肉腫 FFPE 検体をもちいて RANKL 発現を規定する上流因子、下流因子発現量(定量的 RT-PCR)、局在(免疫染色)解析
- (4) 子宮平滑筋肉腫症例類似形態部をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)で採取し、タンデム型質量分析(LC-MS/MS)を用いた網羅的発現タンパク解析から発現因子の違いによる腫瘍群抽出

## 4. 研究成果

- (1) ヒト子宮平滑筋肉腫培養細胞をもちいた RANKL 過剰発現による腫瘍増殖へ直接的作用検討 ヒト平滑筋肉腫細胞 SK-LMS-1 を用いて、RANKL の過剰発現腫瘍細胞を作成したが、コントロールと比較し、効果的に発現を誘導出来なかった。
- (2) 上記培養細胞で RANKL 上流および下流因子同定と腫瘍増殖へ直接的作用検討 RANKL を上記培養細胞の培地に添加し、増殖能の検討を行ったが、未添加細胞と比較し、増殖能に差は見られなかった。
- (3) 子宮平滑筋肉腫 FFPE 検体をもちいて RANKL 発現を規定する上流因子、下流因子発現量(定量的 RT-PCR)、局在(免疫染色)解析 RANKL が骨芽細胞から分泌されることから、骨芽細胞転写因子である RUNX2 の発現に関して、FFPE 検体で、免疫組織化学、定量的 RT-PCR を行い、LMS with OLGCs 症例では RANKL と同様、RUNX2 の発現増加がみられた。また骨芽細胞因子であるオステオポンチンにも発現上昇傾向がみられた。
- (4) 子宮平滑筋肉腫症例類似形態部をレーザーキャプチャーマイクロダイセクション(LCM)で採取し、タンデム型質量分析(LC-MS/MS)を用いた網羅的発現タンパク解析から発現因子の違いによる腫瘍群抽出 LC-MS/MS により、通常型の LMS や平滑筋腫と比較し、LMS with OLGCs 症例で著明に増加しているその他の蛋白の同定はできなかったが、IV 型コラーゲン関連蛋白が著明に減少していた。
- (5) コラーゲンの特殊染色、免疫組織化学によるヒト組織検体での検討 LMS with OLGCs では、とくに OLGCs が集簇する周囲に、顕著にコラーゲン特殊染色の染色性の低下がみられ、免疫組織化学で、IV 型コラーゲンの発現低下がみられた。通常型の LMS や平滑筋腫では、逆にコラーゲンは密に存在していた。
- (6) 骨融解の主要なコラーゲン分解酵素である Cathepsin K の発現を免疫組織化学での検討 免疫組織化学にて、OLGCs に Cathepsin K の強発現を認めた。また破骨細胞分化の

転写因子である NFATc1 が、腫瘍内のマクロファージおよび OLGs の核に発現を認めた。一方、通常型の LMS や平滑筋腫では、腫瘍内のマクロファージに Cathepsin K, NFATc1 の発現はみられなかった。

- (7) 骨化が見られる腫瘍、脱分化を示す腫瘍群（乳癌、肺癌、腎癌、甲状腺癌、Solitary fibrous tumor、骨巨細胞腫での、骨芽細胞分化の検討 RUNX2, RANKL, NFATc1, Cathepsin K の発現についてそれぞれの腫瘍群で検討を行い、LMS with OLGs と同様、骨化が見られる腫瘍、破骨細胞を伴う腫瘍、脱分化を来した腫瘍群では、一部に骨芽細胞への分を示す結果を得た。また、腎癌の肉腫様癌および肺癌において、破骨細胞を伴っていない症例においても、RUNX2 の高い発現がみられることを発見した。加えて、癌周囲反応性間質に RUNX2 が高発現する腫瘍群が見つかり、骨芽細胞分化は肉腫のみならず、上皮悪性腫瘍である「がん」や「がん関連線維芽細胞」にも見られることが示唆された。

以上の研究結果により、破骨細胞様巨細胞を伴う平滑筋肉腫（LMS with OLGs）において、腫瘍細胞が RANKL のみならず、RUNX2, Osteopontin と骨芽細胞分化に関連する他のマーカーを高い発現していることが分かった。また組織学的に特徴的な破骨細胞様巨細胞は、腫瘍内に浸潤している単球・マクロファージが RANKL-RANK シグナルにより破骨細胞転写因子である NFATc1 を発現し、破骨細胞へと分化している事が明らかとなった。以前より破骨細胞様巨細胞を伴う平滑筋肉腫では、通常的肉腫よりも肉眼的に出血が目立つ事が指摘されていた（文献 5）。本研究において、破骨細胞様巨細胞は、破骨細胞と同様、コラーゲンを分解する酵素である Cathepsin K を強発現しており、質量分析においても腫瘍内の IV 型コラーゲンの減少、免疫組織化学にて IV 型コラーゲン蛋白の消失がみられた。このことから、破骨細胞様巨細胞周囲の間質である IV 型コラーゲン分解および血管基底膜の破壊により、LMS with OLGs において特徴的な腫瘍内の著明な出血を引き起こしていると考えた。以上の結果を、英文紙に報告した(文献 6)。近年の研究で、RUNX2 が、腎臓がんや肺癌において予後不良因子であることが示されている。このことから、私たちは、子宮平滑筋肉腫のみならず、その他の悪性腫瘍でも、同様に骨芽細胞分化を来している可能性があると考え、様々な骨化が見られる腫瘍、脱分化を示す腫瘍群での、骨芽細胞分化の検討を行い、RUNX2 の高い発現がみられる腫瘍群や癌周囲反応性間質の線維芽細胞が存在することを明らかにした。

#### 【参考文献】

- (1) Terasaki M et al. Human Pathology, 2015
- (2) Yasuda H et al. Proc Natl Acad Sci USA, 1998
- (3) Ikeda T et al. Pathology International, 2003
- (4) Gibbons CL, Virchows Arch, 2010
- (5) Darby A et al. Cancer, 1975
- (6) Terasaki M et al. Virchows Arch, 2021

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mika Terasaki 1, Yasuhiro Terasaki 2 3, Kyoko Wakamatsu 2, Naomi Kuwahara 2, Koichi Yoneyama 4 5, Rieko Kawase 6, Keisuke Kurose 6 7, Etsuko Toda 2, Yoko Endo 2, Shinobu Kunugi 2, Yusuke Kajimoto 2, Akira Shimizu 2	4. 巻 478
2. 論文標題 Uterine leiomyosarcomas with osteoclast-like giant cells associated with high expression of RUNX2 and RANKL	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Arch.	6. 最初と最後の頁 893-904
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00428-020-02996-1	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Yasuhiro Terasaki 1, Mika Terasaki 1, Akira Shimizu 1	4. 巻 27
2. 論文標題 Protective Effects of Hydrogen against Irradiation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Curr Pharm Des .	6. 最初と最後の頁 679-686
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2174/1381612827666210119103545	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Enomoto A, Terasaki M, Murase Y, Kitagawa Y, Shimizu A, Ohashi R, Terasaki Y.	4. 巻 50
2. 論文標題 Malignant granular cell tumors: Combining cytological and pathological findings for a definitive diagnosis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagn Cytopathol	6. 最初と最後の頁 E217-222
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dc.24970	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Toda E, Sawada A, Takeuchi K, Wakamatsu K, Ishikawa A, Kuwahara N, Sawa Y, Hatanaka S, Kokubo K, Makino K, Takahashi H, Endo Y, Kunugi S, Terasaki M, Terasaki Y, Matsushima K, Terashima Y, Shimizu A.	4. 巻 102
2. 論文標題 Inhibition of the chemokine signal regulator FROUNT by disulfiram ameliorates crescentic glomerulonephritis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Kidney Int	6. 最初と最後の頁 1276-1290
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.kint.2022.07.031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Akiko Mii 1, Masako Tagawa 2, Yoko Endo 2, Akira Shimizu 2, Mika Terasaki 3	4. 巻 25
2. 論文標題 Hyaline arteriosclerosis associated paratubular basement membrane insudative lesions in distal renal tubules	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Clin Exp Nephrol .	6. 最初と最後の頁 1158-1160
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10157-021-02076-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 M. Terasaki, Y Terasaki, M Takahashi, N Kokuho, S. Kunugi, J. Usuda, A. Shimizu	4. 巻 14
2. 論文標題 A sarcomatoid localized malignant mesothelioma with osteosarcomatous elements	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Pathology: Case Reports	6. 最初と最後の頁 16-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ehpc.2018.06.003	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 M. Terasaki, Y Terasaki, R.Kawase, A. Shimizu	4. 巻 13
2. 論文標題 Endometrioid carcinoma arising in a uterine adenomyoma	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Human Pathology: Case Reports	6. 最初と最後の頁 24-26
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ehpc.2018.04.002	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 寺崎 美佳, 寺崎 泰弘, 桑原 尚美, 若松 恭子, 柳 雅人, 遠田 悦子, 梶本 雄介, 遠藤 陽子, 功刀 しのぶ, 清水 章
2. 発表標題 破骨細胞様巨細胞を伴う子宮平滑筋肉腫におけるRUNX2、RANKL高発現と破骨細胞分化
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 長岡 竜太, 松井 満美, 數阪 広子, 銭 真臣, 齋藤 麻梨恵, 軸園 智雄, 杉谷 巖, 寺崎 美佳, 寺崎 泰弘
2. 発表標題 家族性大腸腺腫症関連甲状腺乳頭癌(Cribiform-morular variant)症例の検討
3. 学会等名 日本内分泌外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 富永 健太, 寺崎 美佳, 遠藤 陽子, 功刀 しのぶ, 梶本 雄介, 寺崎 泰弘, 清水 章
2. 発表標題 免疫チェックポイント阻害薬投与後に細小動脈の肉芽腫性血管炎を伴う間質性腎炎を発症した一例
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺崎 美佳, 寺崎 泰弘, 桑原 尚美, 若松 恭子, 柳 雅人, 遠田 悦子, 梶本 雄介, 遠藤 陽子 他
2. 発表標題 破骨細胞様巨細胞を伴う子宮平滑筋肉腫におけるRUNX2, RANKL高発現と破骨細胞分化
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺崎 美佳, 若松 恭子, 桑原 尚美, 寺崎 泰弘, 遠田 悦子, 遠藤 陽子, 功刀 しのぶ, 梶本 雄介, 清水 華, 清水 章
2. 発表標題 破骨細胞様巨細胞を伴う腫瘍の組織学的類似性およびRANKL発現の検討
3. 学会等名 第 65 回日本病理学会 秋期特別総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 寺崎美佳、寺崎泰弘、川瀬里衣子、遠藤陽子、永坂真也、功刀しのぶ、清水章
2. 発表標題 機能性間質を伴った卵巣腺筋腫様腫瘍
3. 学会等名 日本病理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mika Terasaki
2. 発表標題 破骨細胞型巨細胞を伴う平滑筋肉腫の腫瘍発現因子の検討
3. 学会等名 第59回日本婦人科腫瘍学会学術講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担者	永坂 真也  (Nagasaka Shinya)  (00573239)	日本医科大学・医学部・助教   (32666)	削除：2019年3月8日
研究 分担者	寺崎 泰弘  (Terasaki Yasuhiro)  (50332870)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------