

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 19 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22591926

研究課題名（和文）白血球接着分子 VAP-1 の眼窩腫瘍における予後予測因子としての検討

研究課題名（英文）Vascular adhesion protein-1 as a prognostic factor in orbital tumor

研究代表者

野田 実香（NODA MIKA）

北海道大学・北海道大学病院・助教

研究者番号：10296668

研究成果の概要（和文）：

眼科領域における眼付属器腫瘍の中で結膜腫瘍は臨床上よく遭遇する疾患である。その中で、良性腫瘍である化膿性肉芽腫と悪性腫瘍である節外性 B 細胞性リンパ腫は炎症細胞浸潤をともなっているが、その病態における炎症の関与は明らかとされていない。そこで、本研究では両腫瘍組織における白血球接着分子 vascular adhesion protein (VAP)-1 の発現および局在について検討した。VAP-1 は、正常結膜では血管内皮細胞の細胞質に存在したが、化膿性肉芽腫と節外性 B 細胞性リンパ腫の双方では血管の内腔側に局在していた。これらのことは、VAP-1 の発現様式は腫瘍によって異なるが、炎症病態に関与していると考えられた。本研究により、眼付属器腫瘍における VAP-1 の病態関与が示唆され、今後の更なる検討の手がかりを得ることができた。

研究成果の概要（英文）：

Conjunctival tumors are one of the most common tumors in the ocular adnexa, in which pyogenic granuloma and extranodal marginal zone B-cell lymphoma (EMZL) are benign and malignant tumors involved with inflammatory cells, respectively. However, little is known about the contribution of inflammation underlying the pathogenesis of pyogenic granuloma and EMZL. We analyzed the expression and immunolocalization of vascular adhesion protein (VAP)-1 in the tumors. Conjunctival tumors including pyogenic granuloma and EMZL, and 2 normal conjunctivas were analyzed by immunohistochemistry for VAP-1 and CD31 expression. Immunoreactivity for VAP-1 was detected in the lumen of microvessels in pyogenic granuloma and in EMZLs. In contrast, normal bulbar conjunctival tissues demonstrated weak cytoplasmic immunoreactivity for VAP-1 in the blood vessels. In sum, the immunolocalization of VAP-1 varied in the histopathology of the conjunctiva, involving the pathology of inflammatory conjunctival disorders.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011 年度	900,000	270,000	1,170,000
2012 年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・眼科学

キーワード：眼窩腫瘍・白血球接着分子・VAP-1

1. 研究開始当初の背景

眼窩腫瘍には、血管腫、悪性リンパ腫、多形腺腫、腺様嚢胞癌などがある。これらの腫瘍は組織としては腫瘍細胞、血管、変性組織の集合体であるが、同一の組織型でも転移や浸潤の様式は症例によって異なり、生命予後の予後規定因子の特定は重要である。以前より白血球接着分子 intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 の発現や変異が腫瘍性病変の生命予後と関わっていることが知られるが、近年他の白血球接着分子である vascular adhesion protein (VAP)-1 も同様の報告が続き、注目を集めている。

VAP-1 は、1992 年に関節リウマチ患者の滑膜組織から同定された分子量 170kDa の糖タンパクであり、血管内皮細胞に発現する白血球接着分子である。同分子は白血球の血管外遊走における白血球と血管内皮細胞の相互作用を担っている。これまでの検討で、VAP-1 は皮膚、脳、肺、肝臓、消化管、眼球などにおける血管内皮細胞にその発現が確認されており、その白血球血管外遊走に関わる接着分子としての機能を介して、健常状態ではリンパ球ホーミングなどの免疫機構に、そして病的状態では炎症性疾患、病的血管新生、腫瘍性疾患などでその病態メカニズムに深く関わるということが知られている。

眼付属器腫瘍における VAP-1 発現と腫瘍組織型、浸潤形式、転移の有無の相関についてはこれまで報告がなく、以上の背景より本研究を計画した。

2. 研究の目的

腫瘍性病変に関連する VAP-1 についての報告としては、皮膚悪性黒色腫において血管内皮細胞における VAP-1 の発現低下が生命予後の短縮と相関するという報告や消化管腫瘍において血中の遊離型 VAP-1 が低下した例では予後不良となるとする報告がある。免疫機能異常、すなわちリンパ球による腫瘍に対する免疫監視機構の障害が腫瘍の増大に関与することはよく知られており、上記の報告は腫瘍血管における白血球接着分子 VAP-1 の発現低下がその悪性度に関連する可能性を示唆している。

またその一方で、腫瘍の転移メカニズムの一つに腫瘍血管および周囲血管の損傷が関与することが知られており、VAP-1 の SSAO としての酵素活性が腫瘍浸潤や転移における増悪因子となっていることも想定される。すなわち、腫瘍のタイプによっては、VAP-1 発現の亢進が腫瘍血管損傷や炎症の増悪を介して腫瘍浸潤や転移を促進する可能性がある。

本研究の目的は、眼付属器腫瘍における VAP-1 発現とその悪性度との相関を検討することである。

3. 研究の方法

(1) 結膜悪性リンパ腫における VAP-1 発現の検討

腫瘍切除術あるいは腫瘍生検を行った症例からインフォームドコンセントに基づいて摘出した結膜腫瘍の検体を収集し、4 μm 厚のパラフィン切片を作成した。その中で、3 例の化膿性肉芽腫(pyogenic granuloma, PG)と節外性 B 細胞性リンパ腫(extranodal marginal zone B-cell lymphoma, EMZL) 6 例の検体を用いて VAP-1 の免疫染色をおこなった。また、対照群として正常結膜 2 例を用いた。

実験方法は以下の通りである。一次抗体の非特異的結合を抑制するためにブロッキングをおこなった後に、抗 VAP-1 抗体 (50 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology 社) を用いて VAP-1 に対する蛍光免疫染色を施行した。

また、同検体について血管内皮細胞のマーカーである CD31 を用いて微小血管を染色することで血管密度を算出し、上記 VAP-1 の染色性との関連を検討した。

(2) 眼瞼悪性黒色種における VAP-1 発現の検討

眼瞼腫瘍切除術あるいは腫瘍生検を行った症例からインフォームドコンセントに基づいて摘出した腫瘍検体を収集し、4 μm 厚のパラフィン切片を作成した。その中で、3 例の眼瞼悪性黒色種検体を用いて VAP-1 の免疫染色をおこなった。

実験方法は以下の通りである。3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼを失活させ、一次抗体の非特異的結合を抑制するためにブロッキングをおこなった。その後、抗 VAP-1 抗体 (50 倍希釈, Santa Cruz Biotechnology 社) を用いて VAP-1 に対する蛍光免疫染色を施行した。本腫瘍においては、腫瘍細胞がメラニン顆粒を有するため、発色には AEC 法を用いた。

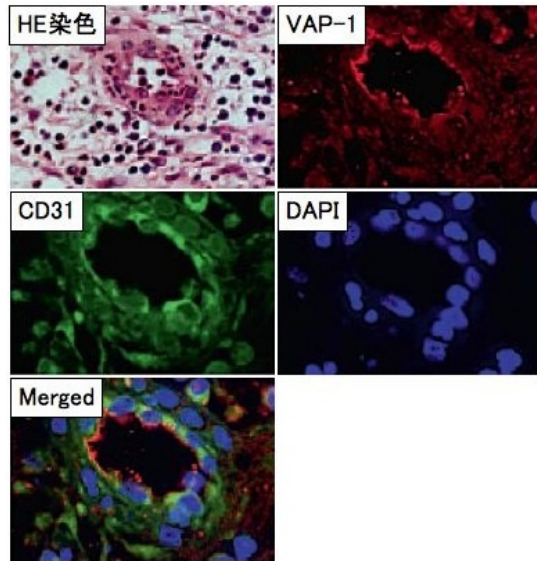
4. 研究成果

(1) 結膜悪性リンパ腫における VAP-1 発現の検討

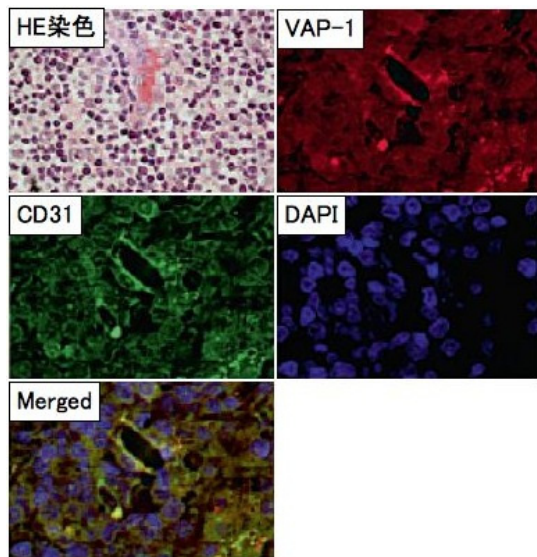
PG においては、好中球を主体とした炎症細胞浸潤が強く認められた。EMZL においては異型 B リンパ球および T リンパ球の浸潤像が認められた。一方、正常結膜組織においては炎症細胞浸潤はほとんど存在しなかった。

VAP-1 の免疫染色の結果は、全ての組織においてそのシグナルが認められた。PG (図 1) と EMZL (図 2) においてその局在は血管内腔側に認められたのに対して、正常結膜における VAP-1 の局在は血管内皮細胞の細胞質主体であった(data not shown, 発表論文の 3 を参照)。また、そのシグナル強度は、pyogenic granuloma がもっとも強く、EMZL が中等度、

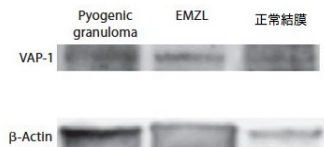
正常結膜では非常に弱かった。また、VAP-1 蛋白の発現は、western blotting により全ての組織で確認された (図 3)。



(図 1 : PG における VAP-1)



(図 2 : EMZL における VAP-1)

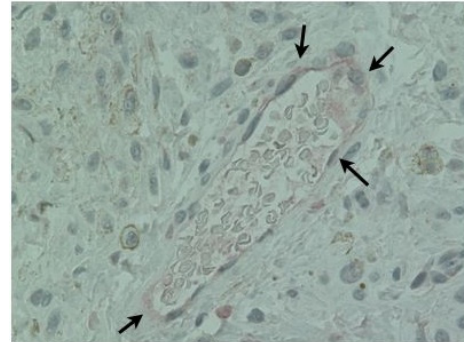


(図 3 : 各組織における VAP-1 発現)

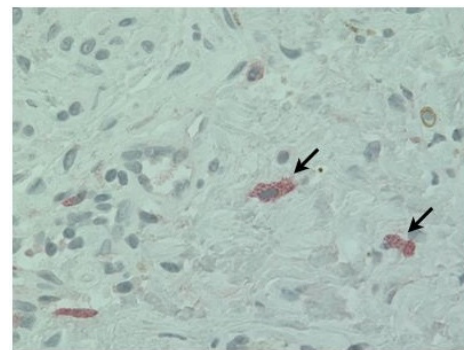
さらに、血管密度は PG、EMZL、正常結膜の順に高くなっており、VAP-1 の染色シグナルとの関連性が示唆された。

(2) 眼瞼悪性黒色種における VAP-1 発現の検討

眼瞼悪性黒色種検体を用いて、同様に VAP-1 の発現解析をおこなった。VAP-1 蛋白は、血管内皮細胞 (図 4) および間質に存在する細胞 (図 5) にその局在が認められた。現在、この間質に存在する VAP-1 陽性細胞を特定するために、各種特異的マーカーによる免疫染色を施行している。



(図 4 : 血管内皮細胞における VAP-1 発現)



(図 5 : 間質組織における VAP-1 陽性細胞)

今後は症例数を増やし、前述の血管あるいは間質における VAP-1 陽性率と臨床スコアの関連を検討し、当該分子が眼窩および眼付属機腫瘍の予後予測因子となり得るかを検討する予定である。

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. Fukuhara J, Kase S, Noda K, Kanda A, Murata M, Noda M, Ando R, Dong Z, Ishida S. Immunolocalization of vascular adhesion protein-1 in human conjunctival tumors. *Ophthalmic Res.* 2012; 48: 33-37 査読有
DOI: 10.1159/000335983
2. Yoshikawa N, Noda K, Ozawa Y, Tsubota K, Mashima Y, Ishida S. Blockade of vascular adhesion protein-1 attenuates choroidal neovasculari-

-zation. Mol Vis. 2012; 18: 593-600
査読有
DOI: なし

3. Murata M, Noda K, Fukuhara J, Kanda A, Kase S, Saito W, Ozawa Y, Mochizuki S, Kimura S, Mashima Y, Okada Y, Ishida S. Soluble vascular adhesion protein-1 accumulates in proliferative diabetic retinopathy. Invest Ophthalmol Vis Sci. 2012; 53: 4055-4062 査読有
DOI: なし
4. Fukuhara J, Kase S, Noda M, Ishijima K, Ishida S. Extranodal marginal zone B-cell lymphoma involving superior rectus muscle: A clinicopathological case report. Oncol Lett. 2011; 2: 489-491 査読有
DOI: なし
5. Fukuhara J, Kase S, Ishijima K, Noda M, Ishida S. Conjunctival lymphoproliferative disorder. Ophthalmology. 2011; 118: 423 査読有
DOI:10.1016/j.ophtha.2010.08.031

[学会発表] (計2件)

1. Kinoshita S, Kase S, Fukuhara J, Dong, Ando R, Lennikov A, Kanda A, Noda K, Ishida S. Expression of vascular endothelial growth factor in human conjunctival lymphoma. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2012/5/6-10, Broward County convention Center (USA)
2. Ando R, Noda K, Murata M, Namba S, Kinoshita S, Fukuhara J, Dong Z, Saito W, Kanda A, Ishida S. Impact of intravitreal bevacizumab on accumulation of vascular adhesion protein-1 in proliferative diabetic retinopathy. ARVO (Association for Research in Vision and Ophthalmology) Annual Meeting. 2012/5/6-10, Broward County convention Center (USA)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野田 実香 (NODA MIKA)
北海道大学・北海道大学病院・助教
研究者番号: 10296668

(2) 研究分担者

加瀬 諭 (KASE SATORU)
北海道大学・大学院医学研究科・客員研究員
研究者番号: 60374394

野田 航介 (NODA KOUSUKE)
北海道大学・大学院医学研究科・講師
研究者番号: 90296666

(3) 連携研究者

なし