

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 9 月 23 日現在

機関番号：11501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26670653

研究課題名(和文) 骨肉腫における変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼの発現解析

研究課題名(英文) Relationship between expression of isocitrate dehydrogenase and clinical outcomes in patients with osteosarcoma

研究代表者

土屋 登嗣 (tsuchiya, takashi)

山形大学・医学部・講師

研究者番号：30400576

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：イソクエン酸脱水素酵素(IDH)の変異はグリオーマの予後診断マーカーとして有用される。骨肉腫は稀であるが、悪性骨腫瘍では最多である。IDHの発現と臨床的予後との関連については、不明であった。骨肉腫98例において、5種類のモノクローナル抗体を用いて、IDHの発現と臨床的予後との関連性を検証した。その結果、IDHの発現において、生存率と化学療法効果判定に関連があった。IDHの発現が予後因子となる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Aberration of isocitrate dehydrogenase (IDH) in glioma is a prognosis factor. Osteosarcoma is rare, but is the most common type of primary bone cancer. Association expression of IDH and clinical outcome of osteosarcoma is unknown. We studied relationship between expression of IDH with 5 monoclonal bodies and clinical outcomes in 98 patients with osteosarcoma. Expression of IDH is relative to survival rates and tumor necrosis rates following chemotherapy. Expression of IDH might be a prognosis factor.

研究分野：悪性骨軟部腫瘍

キーワード：骨肉腫 イソクエン酸脱水素酵素

1. 研究開始当初の背景

イソクエン酸脱水素酵素 (isocitrate dehydrogenase: IDH) は、ヒトでは IDH1, IDH2, IDH3 の 3 つのサブタイプがある。その中で IDH1/2 の変異はグリオーマの予後診断マーカーとして有用とされており¹⁾、特異的モノクローナル抗体による変異型 IDH1/2 の検出も可能となっている。骨軟部腫瘍の領域では、内軟骨腫や軟骨肉腫などの軟骨形成性腫瘍でも IDH1/2 の変異が確認されており²⁾、最も発生頻度の高い悪性骨腫瘍である骨肉腫においても、IDH1/2 変異は欧米では認めないという報告がある中で、当院で骨肉腫患者 12 例の検索を行ったところ、3 例に IDH2 変異が確認され、32 例の骨肉腫組織マイクロアレイ (すべて Chinese) で、9 例に変異型 IDH1/2 発現を確認された³⁾。IDH1/2 変異がアジア人の骨肉腫に特徴的なことなのかもしれない、という内容で論文が受諾された³⁾。しかしながら、骨肉腫における実際の変異型あるいは野生型 IDH1/2 の発現頻度や臨床的予後との関連については、未だに不明である。骨肉腫における IDH1/2 変異の発現と臨床的予後との関連性が明らかになることで、予後予測因子や新しい治療標的因子となる可能性がある。

2. 研究の目的

本研究の目的は、骨肉腫症例の標本に対して、変異型あるいは野生型 IDH1/2 の発現を免疫染色で調査し、臨床的予後との関連性を検討することである。

3. 研究の方法

(1). 骨肉腫症例標本

骨肉腫は稀な疾患であり、臨床データとの統計学的解析のためにはできるだけ多くの症例を集める必要があった。そこで 2013 年 10 月に行われた東北地区骨軟部腫瘍研究会で、「骨軟部腫瘍における変異型イソクエン酸デヒドロゲナーゼ (isocitrate dehydrogenase: IDH) の発現解析」という共同研究について提案し、幹事会で全施設からの承認を得た。各施設 (弘前大学、秋田大学、岩手医科大学、東北大学、新潟大学、新潟県立がんセンター、福島医科大学、山形大学) から過去 10 年間 (2002 ~ 2012 年) における骨肉腫患者の生検あるいは化学療法未施行のホルマリン固定パラフィン包埋切片標本を 10 枚提供いただき、全 98 例を対象症例とした。

(2). 免疫染色

生検標本に対して、複数の変異型 IDH1/2 を検出できるモノクローナル抗体である MsMab-1、野生型 IDH1, IDH2 を検出できるモノクローナル抗体 (IDH1: RMaB-3, RMaB-1, IDH2: RMaB-22, KrMaB-3) を用いて、免疫染色を行った。免疫染色での発現は、染色され

る細胞数が全体の 0 ~ 5% 未満で染色性が弱いものを N 群、それ以上を P 群とした。

(3). 臨床データとの統計学的解析

全症例について、平均年齢、性別、発生部位、組織型、術前化学療法効果、最終観察時の予後を調査した。術前化学療法効果は、組織学的壊死率 90% 未満を A 群、90% 以上を B 群とした。免疫染色の結果と術前化学療法効果との関連性を、 χ^2 検定を用いて検討した。また、生命予後との関連性を Kaplan-Meier 法を用いて検討し、2 群間の検討には、ロジック検定を用い、その有意差について検討した。

4. 研究成果

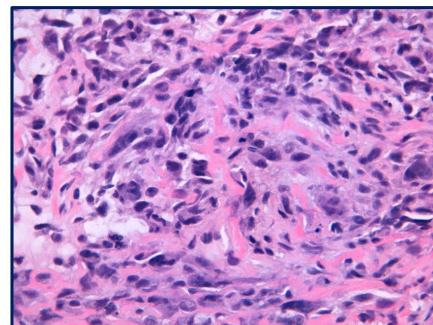
(1). 骨肉腫症例の臨床的特徴

症例の平均年齢は 28.4 歳 (6-86 歳)、男性 57 例、女性 41 例であった。発生部位は大腿骨 44、脛骨 20、上腕骨 11、腸骨 6、腓骨 4、下顎骨 2、肩甲骨 2、仙骨 2、橈骨 2、前腕骨 1、肋骨 1、脊椎 1、中手骨 1、膝蓋骨 1 であった。組織型は骨形成型 61、軟骨形成型 11、線維形成型 10、小円形細胞型 3、MFH-like 3、血管拡張型 2、傍骨性 2、骨膜性 1、高悪性度骨表面型 2、二次性 1、骨内高分化型 1、その他 (脱分化型軟骨肉腫) 1 であった。術前化学療法を行った 79 例中、切除検体による組織学的効果判定ができた症例は 62 例であり、化学療法効果 A 群は 38 例、B 群は 24 例であった。全 98 例の平均観察期間は 112 か月 (2.5-178 か月) で、5 年生存率は 68.1%、10 年生存率は 56.1% であった (Fig. 1)。

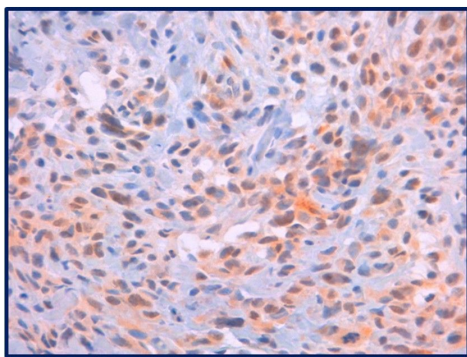
(2). 免疫染色

免疫染色の結果、MsMab-1 は P 群 68 例 (69.4%)、N 群 30 例であった。RMaB-3 は P 群 74 例 (75.5%)、N 群 24 例、RcMab-1 は P 群 60 例 (61.2%)、N 群 38 例、RMaB-22 は P 群 55 例 (56.1%)、N 群 43 例、KrMaB-3 は P 群 45 例 (45.9%)、N 群 53 例であった。

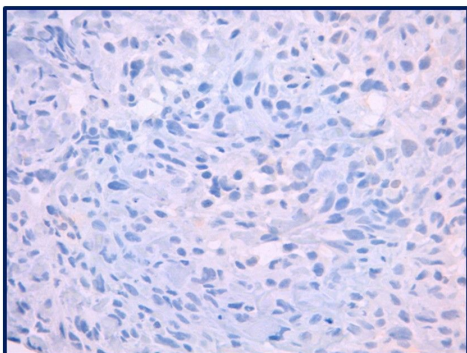
代表症例として、13 歳 男児、腓骨近位骨肉腫 (観察期間 41 か月、腫瘍死) の免疫染色を提示する。



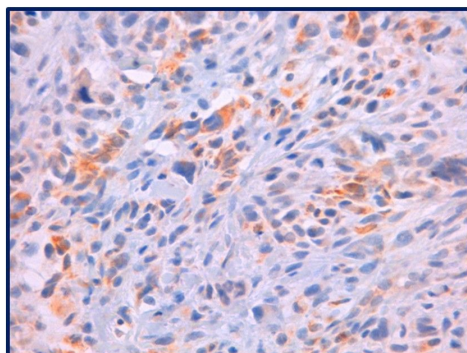
HE



MsMab-1 P群



RMaB-3 N群



RMaB-22 P群

(3) . 免疫染色と生存率，化学療法効果判定との関連性

RMaB-3 染色 P 群（5 年生存率 69.6%，10 年生存率 67%）は N 群（5 年生存率 51.4%，10 年生存率 28.2%）と比べて有意に生存率が高かった（Fig. 2）. MsMab-1 染色 P 群（5 年生存率 63.6%，10 年生存率 61.1%），N 群（5 年生存率 66.8%，10 年生存率 38.7%）（Fig. 3），RcMab-1 染色 P 群（5 年生存率 63.6%，10 年生存率 51.2%）N 群（5 年生存率 66.1%，10 年生存率 57%）（Fig. 4），RMaB-22 染色 P 群（5 年生存率 64.2%，10 年生存率 57.8%），N 群（5 年生存率 65.3%，10 年生存率 44.9%）（Fig. 5），KrMab-3 染色 P 群（5 年生存率 62.9%，10 年生存率 52%），N 群（5 年生存率 66.4%，10 年生存率 57.3%）（Fig. 6）で，いずれも有意差を認めなかった．また，RMaB-22 染色 P 群では N 群より有意に化学療

法効果判定が良好であった（ $P =$ ）（Table 1）.

Fig. 1

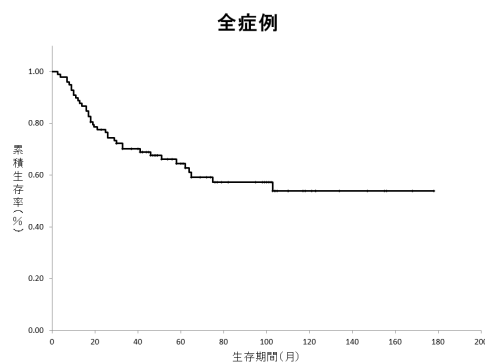


Fig. 2

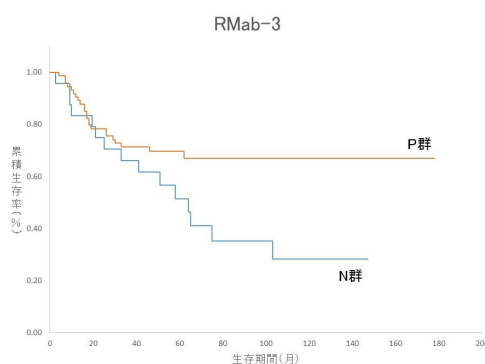


Fig. 3

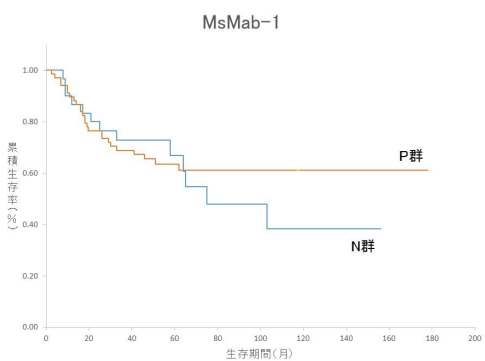


Fig. 4

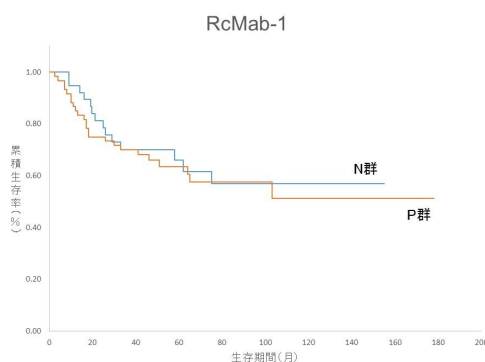


Fig. 5

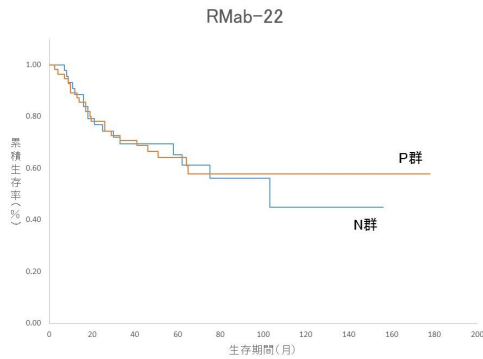


Fig. 6

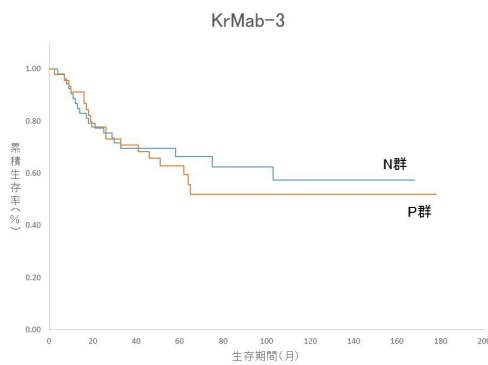


Table 1

| | | 化学療法効果判定 | | 合計 |
|---------|---|----------|----|----|
| | | A | B | |
| RMaB-22 | N | 25 | 6 | 31 |
| | P | 22 | 23 | 45 |
| 合計 | | 47 | 29 | 76 |

考察

近年著者らの研究では、骨肉腫標本に対してDNAダイレクトシーケンスを行い、12例中3例(25%)にIDH2-172S変異を認めており、さらに骨肉腫の組織マイクロアレイに対してMsMab-1免疫染色を行い、32例中9例(28.1%)で陽性であったと報告している3)。本研究ではMsMab-1陽性率は98例中68例(69.4%)であり、これまでの報告より陽性率は高かった。抗体の希釈倍率の違いや、野生型IDH1/2に反応した可能性が考えられるため、今後希釈倍率を変えて再検討する予定である。骨肉腫症例の標本を用いた研究で、悪性度が高い症例ではIDH1発現が低下していたとの報告がある4)。また、骨肉腫細胞株でIDH1

を高発現させると細胞増殖や転移を抑制したとの報告もある4)。本研究では、野生型IDH1発現を示すRMaB-3染色P群ではN群より生存率が有意に高く、野生型IDH2発現を示すRMaB-22染色P群ではN群より有意に化学療法効果判定が良好であった。骨肉腫症例において、MsMab-1免疫染色によるIDH1/2変異と予後との関連は示されなかったが、野生型IDH1/2発現と生存率や化学療法効果との関連性が示され、骨肉腫においてIDH1/2の発現が予後因子となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Yan H, et al: N Engl J Med 2009;360:765-773.
- 2) Amary MF, et al: J Pathol 2011;224:334-343.
- 3) Liu X, et al: Cancer Med 2013;6:803-814.
- 4) Hu X, et al: Cancer Lett 2014;346:114-21.

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

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

土屋 登嗣 (TSUCHIYA, Takashi)
山形大学・医学部・整形外科科学講座・講師
研究者番号：30400576

(2)研究分担者

高木 理彰 (TAKAGI, Michiaki)
山形大学・医学部・整形外科学講座・教授
研究者番号：40241707

高窪 祐弥(TAKAKUBO, Yuya)
山形大学・医学部・整形外科学講座・講師
研究者番号：80431641

菅原 正登(SUGAWARA, Masato)
山形大学・医学部・整形外科学講座・助教
研究者番号：60444030

(3)連携研究者

()

研究者番号：