

論文の内容の要旨

論文題目 Ewing 肉腫における新規腫瘍マーカーの探索：
 ADAMTS4 発現の診断的意義の解析

指導教官 北村俊雄 教授

東京大学大学院医学系研究科
平成 17 年 4 月 入学

医学博士課程
生殖・発達・加齢医学専攻
氏名 美濃部こころ

Ewing 肉腫は骨軟部腫瘍では骨肉腫に次いで 2 番目に多い、未分化で悪性度の高い腫瘍である。1921 年、James Ewing によって骨に発生した小円形細胞腫瘍(Small round cell tumor)として最初に報告されたが、その後骨を覆う筋肉や脂肪などの軟部組織にも発症することが明らかになった。Ewing 肉腫の特徴的な点は、ほとんどにおいて染色体転座が認められることである。その中でも患者の約 90%において、11q12 の *EWS* 遺伝子と 22q24 の *FLI1* 遺伝子の転座が見られる。この染色体転座によって異常なキメラ蛋白質が発現し、新たな転写因子としての機能を獲得することが、Ewing 肉腫の発症の原因であると考えられている。この疾患の治療は、化学療法、放射線治療、手術療法の 3 者併用が効果的である一方で、Ewing 肉腫は再発しやすく他の組織への浸潤が激しいため、肺や骨への転移がある場合の 5 年生存率は 20~30%と、予後不良である。また症状は主に病巣部位の腫脹、疼痛であり、骨を覆っている軟部組織が厚いために早期発見が困難な場合が多い。現在の診断基準は、上記に述べた染色体転座の有無と、免疫組織化学的な CD99 陽性によって判断されている。CD99 の発現は Ewing 肉腫の診断に比較的有用ではあるが、一部の白血病や滑膜肉腫、非ホジキンリンパ腫、消化管間質腫瘍などでも陽性反応を示すため Ewing 肉腫特異的ではない。また診断に有効な腫瘍マーカーも存在しない。そこで私は、Ewing 肉腫の早期診断、簡便かつ非侵襲的な鑑別診断を目的とした、腫瘍マーカーの候補となるような遺伝子のスクリーニング解析を行った。

Ewing 肉腫細胞株由来の mRNA を用いた、改良型シグナルシーケンストラップ (SST)法によって 80 種類の膜蛋白質および分泌蛋白質を同定した。腫瘍細胞株や諸臓器での発現の比較検討から、Ewing 肉腫細胞において有意に高く発現している分泌蛋白質 ADAMTS4 に着目した。ADAMTS4 はこれまでに 19 種同定されている ADAMTS ファミリーの 1 つであり、細胞外マトリックス蛋白質を分解するメタロプロテアーゼであることが知られている。近年の研究によって ADAMTS4 の特性を知る手がかりが示されつつあるが、その生理的意義や活性のメカニズムなど、解明されていない点も多い。ADAMTS4 と腫瘍の関連性については、これまでにグリオーマと乳癌で報告されている。しかしながら Ewing 肉腫と ADAMTS4 の関連性についてはこれまでに報告がないため、腫瘍細胞株や患者検体を用いて ADAMTS4 の発現について検討した。

siRNA を用いた *EWS-FLII* 融合遺伝子の発現抑制では、*EWS-FLII* の抑制と同時に *ADAMTS4* 遺伝子の発現も下方調整されたことから、*ADAMTS4* が *EWS-FLII* の下流に存在している可能性が示唆された。*ADAMTS4* が *EWS-FLII* の直接の標的遺伝子であるのかは今後さらなる検討を要する課題である。

次に患者の組織検体や Ewing 肉腫細胞株において、ADAMTS4 の発現の有無を免疫染色により検討した。患者腫瘍組織では ADAMTS4 の発現が有意に高く、細胞株においても同様の結果が得られた。腫瘍細胞株の細胞質に ADAMTS4 が局在していることは、ADAMTS4 が分泌蛋白質であるという事実を反映していると考えられる。この結果をもとに、ADAMTS4 は腫瘍細胞株の細胞質に留まらず、培養上清にも分泌されていると予想し、免疫沈降法を行った。検討により、細胞抽出物ならびに培養上清に約 100kDa の ADAMTS4 蛋白質の分泌が認められた。用いた抗体が蛋白質の C 末端領域、764-837 アミノ酸を認識するものであることから、2 本のバンドのうち分子量の大きいバンドは ADAMTS4 全長、分子量の小さいバンドは細胞外領域が一部切断された ADAMTS4 蛋白質を認識していることが示唆される。細胞抽出物では前述のように考察できるが、分泌蛋白質として作用する活性型の ADAMTS4 は、本来細胞質で Furin によってプロドメインが切断されるため培養上清中には検出されないはずである。この理由については不明であるが、リン酸化もしくは糖鎖による修飾に起因するのか、本研究で明確な結論を導き出すことはできなかった。

ADAMTS4 のバイオマーカーとしての可能性を検討するために、簡便な診断方法として血清診断に用いることを想定し、患者血清による ELISA 解析を行った。Ewing 肉腫患者では腫瘍組織の RT-PCR では全例で *ADAMTS4* の発現をはっきりと検出できたが(図 12)、血清中には ADAMTS4 を検出できなかった(図 13)。今回の検討で、Ewing

肉腫患者血清中に ADAMTS4 が検出されなかった理由として、検体数が少なかったこと、細胞上清中及び組織標本中には分泌が認められているものの腫瘍部位で局所的に作用していること、などが考えられる。用いた血清検体も化学療法前に採取したものが多かったことから、治療による腫瘍の縮小が原因であるという可能性は否定できる。今後さらに症例数を増やして検討する必要がある。一方、骨肉腫患者に関しては、腫瘍組織の RT-PCR での ADAMTS4 陽性が 13 例中 2 例であるのに対し(図 12)、血清では 3 例中 2 例と比較的高い確率で ADAMTS4 が陽性であった(図 13)。この結果から、ADAMTS4 は骨肉腫における新規の血清マーカーとして有効である可能性が示された。今後さらなる解析が必要であり、さらに患者の治療の経過と合わせた経時的な解析が可能であれば、新たな知見が得られると考えられる。

本研究において、私は Ewing 肉腫細胞株から SST 法を用いた膜蛋白質、分泌蛋白質のスクリーニング解析を行い、これまでに Ewing 肉腫では関連性が報告されていない分泌蛋白質 ADAMTS4 を見出した。培養細胞を用いた siRNA 実験や免疫沈降法および免疫蛍光染色、Ewing 肉腫患者のサンプルを用いた組織染色と RT-PCR において、Ewing 肉腫での ADAMTS4 の発現を認める一貫した結果が得られた。これらの結果から、ADAMTS4 は、Ewing 肉腫特異的な *EWS-FLI1* によって制御されており、その病態形成に重要な働きをもつことが示唆される。ADAMTS4 の遺伝子発現の亢進が腫瘍発生に関与するという報告は現在のところ存在しないが、Ewing 肉腫ならびに骨肉腫は、転移の頻度が高く悪性度も高いことから、ADAMTS4 が腫瘍の浸潤、転移に何らかの役割を果たしている可能性が示唆される。本研究での ADAMTS4 の発現解析は必ずしも疾患特異的といえるものではなかったが、Ewing 肉腫ならびに骨肉腫の病態との関連や診断、治療において、例えば病勢判定への応用の可能性など、今後さらなる解析が望まれる。