

平成 21 年 4 月 23 日現在

研究種目：基盤研究(C)
 研究期間：2006～2009
 課題番号：18590332
 研究課題名（和文）悪性骨軟部腫瘍の転移におけるケモカインレセプターおよび血管新生の関与
 研究課題名（英文）The role of chemokine receptor expression and angiogenesis in the development of metastasis in malignant bone and soft tissue tumors
 研究代表者
 小田 義直 (ODA YOSHINAO)
 九州大学・大学院医学研究院・准教授
 研究者番号：70291515

研究成果の概要：

- 1) 骨肉腫において CXCR4 発現は肺転移巣において増強していた。
- 2) 悪性軟部腫瘍では非円形細胞腫瘍において高い CXCR4 mRNA 発現は予後不良因子であり、VEGF mRNA と相関関係を認めた。
- 3) 横紋筋肉腫において胎児型では CXCR4 発現は予後不良因子となったが、胞巣型では予後に関与しなかった。胞巣型では CXCR4 と VEGF 発現の相関を認めた。
- 4) 類上皮肉腫において CXCR4 発現は近位型において有意に高頻度の発現をみとめさらに近位型のなかでも CXCR4 発現例は有意に予後不良であった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,800,000	0	1,800,000
2007年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2008年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	510,000	4,010,000

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・筋肉、骨軟部腫瘍

1. 研究開始当初の背景

近年乳癌のリンパ節転移や前立腺癌の骨転移にケモカインレセプターである

Chemokine receptor 4 (CXCR4)の発現が強く関与していることが報告されていた。ま

たこの CXCR4 のリガンドである Stromal-cell derived factor 1 (SDF-1)/ CXCL12 はリンパ節、骨髄、肺で強発現していることが明らかになっており、CXCR4/SDF-1 system は種々の悪性腫瘍の転移の過程において homing を促

進するものとして注目されていた。さらに CXCR4 の発現は血管新生因子 VEGF によって制御されていることが乳癌の培養細胞株において報告されており、前立腺癌の臨床検体において CXCR4 の発現は血管新生と相関することが示されていた。また CXCR4 発現は種々の癌腫において臨床病理学的な悪性度と相関することが報告されていた。

具体的には In vivo では乳癌における CXCR4 発現とリンパ節転移の関係(Muller et al. Nature 2001)、前立腺癌における CXCR4 発現と骨転移の関係(Taichman et al. Cancer Res 2002)を検討した研究があり、さらに乳癌細胞株において VEGF が CXCR4 発現を亢進させることが示されていた(Bachelder et al. Cancer Res 2002)。骨軟部腫瘍においては骨肉腫培養細胞株を用いて CXCR4 発現株における SDF-1 の転移促進効果を示した研究があるのみであった(Perissinotto et al. Clin Cancer Res 2005)。臨床検体を用いた研究では神経芽細胞腫(Rusell et al. J Pediatr Surg 2004)、大腸癌(Kin et al. J Clin Oncol 2005)、頭頸部扁平上皮癌(Katayama et al. Clin Cancer Res 2005)および膀胱癌(Int J Cancer 2005)で CXCR4 の発現レベルの高い症例が予後不良との報告があった。しかしながら悪性骨軟部腫瘍の臨床検体で CXCR4、VEGF の発現と転移の関係を検討した報告はその当時、国内外において認められず、極めて貴重な研究であると思われた。

2 . 研究の目的

悪性骨軟部腫瘍は稀な腫瘍であるが、一旦遠隔転移を起こした症例は最新の集学的治療を行っても予後不良である。悪性骨軟部腫瘍の転移先も、肺、リンパ節、骨に多く、本研究では種々の悪性骨軟部腫瘍の原発巣で

の CXCR4、VEGF の発現および血管新生と、臨床病理学的悪性度、転移との関係を明らかにすることを目的とした。

3 . 研究の方法

- 1) 原発性悪性骨腫瘍で最も頻度の高い骨肉腫において原発巣と肺転移巣における CXCR4 および VEGF 発現を免疫組織化学的に比較した。また骨肉腫細胞株における CXCR4 および VEGF mRNA 発現量を計測した。
- 2) 種々の悪性軟部腫瘍において CXCR4 および VEGF mRNA 発現量を計測し、組織亜型別に比較するとともに予後との比較を行った。
- 3) 悪性小円形細胞腫瘍である横紋筋肉腫における CXCR4 および VEGF 発現と組織亜型および予後との関係を検討した。
- 4) 局所浸潤性が強くかつ遠隔転移を起こす頻度の高い悪性軟部腫瘍である類上皮肉腫において CXCR4、VEGF 発現および MVD と転移との関連を検討した。

4 . 研究成果

- 1) 肺転移を来した通常型骨肉腫症例において原発巣と肺転移巣における CXCR4 および VEGF 発現を免疫組織化学的に比較した。また CD34 による免疫染色によって計測した microvessel density (MVD) とともに MIB-1 labeling index (LI) による増殖活性も同時に比較を行った。転移巣においては原発巣と比較して有意に CXCR4 発現が亢進し MVD が高値を示したが、VEGF 発現は両者で有意差を認めなかった。原発巣と転移巣を同時に解析すると CXCR4 発現と VEGF 発現の間には

相関を認めた。また MIB-1 LI は VEGF 陽性腫瘍において有意に高値であった。予後に関しては肺転移を認めた症例での解析ではあるが、原発巣での VEGF 陽性例が陰性例と比較して有意に予後不良であった(図 1)。一方で CXCR4 発現は予後に影響を与えなかった。MNNG, MG63, U2OS, SaOS2, OST の 5 種類の骨肉腫細胞株での mRNA 解析では CXCR4 mRNA 発現は OST, MNNG, MG63 で認められたが、SaOS2, U2OS では発現が認められなかった(図 2)。VEGF mRNA 発現は全ての細胞株で様々なレベルで認められた。解析した骨肉腫細胞株においては CXCR4, VEGF mRNA 発現の間に有意な相関は認められなかった。以上の結果より骨肉腫において、CXCR4 発現は転移の進展に関与しており、一方で VEGF 発現は腫瘍の悪性度を規定する上で重要な役割を果たしていると思われる。将来の治療戦略として骨肉腫の転移、腫瘍の進展を防止するために CXCR4 および VEGF の双方に対する antagonist が有用かもしれないと思われた。

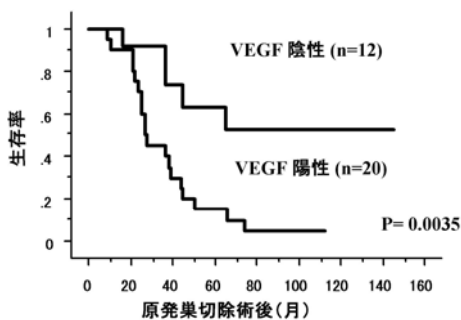


図 1. VEGF 発現別にみた生存曲線

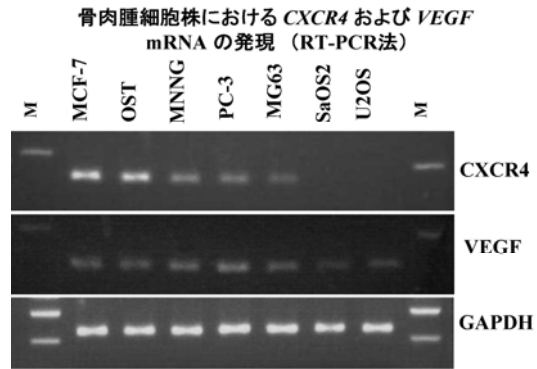


図 2. 骨肉腫細胞株における CXCR4 および VEGF mRNA の発現

2) 悪性軟部腫瘍における同様の検討を行った。悪性軟部腫瘍を悪性度と治療法が異なることより、中間群腫瘍(24 腫瘍)、化学療法感受性があり骨外性 Ewing 肉腫や横紋筋肉腫に代表される悪性円形細胞腫瘍(24 腫瘍)、化学療法感受性が低く手術療法が主な治療法となる平滑筋肉腫や悪性末梢神経鞘腫瘍に代表される非円形細胞腫瘍(128 腫瘍)の 3 群に分けて合計 176 腫瘍を解析した。CXCR4 と VEGF 発現は RT-PCR による mRNA 発現と免疫染色による蛋白発現を検討し、CD31 の免疫染色による MVD の計測も行った。CXCR4 および VEGF mRNA 発現レベルともに悪性非円形細胞腫瘍において、中間群腫瘍および悪性円形細胞腫瘍の発現レベルと比較して有意に高レベルであった。免疫染色における CXCR4 および VEGF 発現は RT-PCR による mRNA 発現と相関しており、3 群の腫瘍間における発現パターンも mRNA 解析結果と同様であった。MVD は悪性円形細胞腫瘍群において中間群腫瘍群および悪性円形非円形細胞群に比較して有意に低かった(図 3)。112 例の原発性悪性非円形細胞腫瘍においては CXCR4 および VEGF mRNA 発現の間に有意な相関関係を認めた(図 4)。さらにこの悪性非円形細胞腫瘍群においては CXCR4 mRNA 発

現亢進は単変量および多変量解析の双方において組織亜型に関係なく有意な予後不良因子であった(図5)。

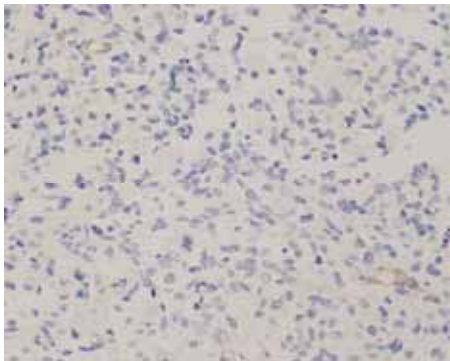


図 3A: 悪性円形細胞腫瘍である横紋筋肉腫の MVD

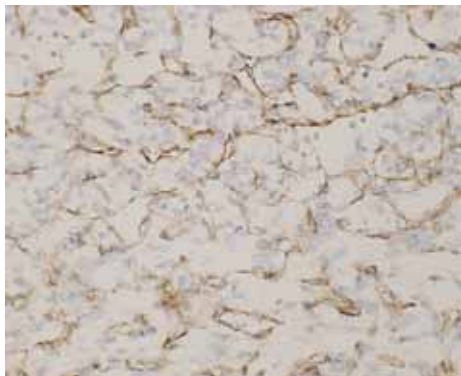


図 3B: 悪性非円形細胞腫瘍である平滑筋肉腫における MVD。図 3A の MVD に比較して明らかに高値である。

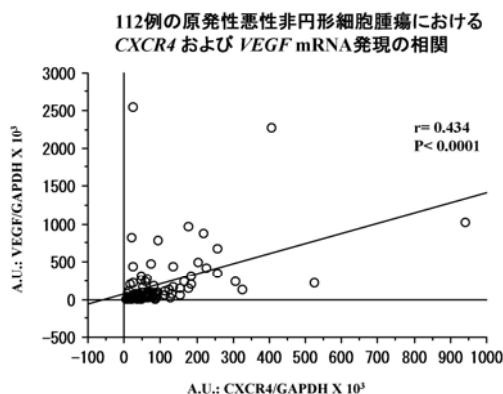


図 4: 原発性非円形細胞腫瘍における CXCR4 および VEGF mRNA 発現の相関

112例の原発性悪性非円形細胞腫瘍における予後因子(Overall survival)

因子	単変量	多変量
年齢 ≥ 20 歳	0.4753	0.9092
性 男性	0.0579	0.9692
発生部位 頭頸部、腹腔内、後腹膜	0.0012*	0.0562
腫瘍径 ≥ 5cm	0.1265	0.8907
深さ 深在性	0.6781	0.0028
核分裂数 ≥ 20/10HPFs	0.003*	0.1907
壊死 > 50%	0.0122*	0.8922
組織学的悪性 Grade 3	0.0028*	0.6468
AJCC stage 高 (III, IV)	0.0016*	0.0041*
MVD 高 (< 19.5)	0.3788	0.9365
MIB-1 LI 高 (< 20.6)	< 0.0001*	< 0.0001*
CXCR4 mRNA 高 (< 44.9)	< 0.0001*	0.0001*
VEGF mRNA 高 (> 52.6)	0.0017*	0.173

*: 統計学的有意差あり

表 1: 原発性非円形細胞腫瘍の予後因子

3) 横紋筋肉腫の胞巣型 39 例と、胎児型 42 例、多形型 3 例の計 84 例のパラフィン包埋標本に対して CXCR4, CCR6, CCR7, VEGF, MIB-1, CD31 の免疫染色と MVD の計測を行った。これらのうち 27 例に凍結標本が使用可能であり CXCR4, CCR6, CCR7, VEGF の mRNA 発現量の測定を行った。得られた mRNA 発現および蛋白発現の間には有意な相関関係を認めた。胞巣型は胎児型に比較して CXCR4 発現レベルが有意に高かったが、CCR6 および CCR7 発現レベルでは両者の間に差異を認めなかった。原発巣と再発もしくは転移巣でのこれらケモカインレセプター発現レベルの比較が可能であった 4 例においては両者の間で有意な変化を認めなかった。VEGF と CXCR4 発現の相関関係は胞巣型に認められたが、胎児型では認めなかった。また胞巣型においては VEGF 発現と MVD の間に有意な相関を認められたが、胎児型では認めなかった。胞巣型では胎児型に比較して MVD が有意に高値を示した。

予後の判明した胞巣型 39 例と胎児型 41 例の計 80 例で予後を比較検討した。臨床病理学的には高い病期、胞巣型の組織像、文献的にも予後不良とされている発生部位、腫瘍径が 5cm 以上のもの、高い年齢が予後不良因子であり、免疫組織化学的には CXCR4 高発現が

予後不良因子であった。組織亜型別に検討すると胞巣型では CXCR4 発現は予後に与しなかったが、胎児型において予後不良因子となった。CCR6, CCR7, VEGF および MVD は予後に与しなかった。

4) 類上皮肉腫は組織学的には遠位型と近位型に分けられ、臨床的に近位型は遠位型に比較して予後不良である。また組織学的に壊死を伴うことも多く何らかの低酸素状態が関与していることが推察される。低酸素状態に関連する HIF1 α とケモカインレセプター CXCR4 の共発現が転移に関与しているという報告や、p53 および HIF1 α 共発現の腫瘍は予後不良であるという報告も最近の他の癌腫での報告がなされている。類上皮肉腫の近位型 27 例と遠位型 28 例の計 55 例に対して CXCR4, CCR7, VEGF, MIB-1, CD31, HIF1 α , p53 の免疫染色と MVD の計測を行った。凍結標本が使用可能であった 11 例と 4 種類の類上皮肉腫由来培養細胞株に対しては CXCR4, CCR6, CCR7, VEGF, HIF1 α の mRNA 発現量の測定を定量的 RT-PCR 法で行い蛋白発現との相関を検討した。解析した症例での各種 mRNA 発現と免疫染色での発現結果との間で有意な相関関係を認めた。免疫染色において HIF1 α 発現と CXCR4 発現との間に相関関係を認め、さらに VEGF 発現 MVD との間にも相関を認めた。CXCR4 発現は近位型において有意に高頻度の発現をみとめさらに近位型のなかでも CXCR4 発現例は有意に予後不良であった。p53 発現は類上皮肉腫においてはその発現自体がまれであり、この腫瘍の進展発育への関与は低いと考えられさらに HIF1 α 発現との共発現と予後との相関も認められなかった。

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 5 件)

1. Oda Y, Tateishi N, Matono H, Matsuura S, Yamamaoto H, Tamiya S, Yokoyama R, Matsuda S, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M: Chemokine receptor CXCR4 expression is correlated with VEGF expression and poor survival in soft-tissue sarcoma. Int J Cancer 124: 1852-1859, 2009 (Corresponding) (査読有)
2. Oda Y, Tsuneyoshi M: Recent advances of molecular pathology in soft tissue sarcoma: Their implications for diagnosis, patient's prognosis, and molecular target therapy in the future. Cancer Sci 100(2): 200-208, 2009 (Corresponding) (査読有)
3. Kohashi K, Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Oshiro Y, Izumi T, Taguchi T, Tsuneyoshi M: SMARCB1/INI1 protein expression in round cell sarcomas associated with chromosomal translocations involving EWS: A special reference of SMARCB1/INI1 negative variant extraskeletal myxoid chondrosarcoma. Am J Surg Pathol 32(8): 1228-38, 2008 (Corresponding) (査読有)
4. Oda Y, Kohashi K, Yamamoto H, Tamiya S, Kohno K, Kuwano M, Iwamoto Y, Tajiri T, Taguchi T, Tsuneyoshi M: Different expression profiles of Y-box-binding protein-1 and multidrug resistance-associated protein between alveolar and embryonal rhabdomyosarcoma. Cancer Sci 99(4): 726-732, 2008 (Corresponding) (査読有)
5. Oda Y, Yamamoto H, Tamiya S, Matsuda S, Tanaka K, Yokoyama R, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M: CXCR4 and VEGF expression in the primary site and the metastatic site of human osteosarcoma: Analysis within a group of patients,

all of whom developed lung metastasis.
Mod Pathol 19: 738-45, 2006 (Corresponding)
(査読有)

[学会発表] (計 6 件)

1. 小田義直、孝橋賢一、岩本幸英、恒吉正澄: 骨・軟部腫瘍の遺伝子診断
シンポジウム: 運動器疾患に対する遺伝子診断の最前線. 第 23 回日本整形外科学会
基礎学術集会 2008.10.23 京都
2. Oda Y: New concepts and classification of fibrous or fibrohistiocytic tumors. The 3rd Korean Society of Skin Cancer. Feb 16, 2008, Seoul, Korea (招待講演)
3. 小田義直、泉貞有、長谷川匡、中西幸浩、田宮貞史、山元英崇、恒吉正澄:
上皮様分化を示す滑膜肉腫、類上皮肉腫および悪性ラブドイド腫瘍における細胞膜糖蛋白 Dysadherin の発現とその意義. シンポジウム“遺伝子解析の診断と治療への応用”
第 40 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会 2007.7.12 甲府
4. Oda Y: New concepts and classification of soft tissue tumors. In: What are new concepts and classification in bone and soft tissue tumors? Refresher Course of 9th Annual Scientific Meeting of the Asian Musculoskeletal Society, Jan 28, 2007, Tokyo, Japan (招待講演)
5. 小田義直、山元英崇、田宮貞史、松田秀一、田仲和宏、横山良平、岩本幸英、恒吉正澄: 骨肉腫の原発巣と肺転移巣における CXCR4 および VEGF の発現. 第 39 回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会
2006.7.7 札幌
6. 小田義直、山元英崇、田宮貞史、恒吉正澄: 軟部肉腫の予後に関する組織形態と分子異常. ワークショップ 8・軟部肉腫

の生物学的悪性度を規定する臨床病理学的、分子生物学的因子.
第 95 回日本病理学会総会 2006.5.1 東京

[その他]
ホームページ等
<http://www.surgpath.med.kyushu-u.ac.jp/ap/index.html>

<http://hyoka.ofc.kyushu-u.ac.jp/search/details/k000918>

- 6 . 研究組織
- (1) 研究代表者
小田 義直 (ODA YOSHINAO)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 7 0 2 9 1 5 1 5
 - (2) 研究分担者
田宮 貞史 (TAMIYA SADAFUMI)
九州大学・大学院医学研究院・准教授
研究者番号 : 6 0 2 8 4 4 8 6
 - (3) 連携研究者
なし ()
研究者番号 :