

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月15日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590389

研究課題名（和文） 骨軟部腫瘍におけるATBF1遺伝子解析による悪性度評価の研究

研究課題名（英文） A study of histological grading on bone and soft tissue tumors by analysis of ATBF1

研究代表者

野島 孝之（NOJIMA TAKAYUKI）

金沢医科大学・医学部・教授

研究者番号：50142732

研究成果の概要（和文）：ATBF1(AT-motif binding factor 1)は $\alpha$ -fetoproteinの転写制御因子として発見されたが、その後、神経や筋の分化制御に関わったり、種々の癌で癌抑制遺伝子としての働きがある。骨軟部腫瘍を中心にATBF1の発現や働きを解析しようと試みた。その結果、良性、低悪性度の骨軟部腫瘍群では免疫組織学的に核陽性を示す症例が多かったのに対して、高悪性度群では核に陽性を示す症例は少なかった。核陰性群は核陽性群に比し、悪性度が高く、癌細胞の悪性度診断を早期に行うことができる可能性を示唆している。

研究成果の概要（英文）：ATBF1(AT-motif binding factor 1) was discovered as a transcriptional regulator of  $\alpha$ -fetoprotein. Thereafter, ATBF1 had a regulatory mechanism of a neuronal and skeletal muscular differentiation, and was a homeotic transcriptional regulatory factor identified as a tumor suppressor gene. We analyzed an immunohistochemical expression and function of ATBF1 on bone and soft tissue tumors. As a result, nuclear staining was observed in most cases of benign or low grade malignant tumor groups, however, in high grade malignant tumor group, one case showed nuclear positivity. Comparing nuclear staining negative group with nuclear staining positive group, we can imply that ATBF1 expression may have potential as a prognostic indicator for bone and soft tissue tumors.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	600,000	180,000	780,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：骨軟部腫瘍・病理診断・悪性度評価・ATBF1

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍における分子生物学的解析は欧米が主体で、Ewing 肉腫における相互転座による変異遺伝子の存在とそれぞれの切断点の塩基配列も明かにされてきた。しかし、遺伝子異常の違いにより予後に差が生じる機構は不明であり、今後の解析が必要である。現在までに我々は骨肉腫では RASSF1A 遺伝子が不活化されていることを、また、p63 遺伝子と p73 遺伝子の発現が低下することを明らかにしてきた。

AT motif binding factor-1 (ATBFI) は、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP) の転写を抑制する大きな転写抑制因子として発見されたが、その後その転写抑制機能は p53 による転写調節機能と深い関係があることが明らかとなった。細胞周期制御に関しても ATBFI と p53 は協調的に作用して p21 (Waf1/Cip1/CDKN1A) 遺伝子を活性化し、増殖制御に関わることが明らかとなっている。また ATBFI 遺伝子は多数の癌で染色体欠失が報告される 16 番染色体に存在し (16q22.3-q23.1)、前立腺癌例の約 4 割で somatic mutation が示された。さらに ATBFI 遺伝子は多数の癌で染色体欠失が報告される 16 番染色体に存在し (16q22.3-q23.1)、前立腺癌例の約 4 割で somatic mutation が示された。さらに ATBFI は胃癌、乳癌、膀胱癌などに共通して感度の高い臨床的予後決定因子であり、新しい癌抑制遺伝子であることが証明された。抗 ATBFI 抗体を用いた検討により P19 細胞では ATBFI は細胞質に留まり、核内に存在していないことが判明した。ATBFI は細胞質と核を移動することで細胞特性を激変させるスイッチとして機能し、このスイッチ機構が癌の特性まで決定できることが予測されている。

## 2. 研究の目的

がんの組織診断は病理学的になされるが、特に骨軟部腫瘍では、①腫瘍の種類が多く、②組織分類が多岐にわたり、複雑で、③発生頻度が比較的低く、病理医が修練し、熟達することが難しい。その補助手技として、④免疫組織化学の結果をどのように診断にむすびつけてよいのか判断に悩むことも多い。近年、分子生物学の技術的進歩により、悪性骨軟部腫瘍の遺伝子異常は画期的に解析が進んでいる。今回我々は、ヒトの悪性骨軟部腫瘍と癌抑制遺伝子 ATBFI との関連を、免疫組織化学および臨床病理学的に探索する。また ATBFI との関係が深い癌抑制遺伝子 p21、p16 や、非上皮性悪性腫瘍での関連が深いと

される  $\beta$  catenin や Akt、WT1 の遺伝子を含め遺伝子量の変化・変異を探索し、細胞内局在を中心に形態学的差異との比較解析を行う。本研究では骨軟部腫瘍において ATBFI を中心として、関連する遺伝子並びにタンパク発現を解析し、悪性骨軟部腫瘍の客観的な病理組織診断およびその悪性度の標準化への応用を試みる。

## 3. 研究の方法

### (1) 骨軟部腫瘍症例の収集と病理学的診断、組織型の確定

症例、細胞株の収集と形態学的所見とともに複数の非上皮性マーカーと癌のマーカーを用いた免疫組織化学的検討、腫瘍特異変異遺伝子の有無の解析を行い、診断を確認する。

### (2) 癌抑制遺伝子 ATBFI の免疫組織学的解析

抗 ATBFI 抗体を用い免疫組織化学的解析を行う。細胞内での各癌抑制遺伝子の局在と染色パターンを詳細に観察し、悪性腫瘍細胞と反応性増殖性線維芽細胞、境界病変細胞などとの比較を行う。2名の病理医により別々に判定されたデータをまとめる。

### (3) 細胞内の核・細胞質における ATBFI の局在の解析

胎仔と成人のマウスの脳細胞を用い、ATBFI のリン酸化による局在の変化をウェスタンブロット法を用い検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 骨軟部腫瘍症例の収集と病理学的診断、組織型の確定

各種骨軟部腫瘍を収集し、組織学的及び免疫組織学的に、また、骨軟部腫瘍に特異的な変異遺伝子の探索により、病理学的な診断を行った。滑膜肉腫、悪性中皮腫では細胞株を用いて細胞の腫瘍特異性を検討し、細胞の特性を行った。

### (2) 癌抑制遺伝子 ATBFI の免疫組織学的解析

ATBFI 抗体を用いて、各種骨軟部腫瘍の細胞内局在を解析した。反応性増殖病変の線維芽細胞、筋線維芽細胞は 8 例全例に細胞質に強い発現を認めたが、核は陰性であった。良性腫瘍では 18 例中 16 例が細胞質に、9 例が核に陽性を示した。一方、悪性腫瘍では 34 例中 31 例が細胞質に、7 例が核に陽性を示した。さらに臨床病理学的に腫瘍組織型別の生

物学的増殖能、悪性度を加味して検討すると、狭義の良性腫瘍は 8 例中 6 例が細胞質に、5 例が核に陽性を、境界・中間型腫瘍では 10 例中 10 例が細胞質に、4 例が核に陽性を示した。一方、低悪性度腫瘍は 8 例中 8 例が細胞質に、5 例が核に、中悪性度腫瘍では 4 例中 1 例が細胞質に、1 例が核に、高悪性度腫瘍では 22 例中 22 例が細胞質に、1 例が核に陽性を示した。これらの結果は核タンパク質である ATBF1 が、良性腫瘍から低悪性度腫瘍に高頻度の発現を示し、ATBF1 の本来有しているがん抑制遺伝子としての働きを示しているものと思われた。平滑筋腫瘍では、良性腫瘍では 3 例中 2 例、低悪性度の平滑筋肉腫では 3 例中 2 例に核の陽性を認めたが、高悪性度平滑筋肉腫では 7 例中全例陰性であった。横紋筋性腫瘍では良性の横紋筋腫は核に陽性を示すが、横紋筋肉腫は 3 例とも陰性であった。

これらの結果は核タンパク質である ATBF1 が、良性腫瘍から低悪性度腫瘍、あるいは in situ 的な病変に高頻度の発現を示し、ATBF1 の本来有しているがん抑制遺伝子としての働きを示しているものと思われた。一方、滑膜肉腫や浸潤性を示す悪性中皮腫の腫瘍細胞ではがん抑制遺伝子としての働きを失い、細胞質に強い発現が生じたものと思われる。多数の骨軟部腫瘍症例、培養細胞株細胞を検討しているが、高悪性度腫瘍では明らかに ATBF1 の細胞質内局在が観察される。反応性病変、良性から低悪性度腫瘍では核に局在をみる症例が多い。

### (3) 細胞内の核・細胞質における ATBF1 の局在の解析

ATBF1 のリン酸化の解析のために、胎仔と成人のマウスの脳細胞を検討した。その結果、胎仔の脳細胞には ATBF1 が豊富に存在し、プロテアーゼ抵抗性で、成人のマウスの脳には ATBF1 が少なく、プロテアーゼで消失することを明らかにした。これにはリン酸化が関与し、かつ full length の ATBF1 のみリン酸化状態にあることが示唆されている。これらの結果を踏まえ、今後骨軟部腫瘍における、ATBF1 の発現とリン酸化の状態、核・細胞質における ATBF1 の機能との関連を明らかにしていきたい。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 6 件)

① H. Suzuki, K. Yamashiro, H. Takeda, T. Nojima, M. Usui. Extra-axial soft tissue

chordoma of wrist, *Pathol Res Prac*, 査読有, 207, 2011, 327-331

DOI:10.1016/j.prp.2011/02.001

② 野島孝之. 軟部腫瘍の分類と診断へのアプローチ, *臨床病理*, 査読無, 58, 2010, 352-357

③ S. Miwa, S. Kitamura, T. Shirai, K. Hayashi, H. Nishida, A. Takeuchi, T. Nojima, H. Tsuchiya. Desmoplastic small round cell tumour successfully treated with caffeine-assisted chemotherapy. A case report and review of the literature, *Anticancer Res*, 査読有, 30, 2010, 3769-3774

④ H. Nakajima, Y. Ishigaki, Q.S. Xia, T. Ikeda, Y. Yoshitake, H. Yonekura, T. Nojima, T. Tanaka, H. Umehara, N. Tomosugi, T. Takata, T. Shimasaki, N. Nakaya, I. sato, K. Kawakami, K. Koizumi, T. Minamoto, Y. Motoi. Induction of HITS, a newly identified family with sequence similarity 107 protein (FAM107B), in cancer cells by heat shock stimulation, *Int. J. Oncol*, 査読有, 37, 2010, 583-593, DOI:10.3892/ijo\_00000707

⑤ 小田義直, 的野浩士, 松浦傑, 恒吉正澄, 長谷川匡, 野島孝之, 岩本幸英. 生検標本による軟部肉腫の組織型・悪性度判定における病理診断の問題点, *日整会誌*, 査読有, 84, 2010, 1114-1119

⑥ H. Minato, T. Nojima, N. Kurose, E. Kinoshita. Adenomatoid tumor of the pleura, *Pathol. Int.* 査読有, 59, 2009, 567-571, DOI:10.1111/j.1440-1827.2009.02407.x

[学会発表] (計 4 件)

① S. Zhang, Y. Dong, M. Kawaguchi, TS. Kim, S. Kanazawa, K. Asai, H. Minato, T. Nojima, Y. Miura. ATBF1 is highly phosphorylated in embryonic brain, 第 34 回日本分子生物学会, 2011 年 12 月 16 日, パシフィコ横浜 (横浜市)

② T. Nojima, Leiomyosarcoma of bone, 37<sup>th</sup> International Skeletal Society Annual Meeting, 2010 年 9 月 28 日, Hilton Hotel (Athens, Greece)

③ 野島孝之, 骨軟部腫瘍の病理診断のピットフォール, 日本病理学会関東支部第 44 回学術集会, 2009 年 9 月 19 日, 帝京大学 (東京都)

④ 野島孝之, 軟部腫瘍の分類と診断へのアプローチ, 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会, 2009 年 8 月 27 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野島 孝之 (NOJIMA TAKAYUKI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：50142732

(2) 研究分担者

湊 宏 (MINATO HIROSHI)  
金沢医科大学・医学部・教授  
研究者番号：10293367  
三浦 裕 (MIURA YUTAKA)  
名古屋市立大学・医学部・准教授  
研究者番号：90285198