

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32620

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2014～2015

課題番号：26893267

研究課題名(和文)骨巨細胞腫のバイオマーカー・治療標的の開発と機能解析

研究課題名(英文) Development and functional analysis of biomarkers and therapeutic targets of giant cell tumor of bone.

研究代表者

大久保 武人 (OKUBO, TAKETO)

順天堂大学・医学部・助教

研究者番号：90732884

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：現在までに申請者を含む研究グループが骨巨細胞腫(以下GCTB)の予後予測マーカーとして同定したGPXファミリー(特にGPX1とGPX3)のタンパク質発現とp53遺伝子変異に対してバイオマーカーとしての検証を行い、GPX1発現とp53遺伝子変異はGCTBの予後に有意差を持って関係することを解明した。GCTBの生物学的な特徴を探索するために、凍結手術検体セットを用いて網羅的なタンパク質発現解析を行い、タンパク質発現プロファイリングを獲得した。そこからGCTB治療薬であるDenosumab使用前後や予後に関連するタンパク質同定を行い、Denosumab奏効に関与する主要タンパク質の同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：To verify the prediction abilities of patient's outcomes in GCTBs, the protein expressions of the GPX family (especially GPX1 and GPX3) and the gene alteration of TP53 gene were analyzed using the large validation cohort. The results of validations showed that the expression of GPX family and gene mutation of TP53 had statistical significant difference of prognosis in GCTBs. In order to establish the protein profiles of GCTBs and elucidate the biological characteristics of GCTBs, comprehensive protein expression analyses were performed using frozen surgical specimen of GCTBs and the identified protein profiles were analyzed according to clinico-pathological features including patient's outcome and drug sensitivities. We found the characteristic proteins which were associated with denosumab treatments and sensitivities in GCTBs which is a therapeutic agent for GCTB.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：骨軟部腫瘍 骨巨細胞腫 プロテオミクス

1. 研究開始当初の背景

骨巨細胞腫 (Giant cell tumor of bone: GCTB) は良性骨腫瘍であったが、高頻度に再発をすることより 2013 年の WHO 分類より中間型悪性に分類されるようになった。現在の治療法としては主に手術療法であり、搔爬術又は搔爬術で腫瘍がコントロール不能な症例や頻回再発症例に対しては切除術を行う。しかしながら、同様の治療を行った場合でも、その将来的な再発の有無を含めた予後の予測は、単なる病理組織学的観察からは困難である。また、GCTB は肺にも良性の転移性病変を形成したり、また 1-2% の頻度で悪性転化を生じることにより、非常に予後不良な転機を取る。

申請者を含む研究グループは、2010 年より GCTB の悪性転化及び再発に関するバイオマーカーの開発を目的とした研究を行い、現在までに *p53* 変異をみることで、その再発・転移の予測が可能であることを報告するなど一定の成果を上げてきた (Saito et al. Human Pathol, 2011; Saito et al. Pathol Res Pract, 2011)。また、近年 Glutathione Peroxidase 1 の発現が GCTB の予後を規定するとの報告があり (Conti A et al. Am J Pathol, 2011)、GPX は抗酸化作用を有する酵素で、その発現は多くの癌を含む腫瘍で、その悪性度や再発の有無、また化学療法に対する治療抵抗性に関与することが示されている。しかしながら、GCTB における GPX ファミリー及びまだ不明な部分も多く、それらの機能的役割の解明も、GCTB の臨床的・生物学的悪性度の解明に重要と考えられる。

一方、GCTB は組織学的には、Receptor activator of NF- κ B ligand (RANKL) を高発現する単核の腫瘍細胞の増殖を背景にして、RANKL の受容体である RANK を発現する破骨型巨細胞の均一に分布する増殖を特徴とするが、この RANKL-RANK シグナル伝達経路の活性化による破骨型巨細胞が骨破壊を伴う GCTB の本態であるとされている。近年 GCTB の分子標的治療薬として、抗 RANKL 抗体である Denosumab が開発され一定の治療効果が報告され始めている。申請者らも Denosumab 治療前後の GCTB 数例を経験し、既報告と同様に、臨床的な腫瘍増大・骨吸収像の抑制や、病理組織学的には RANK を発現していた多核巨細胞の消失・反応性の骨形成を確認している。しかしながら、病理組織学的に骨線維性組織による腫瘍細胞の置換が起こる一方で、変性のみられない単核腫瘍細胞の残存がみられ、また同一腫瘍内あるいは個体間での治療効果の差異がみられるなど、Denosumab による治療効果には差がみられるが、これら Denosumab 治療奏功性に関する詳細な遺伝学的・分子生物学的背景は未だ不明である。

以上を踏まえ、GCTB の更なる治療成績向上には、

(1) これら再発・悪性転化のメカニズムや治療抵抗性を規定する因子の解明を行い、
(2) それらの新しい発見を元にオーダーメイド医療のための新たなバイオマーカーの構築、
(3) 更には悪性転化・治療抵抗性の GCTB に対する新たな治療標的の開発が必要であると考へ研究を行った。

2. 研究の目的

本研究は、GCTB の腫瘍発生・再発・悪性転化の機序についての解析を行い、再発・転移に関する予後予測マーカーの同定及び、新規治療分子標的の開発を行った。特に(1)申請者らの研究において同定された GCTB の悪性度に関する *p53* 変異及び、報告のある GPX ファミリーの解析、(2)近年 GCTB の分子標的治療薬として使用され始めた Denosumab のターゲットである RANKL-RANK シグナル伝達経路の GCTB における解明を目的に、主にタンパク質の網羅的発現解析を用い、GCTB における予後規定因子・Denosumab に対する治療反応性に関する因子を同定し、これらに対し遺伝学的・分子生物学的機能解明を加えることにより、GCTB の治療成績の改善を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

本研究は順天堂大学整形外科・人体病理病態が共同し、2年の研究計画で進めた。

本研究は申請者を中心に研究連携者として、順天堂大学整形外科学(末原義之__臨床一般・タンパク質発現解析・一般的機能解析を専門)・人体病理病態学(齋藤剛__病理診断・遺伝子変異発現解析・細胞生物学全般の機能解析を専門)及び、研究協力者として、順天堂大学整形外科学(向井原健太、赤池慶雄、田邊雄、石井翠)のサポートの下に研究遂行した。

研究対象と実施環境については、凍結手術検体等は、順天堂大学内の骨軟部腫瘍バイオバンク、大規模発現検証に必要な FFPE (パラフィン検体) は人体病理病態学のライブラリーを使用した。機器については、1) タンパク質発現解析は、順天堂大学の研究基盤センターに各種質量分析計等を使用した。特にタンパク質発現解析は、i-TRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) で行った。2) 遺伝子発現・変異解析・機能解析及びネットワーク解析は、順天堂大学整形外科教室、病理学教室、共同機器室の器械及びシステムを使用した。

(1) 免疫染色による GPX1, GPX3, Cyclin D1, Ki-67 及び TP53 予後予測能の検証:

予後予測マーカーとして一定の結果を得る成功している GPX ファミリー (特に GPX1 と GPX3) の発現及び TP53 変異に対して引き続き検証を行った。

方法：

使用する骨巨細胞腫(GCTB)臨床検体の臨床病理学データの収集を行った。

FFPE の薄切を行い、HE による評価をおこなった腫瘍含有量が十分であることや固定条件による検体劣化等を認めるものは除外を行った。

GPX1, GPX3, Cyclin D1, Ki-67 及び TP53 の免疫染色のためのタイトレーションを行い、適切な条件を決定した。

獲得された発現については、単変量解析および多変量解析を行い、臨床データとの比較の元、バイオマーカーとしての価値・有効性を検証した。

また、獲得されていた TP53 の遺伝変化情報との照会も進めた。

(2)GCTB の凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析：

様々な観点からの GCTB の生物学的な特徴をプロファイリングするために、凍結手術検体を用いて網羅的なタンパク質発現解析を行った。特に (A) 予後良好群と不良群の凍結手術検体セット、(B) Denosumab 使用前・後の凍結手術検体セット、(C) Denosumab 使用後の組織学的違いを検証する凍結手術検体セット、用いてタンパク質のプロファイリングを作成した。これら(A)-(C)の特徴を規定するタンパク質が同定し、治療・予後関連バイオマーカーを進めた。

方法：

凍結手術検体から(a)-(c)の目的に応じたタンパク質抽出を行った。検体全例で臨床病理データを収集した。

プロテオミクス：比較する両群間での定量的なタンパク質発現プロファイルを作成するために、iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification) を方法として用い、Mass Spectrometry ベースで約 2000 個のタンパク質(20000 のアミノ酸フラグメント)の観察を行った。

獲得されたタンパク質プロファイリングは IPA (The Ingenuity Pathway Analysis software program (Ingenuity Systems, Redwood City, CA)) を使用したネットワーク解析を行い、各検討項目に対してタンパク質ネットワーク解析を行った。

また、獲得された発現データは単・多変量解析などの手法でデータマイニングを行い、発現に有意に差のあるタンパク質のリストアップを行う。

同定されたタンパク質については特異抗体を使用したウエスタンブロット・免疫染色にて発現を確認した。

免疫染色にて発現差を確認できたタンパク質については、バイオマーカーとしての有効性を確認するために、骨巨細胞腫

の FFPE データセットを使用し、タンパク質発現の大規模検証を行った。

上記に引き続き追加機能解析を行った。

4 . 研究成果

(1)免疫染色による GPX1, GPX3, Cyclin D1, Ki-67 及び TP53 予後予測能の検証：

現在までに GCTB における GPX1 及び TP53 のタンパク質発現差が予後予測に關与することを同定している。

(a)GPX1 について：

現在までの研究に引き続き、GCTB の GPX1 について検証として約 60 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 GPX1 の発現により有意差を持って GCTB の予後の予測が可能であった。

(b)TP53 について：

現在までの研究に引き続き、GCTB の TP53 について検証として約 60 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 GPX1 の発現により有意差を持って GCTB の予後の予測が可能であった。

(c)Ki-67 について：

現在までの研究に引き続き、GCTB の Ki-67 について検証として約 60 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 Ki-67 の発現により有意差を持って GCTB の予後の予測が可能であった。

(d) GPX3 について：

GCTB の GPX3 について検証として約 60 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 GPX3 の発現に臨床的な有意差をみなかった。

(e) Cyclin D1 について：

現在までの研究に引き続き、GCTB の Cyclin D1 について検証として約 60 例で FFPE 切片に対して免疫染色による検証を行った。免疫染色の発現を評価した結果 Cyclin D1 の発現により有意差を持って GCTB の発現に臨床的な有意差をみなかった。

(f) TP53 の遺伝子変化について：

現在までの研究に引き続き、GCTB の TP53 の遺伝子変異を約 60 例に検証を行った。臨床病理学的素因と有意な差はみなかった。

(2)GCTB の凍結手術検体を使用した網羅的タンパク質発現解析：

様々な観点からの GCTB の生物学的な特徴をプロファイリングするために、凍結手術検

体を用いて網羅的なタンパク質発現解析を行った。特に (A) 予後良好群と不良群の凍結手術検体セット、(B) Denosumab 使用前・後の凍結手術検体セット、(C) Denosumab 使用後の組織学的違いを検証する凍結手術検体セット、用いてタンパク質のプロファイリングを作成し解析を行った。

(a) 凍結検体とタンパク質抽出について：
GCTB 凍結手術検体からタンパク質抽出を行った。全例下肢骨よりの検体であり、治療前後のペアサンプルとしては 10 ペアサンプルであった。

(b) iTRAQ (isobaric tags for relative and absolute quantification)を用いたタンパク質発現プロファイリングについて：
比較する両群間での定量的なタンパク質発現プロファイルを作成した。Mass Spectrometryベースで約1500-2000個のタンパク質(15000-20000のアミノ酸フラグメント)の同定に全 10 ペアサンプルで成功し、GCTB の Denosumab 使用関連タンパク質のデータベースに成功した。

(c) プロジェクトごとの検体の選択：
(A) 予後良好群と不良群の比較セット、
(B) Denosumab 使用前・後の比較検体セット、
(C) Denosumab 使用後の組織学的違いを検証するセットを予定した。
(A)については再発などの臨床情報獲得に時間がかかるため検証・解析は保留とした。
(B)については 8 ペアサンプルで検証・解析が可能であり下記研究を進めた。
(C)については 10 ペアサンプルで検証・解析可能であったが、(B)研究が本研究期間では中心となり解析できていない。

(c-1) 解析 B のタンパク質変化：各 8 ペアサンプルの比較による Denosumab 使用前後の有意に発現変化のあったタンパク質数は、
サンプルセット 1: 263 (P<0.05)
サンプルセット 2: 281 (P<0.05)
サンプルセット 3: 334 (P<0.05)
サンプルセット 4: 174 (P<0.05)
サンプルセット 5: 180 (P<0.05)
サンプルセット 6: 212 (P<0.05)
サンプルセット 7: 222 (P<0.05)
サンプルセット 8: 225 (P<0.05)

(c-2) 解析 B において 8 サンプルセットで共通に発現している重要タンパク質は、
Denosumab 使用で低発現：
ACON, CAH2, CYC, CYTB, ECHA, EF2, ENPL, G3P, IDHP, KCRB, MMP9, PLSL, PPA5, RCN1, SERPH, TCGP, VATA, VATB2, VATE1,
Denosumab 使用で高発現：A1AT, AHNK, ALBU, CO3, FLNA, HEMO, IGHG1, IGHG3, IGKC, LMNA, LUM, TPM3, TRFE
であった。

(D) 獲得されたタンパク質プロファイリングのネットワーク解析：
IPA を使用したネットワーク解析を行った。RANK/RANKL pathway や MMP9 に関連したタンパク質ネットワークが Denosumab 使用前・後の重要なタンパク質として同定された。

(E) MMP9 に対するウエスタンブロットタンパク質発現の確認：
6 例について MMP6 のタンパク質発現検証をおこなった。タンパク質発現解析では 2 例で発現が低下、4 例で発現が上昇していたが、全例でタンパク質発現解析を支持するデータであった。

(F) MMP9 に対するザイモグラフィーによる proteolytic activity の確認：
6 例について MMP6 のタンパク質活性型検証をおこなった。タンパク質発現解析では 2 例で発現が低下、4 例で発現が上昇していたが、ザイモグラフィーでは 2 例で活性が低下、4 例で活性が上昇しており、全例でタンパク質発現解析を支持するデータであった。

(G) MMP9 の免疫染色による臨床病理学的解析：
免疫染色は今回の解析に使用していない 37 例の GCTB を用いて行った。そのうち 2 例は Denosumab の使用前後の検体が含まれていなかった。抗体は MMP-9 (dilution 1:100, NB110-57223, Novus Biologicals, Littleton, CO, USA)を用いて行った。免疫染色の評価は単核細胞と多角巨細胞で別々に評価を行い、最終的には
score 0 (no positive cells),
score 1 (<5% positive cells),
score 2 (5-20% positive cells),
score 3 (20-50% positive cells),
score 4 (50-80% positive cells),
score 5 (>80% positive cells).
の 5 段階で評価を行った。
Denosumab を使用しなかった 35 例に対して評価を行い。
score 1 (n = 5), score 2 (n = 19), score 3 (n = 11) であり、score 4 と score 5 はなかった。臨床病理学的因子と比較したが、有意に相関する因子は認めなかった。
また、Denosumab を使用している 2 例については治療前後で MMP9 の発現が低下していることも確認できた。

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)

Toda-Ishii M, Akaike K, Suehara Y, Mukaihara K, Kubota D, Kohsaka S, Okubo T, Mitani K, Mogushi K, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. Clinicopathological effects of protein phosphatase 2, regulatory subunit A, alpha mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Mod Pathol.* 2016 Nov;29(11):1424-1432.doi:10.1038/modpathol.2016.138. Epub 2016 Jul 29. 査読有

Mukaihara K, Suehara Y, Kohsaka S, Akaike K, Tanabe Y, Kubota D, Ishii M, Fujimura T, Kazuno S, Okubo T, Takagi T, Yao T, Kaneko K, Saito T. Protein Expression Profiling of Giant Cell Tumors of Bone Treated with Denosumab. *PLoS One.* 2016 Feb 10;11(2):e0148401. doi:10.1371/journal.pone.0148401. eCollection 2016. 査読有

Akaike K, Toda-Ishii M, Suehara Y, Mukaihara K, Kubota D, Mitani K, Takagi T, Kaneko K, Yao T, Saito T. TERT promoter mutations are a rare event in gastrointestinal stromal tumors. *Springerplus.*2015Dec30;4:836.doi:10.1186/s40064-015-1606-2. eCollection 2015. 査読有

Imanishi J, Yazawa Y, Oda H, Okubo T. Type 3 internal hemipelvectomy: a report of two cases. *J Orthop Surg (Hong Kong).* 2015 Aug;23(2):255-8. 査読有

Takagi T, Katagiri H, Kim Y, Suehara Y, Kubota D, Akaike K, Ishii M, Mukaihara K, Okubo T, Murata H, Takahashi M, Kaneko K, Saito T. Skeletal Metastasis of Unknown Primary Origin at the Initial Visit: A Retrospective Analysis of 286 Cases. *PLoS One.* 2015 Jun 26;10(6):e0129428.doi:10.1371/journal.pone.0129428. eCollection 2015. 査読有

〔学会発表〕(計2件)

太久保武人「当科を初診し悪性リンパ腫と診断された21例」第49回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会2016年7月15日東京ドームホテル(東京)

太久保武人「整形外科外来患者に対するロコモティブシンドローム調査による健康教育」第25回日本健康教育学会学術大会2016年6月11日沖縄科学技術大学院大学(OIST)(沖縄県国頭郡恩納村)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕(計0件)

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

太久保 武人(OKUBO, Taketo)
順天堂大学・医学部・助教
研究者番号:90732884

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし

(4)研究協力者

末原 義之(Suehara, Yoshiyuki)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号:70509405

齋藤 剛(Saito, Tsuyoshi)
順天堂大学・医学部・准教授
研究者番号:80439736

向井原 健太(Mukaihara, Kenta)

赤池 慶祐(Akaike, Keisuke)

田邊 雄(Tanabe, Yu)

石井 翠(Ishii, Midori)