

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670286

研究課題名(和文) 原発不明癌の骨転移症例に対する血清あるいは尿を用いた原発巣の診断法の樹立

研究課題名(英文) Establishment of new diagnostic approach for the primary unknown metastatic bone tumor

研究代表者

齋藤 剛 (SAITO, Tsuyoshi)

順天堂大学・医学部・准教授

研究者番号：80439736

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：悪性腫瘍の再発・転移に関する因子の研究成果として、胃消化管間質腫瘍(GIST)においてPPP2R1Aという脱リン酸化酵素の遺伝子変異が生命予後に影響を与える因子であることを見出した(Toda-Ishii, et al. Mod Pathol, 2016)。また、弧在性線維性腫瘍(SFT)では、腫瘍特異的な融合遺伝子のタイプによって生命予後に差が出ることを示し、また腫瘍の悪性度が急激に上がる脱分化現象にTERT promoter変異とTP53変異が関与している可能性を示した。残念ながら、直接の癌の早期発見に繋がるような因子の同定は本研究期間中には困難であった。

研究成果の概要(英文)：We are trying to find biomarkers that can help to diagnose the primary unknown metastatic carcinomas. In this process, we identified that PPP2R1A mutations frequently occurred in GIST and that patients with GIST having this mutation showed adverse clinical outcome. We also showed that the type of NAB2-STAT6 fusion, which is specifically observed in solitary fibrous tumor (SFT), affects patients' prognosis. Furthermore, TERT promoter mutation and TP53 mutation were associated with the acquisition of the aggressive behavior, especially in the process of dedifferentiation of this tumor. We have previously shown that lung adenocarcinoma was the most common carcinoma among the primary unknown metastatic bone tumors. We also showed that galectin-4 could be a diagnostic marker for the metastatic lung adenocarcinoma, because the metastatic lung adenocarcinomas tend to lose TTF-1 expression, a marker of lung adenocarcinoma, while keeping the galectin-4 expression at the metastatic sites.

研究分野：悪性腫瘍の転移機構の解明

キーワード：原発不明癌 バイオマーカー 病理診断

1. 研究開始当初の背景

転移性骨腫瘍とは、癌が骨に転移したもので、特に頻度の高いものとして骨髄腫・前立腺癌・乳癌・腎癌・肺癌などが挙げられる。癌の治療においては、原発巣に対する有効な治療方法が増え、癌患者さんの延命が得られるようになった半面、転移性骨腫瘍の患者は増加傾向にある。特に、癌の骨転移患者は骨転移による痛みや骨折によりQOLの低下を来し、問題となっている。また、少なからず、骨転移が癌の発見の契機になることもあり、これらは原発不明癌骨転移として扱われる。しかしながら、原発不明癌骨転移が疑われる際に、原発巣の探索の目的で骨転移巣からの生検を施行しようとしても疼痛のために十分な体位が取れず、生検検体の採取が出来ないことも多い。また、生検検体採取後の病理学的検索においても、通常のH.E.染色のみだけではなく、免疫染色等を行うことも多く、確定診断が出るまで通常2週間程度の時間を要することから、その間に病状が進行してしまうこともある。

一方、我々はこれまでに、プロテオミクス解析により、肺腺癌の転移陽性群 vs 転移陰性群の比較により、肺腺癌の転移関連バイオマーカーとして、可溶性 Galectin-4 の同定をした(Hayashi T, **Saito T** et al. PLOS One 2013)。また、未発表データではあるが、原発不明癌の検索の際に肺腺癌のマーカーとしてよく用いられる TTF-1 の発現と Galectin-4 の発現が逆相関するというデータも見出している。これは、転移を高率に来すタイプの肺腺癌には、Galectin-4(+)/TTF-1(-)という phenotype が高率に存在する可能性を示しており、原発不明癌における原発巣の検索においては、TTF-1 の発現の有無による肺腺癌の推定には落とし穴も多いことを示唆する。こうした可溶性の転移関連バイオマーカーの同定は、原発不明癌骨転移患者の原発巣推定の際に、前立腺癌に特異的な尿中に排泄される PSA のような、採血あるいは採尿によって、非侵襲でスピーディーに検査可能な腫瘍マーカーとなり得る可能性を秘めており、非常に有用な検査となり得る。

2. 研究の目的

癌の治療においては、原発巣に対する有効な治療方法が増え、癌患者の延命が得られるようになった半面、転移性骨腫瘍の患者は増加傾向にある。原発不明癌骨転移が疑われる際に、原発巣探索の目的で生検を

施行しようとしても疼痛のために生検検体の採取が出来ずに診断・治療が進まないことも多い。それゆえ、原発不明癌骨転移患者には、原発巣の早期の確定とそれに伴う分子標的治療を含む適切な治療が予後を改善するため、早期診断が可能な方法の樹立に着目した。本研究では、プロテオミクスを用いることにより、癌腫特異的な可溶性のマーカーをまず同定し、“原発不明癌の骨転移症例に対する血清あるいは尿を用いた原発巣の診断法の樹立”を目指し、早期に適切な治療を行い原発不明癌骨転移患者の生命予後の改善に繋げたい。本研究では、骨転移を来しやすい各種由来の新鮮凍結検体を用いてプロテオミクスを行い、より(骨)転移しやすいタイプの癌に発現している癌腫特異的なバイオマーカー、その中でも特に可溶性のマーカーに着目し、マーカーが有用なものかどうかを明らかにする。さらに、そのマーカーを原発不明癌骨転移患者の原発巣推定の際の臨床検査に応用し、“原発不明癌の骨転移症例に対する血清あるいは尿を用いた非侵襲性の診断法の樹立”をする。さらに、原発不明癌転移症例を対象に臨床病理学および分子病理学的解析を行うことから、転移性腫瘍の特徴を見出し、早期診断・治療に結びつける。

3. 研究の方法

肺癌・乳癌・腎癌等の各癌腫において、転移陽性群 5 例 vs 転移陰性群 5 例程度の新鮮凍結検体を用意し、プロテオミクス(ITRAQ)法により転移関連バイオマーカー候補の同定を行う。次に、各種癌の多数の臨床検体を用いて、プロテオミクスによって同定された各癌腫特異的な転移関連バイオマーカー候補の発現状態を免疫染色にて検証する。その後、転移しやすい癌に発現がみられることを確認した後に、臨床検査への有用性の評価を計画している。具体的には、原発不明癌骨転移患者より血液あるいは尿を採取し、血清あるいは尿由来の腫瘍特異的な転移関連バイオマーカーによって示唆される原発巣(A)と、同時に採取された骨転移巣からの生検検体の組織学的/免疫組織学的検索あるいはCT/MRI等によって推測された原発巣(B)が合致するかを検証し、高確率で合致するようであれば、診断価値を有する新たな臓器特異的なマーカーとして確立される。具体的には、以下の方法で行う。

ITRAQ 法による各癌腫に特異的な転移関連バイオマーカーの同定

研究代表者の行った肺腺癌における転移関連バイオマーカーの探索の研究(Hayashi T, **Saito T** et al. PLOS One, 2013)時に行ったものと同様の実験を他の臓器の癌に対してデジタル化されたプロテオミクス(ITRAQ)を用いて行う。ITRAQ 法

は、二次元電気泳動法に比べ、より網羅的に蛋白質の発現量を調べることに適しており、今回これを用いる。

- 1) 腎臓・前立腺・乳腺・卵巣・子宮等の各臓器由来の悪性腫瘍より凍結検体を採取し、初診時の他臓器転移情報を含む臨床病理情報を前向きに収集していく。
- 2) 後の検討に使用できるように、同時に行われた原発不明癌骨転移患者の骨転移巣から採取された生検検体を蓄積しておく。
- 3) まず、各癌腫において多臓器転移を来している症例を収集する。骨転移巣とそれ以外の転移巣において組織形態および免疫染色におけるマーカーの発現様式が同様に保たれているかを確認する。この段階で大きく異なっているようであれば、4)のプロテオミクスに用いる転移由来検体は骨転移巣から採取した検体を用いる。
- 4) 次に各臓器由来の悪性腫瘍について、(骨を含む遠隔あるいはリンパ節)転移陽性群 5 例 vs 転移陰性群 5 例程度を用意し、ITRAQ を用いたプロテオミクスを行う。
- 5) 転移関連バイオマーカーの優先順位付けと選択
各悪性腫瘍において転移関連バイオマーカーとして同定された蛋白質を統計学的有意差の高いものから順に、また、その際に血清あるいは尿中へ出現するタイプのもの、また他臓器との重複のないものを優先して選択する。
- 6) 免疫組織化学を用いた臨床検体多数例における検証
4)において選り出された転移関連バイオマーカーの発現の有無を、多数例のホルマリン固定パラフィン包埋された臨床検体を用いて免疫染色でその蛋白質の発現を確認する。また、そのバイオマーカーの発現の有無が、各癌腫の(骨を含む遠隔あるいはリンパ節)転移の有無と相関するかを検証する。また、生命予後とも相関するかどうかも調べる。
血清・尿中の転移関連バイオマーカーによる原発巣の推定と検証
- 1) ITRAQ 法による各癌腫に特異的な転移関連バイオマーカーの同定の継続
骨転移を起こす頻度の高い乳癌・肺癌・腎癌等は、比較的頻度が高い腫瘍

であるが、26 年度中に十分な症例数が得られなかった場合は、凍結検体等の収集とプロテオミクス以降の実験を継続する。

- 2) 各臓器の臨床検体を用いた検証を行う
[1] 26 年度にプロテオミクスにより同定された各腫瘍における癌転移関連バイオマーカー候補が、真の転移関連バイオマーカーとなり得るかどうか、予後情報の揃っている多数例の各種癌のホルマリン固定パラフィン包埋された原発巣検体に対して免疫染色を用いて検証する。
[2] 各種癌の原発巣と転移巣の病理組織検体が揃っている多数例の臨床検体を用いて、原発巣～転移巣において、転移関連バイオマーカー候補の発現が保たれているか検証する。
- 3) 採血・採尿による原発巣推定のバイオマーカーとなりうるかを検証する
[1] 原発不明癌骨転移患者より採血・採尿を行い、上記 2)までの検証過程を通過した各腫瘍における癌転移関連バイオマーカー候補を対象とし、原発不明癌患者の血清・尿中におけるこれらのマーカーの発現量を ELISA により調べることににより原発巣(A)を推定する。
[2] また、同時に原発不明癌の骨転移患者の骨転移巣から生検検体を採取するとともに、CT, MRI 等の画像所見も参照し、可能な限り原発巣(B)の確定を行う。
[3] 新規症例に関して、血清あるいは尿由来の腫瘍特異的バイオマーカーによって示唆される原発巣(A)と、生検検体の検索あるいはCT/MRI 等によって推測された原発巣(B)が合致するかどうかを実証する。(A)(B)が一致するようであれば、採血・採尿による原発巣推定の有力なバイオマーカーとなることが証明される。
- 4) 生検検体に対する既免疫染色マーカーによる原発巣の推定との有用性を比較
[1] 新規症例に関して、既免疫染色マーカーを用いた骨転移巣からの生検検体を用いた病理学的検索から推測された原発巣候補(C)と、CT/MRI 等によって推測された原発巣(D)が合致するかどうかを調べ、本研究で新規に同定されるバイオマーカーを用いた採

血・採尿による原発巣推定過程と比較・検証する。

[2] さらに、原発巣と骨転移巣の病理組織検体が揃っている既往検体で、かつ最終的に原発巣の確定が行われた症例を対象とし、これらに対し、現在までに原発不明癌の検索の際に用いられている臓器特異的既免疫染色マーカーに加え、今回のプロテオミクス解析によって同定された癌腫特異的転移関連マーカーの発現状態を調べ、それらの有用性を検証する

4. 研究成果

原発不明癌骨転移例の臨床病理学的検討

原発不明癌 286 例の臨床病理学的解析を行い、その特徴を調べた。その結果、血液検査・画像検査を含む臨床的な検査および転移巣からの生検によって、原発不明癌骨転移例の原発巣が判明したのは約 89%であり、肺原発の腺癌が最も多かった。また、原発不明癌骨転移症例の方の平均生存期間は、約 20 か月であり、単発転移例の平均生存期間は 39 か月であったのに対し、多発転移例の平均生存期間は 20 か月であった。一方、原発巣として最も多かった肺原発腺癌症例の平均生存期間は 9 か月、前立腺癌症例の平均生存期間は有意に長く 120 か月に及び、最後まで原発巣の不明であった症例では平均生存期間は 11 か月であった。また、骨転移に伴う疼痛・病的骨折等により患者の performance state が低下すると、さらに予後が低下することがわかった。これらのことから、原発不明癌骨転移症例では、転移巣からの生検等によって病理診断が確定する前の早期の段階から、積極的に治療を開始することが重要と思われた。

骨巨細胞腫における骨破壊機序の解明

上記、転移性骨腫瘍の治療において現在中心的な役割を果たしている分子標的薬に denosumab がある。これは破骨型巨細胞の分化を抑制することから、その骨破壊能を抑えるものであるが、その薬剤が効果を発揮する分子機構について詳細は不明である。一方で、破骨型巨細胞が出現し、骨破壊の顕著な腫瘍として骨巨細胞腫がある。この腫瘍をモデルに、denosumab の抗腫瘍効果・骨破壊抑制機構を調べた。同一患者の骨巨細胞腫の denosumab 治療前後の検体を用いて、ITRAQ によるプロテオミクスを行い、denosumab 投与によって発現に違いのあるタンパク質を調べた。すると、治療前後において、13 の発現が上昇したタンパク質および 19 の発現の低下したタンパク質が同定された。その中の denosumab 投与によって発現の低下していたタンパ

ク質の 1 つである MMP-9 に着目したところ、MMP-9 の活性は denosumab 投与によって著明に抑制されていた。また、投与前の標本では、破骨型巨細胞に MMP-9 の強い発現が認められたが、投与後の標本では残存している単核の間質細胞に少なからず MMP-9 の発現が認められた。これらのことから、denosumab 投与によって破骨型巨細胞の減少とともにその骨破壊能は低下するものの、残存する単核の間質細胞にも MMP-9 を介した若干の骨破壊能があることが推測され、骨巨細胞腫の治療においては継続的に denosumab の投与を続けていく必要性があると思われた。

胃消化管間質腫瘍(GIST)における脱リン酸化酵素異常の臨床病理学的解析

GIST は *KIT* や *PDGFRA* といったチロシンキナーゼ受容体の遺伝子変異がシグナル伝達経路を活性化し、腫瘍発生に重要な役割を果たしていることが知られている。一方で、脱リン酸化酵素はシグナル伝達経路に関わる様々な基質の脱リン酸化に関わることから腫瘍発生に抑制的に働くことが示されている。本研究では、GIST における脱リン酸化酵素の 1 つである *PPP2R1A* を構成する分子の 1 つをコードする *PPP2R1A* 変異と臨床病理学的相関を解析した。まず、*PPP2R1A* 変異が GIST において高頻度で起こっていることを見出した。さらに、この変異を有する場合、GIST 患者の生命予後が有意に悪くなることを見出した。また、この変異を有さない GIST 細胞株に変異型の *PPP2R1A* を遺伝子導入したところ、細胞増殖活性が上がり、またリン酸化アレイを行ったところ、血管新生に関わるタンパク質のリン酸化の亢進が見られた。以上のことから、GIST において *PPP2R1A* 変異は腫瘍の悪性度を上げる方向に働いていることが分かり、また、チロシンキナーゼ阻害剤に対する治療抵抗性にも関与している可能性も示唆された。

弧在性線維性腫瘍(SFT)における融合遺伝子のタイプと臨床病理学的相関の解析

肉腫や悪性リンパ腫、さらには肺腺癌を始めとした悪性腫瘍の一部には、染色体転座による融合遺伝子形成がみられる。近年の次世代シーケンスの発展により、以前は診断基準の曖昧であった SFT においても新規融合遺伝子 *NAB2-STAT6* が同定された。また、融合遺伝子は腫瘍特異的にみられることが多いが、亜型を有するものも多く、その一部は融合遺伝子のタイプと組織学的な特徴や患者の生命予後に違いが出ることが示されている。本研究では、まず融合遺伝子のタイプと腫瘍発生部位・組織形態との相関があることを示した。具体的には、肺・胸膜発生例

では、*NAB2(exon4)-STAT6(exon2)*あるいは*NAB2(exon4)-STAT6(exon3)*が多くみられることを示し、また組織学的にも膠原線維の増生の強い、細胞密度の低いタイプの腫瘍であることを示した。また、*NAB2(exon6)-STAT6(exon16)*あるいは*NAB2(exon6)-STAT6(exon18)*を有する腫瘍は悪性度が高くなることも見出した。さらに SFT では稀に脱分化という腫瘍の悪性度が急激に上がる現象が起こるが、この脱分化過程に *TERT* promoter 変異と *TP53* 変異が関与している可能性を示した。

肺腺癌における TTF-1 と galectin-4 の発現は逆相関する

私たちは、以前、プロテオミクスを用いたタンパク質発現解析によって、肺腺癌において galectin-4 の発現が予後不良因子として働くことを示した。TTF-1 は肺腺癌のマーカーとして日常の病理診断にも用いられるが、一方、TTF-1 陽性肺癌は陰性肺癌に比べて予後良好であることが報告されている。そこで、肺腺癌における TTF-1 の発現と galectin-4 のタンパク質発現の相関を調べた。まず、208 例の肺腺癌検体を用いて TTF-1 の免疫染色を行ったところ、TTF-1 陽性肺癌は陰性肺癌に比べて予後が良好となった。次に、TTF-1 の発現と galectin-4 の発現の相関を調べたところ、両者の間には逆相関がみられた。さらに、肺腺癌の転移として確定された転移性病変の病理検体を用いて、TTF-1 と galectin-4 の免疫染色を行ったところ、転移巣では TTF-1 の発現陽性率が低くなり、TTF-1 陽性例では galectin-4 を発現していることが多かった。これらのことより、原発不明癌における原発巣を病理学的に探索する際には、TTF-1 陰性となる可能性が十分にあることを認識し、病理診断を行うことが必要と思われる。また、その際に galectin-4 の免疫染色も同時に行うことで、診断の補助になる可能性も示唆された。

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 25 件)

1. Takagi T, Katagiri H, Kim Y, Suehara Y, Kubota D, Akaike K, Ishii M, Mukaihara K, Okubo T, Murata H, Takahashi M, Kaneko K, Saito T. Skeletal metastasis of unknown primary origin at the initial visit: A retrospective analysis of 286 cases. PLoS One. 2015, 10:e0129428.
2. Mukaihara K, Suehara Y, Kohsaka S, Akaike K, Tanabe Y, Kubota D, Ishii M, Fujimura T, Kazuno S,

Okubo T, Takagi T, Yao T, Kaneko K, Saito T. Protein Expression Profiling of Giant Cell Tumors of Bone Treated with Denosumab. PLoS One. 2016, 11(2):e0148401.

3. Toda-Ishii M, Akaike K, Suehara Y, Mukaihara K, Kubota D, Kohsaka S, Okubo T, Mitani K, Mogushi K, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. Clinicopathological effects of protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha mutations in gastrointestinal stromal tumors. Mod Pathol. 2016; Nov;29(11):1424-1432. doi: 10.1038/modpathol.2016.138.
4. Akaike K, Kurisaki-Arakawa A, Hara K, Suehara Y, Takagi T, Mitani K, Kaneko K, Yao T, Saito T. Distinct clinicopathologic features of *NAB2-STAT6* fusion gene variants in solitary fibrous tumor with emphasis on the acquisition of highly malignant potential. Human Pathol. 2015, 46:347-356.
5. Hara K, Saito T, Hayashi T, Mitani K, Takamolchi K, Oh S, Suzuki K, Yao T. Inverse correlation between galectin-4 and TTF-1 in lung adenocarcinoma. Virchows Arch, in press.

[学会発表](計 15 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 剛 (SAITO, Tsuyoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号：80439736

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし