氏　　　　　名	前川　武雄
学 位 の 種 類	博士　(医学)
学 位 記 番 号	乙第　676　号
学位授与年月日	平成　25　年　8月　15 日
学位授与の要件	自治医科大学学位規定第 4 条第 3 項該当
学 位 論 文 名	トロンボスポンジン 1 の発現解析による皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫の鑑別についての研究
論 文 審 査 委 員	(委員長) 教　授　出　光　俊　郎
	(委　員) 教　授　福　嶋　敬　宜　　講　師　山　沢　英　明

論文内容の要旨

1　研究目的

隆起性皮膚線維肉腫は緩徐に増大する真皮内の間葉系細胞腫瘍で、局所再発率が低いことや、転移が稀であることから中間型の悪性腫瘍として取り扱われている。病理組織学的には、車軸状構造(cartwheel pattern)や花むしろ状構造(storiform pattern)を形成し、真皮結合組織や下床の脂肪組織に向けて浸潤性の増殖を示す。一方、皮膚線維腫は良性の線維性組織球腫として知られる比較的頻度の高い腫瘍であるが、時に紡錘形細胞が束状や花むしろ状に増生し、時に皮下組織にまで進展することがある。皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫の間には臨床的、病理組織学的にいくつかの鑑別点が知られているが、時にその鑑別が困難な症例を経験する。

皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫における線維化の原因として transforming growth factor-β(TGF-β)の関与が重要とされており、その TGF-β 活性化のメカニズムの 1 つに thrombospondin-1(TSP-1)が極めて重要であることが報告されている。本研究では、両腫瘍における TSP-1 の発現を比較することで、TGF-β 活性化と TSP-1 との関連性を明らかにし、両腫瘍の鑑別の一助になる可能性について検討を行った。

2　研究方法

皮膚病理組織標本は東京大学皮膚科を受診した同意の得られた皮膚線維腫患者 7 名及び隆起性皮膚線維肉腫患者 4 名の計 11 名より採取した。全ての患者は臨床的、病理組織学的に診断した。健常人コントロールとして、5名の基礎疾患を有しない健常人ボランティアより皮膚を採取した。

皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫の鑑別のため病理組織学的検討を全例で施行した。標本は20%ホルマリン液で固定し、パラフィン切片を作成の上ヘマトキシリンエオジン染色を行った。また、全例で抗 CD34 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。

免疫組織化学染色は Vectastain ABC kit を使用し、パラフィン切片を用いて行った。抗 TSP-1 抗体は、Santa Cruz Biotechnology のものを使用した。免疫反応性は Vector Red を用いて可視化した。その後、切片はヘマトキシリンで対比染色した。染色の度合いは、弱陽性: +、中等度陽性: ++、強陽性: +++と判定した。

免疫ブロット法において、TSP-1 の検出は、蛋白濃度測定試薬を用いて補正を行った上で電気

泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。ニトロセルロース膜を抗 TSP-1 抗体を用いて一晩 4℃で incubate し、二次抗体と反応後、enhanced chemiluminescence で発光し X 線フィルムに感光させた。コントロールとして、2000 倍希釈した抗 β-actin 抗体を用いて免疫ブロットを行った。

3　研究成果

(1)　免疫組織化学染色による TSP-1 発現の比較

正常皮膚では線維芽細胞に TSP-1 の発現はみられなかった。皮膚線維腫では、病変内の紡錘形細胞に中等度の TSP-1 の発現を認めた。これとは対照的に隆起性皮膚線維肉腫においては、TSP-1 が腫瘍細胞に強くびまん性に発現していた。また、隆起性皮膚線維肉腫では皮膚線維腫と比較して腫瘍辺縁での TSP-1 の発現が強くみられた。隆起性皮膚線維肉腫において、腫瘍中央部と比較して腫瘍辺縁部において TSP-1 の発現が強くみられた。

(2)　免疫ブロット法による TSP-1 発現量の比較

免疫組織化学染色の結果とは異なり、皮膚線維腫、正常コントロールと比較した隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の過剰発現は認めなかった。

4　考察

皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫における線維化の中心的役割を担っていると考えられているのが TGF-βである。TGF-βは多くの生体システムの中で、細胞外マトリックスの構成、成長、分化における重要な役割を果たす多機能のサイトカインである。TGF-βの活性化メカニズムの 1 つが latent TGF-βと thrombospondin-1(TSP-1)との結合によるものである。そして、この TSP-1 による活性化メカニズムは in vivo において TGF-βの作用を発揮させる上で極めて重要であることが報告されている。したがって、TSP-1 の過剰発現は皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫における線維化を引き起こしている可能性が考えられる。

本研究では、皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の発現パターンに明白な違いが確認された。皮膚線維腫では、各腫瘍細胞において TSP-1 がびまん性に弱く散在性であり、一方で隆起性皮膚線維肉腫においては腫瘍の辺縁において TSP-1 が顕著に強く発現していた。この結果からは､TSP-1 の発現パターンは皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫の鑑別に有用と考えられた。

TGF-βや TSP-1 と悪性腫瘍との関わりは多数報告されている。TGF-βや TSP-1 の過剰発現により癌の進展が抑制されるという報告もあるが、逆に悪性化や浸潤・転移を促進する因子であるとの報告もあり、その作用については未だ明らかにはなっていない。本研究で確認された隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の強い発現は、転移を抑制している可能性が示唆され、隆起性皮膚線維肉腫が局所性の悪性腫瘍であり、転移が稀であることを現していると考えられた。

本研究において、TSP-1 は皮膚線維腫と比較して隆起性皮膚線維肉腫において強く発現していた。一方で過去の報告では、TGF-βレセプターが皮膚線維腫において隆起性皮膚線維肉腫よりも強く発現したとされる。TSP-1 は TGF-βの主な活性化因子であるため、TSP-1 も同様に皮膚線維腫において強く発現すると考えられたが、結果は逆のものとなった。この結果に関しては 3 つの仮説を考えた。①TGF-βの過剰発現により negative feedback が働き TSP-1 が抑制される可能性。②線維化に重要なのは ligand の量ではなく、receptor の発現量が重要である可能性。③隆起性皮膚線維肉腫においては、TSP-1 の産生が増加しているわけではなく分解能が低下している可能

性。また免疫ブロット法において、皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫の腫瘍細胞と正常皮膚の真皮内線維芽細胞における TSP-1 の発現量に有意な差は確認できなかった。これは免疫染色の結果と大きく異なるため、この結果を説明できる 2 つの仮説を考えた。①in vivo（免疫染色）では隆起性皮膚線維肉腫の細胞密度が高いために TSP-1 が過剰発現するが、in vitro（免疫ブロット）では in vivo と異なり細胞と細胞外マトリックスの interaction が異なるため、必ずしも実際の腫瘍の状態を反映していない可能性。②免疫ブロットにおいては、腫瘍からの培養線維芽細胞を用いているために、TSP-1 の活性が減少してしまった可能性。3 群において同じ発現量と言うことは考えにくく、本研究においては in vivo での結果を尊重すべきと考えた。

5　結論

①免疫染色では皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫ともにコントロールと比較して、TSP-1 の過剰発現がみられた。

②免疫染色では、隆起性皮膚線維肉腫において TSP-1 は皮膚線維腫と比較して強く発現しており、特に腫瘍辺縁で強く発現しており、鑑別に有用な可能性が考えられた。

③免疫ブロット法では皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫、コントロール間における線維芽細胞内の TSP-1 の発現量に有意な差は確認できなかった。

論文審査の結果の要旨

悪性軟部組織腫瘍の診断は難しく、しばしば病理診断の専門家でも意見もわかれるところである。このうち、隆起性皮膚線維肉腫(DFSP)は、低悪性度の皮膚悪性腫瘍に分類されるが、良性の皮膚線維腫(DF)との鑑別が容易ではないこともある。DF なら腫瘍マージンぎりぎりで切除しても再発はないが、DFSP であれば、広範囲の病巣切除が必要である。したがって、両者の鑑別は重要である。DFSP ではしばしば良性として誤診されて、小切除、再発を繰り返しているうちに、悪性度が強くなり、局所破壊、転移をきたすこともある。現在まで DFSP では、免疫染色で腫瘍細胞が CD34 染色陽性、factor XIIIa 染色陰性であることが特徴のひとつで、良性の DF と DFSP の鑑別に役立つとされている。しかしながら、これらを用いても両者の鑑別にとまどう症例もあり、DF と DFSP のより、精度の高い鑑別法が求められている。皮膚の線維化および線維性皮膚腫瘍の病態には transforming growth factor (TGFβ)が関与しているとされ、トロンボスポンジン 1 は、TGFβの活性化を促す上で重要な物質である。

本学位論文の研究は DF と DFSP の鑑別方法に関するもので、その中でトロンボスポンジン 1 に注目している。研究は（1）両腫瘍のトロンボスポンジン 1 染色による免疫組織化学的解析、（2）免疫ブロットによる腫瘍内のトロンボスポンジン 1 発現量の解析から成っている。

まず、免疫組織学的に、DF では中等度にトロンボスポンジン 1 に染色されるが、DFSP では細胞質がかなり強く染色されること、また、DFSP の染色性が腫瘍辺縁に強くなる傾向を見いだした。なお、正常皮膚組織線維芽細胞はトロンボスポンジン 1 に染色されない。また、免疫ブロットでトロンボスポンジン 1 発現量をみると DF と DFSP では有意な差がみられなかった。これらの結果から、DFSP ではトロンボスポンジン 1 の分解が低下している可能性を想定している。本学位論文の結果は DF と DFSP の両者の鑑別法のみならず、線維性皮膚腫瘍や皮膚線維化の病

態の理解に役立つ知見を包含している。しかしながら、論文審査では免疫染色による手法、抗体の選択、判定法の限界、今までの CD34 染色と比較した有用性、実用性が問題点として取り上げられた。また、免疫ブロットにより、DF、DFSP ではトロンボスポンジン１の過剰発現がみられないことの解釈にはいくつかの可能性があるのではないかという疑義も出された。それらについては後に、加筆訂正された論文が提出された。

研究内容はすでに欧州の権威ある英文学術雑誌 European Journal of Dermatology に掲載されていることを評価し、審査員全員一致で合格と判定した。

試問の結果の要旨

申請者の紹介に引き続き、本研究内容ついての発表がおこなわれた。

まず DF と DFSP の解説、その鑑別を行うことの重要性について説明がなされた。次いで DF と DFSP の線維化に TGFβとレセプターの結合が関与していること、TGFβが活性化してレセプターに結合するにはトロンボスポンジン１が必要であることなどの基礎的な事項の発表が行われた。その後、本題であるトロンボスポンジン１の免疫染色、免疫ブロットについてプレゼンテーションがあった。質問では（１）本当に DFSP と DF 鑑別に有用なのか？（２）トロンボスポンジン１の発現が悪性所見とどう関係するのか？（３）悪性度よりも腫瘍の大きさと関係するのではないか？（４）DF で陽性、DFSP ではさらに陽性、辺縁部ではもっと陽性である意味と過去の報告例にある TGFβ染色の結果の整合性はどうか？（５）免疫染色の結果(DF<<DFSP) と免疫ブロット結果(DF=DFSP)の解離はどう説明されるか？（６）免疫ブロットでは腫瘍細胞を培養系に移しており、混在する腫瘍内の培養線維芽細胞のロンボスポンジン１を反映しているのではないか？となどの質問がなされた。（１）については検索症例も限られており、従来の方法に比べた有用性は現時点では見いだせていないが、腫瘍の発症や病態にトロンボスポンジン１が関わっているという結果は意義のある結果であるとされた。（２）については文献的には癌の進展、抑制など両論あるが不明（３）については小さい DFSP も症例に含まれており、大きさよりも DF、DFSP 本質的な差であろうという答えであった。また、(5)についてはいくつかの speculation のあることが述べられた。（６）については本実験の限界について説明が行われた。なお、これらは修正した博士学位論文にも反映された。

申請者の研究領域周辺の知識、研究目的、結果やその意義についての理解、質疑に対する応答の内容、態度は満足すべきものであり、学位授与に価する十分な学識、研究資質、能力を有すると評価した。よって、審査員全員一致で博士学位を授与するにふさわしいと判定した。