

松林昌平 論文内容の要旨

主 論 文

Immunohistochemical analyses of β -catenin and cyclin D1 expression in giant cell tumor of bone (GCTB): A possible role of Wnt pathway in GCTB tumorigenesis

骨巨細胞腫における β -catenin と cyclin D1 発現の免疫組織化学的解析：骨巨細胞腫瘍発生における Wnt 経路の関与

Shohei Matsubayashi, Masahiro Nakashima, Kenji Kumagai, Masayuki Egashira, Yuki Naruke, Hisayoshi Kondo, Tomayoshi Hayashi, Hiroyuki Shindo

松林 昌平、中島 正洋、熊谷 謙治、江頭 昌幸、成毛 有紀、近藤 久義、林 徳眞吉、進藤 裕幸

掲載雑誌 Pathology Research and Practice 2009;205(9):626-33

長崎大学大学院医歯薬学総合研究科 医療科学専攻
(主任指導教員：進藤 裕幸教授)

緒 言

骨巨細胞腫 giant cell tumor of bone (GCTB)は良性腫瘍であるが、再発を繰り返して骨破壊を引き起こすため局所的には侵襲性の性格を有している。病理組織学的には破骨細胞様巨細胞 osteoclast-like giant cell (GC)と間質性単核細胞 stromal mononuclear cell (SC)から成る。GCはGCTBの組織像を特徴付けているが増殖能はなく、一方、SCは増殖能がある真の腫瘍成分とみなされている。腫瘍成分の起源については未だ不明な点もあるが、SCは骨芽細胞由来または骨髓間葉細胞由来で、GC形成を調節しているようである。cyclin D1は細胞周期のG1期からS期への進行に重要な調節因子で、腫瘍での過剰発現が報告されている。 β -cateninは細胞の増殖と生存の調節に関与するWnt経路の重要因子で、その遺伝子変異は β -catenin蛋白を安定化し、胞体内蓄積から核内へ移行、Tcf/Lefに結合することでcyclin D1など下流分子の転写活性を促進して腫瘍原性を発揮する。最近、Wnt経路の活性化が骨芽細胞の分化と破骨細胞形成を誘導することで骨吸収過程の調節に関与することが報告された。本研究の目的は、GCTBでの β -cateninとcyclin D1の免疫組織化学的発現と臨床病理学的因子との関連を解析することにより、腫瘍発生におけるWnt経路の役割を評価する事にある。

対象と方法

1977年から2006年までに長崎大学病院及びその関連病院にて手術的に切除された骨巨細胞腫26例のうち、16例(初発11例、再発5例)を対象とした。切片をクエン酸緩衝液(pH6.0)中でmicrowave抗原賦活後、抗 β -catenin抗体(polyclonal, GenWay Biotech, San Diego, CA)抗cyclin D1抗体(monoclonal, Zymed Labs, South San

Francisco, CA)、および増殖マーカーとしての抗 Ki-67 抗体 (monoclonal, DAKO, Carpinteria, CA) を各々 50 倍希釈にて、4°C で一晩反応させた。ビオチン化二次抗体と 1 時間、アビジン-ペルオキシダーゼと 30 分反応後、diaminobenzidine (DAB) により発色させた。非腫瘍性対照として callus 症例を同時に検討した。

β -catenin は腫瘍細胞の核または細胞質に染まったものを陽性とした。cyclin D1 と Ki-67 は核に染まったもののみを陽性とした。200 倍にて腫瘍部 5 視野を SC、GC の陽性細胞を各々計数し、labeling index (LI) をそれぞれの症例で算出した。統計学的解析は Student's t-test を用いて初発と再発での有意差を検定した。 β -catenin、Cyclin D1、または Ki-67 と Campanacci's radiographic grading との関係は Jonckheere-Terpstra 傾向検定により解析した。p 値が 0.05 未満をもって統計学的に有意とした。

結 果

- 1) GCTB16 例全例に β -catenin、cyclin D1、Ki-67 の発現を認めた。一方、callus 組織では、 β -catenin 発現が骨梁に沿って出現する骨芽細胞の核と細胞質のみ観察され、破骨細胞には陰性であった。cyclin D1 発現は骨芽細胞と破骨細胞のいずれも陰性であった。
- 2) β -catenin 発現は SC の核と GC の核や細胞質に認めた。cyclin D1 発現は主に GC の核に観察され、SC の核には稀であった。一方、Ki-67 は SC の核のみに発現していた。連続切片にて、GC での β -catenin と cyclin D1 核内発現の共局在が確認された。
- 3) GC における β -catenin と cyclin D1 発現 LI は、核数 15 未満の細胞が 15 以上の細胞より有意 ($p < 0.001$) に高かった。さらに、 β -catenin 核内発現 LI は SC と GC 両者において再発例の方が初発例より高かったが、有意差は認めなかった (SC: 60.6 vs. 41.8%, $p = 0.074$; GC: 41.7 vs. 20.1%, $p = 0.095$)。一方、SC の Ki-67 発現と GC の cyclin D1 発現の LI は、再発例が初発例より高くなく、有意差は認めなかった (Ki-67: 18.8 vs. 19.9%, $p = 0.851$; cyclin D1: 55.4 vs. 70.1%, $p = 0.225$)。
- 4) GCTB の Campanacci's radiographic grading と β -catenin または cyclin D1 発現 LI との間に有意な関連はなかったが、SC の Ki-67 発現 LI は高 grade で有意に高値となる傾向を認めた (grade I: 14.5%; grade II: 23.1; grade III: 24.0%, $p = 0.033$)。

考 察

本研究は、GCTB での β -catenin と cyclin D1 発現を免疫組織化学的に明らかにした。Wnt 経路の活性化は、胞体内 β -catenin を安定化し核内への蓄積を促進、続いて cyclin D1 転写を活性化する。GCTB での β -catenin 発現は SC と GC の核内に観察され、GC での cyclin D1 との共局在を認めた。GCTB 腫瘍発生過程における Wnt/ β -catenin 経路の活性化が示唆される。GC の核内には cyclin D1 発現を認めたが、増殖マーカーとしての Ki-67 発現とは全く関連はなく、cyclin D1 発現レベルは核数の少ない未熟と思われる小型の GC に有意に高かった。従って、cyclin D1 は GCTB 腫瘍発生過程で、細胞増殖促進以外の作用により GC 形成に関与しているのかもしれない。興味深い事に、 β -catenin の核内発現レベルの増加と GCTB 再発例との関連が示唆された。GCTB 腫瘍形成過程における Wnt/ β -catenin 経路の機能的役割についてさらなる解析が必要である。