

小児骨癌（骨肉腫・ユーイング肉腫を中心に）

の特性に関する基礎的研究

## 1. 目的

小児に好発する骨がんの代表である骨肉腫とユーイング肉腫については、これらの治療遠隔成績は今だに満足には程遠いものであるばかりか、病理学的にも解決すべき数々の問題を残している。これらの二つの腫瘍を中心に生物学的特性を解明することにより治療成績の向上に反映させることを目標とした。

骨肉腫にあつては、各組織亜型の診断基準の確定と生物学的意義について検討し、鑑別診断の重要性と鑑別要点を提示することと、骨肉腫における遺伝子レベルでの特徴を解明することを目的とした。

ユーイング肉腫については、その最初の記載以来 70 年後の現在に至ってもなお未確定の組織発生について、免疫組織化学的、染色体分析、遺伝子レベルでの解析によって、それを解明することを目的とした。さらに、信頼できる予後因子を明らかにすることによって、最初の治療方針をたてる上で参考となることも目的とした。

## 2. 組織

本事業は牛込新一郎、下田忠和、宮沢善夫ら（東京慈恵会医科大学病理学教室）、町並陸生、石田 剛、堀内 啓ら（東京大学医学部病理学教室）、野島孝之ら（北海道大学医学部病理学教室）、高木正之ら（聖マリアンナ医科大学病理学教室）、吉田春彦ら（鳥取大学医学部病理学教室）によるグループ研究によってなされたものである。

牛込新一郎が研究代表者として、町並陸生の協力のもとに研究の推進、結果の総括ならびに研究の報告を担当した。

## 3. 計画及び材料と方法

本研究事業の主旨と先に述べた研究目的にそつて、研究代表者の牛込新一郎がまず最初の事業の方針を各研究者に説明し、協力を求めた。

担当の研究者が施設毎にそれぞれの綿密な研究計画を示し、実行することを申し合わせた。研究対象としては、主に小児の悪性骨腫瘍（主として骨肉腫とユーイング肉腫）を選ぶことになった。

原則として年 2 回の研究発表会と連絡会を慈恵医大高木会館で開催し、活発な討論がなされた。

研究材料については、骨肉腫例、ユーイング肉腫例およびその他の骨腫瘍例（骨巨細胞腫、軟骨肉腫など）を各施設および関連施設からの新鮮組織片またはパラフィンブロックを収集し、これを用いた。ユーイング肉腫は稀な腫瘍なので、お互いの施設で連絡をとり、研究の対象となるように努力した。

研究方法については、各種の方法からなり、一般の病理組織学的検索のほか、パラフィン切片を用いた免疫組織化学的手法(ABC法、PAP法)、牛骨から採取、精製した osteonectin、その家兎を用いた免疫、抗体の作製、新鮮材料からの腫瘍細胞の細胞培養、染色体の分析、DNA の抽出などの方法が用いられた。細胞や核の大きさのモルフォメトリーもなされた、コンピューター処理がなされた。一部の例では DNA flow cytometry も行なわれた。

ユーイング肉腫例の培養細胞に関してははヌードマウスへの移植と株の樹立もなされた。

骨肉腫の異常 RB 遺伝子の検索は polymerase chain reaction-single strand conformation polymorphism 法によった。

#### 4. 成果

- 1) osteonectin 抗体は骨芽細胞により強く、反応を示し、BGP と共に骨肉腫細胞の有用なマーカーであることを示した。
- 2) 骨肉腫の関東地方と英国南西部との比較で最も大きな相違は、英国の 40 才以上の 52.6%はパジェット病を伴っていたが日本例では伴ったものが無かった。
- 3) 骨肉腫の RB 遺伝子の検索により、Exon 21 において 3 例に欠失、1 例に微小変異を認めた。
- 4) 骨肉腫例では、正常骨芽細胞に比べて、IGF-II 受容体の数の減少または IGF-I の受容体類似構造に変化していることが確認された。
- 5) 骨肉腫 17 例について、上皮性マーカーである EMA が 76%、KL-1 と CEA は一例にのみ陽性となった。
- 6) 骨肉腫においては IGF-11 の結合部位が著しく減少していた。
- 7) ALPase の mRNA は 3 例の骨肉腫全てに陽性であった。
- 8) 骨外性軟骨肉腫の染色体分析では、23 細胞のうち 22 細胞に t(9;22)(q22;q12)および 5q の構造異常を認めた。
- 9) ユーイング肉腫では従来から特徴とされる 11 番と 22 番染色体の相互転座を有しない症例のあることがわかった。

この相互転座は他の腫瘍、例えば軟部メラノーマでも見られ、EWS 遺伝子が部分欠失しており、種々の腫瘍で共通であることもわかり、肉腫の発癌機序の解明に重要なポイントとなり得ることを示した。

- 10) MKI は low (<200) は予後良好で、intermediate(200-400), high (>400) では不良であり、多変量解析からも PNET の信頼される予後因子であることを証明した(p<0.05)。他の予後因子と比べても絶対的な意義をもっていることが解った。
- 11) PNET は大部分が diploid であり、短期死亡例と長期生存例との間に差異を認めなかった。同じ neuroectodermal origin である通常型と神経芽腫と対比しても異なるパターンであり、臨床病理学的には区別されるべきであることを示した。
- 12) 骨巨細胞腫のエストロゲン受容体は免疫染色で陰性であったが、<sup>3</sup>H-標識エストロジェンを用いると特異的結合が見られ、低レベルの受容体陽性と解釈された。
- 13) 骨巨細胞腫の染色体分析により、telomeric fusion を認めた。多くの細胞の染色体に観察され、特に#21p に関与するものが多かった。一方、末梢血リンパ球ではこれが観察

されなかった。

- 14) 通常の骨巨細胞腫と aggressive GCT との間に明瞭な境界を認めず、区別できる客観的なパラメーターは得られなかった。
- 15) 骨巨細胞腫 40 例の PCNA は 10~30%程の陽性率を得たが、生物学的態度や予後との関係は得られなかった。
- 16) Ca-ATPase は上皮性格を有する腫瘍および軟骨肉腫が陽性となった。
- 17) 免疫組織化学的検索により、osteofibrous dysplasia がアダマンチノーマへと進展しうる可能性のあることを示した。

## 5. 考察

骨肉腫については組織学的にも臨床病理学的にも亜型のあることの意義と鑑別診断の重要性を示した。その裏づけとして骨芽細胞のマーカーとして BGP, osteonectin 抗体の利用、ALPase の mRNA の検索の意義の重要性が求められた。がん抑制遺伝子 (RB) の知られている両側性網膜芽細胞腫例で頻発する骨肉腫での RB 遺伝子の検索により、Exon 21 において 3 例に欠失、1 例に微小変異を認めたことは、各国の研究レベルと比較しても意義がある。異常 RB の存在は重要であるが、骨肉腫の発生への他因子の関与と、進展に関する遺伝子の解明が今後の課題である。

一方、提唱以来 70 有余年組織発生の不確定であった骨並びに軟部のユーイング肉腫が本研究事業によって、neuroectodermal origin であることを示し且つ確実なものであることを示したことは意義がある。他国の研究においてもその根拠の一つとみなされている t(11;12)が大変強調されているが、しかし、11 番と 22 番染色体の相互転座を有しない症例のあることもわかった。本腫瘍におけるこの転座の意義と腫瘍発生へのなお他因子の関与の可能性を示したことは大変意義があるものと判断出来る。

ユーイング肉腫を Primitive neuroectodermal tumor の範疇で捉えた場合、形態的な亜型分類を確立し、予後との関係を明らかにした。

さらに、本腫瘍の予後因子を探索し、MKI すなわち核分裂・核崩壊指数が単純にして信頼できる有用な因子となることを示したことは、治療方針を立てる上でも意義がある。DNA プロイディーパターンは現在のところ有用な因子となり得ないことを示した。

以上の二つの小児がんに加えて、臨床病理学的にも特異な腫瘍であり、且つ組織発生の確定していない骨巨細胞腫の生物学的性状並びに染色体異常に関しても、数々の興味ある新知見を得ることが出来た。アダマンチノーマの組織発生に関しても、ossifying fibroma との関係論ずるデータを提示できたことも本研究事業の成果である。

最後に、代表的な骨腫瘍である骨肉腫とユーイング肉腫の生物学的特性に関して基礎的研究が、車両財団の援助による本研究事業によってなされたことは誠に意義があり、研究者を代表して深謝する次第である。

## 6. 発表

1. 牛込新一郎、下田忠和、福永真治ほか：骨・軟部 Primitive neuroectodermal tumor (PNET)に関する検討—経過による組織像変化例を中心に—。日整会誌 64:S170, 1990
2. 牛込新一郎、下田忠和、二階堂孝ほか：悪性線維性組織球腫様骨肉腫および富巨細胞型骨肉腫の臨床病理学的検討。病理と臨床 9:326-331, 1991
3. Iemoto Y, Ushigome S, et al: Parosteal osteosarcoma arising from the right temporal bone (Case report 648). Skeletal Radiol 20:59-61, 1991
4. Iemoto Y, Ushigome S, Fukunaga M, et al: Central low-grade osteosarcoma with foci of dedifferentiation. Skeletal Radiol 20:379-382, 1991
5. 中森和仁、浅沼和生、ほか：BGP 前駆体を用いた BGP 合成細胞に関する研究。日整会誌 65(7):S1297, 1991
6. 牛込新一郎：骨・軟部腫瘍における酵素抗体法の意義と評価。日整会誌 65:1229-1237, 1991
7. 中森和仁、浅沼和生、牛込新一郎ほか：腸骨に発生した動脈瘤様骨嚢腫の solid variant (Sanerkin)の一切除例。臨床整形外科 27:1381-1384, 1992
8. 二階堂孝、高木敬三、牛込新一郎ほか：軟部悪性リンパ腫の臨床病理学的検討。病理と臨床 10(11):1291-1299, 1992
9. 牛込新一郎、千葉 諭：ユーイング肉腫とその鑑別—非ホジキンリンパ腫、骨髄腫などを含む—。町並陸生、牛込新一郎編著「腫瘍鑑別診断アトラス：骨」p139-147、文光堂（東京）、1992
10. Ushigome S, Shimoda T, Nikaido T, et al: Primitive neuroectodermal tumors of bone and soft tissue. With reference to the histologic differentiation in recurrent or metastatic foci. Acta Pathol Jpn 42:483-493, 1992
11. Ushigome S, Shimoda T, Nikaido T, Takasaki S Histopathologic diagnostic and histogenetical problems of malignant soft tissue tumors - Reassessment of malignant fibrous histiocytoma, epithelioid sarcoma, malignant rhabdoid tumor and neuroectodermal tumor. Acta Pathol Jpn 42:691-706, 1992
12. Shishikura A, Ushigome S, Shimoda T: Primitive neuroectodermal tumors of bone and soft tissue. Histologic subclassification and clinicopathologic correlation. Acta Pathol Jpn 43:176-186, 1993
13. Ushigome S, Nakamori K, Nikaido T, Takagi M: Histologic subclassification of osteosarcoma: Differential diagnostic problems and immunohistochemical aspects. G. B. Humphrey et al edited "Osteosarcoma in Adolescents and Young Adults: New Developments and Controversies" . p125-137 Kluwer Academic Publishers, Boston, 1993
14. Fukunaga M, Shimoda T, Nikaido T, Ushigome S, et al: Soft tissue vascular tumors. A flow cytometric DNA analysis. Cancer 71:2233-2241, 1993
15. 中森和仁、浅沼和生、牛込新一郎ほか：淡明細胞性軟骨肉腫の二例：免疫組織化学的および電顕的検索。病理と臨床 11:361-366, 1993

16. 牛込新一郎：骨・軟部腫瘍における脱分化の病理と臨床的意義について。日整会誌 67(5):501-510, 1993
17. 牛込新一郎：ユーイング肉腫および関連腫瘍の外科病理と最近の研究動向。日整会誌 67(6):1100, 1993
18. 中森和仁、室田景久、牛込新一郎、ほか：骨巨細胞腫の病理学的検討—組織学的に nodular pattern を呈した 8 例を中心に—。日整会誌 67:S1144, 1993
19. 牛込新一郎、ほか：骨・軟部の Primitive neuroectodermal tumor の予後因子に関する研究：MKI (mitosis-karyorrhexis index) と DNA ploidy pattern を中心に。投稿準備中
20. Fukunaga M, Moriya T, Miyazawa Y, Ushigome S, et al: Angiomatoid malignant fibrous histiocytoma. An immunohistochemical, ultrastructural, and flow cytometric study of two cases. Acta Pathol Jpn に投稿中
21. 牛込新一郎、中森和仁、原田 徹ほか：悪性骨巨細胞腫およびこれと関連する腫瘍の臨床病理学的研究。投稿準備中
22. 中森和仁：骨巨細胞腫の病理学的、免疫組織化学的、電顕的観察—stromal cell の diversity について—。慈恵医大誌に投稿中
23. 宍倉章浩、吉田光明、浅沼和生、池内達郎、牛込新一郎：大腿骨に発生した骨巨細胞腫の染色体分析：染色体末端融合と FISH 法によるテロメア配列の解析。第 52 回日本癌学会総会 平成 5 年 10 月 7 日（仙台市）、日本癌学会総会記事 p186.
24. 宍倉章浩、原田 徹、下田忠和、牛込新一郎：Primitive neuroectodermal tumor の予後因子に関する検討—MKI と DNA ploidy パターンを中心に—。小児がん研究会 平成 5 年 12 月 4 日に発表（筑波大学会館）
25. Kurioka S, Ishioka N, Sato J, Ushigome S, Nakamori K: Identification of non-collagenous bone proteins and purification of osteonectin, using two-dimensional gel electrophoresis and high performance liquid chromatography. Jikei Med J. 40:249-257, 1993
26. 羽野 寛、牛込新一郎、杉下雅美、原田 徹：頭頸部の神経外胚葉性腫瘍。病理と臨床 11:1415-1422, 1993
27. Fukunaga M, Moriya T, Miyazawa Y, Ushigome S, et al: Angiomatoid malignant fibrous histiocytoma. An immunohistochemical, ultrastructural, and flow cytometric study of two cases. 投稿中
28. Ishida T, Kikuchi F, Machinami R, et al: Histological grading and morphometric analysis of cartilaginous tumours. Virchows Arch (A) Pathol Anat 418:149-155, 1991
29. 町並陸生：骨腫瘍の悪性度。整形・災害外科 34:683-688, 1991
30. Machinami R: Small round cell tumors of bone. Virchows Arch (A) Pathol Anat 418:475-478, 1991
31. 町並陸生：定型および非定型骨肉腫の病理。病理と臨床 9:301-306, 1991
32. 堀内 啓、黒田雅彦、岡 輝明、土橋 洋、町並陸生：骨巨細胞腫に対するモノクローナル抗体の作製。日本病理学会誌 81(1):110, 1992

33. Ishida T, Kikuchi F, Oka T, et al: Juxtacortical adamantinoma of the humerus with a histologic appearance of Ewing's sarcoma: A case report. *Skeletal Radiol* 21(3):205-209, 1992
34. 町並陸生、石田 剛、菊地文史、北川知行、谷田健郎: 骨アダマンチノーマの病理、特に骨線維性異形成との関連に注目して。 *病理と臨床* 10:1374-1384, 1992
35. Ishida T, Machinami R, et al: Malignant fibrous histiocytoma and osteosarcoma in association with fibrous dysplasia of bone. Report of three cases. *Path Res Pract* 印刷中、1993
36. Machinami R, Wickremaratchi T: Difference between osteosarcoma in southwest England and the Kanto area in relation to age, sex, and localization. In G. B. Humphrey et al edited "Osteosarcoma in Adolescents and Young Adults: New Developments and Controversies" p32-38, Kluwer Academic Publishers, Boston, 1993
37. Ishida T, Oda H, Oka T, Imamura T, Machinami R: Parachordoma: Anultrastructural and immunohistochemical study. *Virchows Arch (A)* 422:239-245, 1993
38. 木田直俊、岡 輝明、黒田雅彦、石田 剛、町並陸生: 骨腫瘍における上皮性マーカーの発現について。 *日整会誌* 67:S961, 1993
39. 黒田雅彦、堀内 啓、岡 輝明、町並陸生ほか: 骨軟部腫瘍における小胞体 Ca-ATPase の発現について。 *日整会誌* 67:S962, 1993
40. 亀田典章、蛭田啓之、町並陸生、ほか: Aggressive GCT の臨床病理学的検討。 *日整会誌* 67:S1104, 1993
41. 野島孝之: 小細胞性骨肉腫の病理と鑑別診断。 *病理と臨床* 9:321-325, 1991
42. Nojima T, Abe S, Furita Y, et al: Morphological and cytogenetic characterization and N-myc oncogene analysis of a newly established neuroblastoma cell line. *Acta Pathol Jpn* 41:507-515, 1991
43. Nojima T, Yamaguchi H, Nagashima K et al: Osteosarcoma resembling osteoblastoma and its heterotransplantation into nude mice. *Acta Pathol Jpn* 42:75-81, 1992
44. 野島孝之、井上和秋、山城勝重ほか: 右大腿骨腫瘍。 *日整会誌* 66(6):S949, 1992
45. 石部基実、武田直樹、野島孝之ほか: 正常組織由来骨芽細胞と骨肉腫由来骨芽細胞様細胞における type 2 insulin-like growth factor 受容体の相違。 *日整会誌* 66(6):S1051, 1992
46. Nojima T, Takeda N, Matsuno T, Inoue K, Nagashima K: Benign metastasizing giant cell tumor of bone. *Skeletal Radiology* に投稿中。
47. 九津見圭司、山脇慎也、姥山雄二、野島孝之ほか: 患肢に巨大腫瘤を形成し、骨肉腫と鑑別を要した骨形成不全症の1例。 *臨床整形外科* へ投稿準備中
48. 野島孝之、後藤田裕子、井上和秋、ほか: 仙骨部腫瘍。 *日整会誌* 67:1069-1070, 1993
49. 中島久弥、磯見 卓、諸見里浩、高木正之ほか: 大腿骨骨幹部に発生した骨膜性骨肉腫の一例。 *関東整形災害外科学会誌* 23:508-511, 1992
50. 高桑俊文: Askin 腫瘍とその組織発生。 *小児外科* 24(2):211-215, 1992
51. 中島久弥、磯見 卓、諸見里 浩、高木正之: 骨・軟部腫瘍および非腫瘍性疾患における P-MRS の検討。 *日本整形外科学会誌* に投稿中。

52. Ooe K, Takagi M, Imamura K, et al: P-31 MR spectroscopy for monitoring skeletal tumor response therapy. Radiology に投稿中
53. 磯見 卓 : 1 本鎖高次構造多型性 (SSCP) を用いた骨肉腫における異常網膜芽細胞腫遺伝子の検索。日本整形外科学会誌 67:1026-1032, 1993
54. 高梨吾郎、別府諸兄、高木正之、ほか : Bizarre parosteal osteochondromatous proliferation の 2 例。日本整形外科学会誌 67:S1145, 1993
55. 諸見里 浩、高木正之、ほか : 骨巨細胞腫の古典的 Grading における免疫組織化学的検討。日本整形外科学会誌 67:S1145, 1993
56. Isomi T, Nakajima H, Takagi M, Takakuwa T, et al: The comparison of type 2 mutation of RB gene in human osteosarcoma. Simplified detection by PCR-SSCP method. SIROT 93 SEOUL.
57. Yoshida H, Yumoto T, Minamizaki T: Osteosarcoma with features mimicking malignant fibrous histiocyoma. Virchows Arch (A), 421:229-238, 1992
58. 西 孝之、吉田春彦、井藤久雄、山本吉蔵 : 線維肉腫を伴った隆起性皮膚線維肉腫の一例。臨床整形外科 28:959-961, 1993
59. 吉田春彦 : 脱分化を伴う軟部肉腫。牛込新一郎、町並陸生編著「腫瘍鑑別診断アトラス、軟部腫瘍」p165-169、文光堂 (東京)、1993
60. Adachi H, Yoshida H: Osteosarcoma subtypes and cell heterogeneity: Immunohistochemical analysis of three transplantable osteosarcomas. Yonago Acta Med に投稿中。
61. 西 孝之、吉田春彦、足立裕宣、井藤久雄 : 再発にて軟骨肉腫像を呈した悪性線維性組織球腫の一例。第 26 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会。日整会誌 67:S985, 1993
62. 吉田春彦、足立裕宣ほか : 胸椎に発生した骨巨細胞腫。病理と臨床に投稿中。