

令和 2 年 6 月 10 日現在

機関番号：24402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10977

研究課題名(和文) プロテオームを用いた単純性骨嚢腫の発生・再発メカニズムの検討

研究課題名(英文) Proteomic analysis for mechanism of solitary bone cyst.

研究代表者

星 学 (HOSHI, MANABU)

大阪市立大学・大学院医学研究科・准教授

研究者番号：50445037

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)：単純性骨嚢腫は長管骨、踵骨に発生する内部に液体を貯留する腫瘍様類似疾患であるが、その病因は不明である。本研究では単純性骨嚢腫を構成する壁細胞と内容液の検討を行った。長管骨骨嚢腫の壁細胞の性格は、RNAの発現では骨芽細胞に偏っており、また、壁細胞の培養細胞はALPを産生する性格を有することが確認された。病理学的には長管骨症例、再発症例、踵骨症例いずれにおいても破骨細胞活性は高くなかった。内容液のプロテオーム解析を行ったところ、踵骨骨嚢腫ではapolipoprotein Eを主体とする脂質代謝が賦活化しており、踵骨骨嚢腫に観察されるCholesterol granulomaとの関連性も示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

単純性骨嚢腫の病因は現在も未解決の状態である。遺伝子発現、病理組織像での検討では、単純性骨嚢腫の壁細胞の性格は、骨吸収像を示唆する破骨細胞ではなく、骨芽細胞系形質の性格が優位であった。プロテオーム解析では、踵骨骨嚢腫症例では脂質代謝の賦活化がみられ、古典的に報告されている静脈還流障害説、内圧上昇説などの病因論とは異なった経路の関与が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Solitary bone cysts are benign, fluid-filled, skeletal lesions mainly seen in the metaphyseal regions of long bone of proximal humerus, femur (long bone cyst), and calcaneus (calcaneal bone cyst). The pathogenesis of solitary bone cyst remains unknown. We investigated the character of parietal cell and inside cystic fluid. The RNA level of the osteoblast activity was dominant in long bone cyst. The cultured parietal cell had the property of producing ALP. Pathologically, osteoblast activity was not significant in solitary bone cysts. Proteomic analysis of the cystic fluid revealed that lipid metabolism including apolipoprotein E was activated in calcaneal bone cysts. It was suggested that activation of lipid metabolism related to the pathological findings of the presence of cholesterol granuloma that was histologically observed in calcaneal bone cysts.

研究分野：整形外科

キーワード：整形外科 骨軟部腫瘍 骨腫瘍 単純性骨嚢腫 病因

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

単純性骨嚢腫は、小児に好発する比較的頻度の高い腫瘍様類似疾患である。その内部には漿液性の液体で満たされた空洞が骨髄内で形成される。主には小児の上腕骨近位、大腿骨近位骨幹端部や脛骨近位、踵骨に好発するとされている。嚢胞腔が緩徐に増大し、骨の菲薄化が増悪すると、病的骨折をきたし繰り返す疼痛の原因となる。更に、骨折を契機として、成長障害をきたし、変形が残存することにより QOL を損ねることが単純性骨嚢腫の臨床上的問題点である。

病因に関しては現在も不明な点が多いが、古典的な研究では、単純性骨嚢腫からの間質液のドレナージ障害 (Cohen 1960)、静脈還流異常説 (Cohen 1970)、単純性骨嚢腫内の内圧上昇説 (Shigira 1983) などが唱えられている。また、本疾患に対する生化学的なアプローチとして PG、IL-1、蛋白分解酵素などの炎症の関与が関与していること (Komiya 1993)、活性酸素が関与していること (Komiya 1994)、NO が関与していること (Komiya 2000) などが考察されてきたが、単純性骨嚢腫の骨吸収、及び液体貯留に関する病因にはまだまだ不明な点が多い。治療方法としては、ステロイド注入をはじめ、病巣搔爬術後に空洞に人工骨を移植するなどの手術療法の選択されているが、長管骨の単純性骨嚢腫においては特に再発が問題である。このように、単純性骨嚢腫は種々の臨床的問題が存在する。

2. 研究の目的

単純性骨嚢腫の手術標本 (腫瘍細胞: 壁細胞) や内容液を対象としてプロテオームによる網羅的タンパク解析により、その発生・再発に関する因子を同定することが今回の研究目的である。本研究では単純性骨嚢腫を臨床的な病態の違いから、1. 長管骨単純性骨嚢腫、2. 再発した長管骨単純性骨嚢腫、3. 踵骨骨嚢腫に分類し、手術試料を検討することで、発生・再発に関わる因子の解明を試みた。

単純性骨嚢腫の病因を解析するにあたり、腫瘍細胞に相当する壁細胞については過去にはほとんど報告がない。内容液に対する生化学的解析を試みられており、内容液では血清と比較して、骨代謝性マーカーである ALP、BAP、ACP が著名に亢進していることが報告されている (Marković 1988)。また、単純性骨嚢腫では、発生部位によりその臨床像は異なっており、踵骨に発生する症例は若干高い年齢層にみらる。踵骨の単純性骨嚢腫は長管骨の発生例とは異なり、手術治療後の再発率は低く、予後は良好であることを、我々は過去に報告してきた (Takada 2014)。そこで、手術で得られた検体組織の病理組織像を詳細に検討したところ、踵骨骨嚢腫では cholesterol cleft が多数含まれ、薄い疎な線維性結合組織の膜から構成される病理像を呈しており、長管骨発生の単純性骨嚢腫の病理組織像とは異なっていることを発見した (Takada 2014)。cholesterol cleft は慢性血腫を起因とする組織像 (Dota 1963) であることが証明されていることから踵骨の症例では、還流障害説等が報告されている長管骨とはその発生の病因が異なると考えた (Takada 2014)。我々は単純性骨嚢腫から採取される壁細胞、及び、内容液に着目して研究をすることにより、単純性骨嚢腫の発生・再発の病因の解明を前進できると考えた。

3. 研究の方法

単純性骨嚢腫から手術により採取した 1. 壁細胞組織、2. 嚢胞内溶液に分けての解析を行った。

(1) 長管骨単純性骨嚢腫の壁細胞の性格の解析

壁細胞組織の遺伝子発現

単純性骨嚢腫は単純 X 線像からも推測されるように、その内腔に内容液を貯留することから、骨吸収性の骨病変と予測される。単純性骨嚢腫の壁細胞について、骨芽細胞系 (ALP, BAP)、破骨細胞系 (ACP) のマーカーについて RNA レベルでの遺伝子発現を検討した。長管骨単純性骨嚢腫の壁細胞から RNA を回収し、cDNA とし、PCR により骨芽細胞系の分化に関する遺伝子発現 (RUNX2、オステオポンチン、骨シアロプロテイン、オステオカルシン) 及び、破骨細胞系の分化に関する遺伝子発現 (CAII, TRAP, RANK) の検討を行った。

壁細胞組織の ALP 活性

長管骨単純性骨嚢腫から採取した壁細胞を培養し、ALP の活性を計測した。

比較対象には Positive control として Rat osteosarcoma 株 (UMR106)、Negative control として Myoblast cell (C2C12) を用いた。

(2) 壁細胞の病理組織学的検討

単純性骨嚢腫の壁細胞に関して、1. 長管骨単純性骨嚢腫 2. 再発した長管骨単純性骨嚢腫 3. 踵骨骨嚢腫で病理学的検討を行った。単純性骨嚢腫ではその骨に空洞ができる病態の特徴から、特に破骨細胞活性に注目し TRAP 染色を行った。

(3) 単純性骨嚢腫内容液の解析

プロテオームによる内容液の網羅的解析: 長管骨単純性骨嚢腫の内容液と踵骨単純性骨嚢腫の内容液の比較

当院での手術時に回収した単純性骨嚢腫症例の内容液 (長管骨、踵骨症例それぞれ 3 例) を用いて、プロテオミクスによるタンパク質の網羅的解析を行った。単純性骨嚢腫内容液における蛋白・ペプチドの発現パターンを網羅的な比較解析のために、iTRAQ labeling 法および QSTAR Elite

LC-MS/MS (AB Sciex) 法を施行した。Ingenuity Pathway Analysis を用いて、高発現しているタンパクの pathway の解析を行った。

4. 研究成果

(1) 長管骨単純性骨腫の壁細胞の性格の同定

壁細胞組織の遺伝子発現

当初の予測では単純性骨腫の壁細胞の遺伝子発現の形質は破骨細胞系に傾いていることを予測していたが、破骨細胞系統の遺伝子発現は確認できなかった。一方で、オステオポンチン、骨シアロプロテイン、オステオカルシンの骨芽細胞系統の発現が確認され、単純性骨腫の壁細胞の形質は RNA レベルでは破骨細胞系統ではなく骨芽細胞系統にその発現が傾いていることが確認された。また、RNA の発現レベルから骨芽細胞の分化のレベルは初期の骨芽細胞レベル(前骨芽細胞または成熟骨芽細胞) であると推測された (図 1)。

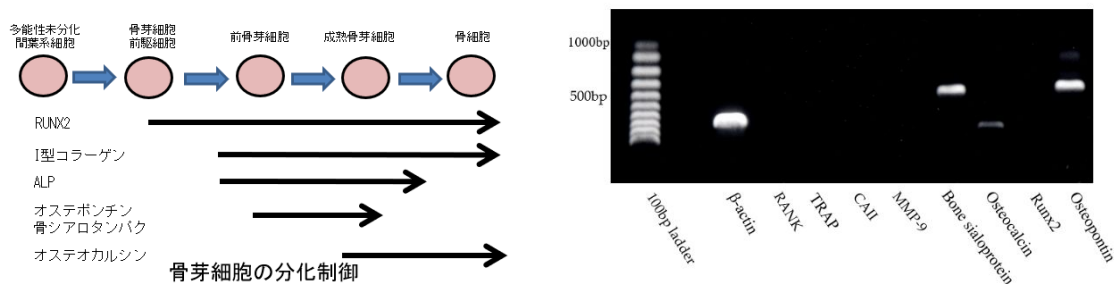


図1. RT-PCR

(b) 壁細胞組織の ALP 活性

長管骨単純性骨腫の壁細胞の培養では、その細胞には ALP 活性があること (図 2)、また、その活性は ERISA 法によりコントロールである骨肉腫細胞よりも低く、Myoblast cell よりも高いことが判明した (図 3)。

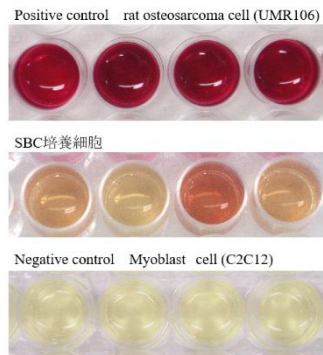


図2. ALP活性

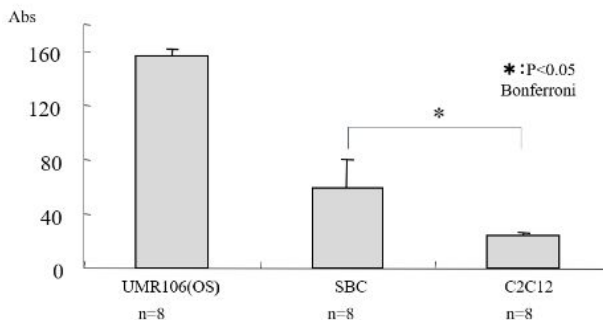


図3. Concentration of ALP in vitro

以上の結果から、長管骨発生の単純性骨腫の壁細胞の形質は破骨細胞系ではなく、骨芽細胞系に傾いていることが判明した。

(2) 壁細胞の破骨細胞の活性

長管骨単純性骨腫症例および再発した長管骨骨腫症例において強視野にて TRAP 染色 (図 4) による破骨細胞活性を検討した。この 2 群間では有意差を認めなかった。更に、長管骨単純性骨腫と踵骨単純性骨腫の間においても同様に検討を行ったが、破骨細胞活性に有意差を認めなかった。尚、組織学的な特徴として、踵骨単純性骨腫の特徴として慢性出血像をしめす Cholesterol granuloma の存在 (図 5) が認められた。

従来予測では手術による臨床成績が良好である踵骨の単純性骨腫での破骨細胞の活性が低く、長管骨単純性骨腫での破骨細胞の活性が高いこと、更に再発した長管骨単純性骨腫の破骨細胞活性が高いことを推測していたが、いずれの組織においても TRAP 染色陽性となる破骨細胞数が非常に少なく、有意差は確認できなかった。

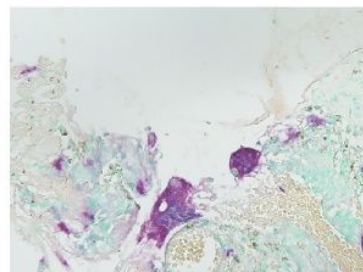


図4. TRAP染色 (× 400)

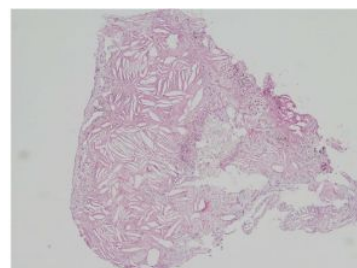


図5. Cholesterol granuloma (× 40)

(3) プロテオーム解析 (長管骨単純性骨嚢腫の内容液と踵骨単純性骨嚢腫の内容液の比較)

長管骨骨嚢腫症例の内容液で lumican, periostin (osteoblast specific factor), Alpha-1-acid glycoprotein-1 など 21 のタンパクの発現の上昇が認められた。

踵骨骨嚢腫症例の内容液では Apolipoprotein A-IV, Apolipoprotein B-100, Zinc-alpha-2-glycoprotein, Apolipoprotein A-II, Pigment epithelium-derived factor, afamin や apolipoprotein E (ApoE) などの発現の上昇が認められた。Ingenuity Pathway Analysis を用いて、高発現している pathway の解析では、踵骨骨嚢腫症例の内容液では、脂質代謝関連経路の活性化高いと考えられた。

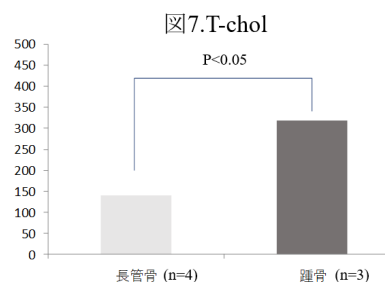
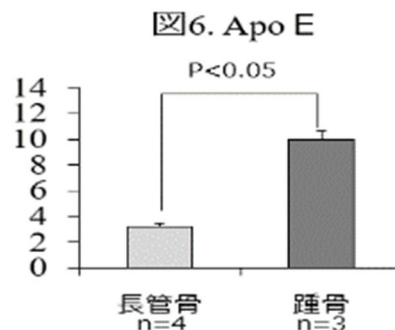
本プロテオーム解析を施行した以外の単純性骨嚢腫症例の内容液を用いて脂質代謝に関連する apolipoprotein E を生化学的に測定したところ、有意に高値であることを確認された (図 6)。

apolipoprotein はコレステロール代謝にかかわる物質である。更に、内容液中の総コレステロールに関して、長管骨骨嚢腫症例と踵骨骨嚢腫症例で比較検討したところ、踵骨骨嚢腫症例で有意に高値であることが判明した (図 7)。これらの発現の上昇は Cholesterol granuloma の組織像を含む踵骨骨嚢腫の病態との強い関連性が示唆された。踵骨骨嚢腫症例では、長管骨骨嚢腫症例と異なり、脂質代謝関連の経路が活性化していることが確認された。

以上より、長管骨単純性骨嚢腫の壁細胞は破骨細胞優位ではなく、骨芽細胞の性格が優位であること、踵骨骨嚢腫では脂肪代謝経路が賦活化されていることが判明した。

< 引用文献 >

- Cohen J (1960) Simple bone cysts. Studies of cyst fluid in six cases with a theory of pathogenesis J Bone Joint Surg Am.1960. 42-A: 609-616.
- Cohen J (1970) Etiology of simple bone cyst. J Bone Joint Surg Am. 294 52:1493-1497.
- Chigira M, Maehara S, Arita S, Udagawa E (1983) The aetiology and treatment of simple bone cysts 65:633-637.
- Komiya S, Minamitani K, Sasaguri Y, Hashimoto S, Morimatsu M, Inoue A (1993) Simple Bone Cyst Treatment by Trepanation and Studies on Bone Resorptive Factors in Cyst Fluid With a Theory of Its Pathogenesis . Clin Orthop Relat Res. 287:204-211. 319
- Komiya S, Tsuzuki K, Mangham DC, Sugiyama M, Inoue A (1994) Oxygen scavengers in simple bone cysts. Clin Orthop Relat Res. 308:199-206.
- Komiya S, Kawabata R, Zenmyo M, Hashimoto S, Inoue A. Increased concentrations of nitrate and nitrite in the cyst fluid suggesting increased nitric oxide synthesis in solitary bone cysts (2000) J Orthop Res.18:281-288.
- Takada J, Hoshi M, Oebisu N, Ieguchi M, Takehashi A, Wanibuchi H, Nakamura H (2014) A comparative study of clinicopathological features between simple bone cysts of the calcaneus and the long bone. Foot Ankle Int. 35:374-382.
- Dota T, Nakamura K, Saheki M, Sasaki Y (1963) Cholesterol granuloma. Ann Otol. 72:346-356.
- Marković B, Cvijetić A, Karakasević J. Acid and alkaline phosphatase activity in bone-cyst fluid. J Bone Joint Surg Br. 1988 Jan;70(1):27-8.



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Hoshi M, Oebisu N, Iwai T, Shimatani A, Takada N, Aono M, Ieguchi M, Takami M, Nakamura H	4. 巻 -
2. 論文標題 Possible pathogenesis of calcaneal bone cysts.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Arch Orthop Trauma Surg	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00402-019-03299-0	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Manabu Hoshi, Naoto Oebisu, Tadashi Iwai, Akiyoshi Shimatani, Naoki Takada, Hiroaki Nakamura
2. 発表標題 Radiological assessment for pathogenesis of solitary bone cyst in calcaneus
3. 学会等名 20th General Meeting of International Society of Limb Salvage（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 学 大戎直人 岩井正 嶋谷彰芳 高田尚樹 伴祥高 家口尚 高見勝次 青野勝成 中村博亮
2. 発表標題 画像解析からみた踵骨単純性骨嚢腫の発生機序の考察
3. 学会等名 第92回日本整形外科学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 学 大戎直人 岩井正 嶋谷彰芳 高田尚樹 伴祥高 家口尚 高見勝次 青野勝成 中村博亮
2. 発表標題 踵骨単純性骨嚢腫の画像的特徴
3. 学会等名 第52回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 星 学、大戎直人、伴祥高、岩井正、家口尚、中村博亮
2. 発表標題 単純性骨嚢腫の踵骨と長管骨では病態が異なる
3. 学会等名 第90回日本整形外科学会
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	大戎 直人 (Oebisu Naoto) (50754743)	大阪市立大学・大学院医学研究科・病院講師 (24402)	