

血管肉腫における高発現遺伝子の探索と
その機能解析に関する研究

よねくら ゆいこ
米倉 由子

(病理学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目 次

第一章 緒言	1 頁
第二章 遺伝子発現プロファイル解析	
第 1 節 背景と目的	3 頁
第 2 節 材料と方法	3 頁
第 3 節 結果	4 頁
第三章 血管肉腫細胞株および組織における osteopontin (OPN) および scinderin (SCIN) の機能・発現解析	
第 1 節 背景と目的	6 頁
第 2 節 材料と方法	6 頁
第 3 節 結果	16 頁
(1) 血管肉腫細胞株および組織における osteopontin (OPN) の機能・発現解析	16 頁
(2) 血管肉腫細胞株および組織における scinderin (SCIN) の機能・発現解析	19 頁
第四章 考察	23 頁
(1) 遺伝子発現プロファイル解析	23 頁
(2) 血管肉腫細胞株および組織における osteopontin (OPN) の機能・発現解析	24 頁
(3) 血管肉腫細胞株および組織における scinderin (SCIN) の機能・発現解析	27 頁
(4) 研究の限界	30 頁
第五章 結論	31 頁

謝辞	32 頁
略語一覧	33 頁
引用文献	35 頁
図表	43 頁

第一章 緒言

血管肉腫は高齢者に好発（平均 74.48 歳）する非常に悪性度の高い間葉系腫瘍で、血管肉腫の本邦での年間発症数は 100 万人に 2～3 人と報告されているが、近年増加傾向にあり、きたる高齢化社会において問題となる可能性がある^{1, 2)}。また、治療の第一選択であるパクリタキセルによる抗がん剤治療は、特に患者が高齢者の場合、副作用により用いることができないケースも多い。予後は不良であり、5 年生存率は 26～51%とされる。部位別発症割合は皮膚（頭頸部が最多）が 49.6%と最も多く、次いで乳房実質 14.4%、軟部組織 11.2%、心臓 6.7%、骨 4.1%、それ以外が 14%となっている³⁾。また、血管肉腫は血行性転移しやすく、最も肺に転移しやすい。さらに血管肉腫に遠隔転移を生じた場合の予後は極めて悪く、その平均生存期間は 6～8 カ月程度と短い。

現在の診療上の課題として、初期病変や高分化型血管肉腫の場合は診断に苦慮することが多いことや、その病態が殆ど解明されていないこと、有効な治療薬が少なくその効果も限られていることなどが挙げられる。

近年、血管肉腫の原因遺伝子の研究で融合遺伝子 *NUP160-SLC43A3* の存在が報告されており、陽性の場合には進行が速いと考えられている⁴⁾。その他にみつかっている遺伝子変異として、*TP53*⁵⁾、*KDR*⁶⁾、*PTPRB* および *PLCG1* 遺伝子の変異⁷⁾、*c-MYC*⁸⁾ 遺伝子の増幅の報告がある。*KDR*、*PTPRB*、*PLCG1* 変異は機能獲得型の変異であり、これらの遺伝子を small interfering RNA (siRNA) でノックダウンすることで、腫瘍の増殖が抑制されることが示されており、治療の一助

となることが期待されている。

本研究では、ヒト由来の唯一の血管肉腫細胞株 (ISO-HAS-B⁹⁾：東北大学加齢医学研究所) を対象に用いて、血管肉腫細胞における遺伝子発現プロファイルの解析を行い、発現が亢進している遺伝子を検索した。それらの発現亢進遺伝子の中から osteopontin (OPN) と scinderin (SCIN) に注目し、同細胞株に対する主として siRNA の導入実験によって、これらの遺伝子の機能解析を実施した。さらに、これらの 2 遺伝子につき、過去の手術、生検で得られた血管肉腫組織におけるタンパク質レベルの発現変化を免疫組織化学染色法で確認し、臨床的意義についても検討した。

第二章 遺伝子発現プロファイル解析

第1節 背景及び目的

ISO-HAS-B 細胞は 84 歳男性の頭部血管肉腫から樹立されたほぼ唯一の血管肉腫細胞株である⁹⁾。本株において発現亢進している遺伝子は血管肉腫の増殖、浸潤に関わっている可能性が高いと考えられる。そこで、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイルの解析により ISO-HAS-B 細胞で発現亢進している遺伝子をスクリーニングし、検討対象の遺伝子を絞り込むこととした。対照の細胞としてヒト皮膚微小血管内皮細胞 (human dermal microvascular endothelial cells, HDMEC) を用いた。

第2節 材料と方法

(1) 細胞株

① 血管肉腫細胞株

ISO-HAS-B 細胞 (東北大学加齢医学研究所附属医用細胞資源センター研究室より供与) を 10%ウシ胎児血清(FBS, fetal bovine serum)および抗生剤(100 IU/ ml penicillin, 100 µg/ml streptomycin)を添加した Dulbecco's modified Eagle medium (DMEMTM) (Gibco; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 培地上で、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

② 成人血管内皮細胞株

対照として HDMEC 細胞 (PromoCell, Heidelberg, Germany) を用い、10% FBS、Penicillin - Streptomycin (Gibco; Thermo Fisher Scientific) を添加した内皮細胞増殖培地 (MV2) (PromoCell) 上で、37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

(2) 方法

① 遺伝子発現プロファイル解析

ISO-HAS-B細胞と HDMEC 細胞から NucleoSpin®RNA (MACHEREY-NAGEL, Düren, Germany) を用いて total ribonucleic acid (total RNA) を抽出した。Total RNA のクオリティは Agilent 2100 バイオアナライザ (Agilent, Santa Clara, CA, USA) で確認し、RNA Integrity Number (RIN) 値が ISO-HAS-B 10.0、HDMEC 9.3 と良好であること確認した。これらの total RNA サンプルをタカラバイオ株式会社に送付し、Agilent SureScan Microarray Scanner (G2600D) (Agilent) を用いた遺伝子発現プロファイルの解析を依頼した。

第3節 結果

解析結果から、HDMEC に比較して ISO-HAS-B 細胞で 350 倍以上の発現亢進を示した上位 100 遺伝子をリストアップした (表 1)。100 遺伝子の中から、同一ファミリーに属する遺伝子が少なく、コードされるタンパク質の発現が癌で報告されている osteopontin (OPN) (gene symbol は SPP1) と scinderin (gene symbol は SCIN, 本稿では SCIN を用いた) に注目した (表 1)。図

1a の凡例はシグナル強度を \log_2 変換して、中央値 3.371 を黒色とした場合に、中央値より高くなると赤色で発現亢進、中央値より低くなると緑色で発現低下を表す。ISO-HAS-B で高発現していた上位 50 遺伝子のヒートマップを示す (図 1b)。

これらの遺伝子の中で HDMEC の OPN シグナル強度に対する ISO-HAS-B における OPN シグナル強度の比率は 1858 倍、および HDMEC の SCIN シグナル強度に対する ISO-HAS-B における SCIN シグナル強度の比率は 2286 倍を示した (図 1c, 1d)。

第三章 血管肉腫細胞株および組織における osteopontin (OPN) および scinderin (SCIN) の機能・発現解析

第1節 背景及び目的

第二章で、ISO-HAS-B にて遺伝子発現プロファイル解析により OPN と SCIN の発現が亢進していることが見出された。

本章では、血管肉腫細胞株を用いて、mRNA とタンパク質レベルでの OPN と SCIN の発現を確認するとともに、siRNA 法により OPN と SCIN 各々の発現抑制を行い、血管肉腫細胞株における OPN と SCIN の機能解析を行った。さらに、手術検体の OPN、SCIN の発現を免疫組織化学染色法で確認し、生命予後との相関を検討した。

第2節 材料と方法

(1) 細胞株

血管肉腫細胞株 (ISO-HAS-B) 第二章、第2節 (1) 細胞株と同様

(2) 方法

① OPN と SCIN messenger ribonucleic acid (mRNA) の発現解析 (real-time PCR 法)

ISOGEN™ (Nippon gene, Toyama, Japan) のマニュアルに基づいて、ISO-HAS-B と HDMEC から total RNA を抽出し、500 ng に調製して、Prime Script RT-reagent Kit™ (Takara Bio, Otsu, Japan) で逆転写反応を行った。Primer Express Software v3.0

(Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を使用して、各 complementary DNA (cDNA) について real-time polymerase chain reaction (PCR) プライマー配列を設計した。

Real-time PCR に用いたプライマーと反応条件は下記の通りである。

OPN : (forward primer) 5' - GTTGTGATTATCTTTTTGTGGTGTGAATA - 3'

(reverse primer) 5' - CCGTGGGAAAACAAATAAGCA - 3'

SCIN : (forward primer) 5' - ATGCCTTGGAAGTTATTATTCTCTTTTCT - 3'

(reverse primer) 5' - GCCACCTTAACATAAACCTTATTGC - 3'

β -actin : (forward primer) 5' - CCACCCCACTTCTCTCTAAGGA - 3'

(reverse primer) 5' - ACCTCCCCTGTGTGGACTTG - 3'

PCR プロトコル :

(初期変性) 95°C、10 分

(アニーリング・伸長) 95°C、15 秒 → 60°C、1 分 (40 サイクル)

Real time PCR 反応および測定は、Power SYBR® Green Master Mix (Applied Biosystems) および Applied Biosystems StepOnePlus™ Real - Time PCR System を使用して行った。20 倍希釈した逆転写反応液 (cDNA) 2 μ l、Power SYBR® Green PCR Master Mix (2X) 5 μ l、10 μ M フォワードプライマー0.5 μ l と 10 μ M リバースプライマー 0.5 μ l、水を加えて 10 μ l とした。

PCR 反応終了後、融解曲線分析にて増幅産物の特異性を確認した。mRNA の相対的発現量の評価は内因性標準遺伝子である β -actin により発現を補正し、検量線法にて行った。

② OPN と SCIN タンパク質の発現解析 (Western blot 法)

ISO-HAS-B と HDMEC は細胞培養用ディッシュに生着した状態で phosphate buffered saline (PBS) にて洗浄した後に、細胞溶解バッファー (10 mM Tris-HCl [pH 7.4]、1% sodium dodecyl sulfate [SDS], 1 mM Na_3VO_4) を用いて回収した細胞を 98°C で 5 分間処理して、総タンパク質を抽出した。抽出物は超音波破碎 (Bioruptor, BM Equipment, Tokyo, Japan) 後、13,000 g、15 分間遠心し、上清をタンパク質検体とした。得られたタンパク質検体の濃度は、Pierce™ BCA protein assay kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて定量した後、サンプルが 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ になるように上清を 6×Laemmli サンプルバッファー (62.5 mM Tris-HCl [pH6.8], 50 mM dithiothreitol [DTT], 2% SDS, 10% glycerol, 0.01% bromophenolblue [BPB]) に添加し、98°C に設定したブロックインキュベータ (wsc-2620 PowerBLOCK; Atto Corporation, Tokyo, Japan) を用いて 5 分間の加熱処理を行った。4~15% Mini-PROTEAN TGX Precast Gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) を用いた SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) によりタンパク質を分離した (200 V, 40 分間)。電気泳動後、メンブレンに転写し、5% スキムミルク / Tris buffered saline with tween 20 (TBS-T) 溶液で浸透後に一次抗体を 4°C で一晩反応させた。一次抗体は以下の希釈率で用いた : Goat anti-human OPN antibody (1:500, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)、mouse monoclonal anti-

SCIN antibody (1:100, Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA, USA)、rabbit anti- β -actin (13E5) antibody (HRP Conjugate) (1:1000, Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)。一次抗体の希釈は TBS-T 溶液を用いた。

一次抗体反応後、メンブレンを TBS-T 溶液で洗浄し、標識二次抗体を室温で 1 時間反応させた。二次抗体は OPN に対しては donkey anti-goat IgG (HRP Conjugate) (Santa Cruz Biotechnology)、SCIN に対しては、goat anti-mouse IgG, HRP-linked Antibody (1:1000, Cell Signaling Technology) を使用した。上記抗体反応後に TBS-T 溶液で洗浄し、Clarity western ECL substrate (Bio-Rad) を用いた化学発光法で標的蛋白質のバンドを検出した。バンドの検出および撮影には、LAS3000 (Fujifilm, Tokyo, Japan) で撮影した。

③ Enzyme-Linked Immuno Sorbent Assay (ELISA 法)

OPN が分泌型タンパク質であるため ELISA 法による測定を行った。Osteopontin immunoassay (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を用い、キットマニュアルに基づいて測定した。

④ siRNA 法による OPN と SCIN の発現抑制解析

ISO-HAS-B 細胞は、siRNA を導入する 24 時間前に 12 ウェルプレートに 4×10^4 個/well 撒いて培養した。siRNA 導入は 50 % コンフルエントになった状態で Lipofectamine®RNAiMAX 試薬 (Thermo Fisher Scientific) を使用して、マニュアルに基づいて行った。OPN siRNA は Silencer® Select (s13375, Thermo Fisher Scientific)

を、SCIN siRNA は Silencer® Select (s40065, Thermo Fisher Scientific) を、コントロール (control ; ctrl) siRNA は negative control (Thermo Fisher Scientific) を使用した。

48 時間後に mRNA とタンパク質および細胞培養上清を回収した。

Ctrl と OPN の発現量は、上述の real-time PCR 法と Western blot 法、ELISA 法で解析した。Ctrl と SCIN の発現量は real-time PCR 法と Western blot 法で解析した。

⑤ Cell Counting Kit-8 (CCK8)を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN と SCIN siRNA 導入による細胞増殖能変化の解析

96well プレートに ISO-HAS-B を 5×10^3 個/well で播種し、24 時間後に ctrl と OPN の siRNA、もしくは ctrl と SCIN の siRNA を各々 20 nM でトランスフェクションした。トランスフェクション後 0, 24, 48, 72 時間毎に CCK-8 溶液 (Dojindo Molecular Technologies, Kumamoto, Japan) を各 well に 10 μ l ずつ加え 37°C、5%CO₂ で 2 時間呈色反応を行った。iMark マイクロプレートリーダー (Bio-Rad Laboratories) を用いて 450 nm の波長で吸光度を測定することで生細胞数を計測して、増殖能を解析した。

⑥ 細胞周期マーカーの免疫細胞染色を用いた ISO-HAS-B 細胞に対する SCIN siRNA 導入による S 期および G2/M 期細胞割合の変化の検討

12 well プレートに ISO-HAS-B 細胞を 4×10^4 個/well で播種し、24 時間後に 50%コンフルエントになった状態で、ctrl と SCIN の siRNA を 20 nM で導入した。48 時間後にチミジン類似体の 5-ethynil-2'-deoxyuridine (EdU) を 2 時間取り込ませた後、培養液を除去し PBS で 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定した。その後、PBS

で2回洗浄し、0.5% Triton-X100 in PBS (-) で5分間膜透過処理を行い、PBSで2回洗浄し、Click-iT® EdU Imaging Kits (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific) のキットマニュアルに基づいてS期の細胞検出を行った。そのS期の細胞検出後にG2/M期の細胞はphospho-histone H3 (pHH3) 抗体を用いて(1:500, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) 4℃で一晩反応させた。一次抗体反応後、PBSで5分間の洗浄を3回行い、二次抗体をPBSで希釈し、室温で1時間反応させた。二次抗体はgoat anti-rabbit IgG Alexa 555 (1:1000, Thermo Fisher Scientific) を使用した。二次抗体反応後、PBSで5分間の洗浄を3回行い、細胞核を染色するためDAPIで染色した。EdUとpHH3陽性の細胞を蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence, Osaka) で各々カウントし、ctrl siRNA 導入群と SCIN siRNA 導入群との差を比較した。

⑦ **TUNEL 法を用いた ISO-HAS-B 細胞株に対する SCIN siRNA 導入によるアポトーシス細胞割合の変化の解析**

12 well プレートに ISO-HAS-B 細胞を 4×10^4 個/well で播種し、24 時間後に 50%コンフルエントになった状態で、ctrl と SCIN の siRNA を 20 nM で導入した。48 時間後、In situ Apoptosis Detection Kit (Takara Bio) のキットマニュアルに基づいて、後期のアポトーシス細胞を検出し、蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence) でカウントし、ctrl siRNA 導入群と SCIN siRNA 導入群との差を比較した。

⑧ **Scratch assay** を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による細胞遊走能の変化の解析

12 well プレートに、ISO-HAS-B を 5×10^4 個/well で播種し、24 時間後に 50%コンフルエントになった状態で、ctrl と OPN の siRNA、あるいは ctrl と SCIN の siRNA を各々 20 nM で導入した。さらに、24 時間後に 100%コンフルエントになった状態でマイクロチップ (p200, イエローチップ) 先端で線状に剥離し、培地を 1%FBS の DMEM に変更した。0, 24, 48 時間後に明視野 (BZ-X710, Keyence) で撮影を行い、任意の 10 ヶ所における 0 時間後と 48 時間後の移動距離の差を計測し、平均値を求めて、ctrl siRNA 導入群と OPN siRNA 導入群との間、もしくは ctrl siRNA 導入群と SCIN siRNA 導入群との間で遊走能を比較した。

⑨ **Transwell** を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN と SCIN siRNA 導入による細胞遊走/浸潤能の変化の解析

Migration assay はマトリゲル未処理のトランズウェル (Corning, NY, USA) を invasion assay は 200 mg/ml のマトリゲル (Corning) でコートしたトランズウェルを用いた。下の well には化学誘引物質としての 10%FBS を含んだ DMEM 培地を加えて、チャンバー内には無血清培地と 48 時間 ctrl と OPN の siRNA でトランスフェクションした細胞もしくは ctrl と SCIN の siRNA をトランスフェクションした細胞各々 3×10^4 個/well を添加した。プレートを、37°C、5%CO₂ の条件下、24 時間で培養し、非浸潤細胞を綿棒で除去し、浸潤細胞を 100%メタノールで 10 分間固定し、4',6-diamidino-2-

phenylindole (DAPI) で染色した。その後に浸潤細胞数を蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence) で測定した。

⑩ Phalloidin 染色を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN と SCIN siRNA 導入による F-actin 発現および細胞形態変化の検出

12 well プレートに ISO-HAS-B 細胞を 4×10^4 個/well で播種し、24 時間後に 50%コンフルエントになった状態で、ctrl と OPN の siRNA もしくは ctrl と SCIN の siRNA を各々 20 nM で導入した。48 時間後に細胞をトリプシン処理し、ファイブロネクチンでコーティングしたスライドガラスに播種し直した。24 時間のインキュベート後、培養液を除去し PBS で 2 回洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで 20 分間固定した。その後、PBS で 2 回洗浄し、0.5% Triton-X100 in PBS (-) で 5 分間膜透過処理を行い、PBS で 2 回洗浄し、rhodamine phalloidin (1:40, invitrogen; Thermo Fisher Scientific) を室温で 40 分間反応させ、PBS で洗浄した。細胞形態の変化の観察には蛍光顕微鏡 (BZ-X700, Keyence) を使用した。

⑪ 切除検体の免疫組織化学法

1997～2019 年に当院で手術された血管肉腫 20 例 (表 2) と良性血管性病変 20 例 (単純性血管腫 5 例、類上皮血管腫 5 例、化膿性肉芽腫 10 例) を対象とした。

採取された組織を 10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィンに包埋し、4 μ m の厚さに切片化した。Hematoxylin-eosin 染色と免疫組織化学染色を施行した。免疫組織化学染色に用いた OPN の一次抗体は mouse monoclonal anti-OPN antibody (AKm2A1)

(1:200, Santa Cruz Biotechnology)、SCIN の一次抗体は mouse monoclonal anti-SCIN antibody (1:50, Santa Cruz Biotechnology) を使用した。各切片を脱パラフィン、再水和後、10 mM クエン酸ナトリウム (pH 6.0) 中、121°Cオートクレーブで 10 分間の賦活化を行った。賦活化後、30 分間のクールダウンをおき、0.3%過酸化水素処理を 5 分、その後スキムミルク溶液 (ブロッッキングエース) (KAC, Kyoto, Japan) にて 10 分間、内因性ペルオキシダーゼ、非特異的反応のブロッッキングを行った。PBS で洗浄ののち、一次抗体と反応させ湿潤箱中、4°Cで一晩インキュベートを行った。その後、スライド上で二次抗体 (REAL Envision) (DAKO/Agilent) との反応を室温で 60 分行い、PBS で洗浄後、DAB 溶液 (3,3'-diaminobenzidine + Tris tablet) (Muto Pure Chemicals, Tokyo, Japan) で発色させた。水洗後、hematoxylin で対比染色を施行し、洗浄、脱水、封入を行った。

OPN、SCIN 各々の発現強度は免疫染色の染色強度と面積割合によって 4 段階スコア (0, 1+, 2+, 3+) に分類した。判定基準を以下に示す。

0：検体組織中の腫瘍細胞の中で OPN もしくは SCIN 陽性を呈している細胞がないか、または 10%に満たないもの

1+：検体組織中の腫瘍細胞の中で OPN もしくは SCIN 陽性を呈している細胞が 10%以上 50%未満あるが、腫瘍細胞の細胞質に弱い染色強度を有するもの

2+：検体組織中の腫瘍細胞の中で OPN もしくは SCIN 陽性を呈している細胞が 50%以上あり、腫瘍細胞の細胞質に弱い染色強度を有するもの、あるいは検体組織中の腫瘍

細胞の中で OPN もしくは SCIN 陽性を呈している細胞が 10%以上 50%未満あるが、
腫瘍細胞の細胞質に中等度の染色強度を有するもの

3+：検体組織中の腫瘍細胞の中で OPN もしくは SCIN 陽性を呈している細胞が 50%
以上あり、腫瘍細胞の細胞質に中等度の染色強度を有するもの、あるいは検体組織中の
腫瘍細胞の中で OPN もしくは SCIN 陽性を呈している細胞が 10%以上あるが、腫瘍細胞
の細胞質に強い染色強度を有するもの

0 と 1+を陰性、2+と 3+を陽性とした。

⑫ 分子の発現強度と転移の有無との関連

OPN と SCIN の発現強度の陰性、陽性例における受診時転移の有無の関連を調べる
ために、Fisher の正確確率検定を用いて統計解析した。

⑬ 生存時間解析

血管肉腫の OPN もしくは SCIN 発現強度に応じた全生存曲線を、Kaplan-Meier 法
を用いて抽出し、log rank 法で統計解析した。

⑭ 倫理

免疫組織化学的解析研究は、ヘルシンキ宣言及び「人を対象とする医学的研究に関する倫理方針」を遵守して実施され、防衛医科大学校倫理委員会（No.4005）によりレトロスペクティブ研究として承認された。

⑮ 統計学的解析

実験はいずれも3回実施し、得られたデータは JMP® Pro 14.0 (SAS Institute Inc, Cary, NC) を用いて解析した。平均値で求められる数値には標準誤差を付記し、2群間の比較には Welch の t 検定もしくは Mann-Whitney の U 検定、⑪のクロス集計表と⑫には Fisher の正確確率検定を用いた。いずれの検定においても P 値は両側検定を用いて 0.05 未満を統計学的に有意と判定した。

第3節 結果

(1) 血管肉腫細胞株および組織における osteopontin (OPN) の機能・発現解析

① OPN mRNA とタンパク質の発現解析

Real-time PCR 法では、ISO-HAS-B の mRNA 発現量は HDMEC と比較して 394 倍であった ($P = 0.0002$) (図 2a)。Western blot 法では、ISO-HAS-B のタンパク質量は HDMEC より 3.7 倍高く ($P=0.0161$) (図 2b, 2c)、ISO-HAS-B は HDMEC よりも高レベルの OPN の mRNA とタンパク質を発現していた。

② siRNA 導入による OPN の発現抑制の確認

ISO-HAS-B に ctrl と OPN の siRNA を導入したところ、real-time PCR では、対照群と比べ導入群にて OPN mRNA の発現量が 97%抑制された ($P = 0.00042$) (図 3a)。Western blot 法では、OPN siRNA 導入群は対照群に比べて OPN の発現が 28%低下した ($P = 0.0226$) (図 3b, 3c)。ELISA 法では、OPN の分泌型タンパクの発現は、OPN

siRNA 導入群は対照群に比べて 68%抑制された ($P = 0.0001$) (図 3d)。今回使用する siRNA の配列が mRNA とタンパク質の双方のレベルにおいて OPN の発現抑制を示すことが確認された。

③ Cell Counting Kit-8 (CCK8)を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による細胞増殖能変化の解析

Cell Counting Kit-8 (CCK8) を用いた細胞増殖能解析では、OPN siRNA 導入群における ISO-HAS-B の増殖能に有意な変化は認めなかった (0 時間後の吸光度を比較対象とした統計学的な P 値は、24 時間後 $P = 0.0907$, 48 時間後 $P = 0.962$, 72 時間後 $P = 0.0717$) (図 4)。

④ Scratch assay を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による細胞遊走能の変化の解析

遊走能解析では、OPN siRNA 導入群は、ctrl siRNA 導入群に比べて scratch 後 48 時間での遊走距離が 5.4 倍大きく、細胞の遊走能が促進することがわかった ($P = 0.0002$) (図 5a, 5b)。

⑤ Transwell を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による細胞遊走/浸潤能の変化の解析

Migration assay (図 6a) では、下方の well に遊走した細胞は ctrl siRNA 導入群で平均 87 個に対して、OPN siRNA 導入群では平均 2020 個と有意に多かった ($P < 0.0001$)。

Invasion assay (図 6b)では、下の well に浸潤した細胞は ctrl siRNA 導入群で平均 626

個に対して、OPN siRNA 導入群では平均 1880 個と有意に多かった ($P = 0.00012$)。

OPN siRNA 導入群で細胞遊走能と浸潤能が亢進していた。

⑥ Phalloidin 染色を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による F-actin 発現 および細胞形態変化の検出

Ctrl、OPN siRNA 導入群で filamentous actin (F-actin) の rhodamine phalloidin 染色を行った。OPN siRNA 導入群で F-actin の発現が亢進し、仮足形成 (糸状、葉状) を伴う形態変化を認めた (対物 60 倍) (図 7)。

⑦ 切除検体の免疫組織化学法

血管肉腫と良性の血管性病変の切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックを 20 例ずつ使用し、OPN の免疫組織化学染色を行った (図 8)。血管肉腫 20 例の内訳は、年齢が 74 ± 13 歳で 17 例 (85%) が 65 歳以上、男 : 女 = 13 : 7 であった。また、8 例 (40%) が腫瘍径 5cm 以上、11 例 (55%) が受診時の遠隔転移陽性で肺への転移が最も多かった (表 2)。

OPN 発現陽性率は血管肉腫で 75% (15/20 例)、良性の血管性病変で 0% (0/20 例) であり、血管肉腫の方が有意に高い OPN 陽性率であった ($P < 0.001$) (表 3)。

⑧ OPN 発現強度と転移の有無との関連

血管肉腫 20 例中、受診時の転移は 11 例でみられ、9 例でみられなかった。OPN 発現は転移陽性例 8 例 (72%)、転移陰性例 7 例 (8%) で陽性であった。OPN 発現強度と受診時転移の有無との間に関連性は見られなかった ($P = 1.0$)。

⑨ 生存期間解析

血管肉腫患者 20 名を対象に OPN 発現強度別に Kaplan-Meier 法を用いて、全生存曲線を作成した。患者全体の生存期間の中央値は 10 カ月、5 年生存率は 5%であった。

OPN 発現強度と生存率には有意な関連は認めなかった (図 9)。

(2) 血管肉腫細胞株および組織における scinderin (SCIN) の機能・発現解析

① SCIN mRNA とタンパク質の発現解析

Real-time PCR 法では、ISO-HAS-B の mRNA 発現量は HDMEC と比較して 514 倍であった ($P = 0.0334$) (図 10a)。Western blot 法では、ISO-HAS-B のタンパク質は HDMEC より 13 倍高く ($P < 0.05$) (図 10b, 10c)、ISO-HAS-B は HDMEC よりも SCIN の mRNA とタンパク質を高レベルで発現していた。

② siRNA 導入による SCIN の発現抑制の確認

ISO-HAS-B に ctrl と SCIN の siRNA を導入したところ、real-time PCR では、SCIN siRNA 導入群は ctrl 群に比べて mRNA の発現量が 82%抑制された ($P = 0.004$) (図 11a)。Western blot 法では、SCIN siRNA 導入群にて SCIN の発現が 28%低下した ($P = 0.0159$) (図 11b)。今回使用する siRNA の配列が mRNA とタンパク質の双方のレベルにおいて SCIN の発現抑制を示すことが確認された。

③ **Cell Counting Kit-8 (CCK8)を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による細胞増殖能変化の解析**

ISO-HAS-B における CCK8 を用いた細胞増殖能解析では、SCIN siRNA 導入群の方が ctrl siRNA 導入群に比べて、48、72 時間後において吸光度が有意に低く、細胞増殖能が低下していた (0 時間後の吸光度を比較対象とした統計学的な P 値は、24 時間後 $P=0.16$, 48 時間後 $P=0.0016$, 72 時間後 $P=0.0048$) (図 12)。SCIN siRNA 導入により細胞増殖能の抑制を認めたため、細胞周期マーカーを用いた免疫細胞染色とアポトーシス解析を更に検討した。

④ **細胞周期マーカーの免疫細胞染色を用いた ISO-HAS-B 細胞に対する SCIN siRNA 導入による S 期および G2/M 期細胞割合の変化の検討**

ISO-HAS-B における細胞周期マーカーを用いた免疫細胞染色では、2 時間の EdU 処理により S 期に進行した細胞の割合は ctrl siRNA 導入群より SCIN siRNA 導入群の方が 15%低く ($P=0.0418$) (図 13a)、pHH3 染色による M 期の細胞の割合は ctrl siRNA 導入群より SCIN siRNA 導入群の方が 31%低かった ($P=0.044$) (図 13b)。

⑤ **TUNEL 法を用いた ISO-HAS-B 細胞株に対する SCIN siRNA 導入によるアポトーシス細胞割合の変化の解析**

ISO-HAS-B における TUNEL 法を用いた解析では、アポトーシス細胞の割合は ctrl siRNA 導入群より SCIN siRNA 導入群の方が 17%低かったが有意差はなかった ($P=0.119$) (図 14)。

⑥ **Scratch assay** を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による細胞遊走能の変化の解析

ISO-HAS-B における細胞遊走能解析では、SCIN siRNA 導入群で、ctrl siRNA 導入群に比べて scratch 後 48 時間での遊走距離が 1.8 倍大きく、遊走能が亢進していた ($P = 0.0177$) (図 15a, 15b)。

⑦ **Transwell** を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による細胞遊走/浸潤能の変化の解析

ISO-HAS-B における Migration assay では、下方の well に遊走した細胞は ctrl 群で 87 個に対して、SCIN siRNA 導入群では平均 999 個と有意に多かった ($P = 0.0079$) (図 16a)。Invasion assay では、下方の well に浸潤した細胞は ctrl で平均 626 個に対して、SCIN siRNA 導入群では平均 965 個と多かったが、有意差はなかった ($P = 0.311$) (図 16b)。SCIN siRNA 導入群で細胞遊走能の亢進がみられた。

⑧ **Phalloidin 染色** を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による F-actin 発現および細胞形態変化の検出

ISO-HAS-B に ctrl、SCIN siRNA を導入し、F-actin の rhodamine phalloidin 染色を行った。SCIN siRNA 導入群で F-actin の発現が亢進し、仮足形成 (糸状、葉状) を伴う形態変化を認めた (対物 60 倍) (図 17)。

⑨ **切除検体の免疫組織化学法**

血管肉腫と良性の血管性病変の切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋ブロック

を 20 例ずつ使用し、SCIN の免疫組織化学染色を行った (図 18)。血管肉腫 20 例の内訳は表 2 に示す。SCIN 発現陽性率は血管肉腫で 35% (7/20 例)、良性の血管性病変で 0% (0/20 例) であり、血管肉腫の方が有意に高い SCIN 陽性率であった ($P = 0.0083$) (表 3)。

⑩ SCIN 発現強度と転移の有無との関連

SCIN 発現は転移陽性 11 例中例 2 例 (18%)、転移陰性例 9 例中 5 例 (56%) で陽性であった。SCIN 発現強度と受診時転移の有無との間に統計学的な有意差はみられなかった ($P = 0.159$) が転移陽性例で SCIN 発現頻度が低い傾向がうかがわれた。

⑪ 生存期間解析

血管肉腫患者 20 名を対象に SCIN 発現強度別に Kaplan-Meier 法を用いて、全生存曲線を作成した。患者全体の生存期間の中央値は 10 ヶ月、5 年生存率は 5%であった。SCIN 発現強度と生存率には有意な関連は認めなかった (図 19)。

第四章 考察

(1) 遺伝子発現プロファイル解析

第二章では、遺伝子発現プロファイル解析によるスクリーニングにて ISO-HAS-B で発現亢進を示す遺伝子を明らかにし、この中で OPN と SCIN に注目した。

OPN は遺伝子量約 44kDa の分泌型リン酸化タンパク質で、カルシウムの沈着した骨組織のマトリックスを構成するタンパク質として同定され、胎盤、腎、白血球などの正常組織や細胞、乳汁や尿中にも存在している¹⁰⁾。OPN は、インテグリンやフィブロネクチン¹¹⁾、CD44 受容体などに結合し骨の再吸収や、創傷治癒、免疫機能、血管新生、細胞の生存など多くの機能に関与していることが知られている¹²⁾。またがん組織では乳癌、胃癌、卵巣癌、舌癌、肺癌、肝癌、大腸癌、メラノーマなどで高発現していることが報告されている¹³⁻²¹⁾。さらに、血管内皮細胞への結合に関与し、癌転移における OPN の役割が注目されている²¹⁾。腹膜原発の血管肉腫症例の腹水で OPN 異常高値であった症例報告が 1 報²²⁾あるが、血管肉腫に関連した研究報告はない。

SCIN は、細胞骨格の調節に関与するタンパク質として知られており、特に actin フィラメント切断タンパク質として重要とされる²³⁾。また、SCIN が胃癌細胞の浸潤や転移を促進すること²⁴⁾や、SCIN をノックダウンすると乳癌の増殖が阻害され、アポトーシスが促進されること²⁵⁾が知られているが、血管肉腫での関連を示唆する報告はない。

これらの背景理由と遺伝子ファミリーが少ないことから OPN と SCIN の 2 遺伝子について ISO-HAS-B 細胞における機能解析を進めた。

(2) 血管肉腫細胞株および組織における osteopontin (OPN) の機能・発現解析

第三章第3節(1)では、細胞株における OPN の機能解析および血管肉腫組織における OPN の発現の検討を行った。なお、ISO-HAS-B の関連細胞株である ISO-HAS 細胞株にて前述した融合遺伝子 *NUP160-SLC43A3* が見出されており、血管肉腫の臨床検体においてもこの融合遺伝子が 36% の頻度で検出されることが報告された⁴⁾。*NUP160-SLC43A3* 融合遺伝子、キメラタンパク質と OPN、SCIN との分子間での関連については今のところ知られていない。

ISO-HAS-B は HDMEC に比べ、mRNA、タンパク質の両レベルで OPN を高発現していた。また、siRNA を用いた CCK8 による細胞増殖能解析は、ctrl siRNA 導入群と OPN siRNA 導入群の増殖能に有意差はみられなかったが、scratch assay による細胞遊走能解析や migration, invasion assay では OPN siRNA 導入群で細胞遊走能が有意に高かった。Phalloidin 染色では、OPN siRNA 導入群において F-actin の発現が亢進し、形態変化を認めた。切除検体において、OPN の発現は良性血管性病変に比較し、血管肉腫においてより高頻度で観察された。

OPN が細胞増殖を調節することがいくつかの研究で明らかにされているが、その作用については様々な結果が報告されている。OPN の細胞への直接的な作用としては、OPN 添加が用量依存的に血管内皮前駆細胞の増殖能を阻害することが知られている²⁶⁾。一方で大腸癌の細胞株に OPN 特異的 siRNA を導入すると、逆にその増殖が低下し、細胞周期の S 期にある細胞の割合が減少していたという報告²⁷⁾があり、細胞増殖能に対する OPN の作用についての一定の見解は得られていない。今回の我々の実験では、ISO-HAS-B においては ctrl 群と OPN siRNA 導入群の増殖能に有意差はみられなかった。

OPN は腫瘍細胞の増殖自体に影響を与えないが、周囲の血管新生を誘導することで腫瘍の発育において、重要な役割を果たしていることが示唆されている。Tang H らは胃癌細胞株の *in vivo*, *in vitro* の系で OPN siRNA を導入し OPN 産生の低下したヒト胃癌細胞株がヒト臍帯静脈内皮細胞の増殖を低下させることを明らかにしている²⁸⁾。また、Hirama らは、OPN 遺伝子を導入されたマウス神経芽腫 C1300 細胞は細胞増殖速度に変化はないが、マウスにおける腫瘍形成性が増大すること、この腫瘍増大には血管新生 (angiogenesis) の亢進が重要であることを示した²⁹⁾。これらの結果を総合して考えると腫瘍で産生された OPN は paracrine な作用により腫瘍の新生血管の誘導をもたらして腫瘍形成や増大に関わるが、それを発現する腫瘍細胞の増殖への影響は様々であるように思われた。ISO-HAS-B 自身の増殖を亢進させる作用は特に強くはないと考えられた。

細胞遊走/浸潤能に関しては、OPN の添加が用量依存的に血管内皮前駆細胞の遊走活性を増加させること²⁶⁾、メラノーマ細胞の実験において siRNA で OPN の発現を低下させると、メラノーマ細胞の浸潤を抑制することができること²¹⁾など、殆どの報告で OPN の発現抑制により、遊走能が低下することが示されている。しかし、舌癌細胞株に OPN 特異的 siRNA を導入すると、細胞株の移動能力は上昇し、Transwell assay でも同様の結果であったという報告もある³⁰⁾。我々の ISO-HAS-B の実験では、上記の舌癌株と同様、OPN siRNA を導入により腫瘍細胞の遊走能力の上昇を認め、OPN は ISO-HAS-B において遊走能を抑制させる可能性を示唆する結果であった。OPN の細胞遊走/浸潤能に対する影響は腫瘍の種類によって異なるのかもしれない。

我々の実験では、Phalloidin 染色で OPN siRNA 導入群で F-actin の発現が亢進し、scratch

assay でも細胞運動が有意に亢進していた。これらの結果からは、OPN 発現の抑制は F-actin 発現を亢進させて細胞運動性を増加させると考えられた。一方で、Kim ID らは、ミクログリア細胞株 (BV2 細胞) を用いた実験で、我々の実験と逆の結果を報告している。すなわち、OPN と特異的インテグリン結合領域である RGD (arginine-glycine-aspartic acid) および SLAY (serine-leucine-alanine-tyrosine) を含有した OPN-peptide icosamer (OPNpt20) で処理した BV2 細胞では、F-actin 重合と細胞運動が有意に亢進し、糸状仮足 (フィロポディア) 様突起の数が増加し、葉状仮足 (ラメリポディア) 様構造が拡大・肥厚していた³¹⁾。このような結果の相違は、細胞の種類の違いや実験系の違いに帰することも出来なくはないが、合理的な解釈に至るには更なる検討が必要と考えられた。

手術・生検検体においては OPN の強発現は血管肉腫では高頻度にみられ、良性の血管性病変では認められなかった。このことから OPN が血管肉腫の悪性の形質獲得と何らかの関連を有していると考えられた。OPN は様々ながん種で発現していることが知られ、免疫組織化学染色にて食道扁平上皮癌の 100%、食道腺癌の 58%で過剰発現の報告がある³²⁾。胃癌にて 72.5%の陽性率の報告¹⁴⁾、リンパ節転移陰性乳癌での 26%の陽性率、などの報告がある³³⁾。

その役割について、今回の ISO-HAS-B を用いた検討結果では、細胞遊走/浸潤能の抑制との関連が示された。一方で細胞増殖能との関連は明らかでなかったことから、血管肉腫細胞の腫瘍形成の場において関与していることが考えられた。血管肉腫の増殖、転移の進行において腫瘍が host から誘導する腫瘍血管の新生や腫瘍血管の内皮細胞の生存は重要であるが、これらの役割は OPN の受容体であるインテグリン $\alpha v\beta 3$ が担っていることが知られている³⁴⁻³⁵⁾。したがって OPN

は、腫瘍が host から誘導する腫瘍血管の新生、血管内皮細胞の生存を通じて血管肉腫の増大に関わっている可能性がある。我々は OPN siRNA 導入 ISO-HAS-B を NOD / SCID マウスに移植し、xenograft の形成を preliminary に試みたが残念ながら腫瘍形成には至らず、OPN の腫瘍血管新生の検討には進めなかった。

以上のように OPN は様々な機能を有しており、がんにおけるその作用については未だ不明な点が多く腫瘍の種類によって、OPN の機能は異なる可能性がある。今回の研究から OPN の抑制が血管肉腫細胞の遊走能と浸潤能を亢進させることが示唆された。遊走能、浸潤能の抑制と悪性度の増強は一見 paradoxical にみえるが、腫瘤を形成するには局所に腫瘍細胞が留まる必要があるであり、局所で遊走能を抑えることは理にかなっており、他の増殖シグナル分子との協働で局所の腫瘍形成に関与したと考えると矛盾しないと思われた。OPN は血管肉腫細胞の遊走能と浸潤能を制御し、原発巣や転移巣などの局所における腫瘤形成を通じて血管肉腫細胞の生物学的特性獲得に関与することが推測された。

(3) 血管肉腫細胞株および組織における scinderin (SCIN) の機能・発現解析

第三章第 3 節 (2) では、血管肉腫細胞株における SCIN の機能解析および血管肉腫組織における SCIN 発現の検討を行った。

ISO-HAS-B は HDMEC に比べ、mRNA, タンパク質の両レベルで SCIN を高発現していた。また、SCIN siRNA 導入群では、ctrl 群と比較して細胞増殖が低下し、S 期、G2/M 期の両方の細胞数の割合が低かった。これらのことから、SCIN は血管肉腫細胞の増殖、ならびに S 期、G2/M

期の細胞数割合の増加と関連し、DNA 合成および細胞分裂の移行において何らかの機能を果たしている可能性が考えられた。一方、アポトーシス陽性細胞の割合は ctrl 群と SCIN siRNA 導入群の間に有意差はなかった。

細胞遊走能解析、migration assay では、SCIN siRNA 導入群では、ctrl siRNA 導入群に比べてより遊走が上昇していたが、Invasion assay では、両群の間に浸潤能に有意差はなかった。

SCIN siRNA 導入群では F-actin の発現亢進、仮足形成（糸状、葉状）を伴う形態変化も認められ、細胞遊走能亢進が裏付けられた。さらに、切除検体の免疫組織化学的検討により、良性血管性病変に比較し、血管肉腫で SCIN の発現がより高頻度で観察された。

細胞増殖能に関しては、当初、SCIN 発現は巨核球性白血病細胞において、アポトーシスを促進し、細胞増殖および腫瘍形成を損なうと報告された³⁶⁾。しかし、その後は逆の結果が多く示され、SCIN を高発現している膀胱癌細胞株 HT1376、前立腺癌細胞株 PC3、肺癌細胞株 A549、H1299、大腸癌細胞株などにて、SCIN の機能をノックダウンすると細胞増殖の低下、細胞周期進行の停止、アポトーシスの誘導が生じることが報告されている^{27, 37-40)}。直近の報告では、肝細胞癌細胞株に SCIN small hairpin (shRNA) を導入して機能解析を行い、その細胞株をマウスの皮下に注射して腫瘍形成能を確認したところ、SCIN shRNA 導入した肝細胞癌細胞の方が増殖を抑制され、S/G2 期で停止していた⁴¹⁾。

今回の血管肉腫細胞株における実験では、SCIN のノックダウンにより、細胞増殖能が有意に低下していた。その中でも S, G2/M 期の細胞割合がより低下しており、アポトーシスの結果や停止する細胞周期の相に一部齟齬があるが、SCIN はがん種の間で共通して細胞増殖に関わってい

と考えられた。

細胞遊走/浸潤能機能に関しては、牛の副腎から樹立されたクロマフィン細胞における SCIN の機能をベクターによって抑制させると、細胞遊走、葉状仮足形成、細胞浸潤能を阻害することが示され⁴²⁾、胃癌細胞株 SGC-7901 やメラノーマ細胞でも同様の結果が明らかにされている^{43, 44)}。また、胃癌細胞株に SCIN shRNA を導入するとその遊走能と浸潤能が抑制され、マウス皮下への異種移植によっても腫瘍形成能と転移能が各々効果的に抑制されていた²⁴⁾。今回の実験では、scratch assay と migration assay で、SCIN siRNA 導入により有意に ISO-HAS-B 細胞の遊走能が亢進しており、既報とは逆の結果であった。

SCIN は villin/gelsolin ファミリーに属し、actin 重合を切断するタンパク質として重要である²³⁾。Gelsolin と同様、SCIN は F-actin の脱重合と核形成を促進し、F-actin 編成の制御に関わるとされる²⁴⁾。また、破骨細胞前駆細胞における SCIN のノックダウンでは、F-actin の分布の変化と糸状仮足形成の増加を特徴とする明確な形態学的変化が生じた²³⁾。今回の実験でも、SCIN siRNA 導入群で F-actin の発現の亢進を認めていたことから、SCIN siRNA 導入群でみられた遊走能の亢進は、actin 切断タンパク質としての機能が抑制されたことによるものと推測された。

免疫組織化学染色では、良性の血管性病変に比べて有意に血管肉腫で SCIN の陽性率が高かった。診断において、SCIN の免疫組織化学染色が血管性病変の良悪性の鑑別に有用である可能性が考えられた。他の癌腫では SCIN の高発現は胃癌で 56% (105/188 例)²⁴⁾、乳癌で 60.9% (28/46 例)²⁵⁾の頻度で報告されている。予後に関しては、肝癌患者においては SCIN の低発現は予後不良因子と報告されている⁴¹⁾一方、胃癌患者、大腸癌患者では SCIN の高発現は、全生存期間の短

縮と相関すると報告されており^{24, 45)}、SCIN 発現と予後の関連は腫瘍の種類によって異なっている。今回の検討では患者数が 20 例と少なかったこともあり、予後との相関、受診時の転移との相関のいずれにおいても有意差はみられなかったが、受診時の転移については SCIN 陽性群 (18%) に対し陰性群 (56%) の方が多い傾向を示した。今後は更なる症例の集積を行い、検討を行いたい。

以上のように、SCIN は様々な機能を有しており、腫瘍における役割は未だ不明な点が多く、腫瘍の種類によって、SCIN の機能は一部異なる可能性がある。今回の検討により、SCIN の抑制が血管肉腫細胞の増殖抑制と遊走能促進に関与することが示された。血管肉腫細胞株における SCIN 発現の役割が増殖促進と遊走能抑制というのは一見相反するように見えるが、局所で腫瘍を形成して増殖するには腫瘍細胞が局所にとどまることが必要であり、少なくとも局所においては増殖促進と遊走性抑制の両者が協働することは腫瘍形成と矛盾しないと思われる。SCIN は血管肉腫の増殖促進と遊走抑制による悪性形質獲得、腫瘍形成を通じて腫瘍の生物学的特性の獲得に関わっているものと推測され、将来治療標的となる可能性があると考えられた。

(4) 研究の限界

本研究の限界として、細胞株が ISO-HAS-B の 1 種類のみを用いているため、本実験の結果が血管肉腫自体の特性を反映しているとは限らない可能性があること、また上記のように予後

解析にて患者数が 20 例と少なく予後因子探索モデルとしての検出力が十分でなかったことが
あげられる。

第五章 結論

血管肉腫細胞株 ISO-HAS-B において発現亢進している遺伝子として OPN と SCIN を見出した。OPN は ISO-HAS-B の遊走能、浸潤能の抑制に関与すると考えられた。また、SCIN は ISO-HAS-B の増殖能の亢進と遊走能の抑制に関わることが示唆された。免疫組織化学染色法による切除検体の検討では OPN、SCIN 共に血管肉腫で高頻度に強発現を示していた。OPN は血管肉腫細胞の局所での腫瘍形成、SCIN は血管肉腫細胞の増殖と腫瘍形成を通じて、血管肉腫の生物学的特性の獲得に関わっている可能性が考えられた。今後マウスを用いた腫瘍形成実験を含む *in vivo* の検討や症例を追加した検討を継続し、これらの遺伝子が血管肉腫のバイオマーカーや治療標的となり得るかについてデータを蓄積していきたい。

謝辞

稿を終えるにあたり御指導、御校閲を賜りました防衛医科大学校病態病理学講座の津田均教授に深甚なる感謝の意を表します。また、長きにわたり終始直接御指導、御教示頂きました防衛医科大学校皮膚科学講座の佐藤貴浩教授、防衛医科大学校生化学講座の今村宰准教授に深く感謝致します。

略語一覧

BPB: bromophenolblue

CCK8: Cell Counting Kit-8

cDNA: complementary DNA

ctrl: control

DAB: 3,3'-diaminobenzidine

DAPI: 4',6-diamidino-2-phenylindole

DTT: dithiothreitol

DMEM: Dulbecco's modified Eagle medium

EdU: 5-ethynyl-2'-deoxyuridine

ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay

F-actin: filamentous actin

FBS: fetal bovine serum

HDMEC: human dermal microvascular endothelial cells

mRNA: messenger ribonucleic acid

OPN: osteopontin

PAGE: polyacrylamide gel electrophoresis

PCR: polymerase chain reaction

pHH3: phospho histone H3

RIN: RNA integrity number

SCIN: scinderin

SDS: sodium dodecyl sulfate

shRNA: small hairpin ribonucleic acid

siRNA: small interfering RNA

total RNA: total ribonucleic acid

引用文献

- 1) 水上晶子, 田口理史, 鈴木 正, 土田 哲也. 血管肉腫ガイドライン作成に向けて 血管肉腫
日本皮膚外科学会アンケート調査結果を中心に. *Skin Cancer*. 2010; 24: 350-362.
- 2) 増澤幹男, 増澤真実子, 勝岡憲生, 西山茂夫. 北里大学 病院皮膚科脈管肉腫の集計と解析.
皮膚病診療. 2010; 32: 476-82.
- 3) Lahat G, Dhuka AR, Hallevi H, Xiao L, Zou C, Smith KD, Phung TL, Pollock RE,
Benjamin R, Hunt KK, Lazar AJ, Lev D. Angiosarcoma: clinical and molecular insights. *Ann*
Surg. 2010;251:1098-106.
- 4) Shimozono N, Jinnin M, Masuzawa M, Wang Z, Hirano A, Tomizawa Y, Etoh-Kira T,
Kajihara I, Harada M, Fukushima S, Ihn H. NUP160-SLC43A3 is a novel recurrent fusion
oncogene in angiosarcoma. *Cancer Res*. 2015; 75: 4458-65.
- 5) Donehower LA, Harvey M, Slagle BL, McArthur MJ, Montgomery CA, Butel JS, Bradley
A. Mice deficient for p53 are developmentally normal but susceptible to spontaneous
tumours. *Nature*. 1992;356:215-21.
- 6) Antonescu CR, Yoshida A, Guo T, Chang NE, Zhang L, Agaram NP, Qin LX, Brennan
MF, Singer S, Maki RG. KDR activating mutations in human angiosarcomas are sensitive to
specific kinase inhibitors. *Cancer Res*. 2009; 69: 7175-9.
- 7) Behjati S, Tarpey PS, Sheldon H, Martincorena I, Van Loo P, Gundem G, Wedge D C,
Ramakrishna M, Cooke S L, Pillay N, Vollan H K M, Papaemmanuil E, Koss H, Bunney T D,

Hardy C, Joseph OR, Martin S, Mudie L, Butler A, Teague JW, Patil M, Steers G, Cao Y, Gumbs C, Ingram D, Lazar AJ, Little L, Mahadeshwar H, Protopopov AA, Sanna GA, Seth S, Song X, Tang J, Zhang J, Ravi V, Torres KE, Khatri B, Halai D, Roxanis I, Baumhoer D, Tirabosco R, Amary MF, Boshoff C, McDermott U, Katan M, Stratton MR, Futreal PA, Flanagan AM, Harris A, Campbell PJ. Recurrent PTPRB and PLCG1 mutations in angiosarcoma. *Nat Genet.* 2014;46:376-9.

8) Manner J, Radlwimmer B, Hohenberger P, Mossinger K, Kuffer S, Sauer C, Belharazem D, Zettl A, Coindre JM, Hallermann C, Hartmann JT, Katenkamp D, Katenkamp K, Schoffski P, Sciort R, Wozniak A, Lichter P, Marx A, Strobel P. MYC high level gene amplification is a distinctive feature of angiosarcomas after irradiation or chronic lymphedema. *Am J Pathol.* 2010;76:34-9.

9) Masuzawa M, Fujimura T, Hamada Y, Fujita Y, Hara H, Nishiyama S, Katsuoka K, Tamauchi H, Sakurai Y. Establishment of a human hemangiosarcoma cell line (ISO-HAS). *Int J Cancer.* 1999;81:305-8.

10) Senger DR, Perruzzi CA, Gracey CF, Papadopoulos A, Tenen DG. Secreted phosphoproteins associated with neoplastic transformation: close homology with plasma proteins cleaved during blood coagulation. *Cancer Res.* 1988;48:5770-4.

- 11) Oldberg A, Franzén A, Heinegård D. Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1986;83:8819-23.
- 12) O'Regan A, Berman JS. Osteopontin: a key cytokine in cell-mediated and granulomatous inflammation. *Int J Exp Pathol*. 2000;81:373-90.
- 13) Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Månsson H. The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2007;16:1087-97.
- 14) Ue T, Yokozaki H, Kitadai Y, Yamamoto S, Yasui W, Ishikawa T, Tahara E. Co-expression of osteopontin and CD44v9 in gastric cancer. *Int J Cancer*. 1998;79:127-32.
- 15) Kim JH, Skates SJ, Uede T, Wong KK, Schorge JO, Feltmate CM, Berkowitz RS, Cramer DW, Mok SC. Osteopontin as a potential diagnostic biomarker for ovarian cancer. *JAMA*. 2002;287:1671-9.
- 16) Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CM, Chen CH, Huang CC. Clinical significance of osteopontin expression in T1 and T2 tongue cancers. *Head Neck*. 2008;30:776-81.
- 17) Gu T, Ohashi R, Cui R, Tajima K, Yoshioka M, Iwakami S, Sasaki S, Shinohara A, Matsukawa T, Kobayashi J, Inaba Y, Takahashi K. Osteopontin is involved in the

development of acquired chemo-resistance of cisplatin in small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2009;66:176-83.

18) Chien CY, Su CY, Chuang HC, Fang FM, Huang HY, Chen CH, Chen CM, Huang CC.

Comprehensive study on the prognostic role of osteopontin expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2009;45:798-802.

19) Zhang R, Pan X, Huang Z, Weber GF, Zhang G. Osteopontin enhances the expression and activity of MMP-2 via the SDF-1/CXCR4 axis in hepatocellular carcinoma cell lines.

PLoS One. 2011;6:e23831.

20) Cao DX, Li ZJ, Jiang XO, Lum YL, Khin E, Lee NP, Wu GH, Luk JM. Osteopontin as potential biomarker and therapeutic target in gastric and liver cancers. *World J*

Gastroenterol. 2012;18:3923-30.

21) Kiss T, Jámboor K, Koroknai V, Szász I, Bárdos H, Mokánszki A, Ádány R, Balázs M.

Silencing Osteopontin Expression Inhibits Proliferation, Invasion and Induce Altered Protein Expression in Melanoma Cells. *Pathol Oncol Res*. 2021;27: 581395.

22) Litvan J, Aghazarian M, Wiley E, Guleria S, Dudek AZ. Primary peritoneal

angiosarcoma: a case report. *Anticancer Res*. 2014;34:5001-6.

23) Hassanpour S, Jiang H, Wang Y, Kuiper JW, Glogauer M. The actin binding protein adseverin regulates osteoclastogenesis. *PLoS One*. 2014;9:e109078.

- 24) Liu JJ, Liu JY, Chen J, Wu YX, Yan P, Ji CD, Wang YX, Xiang DF, Zhang X, Zhang P, Cui YH, Wang JM, Bian XW, Qian F. Scinderin promotes the invasion and metastasis of gastric cancer cells and predicts the outcome of patients. *Cancer Lett.* 2016;376:110-7.
- 25) Jian W, Zhang X, Wang J, Liu Y, Hu C, Wang X, Liu R. Scinderin-knockdown inhibits proliferation and promotes apoptosis in human breast carcinoma cells. *Oncol Lett.* 2018;16:3207-14.
- 26) Yu M, Liu Q, Yi K, Wu L, Tan X. Effects of osteopontin on functional activity of late endothelial progenitor cells. *J Cell Biochem.* 2011;112:1730-6.
- 27) Xu C, Sun L, Jiang C, Zhou H, Gu L, Liu Y, Xu Q. SPP1, analyzed by bioinformatics methods, promotes the metastasis in colorectal cancer by activating EMT pathway. *Biomed Pharmacother.* 2017;91: 1167-77.
- 28) Tang H, Wang J, Bai F, Hong L, Liang J, Gao J, Zhai H, Lan M, Zhang F, Wu K, Fan D. Inhibition of osteopontin would suppress angiogenesis in gastric cancer. *Biochem Cell Biol.* 2007;85:103-10.
- 29) Hirama M, Takahashi F, Takahashi K, Akutagawa S, Shimizu K, Soma S, Shimanuki Y, Nishio K, Fukuchi Y. Osteopontin overproduced by tumor cells acts as a potent angiogenic factor contributing to tumor growth. *Cancer Lett.* 2003;198:107-17.

- 30) Zhang Q, Li L, Lai Y, Zhao T. Silencing of SPP1 suppresses progression of tongue cancer by mediating the PI3K/Akt signaling pathway. *Technol Cancer Res Treat*. 2020;19:1533033820971306.
- 31) Kim ID, Lee H, Jin YC, Lee JK. Osteopontin peptide icosamer containing RGD and SLAYGLR motifs enhances the motility and phagocytic activity of microglia. *Exp Neurobiol*. 2017;26:339-49.
- 32) Casson AG, Wilson SM, McCart JA, O'Malley FP, Ozcelik H, Tsao MS, Chambers AF. ras mutation and expression of the ras-regulated genes osteopontin and cathepsin L in human esophageal cancer. *Int J Cancer*. 1997;72:739-45.
- 33) Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H, Harris JF, Tonkin KS, Kerkvliet N, Saad Z, Doig GS, Chambers AF. Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer*. 1998;79:502-8.
- 34) Scatena M, Almeida M, Chaisson ML, Fausto N, Nicosia RF, Giachelli CM. NF-kappaB mediates alphavbeta3 integrin-induced endothelial cell survival. *J Cell Biol*. 1998;141:1083-93.
- 35) Rice J, Courter DL, Giachelli CM, Scatena M. Molecular mediators of alphavbeta3-induced endothelial cell survival. *J Vasc Res*. 2006;43:422-36.
- 36) Zunino R, Li Q, Rosé SD, Romero-Benítez MM, Lejen T, Brandan NC, Trifaró JM. Expression of scinderin in megakaryoblastic leukemia cells induces differentiation,

maturation, and apoptosis with release of plateletlike particles and inhibits proliferation and tumorigenesis. *Blood*. 2001;98:2210-9.

37) Miura N, Takemori N, Kikugawa T, Tanji N, Higashiyama S, Yokoyama M. Adseverin: a novel cisplatin-resistant marker in the human bladder cancer cell line HT1376 identified by quantitative proteomic analysis. *Mol Oncol*. 2012;6:311-22.

38) Wang D, Sun SQ, Yu YH, Wu WZ, Yang SL, Tan JM. Suppression of SCIN inhibits human prostate cancer cell proliferation and induces G0/G1 phase arrest. *Int J Oncol*. 2014;44:161-6.

39) Lai X, Su W, Zhao H, Yang S, Zeng T, Wu W, Wang D. Loss of scinderin decreased expression of epidermal growth factor receptor and promoted apoptosis of castration-resistant prostate cancer cells. *FEBS Open Bio*. 2018;8:743-50.

40) Liu H, Shi D, Liu T, Yu Z, Zhou C. Lentivirus-mediated silencing of SCIN inhibits proliferation of human lung carcinoma cells. *Gene*. 2015; 554: 32-39.

41) Zhou B, Chen TW, Jiang YB, Wei XB, Lu CD, Li JJ, Xie D, Cheng SQ. Scinderin suppresses cell proliferation and predicts the poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Oncol Lett*. 2020;19:2011-20.

42) Dumitrescu Pene T, Rosé SD, Lejen T, Marcu MG, Trifaró JM. Expression of various scinderin domains in chromaffin cells indicates that this protein acts as a molecular switch in the control of actin filament dynamics and exocytosis. *J Neurochem*. 2005;92:780-9.

43) Chen XM, Guo JM, Chen P, Mao LG, Feng WY, Le DH, Li KQ. Suppression of scinderin modulates epithelial mesenchymal transition markers in highly metastatic gastric cancer cell line SGC 7901. *Mol Med Report*. 2014;10: 2327-33.

44) Vaysse A, Fang S, Brossard M, Wei Q, Chen WV, Mohamdi H Vincent-Fetita L, Margaritte-Jeannin P, Lavielle N, Maubec E, Lathrop M, Avril MF, Amos CI, Lee JE, Demenais F. A comprehensive genome-wide analysis of melanoma Breslow thickness identifies interaction between CDC42 and SCIN genetic variants. *Int J Cancer*. 2016;139: 2012-20.

45) Lin Q, Li J, Zhu D, Niu Z, Pan X, Xu P, Ji M, Wei Y, Xu J. Aberrant Scinderin Expression correlates with liver metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Front Pharmacol*. 2019;10:1183.

表 1 ISO-HAS-B で高発現している上位 100 遺伝子

	GeneSymbol	シグナル強度比 (ISO-HAS-B/HDMEC)		GeneSymbol	シグナル強度比 (ISO-HAS-B/HDMEC)
1	SPANXB1	29543.67092	26	<u>SCIN</u>	2285.916969
2	TSPY3	22722.20026	27	VCY	2279.904032
3	AMTN	17532.73017	28	<u>SPP1</u>	1858.013936
4	CTAG1A	16558.19005	29	GTSE1	1801.460302
5	SPANXC	14655.55578	30	MAGEA1	1795.52952
6	SOST	14444.85477	31	MAGEC2	1667.406601
7	MAGEA6	13022.52971	32	XLOC_12_012323	1591.286812
8	TSPY2	7584.153991	33	APBB1IP	1509.768935
9	XAGE1A	7229.774346	34	TMEM200A	1504.639516
10	MAGEA2B	7133.420209	35	POTEB3	1426.502109
11	SPANXA1	7013.895423	36	APCDD1L	1424.58306
12	CT47A11	6896.053758	37	lnc-NPY5R-4	1281.164538
13	CSAG1	5897.295189	38	CT45A5	1220.003748
14	UCA1	4622.848183	39	LINC02184	1192.423199
15	HTN3	4030.008325	40	LOC441601	1140.615963
16	VCX2	3656.807664	41	LINC02582	1096.546162

17	RPS4Y1	3627.268308	42	RFPL4AL1	1075.070334
18	HAPLN1	3536.057867	43	FAM133A	978.2820633
19	GAGE7	3421.469345	44	ST8SIA6-AS1	913.0165409
20	CEACAM6	3374.393637	45	DDX3Y	847.2819813
21	AJAP1	2684.557967	46	CTAG2	785.2862231
22	RPS4Y2	2538.516355	47	LCP1	770.8715999
23	DEFB122	2423.50472	48	CSAG4	770.4524927
24	MAGEA12	2320.801812	49	LINC01425	769.4861755
25	IL13RA2	2299.134465	50	FOS	761.8107958
	GeneSymbol	シグナル強度比 (ISO·HAS·B/HDMEC)		GeneSymbol	シグナル強度比 (ISO·HAS·B/HDMEC)
51	LHX8	730.2519265	76	LINC01234	493.923321
52	HOXB13	728.7717496	77	MAGEC1	492.8848631
53	GSTT1	722.3141049	78	FMO3	488.5753153
54	LINC02167	691.9846941	79	FAM19A2	487.1492715
55	FOLR3	690.9678495	80	lnc-BDKRB1-1	486.9016894
56	HTN1	688.7572897	81	SPANXA2-OT1	480.2091094
57	CD33	670.53028	82	MUC15	471.065271
58	CTLA4	661.3138489	83	XLOC_l2_015879	449.4104412

59	HTR1F	651.7204552	84	LINC01419	446.719415
60	LINC01029	639.8994805	85	XLOC_l2_009405	445.3372093
61	LOC105379057	628.3872902	86	PART1	414.669857
62	PICSAR	617.9201706	87	BDKRB1	410.7295776
63	MAGEA4	616.3634595	88	DNAH2	405.1529354
64	LINC00221	606.617784	89	DCAF8L1	404.2273357
65	KCNMA1	603.4785682	90	lnc-TNC-3	390.0545955
66	LOC105372640	587.7837815	91	LOC643201	387.5098097
67	SPINK1	574.9030809	92	SSX1	386.6357608
68	LINC01764	574.4207841	93	LOC101929534	386.4035934
69	XLOC_l2_011744	540.8355634	94	NALCN-AS1	384.6631445
70	CTTNBP2	513.5887862	95	FAM230E	380.5592241
71	LOC101928833	513.5804536	96	LOC107986952	376.8687229
72	CCN3	508.4829101	97	FOSB	376.4057619
73	LOC102724874	502.2640948	98	LINC00221	374.6889237
74	LIN28B	501.2460201	99	LOC645188	372.9417483
75	LOC643201	497.3490515	100	ANO3	368.9476893

注：Osteopontin (OPN) (gene symbol は SPP1) と scinderin (SCIN) (gene symbol は SCIN) は灰色で示す。

表 2 本研究で検討した血管肉腫 20 症例の臨床情報

	年齢	性別	発生部位	大きさ (mm)	受診時の転移臓器	OPN 発現強度	SCIN 発現強度	生存期間 (月)	予後
1	74	男	頭部	50×25	肺	3+	0	57	死亡
2	75	男	頭部	15×45	肺	3+	2+	52	死亡
3	69	男	頭部	50×50	肺	1+	0	30	死亡
4	89	女	頭部	30×30	肺	2+	0	8	死亡
5	74	女	頭部	不明	不明	3+	2+	8	死亡
6	77	男	頭部	60×40	肺 右耳下腺リンパ節	0	1+	10	死亡
7	69	女	頭部	14×8	右耳下腺リンパ節	1+	0	13	死亡
8	82	男	頭部	不明	肺	3+	1+	12	死亡
9	88	男	頭部	110×110	なし	2+	3+	9	死亡
10	99	女	頭部	40×40	なし	3+	3+	14	死亡
11	77	男	頭部	110×110	なし	3+	3+	10	不明
12	72	男	頭部	25×15	なし	2+	2+	3	不明
13	68	男	舌	10×10	なし	1+	0	156	生存
14	59	男	背部	150×170	肺	2+	0	4	死亡
15	43	男	左上肢	不明	なし	0	0	7	死亡
16	71	女	右下肢	不明	骨	3+	3+	120	生存
17	89	女	左下肢	40×40	肺、骨	3+	1+	8	死亡
18	60	男	肝臓	70×70	脾臓	3+	1+	3	死亡
19	67	男	肝臓	不明	なし	2+	1+	2	死亡
20	84	女	肝臓	130×60	なし	3+	0	1	死亡

表 3 切除検体の免疫組織化学法による OPN 発現強度

	Number of cases (%)			<i>P</i>
	Total	Positive (3+ or 2+)	Negative (1+ or 0)	
Angiosarcoma	20	15 (75)	5 (25)	<0.001
Benign vascular tumor	20	0 (0)	20 (100)	

表 4 切除検体の免疫組織化学法による SCIN 発現強度

	Number of cases (%)			<i>P</i>
	Total	Positive (3+ or 2+)	Negative (1+ or 0)	
Angiosarcoma	20	7 (35)	13 (65)	0.0083
Benign vascular tumor	20	0 (0)	20 (100)	

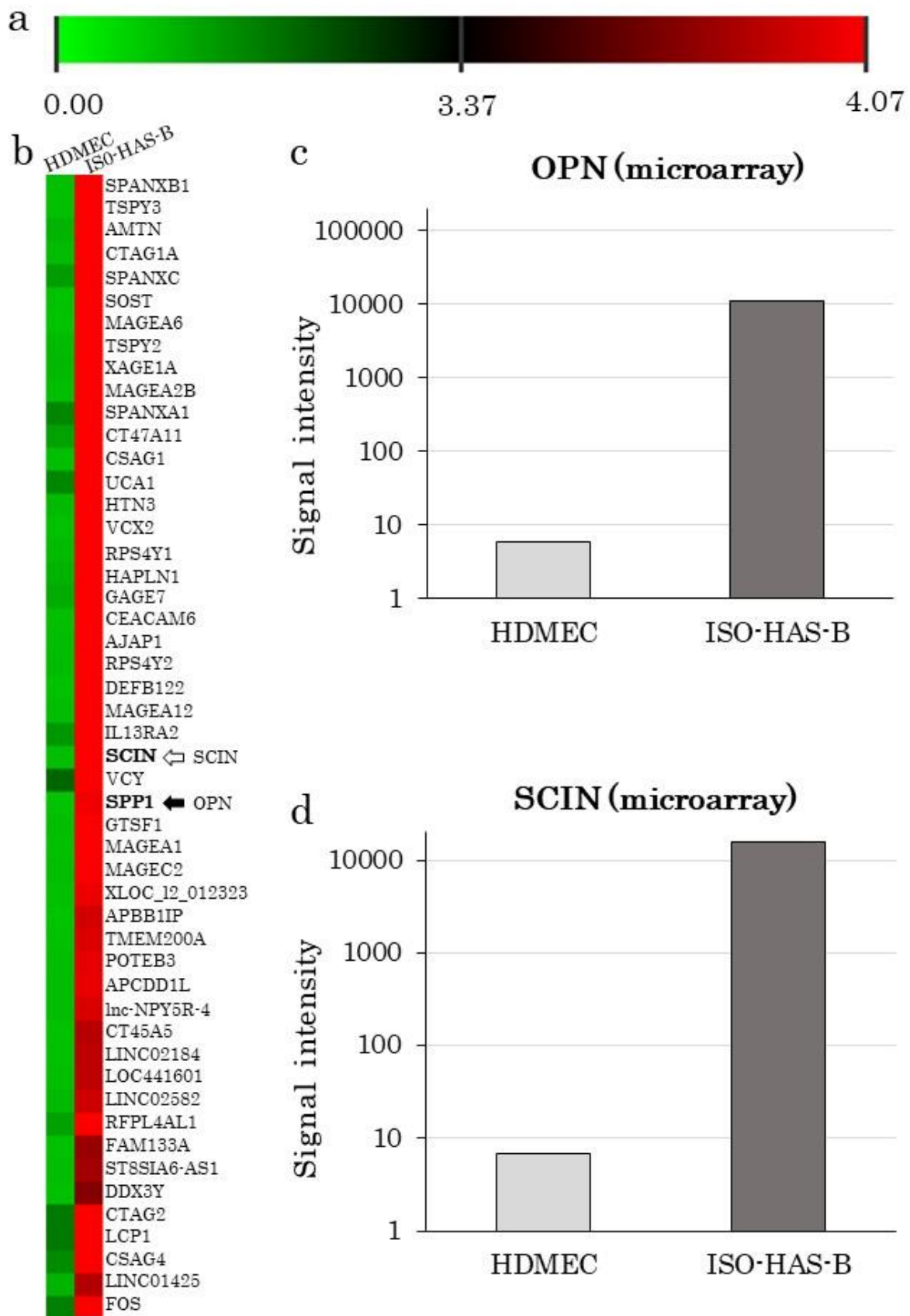


図 1 血管肉腫細胞株で高発現していた遺伝子の同定

a: 各細胞株において各遺伝子発現のシグナル強度を \log_2 変換して、全部の遺伝子の発現強度の中央値 3.371 を黒色としたとき、中央値より高くなると赤色で発現亢進、中央値より低下すると緑色で発現低下を示す。

b: 血管肉腫細胞株で高発現していた遺伝子のヒートマップ、右側に遺伝子名が記載されている。

HDMEC と比較して ISO-HAS-B 細胞で 350 倍以上の発現亢進を示した上位 50 遺伝子を示す。

黒矢印は OPN、白矢印は SCIN を表す。

c: OPN 発現は HDMEC と比べて ISO-HAS-B で 1858 倍のシグナル強度を示す。

d: SCIN 発現は HDMEC と比べて 2285 倍のシグナル強度を示す。

略語: HDMEC, human dermal microvascular endothelial cells ; OPN, osteopontin ; SCIN, scinderin

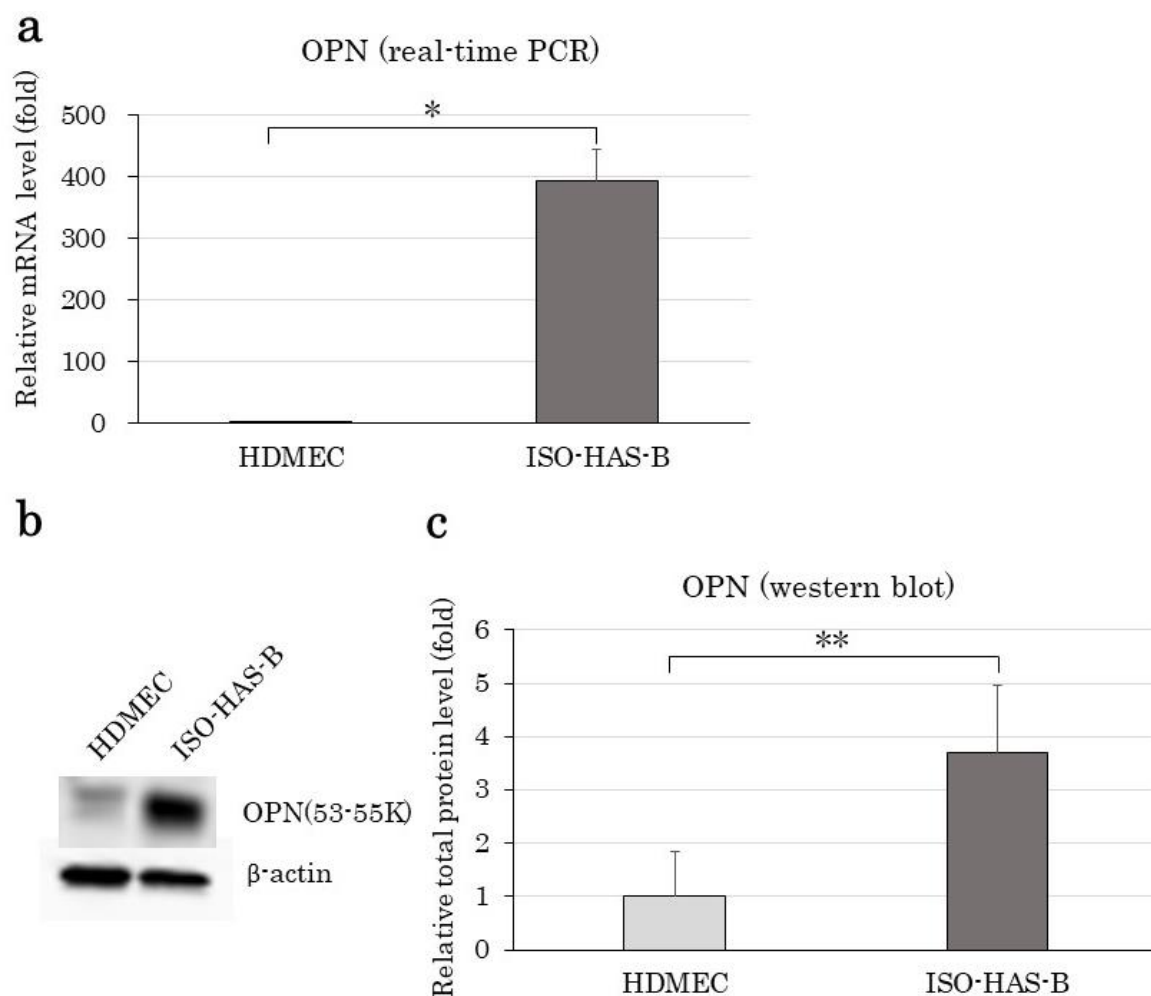


図2 HDMEC と ISO-HAS-B の OPN mRNA とタンパク質の発現解析

a : Real-time PCR 法 : ISO-HAS-B の OPN mRNA は HDMEC に比し、394 倍の発現量を認める。内在性コントロールとして β-actin を使用した。HDMEC における OPN の発現量を 1 としたときの ISO-HAS-B における OPN 発現量の相対値を示す。

b, c : Western blot 法 : HDMEC と比べ ISO-HAS-B において OPN は 3.7 倍の強発現を認める。

n=3 * $P=0.0002$ ** $P=0.0161$

略語: HDMEC, human dermal microvascular endothelial cells ; mRNA, messenger

ribonucleic acid ; OPN, osteopontin

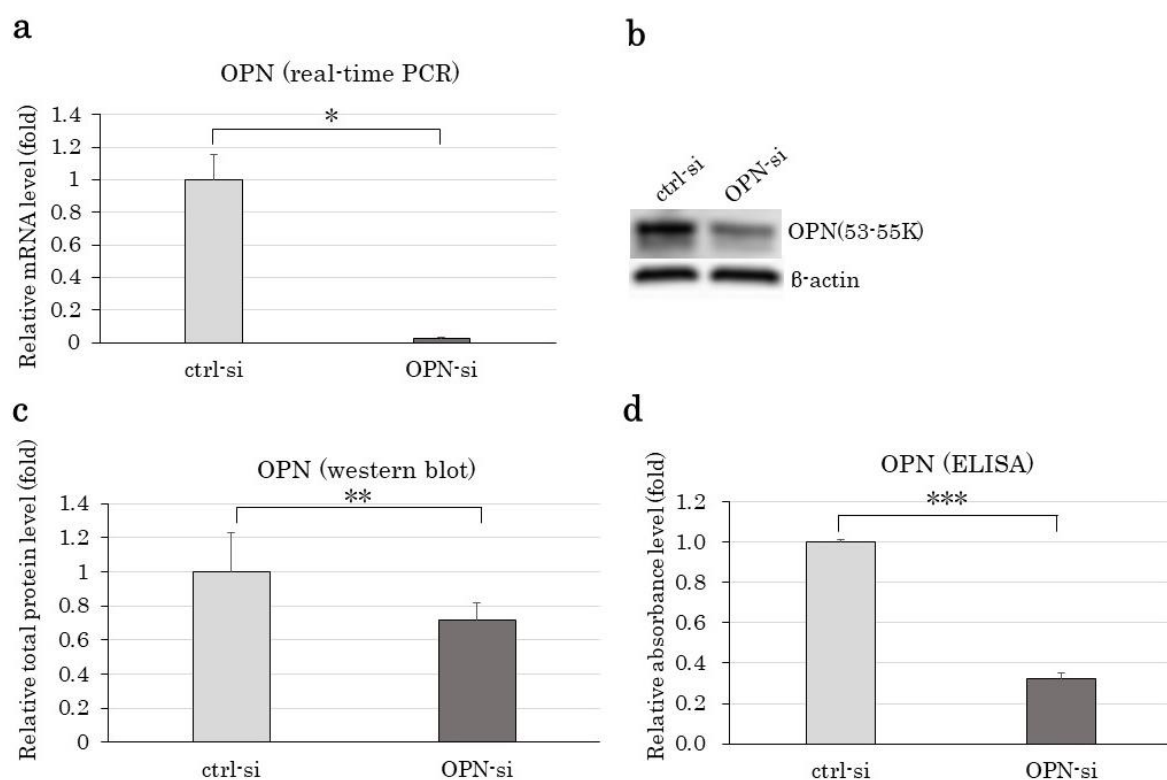


図3 siRNA 導入による OPN の発現抑制の確認

a : Real-time PCR 法 : ISO-HAS-B への siRNA 導入により OPN mRNA の発現は 97%抑制されている。内在性コントロールとして β-actin を使用した。

b, c : Western blot 法 : OPN siRNA 導入群は ctrl siRNA 導入群に比べて OPN の発現は 28%低下している。

d : ELISA 法 : siRNA 導入により OPN の分泌型タンパク質の発現は、68%抑制されている。

n=3 * $P=0.00042$ ** $P=0.0226$ *** $P=0.0001$

略語: ctrl, control ; ELISA, enzyme-linked immunosorbent assay ; mRNA, messenger

ribonucleic acid ; OPN, osteopontin ; siRNA, small interfering RNA

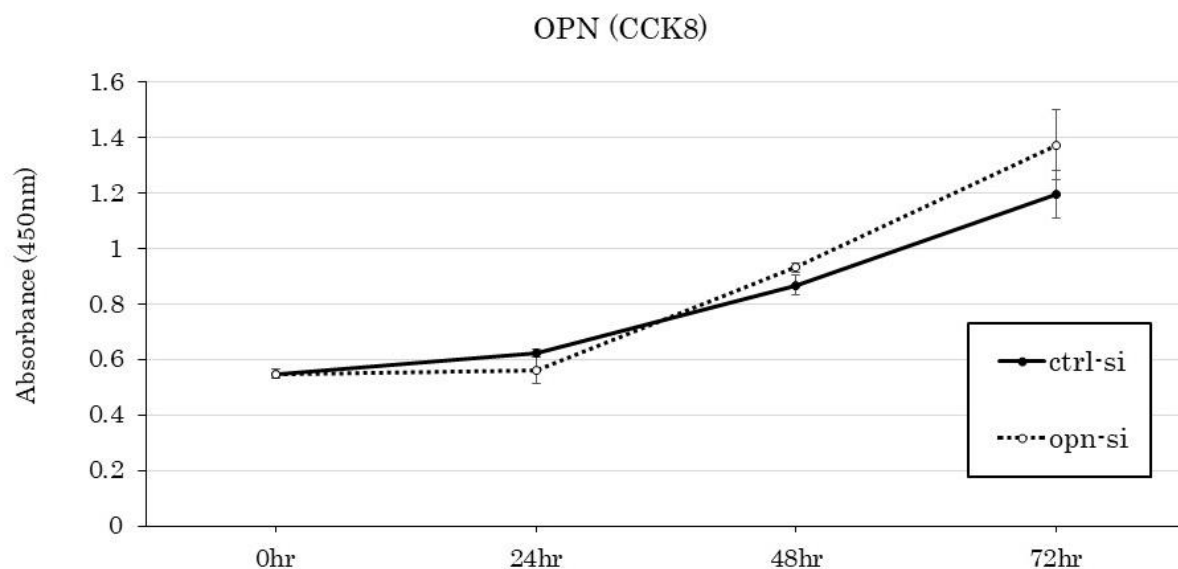


図4 Cell Counting Kit-8 (CCK8)を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による

細胞増殖能変化の解析

OPN siRNA 導入後 0, 24, 48, 72 時間毎に CCK8 を反応させ、吸光度を計測した。

OPN siRNA 導入群における ISO-HAS-B の増殖能に有意な変化は認めなかった。

n=3 24 時間後 $P = 0.0907$ 48 時間後 $P = 0.962$ 72 時間後 $P = 0.0717$

略語: ctrl, control ; OPN, osteopontin ; siRNA, small interfering RNA

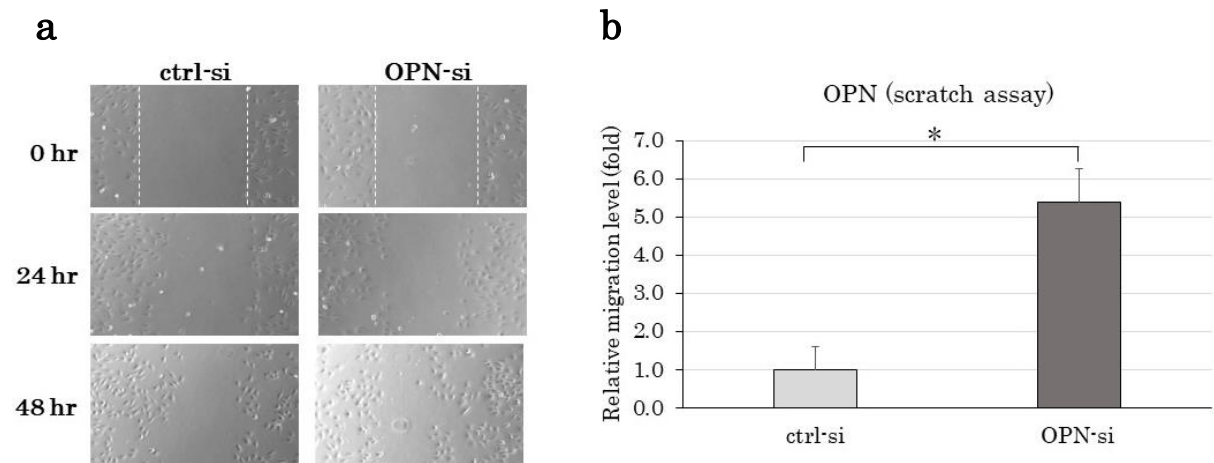


図5 Scratch assay を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による細胞遊走能の変化

の解析

a : ISO-HAS-B に ctrl、OPN siRNA を導入し、0, 24, 48 時間の ctrl、OPN siRNA 導入群における scratch 後の変化を示す。48 時間後において、OPN siRNA 導入群は ctrl 群に比べ細胞がより遊走している。

b : Ctrl siRNA 導入群の 0~48 時間での遊走距離を 1 としたときの OPN siRNA 導入群の遊走距離の相対値を示す。OPN siRNA 導入群の方が、ctrl siRNA 導入群より遊走距離が 5.4 倍大きく、遊走能が促進している。n=3 * $P=0.0002$

略語: ctrl, control ; OPN, osteopontin ; siRNA, small interfering RNA

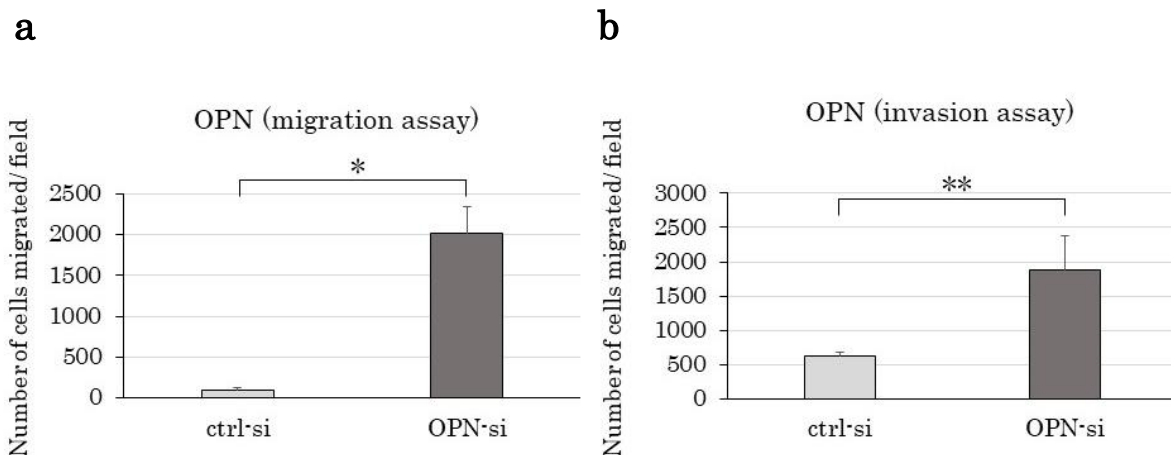


図6 Transwellを用いたISO-HAS-B細胞株へのOPN siRNA導入による細胞遊走/浸潤能の変化の解析

ISO-HAS-Bにctrl、OPN siRNAを導入して検討を行った。

a: Migration assay では、下方の well に遊走した細胞の数は ctrl 群で平均 87 個に対して、OPN siRNA 導入群では平均 2020 個と有意に多くみられる。

b: Invasion assay では、下方の well に浸潤した細胞の数は ctrl で平均 626 個に対して、OPN siRNA 導入群では平均 1880 個と有意に多くみられる。OPN siRNA 導入群で細胞遊走能と浸潤能が亢進された。

n=3 * $P < 0.0001$ ** $P = 0.00012$

略語: ctrl, control ; OPN, osteopontin ; siRNA, small interfering RNA

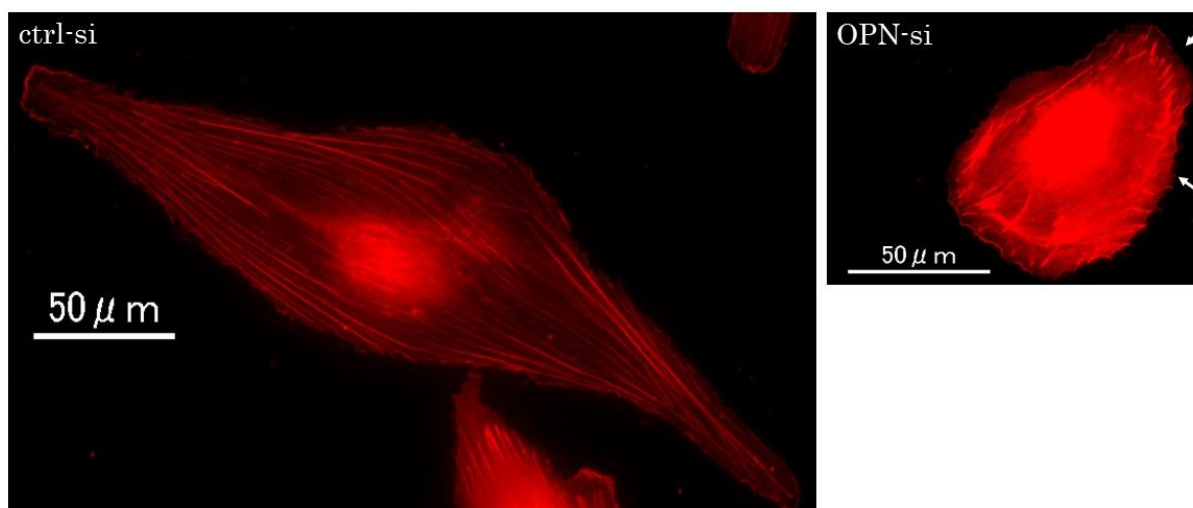


図7 Phalloidin 染色を用いた ISO-HAS-B 細胞株への OPN siRNA 導入による F-actin 発現

および細胞形態の変化の検出

ISO-HAS-B に ctrl、OPN siRNA を導入して、F-actin の rhodamine phalloidin 染色を行った。

OPN siRNA 導入群で F-actin の発現が亢進し、仮足形成（糸状、葉状）（白矢印）を伴う形態変化を認める（対物 60 倍）。

略語: ctrl, control ; F-actin, filamentous actin ; OPN, osteopontin ; siRNA, small interfering RNA

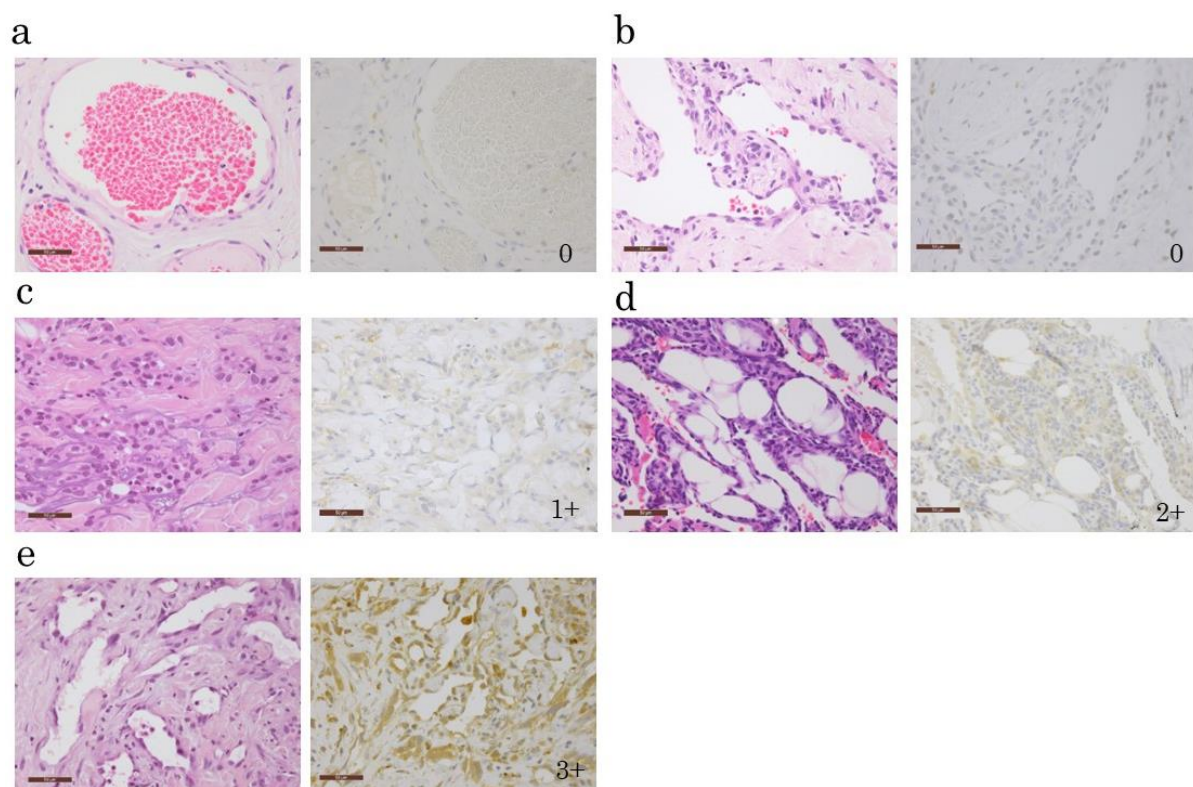


図 8 免疫組織化学法による OPN 発現強度の判定例 (400 倍)

a, b: スコア 0 の良性血管性病変。a は単純性血管腫、b は化膿性肉芽腫の例。

c: スコア 1+の血管肉腫。

d: スコア 2+の血管肉腫。

e: スコア 3+の血管肉腫。

判定基準は本文参照

a ~ e の各々左側はヘマトキシリン・エオジン染色、右は OPN の免疫組織染色

スケールバーは 50 μ m を示す。

略語: OPN, osteopontin

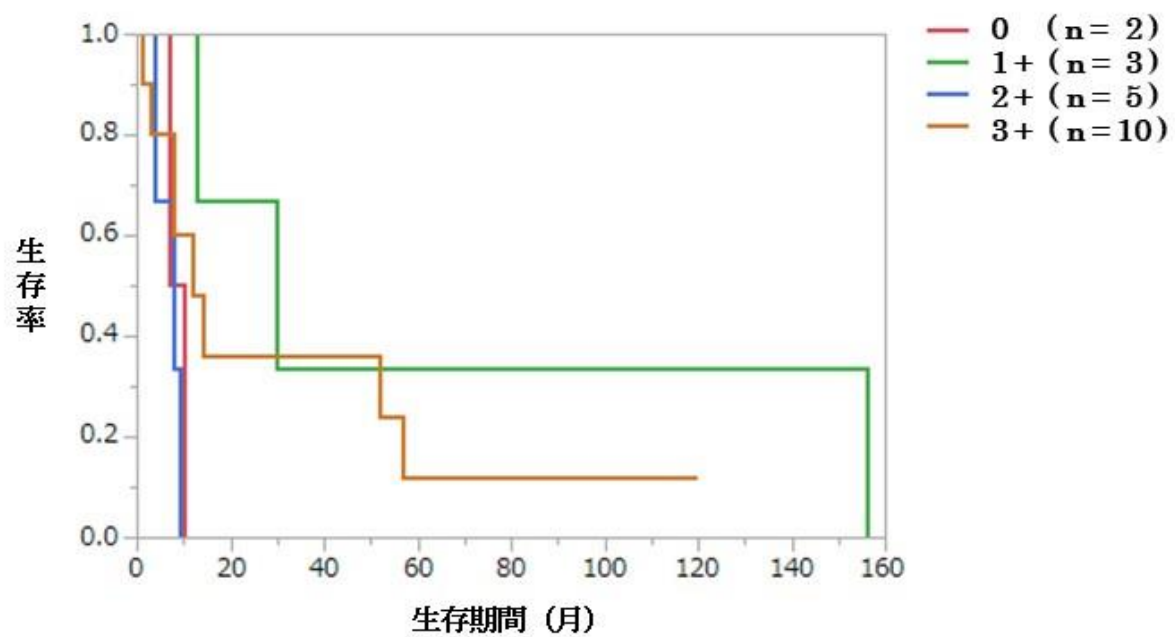


図 9 OPN 発現強度別の生存曲線 (Kaplan-Meier 法)

OPN 発現強度と生存率には有意な関連は認めない。

略語: OPN, osteopontin

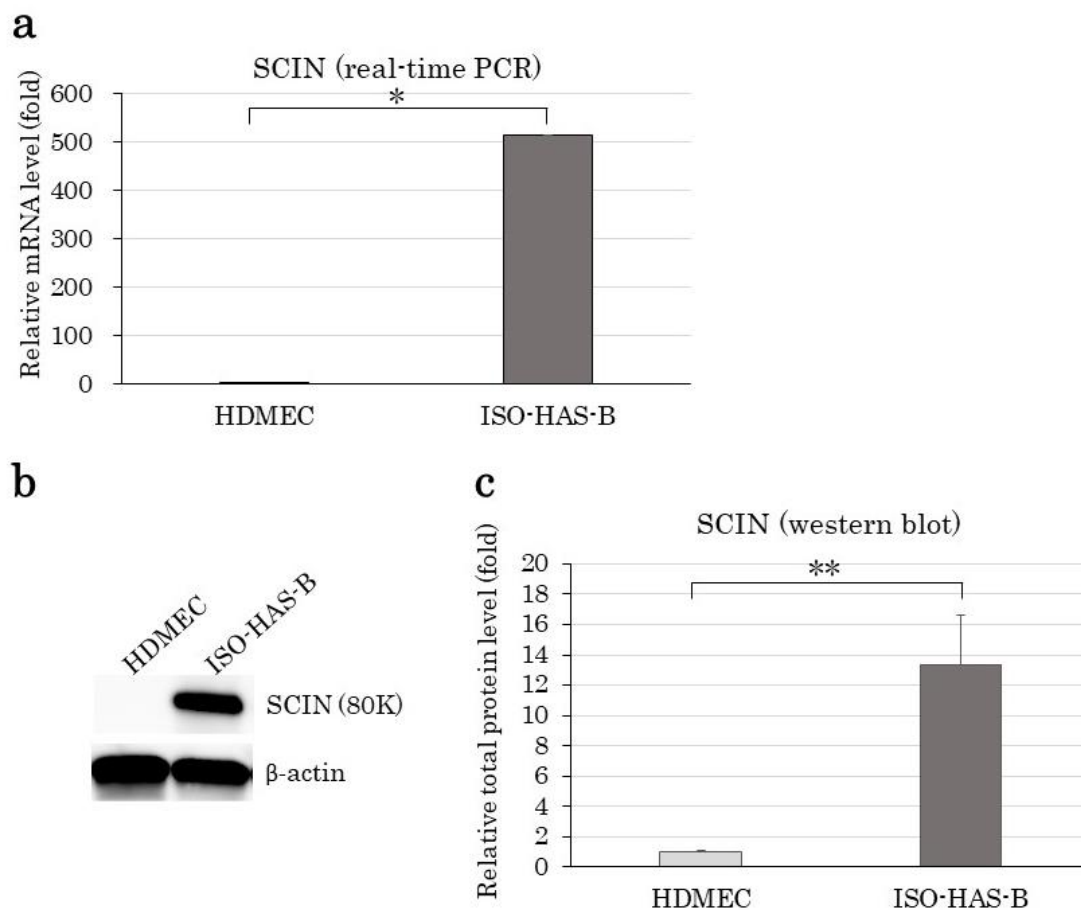


図 10 HDMEC と ISO-HAS-B の SCIN mRNA とタンパク質の発現解析

a : Real-time PCR 法 : ISO-HAS-B の SCIN mRNA 発現量は HDMEC と比較して 514 倍である。内在性コントロールとして β -actin を使用した。HDMEC における SCIN の発現量を 1 としたときの ISO-HAS-B の相対値を示している。

b, c : Western blot 法 : HDMEC と比べ ISO-HAS-B において SCIN は 13 倍の強発現を認める。

n=3 * P = 0.0334 ** P < 0.05

略語: HDMEC, human dermal microvascular endothelial cells ; mRNA, messenger ribonucleic acid ; SCIN, scinderin

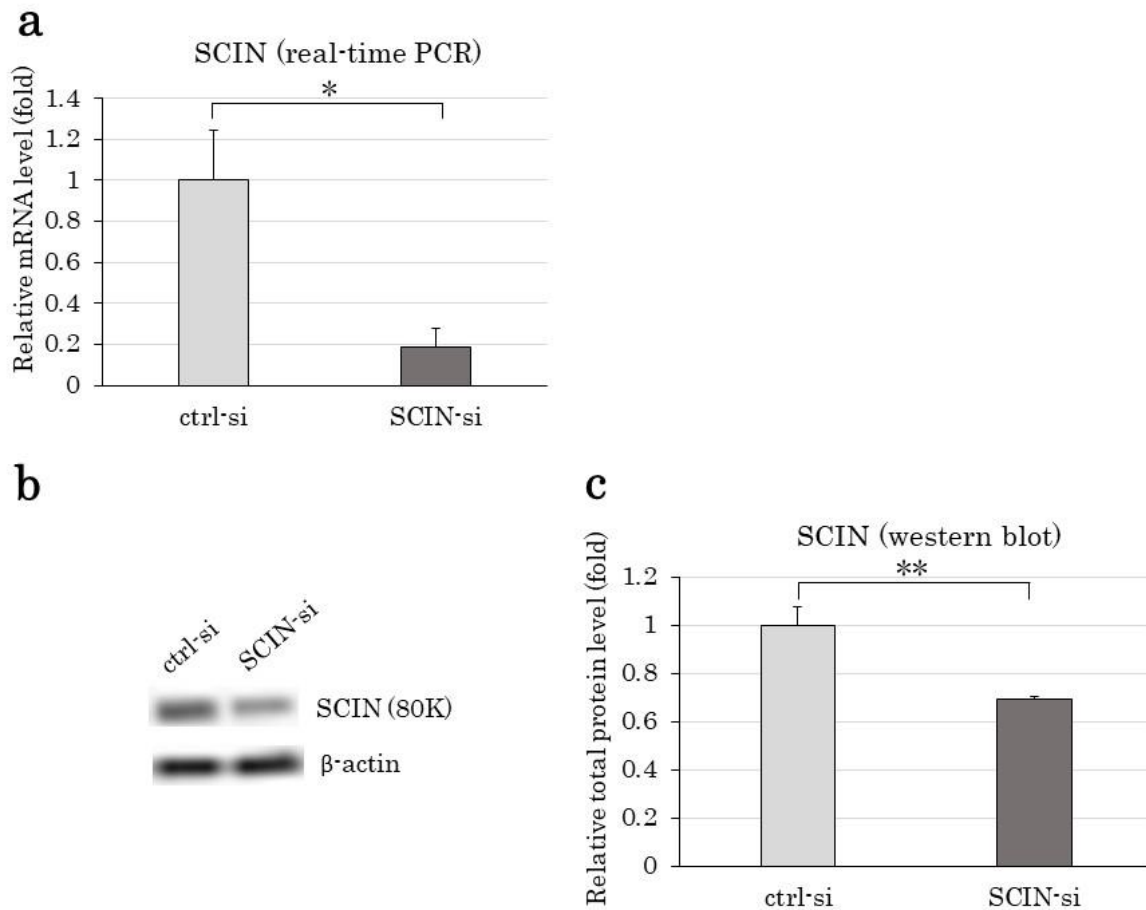


図 11 siRNA 導入による SCIN の発現抑制の確認

a : ISO-HAS-B に ctrl と SCIN の siRNA を導入したところ、real-time PCR では、mRNA の発現量が 82%抑制されている。内在性コントロールとして β-actin を使用した。

b, c : Western blot 法では、SCIN の発現が 28%低下している。

n=3 * $P=0.004$ ** $P=0.0159$

略語: ctrl, control ; mRNA, messenger ribonucleic acid ; SCIN, scinderin ; siRNA, small interfering RNA

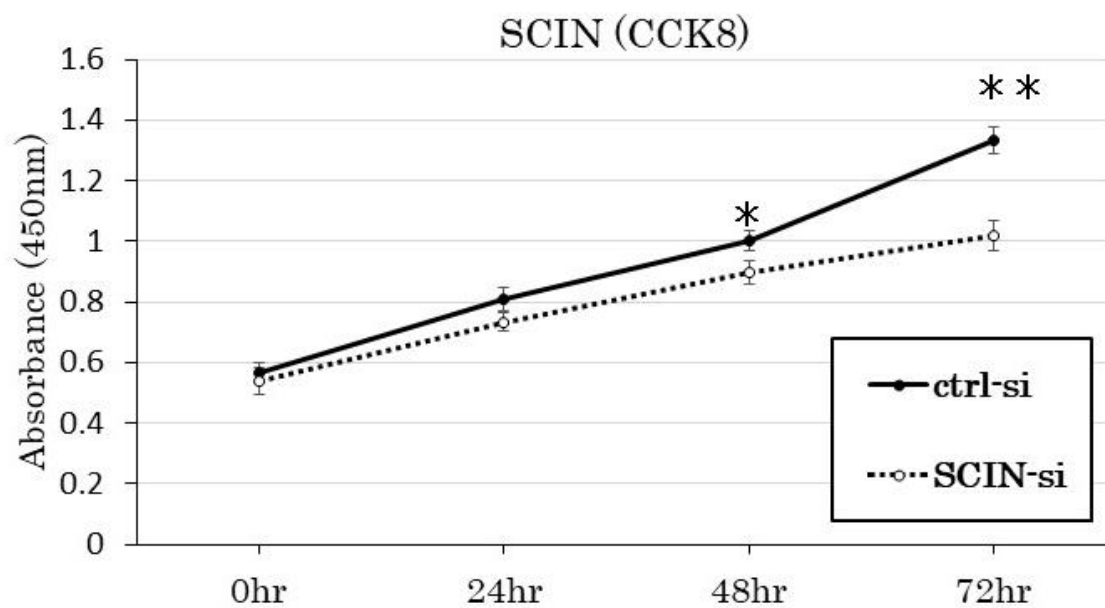


図 12 Cell Counting Kit-8 (CCK8) を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による細胞増殖能変化の解析

SCIN siRNA 導入後 0, 24, 48, 72 時間毎に CCK8 を反応させ、吸光度を計測した。

ISO-HAS-B における細胞増殖能解析では、SCIN siRNA 導入群の方が ctrl siRNA 導入群より 48 時間、72 時間後において吸光度が有意に低く、細胞増殖が低下している。

n=3 * $P=0.0016$ ** $P=0.0048$

略語: ctrl, control ; SCIN, scinderin ; siRNA, small interfering RNA

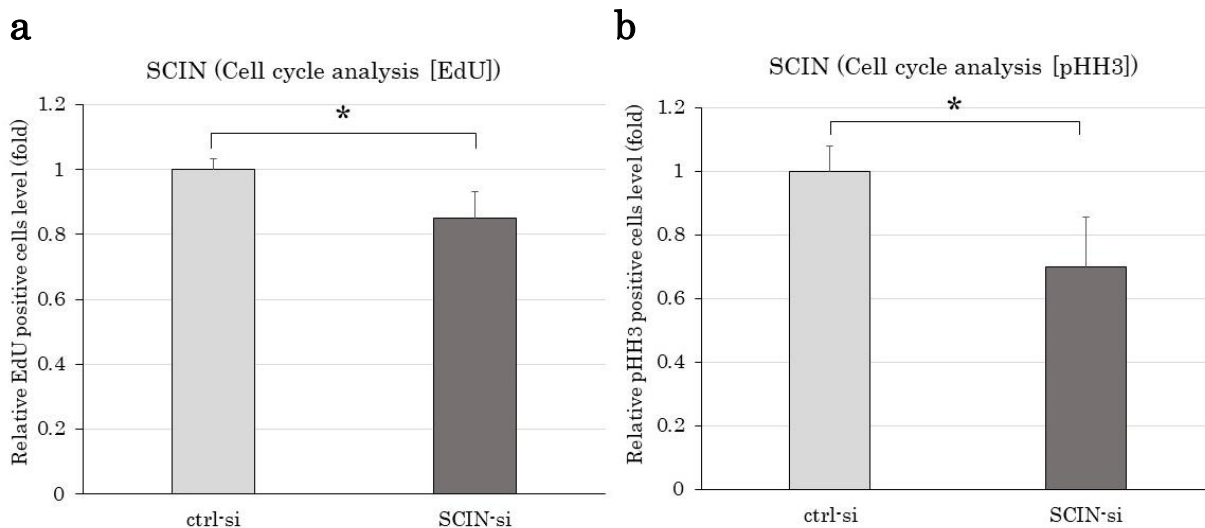


図 13 細胞周期マーカーの免疫細胞染色を用いた ISO-HAS-B 細胞に対する SCIN siRNA 導入

による S 期および G2/M 期細胞割合の変化の検討

ISO-HAS-B に ctrl と SCIN siRNA を導入して検討を行った。

a : EdU (S 期マーカー) 陽性細胞の割合は ctrl siRNA 導入群より SCIN siRNA 導入群の方が 20%低い。n=3 * $P=0.0418$

b : pHH3 (G2/M 期マーカー) 陽性細胞の割合は ctrl siRNA 導入群より SCIN siRNA 導入群の方が 29%低い。n=3 * $P=0.044$

略語: ctrl, control ; EdU, 5-ethynil-2'-deoxyuridine ; pHH3, phospho histone H3 ; SCIN,

scinderin ; siRNA, small interfering RNA

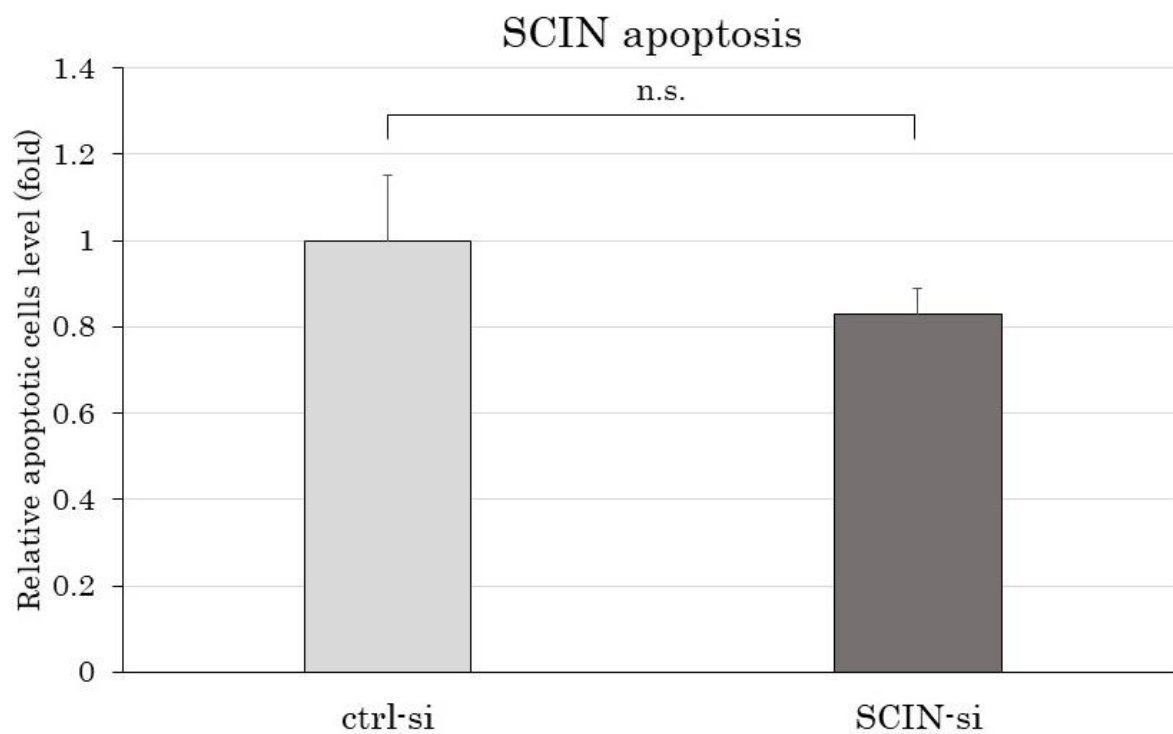


図 14 TUNEL 法を用いた ISO-HAS-B 細胞株に対する SCIN siRNA 導入によるアポトーシス

細胞割合の変化の解析

ISO-HAS-B に ctrl と SCIN siRNA を導入し、両者のアポトーシス細胞の割合を TUNEL 法で比較した。アポトーシス陽性細胞の割合は ctrl siRNA 導入群より SCIN siRNA 導入群の方が 17% 低い、統計学的有意差は認めない ($P = 0.119$)。

n=3 n.s., not significant

略語: ctrl, control ; SCIN, scinderin ; siRNA, small interfering RNA

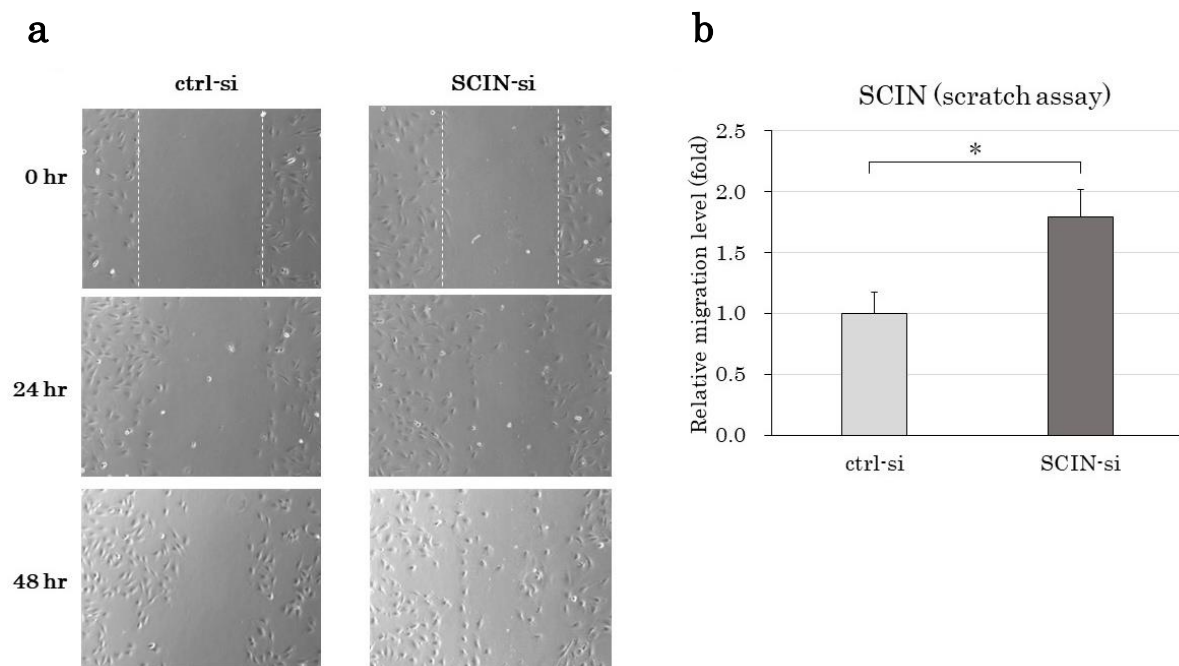


図 15 Scratch assay を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による細胞遊走能の変化の解析

a : ISO-HAS-B に ctrl、OPN siRNA を導入し、scratch 後 0, 24, 48 時間の ctrl siRNA 導入群と SCIN siRNA 導入群における scratch 後の変化を示す。48 時間後において、SCIN siRNA 導入群で細胞の遊走能がより亢進している。

b : Ctrl siRNA 導入群の 0~48 時間での遊走距離を 1 としたときの SCIN siRNA 導入群の遊走距離の相対値を示す。SCIN siRNA 導入群の方が、ctrl siRNA 導入群に比べ遊走距離が 1.8 倍大きく、遊走が促進している。

n=3 * $P=0.0177$

略語: ctrl, control ; SCIN, scinderin ; siRNA, small interfering RNA

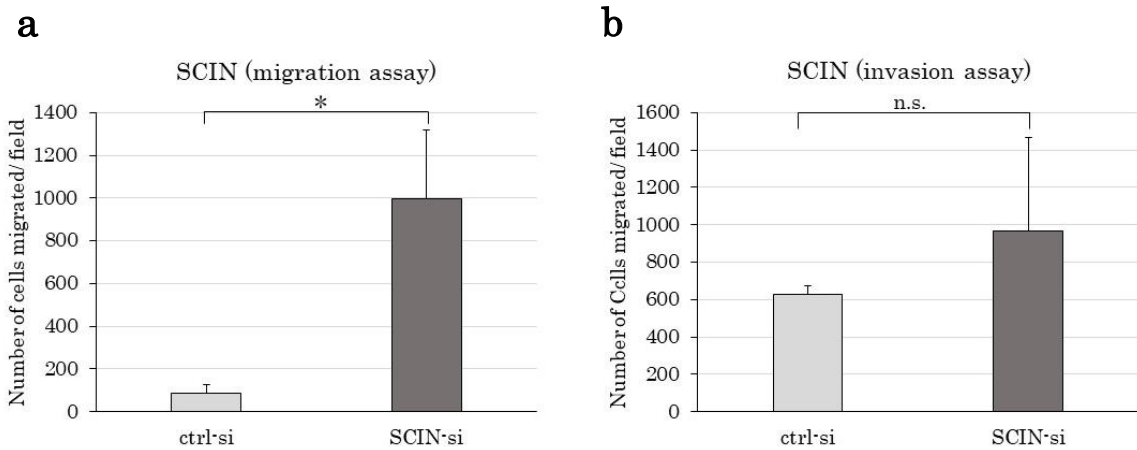


図 16 Transwell を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による細胞遊走/浸潤能の変化の解析

ISO-HAS-B に ctrl、SCIN siRNA を導入して検討を行った。

a : Migration assay では、下の well に遊走した細胞は ctrl で平均 87 個に対して、SCIN siRNA 導入群では 999 個と有意に多くみられる。

b : Invasion assay では、下の well に浸潤した細胞は ctrl で平均 626 個に対して、SCIN siRNA 導入群では平均 965 個と多いが、有意差はみられない。

SCIN siRNA 導入群で細胞の遊走能の亢進がみられる。

n=3 * $P=0.0079$ n.s., not significant

略語: ctrl, control ; SCIN, scinderin ; siRNA, small interfering RNA

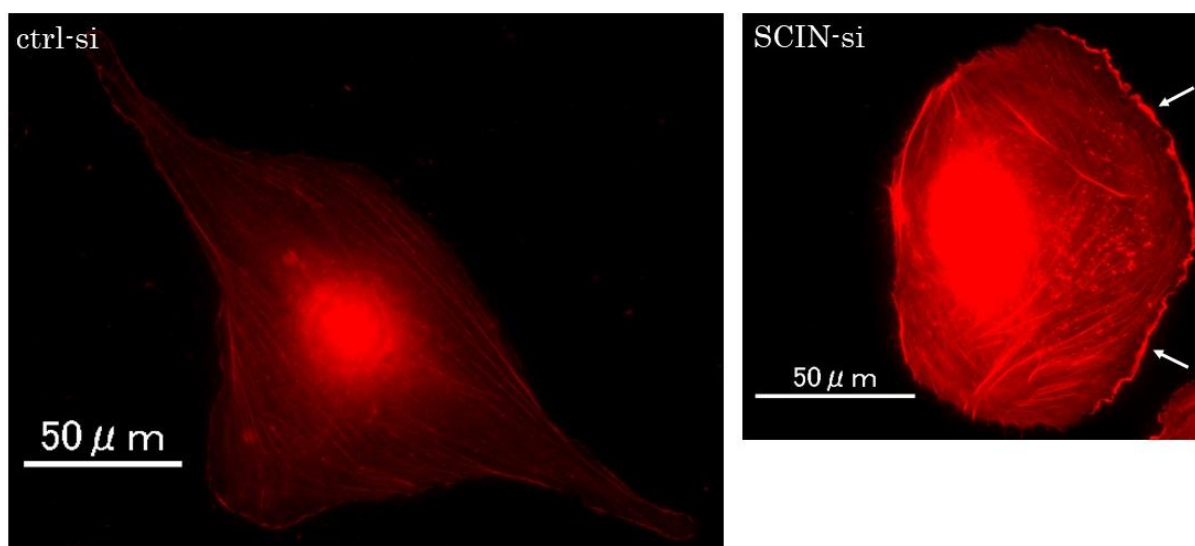


図 17 Phalloidin 染色を用いた ISO-HAS-B 細胞株への SCIN siRNA 導入による F-actin 発現

および細胞形態の変化の検出

ISO-HAS-B に ctrl、SCIN siRNA を導入して、F-actin の rhodamine phalloidin 染色を行った。

SCIN siRNA 導入群で F-actin の発現が亢進し、仮足形成（糸状、葉状）(白矢印)を伴う形態変化を認める（対物 60 倍）。

略語: ctrl, control ; F-actin, filamentous actin ; SCIN, scinderin ; siRNA, small interfering RNA

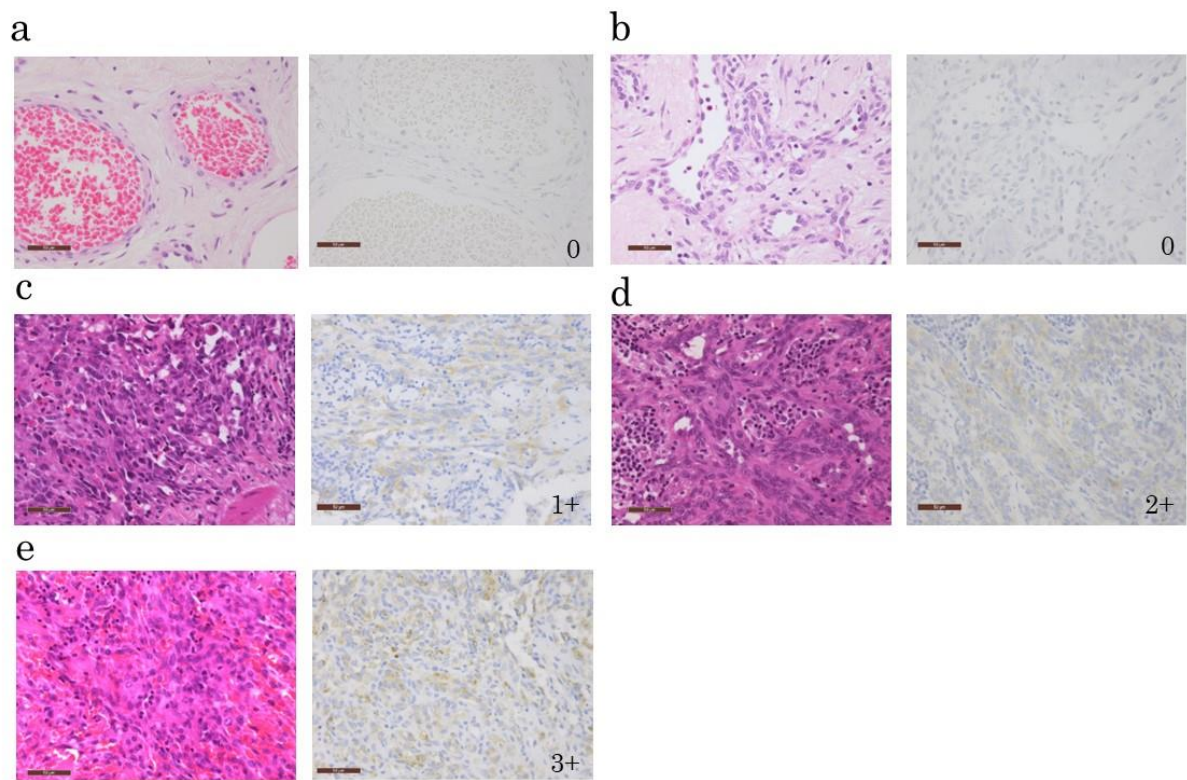


図 18 免疫組織化学法による SCIN 発現強度の判定例 (400 倍)

a, b: スコア 0 の良性血管性病変。a は単純性血管腫、b は化膿性肉芽腫の例。

c: スコア 1+の血管肉腫。

d: スコア 2+の血管肉腫。

e: スコア 3+の血管肉腫。

判定基準は本文参照。

a ~ e の各々左側はヘマトキシリン・エオジン染色、右は SCIN の免疫組織染色

スケールバーは 50μm を示す。

略語: SCIN, scinderin

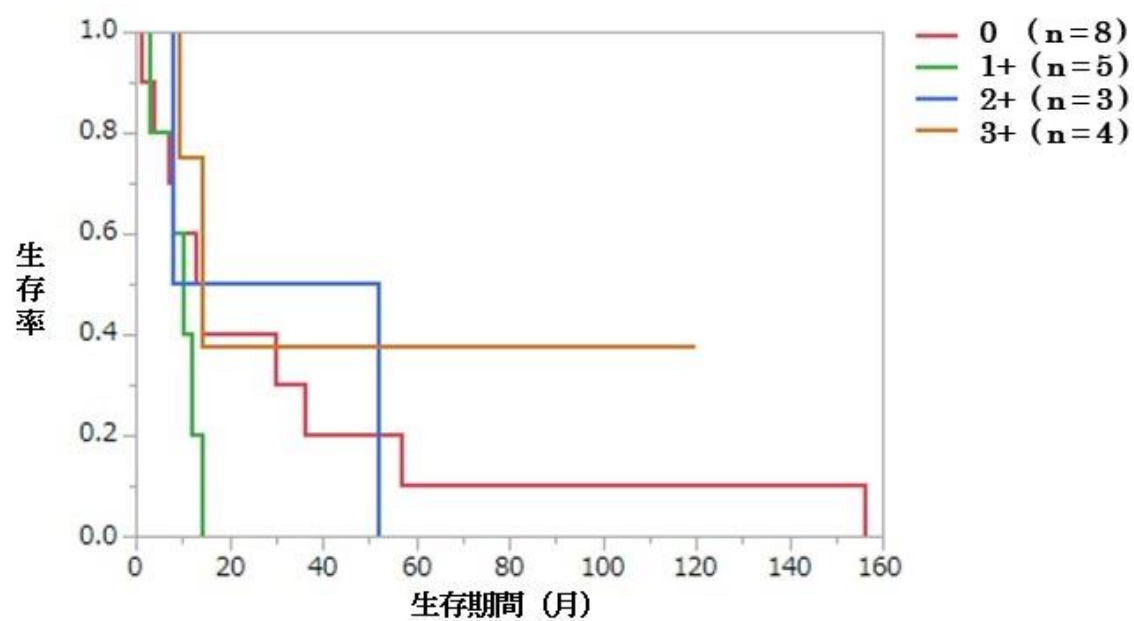


図 19 SCIN 発現強度別の生存曲線 (Kaplan-Meier 法)

SCIN 発現強度と生存率には有意な関連は認めない。

略語: SCIN, scinderin