

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18429

研究課題名(和文)炎症性サイトカインとmicroRNAは軟部腫瘍の診断・予後因子となりうるか？

研究課題名(英文) Diagnostic and prognostic analysis for soft tissue tumor using inflammatory cytokine and micro RNA

研究代表者

中村 知樹 (NAKAMURA, TOMOKI)

三重大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50467362

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：軟部腫瘍において予後や診断に関連を示したものは血清IL-6であった。IL-17は、良性および悪性で感度よりも上昇している検体はなかった。またヘプシジンなども正常であった。IL-6は悪性軟部腫瘍で有意に上昇しており、Logistic 回帰分析ではIL-6値の上昇は悪性であるOdd比が1.17(p=0.004)であり悪性の診断に有意なマーカーであった。また悪性軟部腫瘍患者59例における血清IL-6は単変量でHazard Risk(95%信頼区間)1.005 (1.002-1.008)、多変量解析でもHR(95%CI)1.003 (1.000-1.006)で有意に生命予後に関連していた。

研究成果の概要(英文)：We measured several kind of cytokines. Interleukin(IL)-6 was related to diagnosis in 99 patients with soft tissue mass. But, other cytokines including IL-17 were not elevated using ELISA technique. C-reactive protein (CRP) was strong co-relation with IL-6. IL-6 was useful in differentiation between benign and malignant tumors. Furthermore, we analyzed prognostic variables including IL-6 in 59 patients with soft-tissue sarcoma. IL-6 was prognostic factor for survival and event-free survival in multivariate analysis. We conclude that IL-6 may be a useful marker for diagnosis of soft tissue mass and prognostic factors for survival in soft-tissue sarcoma. Now, we analyze the relationship between micro RNA and soft tissue sarcoma.

研究分野：整形外科

キーワード：サイトカイン

## 1. 研究開始当初の背景

骨軟部腫瘍は稀な疾患であり、悪性骨腫瘍は全腫瘍のわずか 0.2%、悪性軟部腫瘍でも 0.8%と言われている。5 年累積生存率は 60%程度であり、決して良好であるとは言えない。現在特異的な腫瘍マーカーは存在せず、また化学療法の効果予測や予後予測が可能な biomarker も明らかにされていない。

近年炎症性サイトカインと悪性腫瘍との関連性が指摘されており、骨軟部腫瘍においても報告されている(Nakamura T et al. J Surg Oncol 2013 E-pub, Nakamura T et al. Cancer 2012;118(4):1055-1061, Nakamura T et al. Eur J Cancer 2012;49:377-385, Nakamura T et al. Bone Joint J 2013;95-B(3):411-418).

他の癌を含めて炎症性サイトカインは良性腫瘍では上昇しないが、悪性腫瘍では上昇しているとの報告が多く、そのため良悪性の診断の一助となりえる可能性が高い。申請者は血清高感度 CRP が軟部腫瘍における良悪性の鑑別に有用であったと報告したが(Anticancer Res 2014),より上流のサイトカインである Interleukin(IL)-6 や IL-17 などでの報告はない。またこれらのサイトカインの産生・誘導にがん間質が関連しているとの報告があり近年注目されている(Hoshino A et al. Cancer Res 2011)。がん間質にある腫瘍特異的マクロファージや線維芽細胞によってサイトカインの産生や誘導が生じると考えられているが、いまだ不明な点も多い。

一方で、microRNA が炎症と癌において確かな役割を持つ制御性分子種として注目されている。実際に Fountzilias らは平滑筋肉腫や脂肪肉腫において microRNA の発現を調べており、正常組織には発現しない、数種類の microRNA の発現を報告している

(Fountzilias E et al. BMC Genomics 2012;13:332)。さらには炎症性サイトカインの産生にも microRNA の発現が関しているとの報告も近年なされており(Chen Q et al. PLOS One 2012;7:e42971)、今後炎症と癌において共通して発現する microRNA の存在なども期待される。

## 2. 研究の目的

良悪性軟部腫瘍における血清炎症性サイトカインに加えて血清高感度 CRP、血清 CRP を測定し、その陽性率や測定値が良悪性の診断結果と相関するかどうかを検討する。またそれぞれのサイトカインの関連性についても検討する。腫瘍を摘出した場合は免疫組織学的検査を行うことで、特に腫瘍細胞と間質における相違など、局在についても追求していく。

また摘出した組織から microRNA を抽出し、その発現を解析する。悪性腫瘍や炎症性サイトカインが上昇している腫瘍に特異的な microRNA の発現があるかを検討する。最後に、悪性腫瘍に関してはその後の生命予後、局所制御とこれら血清サイトカインの関連性を検討する

## 3. 研究の方法

軟部腫瘍の治療あるいは生検前に採血を行い、遠心分離後に血清を -80 で保存し、ELISA 法を用いて検体を解凍後に各種サイトカインの測定を行った。また最大断面における腫瘍組織を抗 CRP 抗体および抗 IL-6 抗体で染色を行った。またこれらの結果を臨床情報と比較してその関連性についても解析を行った。また悪性腫瘍における IL-6 の産生と関連性があると報告されている microRNA(X)について良性腫瘍および悪性腫瘍での発現あるいは抑制について real time RT-PCR 法を用いて確認する。

#### 4. 研究成果

種々のサイトカインを 99 例の血清サンプルを使用して測定したが、良悪性の診断ツールおよび腫瘍学的予後や転帰に関連を示したものは血清 IL-6 であった。Pre-inflammatory cytokine といわれる IL-17 を測定するも、良性および悪性で感度よりも上昇している検体はなかった（悪性骨腫瘍でも測定したが、1 例のみ上昇していた）。またヘプシジンなど炎症下に上昇するタンパクもほぼ正常であった。IL-6 は悪性軟部腫瘍で有意に上昇しており、悪性で平均 35.9 pg/ml (中央値:9.04 pg/ml), 良性で 3.89 pg/ml (中央値:3.31 pg/ml) であった。その他年齢および腫瘍径が良悪性の診断に関連している因子であり、Logistic 回帰分析では IL-6 の上昇(pg/ml)は悪性である Odd 比が 1.17(p=0.004) であり悪性の診断に有意なマーカーであることが判明した。また CRP とは有意に強い相関を認めていた (Spearman =0.72, p<0.0001)。悪性軟部腫瘍患者 59 例における血清 IL-6 は単変量で Hazard Risk(95%信頼区間)1.005 (1.002-1.008), 多変量解析でも HR(95%CI)1.003 (1.000-1.006) で有意に生命予後に関連していた。なお IL-6 以外で多変量解析で有意に予後に関連する因子は腫瘍の組織学的悪性度であった。ROC 曲線にて閾値を 26.7 pg/ml と設定した場合、14 例が 26.7 pg/ml 以上であり、2 年生存率は 19%, 26.7 pg/ml 以下の 45 例では 80.3% であった。腫瘍サンプルを IL-6 および CRP をターゲットに染色を行ったが、血清で高値を示す症例の約半数でのみ陽性であり、局所と全身の炎症反応の結果が異なる結果であった。これは血清 IL-17 が陰性であることも考慮にいれると、局所での炎症の環境が必ずしも全身性の炎症性変化と一致していないことが示唆された。現在 IL-6 がサイトカインの中で Key であると考え、悪性腫瘍における IL-6 の上昇と関連があると報告されてい

る MicroRNA(X=非公表)について、腫瘍サンプルでの発現解析を開始している。今後血清での発現を解析して、サイトカインと同様の解析を行い、最終的にはこれらの関連性を明らかにしたい。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Sudo A. The role of C-reactive protein in predicting post-metastatic survival of patients with metastatic bone and soft tissue sarcomas. *Tumour Biol* 2015;36(10):7515-7520. 査読あり

2. Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma K, Sudo A. The value of the high-sensitivity modified Glasgow prognostic score in predicting the survival of patients with a soft-tissue sarcoma. *Bone Joint J* 2015;97-B(6):847-892. 査読あり

〔学会発表〕(計 2 件)

1. Nakamura T, Matsumine A, Matsubara T, Asanuma T, Sudo A. The role of pre-treatment serum albumin and C-reactive protein levels in patients with soft-tissue sarcoma patients. 11<sup>th</sup> Asian Pacific Musculoskeletal Tumor meeting (APMST), Singapore. 2016年4月21日-23日.

2. 中村知樹、松峯昭彦、浅沼邦洋、松原孝夫、大濱敏弘、飯野隆大、湊藤啓広. 軟部肉腫における治療前血清 interleukin-6 値の意義. 第 31 回日本整形外科学会基礎学術集会, 福岡国際会議場(福岡県福岡市) 2016年10月13-14日.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況（計0件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

中村 知樹 (NAKAMURA Tomoki)  
三重大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号：50467362

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )