

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

The expression levels of thrombospondin-1 in dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans.

論文博士

前川 武雄

自治医科大学 皮膚科学講座

「2013 年 5 月 1 日申請の学位論文」

担当指導教員

自治医科大学大学院医学研究科

地域医療学系専攻

皮膚・感覚器疾患学分野

皮膚科学

教授 大槻 マミ太郎

目次

要旨	1
背景	6
材料、方法	10
結果	14
考察	23
謝辞	27
参考文献	28

要旨

【背景・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。

【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。皮膚線維腫患者は男性3名、女性4名の計7名で、年齢は33歳～56歳(平均41.7歳)であった。隆起性皮膚線維肉腫患者は男性2名、女性2名の計4名で、年齢は23歳～45歳(平均32.3歳)であり、両者を併せると男性5名、女性6名の計

11名で、年齢は23歳～56歳(平均38.3歳)であった。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。男性2名、女性3名の計5名で、年齢は20歳～45歳(平均32.0歳)であった。

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へ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(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を使用し、パラフィン切片を用いて行った。抗TSP-1抗体(N-20)は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)のものを使用した。免疫反応性はVector Red (Vector Laboratories)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(Bio-Rad社, Hercules, CA)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抗体を用いて一晚4℃でincubateし、二次抗体と反応後、enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech)で発光しX線フィルム (Amersham Biosciences社, Piscataway, NJ)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。

【結果】

(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) 免疫プロット法による 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。

【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を引き起こす原因として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 はレセプターに結合する前に活性化されなければならないが、TGF- β の活性化メカニズムの 1 つが latent TGF- β と細胞外マトリックスのひとつである 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。

TSP-1 が TGF- β の主な活性化因子であることは、TSP-1 ノックアウトマウスにおける *in vivo* の実験において報告されている。さらに、TSP-1 の過剰発現は増殖性糸球体腎炎による線維化や尿細管間質の線維化の進行と密接に関連があるとも言われている。これらの報告から考えると、TGF- β の活性化によっ

て生じる組織学的な線維化は TSP-1 の主な役割であることが示唆される。また TSP-1 の発現増加は、コラーゲンを含む細胞外マトリックスの過剰発現を引き起こす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。さらに、皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の発現パターンには明白な違いが確認された。皮膚線維腫の組織では、各腫瘍細胞において TSP-1 がびまん性に発現しているものの、その発現は弱く散在性であり、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 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。TSP-1 についても同様に、癌の進展を抑制する報告がある一方で、細胞の悪性化や浸潤能の促進がみられたとする報告もある。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。① TGF- 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。

結論として、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。

背景

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、浸潤を伴う局面として出現し、徐々に紅色や紫色調の結節や潰瘍形成を伴うようになる⁽¹⁾。若年成人の体幹や四肢近位部に好発し、頭頸部では稀とされる^(2,3)。通常、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^(4,5)が、隆起性皮膚線維肉腫の10～20%では、腫瘍内に高悪性度の線維肉腫の像を伴うとされている。病理組織学的には、腫瘍中央部においては単一な形態の紡錘系細胞が稠密に増生し、車軸状構造(cartwheel pattern)や花むしろ状構造(storiform pattern)を形成するが、腫瘍辺縁部においては健常部の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⁽⁶⁾。腫瘍細胞は真皮内において、腫瘍側方への不規則な進展はしばしばみられるものの、腫瘍辺縁部では一見すると正常なコラーゲンとの鑑別が困難なほど形態的には異型性が低い。このため、隆起性皮膚線維肉腫の腫瘍断端の評価は時に困難であり、適切な切除を施行した後に断端からの再発を起こす事が知られる⁽⁴⁾。隆起性皮膚線維肉腫の腫瘍細胞は造血幹細胞マーカーであるCD34がびまん性に陽性になり、皮膚線維腫で陽性となるfactor XIIIaが陰性になることが知られている。SMA (smooth muscle actin)などの筋原性マーカーが陽性となる紡錘形細胞の集簇を伴うことがあり、免疫組織学的には線維芽細胞や筋線維芽細胞由来である事を示すとされる一方^(7,8)、神経鞘腫瘍の亜型であるという考え方も報告されている⁽⁶⁾。また、隆起性皮膚線維肉腫にはいくつかの亜型が報告されている。全体が線維肉腫構造で置換された表在性線維肉腫(superficial fibrosarcoma)、色素細胞の混在する色素性隆起性皮膚線維肉腫(pigmented dermatofibrosarcoma protuberans/ Bednar 腫瘍)、間質の粘液腫状変化の顕著

な粘液型隆起性皮膚線維肉腫(myxoid dermatofibrosarcoma protuberans)、小児や若年者に好発し巨細胞や間質の類洞様裂隙を伴う巨細胞線維芽細胞腫(giant cell fibroblastoma)があり、これらの亜型も含めた全ての隆起性皮膚線維肉腫は特異的なキメラ遺伝子である *COL1A1-PDGFB* を有するとされている⁽⁹⁾。

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、単発ないし多発する固い結節を呈し、成人の四肢に好発するとされるがその他の部位でも多くみられる。いくつかの病理組織学的亜型が報告されており、中でも *cellular type* と呼ばれるものは稠密な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⁽¹⁰⁾。皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫の間には臨床的、病理組織学的に類似点があるものの、いくつかの鑑別点が知られている(表 1)。すなわち、皮膚線維腫では腫瘍部での表皮肥厚を認め、腫瘍細胞に多形性があり、腫瘍辺縁においてヒアリン化した膠原線維束が存在し、免疫組織学的に *factor XIIIa* が陽性で *CD34* が陰性となる⁽¹¹⁾。

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いる^(12,13)。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⁽¹⁴⁾。*TSP-1* は 150-180kD のサブユニットがジスルフィド結合で架橋された 3 量体構造を持つ、合わせて約 450kD の複合糖タンパク質である⁽¹⁵⁾。*TSP-1* は主に血小板 α 顆粒に存在するが、その他にも線維芽細胞、血管内皮細胞、平滑筋細胞、単球、マクロファージ、各種がん細胞などでその産生が確認されている^(16,17)。正常組織では、角膜内皮、血管壁、基底膜、腺組織、乳汁中などにその存在が確認されており、いわゆる細胞外マトリックスを構成していると考えられる。

本研究では、皮膚線維腫においては *TSP-1* による *TGF-β* の活性化が重要で

あり、逆に隆起性皮膚線維肉腫においては TSP-1 の発現が低下することにより、TGF- β による細胞増殖抑制作用が減弱するであろうと仮定し、皮膚線維腫や隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の発現量や分布についての研究を行った。また、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。

	皮膚線維腫	隆起性皮膚線維肉腫
		
性質	良性	悪性
境界	明瞭	不明瞭
大きさ	小さい	大きい
被覆表皮	肥厚	菲薄化
細胞形態	多形	単一
巨細胞	あり	なし
皮下への進展	稀、部分的	よく見られる、びまん性
Factor XIIIa	陽性	陰性
CD34	陰性	陽性

表 1 皮膚線維腫と隆起性皮膚線維腫における臨床・病理組織学的差異

材料・方法

対象患者

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。皮膚線維腫患者は男性 3 名、女性 4 名の計 7 名で、年齢は 33 歳～56 歳（平均 41.7 歳）であった。隆起性皮膚線維肉腫患者は男性 2 名、女性 2 名の計 4 名で、年齢は 23 歳～45 歳（平均 32.3 歳）であり、両者を併せると男性 5 名、女性 6 名の計 11 名で、年齢は 23 歳～56 歳（平均 38.3 歳）であった（表 2）。全ての患者は臨床的、病理組織学的に診断した。

対照

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、健常人コントロールとした。男性 2 名、女性 3 名の計 5 名で、年齢は 20 歳～45 歳（平均 32.0 歳）であった。

病理組織学的検討

皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫の鑑別のため全例で施行した。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染色を行った。

免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は Vectastain ABC kit(Vector Laboratories, Burlingame, CA)を使用し、パラフィン切片を用いて行った。シランでコーティングしたスライドに 5 μm の厚さに切った切片を乗せ、キシレンで脱パラフィン化し、エチルアルコールと Phosphate Buffered Saline (PBS)による一連の流れにより処理した。その後、切片は 50 倍に希釈した抗 TSP-1 抗体を用い、4°Cで一晩 incubate した。抗 TSP-1 抗体(N-20)は、Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA)のものを使用した。免疫反応性は Vector Red (Vector Laboratories)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

皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫の腫瘍細胞、対照群の真皮内線維芽細胞を分離し、10% fetal calfserum (FCS)を含むminimal essential medium (MEM)で培養した。24時間のserum starvationの後、細胞はlysis buffer (1% Triton X-100 in 50 mM Tris-HCl [pH7.4], 150 mMNaCl, 3m MMgCl₂, 1mMCaCl₂ containing 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin, pepstatin, aprotinin, 1 mM PMSF, and 1 mMNa₃VO₄)に溶解した。TSP-1の検出は、蛋白濃度測定試薬 (Bio-Rad社, Hercules, CA)を用いて補正を行った上で、細胞溶解液を SDS-polyacrylamide gelにて電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写した。その後、ニトロセルロース膜を抗TSP-1抗体を用いて4°Cで一晩incubateし、洗浄後horseradish peroxidase (ICN/CAPPEL社, Aurora, OH)と結合した二次抗体と反応後、enhanced chemiluminescence (Amersham Pharmacia Biotech)で発光しX線フィルム (Amersham Biosciences社, Piscataway, NJ)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。

同意

本研究の開始前に、ヘルシンキ宣言に則り、患者及び健常人ボランティアより書面でのインフォームド・コンセントを得た。また、これらの検体の採取は東京大学医学部倫理委員会の規定に基づき被験者の承認を得た上で行った。

	年齢	性別	診断	部位	CD34染色
症例 1	40	女	DF	胸部	陰性
症例 2	33	女	DF	大腿	陰性
症例 3	56	男	DF	下顎	陰性
症例 4	45	男	DF	大腿	陰性
症例 5	33	女	DF	上腕	陰性
症例 6	44	女	DF	大腿	陰性
症例 7	41	男	DF	肩部	陰性
症例 8	43	女	DFSP	胸部	陽性
症例 9	28	女	DFSP	肘部	陽性
症例 10	35	男	DFSP	大腿	陽性
症例 11	23	男	DFSP	手指	陽性
コントロール 1	45	女			
コントロール 2	20	女			
コントロール 3	43	男			
コントロール 4	22	女			
コントロール 5	30	男			

※ DF: dermatofibroma (皮膚線維腫)、DFSP: dermatofibrosarcoma protuberans (隆起性皮膚線維肉腫)

表 2 皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫、コントロール群のまとめ

結果

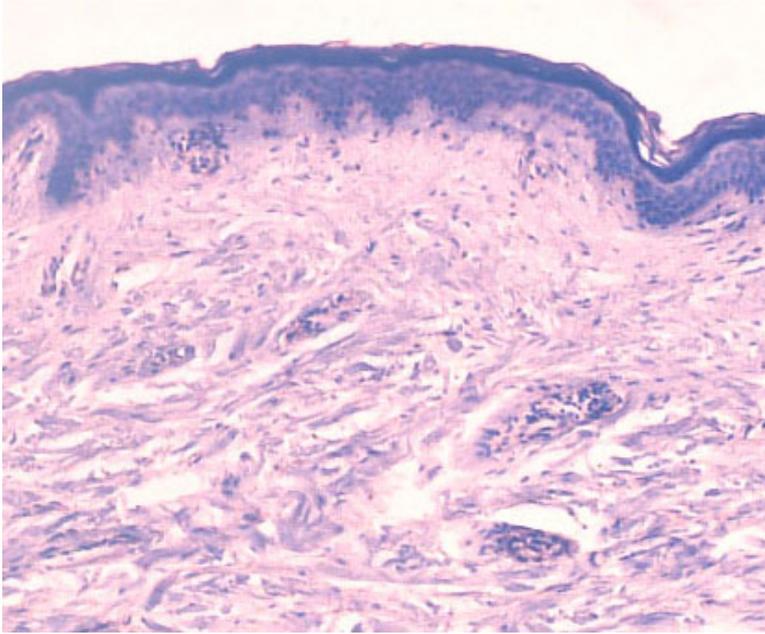
免疫組織化学染色による TSP-1 の発現の検出

免疫組織化学染色による皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫、正常皮膚における TSP-1 の発現について表 3 に示した。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(図 1a)。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(図 1b)。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(図 1c)。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(図 1d)。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(図 1e)。

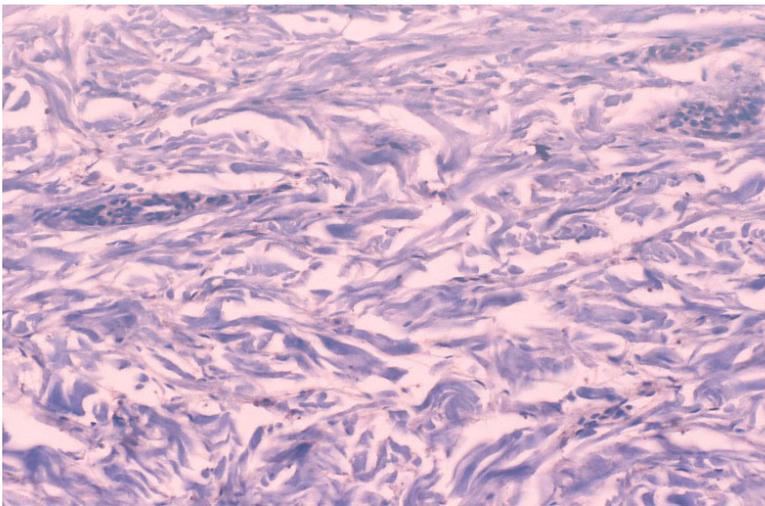
	診断	年齢	性	表皮	腫瘍細胞	辺縁の線維芽細胞
症例1	DF	40	女	+	+	-
症例2	DF	33	男	+	++	-
症例3	DF	56	男	-	+	-
症例4	DF	45	男	+	+	-
症例5	DF	33	女	-	+	-
症例6	DF	44	女	+	+	-
症例7	DF	41	男	+	+	-
症例8	DFSP	43	女	+	+++	-
症例9	DFSP	28	女	+	+++	-
症例10	DFSP	35	男	+	+++	-
症例11	DFSP	23	男	+	+++	-
						真皮の線維芽細胞
Control 1		45	女	+		-
Control 2		20	女	-		-
Control 3		43	男	-		-
Control 4		22	女	-		-
Control 5		30	男	+		-

+ for slight staining; +++ for strong staining; ++ for staining between + and +++

表 3 免疫染色による皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫、正常皮膚における TSP-1 の発現



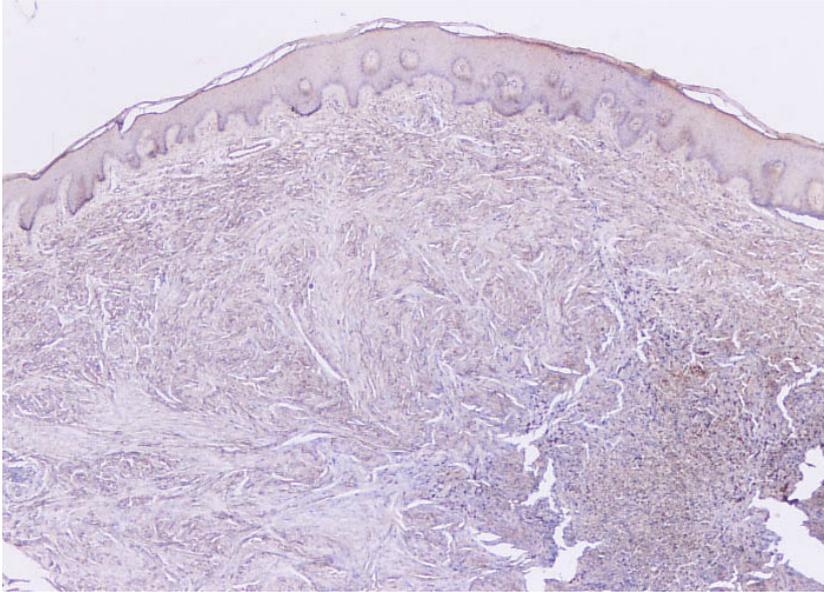
弱拡大



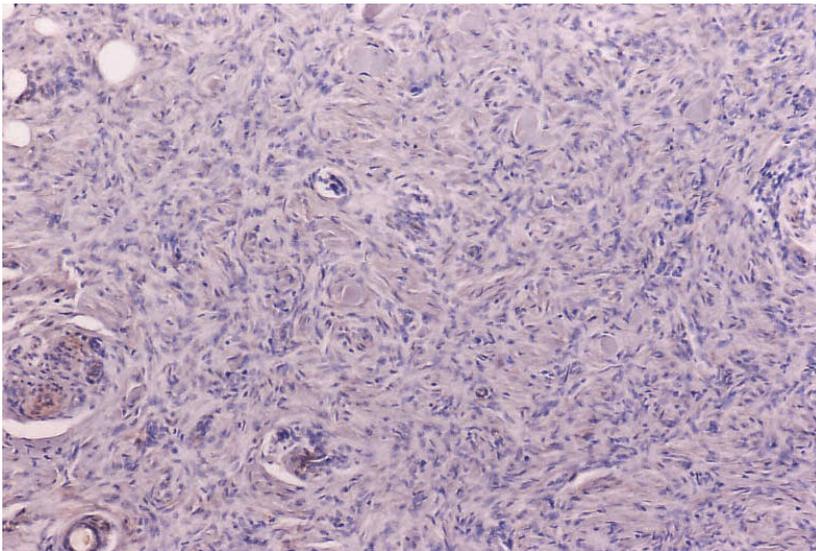
強拡大

図 1a 正常皮膚における TSP-1 の発現

TSP-1 は表皮や付属器での発現がみられるが、真皮内膠原線維では発現がみられない。



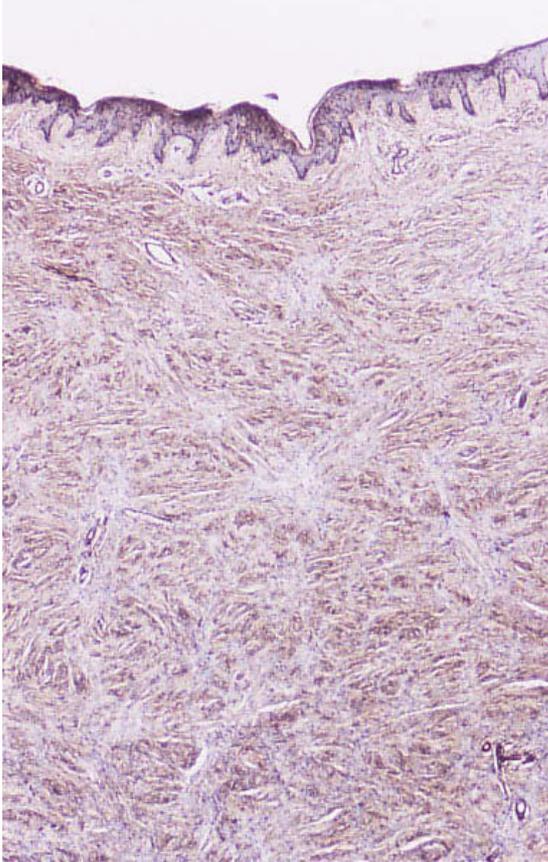
弱拡大



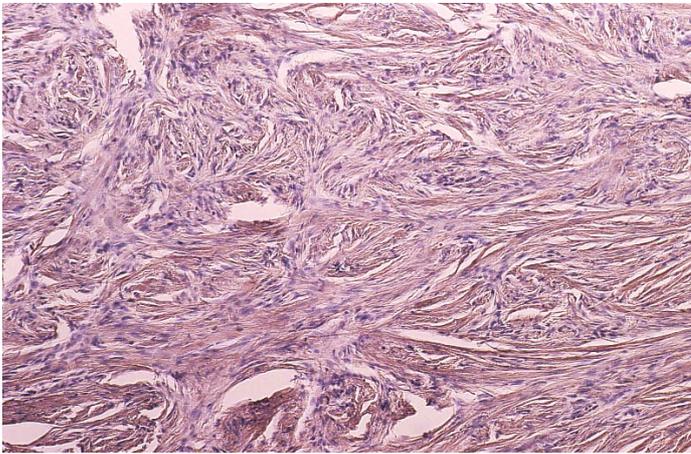
強拡大

図 1b 皮膚線維腫における TSP-1 の発現

TSP-1 は腫瘍全体にびまん性に弱い発現がみられた。紡錘形の細胞と類円形の細胞とで染色に差はみられなかった。TSP-1 は間質には発現していなかった。



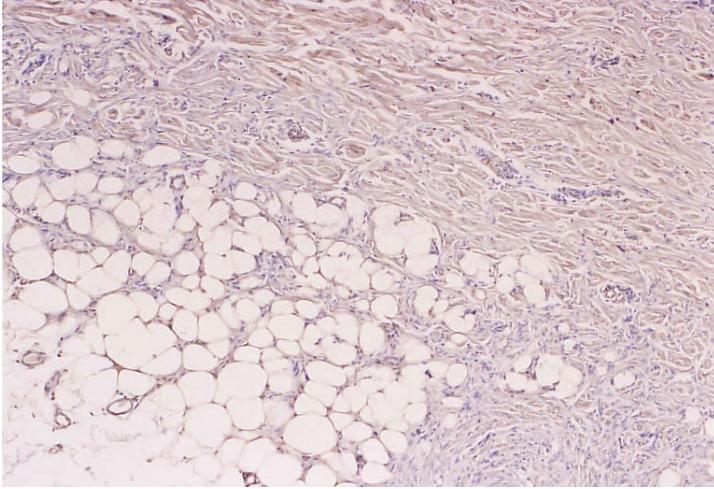
弱拡大



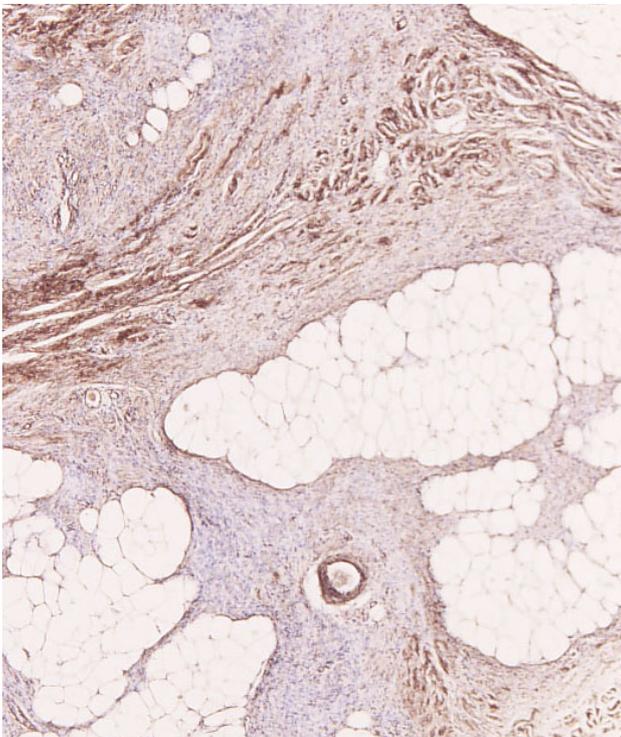
強拡大

図 1c 隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の発現

皮膚線維腫と比較するとより強く腫瘍細胞に発現がみられた。間質での発現は皮膚線維腫と同様みられなかった。



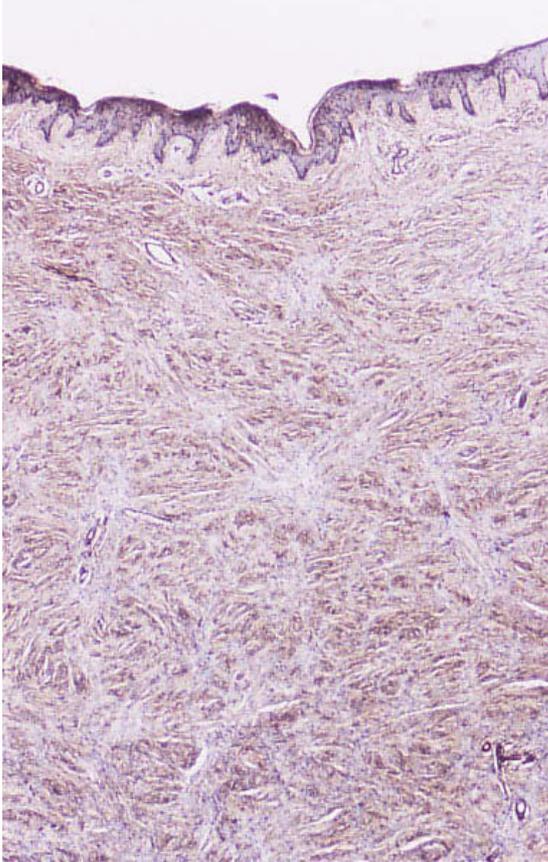
皮膚線維腫



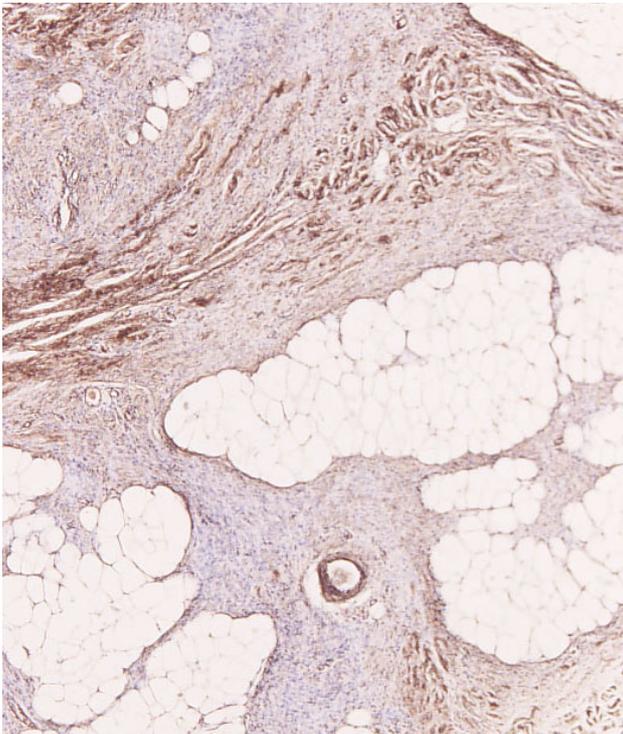
隆起性皮膚線維肉腫

図 1d 皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫における腫瘍辺縁部での
TSP-1 発現量の比較

隆起性皮膚線維肉腫において、脂肪組織内に浸潤する腫瘍細胞に TSP-1
の強い発現がみられた。



腫瘍中央部

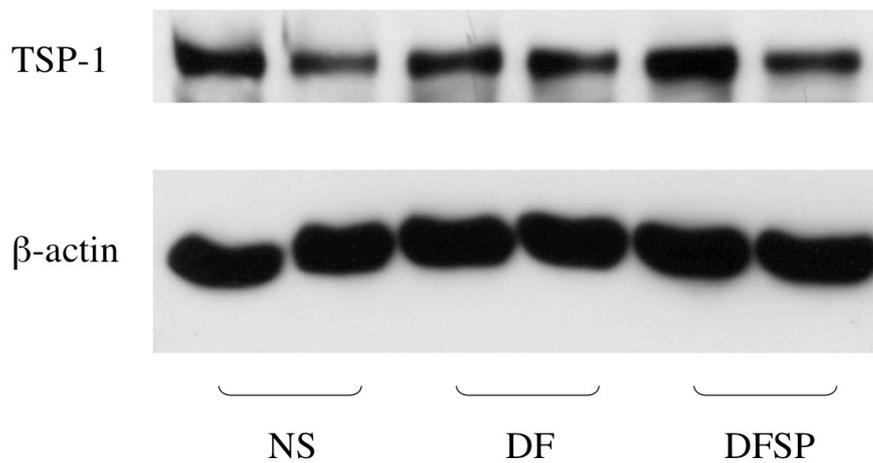


腫瘍辺縁部

図 1e 隆起性皮膚線維肉腫における腫瘍中央部と腫瘍辺縁部での TSP-1 発現量の比較
腫瘍辺縁部において、TSP-1 のより強い発現を認めた。

免疫ブロット法による TSP-1 の発現の検出

皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫の腫瘍細胞と正常皮膚における線維芽細胞の TSP-1 発現量について免疫ブロット法で比較した。免疫組織化学染色の結果とは異なり、皮膚線維腫、正常皮膚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(図 2)。



NS: normal skin, DF: dermatofibroma, DFSP: dermatofibrosarcoma protuberans

図2 免疫ブロット法による皮膚線維腫、隆起性皮膚線維肉腫の腫瘍細胞とコントロール群の線維芽細胞における TSP-1 の発現量の比較
3群とも TSP-1 の発現量の差はみられなかった。

考察

皮膚線維腫及び隆起性皮膚線維肉腫が硬く触れることは、病理組織学的な腫瘍周辺の線維化と関連があると考えられ、この線維化を引き起こす原因としていくつかのサイトカインや成長因子の関与が疑われる。これらのサイトカインや成長因子の中で、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 transforming growth factor- β (TGF- β)である^(12,13)。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^(18,19)。TGF- β 1 は通常 bioactive peptide of TGF- β 1、a latency-associated peptide- β 1(LAP- β 1)、a latent TGF- β binding protein-1 の3つのタンパク質の複合体として分泌される。TGF- β 1 は LAP- β 1 と非共有結合によって small latent complex(SLC)と呼ばれる複合体を形成するが、この latent form と呼ばれる状態では TGF- β 受容体に結合することができない⁽²⁰⁾。このため、TGF- β は TGF- β 受容体に結合する前に活性化されなければならないが、TGF- β の活性化メカニズムの1つが latent TGF- β と細胞外マトリックスのひとつである 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⁽¹⁴⁾。

TSP-1 のそれぞれのサブユニットはいくつかのドメインに区分され、それぞれのドメインが種々のタンパク質と結合する配列を持つため、多彩な生理作用を発揮する⁽²¹⁾。latent TGF- β の活性化に責任を持つ領域は、3つのタイプ1リピートを持つドメインに存在する⁽²²⁾。また、2つのアミノ酸配列が TGF- β の活性化に関係することが分かっており、1つはタイプ1リピートにある

GGWSHW 配列 (アミノ酸 418~423) (もしくはタイプ 2 リピートにある DGWSPW 配列かタイプ 3 リピートにある GGWGPW 配列) であり、もう 1 つはタイプ 1 リピートの 1 番目と 2 番目の間にある KRFK 配列 (アミノ酸 412~415) である⁽²³⁾。latent TGF- β の活性化は TSP-1 の KRFK 配列と LAP のアミノ酸末端領域である LSKL 配列の結合の結果生じることが報告されている⁽²⁴⁾。そして TSP-1 が TGF- β の主な活性化因子であることは、TSP-1 ノックアウトマウスにおける *in vivo* の実験において報告されている⁽¹⁴⁾。さらに、TSP-1 の過剰発現は増殖性糸球体腎炎による線維化⁽²⁵⁾や尿細管間質の線維化⁽²⁶⁾の進行と密接に関連があるとも言われている。これらの報告から考えると、TGF- β の活性化によって生じる組織学的な線維化は TSP-1 の主な役割であることが示唆される。

一般的に良性腫瘍も悪性腫瘍もその起源となる細胞が存在し、細胞の分化の過程で生じることが知られている。良性腫瘍の細胞が機能的で形態学的によく分化している一方で、悪性腫瘍の細胞は部分的な分化しかみられない。隆起性皮膚線維肉腫は low-grade の悪性腫瘍として知られている。今回の研究では、隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の過剰発現が確認された。さらに、正常コントロールと比較すると、皮膚線維腫においても TSP-1 の過剰発現が確認された。TSP-1 の発現増加は、コラーゲンを含む細胞外マトリックスの過剰発現を引き起こすことが報告されている⁽²⁷⁾。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病理組織学的な線維化を引き起こしている可能性が考えられる⁽¹³⁾。さらに、皮膚線維腫と隆起性皮膚線維肉腫における TSP-1 の発現パターンには明白な違いが確認された。皮膚線維腫の組織では、各腫瘍細胞において TSP-1 がびまん性に発現しているものの、その発現は弱く散在しており、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 の細胞増殖抑制作用により癌の進展が抑制されるという報告もあるが、逆に TGF- β は癌の悪性化や浸潤・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⁽²⁸⁻³³⁾。TSP-1 についても同様に、血管新生抑制作用により癌の進展を抑制する報告がある一方で、TSP-1 の発現レベルの増加に伴い、細胞の悪性化や浸潤能の促進がみられたとする報告もある^(34,42)。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、隆起性皮膚線維肉腫が悪性腫瘍であるものの転移が稀であることと併せて考えると、その血管新生抑制作用などにより、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⁽¹³⁾。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。これらを明らかにするためには、TGF- β を活性化する他の **ligand** についても検討し、また TSP-1 の代謝経路を明らかにする必要があると考えた。また免疫ブロット法において、皮

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。いずれの可能性も考えられ、また双方が関連している可能性も考えられるが、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。

結論として、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。

謝辞

本研究を行うにあたり御指導下さいました、熊本大学大学院皮膚病態治療再建学分野 尹浩信教授ならびに、研究方法に関して直接御指導を頂いた自治医科大学皮膚科学講座 大槻マミ太郎教授に深謝いたします。自治医科大学皮膚科学講座の皆様にはさまざまな機会に御協力いただき、終始あたたかなご助言とご配慮をいただきました。まことに感謝申し上げます。

参考文献

1. Heenan PJ. Tumors of the fibrous tissue involving the skin. In: *Lever's histopathology of the skin* (Elder D, Elenitsas R, Jaworsky C, Johnson B, eds), 8th edn. Philadelphia: Lippincot-Raven. 1997; 847-87.
2. Peters CW, Hanke CW, Pasarell HA, Bennett JE. Chemosurgical reports. Dermatofibrosarcoma protuberans of the face. *J Dermatol Surg Oncol* 1982; 8: 823-6.
3. Gutierrez G, Ospina JE, de Baez NE *et al.* Dermatofibrosarcoma protuberans. *Int J Dermatol* 1984; 23: 396-401.
4. Kahn LB, Saxe N, Gordon W. Dermatofibrosarcoma protuberans with lymph node and pulmonary metastases. *Arch Dermatol* 1978; 114: 599-601.
5. Berbis P, Devant O, Echinard C *et al.* Metastatic Darier-Ferrand dermatofibrosarcoma. Review of the literature apropos of a case. *Ann Dermatol Venereol* 1987; 114: 1217-27.
6. Kamino H, Jacobson M. Dermatofibroma extending into the subcutaneous tissue. Differential diagnosis from dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Surg Pathol* 1990; 14: 1156-64.
7. Lautier R, Wolff HH, Jones RE. An immunohistochemical study of dermatofibrosarcoma protuberans supports its fibroblastic character and contradicts neuroectodermal or histiocytic components. *Am J Dermatopathol* 1990; 12: 25-30.
8. Ma CK, Zarbo RJ, Gown AM. Immunohistochemical characterization of atypical fibroxanthoma and dermatofibrosarcoma protuberans. *Am J Clin Pathol* 1992; 97: 478-83.
9. Takahira T, Oda Y, Higaki K, *et al.* Detection of COL1A1-PDGFB fusion

transcripts and PDGFB/PDGFRB expression in dermatofibrosarcoma protuberans. *Mod Pathol* 2007; 20: 668-675

9. Calonje E, Mentzel T, Fletcher CD. Cellular benign fibrous histiocytoma. Clinicopathologic analysis of 74 cases of a distinctive variant of cutaneous fibrous histiocytoma with frequent recurrence. *Am J Surg Pathol* 1994; 18: 668-76.

10. Cohen PR, Rapini RP, Farhood AI. Expression of the human hematopoietic progenitor cell antigen CD34 in vascular and spindle cell tumors. *J Cutan Pathol* 1993; 20: 15-20.

11. LeRoy EC, Smith EA, Kahaleh MB *et al.* A strategy for determining the pathogenesis of systemic sclerosis; is transforming growth factor β the answer? *Arthritis Rheum* 1989; 32: 817-25.

12. Crawford SE, Stellmach V, Murphy-Ullrich JE, Ribiero SMF, Lawler J, Hynes RO, Boivin GP, Bouk N. Thrombospondin-1 is a major activator of TGF β 1 in vivo. *Cell* 1998; 93: 1159-70.

13. Kubo M, Ihn H, Yamane K, Tamaki K. The expression levels and the differential expression of transforming growth factor β receptors in dermatofibroma and dermatofibrosarcoma protuberans. *Br J Dermatol* 2006; 154: 919-925

14. Lawler JW, Slayter HS, Coligan JE. Isolation and characterization of a high molecular weight glycoprotein from human blood platelets. *J Biol Chem* 1978; 253: 8609–8616.

15. Raugi GJ, Mumby SM, Abbott-Brown D *et al.* Thrombospondin: synthesis and secretion by cells in culture. *J Cell Biol* 1982; 95: 351–354.

16. Jaffe EA, Ruggiero JT, Falcone DJ. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. *Blood* 1985; 65: 79–84.

17. Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-641.
18. Border WA, Noble NA. Transforming growth factor β in tissue fibrosis. *N Engl J Med* 1994; 331: 1286-92.
19. Anns JP, Munger JS, Rifkin DB. Making sense of latent TGF- β activation. *J Cell Sci* 2003; 116: 217-24.
20. Adams JC. Thrombospondin-1. *Int J Biochem Cell Biol* 1997; 29: 861-5.
21. Schultz-Cherry S, Lawler J, Murphy-Ullrich JE. The type 1 repeats of thrombospondin-1 activate latent transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1994; 269: 26783-8.
22. Schultz-Cherry S, Chen H, Mosher DF, Misenheimer TM, Kruttsch HC, Roberts DD, Murphy-Ullrich JE. Regulation of transforming growth factor- β activation by discrete sequences of thrombospondin-1. *J Biol Chem* 1995; 270: 7304-10.
23. Ribiero SMF, Poczatek M, Schultz-Cherry C, Villian M, Murphy-Ullrich JE. The activation sequence of thrombospondin-1 interacts with the latency-associated peptide to regulate activation of latent transforming growth factor- β . *J Biol Chem* 1999; 274: 13586-93.
24. Barnes JL, Mitchell RJ, Kanalas JJ, Barnes VL. Differential expression of thrombospondin and cellular fibronectin during remodeling in proliferative glomerulonephritis. *J Histochem Cytochem* 1999; 47: 533-44.
25. Hugo C, Shanklad S, Pichler RH, Couser WG, Johnson RJ. thrombospondin-1 precedes and predicts the development of tubulointerstitial fibrosis in glomerular disease in the rat. *Kidney Int* 1998; 53: 302-11.
26. Mimura Y, Ihn H, Jinnin M, Asano Y, Yamane K, Tamaki K.

Constitutive thrombospondin-1 overexpression contributes to autocrine transforming growth factor- β signaling in cultured scleroderma fibroblasts. *Am J Pathol* 2005; 166: 1451-63.

27. Meister P, Konrad E, Hohne N. Incidence and histological structure of the storiform pattern in benign and malignant fibrous histiocytomas. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol* 1981; 393: 93-101.

28. Park K, Kim SJ, Bang YJ, Park JG, Kim NK, Roberts AB, Sporn MB. Genetic changes in the transforming growth factor beta (TGF-beta) type II receptor gene in human gastric cancer cells: correlation with sensitivity to growth inhibition by TGF-beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91: 8772-8776.

29. Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Parsons R, Sun L, Lutterbaugh J, Fan RS, Zborowska E, Kinzler KW, Vogelstein B, et al. Inactivation of the type II TGF-beta receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-8.

30. Myeroff LL, Parsons R, Kim SJ, Hedrick L, Cho KR, Orth K, Mathis M, Kinzler KW, Lutterbaugh J, Park K, et al. A transforming growth factor beta receptor type II gene mutation common in colon and gastric but rare in endometrial cancers with microsatellite instability. *Cancer Res* 1995; 55: 5545-7.

31. Garrigue-Antar L, Muñoz-Antonia T, Antonia SJ, Gesmonde J, Vellucci VF, Reiss M. Missense mutations of the transforming growth factor beta type II receptor in human head and neck squamous carcinoma cells. *Cancer Res* 1995 ; 55: 3982-7.

32. Yang HK, Kang SH, Kim YS, Won K, Bang YJ, Kim SJ. Truncation of the TGF-beta type II receptor gene results in insensitivity to TGF-beta in human gastric cancer cells. *Oncogene* 1999; 18: 2213-9.
33. Chang J, Park K, Bang YJ, Kim WS, Kim D, Kim SJ. Expression of transforming growth factor beta type II receptor reduces tumorigenicity in human gastric cancer cells. *Cancer Res* 1997; 57: 2856-9.
34. Wong SY, Purdie AT, Han P. Thrombospondin and other possible related matrix proteins in malignant and benign breast disease. An immunohistochemical study. *Am J Pathol* 1992; 140: 1473-82.
35. Tuszynski GP, Nicosia RF. Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 1994; 70: 228-33.
36. Hosokawa T, Muraishi A, Rothman VL, Papale M, Tuszynski GP. The effect of thrombospondin on invasion of fibrin gels by human A549 lung carcinoma. *Oncol Res* 1993; 5: 183-9.
37. Albo D, Arnoletti JP, Castiglioni A, Granick MS, Solomon MP, Rothman VL, Tuszynski GP. Thrombospondin (TSP) and transforming growth factor beta 1 (TGF-beta) promote human A549 lung carcinoma cell plasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1) production and stimulate tumor cell attachment in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 1994; 203: 857-65.
38. Arnoletti JP, Albo D, Granick MS, Solomon MP, Castiglioni A, Rothman VL, Tuszynski GP. Thrombospondin and transforming growth factor-beta 1 increase expression of urokinase-type plasminogen activator and

plasminogen activator inhibitor-1 in human MDA-MB-231 breast cancer cells. *Cancer* 1995; 76: 998-1005.

39. Arnoletti JP, Albo D, Jhala N, Granick MS, Solomon MP, Atkinson B, Rothman VL, Tuszynski GP. Computer-assisted image analysis of tumor sections for a new thrombospondin receptor. *Am J Surg* 1994; 168: 433-6.

40. Tuszynski GP, Nicosia RF. Localization of thrombospondin and its cysteine-serine-valine-threonine-cysteine-glycine-specific receptor in human breast carcinoma. *Lab Invest* 1994; 70: 228-33.

41. Tuszynski GP, Gasic TB, Rothman VL, Knudsen KA, Gasic GJ. Thrombospondin, a potentiator of tumor cell metastasis. *Cancer Res* 1987; 47: 4130-3.

42. Tuszynski GP, Rothman VL, Deutch AH, Hamilton BK, Eyal J. Biological activities of peptides and peptide analogues derived from common sequences present in thrombospondin, properdin, and malarial proteins. *J Cell Biol* 1992; 116: 209-17.