

令和元年6月14日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19079

研究課題名(和文) カスタムアレイを利用した脱分化型脂肪肉腫の進展における分子生物学的機構の解明

研究課題名(英文) Prognostic factors of dedifferentiated liposarcoma detected using custom CGH array.

研究代表者

山下 享子 (Yamashita, Kyoko)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・研究員

研究者番号：50754975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：脱分化型脂肪肉腫において、遠隔転移・予後不良と関連する因子の解明を目的として、アレイ解析および臨床病理学的検討を行った。アレイCGHは、脱分化型脂肪肉腫で高頻度に増幅が起きることの知られている領域に高密度でプローブを配置して作成したカスタムアレイを用いた。アレイ解析からは、MDM2/HMGA2比が、病理学的検討からは、組織学的悪性度と細胞異型、MDM2の免疫染色態度が重要な予後因子であることが判明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって明らかになった予後予測因子は、個々の患者の予後予測に有用であるばかりでなく、MDM2/HMGA2比が予後と関連するという結果は、脱分化型脂肪肉腫の病態解明の一助となり、また免疫染色上MDM2の発現が高いほど予後不良であるという結果は、治療薬の開発にも糸口を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：For the purpose of clarifying the factors related to the distant metastasis and poor prognosis in dedifferentiated liposarcoma, array CGH analysis and clinicopathological analysis were performed. We used a custom CGH array, which included dense coverage for genes in the areas known to be frequently amplified in dedifferentiated liposarcoma. As a result, High MDM2/HMGA2 ration in array CGH and histological grade, cellular atypia and MDM2 immunoreactivity in pathological analysis proved to be important prognostic factors.

研究分野：pathology

キーワード：脱分化型脂肪肉腫 カスタムCGHアレイ 予後因子

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 高分化型脂肪肉腫は、高齢者に多く発生する最も頻度の高い肉腫の一つであるが、最新の WHO 分類では Atypical lipomatous tumor の同義語として中間悪性 Intermediate (locally aggressive) に分類されている。その一部は脱分化を起こし、転移能を獲得して、まぎれもない悪性腫瘍(脱分化型脂肪肉腫)になることが知られているが、脱分化における分子生物学的機構は明確でない。

(2) 高分化型および脱分化型脂肪肉腫は、MDM2 遺伝子を含む 12q13-15 の増幅を伴った環状染色体やマーカー染色体を有することが特徴で、症例によって、1p32, 1q21-q22, 6q23 などの増幅も伴うことがある。1p32 と 6q23、各々の領域に含まれる c-JUN, MAP3K5(ASK1)は JNK pathway を構成し、脂肪分化抑制への関与が示唆されているものの、この増幅だけでは本腫瘍における脂肪分化抑制、つまり脱分化を十分に説明できない。

(3) 12q13-15 においては、腫瘍の原因遺伝子とされる MDM2 のほか、多数の腫瘍関連遺伝子が同定されている。CDK4 の高度増幅が予後不良因子であることは以前から知られているが、ごく最近になって HMGA2 の近位部 (exon 3 まで) の増幅が、高分化型の表現型、予後良好と関連していることが示された(Mod Pathol. 2015 Sep 4.)。他にも 12q13-15 には、FRS2, TSPAN31, OS9, DDIT3, GLI1, STAT6 といった腫瘍関連遺伝子が存在する。これまで MDM2 以外には CDK4 に着目した研究が圧倒的に多かったが、lipoma など融合遺伝子を形成する HMGA2 の他、myxoid liposarcoma で融合遺伝子を形成する DDIT3 や、組織学的に脱分化型脂肪肉腫の一部とよく類似した solitary fibrous tumor で癒合遺伝子を形成する STAT6 など、この領域には注目に値する遺伝子が密在している。

(4) また古典的には、脱分化型脂肪肉腫は、高分化型脂肪肉腫に隣接する高悪性度で多形性の目立つ腫瘍として理解されてきたが、近年多形性の目立たない「low grade dedifferentiation」という現象が知られるようになってきた。一方で高分化型脂肪肉腫の壺型として、線維成分の目立つ硬化型脂肪肉腫があり、細胞密度が中等度の場合や膨張性の結節形成が不明瞭な場合など、高分化型脂肪肉腫と脱分化型脂肪肉腫との形態学的区別には必ずしも明確なコンセンサスがなないのが実情である。

## 2. 研究の目的

現在まで、脂肪肉腫を高分化型と脱分化型に二分できるような遺伝子変異が特定されていない背景には、BAC based array やカタログアレイでは解像度が十分でなく、正確な増幅・欠失の範囲や、小範囲での変異が同定できていない可能性がある。

本研究は、12q13-15 を中心として増幅・欠失の知られている染色体領域に高密度にプローブを配置したカスタム CGH アレイを使用することで、腫瘍の進展や悪性度に相関する遺伝子増幅や欠失を、その詳細な領域を含めて明確にし、治療標的になりうる遺伝子(とその領域)を同定することが目的である

## 3. 研究の方法

(1) 最終的に 2001 年から 2015 年までに名古屋大学医学部附属病院で原発病変を切除された脱分化型脂肪肉腫の 29 症例に、2007 年から 2010 年の間に同病院で原発巣切除された高分化型脂肪肉腫のうち切除後 5 年以上観察期間のある 5 症例、2007 年から 2009 年までの間に九州大学病院で原発巣切除された脱分化型脂肪肉腫 3 症例を加えた全 37 症例において、カスタムアレイによるアレイ CGH を実施した。

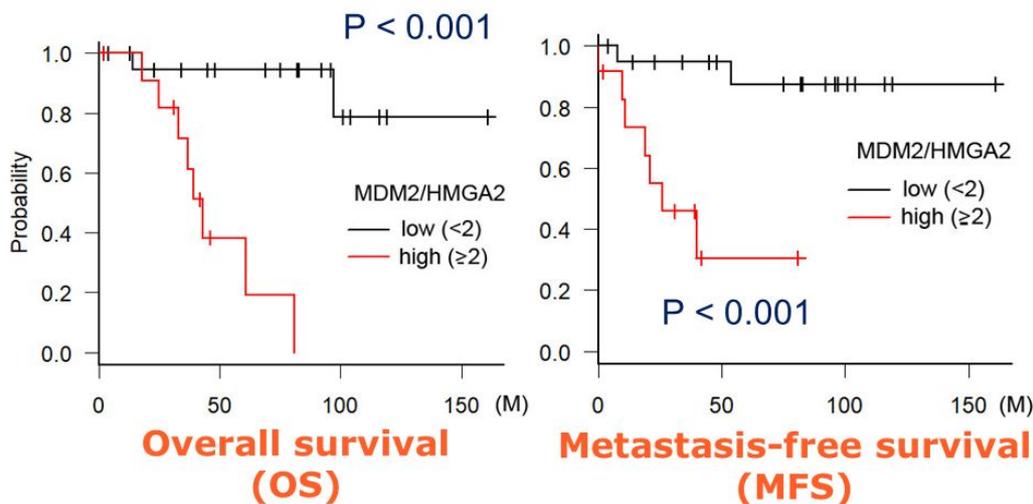
(2) またこれらの脱分化型脂肪肉腫 32 症例に、炎症細胞浸潤が多く非腫瘍細胞が多数混入するなどの理由で十分量の適切な DNA が採取できない、あるいは適切なラベル化が行えなかった症例を加えた脱分化型脂肪肉腫全 44 症例につき、病理組織学的検索を行ない、全生存率および無遠隔転移生存率と関連する因子について調べた。

## 4. 研究成果

(1) カスタムアレイについては、SurePrint G3 Custom CGH Microarray, 8x60K (Agilent Technologies)を用い、脱分化型脂肪肉腫で高頻度に増幅がみられることの知られている領域(1q21-24, 6q23-24, 12q13-15, 12q23-24, JUN) 欠失が予後不良と関係しているとの報告がある領域(19q13) また一般的に腫瘍発生や悪性転化に重要な役割をはたすことの知られている遺伝子領域(KIT, PDGFRA, PTEN, RB1, TP53, CDKN2A, CDKN2B, EGFR)に、高い密度でプローブを配置した。プローブ間距離の中央値は、exon 領域では 314-358bp (6q23-24)あるいは 624-829bp (その他の領域)、非 exon 領域では 2.5kb とした。



(2) 解析では、まず遠隔転移をきたし原病死あるいは原病による終末期状態で観察を終了した 8 例を予後不良群に、腫瘍切除後 5 年以上再発・転移のなかった 14 例を予後良好群に設定した。次に、amplification ( $\log_2 \text{ratio} > 2$ ) の見られた遺伝子を症例ごとに抽出し、それぞれの群で増幅のみられる頻度が高かった遺伝子を抽出した。その後、抽出した遺伝子について、予後不良群と予後良好群の両方で増幅のみられた割合を調べ、その差が大きいものをリストアップした。その中から増幅頻度の高い遺伝子である MDM2 と HMGA2 を選び、脱分化型脂肪肉腫の全症例で相対的なコピー数を調べて MDM2/HMGA2 比を計算し、simple Cox model を用いて解析したところ、全生存率と有意な関連が認められた。さらに  $\log [\text{MDM2}/\text{HMGA2}]$  の平均は約 1、すなわち実際の MDM2/HMGA2 の平均は約 2 であり、MDM2/HMGA2 が 2 以上と 2 未満との 2 群に分けて、Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成し、Log rank Test により生存率曲線の差の検定を行ったところ、全生存率および無遠隔転移生存率のいずれにおいても  $P < 0.001$  となる明白な関連が認められた。また予後不良群では、予後良好群と比較して増幅のみられた遺伝子数が有意に多く、染色体異常の複雑性が予後不良因子である可能性が示された。



(3) 同時に施行した臨床病理学的検討では、組織学的評価項目として、組織学的悪性度、細胞異型、炎症細胞浸潤の程度を、免疫組織化学による評価項目として、MDM2, desmin,  $\alpha$ SMA の染色態度を取り上げた。組織学的悪性度は、FNCLCC grading system のうち、腫瘍分化度を示すスコアを細胞異型を示すスコアに置き換えた modified FNCLCC grading system を用いて評価した。細胞異型は、軽度から中等度と高度の 2 群に、炎症細胞浸潤は中等度以下と高度の 2 群に分けて評価した。MDM2 の免疫染色態度は、中等度以下の陽性所見とびまん性強陽性の 2 群に分けて評価し、desmin と  $\alpha$ SMA の免疫染色態度は、10% 以上の腫瘍細胞に染色性がみられたものを陽性と判断し陽性と陰性の 2 群に分けて評価した。組織学的悪性度と細胞異型については、術前治療の施行された症例は評価対象から除外した。

全生存率および無遠隔転移生存率について、Kaplan-Meier 法により生存曲線を作成し、Log rank Test により生存率曲線の差の検定を行ったところ、組織学的悪性度、細胞異型、MDM2 の免疫染色態度は全生存率と有意な関連が認められ、また細胞異型は無遠隔転移生存率とも有意な関連が認められた。一方、免疫染色における筋性分化 ( $\alpha$ SMA, desmin の免疫染色態度) は、予後との関連は認められなかった。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 2 件)

Yamashita K, Kohashi K, Yamada Y, Ishii T, Nishida Y, Urakawa H, Ito I, Takahashi M, Inoue T, Ito M, Ohara Y, Oda Y, Toyokuni S. Osteogenic differentiation in dedifferentiated liposarcoma: a study of 36 cases in comparison to the cases without ossification. *Histopathology*. 2018;72(5):729-38.

Yamashita K, Kohashi K, Yamada Y, Nishida Y, Urakawa H, Oda Y, Toyokuni S. Primary extraskeletal osteosarcoma: a clinicopathological study of 18 cases focusing on MDM2 amplification status. *Hum Pathol*. 2017;63:63-9.

〔学会発表〕(計5件)

Yamashita K, Kohashi K, Yamada Y, Akatsuka S, Toyokuni S, Oda Y. Prognostic impact of the MDM2/HMGA2 ratio and clinicopathological factors in well-differentiated and dedifferentiated liposarcoma. 107th Annual Meeting of the United-States-and-Canadian-Academy-of-Pathology (USCAP); MAR 16-21, 2019. National Harbor, Maryland.

Yamashita K, Kohashi K, Yamada Y, Oda Y, Toyokuni S. Clinicopathological and Molecular Features of Dedifferentiated Liposarcoma with Ossification: A Comparative Study with Dedifferentiated Liposarcoma without Ossification and Extraskkeletal Osteosarcoma. 106th Annual Meeting of the United-States-and-Canadian-Academy-of-Pathology (USCAP); MAR 4-10, 2017. San Antonio, TX

山下享子、孝橋賢一、山田裕一、伊藤以知郎、小田義直、豊國伸哉. 脱分化型脂肪肉腫における骨形成の特徴と予後との関連. 第107回日本病理学会総会 2018年6月21日-23日. 北海道.

横山翔大、山下享子、豊國伸哉. 脱分化型脂肪肉腫に寄与するゲノム変化についての検討. 第107回日本病理学会総会 2018年6月21日-23日. 北海道

佐々木和磨、山下享子、豊國伸哉. 脱分化型脂肪肉腫における組織所見と予後との関連. 第106回日本病理学会総会 2017年4月27日-29日. 東京.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

該当なし

必ず研究機関で管理している収支簿と照会後に入力をしてください。

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。