

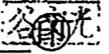
財団法人日中医学協会
2004年度共同研究等助成金－在留中国人研究者－報告書

平成 17 年 3 月 10 日

財団法人 日中医学協会 御中

貴財団より助成金を受領して行った研究テーマについて報告いたします。

添付資料： 研究報告書

中国人研究者名： 谷 文光 
指導責任者名： 遠藤 直人 職名： 教授
所属機関名： 新潟大学大学院医歯総合研究科
〒951-8510
所在地： 新潟県新潟市旭町通 1-757
電話： 025-227-2272 内線： _____

1. 助成金額： 60万 円

2. 研究テーマ

悪性線維性組織球腫における新しい細胞株の樹立と遺伝子異常の検索

3. 成果の概要（100字程度）

悪性線維性組織球腫（MFH）は組織発生不明であるが、軟部肉腫の中で最多でありかつ高率に転移をきたす予後不良の疾患である。本腫瘍の遺伝子異常検討し、診断・治療に有用なデータを得ることが研究の目的である。私達は新たな粘液型 MFH 細胞株を樹立した。染色体分析による 17 番染色体と 22 番染色体の相互転座を解明した、隆起性皮膚線維肉腫（DFSP）でこのような染色体の相互転座が報告されている。CGH 法を用いて 1q12-23 と 8q13-qter 領域にコピー数の増加を検出した。9p21 と 13q10-q31 の欠失を見出した。RT-PCR 法を用いて DFSP にみられる融合遺伝子（COL1A1-PDGFB）の存在を検討したが、検出不能であった。従って、NMFH-1 細胞の組織発生は DFSP とは異なっていると考えられる。

4. 研究業績

(1) 学会における発表 無 (有) (学会名・演題)

学会名： 51st Annual Meeting of the Orthopaedic Research Society (ワシントン DC)

演題： EXPRESSION OF THE COXSACKIEVIRUS AND ADENOVIRUS RECEPTOR IN
SOFT TISSUE TUMORS

(2) 発表した論文 (無) 有 (雑誌名・題名)

悪性線維性組織球腫における新しい細胞株の樹立と遺伝子異常の検索

研究者氏名 谷 文光
中国所属機関 ハルビン医科大学附属第一病院整形外科
日本研究機関 新潟大学大学院医歯総合研究科整形外科学分野
指導責任者 教授 遠藤 直人
共同研究者名 生越 章、川島 寛之、工藤 尚子

要 旨：

悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma (MFH) は発生組織不明であるが、軟部肉腫の中で最多でありかつ高率に転移をきたす予後不良の疾患である。本腫瘍の遺伝子異常検討し、診断・治療に有用なデータを得ることが研究の目的である。私達は新たな粘液型 MFH 細胞株を樹立した。染色体分析による 17 番染色体と 22 番染色体の転座を解明した。隆起性皮膚線維肉腫 dermatofibrosarcoma protuberance (DFSP) でこのような染色体の転座が報告されている。CGH 法を用いて 1q12-23 と 8q13-qter 領域にコピー数の増加を検出した。9p21 と 13q10-q31 の欠失を見出した。RT-PCR 法を用いて DFSP にみられる融合遺伝子 (COL1A1-PDGFB) の存在を検討したが、検出不能であった。従って、NMFH-1 細胞の組織発生は DFSP とは異なっていると考えられる。

キーワード：粘液型、悪性線維性組織球腫、細胞株、隆起性皮膚線維肉腫、融合遺伝子、COL1A1-PDGFB

結 言：

悪性線維性組織球腫 malignant fibrous histiocytoma (MFH) は組織発生不明であるが、軟部肉腫の中で最多でありかつ高率に転移をきたす予後不良の疾患である。腫瘍を特徴づけている組織成分によって、花むしろ多形型、粘液型、巨細胞型、炎症型に分類される。今まで多くの MFH 細胞株が樹立されてきたが、その多くは花むしろ多形型であり、粘液型 MFH 細胞株はきわめて少なく、かつ遺伝子異常の詳細な検討もきわめて少ないである¹⁻³。我々は 粘液型 MFH 細胞株の樹立に成功し、この細胞の遺伝子異常について検討した。

対象と方法：

1：症例

89 歳男性の左側膝部に発生した粘液型 MFH から手術時に組織を採取し、培養系に移した。10%牛胎仔血清添加した RPMI1640 培養液を用い培養した。全ての培養は 37 度、5%CO₂ インキュベータ中で行い、培地は三日毎交換した。

2：RNA 抽出と RT-PCR

NMFH1 細胞株から TRIzol (Gibco BRL, Rockville, MD) 試薬を用いて total RNA を抽出した。抽出した RNA から Oligo(dT)15 プライマー (Promega, Madison, WI) を用いて逆転写酵素により cDNA を作製した。既報の融合遺伝子 (COL1A1-PDGFB) のプライマーで PCR を行った⁴。

3 : Spectral Karyotyping (SKY) 核型分析

SKY は Applied Spectral Imaging (ASI) 社の SKY キットを用いて解析した。プローブカクテルを 37 度で 2 日間、分裂期の細胞にハイブリダイズし、SKY のフィルターを通して観察、Spectracube (ASI 社) で解析した。同時に DAPI 染色の画像も取り込み、得られるバンドパターンにより切断点も同定した。

4 : Comparative Genomic Hybridization (CGH) 核酸分析

NMFH1 細胞からゲノム DNA を抽出して、CGH 法は既報の方法で行った⁵。腫瘍 DNA は fluorescein-12-dUTP (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) でニックトランスレーション法を用いて標識した。正常リファレンス DNA は Spectrum Red direct-labeled male total human DNA (Vysis, Downers Grove, IL, USA) です。標識した腫瘍 DNA と正常 DNA は同量 (800 ng) ずつ Cot-1 DNA (20 ug) (GIBCO-BRL, Gaithersburg, MD, USA) と共にエタノール沈殿し、ハイブリダイゼーションバッファーに溶解した。ハイブリダイゼーション後洗浄し、染色体を同定するために 4', 6' -diamino-2-phenylindole (DAPI; Sigma, St. Louis, MO, USA) を用いて対比染色をした。蛍光ハイブリダイゼーションシグナルと DAPI 染色パターンは高感度 MCD (monochrome charge-coupled device) カメラを装着した顕微鏡で取り込み、automated CGH analysis software (MetaSystems, Altusheim, Germany) を用いて解析を行った。

5 : ノードマウスへの移植

RPMI1640 培養液に浮遊している 5×10^6 の NMFH1 細胞を 7 週齢の雌性ノードマウス (CB-17/Icr scid; Jel Clea, nInc., Osaka, Japan) の背部に皮下注射した。

結 果

1 : NMFH1 細胞株の樹立

初代培養から三週間に腫瘍細胞は単層に分布して、小紡錘形の単核細胞と多核巨細胞の二種類の細胞によって構成された。

2 : RT-PCR

NMFH1 細胞株で COL1A1-PDGFB 融合遺伝子を検出されなかった。

3 : SKY 法による解析

10 個核分裂中期 NMFH1 細胞を用いて SKY 分析を行った。染色体数は 84-94 であり、複雑な構造異常が見られた。染色体異常は以下のとおりである。

84-94 <4n>, XXY, -X[9], -Y[10], +1[6], add(1)(p11)[4], add(1)(q11)[2], add(1)(q11)[5], del(1)(q11)[3], -2[9], add(2)(q37)[10], add(2)(q37)[4], del(2)(q37)[2], -3[9], -3[4], add(3)(p11)[10], add(3)(p11)[9], add(3)(p11)[6], -4[10], -4[9], add(4)(q31)[7], -5[10], -5[10], del(5)(q11)[8], der(5)t(3;56)(p11;p15)[9], -6[10], -6[10], add(6)(p11)[6], del(6)(p12)[4], -7[10], der(7

)add(7)(p22)add(7)(q36)[10],-8[7],add(8)(p11)[10],add(8)(p11)[8],add(8)(q24)[10],add(8)(q24)[2],-9[9],del(9)(p11)x2[10],del(9)[8],-10[10],-11[10],-11[10],-11[3],-12[5],-13[9],add(13)(p11)[2],add(13)(p11)[4],add(13)(q34)[2],-14[10],-14[10],-14[9],+15[2],-15[4],i(15)(q10)[5],-16[10],-16[7],add(16)(q13)[8],del(16)(p11)[8],-17[8],add(17)(p11)[8],add(17)(p11)[2],del(17)(p11)[10],del(17)(p11)[9],del(17)(p11)[2],-18[10],-18[10],add(18)(q23)[8],add(18)(q23)[2],add(18)(q273)[7],-19[7],add(19)(p13)[9],add(19)(p13)[2],add(19)(q13)[8],add(19)(q13)[5],add(19)(q13)[4],-20[6],add(20)(q13)[9],add(20)(q13)[4],add(20)(q13)[2],-21[7],add(21)(q22)[10],+22[10],+22[2],+der(?)t(?;3)(?;p11)t(?;3)(?;p11)[6],+mar1[10],+mar2[10],+mar3[9],+mar4[10],+mar5[10],+mar6[10],+mar7[10],+10-14mar.

SKY 分析で mar7 は派生染色体 der(22)t(17;22)であると判明した。この染色体の転座変化は DFSP の染色体異に類似していた。

4 : CGH 法による解析

NMFH1 細胞のコピー数の変化を検出した。有意な過剰を検出した領域は the p12-p22, 1q12-23, 5p, 7, 8q13-qter, 9q12-32, 11q13, 15, 17q23-qter, 18, 19p13.1, 20 であった。有意な欠失を検出した領域は 2q36-qter, 4q22-qter, 6q12-q16, 9p21-pter, 10p13-pter, 11q23, and 13q12 であった。しかし、高レベルのゲノム増幅の変化を検出しなかった。

5 : ノードマウスの体内で腫瘍形成

NMFH1 細胞はノードマウスの体内で移植腫瘍を形成した。接種後の三週に触知可能な小結節を見られた、八週後に腫瘍の直径は 2cm になった。形成した腫瘍は、組織学的には典型的な粘液型 MFH の特徴を示した。

考 察

粘液性 MFH は粘液線維肉腫として成人軟部肉腫瘍群へ分類され、最も発生率が高い。組織学的には、樹立した細胞株は粘液性 MFH の特徴を示した。

MFH を含めて肉腫は 1q21-q22 と 8q 領域のコピー数の増加を認められることが多い⁶。今回の研究で用いた NMFH1 細胞株には 1q12-23 と 8q13-qter 領域にコピー数の増加を検出した。9p21 と 13q10-q31 の欠失は MFH の顕著なゲノム不均衡であることがわかった。

CGH 分析の結果は、NMFH-1 腫瘍細胞には MFH の典型的な分子特性があったのを明らかにした。この細胞株は、人間の粘液性 MFH について腫瘍起源の分子メカニズムに関する研究のために有益な材料となる。

COL1A1-PDGFB 遺伝子融合は隆起性皮膚線維肉腫(DFSP)でしばしばみられる。このキメラ遺伝子は 17q22 での COL1A1 と 22q13 での PDGFB が溶融したものであり、腫瘍の発生で重要な役割を果たすと信じられている^{4,7}。現在まで若干の症例報告で、DFSP を母体として MFH が発生する例が知られている^{8,9}。DFSP と MFH の両方が同じ発生組織を共有するとの仮説がなりたつわけである。SKY 分析は、NMFH-1 腫瘍細胞には t(17;22)があったのを明らかにした、しかし、RT-PCR を

用いて COL1A1-PDGFB 遺伝子融合の発現を調べが、腫瘍細胞には、この特定の融合遺伝子を検出なかった。この結果は、NMFH-1 細胞の組織発生は DFSP とは異なっていると考えられる。

参考文献：

- [1] Kanzaki T, Kitajima S, Suzumori T, Biological behavior of cloned cells of human malignant fibrous histiocytoma in vivo and in vitro. *Cancer Res* 1991;51: 2133-2137.
- [2] Iwasaki H, Isayama T, Ohjimi Y, Kikuchi M, Yoh S, Shinohara N, Yoshitake K, Ishiguro M, Kamada N, Enjoji M, Malignant fibrous histiocytoma: a tumor of facultative histiocytes showing mesenchymal differentiation in culture cell lines. *Cancer* 1992: 69: 437-447
- [3] Nakatani T, Marui T, Yamamoto T, Kurosaka M, Akisue T, Matsumoto K, Establishment and characterization of cell line TNMY1 derived from human malignant fibrous histiocytoma. *Pathol Int* 2001; 51: 595-602.
- [4] Wang J, Hisaoka M, Shimajiri S, Morimitsu Y, Hashimoto H: Detection of COL1A1-PDGFB fusion transcripts in dermatofibrosarcoma protuberans by reverse transcription-polymerase chain reaction using archival formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Diagn Mol Pathol* 1999, 8:113-119
- [5] Nishio J, Iwasaki H, Ishiguro M, Ohjimi Y, Nishimura N, Koga T, Kawarabayashi T, Kaneko Y, Kikuchi M. Establishment of a new human malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-1: cytogenetic characterization by comparative genomic hybridization and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 144: 44-51.
- [6] Nilsson M, Meza-Zepeda LA, Mertens F, Forus A, Myklebost O, Mandahl N. Amplification of chromosome 1 sequences in lipomatous tumors and other sarcomas. *Int J Cancer* 2004; 109: 363-369.
- [7] Sandberg AA, Bridge JA. Updates on the cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: dermatofibrosarcoma protuberans and giant cell fibroblastoma. *Cancer Genet Cytogenet* 2003; 140: 1-12.
- [8] Lopes JM, Paiva ME. Dermatofibrosarcoma protuberans. A histological and ultrastructural study of 11 cases with emphasis on the study of recurrences and histogenesis. *Path Res Pract* 1991; 187: 806-813.
- [9] Zámečník M, Michal M, Mukenšnábl P. Composite tumor consisting of dermatofibrosarcoma protuberans and myxofibrosarcoma. *J Cutan Pathol* 1998; 25: 445-449.