

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07004

研究課題名(和文) 異型脂肪腫様腫瘍から脱分化型脂肪肉腫への脱分化現象に関与する分子機序の解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of dedifferentiation in dedifferentiated liposarcoma

研究代表者

松山 篤二 (Matsuyama, Atsuji)

産業医科大学・大学病院・講師

研究者番号：80351021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：異型脂肪腫様腫瘍から脱分化型脂肪肉腫への変化は腫瘍の悪性度を規定する現象であるが、その分子機序は解明されていない。次世代シーケンスを用いて3例の脱分化脂肪肉腫、異型脂肪腫様腫瘍の両成分のmRNA発現を網羅的に調べ、責任的役割を果たす分子異常を見出すことを目的とした。パスウェイ解析にて3例に共通した発現変動遺伝子は約150種類検出されたが、発がんや細胞周期に関与する因子は少なく意義が不明なものが多く、脱分化に責任的役割を果たしたと考えられる分子異常の絞り込みや特定するのは困難であった。数種の分子はその候補として挙げられるため、培養条件下で発現抑制による異型脂肪腫様腫瘍に与える影響を検討中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

染色体12q15領域の増幅は異型脂肪腫様腫瘍の発生に重要な役割を果たし、脱分化型脂肪肉腫にも維持されているが、脱分化現象に関与する分子異常は明らかにされていない。脱分化型脂肪肉腫は異型脂肪腫様腫瘍から生じた非脂肪性肉腫であるもののその組織像や異型度は多彩である。今回、脱分化の分子機序を明らかにするために異型脂肪腫様腫瘍成分と脱分化型脂肪肉腫成分両者を網羅的に解析したが、脱分化の責任的役割を果たす分子異常は見出されなかった。脱分化の分子異常も組織像同様に多彩で共通していない可能性が示唆される。

研究成果の概要(英文)：Dedifferentiation from atypical lipomatous tumor to dedifferentiated liposarcoma is the phenomenon that influence the biological behavior of the tumor, but its molecular mechanism has been still unclear. We examined the expression of mRNA of both atypical lipomatous tumors and dedifferentiated liposarcomas components of three cases using next generation sequence analysis to find the molecular abnormalities responsible for the dedifferentiation. About 150 molecular abnormalities were detected to be common to all the cases based on the pathway analyses, but genes associated with tumorigenesis or cell cycle were few among them and it was difficult to confirm the responsible molecular abnormalities in the differentiation phenomenon in dedifferentiated liposarcomas. We are continuing the experiments of cell culture with inhibitors of some genes to find their influences to atypical lipomatous tumor cells.

研究分野：病理学

キーワード：軟部肉腫 脂肪肉腫 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟部腫瘍には良性腫瘍、悪性腫瘍のほかに、中間悪性腫瘍が存在し、中間悪性腫瘍は極めて稀に転移する群と、局所浸潤性に増殖するが転移能はない群とに分けられる。腫瘍はそれぞれの腫瘍細胞の分化の方向性によって分類されるが、脱分化が起こることによって、その腫瘍が本来持っていた分化能を失い、異なる分化を示す腫瘍に形質が変化する場合がある。悪性度に着目すると、脱分化が起こることにより一般には悪性度が増す。転移能を有さない中間悪性腫瘍である異型脂肪腫様腫瘍(高分化型脂肪肉腫)が脱分化型脂肪肉腫となることによって転移能を獲得するのはその代表的な例である。しかし、脱分化現象の分子機構はほとんど明らかにされていないのが現状である。

2. 研究の目的

我々は、骨軟部腫瘍の脱分化現象の根幹をなす分子機構を解明するために本研究を企画した。代表的な脱分化型腫瘍である脱分化型脂肪肉腫を対象とし、同一症例の異型脂肪腫様腫瘍成分(脱分化前の腫瘍成分)と脱分化脂肪肉腫成分における mRNA 発現の変動を解析することにより、脱分化に責任的な役割を果たすと考えられる因子を見出すことを目的とした。

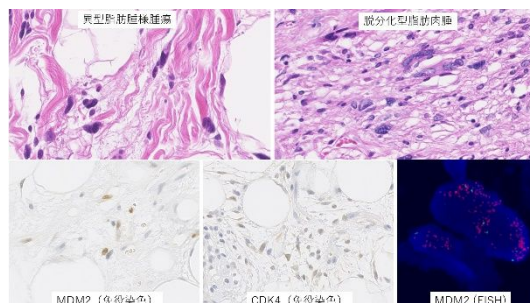
3. 研究の方法

異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫それぞれの成分から次世代シーケンス(NGS)解析を施行することができる症例を対象とした。術前に脱分化脂肪肉腫の診断が得られている、あるいは脱分化脂肪肉腫の診断が予想される症例に関して、手術にて摘出された腫瘍組織のうち病理組織学的診断に必要とされない余剰組織検体から解析用サンプルを採取し、NGSにより一定の mRNA 発現の情報が得られれば、異型脂肪腫様腫瘍、脱分化型脂肪肉腫のパラフィンブロックを用いて免疫組織化学でそれらの発現を検討した。さらに、術前に異型脂肪腫様腫瘍の診断が得られている症例に関して、手術にて摘出された腫瘍組織のうち病理組織学的診断に必要とされない余剰組織検体から腫瘍組織を採取し、初代組織培養による検討を予定した。

4. 研究成果

(1) 脱分化型脂肪肉腫の症例収集

脱分化型脂肪肉腫の手術が当初予想していたより少なく、実際に手術が行われた場合でも脱分化成分あるいは異型脂肪腫様腫瘍成分のいずれかしか採取できない例も多く、研究の進行が遅延した。当初は5例での検討を予定していたが、最終的に4例を収集した。左図のような形態学的観察に加え、免疫組織化学ならびに FISH 法を用いて、異型脂肪腫様腫瘍、脱分化型脂肪肉腫の診断を確定し NGS 解析を行うこととした。



(2) RNA 抽出と品質検査

各症例の異型脂肪腫様腫瘍成分と脱分化型脂肪肉腫成分の両者から採取された新鮮凍結検体から RNA を抽出した。total RNA 量、A260/A280 を確認し、RNA 品質検査に進んだ。RNA 品質検査で品質不良のサンプルは再抽出を行うなどし、最終的に4例8サンプル中、7サンプルでは RIN 値が7以上であったが、1サンプルは2.0であったため NGS 解析には適さないと考えられた。その結果、3例6サンプルで NGS 解析を行うこととした。

	Nanodrop		Bioanalyzer		サンプル量	
	A260/A280	A260/A230	ng/ul	28S/18S RIN	μg	
症例1D	1.95	1.74	834.3	0.78	7.3	20.858
症例2D	2.11	2.2	615.7	1.12	7.5	46.412
症例3D	2.13	2.25	782.9	1.43	8.4	70.458
症例4D	2.1	2.22	415.3	1.38	7.6	37.373
症例1A	2.11	1.97	152.3	1.63	7.3	13.708
症例2A	2.1	1.55	60.1	1.09	7.9	5.405
症例3A	2.1	1.16	138.4	1.72	8.3	12.456
症例4A	1.76	1.26	14.7	1	2	1.319

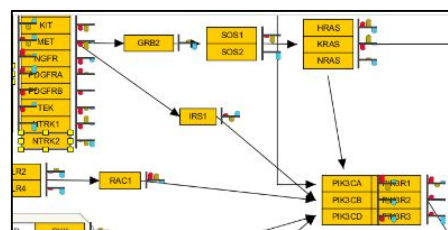
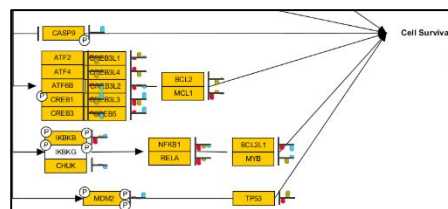
D: 脱分化脂肪肉腫成分 A: 異型脂肪腫様腫瘍成分

(3) 異型脂肪腫様腫瘍成分と脱分化型脂肪肉腫成分

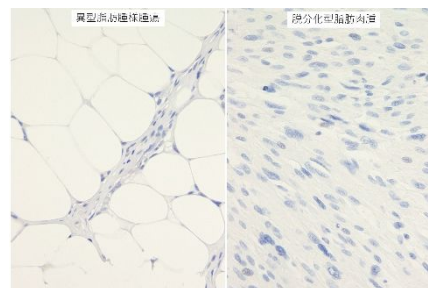
の RNA を NGS 解析し、その発現を Cuffdiff プログラムの統計検定結果を用いて、パスウェイ解析を進めた。パスウェイ解析の結果、mRNA 発現変化を示した発現変動遺伝子 (DEG) のうち3例に共通するものがいくつか認められた。A) 右表のように、ほとんどが脂肪分化に関する発現の変化であり、これらは異型脂

Pathway	p-value	Matched Entities	Pathway Entities of Experiment Type
Hs Transcriptional regulation of white adipocyte differentiation WP2751 113326		0	10
Hs PPAR signaling pathway WP3942 106517	3.25E-07		6
Hs Differentiation of white and brown adipocyte WP2895 87889	4.80E-06		4
Hs Metapathway biotransformation Phase I and II WP702 106643	5.20E-06		7
Hs Signaling b ERBB4 WP2781 113489	1.08E-04		4
Hs Triacylglyceride Synthesis WP325 107140	1.15E-04		3
Hs Transcription factor regulation in adipogenesis WP3599 105845	1.33E-04		3
Hs Retinoid metabolism and transport WP3839 113124	2.48E-04		3
Hs Adipogenesis WP236 105873	2.94E-04		3
Hs Lipid particle organization WP4051 113209	3.03E-04		2

脂肪腫様腫瘍から脱分化脂肪肉腫に変化するのに必要な、いわゆるドライバー遺伝子としての働いているのではなく、むしろ脱分化現象による結果であろうと考えられた。B)パスウェイ解析の結果 (Pathway Map) の一部を右上図、右下図に示す。各遺伝子の横に表示されている棒グラフは各症例における (脱分化成分の発現量) / (高分化成分の発現量) で表される発現比 (log fold change) を示している。3例に共通した DEG は Map 上に 150 種類以上が検出された (重複があるため正確な遺伝子数は確認できていない)。これらはシグナル下流の分子に一定の発現の変化は認められないものがほとんどであり、それらの意義は不明であった。以上から、DEG から実際に脱分化現象に重要な役割を果たしていると考えられる因子を絞り込むことは容易ではなかった。C)過去の研究から異型脂肪腫様腫瘍、脱分化型脂肪肉腫ともに MDM2 の増幅が見られることが知られているが、脱分化型脂肪肉腫では増幅の程度が大きいことが報告されているため、MDM2 の更なる増幅が脱分化に関与しているのではないかと予想していたが、右上図のように MDM2 発現の増加は軽度で、その下流の TP53 の発現の変化も一定しておらず、脱分化におけるそれらの関連性は乏しいと考えられた。D)NTRK2 は 3 例で共通して脱分化型脂肪肉腫において発現の低下がみられた (右下図)ため、シグナル下流の分子に一定の発現の変化はみられないものの脱分化現象に関与している可能性があるのではないかと考えられた。同様に NF B も脱分化現象に関与する分子の候補に挙げられた。



(4)NTRK2 と NF B に関しては免疫組織化学にて脱分化に伴う発現の変化を検討した。脱分化型脂肪肉腫 14 例と異型脂肪腫様腫瘍 23 例を収集し市販の pan-TRK ならびに NF B の一次抗体を用いて免疫組織化学を行った。pan-TRK はごくわずかな陽性細胞はみられるもののいずれの症例も有意な陽性所見は得られず陰性であり (右図)、免疫組織化学と NGS による結果に乖離があり、その意義を考察することは困難であった。NF B についても脱分化型脂肪肉腫と異型脂肪腫様腫瘍いずれも全例で明瞭な陽性像は確認できず、評価困難であった。



(5)以上の現段階で得られた結果をまとめると、脱分化型脂肪肉腫は異型脂肪腫様腫瘍から発生する非脂肪性腫瘍であるがその組織像は多彩であり、脱分化の分子機序もその組織像同様多彩であり一定していない可能性が推察される。このことは、未分化多形肉腫や平滑筋肉腫など、「多形性肉腫」としてまとめられることが多い組織像の多彩な肉腫が複雑な遺伝子異常を有し未だ特定のドライバー遺伝子異常が見出されていないこと、脱分化型脂肪肉腫も「多形性肉腫」に属する腫瘍と考えられることから、矛盾しない結果であるとも言える。

(6) (5)で考えられた結論の一方で、いまだ検討の余地は残されていると考えられる。NTRK2 を含め検出された DEG のうち、特に異型脂肪腫様腫瘍よりも脱分化型脂肪肉腫で発現が低下したものに関しては、異型脂肪腫様腫瘍の初代培養条件下でインヒビターを投与することにより異型脂肪腫様腫瘍が脱分化に相当する形態変化を示さないか検討を予定したが、異型脂肪腫様腫瘍の手術が行われず期限内に検討を終了することができなかった。この点に関しては研究期間を延長して、さらに検討を継続していく予定である。

(7)異型脂肪腫様腫瘍の症例収集において、形態学的に褐色脂肪腫に類似した組織像を示す例に遭遇し、貴重な例と考えられた。本来の本研究の趣旨とは異なるが、褐色脂肪腫における MDM2 発現と合わせ、教室の大学院生が研究としてまとめた (Tsuda Y, Matsuyama A, Hisaoka H, et al. Nuclear expression of MDM2 in hibernoma: a potential diagnostic pitfall. Virchows Arch. 478: 527-534, 2021)。また、NTRK 遺伝子異常を示す軟部腫瘍が新たな疾患概念として報告されているが、中には脂肪成分を含むものもあり、脂肪性腫瘍との鑑別が必要になる可能性がある。本研究の趣旨とは異なるが、第 110 回日本病理学会における発表にて、NTRK 異常を伴う軟部腫瘍に関する口演で、脂肪成分を含み脂肪性腫瘍に類似する症例についても供覧した (松山篤二、久岡正典. NTRK 融合遺伝子関連軟部腫瘍. 第 110 回日本病理学会総会.)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tsuda Y, Matsuyama A, Makihara K, Higaki K, Motoi T, Okuma T, Hisaoka M.	4. 巻 478
2. 論文標題 Nuclear expression of MDM2 in hibernoma: a potential diagnostic pitfall.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 527-534
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-020-02914-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松山篤二
2. 発表標題 NTRK融合遺伝子関連軟部腫瘍
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	久岡 正典 (Hisaoka Masanori) (40218706)	産業医科大学・医学部・教授 (37116)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------