

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 25 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K20017

研究課題名(和文) 浸潤関連候補タンパク質による粘液線維肉腫浸潤性機構解析

研究課題名(英文) A proteomic analysis to identify novel proteins related to mechanisms of tumor cell invasion in myxofibrosarcoma

研究代表者

菊田 一貴 (Kikuta, Kazutaka)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・助教

研究者番号：30383798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：浸潤性軟部肉腫の代表である粘液線維肉腫はその浸潤性性格による外科的切除後の高い再発率が臨床上的問題である。そのため、粘液線維肉腫患者の治療成績向上には浸潤性に関わるバイオマーカー開発が必須である。本研究では11例の粘液線維肉腫を対象に蛍光二次元電気泳動法を用いたプロテオミクス解析で、粘液線維肉腫浸潤性予測バイオマーカー候補としてDCBLD2を見出し免疫組織化学的解析により、その有用性を検証した。今後、症例数を増やしてさらなる検証実験をおこなうことで、浸潤性予測バイオマーカーとしての臨床応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Myxofibrosarcoma (MFS) is a mesenchymal malignancy characterized by frequent recurrence even after radical wide resection. To optimize therapy for MFS patients, we aimed to identify candidate tissue biomarkers of MFS invasion potential. We performed protein profiling in invasive and non-invasive MFS and detected a number of differentially expressed proteins. Among them, DCBLD2 was identified as a novel factor associated with tumor cell invasion in MFS, suggesting its potential clinical application as a biomarker for MFS prognosis. This is the first report about possible clinical utility of DCBLD2 in sarcomas. Further investigation of the detected proteins may produce additional biomarkers or clinical targets in MFS.

研究分野：整形外科、骨軟部腫瘍、希少がん、プロテオミクス

キーワード：Myxofibrosarcoma Invasion Proteomics DCBLD2 2D-DIGE

1. 研究開始当初の背景

浸潤性軟部肉腫の代表である粘液線維肉腫は中高年齢者の特に四肢に好発する悪性軟部肉腫である¹⁾。粘液線維肉腫の唯一の根治的な治療は外科的切除であり、放射線療法や化学療法の有用性は示されていない^{2), 3)}。しかしながら、その浸潤性性格のために外科的切除後の再発率は50-60%に上り、再発例の約30%では、より悪性度の高い腫瘍となり予後不良であることが報告されている^{1), 4)}。臨床上、粘液線維肉腫の浸潤性はMRI、特にガドリニウム造影MRIを用いて評価されているが、MRIで評価した腫瘍浸潤性と病理組織学的な腫瘍浸潤性が一致しない場合が散見される^{4), 5), 6), 7)}。そのため、粘液線維肉腫の浸潤性を評価するための新しいモダリティが必要である。我々は、これまでに蛍光2次元電気泳動法(2D-DIGE)を用いたタンパク質網羅的解析(プロテオミクス解析)が様々な肉腫の診断、予後予測、化学療法奏効性予測バイオマーカー開発に有用であることを示してきたが、粘液線維肉腫に対しては、過去に2D-DIGEを用いたプロテオミクス解析の報告はなかった。

2. 研究の目的

本研究では粘液線維肉腫の浸潤性予測バイオマーカーを開発するために2D-DIGEを用いたプロテオミクス解析をおこない、がんの増殖に関わる膜タンパク質である discoidin, CUB and LCCL domain-containing protein 2 (DCBLD2)が粘液線維肉腫の浸潤性に関わるタンパク質であることを同定し、その有用性を免疫組織化学的に検証した。

3. 研究の方法

(1) 対象

1999年から2008年までに国立がん研究センター中央病院および慶應義塾大学病院で外科的切除を受けた11例の粘液線維肉腫症例を対象とし、MRIで浸潤性を認める浸潤性粘液線維肉腫6例と浸潤性を認めない非浸潤性粘液肉腫5例の2群に分類した(Fig. 1)。

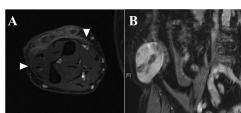


Fig. 1. MFS samples were divided into the invasive and non-invasive groups based on MRI findings. A. Invasive MFS. The tumor shows extensive multidirectional spread from the central tumor mass (white arrowheads). B. Non-invasive MFS. The tumor lacks obvious signs of spread from the central tumor mass, showing clear margins.

これら11例の組織サンプルを外科的切除の際に採取し、-80度で保存し、プロテオミクス解析に使用した。また、21例の新規追加パラフィン包埋検体を免疫組織学的解析に使用した。これらの症例の臨床病理学的データをTable 1およびTable 2にまとめた。

本研究は国立がん研究センターおよび慶應大学病院における倫理審査委員会の承認のもと、全ての症例からインフォームドコンセントを取得しおこなった。

(2) サンプル調整と2D-DIGE

2D-DIGEの全体像をFig. 2に示した。

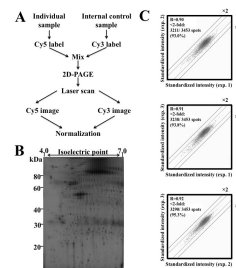


Fig. 2. Workflow of proteomic screening and evaluation of system reproducibility. A. Experimental protocol of 2D-DIGE. The internal control sample was included in all experiments. B. Typical gel images. Spot area and intensity indicate the amount of protein in the spot. C. Scatter plot analysis of the data obtained in three independent experiments. The correlation and number of protein spots whose intensity was scattered within a range of 2-fold difference between the paired two experiments are shown in the panels.

具体的には、2D-DIGEには24×36cmの巨大ゲルを使用した。サンプルの調整においては、解析する全てのサンプルから等量ずつタンパク質を混合した内部標準サンプルを作成し、Cy3 (CyDye DIGE Fluor saturation dyes; GE Healthcare Biosciences, Uppsala, Sweden)で標識し、個別の解析サンプルはCy5 (GE Healthcare Biosciences)で

標識した。これら異なる色素で標識したサンプルを混合し、1枚のゲルで泳動した。一次元目には24 cmのIPGゲル(pI 4-7, GE Healthcare Biosciences)を使用し、二次元目は36 cmの泳動距離でSDS-PAGEを行った⁸⁾。泳動されたゲルをレーザーキャナー(Typhoon Trio, GE Healthcare Biosciences)でスキャンし、タンパク質スポット情報を取得した。各解析サンプルのゲル間のばらつきをProgenesis SameSpots software (Nonlinear Dynamics, Newcastle, UK)を用い、各解析サンプルの泳動パターンを内部標準サンプルの泳動パターンで補正した。各解析サンプルは3回泳動し平均をとることで各解析サンプル内の不均一性を補正した。

(3) 質量分析によるタンパク質同定

得られたタンパク質スポットの中から、興味深いスポットを回収し、トリプシン(Promega, Madison, WI)処理をおこない、高速液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計(Finnigan LTQ linear ion trap mass spectrometer equipped with a nanoelectrospray ion source; Thermo Electron Co., San Jose, CA)を用いて解析した⁸⁾。

(4) 免疫染色

免疫染色は、ポリマー法(Envision Dual Link System-HRP, Dako, DK-2600, Glostrup, Denmark)を用いた。各症例について、腫瘍中心部と辺縁部の両方で免疫染色をおこなった。各症例切片を脱パラフィン処理および脱水処理した後、10mMクエン酸緩衝液(pH 6.0)で10分間121オートクレーブ処理して抗原賦活化をおこなった。DCBLD2抗体(Atlas Antibodies, Stockholm, Sweden)は100倍希釈して用い、常温で1時間反応させた。反応後3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochlorideを用いて発色させた。その後、ヘマトキシリン液にて対比染色した。染色強度の評価は、独立した2名の医師がブラインドで行い、以下の基準によりG0-G3の4段階に分類した。G3: 腫瘍細胞の細胞膜全体が強く染色される、G2: 腫瘍細胞の細胞膜全体が弱～中等度に染色される、G1: 腫瘍細胞の細胞膜においてわずかに染色性が認め

られる。G0: 腫瘍細胞は染色されない。

4. 研究成果

全解析サンプルに発現が確認された3453タンパク質スポットのうち、浸潤性・非浸潤性粘液線維肉腫の2群間で、2倍以上かつWilcoxon検定 $p < 0.05$ と統計学的優位に発現量が異なる59個のタンパク質スポットを見出した。このうち46スポットが浸潤性粘液線維肉腫で発現量が増加しており、一方で13スポットの発現量が低下していた。質量分析により、これら59タンパク質スポットは47個のタンパク質に対応しており、浸潤性粘液線維肉腫において、36個のタンパク質は発現が増加しており、11個のタンパク質は発現が低下していた。

浸潤性粘液線維肉腫において発現が増加していた36タンパク質に関して、これまでの解析で用いたサンプルに対応したパラフィン包埋切片を用いて、免疫組織化学的に発現の解析を行った。その結果、膠芽腫や頭頸部癌においてその発現が腫瘍形成に関わるEGFRパスウェイに属するDCBLD2を見出した⁹⁾。そこで、DCBLD2と粘液線維肉腫の浸潤性との相関を検証するため新規21症例の粘液線維肉腫パラフィン包埋切片を用いて免疫組織化学的解析をおこなった。これら全ての症例は術前のガドリニウム造影MRIで確認された腫瘍辺縁から2cmの切除縁を設定し、外科的切除施行後、組織学的に切除断端の陽性あるいは陰性の評価をおこなった。DCBLD2の染色強度をG3からG0の4段階で評価し、G3、G2を陽性、G1、G0を陰性と定義したところ、陽性症例は10/21例(47.6%)であり、これら10例では腫瘍中心部と腫瘍辺縁部いずれにおいてもDCBLD2は高発現していた(Fig. 3)。

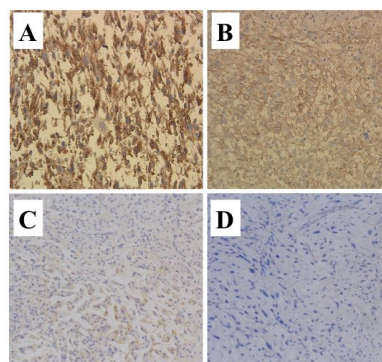


Fig. 3. DCBLD 2 expression status examined by immunohistochemistry. A. Strong complete membrane staining (G3). B. Weak to moderate complete membrane staining (G2). C. Faint/barely perceptible membrane staining (G1). D. No staining (G0). Tumor tissues with G0–G1 scores were considered as DCBLD2-negative, and those with G2–G3 as DCBLD2-positive.

粘液線維肉腫の浸潤性予測バイオマーカーとして、DCBLD2の感度および特異度はそれぞれ69.2%と87.5%であった。また陽性的中率と陰性的中率はそれぞれ90%と63.6%であった (Table 2)。DCBLD2発現量とMRI上の浸潤性および組織学的断端陽性は単変量解析によりいずれも統計学的に有意な相関を認めた (Table 3)。

これらの結果から、DCBLD2の強発現が粘液線維肉腫の浸潤性に強い相関を示すことが示唆された。

<引用文献>□

- 1) C.D.M. Fletcher, J.A. Bridge, P. Hogendoorn, F. Mertens, WHO Classification of Tumours of Soft Tissue and Bone, Fourth Edition ed., WHO Press, Place Published. 2013.
- 2) K.E. Haglund, C.P. Raut, A.F. Nascimento, et al, Recurrence patterns and survival for patients with intermediate- and high-grade myxofibrosarcoma, International journal of radiation oncology, biology, physics. 2012;82:361-367.
- 3) R. Sanfilippo, R. Miceli, F. Grosso, M. Fiore, et al, Myxofibrosarcoma: prognostic factors and survival in a series of patients treated at a single institution, Ann Surg Oncol. 2011;18:720-725.
- 4) T. Mentzel, E. Calonje, C. Wadden, et al, Myxofibrosarcoma. Clinicopathologic analysis of 75 cases with emphasis on the low-grade variant, Am J Surg Pathol. 1996;20:391-405.
- 5) L.G. Kindblom, C. Merck, L. Angervall, The ultrastructure of myxofibrosarcoma. A study of 11 cases, Virchows Archiv. A, Pathological anatomy and histology. 1979;381:121-139.

6) H.Y. Huang, P. Lal, J. Qin, et al, Low-grade myxofibrosarcoma: a clinicopathologic analysis of 49 cases treated at a single institution with simultaneous assessment of the efficacy of 3-tier and 4-tier grading systems, Hum Pathol. 2004;35:612-621.

7) K. Kikuta, D. Kubota, A. Yoshida, et al, An analysis of factors related to the tail-like pattern of myxofibrosarcoma seen on MRI, Skeletal radiology. 2015;44:55-62.

8) T. Kondo, S. Hirohashi, Application of highly sensitive fluorescent dyes (CyDye DIGE Fluor saturation dyes) to laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis (2D-DIGE) for cancer proteomics, Nature Protocols. 2007;1:2940-2956.

9) H. Feng, G.Y. Lopez, C.K. Kim, et al, EGFR phosphorylation of DCBLD2 recruits TRAF6 and stimulates AKT-promoted tumorigenesis, The Journal of clinical investigation. 2014;124:3741-3756.

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5件)

(1) Kikuta K, Nakayama R, Yoshida A, Sasaki A, Kameyama K, Chuman H, Kawai A, Nakamura M, Matsumoto M, Morioka H. A histological positive margin after surgery is correlated with high local re-recurrence rate in patients with recurrent myxofibrosarcoma. Japanese Journal of Clinical Oncology. 査読有. 47(4). 2017. 334-341.

DOI: 10.1093/jjco/hyw199

(2) Morioka H, Shunji T, Araki N, Sugihara H, Ueda T, Takahashi M, Yonemoto T, Hiraga H, Himura T, Kunisada T, Matsumine A, Susa M, Nakayama R, Nishimoto K, Kikuta K, Horiuchi K, Kawai A. Results of sub-analysis of a phase 2 study on trabectedin treatment for extraskeletal myxoid chondrosarcoma and mesenchymal chondrosarcoma. BMC Cancer. 査読有. 16. 2016. 479.

DOI: 10.1186/s12885-016-2511-y

(3) Kikuta K, Oguro S, Sekita T, Yamaguchi

S, Susa M, Nishimoto K, Inoue M, Nakatsuka S, Sasaki A, Kameyama K, Nakamura M, Matsumoto M, Morioka H. Osteoid osteoma of the acetabulum successfully treated with computed tomography-guided resection and ablation using a standard electro-surgical generator: a case report. Journal of Medical Case Reports. 査読有. 10. 2016. 348.

DOI: 10/1186/213256-016-1136-8

(4) Kobayashi H, Kikuta K, Sekita T, Susa M, Nishimoto K, Sasaki A, Kameyama K, Sugita S, Hasegawa T, Nakamura M, Matsumoto M, Morioka H. Diagnosis of extraskeletal myxoid chondrosarcoma in the thigh using EWSR1-NR4A3 gene fusion: a case report. Journal of Medical Case Reports. 査読有. 10. 2016. 321.

DOI: 10.1186/213256-016-1113-2

(5) Kamata Y, Kikuta K, Susa M, Nishimoto K, Sasaki A, Kameyama K, Murakami K, Nakamura M, Matsumoto M, Morioka H. Hibernoma showing high uniform accumulation on an 18F-fluorodeoxyglucose positron emission tomography scan: a case report. Case Reports in Oncology. 査読有. 9(2). 2016. 427-431.

DOI: 10.1159/000448240

〔学会発表〕(計4件)

(1) Kikuta K. Protein X as a candidate molecule related to high invasive activity of myxofibrosarcoma revealed by proteomics. 15th Human Proteome Organization World Congress. 2016年9月18日. Taipei (Taiwan).

(2) 菊田一貴. 粘液線維肉腫浸潤性関連候補タンパク質同定のための蛍光2次元電気泳動法を用いたプロテオーム解析. 第67回日本電気泳動学会. 2016年8月27日. 釧路市観光国際交流センター. 北海道・釧路市

(3) 菊田一貴. 小切開と術中イメージを併用したCTガイド下焼灼術をおこなった臼蓋部類骨骨腫の1例. 第49回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会. 2016年7月14日. 東京ドームホテル. 東京都・文京区

(4) 菊田一貴. プロテオーム解析により同定した粘液線維肉腫浸潤性関連候補タンパク質の免疫組織学的検討. 第89回日本整形外科学会総会. 2016年5月12日. パシフィコ横浜. 神奈川県・横浜市

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 粘液線維肉腫の浸潤性判定補助方法および当該方法に利用される粘液線維肉腫の

浸潤性判定用キット

発明者: 菊田一貴, 中村雅也, 川井章, 近藤格

権利者: 同上

種類: 特許

番号: 第2011/0293618号

出願年月日: 2017年3月31日

国内外の別: 国外

取得状況(計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊田一貴 (KIKUTA KAZUTAKA)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号: 30383798