

令和元年6月14日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19085

研究課題名(和文)骨巨細胞性病変の解析による、骨代謝シグナルネットワークの解析

研究課題名(英文)Analyses of signal network of bone metabolism through giant cell-rich lesions of bone

研究代表者

加藤 生真(Kato, Ikuma)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80644939

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)：破骨細胞分化誘導因子RANKLに対する抗体製剤(デノスマブ)が骨巨細胞腫の治療薬として使われるようになったが、治療後の特異な組織像および腫瘍細胞の本体に関して、これまでの理解は不十分であった。近年明らかとなった骨巨細胞腫特異的な遺伝子異常を各種骨代謝シグナルと統合的に解析し、組織像および治療効果について考察した。デノスマブ治療後は、全例において巨細胞の消失を含む組織像の劇的な変化がみられた一方で、骨芽細胞マーカーを発現する腫瘍細胞は一貫して豊富にみられた。以上から、骨巨細胞腫における真の腫瘍細胞は骨芽細胞分化能を有しており、デノスマブ治療後の線維骨は腫瘍細胞が形成していることが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年発見された特異的な遺伝子異常の視点を加えたことで、骨巨細胞腫は、非腫瘍細胞(破骨細胞系細胞)との相互作用によって成立している腫瘍性病変であることが明らかとなった。また抗RANKL抗体による治療は、一見すると劇的な治療効果があるように思われていたが、根本的な治療とは言い難いことが明らかとなった。病理組織像と遺伝子異常を統合的に解析することが、疾患の本質的な理解につながることを示された。

研究成果の概要(英文)：Denosumab, a human monoclonal antibody directed against the receptor activator of nuclear factor-kappa B ligand (RANKL), was introduced as a therapeutic agent for giant cell tumor of bone (GCTB). To understand the complete mechanism of denosumab, we compared the histologic and immunohistochemical features of GCTBs before and after denosumab therapy. In all cases, the osteoclast-like giant cells disappeared. However, all post-therapeutic lesions still contained many H3.3 G34W(+) cells. Immunofluorescent double-staining revealed that RUNX2(+) mononuclear cells co-expressed H3.3 G34W in pre- and post-denosumab lesions. In conclusion, the neoplastic cells survive denosumab therapy and make woven bones in response to the new environment free from osteoclastic cells.

研究分野：人体病理学

キーワード：骨巨細胞腫

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

RANK/RANKL系は破骨細胞分化を誘導することが知られており、骨リモデリングによる恒常性維持において重要な役割を担っている。近年、破骨型巨細胞が豊富にみられる骨巨細胞腫の治療薬として、抗RANKL阻害剤であるデノスマブが用いられるようになった。治療後は、線維骨形成と紡錘形細胞増生というきわめて特異な組織像が観察されるが、そのメカニズムは明らかではなかった。また、骨巨細胞腫の真の腫瘍細胞に関しても、結論が出ていなかった。

2. 研究の目的

骨巨細胞腫に抗RANKL阻害剤であるデノスマブが投与されることで、線維骨形成と紡錘形細胞増生というきわめて特異な組織像が観察されることに注目した。その特異な組織像とRANK/RANKL系との関係を解析することにより、真の腫瘍細胞の同定および骨代謝シグナルネットワークの解明を試みた。

3. 研究の方法

①症例：デノスマブの生検検体・デノスマブ治療後の搔把検体が入手可能な骨巨細胞9例を対象とした。

②組織像の評価：病理組織学的に治療後の像をパターン別に分類し、その割合を計測した。

③免疫組織化学的评价：治療前後における、H3.3 G34W(骨巨細胞腫瘍の新規マーカー)・RUNX2(骨芽細胞分化マーカー)・NFATc1(破骨細胞分化マーカー)の発現を判定量的に計測した。さらに、陽性細胞どうしの局在・関連性について、蛍光重染色を用いて検討した。

④遺伝子変異の評価：治療前後におけるH3F3A G34W変異(骨巨細胞腫の腫瘍特異的変異)の有無についてサンガー法を用いて評価した。

4. 研究成果

デノスマブ治療前は全例とも、破骨型巨細胞と単核細胞が混在する、骨巨細胞腫の典型的な像であった(図1)。

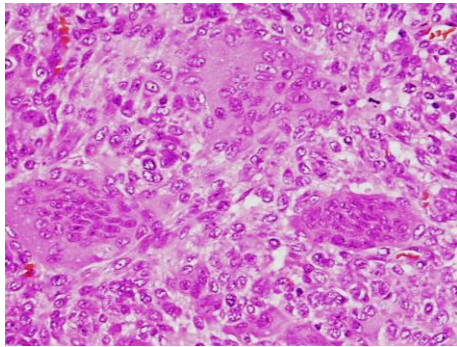


図1：骨巨細胞腫瘍の典型的な組織像
無数の核をいれた破骨型巨細胞が単核細胞と混在している。

デノスマブ治療後は全例において組織像の劇的な変化(紡錘形細胞の増生巣から線維骨形成へと移行する像)が観察され、破骨型巨細胞およびNFATc1陽性細胞は消失した(図2)。一方で、H3.3 G34W陽性細胞およびRUNX2陽性細胞は一貫して豊富にみられ、サンガー法でもH3F3A G34W変異が一貫して検出された。さらに、蛍光重染色で、治療前後とも、H3.3 G34WとRUNX2は同一の細胞に発現していることが示された。

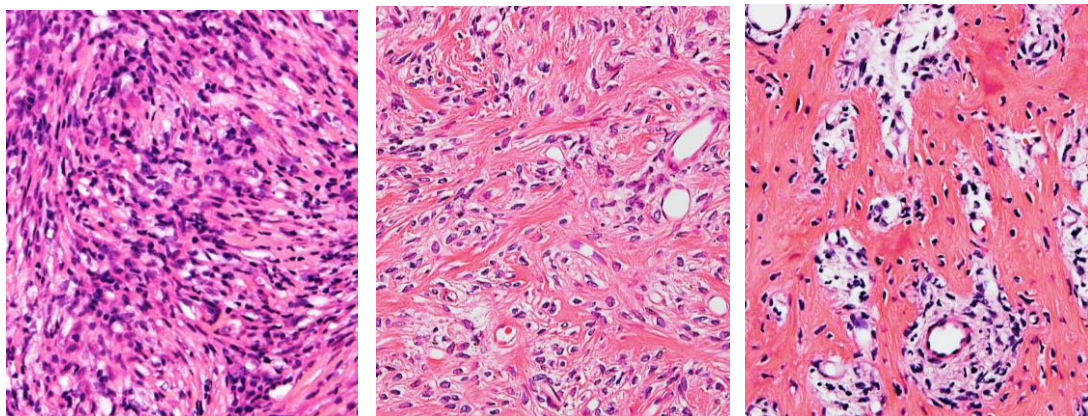


図2：デノスマブ治療後の組織パターン

左) 紡錘形細胞が流れをもって増生する像

中央) 繊細な膠原線維が紡錘形細胞とともに網目状に入り混じる像

右) 線維骨が網目状に形成される像

上記3パターンの像が種々の程度に混在する。いずれの領域においても、破骨型巨細胞は認められない。

以上から、劇的な組織像の変化とは裏腹に、デノスマブ治療後も腫瘍細胞は形を変えて残存していることが判明した。骨巨細胞腫における真の腫瘍細胞は、RUNX2 を発現する骨芽細胞分化能を有しており、デノスマブ治療後の線維骨は腫瘍細胞が形成していることが示された。かつては「破骨細胞腫」の別名でも呼ばれた骨巨細胞腫であるが、その本質は破骨細胞との相互作用によって形成される骨芽細胞系腫瘍であることが明らかとなった（図3参照）。

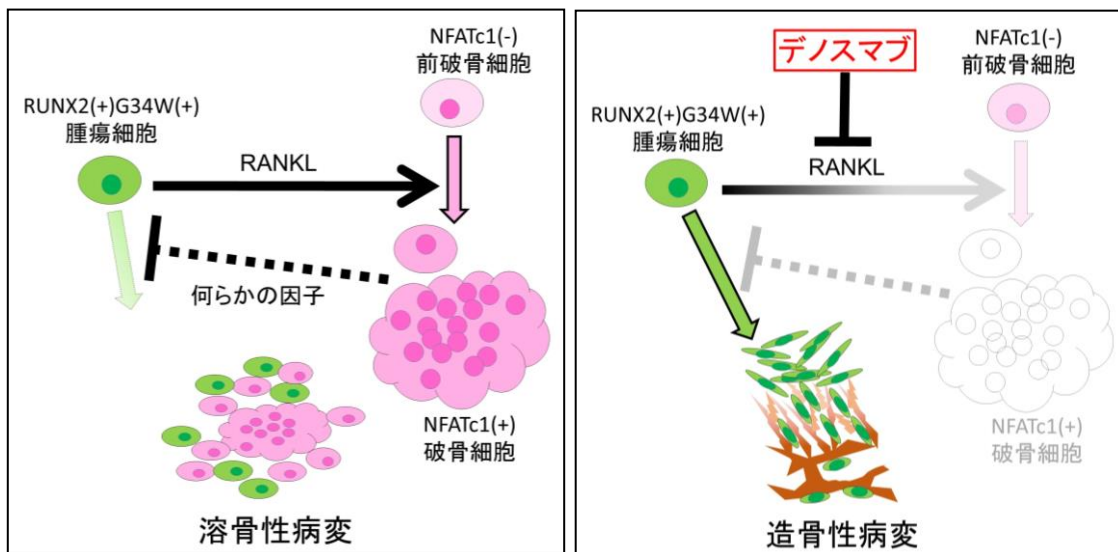


図3:骨巨細胞腫における構成細胞の相互作用（左はデノスマブ治療前、右は治療後）。治療前は共存する破骨細胞の作用により、腫瘍細胞の骨形成能は抑制されている。治療後は破骨細胞からの作用が無くなり、腫瘍細胞が本来有している骨形成能が顕在化する。腫瘍細胞と破骨細胞の相互作用のバランスにより病変の組織像および性質（溶骨性/造骨性）が劇的に変化することがわかる。（雑誌論文①から引用・改変）

今回の結果を踏まえると、デノスマブ治療は骨巨細胞腫に対する殺腫瘍細胞効果に乏しく、根治的治療となり得ないことが示唆された。従来からの搔把や切除などとあわせた、最適な治療方法に関して、臨床医と連携してさらに検討をすすめていく必要があると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計1件、査読あり）

- ① Kato I, Furuya M, Matsuo K, Kawabata Y, Tanaka R, Ohashi K. Giant Cell Tumours of Bone Treated with Denosumab: Histologic, Immunohistochemical, and H3F3A Mutation Analyses. *Histopathology*. 2018; 72: 914-922.

〔学会発表〕（計6件）

- ① 加藤生真、古屋充子、大橋健一. 骨巨細胞腫における真の腫瘍細胞は、破骨細胞系ではなく骨芽細胞系である 第77回日本癌学会学術総会、大阪、大阪国際会議場、2018年9月29日(27-29日)、一般口演.
- ② 加藤生真、古屋充子、川端佑介、田中玲子、大橋健一. デノスマブ投与後の骨巨細胞腫：蛍光免疫二重染色を含めた統合的解析 第107回日本病理学会総会、札幌、ロイトン札幌、2018年6月23日(21-23日)、一般口演(英語).
- ③ Kato I, Furuya M, Kawabata Y, Tanaka R, Ohashi K. True Neoplastic Cells in Giant Cell Tumor of Bone are Osteoblast Lineage Cells. Global Academic Programs GAP 2018 conference, 2018年5月15-17日, Karolinska Institutet and University Hospital, Stockholm (Sweden), 一般示説(英語).
- ④ Kato I, Furuya M, Kawabata Y, Tanaka R, Ohashi K. True Neoplastic Cells in Giant Cell Tumor of Bone Potentially Have Osteogenic Nature and Reveal their Osteogenic Histology After Denosumab Therapy: Integrated Analyses Including Immunofluorescent Double Staining. 107th The United States Canadian Academy of Pathology Annual meeting, 2018年3月20日, Vancouver (Canada), 一般口演(英語).
- ⑤ 加藤生真、古屋充子、大橋健一. Giant cell tumor of bone after denosumab therapy: histologic changes do not mean disappearance of the tumor cells 第76回日本癌学会学術総会、横浜、パシフィコ横浜、2017年9月28日(28-30日)、一般示説.
- ⑥ 加藤生真、古屋充子、松尾光祐、田中玲子、大橋健一、青木一郎. デノスマブ投

与後の骨巨細胞腫：組織像の劇的な変化は腫瘍細胞の消失を意味しない 第106回日本病理学会総会、東京、京王プラザホテル、2017年4月27日(27-29日)、一般口演(英語).

〔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〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者：なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：古屋 充子

ローマ字氏名：(FURUYA, Mitsuko)

研究協力者氏名：川端 佑介

ローマ字氏名：(KAWABATA, Yusuke)

研究協力者氏名：松尾 光祐

ローマ字氏名：(MATSUO, Kosuke)

研究協力者氏名：田中 玲子

ローマ字氏名：(TANAKA, Reiko)

研究協力者氏名：大橋 健一

ローマ字氏名：(OHASHI, Kenichi)

※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。