

骨肉腫, 骨巨細胞腫, 軟部肉腫における Vascular endothelial growth factor の 関与についての研究

谷川 浩 隆

信州大学医学部整形外科学教室
(主任: 寺山 和雄教授)

A Study on the Role of Vascular Endothelial Growth Factor in Osteosarcomas, Giant Cell Tumors of Bone, and Soft Tissue Sarcomas

Hiroataka TANIKAWA

Department of Orthopaedic Surgery, Shinshu University School of Medicine
(Director: Prof. Kazuo TERAYAMA)

Bone and soft tissue sarcomas, known to be of high-grade malignancy, are hypervascular tumors and usually metastasize. Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a potent endothelial cell-specific growth factor which was identified in 1989. The purpose of this study was to investigate whether VEGF is expressed in tumors of bone and soft tissue origin. Thirteen primary bone and soft tissue tumors were studied. Non-radioactive, digoxigenin-labeled single-stranded RNA probes were made from cDNA of VEGF which were reverse-transcribed from total RNA of human liver. Northern analysis with these probes demonstrated that VEGF-mRNA was transcribed in 10 of the cases. These results suggest that the transcription of VEGF is related with the clinical course, including the effects of adjuvant chemo/radio-therapy and distant metastasis. Giant cell tumors of bone, called borderline malignancy due to occasional distant metastasis despite benign histological features, transcribed VEGF-mRNA. This suggested that giant cell tumors of bone have aggressive biological features. The transcription of subtypes of VEGF was investigated with RT-PCR, and it was found that all cases of osteosarcomas transcribed VEGF₁₂₁ predominantly. Transcription of VEGF₁₂₁ is thus seen to be related with malignant biological features. *Shinshu Med J 43: 253-263, 1995*

(Received for publication February 1, 1995)

Key words: vascular endothelial growth factor, messenger RNA, osteosarcoma, giant cell tumor of bone, soft tissue sarcoma

血管内皮成長因子, メッセンジャー-RNA, 骨肉腫, 骨巨細胞腫, 軟部肉腫

I 緒 言

骨・軟部原発肉腫の多くは組織学的に血管に富み局

別刷請求先: 谷川 浩隆

〒390 松本市旭3-1-1 信州大学医学部整形外科

所増殖能も高いことが知られている。また転移形式はほとんどが血行性であり, リンパ行性であることはきわめてまれである。これらの事実はある種の血管成長因子が骨・軟部肉腫の増殖および遠隔転移に関与していることを強く示唆している。

Vascular endothelial growth factor (VEGF) は 1989年に塩基配列が決定された最も強力な血管内皮細胞の成長因子の1つであり¹⁾, 血管内皮細胞に直接作用して分裂増殖させ、また血管の透過性を亢進させる。VEGFが上記の骨・軟部肉腫の特徴に寄与している可能性を考え、その messenger RNA (mRNA) に関し Northern blotting を用いて検討した。検出された VEGF-mRNA のサブタイプについては reverse transcription/polymerase chain reaction (RT-PCR) を使って検討した。また組織学的に良性であるにもかかわらず時には遠隔転移を生ずるため、悪性骨腫瘍と良性骨腫瘍との境界線上に位置づけられている骨巨細胞腫についても同様の検討をした。この結果、これらの骨・軟部肉腫および骨巨細胞腫における VEGF-mRNA の存在がはじめて明らかになった。

II 材料と方法

A 材料と採取方法

検討に用いた材料は、信州大学医学部附属病院で著者が執刀し、中央検査部病理検査室で臨床病理医によって確定診断された骨肉腫 4 例、骨巨細胞腫 3 例、脂肪肉腫 1 例、平滑筋肉腫 1 例、primitive neuroectodermal tumor (PNET) 1 例、隆起性皮膚線維肉腫 (DFSP: dermatofibrosarcoma protuberans) 1 例、悪性線維性組織球腫 (MFH: malignant fibrous histiocytoma) 2 例の計13例であった (表1)。材料は切開生検時に腫瘍中心部で他の組織や壊死を認めない部分から採取し、ただちに清潔下にプラスチックバックにいれ、ドライアイスで凍結し-70°Cで保存した。また切離断術、広範切除術の際は、術後可及的早期に腫瘍内部からとりだした組織を上記と同様の処置により保存した。

B RNA の抽出

RNA の抽出は AGPC 法 (acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform)²⁾ をもとに開発された ISOGEN (ニッポンジーン) により行った。まず上記

表1 VEGF を検討した症例一覧

症 例	年/性	診 断	発生部位	採取時手術	補助療法 ¹⁾	遠隔転移	転 帰
1	14/女	骨肉腫	腓骨近位	生 検	—	—	CDF
2	58/男	骨肉腫	大腿骨遠位	生 検	—	—	CDF
3	14/男	骨肉腫	大腿骨遠位	切断術	RT+CT	—	CDF
4	58/男	骨肉腫	尺骨近位	切断術	放射線療法	+ (肺)	AWD
5	27/女	骨巨細胞腫	腸 骨	生 検	—	—	AWD
6	22/男	骨巨細胞腫	脛骨近位	搔爬術	—	—	CDF
7	61/男	骨巨細胞腫	大腿骨骨頭	骨頭切除	—	—	CDF
8	64/女	脂肪肉腫	殿 部	広範切除	—	—	CDF
9	64/女	平滑筋肉腫	大腿部	再発手術	—	—	NED
10	16/女	PNET	大腿部	再発手術	化学療法	—	NED
11	53/男	DFSP	上腕部	生 検	—	—	CDF
12	39/男	MFH	大腿部	再発手術	—	+ (肺, 骨)	DOD
13	64/男	MFH	大腿部	生 検	—	—	CDF

PNET: primitive neuroectodermal tumor

DFSP: 隆起性皮膚線維肉腫

RT+CT: 放射線療法と化学療法

CDF: continuous disease free

NED: no evidence of disease

AWD: alive with disease

DOD: dead of disease

¹⁾: 材料を採取した手術の前に行った補助療法

表2 RT-PCR に用いたプライマー

#1	primer-1 (sense) : 5'-TCCAGGAGTACCCTGATGAG-3'
	primer-2 (antisense) : 5'-TTCACATTTGTTGTGCTGT-3'
#2	primer-3 (sense) : 5'-CGAAGTGGTGAAGTTCATGGATG-3'
	primer-4 (antisense) : 5'-TTCTGTATCAGTCTTTCCTGGTGAG-3'

Leung による VEGF-cDNA の塩基配列¹⁾で primer-1は第241塩基～第260塩基，primer-2は第425塩基～第444塩基，primer-3は第170塩基～第192塩基，primer-4は第681塩基～第705塩基である。

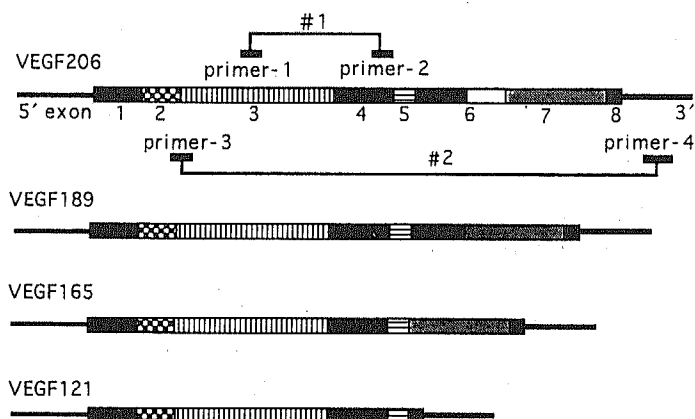


図1 VEGF-cDNA の構造とプライマーの位置

VEGF は 8 個の exon 部分よりなる。Exon6 は 2 通りのスプライシングをされ VEGF₁₈₉ と VEGF₁₆₅ になり，さらに exon7 もスプライシングされると VEGF₁₂₁ になる。#2 プライマー間は VEGF₂₀₆ が 658 塩基対，VEGF₁₈₉ が 607 塩基対，VEGF₁₆₅ が 535 塩基対，VEGF₁₂₁ が 403 塩基対となる。#1 プライマー間はすべてのサブタイプで 204 塩基対となる。

の凍結保存材料 200mg をプラスチックバックにいれたままドライアイス上で凍結した状態で砕いて粉末状にし，ただちに ISOGEN 溶液 2 ml 中に投じホモジナイズした。400 μ l のクロロホルムを加え攪拌し 5 分間室温に留置した後，4 $^{\circ}$ C，12,000rpm，15 分間遠心した。最上層の水層を別のエッペンドルフチューブに移し，1ml のイソプロピルアルコールを加えて 10 分間室温に留置した後，再度 4 $^{\circ}$ C，12,000rpm，15 分間遠心し RNA を沈殿させた。RNA ペレットを 75% エチルアルコール 1ml で洗浄した後，風乾させ RNase inhibitor 加 diethyl pyrocarbonate 水 (0.1%) に溶解し，-70 $^{\circ}$ C で保存した。

C RT-PCR

表 2 に示した 2 組のプライマーを DNA 合成器 Cyclon Plus DNA Synthesizer (Millipore, USA) により作製した。図 1 のように VEGF は alternative splicing により 4 種のサブタイプに分けられる。#1 の primer-1 と primer-2 で増幅される cDNA はすべてのサブタイプで共通であるが，#2 の primer-3 と primer-4 で増幅される cDNA は各サブタイプにより長さが異なる³⁾⁴⁾。

まず最初に総 RNA を AGPC 法によりそれぞれの材料より抽出した。ついで RNA 溶液 10 μ l をエッペンドルフチューブにとり 10 \times PCR 反応液 1.5 μ l (10

mmol/l トリス塩酸緩衝液, 50mmol/l KCl, 1.5 mmol/l MgCl₂, Perkin Elmer, USA)を加えて70°Cで3分間denatureした後, 急速水冷却した。ついで10 mmol/l dNTPs 1.0μl, 0.1mol/l DTT 0.2μl, 10×PCR反応液0.5μlを加えた。逆転写 (RT) のプライマーとして random hexanucleotide primer (Amersham, USA) と, primer-4 の 2 種を用いた。Mo-MuLV reverse transcriptase (Gibco BRL, USA) 200単位を加え反応液全量を20μlにし, 42°C, 55分間の RT 反応を行い相補的 DNA (cDNA) を作成した。

合成された cDNA を Program Temp Control System PC-800 (ASTEC) を使って polymerase chain reaction (PCR) により増幅した。反応液は10×PCR反応液を用い, 200μmol/l dNTPs 2.5μl, #1プライマーあるいは#2プライマーを各600nmol/l となるように加えた。さらに Taq DNA polymerase (Perkin Elmer) 1.5単位を加え, 反応液全量を25μl となるようにして行った。反応条件は, 95°C・120秒間の熱処理にひきつづいて, 94°C・60秒の denature, 55°C・120秒の annealing, 72°C・120秒の extension を35サイクル行い, 最後に72°C・10分の extension を追加した。

D DIG 標識単鎖 RNA プローブの作製

PCR 産物を 2% アガロースゲル上で Tris-borate EDTA (TBE) 緩衝液により電気泳動し primer-1 および 2 で増幅された 204塩基対のバンドを検出した。この 204塩基対の PCR 産物を GeneClean II (BIO 101 Inc., USA) を用いてゲルから回収し, TA クローニング法により T-ベクター (pCRTMII, Invitrogen, USA) にサブクローニングした。ついで competent cell (INV α F⁺) を transformation し アミノペンシルベニシリン選択培地上で単クローン由来のコロニーを拾い, これをさらに液体培地で培養後, アルカリライシス法⁹⁾でプラスミド DNA を抽出した。

サブクローニングベクター pCRTMII に組み込んだ PCR 産物の塩基配列の決定は dideoxy 法⁹⁾によって行った。精製したプラスミド DNA 100~300ng をテンプレートとし, Taq DyeDeoxyTM Terminator Cycle Sequencing Kit (Perkin Elmer) を用いてシーケンシング反応を実施した。サーマルサイクラー Roche R9600 による反応終了後, ABI 373A DNA シーケンサーによって塩基配列を決定した。この結果を遺伝子解析プログラム MacVector により GenBank に登録されている VEGF の塩基配列と照合した。

ついで DIG RNA Labeling Kit (Boehringer Mannheim, Germany) を用いて, cDNA を組込んだプラスミドベクター上の T7プロモーター (antisense側) と SP6プロモーター (sense側) に作用する T7および Sp6 RNA polymerase を加え, antisense および sense のジゴキシンゲン (DIG) 標識 RNA プローブを作製した。

E Northern blotting

2.2mol/l ホルムアルデヒドを含む 1% アガロースゲルを用いて MOPS [3-(N-morpholino)-propanesulfonic acid] 緩衝液により 10μg の総 RNA を 50V, 100分間電気泳動した。泳動後エチジウムブロマイド染色により 28S および 18S リボソーム RNA (rRNA) を確認し, ゲル上の分離した総 RNA をナイロンフィルターに毛細管現象を利用してトランスファーした。トランスファーされた総 RNA を GS Gene LinkerTM (Bio-Rad) を用い紫外線でフィルターに固定した後, プラスチックバックに収納した。

Hybridization 液の組成は 50% ホルムアミド, 5×SSC, 2% ブロッキングリエージェント, 0.02% SDS, 0.1% N-ラウロイルサルコシンとした。これに 100°C で 5 分間 denature した後, 急速水冷却したサケ精子 DNA を 0.1mg/ml の濃度で加え, プラスチックバックの中に注入してフィルターに浸透させ, 恒温器で 65°C, 3 時間 prehybridization を行った。ついで 500ng の DIG 標識 RNA プローブを含む hybridization 液中で 65°C, 16 時間の hybridization を行った。0.1% SDS を含む 2×SSC で室温で 2 回, 0.1% SDS を含む 0.2×SSC で 68°C で 2 回, フィルターを洗浄した。

プローブの検出は DIG Luminescent Detection Kit (Boehringer Mannheim) を用いて行った。ブロッキング液 [ブロッキングリエージェント 1 に反応 1 液 (0.1mol/l マレイン酸, 0.15mol/l NaCl, pH7.5) を 10 の割合で調整した液] で室温 30 分間のブロッキングを行った。ついでアルカリフォスファターゼ標識抗 DIG 抗体 7.5 単位を加え室温で 40 分反応させた。洗浄液 (0.3% Tween 20 を含む反応 1 液) で 15 分間 2 回洗浄後, 反応停止液 (0.1mol/l トリス塩酸緩衝液, 0.1 mol/l NaCl, 50mmol/l MgCl₂; pH9.5) で反応を停止させた。発光性基質 AMPPD[®] を加え, X 線フィルムに室温で 5 時間感光させてプローブのバンドを検出した。バンドの濃さはデントメトリーにより記録した。

III 結 果

A VEGF の sense および antisense RNA プローブの作製

ヒト正常末梢血白血球と肝から抽出した総 RNA より RT-PCR を用いて VEGF の cDNA を増幅した。まず RT 反応では, プライマーとして random hexanucleotide primer または primer-4 のいずれかを用い, ひきつづく PCR では primer-1 および 2 を使用した。PCR 産物を電気泳動したところ末梢血白血球 RNA を primer-4 で RT した cDNA では PCR により 2 種類の DNA フラグメントが増幅された。うち低分子量のフラグメントを塩基対数から判断して VEGF とした。Random hexanucleotide primer で RT した cDNA の PCR 産物では 1,000 塩基対程度の非特異と考えられる DNA フラグメントの増幅がみられた。肝 RNA から同様に RT-PCR したものでは両方のプライマーによる cDNA から VEGF と思われるフラグメントが増

幅された (図 2)。以上の結果から肝由来の cDNA を RNA プローブの作製に用いることとし, pCRTMII に組み込んだ。Dideoxy 法によりプラスミドに組み込まれた cDNA フラグメントの全塩基配列を決定し, GenBank に登録されている VEGF の cDNA の塩基配列と比較したところ完全に一致していることが確認された。そこでこの cDNA を鋳型に DIG で標識した sense および antisense RNA プローブを作製した。

B Northern blotting による腫瘍組織中での VEGF mRNA 量の検討

表 1 に示した症例の腫瘍組織から RNA を抽出し, VEGF-mRNA の検出を Northern blotting で試みた。等量(10 μ g)の総 RNA を電気泳動しエチジウムブロマイド染色により 18S および 28S rRNA を確認した (図 3B)。泳動後の RNA をナイロンフィルターに移し antisense と sense (コントロール) のそれぞれのプローブとハイブリダイズさせた。ついで特異的にハイブリダイズしたプローブを化学発光により X 線フ

表 3 Northern blotting と RT-PCR の結果

症 例	診 断	rRNA ¹⁾	VEGF ²⁾	VEGF ₁₂₁ ³⁾	VEGF ₁₆₅ ³⁾	VEGF ₁₈₉ ³⁾
1	骨肉腫	++	++	++	±	-
2	骨肉腫	++	++	++	±	-
3	骨肉腫	+	±	++	+	-
4	骨肉腫	+	++	++	+	-
5	骨巨細胞腫	+	++	++	++	+
6	骨巨細胞腫	+++	+++	++	++	±
7	骨巨細胞腫	+++	+++	++	++	-
8	脂肪肉腫	+	+	±	+	±
9	平滑筋肉腫	-	-	+	+	-
10	PNET	+++	++	+	+	-
11	DFSP	+	+	+	++	+
12	MFH	-	-	+	-	-
13	MFH	-	-	+	++	+

¹⁾ rRNA: RNA の電気泳動での 18S および 28S rRNA の検出量

²⁾ VEGF: Northern blotting での検出量

³⁾ VEGF_{121,165,189}: RT-PCR での検出量

13例中10例の骨肉腫, 骨巨細胞腫, 軟部肉腫で VEGF が検出された。術前補助療法の効果があった症例 3 では VEGF 量は少量であった。骨肉腫は VEGF₁₂₁ が主要なサブタイプであった。骨巨細胞腫では VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅ が同等であり, 2 例で VEGF₁₈₉ も観察された。軟部肉腫の中で VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅, VEGF₁₈₉ の 3 種がみられた症例では VEGF₁₆₅ がもっとも多かった。

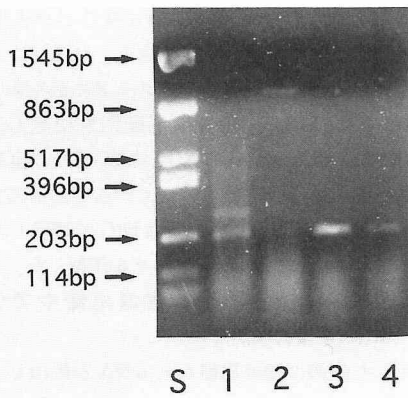


図2 正常組織からの RT-PCR 後の電気泳動像

Lane Sはサイズマーカー、Lane 1は白血球 RNA を primer-4で RT したもの、Lane 2は白血球 RNA を random hexanucleotide primer で RT したもの、Lane 3は肝 RNA を primer-4で RT したもの、Lane 4は肝 RNA を random hexanucleotide primer で RT したもの。肝から RT-PCR したもので204塩基対の長さの cDNA フラグメントがみられた。

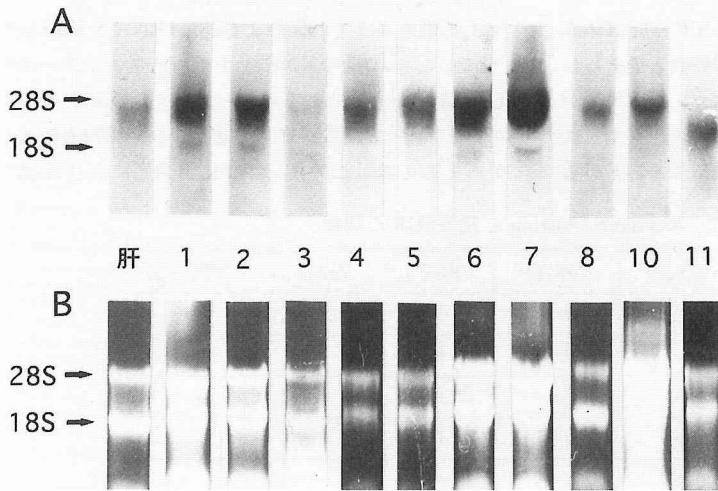


図3 Northern blotting 像

A, B間の数字は症例番号。A: Northern blotting 像。2枚のホルムアルデヒドゲルにわけ同じ条件で行った。B: RNA の電気泳動像。各症例とも10 μ g の RNA を泳動した。左の矢印は28Sおよび18Sの rRNA の位置を示す。

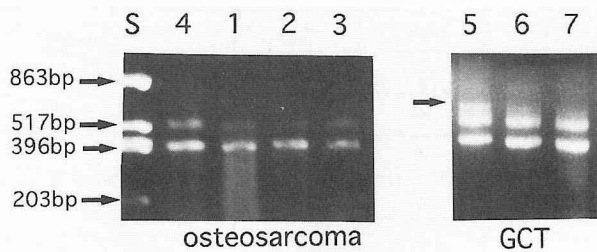


図4 骨肉腫と骨巨細胞腫の RT-PCR 後泳動像

Lane の上段の数字は症例番号を表す。各症例について全 RNA10 μ g から RT-PCR を行い、1枚のゲルに流した。骨巨細胞腫(GCT)の左の矢印は VEGF₁₈₉に相当する607塩基対の cDNA フラグメント。

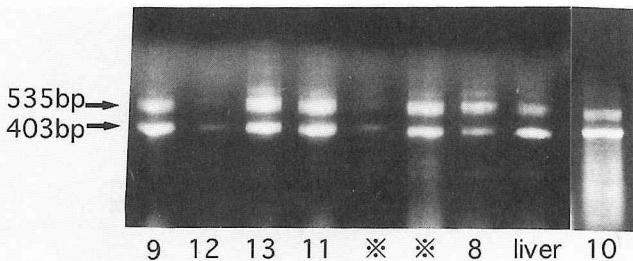


図5 軟部肉腫の RT-PCR 後泳動像

Lane の下段の数字は症例番号を表す。全 RNA10 μ g から RT-PCR を行い、症例 10以外は 1枚のゲルで泳動した。※の Lane は脂肪肉腫 2例。

フィルム上にバンドとして検出した。図3Aに anti-sense プローブで検出したバンドを示した。なお sense プローブではいずれの RNA においてもまったくバンドはみられなかった。

検討した腫瘍13例中10例と肝から抽出した RNA で、28S と18S の rRNA をはさむ3.5~4.5kb の範囲を中心に VEGF-mRNA と考えられるバンドが検出されたが、平滑筋肉腫と MFH の3例(症例9,12,13)では VEGF-mRNA のバンドは観察できなかった。この3症例はいずれも泳動の段階で rRNA が観察されなかった症例であり、RNA の変性によるものと思われた。

骨肉腫では3例(症例1,2,4)で、肝よりも強い VEGF-mRNA のバンドがみられたが、術前に化学療法と局所放射線療法を行った症例3ではほとんど検出されなかった。症例1,2で18Sの rRNA より短い VEGF-mRNA と思われるバンドがわずかに認められた。

骨巨細胞腫の3例ではいずれにおいても肝より多量の VEGF-mRNA が検出された。軟部肉腫のうち、rRNA が検出された脂肪肉腫、PNET、DFSP の3症例では VEGF-mRNA が検出された。その程度は骨肉腫や骨巨細胞腫に比べて少量であった。

C RT-PCR

全ての症例の RNA から RT-PCR で VEGF の cDNA フラグメントが増幅された。Primer-3,4により増幅される cDNA フラグメントはサブタイプによって長さが異なり、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆はこの順にそれぞれ403塩基対、535塩基対、607塩基対、658塩基対となる。肝では VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅に相当する cDNA が増幅された。各症例で検出された VEGF-mRNA の総量とサブタイプの一覧を表3にまとめた。

骨肉腫では4例全例に VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅由来の cDNA フラグメントの増幅がみられた。いずれの症例も VEGF₁₂₁の方が強く増幅されていた。VEGF₁₈₉は増幅されなかった。骨巨細胞腫では3例とも VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅の cDNA フラグメントがほぼ同程度に増幅されていた。なお症例5では VEGF₁₈₉の cDNA が強く増幅され、症例6でも若干増幅されていたが症例7では増幅されなかった(図4)。

脂肪肉腫(症例8)では、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅および VEGF₁₈₉由来の3種類の cDNA フラグメントが増幅されていたが、VEGF₁₆₅由来のバンドがもっとも濃かった。他の2例の脂肪肉腫についても同様に RT-

PCR を行ったところ、1例では症例8と同様の所見がみられたが、他の1例では VEGF₁₂₁の cDNA のみ弱く増幅された。平滑筋肉腫(症例9)と PNET(症例10)では VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅が同程度に増幅された。DFSP(症例11)と MFH の1例(症例13)では VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉が増幅され、うち VEGF₁₆₅がもっとも強かった。MFH の他の1例(症例12)は VEGF₁₂₁のみわずかに増幅された(図5)。すべての症例で VEGF₂₀₆の増幅はみられなかった。

IV 考 察

血管新生作用を持つポリペプチドとして angiogenin や transforming growth factor- β (TGF- β)、tumor necrosis factor- α (TNF- α) などが知られている。しかしこれらの血管成長因子は血管内皮細胞に対する直接作用を有しない。逆に TGF- β や TNF- α では血管内皮細胞の細胞分裂を抑制することが知られている⁷⁾⁻⁹⁾。これらに対して basic fibroblast growth factor (bFGF)、platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) は直接血管内皮細胞に作用し、その分裂増殖を促すことが報告されている¹⁰⁾⁻¹¹⁾。

VEGF は1989年 Ferrara と Henzel¹²⁾によって、ウシ下垂体ろ胞細胞の培養液から単離された血管内皮細胞成長因子である。血管内皮細胞のみに特異的に働いて細胞分裂を促すことが知られているが、血管平滑筋細胞、線維芽細胞、ケラチン細胞に対してはまったく作用しない。この点が他の血管成長因子と違うところであり生体内で血管新生のみに特異的に働いていることが示唆される¹³⁾⁻¹⁵⁾。また血管新生作用の他に血管壁の透過性を高める作用があり、vascular permeability factor, vasculotropin とも呼ばれている¹⁶⁾⁻¹⁸⁾。

VEGF は45kDa のヘパリン親和性糖タンパクであり、23kDa のポリペプチドが二量体を形成している¹²⁾。そのアミノ酸配列は、platelet-derived growth factor (PDGF)-A および PDGF-B と18~20%の相同性を示す。VEGF 中のシステインは PDGF にみられる8個に加えてさらに8個が認められている¹⁹⁾⁻²⁰⁾。

また VEGF は26個のシグナルペプチドを除いたアミノ酸の数により VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅、VEGF₁₈₉の3つのサブタイプに分類されていたが、1991年 Houck ら⁴⁾によってヒト胎児肝 cDNA ライブラリーより PCR を行うことにより VEGF₂₀₆がクローニングされた。おのおののサブタイプは alternative splicing により生ずる²¹⁾(図1)。

1992年の報告で VEGF-mRNA は脳、肝、腎などの諸臓器に広く存在していることが確認された^{21,22)}。

細胞内から組織間中に出て血管内皮細胞に作用するサブタイプは VEGF₁₂₁ と VEGF₁₆₅ である。これに対し VEGF₁₈₉ と VEGF₂₀₆ は細胞関連性が強く、また血管内皮細胞の分裂増殖能を持たない⁴¹⁾³⁾。

腫瘍における VEGF の発現はまだ研究の端緒であるが、神経膠芽腫や血管芽腫に発現していることが報告されている²³⁾⁻²⁵⁾。消化管の腫瘍に対する検討では腺腫、過形成では発現せず、癌腫の腫瘍細胞の細胞質内のみ強く発現していることが明らかになっている²⁶⁾。これは VEGF の発現量が腫瘍の悪性度と関連性があることを示唆している。しかし VEGF のサブタイプの発現と腫瘍の悪性度との関連についてふれている報告はない。

著者は非上皮性悪性腫瘍の中でもっとも悪性度が高く富血管性であり易転移性である骨・軟部肉腫における VEGF の発現に注目して検討した。その結果、骨・軟部肉腫と骨巨細胞腫で VEGF-mRNA を初めて検出した。表 3 に示したように、症例により総 RNA 中に占める VEGF-mRNA の比率に差があることや、腫瘍によって転写される VEGF-mRNA のサブタイプが異なることなどの結果が得られた。

治療効果と VEGF との関係についても興味深い結果が得られた。すなわち補助療法前に採取した生検材料(症例 1, 2)では Northern blotting で中等量の VEGF-mRNA がみられた。しかし術前補助療法として大量メトトレキサートとシスプラチン、アドリアマイシンによる化学療法と局所放射線療法(30Gy)を行った後、切断術時に材料を採取した症例 3 では顕著に VEGF-mRNA 量が低下していた。この症例は術前の CT や MRI などの画像での補助療法効果判定²⁷⁾でサイズの縮小がみられず無効と判断され切断術を実施されている。しかし切断肢の腫瘍部は病理組織学的に壊死や線維化を伴っており術前補助療法の効果がみられ、術後再発転移を認めていない。これに対し症例 4 では術前放射線療法を行ったにもかかわらず VEGF-mRNA 量は症例 3 ほど顕著な低下はみられなかった。この症例は病理組織学的にも腫瘍細胞は壊死部分が少なく術前療法の効果はみられず、臨床的にも術後多発性肺転移をきたした。この 2 症例の結果から VEGF-mRNA 量と腫瘍の悪性度との相関が強く示唆された。

今後 VEGF-mRNA の組織内局在を確かめるためには *in situ* hybridization 等による検討が必要であり、

また骨肉腫や骨巨細胞腫の発生母地である骨芽細胞、破骨細胞での VEGF 量についても調査を要すると考える。さらに症例を増やして検討を加えれば、今後臨床面において術前療法の効果判定および、術後の局所再発遠隔転移などの予測の重要なパラメーターになると考えている。

また RT-PCR による検討で、骨肉腫では VEGF₁₂₁ が主要なサブタイプであった。この研究の対象の中では骨肉腫の 4 例がもっとも生物学的に悪性度が高いことを考えると、VEGF₁₂₁ が生物学的悪性度を高める主要な原因の 1 つであることを示唆している。

骨巨細胞腫は通常良性腫瘍に分類されるが、易再発性でときに肺転移を生じる²⁸⁾。しかしその病理組織像から転移を予測することができない。骨巨細胞腫から骨肉腫と同等以上の VEGF-mRNA がみられ、このことが、生物学的なふるまいが aggressive であることの原因と考えられ、きわめて関心深いことであり新知見であった。しかし骨肉腫と大きく異なる点は VEGF₁₂₁ と VEGF₁₆₅ がほぼ同等量でみられたこと、2 例で VEGF₁₈₉ がみられたことである。VEGF₁₈₉ は細胞関連性が高く、血管増生に寄与しないサブタイプである。本研究で検査した 3 例は遠隔転移がみられなかったが、VEGF₁₂₁ が多くなれば生物学的悪性度が高くなり転移の危険性も高くなると推測される。

軟部肉腫では VEGF-mRNA の全体量は骨肉腫、骨巨細胞腫に比べて低かった。脂肪肉腫では VEGF₁₆₅ がもっとも多く、RT-PCR を行った脂肪肉腫の 3 例中 2 例は VEGF₁₈₉ もみられた。これらの症例でみられたサブタイプの VEGF₁₈₉ 方向へのシフトは生物学的悪性度を低くすると考えられ、実際にこれらは術後再発していなかった。PNET 例は摘出後、化学療法を実施したが 7 カ月後局所再発したため、再発発見から 5 カ月後に行った手術の切除材料である。Northern blotting で rRNA 量がほぼ同等な骨巨細胞腫と比較し、VEGF-mRNA 全体量は低かった。PNET は一般的に高悪性度で転移傾向が強いがこの症例では再発後 5 カ月間転移をきたさなかった。化学療法を実施したにもかかわらず腫瘍は増大したが、遠隔転移をきたさなかった原因の 1 つとして VEGF-mRNA 量が減少したためと考えた。DFSP は病理組織学的に肉腫に分類され、易再発性であるが遠隔転移をきたしにくいことが知られている²⁹⁾。この研究で検討した DFSP の 1 例では VEGF₁₆₅-mRNA が最も多く、また VEGF₁₈₉ も比較的多かった。病理組織学的に肉腫であっても生

物学的悪性度が低いDFSPにおいてもやはり VEGF₁₈₉へのシフトがみられた。

以上より生物学的悪性度が高い腫瘍では VEGF は細胞外へ出て内皮細胞に働くサブタイプ(VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅), 特に VEGF₁₂₁が多く発現し, 生物学的悪性度は低い腫瘍では細胞関連サブタイプ(VEGF₁₈₉, VEGF₂₀₆)が多く発現しているものと推察した。このサブタイプに関して alternative splicing を決定している promoter に対し腫瘍の悪性度がどのように影響しているか検討することが今後の課題である。本研究は骨軟部腫瘍における VEGF の関与を明らかにした最初の報告である。

V 結 語

骨肉腫 4 例, 骨巨細胞腫 3 例, 軟部肉腫 6 例の腫瘍組織内の VEGF-mRNA について Northern blotting と RT-PCR を用いて検討した。

- 1 骨肉腫, 骨巨細胞腫, 軟部肉腫の腫瘍組織中に, VEGF-mRNA が明らかに認められた。
- 2 生物学的悪性度が高い腫瘍では VEGF は細胞外へ出て内皮細胞に働くサブタイプ (VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅), 特に VEGF₁₂₁が多く, 生物学的悪性度が低い腫瘍では細胞関連サブタイプ(VEGF₁₈₉,

VEGF₂₀₆)が多い傾向が示された。

- 3 骨肉腫では VEGF₁₂₁が主要なサブタイプであった。化学療法, 放射線療法などの補助療法の効果が高いものは VEGF-mRNA の全体量が減少していた。VEGF は補助療法の効果判定や予後予測のパラメーターになりうると考えた。
- 4 骨巨細胞腫では VEGF-mRNA の全体量が高かった。骨肉腫と異なり VEGF₁₂₁, VEGF₁₆₅が同程度であり, VEGF₁₈₉もみられた。組織学的に良性であっても生物学的なふるまいが aggressive である原因として VEGF₁₂₁と VEGF₁₆₅の関与が示唆された。
- 5 軟部肉腫では骨肉腫や骨巨細胞腫より VEGF-mRNA の全体量は低かった。

本論文の内容の一部は, 第27回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会(1994年7月, 三重)において発表した。

稿を終るにあたり, 研究のすべての過程でご教授ご助言頂いた臨床検査医学講座勝山 努教授, 降旗謙一助教授に深く感謝する。また実験手技などについてご協力ご助言いただいた附属病院中央検査部遺伝子検査室上野一郎医学博士, 日高恵以子技官, 古渡千澄技官に感謝する。

文 献

- 1) Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N: Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989
- 2) Chomczynski P, Sacchi N: Single-step method of RNA isolation by acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 3) Berse B, Brown LF, Van De Water L, Dvorak HF, Senger DR: Vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) gene is expressed differentially in normal tissues, macrophages, and tumors. *Mol Biol Cell* 3: 211-220, 1992
- 4) Houck KA, Ferrara N, Winer J, Cachianes G, Li B, Leung DW: The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814, 1991
- 5) Birnboim HC, Doly J: A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* 7: 1513-1523, 1979
- 6) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR: DNA sequencing with chain terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-5467, 1977
- 7) Fett JW, Strydom DJ, Lobb RR, Alderman EM, Bethune JL, Riordan JF, Vallee BL: Isolation and characterization of angiogenin, an angiogenic protein from human carcinoma cells. *Biochemistry* 24: 5480-5486, 1985
- 8) Roberts AB, Sporn MB, Assoian RK, Smith JM, Roche NS, Wakefield LM, Heine UI, Liotta LA, Falanga V, Kehrl JH, Fauci AS: Transforming growth factor type β : rapid induction of fibrosis and angiogenesis

- in vivo and stimulation of collagen formation in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 83 : 4167-4171, 1986
- 9) Leibovich SJ, Polverini PJ, Shepard HM, Wiseman DM, Shively V, Nuseir N : Macrophage-induced angiogenesis is mediated by tumour necrosis factor α . *Nature* 329 : 630-632, 1987
 - 10) Abraham JA, Mergia A, Whang JL, Tumolo A, Friedman J, Hjerrild KA, Gospodarowicz D, Fiddes JC : Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science* 233 : 545-548, 1986
 - 11) Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, Wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W, Heldin CH : Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338 : 557-562, 1989
 - 12) Ferrara N, Henzel WJ : Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 161 : 851-858, 1989
 - 13) Connolly DT : Vascular permeability factor : a unique regulator of blood vessel function. *J Cell Biochem* 47 : 210-223, 1991
 - 14) Claffey KP, Wilkison WO, Spiegelman BM : Vascular endothelial growth factor : regulation by cell differentiation and activated second messenger pathways. *J Biol Chem* 267 : 16317-16322, 1992
 - 15) Ferrara N, Houck K, Jakeman L, Leung DW : Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13 : 18-32, 1992
 - 16) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Conolly DT : Vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related PDGF. *Science* 246 : 1309-1312, 1989
 - 17) Plouet J, Schilling J, Gospodarowicz D : Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J* 8 : 3801-3806, 1989
 - 18) Connolly DT, Heuvelman DM, Nelson R, Olander JV, Eppley BL, Delfino JJ, Siegel NR, Leimgruber RM, Feder J : Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J Clin Invest* 84 : 1470-1478, 1989
 - 19) Tischer E, Gospodarowicz D, Mitchell R, Silva M, Schilling J, Lau K, Crisp T, Fiddes JC, Abraham JA : Vascular endothelial growth factor : a new member of the platelet-derived growth factor gene family. *Biochem Biophys Res Commun* 165 : 1198-1206, 1989
 - 20) Conn G, Bayne ML, Soderman DD, Kwok PW, Sullivan KA, Palisi TM, Hope DA, Thomas KA : Amino acid and cDNA sequences of a vascular endothelial cell mitogen that is homologous to platelet-derived growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87 : 2628-2632, 1990
 - 21) Tischer E, Mitchell R, Hartman T, Silva M, Gospodarowicz D, Fiddes JC, Abraham JA : The human gene for vascular endothelial growth factor : multiple protein forms are encoded through alternative exon splicing. *J Biol Chem* 266, 11947-11954, 1991
 - 22) Brown LF, Berse B, Tognazzi K, Manseau EJ, Van De Water L, Senger DR, Dvorak HF, Rosen S : Vascular permeability factor mRNA and protein expression in human kidney. *Kidney Int* 42 : 1457-1461, 1992
 - 23) Dvorak HF, Sioussat TM, Brown LF, Berse B, Nagy JA, Sotrel A, Manseau EJ, Van De Water L, Senger DR : Distribution of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) in tumors : concentration in tumor blood vessels. *J Exp Med* 174 : 1275-1278, 1991
 - 24) Plate KH, Breier G, Weich HA, Risau W : Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human glioma in vivo. *Nature* 359 : 845-848, 1992
 - 25) Morii K, Tanaka R, Washiyama K, Kumanishi T, Kuwano R : Expression of vascular endothelial growth factor in capillary hemangioblastoma. *Biochem Biophys Res Commun* 194 : 749-755, 1993
 - 26) Brown LF, Berse B, Jackman RW, Tognazzi K, Manseau EJ, Senger DR, Dvorak HF : Expression of

vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinoma of the gastrointestinal tract. *Cancer Res* 53: 4727-4735, 1993

- 27) 日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍委員会：整形外科・病理悪性骨腫瘍取扱い規約，第2版，pp 47-54，金原出版，東京，1990
- 28) Rock MG, Pritchard DJ, Unni KK: Metastases from histologically benign giant-cell tumor of bone. *J Bone Joint Surg [Am]* 66: 269-273, 1984
- 29) Enzinger FM, Weiss SW: *Soft tissue tumors*. 2nd ed, pp 252-262, Mosby, St. Louis, 1988

(7. 2. 1 受稿)
