

主論文の要旨

**Hyaluronan expression as a significant prognostic
factor in patients with malignant peripheral
nerve sheath tumors**

悪性末梢神経鞘腫瘍患者におけるヒアルロン酸発現の
予後予測因子としての有用性

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野
(指導：西田 佳弘 准教授)

生田 国大

【緒言】

悪性末梢神経鞘腫瘍（MPNST）は悪性軟部腫瘍の 5～10%を占め、局所再発や遠隔転移を高頻度にくる。MPNST の半数は神経線維腫症 I 型（NF1）に関連して発症し、一部の神経線維腫は MPNST へ悪性転化することが知られている。従来の化学療法や放射線治療の有効性は明らかでなく、治療は外科的切除が中心であり、一般に予後不良である。したがって、MPNST を早期発見、診断し、適切な治療を行うことが予後改善に重要である。最近の研究では、NF1、組織学的悪性度、腫瘍サイズなどが MPNST の予後不良因子として報告されているが、診断や予後予測に有用な分子マーカーに関する報告は少ない。

ヒアルロン酸（HA）は生体内に広く分布する多糖類で、細胞外マトリックスの主要な構成成分である。細胞周囲や細胞内にも存在し、細胞周囲環境の恒常性維持に寄与している。悪性腫瘍では HA 集積が腫瘍細胞の増殖、浸潤、遊走を促進し、遠隔転移や腫瘍進展に関与することが知られている。乳癌、肺癌、胃癌などの上皮癌では、腫瘍の HA 集積が有意な予後不良因子として報告されている。しかし、末梢神経発生腫瘍において、HA がその悪性化や悪性度、および予後と関連しているかは明らかではない。本研究では、MPNST と神経線維腫における HA 発現を調査し、両者の鑑別および MPNST の予後予測に有用であるかを解析した。

【対象と方法】

1986 年から 2011 年までに名古屋大学整形外科で治療を行った症例のうち、抗がん剤の影響のない腫瘍組織が得られた神経線維腫 15 例、MPNST 30 例を対象とした。腫瘍組織からホルマリン固定パラフィン包埋切片を作製し、ビオチン化ヒアルロン酸結合蛋白（HABP）を用いた組織化学染色により HA 発現の評価を行った。1997 年以降に得られた MPNST 22 例について、免疫組織化学染色により HA 合成酵素（HAS1、HAS2、HAS3）発現の評価を行った。腫瘍細胞および細胞周囲の染色性により、negative（0%）、weak（1-20%）、strong（21%以上）に分類した。

MPNST の治療成績について、HA および HAS1-3 発現に加え、患者の年齢、性、発生部位、発生深度、組織学的悪性度、腫瘍サイズ、NF1 の有無の各因子に関して overall survival と disease-free survival を Kaplan Meier 法で算出、log-rank test にて解析し、Cox 回帰分析による多変量解析を行った。神経線維腫と MPNST の HA 量を比較するために、抗がん剤の影響のない凍結腫瘍組織（神経線維腫 6 例、MPNST 20 例）、およびそれぞれの細胞株（ヒト神経線維腫細胞株；Hs53T、ヒト MPNST 細胞株；sNF02.2）を用いて HA binding assay により定量化し評価を行った。平均値の差の解析は t 検定または Bonferroni 法、カテゴリー変数の比較は Fisher's exact test にて統計学的に有意であるかを解析した。P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

【結果】

神経線維腫症例は男性 7 例、女性 8 例、初診時平均年齢 40.8 歳（19-61）であった。

MPNST 症例は男性 16 例、女性 14 例、初診時平均年齢 44.5 歳 (17-77)、平均経過観察期間は 46.8 か月 (2-104) であった。NF1 (+) 16 例、発生部位は体幹 14 例、四肢 16 例であった。深層発生 20 例、組織学的悪性度は高悪性 19 例、腫瘍サイズは平均 9cm (2-22) であり、10cm より大きいものは 8 例であった。各臨床因子の分布について、神経線維腫と MPNST 症例間に有意差はなかった (Table 1)。

HA 染色性は、MPNST 症例で negative 6 例、weak 15 例、strong 9 例、神経線維腫症例で negative 4 例、weak 11 例であり、strong 以上の染色率を認めなかった (Table 2、3)。Strong と weak 以下の 2 群に分けて検討すると、HA 発現は MPNST 症例で有意に高く (P=0.020)、神経線維腫と MPNST の鑑別に有用であった (Table 3)。MPNST の臨床因子のうち、HA 発現と有意に関連するものはなかった (Table 4)。

HAS1 染色性は negative 5 例、weak 6 例、strong 11 例、HAS2 染色性は 4 例、5 例、13 例、HAS3 染色性は 7 例、8 例、7 例であった (Table 2)。死亡例を 7 例、遠隔転移を 12 例、局所再発を 3 例に認め、MPNST 30 例における 5 年 overall survival は 83%、5 年 disease-free survival は 65%であった。Strong と weak 以下の 2 群に分けて検討すると、overall survival では HA 高発現 (P=0.041) が有意な予後不良因子であり、HAS1 発現 (P=0.334)、HAS2 発現 (P=0.378)、HAS3 発現 (P=0.622) は有意差を認めなかった (Fig. 2)。Disease-free survival では HA 高発現 (P=0.019) が有意な予後不良因子であり、HAS1 発現 (P=0.258)、HAS2 発現 (P=0.957)、HAS3 発現 (P=0.837) は予後予測に有用性を示さなかった (Fig. 3)。

MPNST の臨床因子のうち、overall survival では年齢 (45 才以上、P=0.048)、NF1 (P=0.019)、腫瘍サイズ (>10cm、P=0.020)、組織学的悪性度 (P=0.034)、disease-free survival では、NF1 (P=0.025)、腫瘍サイズ (>10cm、P=0.001)、組織学的悪性度 (P=0.032) が有意な予後不良因子であった (Table 5)。多変量解析では、腫瘍サイズ (P=0.022) が overall survival における唯一の独立した予後不良因子であり、HA 高発現 (P=0.089) は予後不良と関連する傾向を認めた。Disease-free survival については、HA 高発現 (P=0.028) と腫瘍サイズ (P=0.002) がともに独立した予後不良因子であった (Table 6)。

腫瘍組織の平均 HA 濃度は、神経線維腫 238.2 $\mu\text{g/g}$ 、MPNST 275.4 $\mu\text{g/g}$ であり、両群間に有意差を認めなかった (P=0.750) (Fig. 4)。細胞株における HA 濃度の比較では、培養 12、24 時間後の細胞内 HA 濃度、培養 24 時間後の細胞周囲および培養液 HA 濃度は、Hs53T に比べて sNF02.2 で有意に高かった (Fig. 5a-c)。

【考察】

MPNST は一部の神経線維腫との鑑別が組織学的に困難なことがある。本研究では、HA 発現が神経線維腫と MPNST の鑑別に有用であることが示され、細胞株においても MPNST 細胞および周囲環境の HA 濃度は神経線維腫細胞に比べて有意に高かった。一方、腫瘍組織の HA 濃度については、神経線維腫と MPNST の間に有意な差を認めなかったが、原因として組織中の間質組織や血管が含有する

HA 量の影響が考えられた。

MPNST の臨床因子については、過去の研究により腫瘍サイズ、発生部位、組織学的悪性度、NF1、初診時再発病変の存在が有意な予後不良因子として報告されている。本研究では、過去の報告と同様に腫瘍サイズ、組織学的悪性度、NF1 が予後不良因子として抽出され、HA 発現がこれら臨床因子と同等以上に有意に生命予後、再発・転移に関連することが明らかとなった。また HA 発現は disease-free survival の独立した予後不良因子であった。したがって HA 高発現例では、NF1 の有無や組織学的悪性度にかかわらず、早期から特に遠隔転移の可能性を考慮した治療介入を行うべきである。HABP による組織化学染色の手法は比較的簡便であるため、診断早期に腫瘍細胞および周囲の HA 発現の多寡を評価し、MPNST の予後不良症例を早期に抽出することができれば、MPNST 患者の治療成績向上が期待できると考えられる。近年、MPNST における分子学的検索により、生物学的マーカーとして有用な細胞内分子の報告が散見されるが、HA のように細胞周囲の腫瘍微小環境において重要な役割を果たす分子に着目した報告はない。本研究により、HA が MPNST の有用な治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。

【結語】

HA 発現の評価は、神経線維腫と MPNST の鑑別および MPNST 患者の予後予測に有用であった。HA が MPNST の有用な治療ターゲットになりうる可能性が示唆された。