

主論文の要旨

**Overexpression of KIAA1199, a novel strong
hyaluronidase, is a poor prognostic factor in
patients with osteosarcoma**

新規の強力なヒアルロニダーゼである KIAA1199 の過剰発現は、
骨肉腫患者の予後不良因子である

名古屋大学大学院医学系研究科 総合医学専攻
運動・形態外科学講座 整形外科学分野

(指導：今釜 史郎 教授)

伊藤 鑑

【緒言】

骨肉腫は、小児・思春期の原発性悪性骨腫瘍で最も多く、9割以上が高悪性度に分類される。5年全生存率(5yOS)は、限局性では65-76%だが、転移性では19-29%と低い。また、限局性の約4割が再発を来す。

ヒアルロン酸(HA)は、細胞外マトリックス(ECM)の主な構成要素の一つである高分子グリコサミノグリカンである。HAは、悪性腫瘍の成長、浸潤、転移に重要な役割を果たすことが示されている。

KIAA1199は、難聴との関連が確認された最初の遺伝子であり、最近では強力なHA分解酵素として知られる。様々な悪性腫瘍で、KIAA1199の発現量が予後に関連することが報告されているが、骨肉腫における報告はない。

本研究の目的は、骨肉腫組織におけるKIAA1199とHAの発現と、骨肉腫患者の予後や臨床的特徴との関連を調べることである。

【対象と方法】

2003-2013年に、当院で治療し、生検時のホルマリン固定パラフィン包埋検体が得られた骨肉腫患者49例を対象とした。男性30例、女性19例、平均年齢23歳、平均経過観察期間84カ月、平均腫瘍径11.5cm、部位は四肢45例、骨盤3例、胸骨1例であった。組織型は23例がosteoblastic typeで、27例に遠隔転移(うち10例が初診時転移)を認めた。術前化学療法後の平均腫瘍壊死率は67%であった。各検体におけるKIAA1199とHAの発現は、KIAA1199とHA binding protein(HABP)の一次抗体を用いた免疫組織化学染色により評価した。各染色の陽性細胞の割合の高さでHigh群とLow群の2群に分類する際のカットオフ値は、予後診断能の指標であるC-indexが最大値となるように求めた。2群における各臨床病理学的因子との関連についてはピアソンのカイ二乗検定とマン・ホイットニーのU検定を用い、予後解析にはカプラン・マイヤー法を用いて解析した。予後因子の解析はログ・ランク検定を用いた。HOSとSaos-2の2つの骨肉腫細胞株で、HAS1/2/3、HYAL1/2、KIAA1199、GAPDHのmRNAの発現量をRT-PCRにて評価した。

【結果】

KIAA1199およびHABPの染色陽性率がそれぞれ73-77%、59-62%のときC-indexが最大値を示し、代表値として75%と60%をカットオフ値とした。KIAA1199染色では34例がHigh群、15例がLow群、HABP染色では21例がHigh群、28例がLow群に分類された。

KIAA1199染色の高い陽性率は遠隔転移の発生と有意に相関し($P=0.002$)、初診時限局性で経過を評価し得た38例における遠隔転移の発症もHigh群で有意に多かった($P=0.009$)。壊死率は、High群(59%)がLow群(85%)に比べて有意に低かった($P=0.003$)。HABP染色では有意差のある因子はなかった。

KIAA1199染色における生存解析では、5年無病生存期間(5yDFS)はLow群で69%、

High 群で 39%、5yOS は Low 群で 93%、High 群で 59%であり、Low 群は DFS が長い傾向にあり (P=0.054)、Low 群の OS が有意に長かった (P=0.026)。HABP 染色では、5yDFS は Low 群 57%、High 群 40%、5yOS は Low 群 82%、High 群 52%で、DFS には有意差がなかったが (P=0.275)、OS は Low 群が有意に長かった (P=0.029)。

予後因子の単変量解析では、DFS に有意に寄与する因子はなかったが、OS では、骨盤発生、遠隔転移、KIAA1199 染色の高陽性、HABP 染色の高陽性が有意な予後不良因子であった (それぞれ、P=0.018、0.007、0.026、0.029)。多変量解析でも、この 4 因子は有意差を示し、OS の独立した予後因子であった (それぞれ P=0.001、<0.001、0.036、0.002)。

RT-PCR では、HYAL1/2 の発現量は、2 つの細胞株で同様の割合を示したが、HAS1/2/3 と KIAA1199 の発現量は両者間で異なっていた。

【考察】

胃癌などの多くの癌で、KIAA1199 のノックダウンにより腫瘍の増殖・浸潤能が抑制されることが報告されている。本研究結果は、他の癌と同様に、骨肉腫における KIAA1199 の過剰発現が腫瘍増殖・浸潤性の促進に寄与している可能性を示した。

骨肉腫の一般的な予後因子は、腫瘍部位、大きさ、遠隔転移、化学療法への反応、完全切除などが報告されている。本研究でも、多変量解析により、部位と遠隔転移が予後因子として同定された。また、遠隔転移と壊死率が、KIAA1199 染色の陽性度と有意に相関していた。この結果は、KIAA1199 が遠隔転移と壊死率の予測マーカーとなりうることを示唆している。壊死率は予後因子として同定されなかったが、過去の報告でも対象患者数が 30 例程度の報告では本研究と同様に壊死率は予後因子として同定されていない。

一方で、HABP 染色では High 群と Low 群の間で DFS や転移の発生率に有意な差はなかった。この結果は、骨肉腫の転移能力は、HA よりも KIAA1199 の発現と強く関連している可能性が高いことを示唆している。

HA は細胞膜下で HA 合成酵素 (HAS1/2/3) により産生され、細胞表面と ECM に押し出される。腫瘍組織中の HA レベルの上昇は、様々な悪性腫瘍患者の予後不良と相関しており、骨肉腫との関連では、骨肉腫細胞株 MG63 において、HAS2 を介した HA 合成が細胞の増殖、移動、浸潤に重要な役割を果たし、HAS3 関連 HA が骨肉腫細胞株 LM8 の転移性を高めることが報告されている。

一方、HA 分解の詳細な機序は未解明であった。HA 受容体の CD44 と 2 つの HA 分解酵素 (HYAL1/2) による分解経路が報告されているが、KIAA1199 による経路とは異なることが示されている。本研究で、HA 分解酵素の KIAA1199 が HA と同様に予後の悪い骨肉腫患者で多く発現していたが、これは、豊富な HA に対して反応性に KIAA1199 が高発現したことが一因であると考えられた。

HA 代謝関連酵素の mRNA レベルは骨肉腫細胞株間で異なっていた。この結果は、HA 代謝パターンが細胞間で異なることを示唆している。以前の報告では、HOS 細胞

の増殖は Saos-2 よりも遥かに速く、一方 VEGF 遺伝子発現は Saos-2 の方が HOS より 6 倍高かった。種々の分子発現は症例によって異なることが予想され、将来的に腫瘍の増殖・進展において HA 関連酵素が果たす役割を解明する必要がある。

本研究の限界は、第一に、対象患者数が少ない点、第二に、後ろ向き研究のために詳細な患者情報が不足した点、第三に、KIAA1199 が骨肉腫の不良な予後に関与する機序が未解明である点である。

【結論】

本研究結果は、KIAA1199 が、遠隔転移や化学療法抵抗性の予測マーカーとして有用である可能性を示した。また、KIAA1199 と HA の高発現は、ともに骨肉腫の予後不良因子であることが示された。これらの発現は、免疫染色によって比較的容易に評価できるため、骨肉腫患者の予後を評価する上で臨床的に有用だと考えられた。