

機関番号：16401
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20790284
 研究課題名 (和文) 粘液型脂肪肉腫における PCR 法及び FISH 法を用いた腫瘍特異的遺伝子異常の解析
 研究課題名 (英文) Detection of CHOP gene rearrangements in myxoid liposarcoma by PCR and FISH analyses
 研究代表者
 岡本 純佳 (OKAMOTO SUMIKA)
 高知大学・教育研究部医療学系・助教
 研究者番号：10279325

研究成果の概要 (和文)：

粘液型脂肪肉腫は TLS/FUS-CHOP 融合遺伝子を有している。本研究ではパラフィン包埋組織を用いた RT-PCR 法および FISH 法を施行し、同遺伝子変異の検出感度を比較した結果、FISH 法の方が再現しやすいことが示された。また FISH 法では同一腫瘍内で形態学的に異なる部 (粘液腫様部、白色脂肪部、褐色脂肪部並びに円形細胞部) 毎に解析し、同変異遺伝子の局在性を検討した結果、各部において等しく再構成のシグナルが観察された。このことより TLS/FUS-CHOP 融合遺伝子は形態学的な形質発現に直接的に関与していない可能性が示唆された。

研究成果の概要 (英文)：

Myxoid liposarcoma has the specific fusion gene such as TLS/FUS-CHOP. We tried to detect TLS/FUS-CHOP fusion gene transcript by RT-PCR or CHOP gene rearrangement by FISH using formalin-fixed paraffin-embedded specimens. Contrasting the two analyses, FISH was more sensitive than RT-PCR. The histologically different components involving myxomatous, white adipose, brown adipose and round cell ones in the same tumor had the identical CHOP gene rearrangement. It suggests that the phenotypic expression of the inside of myxoid liposarcoma are not directly influenced by TLS/CHOP fusion gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	900,000	270,000	1,170,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：軟部腫瘍, 粘液型脂肪肉腫, 腫瘍特異的融合遺伝子, RT-PCR, FISH, TLS/FUS-CHOP

1. 研究開始当初の背景

ヒト軟部悪性腫瘍は組織形態や機能分化が多様性に富んでおり、これを反映して組織分類における腫瘍の種類が非常に多い。更に組織起源の異なる腫瘍が互いに極めて近似した組織像を呈することもあり、病理組織診断業務の上で難渋することが稀ではない。近年

の遺伝子解析技術の進歩によって多くの軟部腫瘍で特異的な遺伝子異常が同定されてきており、従来の形態学的観察に加えて分子生物学的方法を用いた腫瘍特異的遺伝子異常の検出が病理診断に応用されつつある。

腫瘍特異的遺伝子異常に関する知見は分子病理診断に利用されるのみならず、未だ

不明な点が多い軟部腫瘍の生物学的特性の解明に寄与すると予想される。なぜなら細胞の形態や機能分化は主としてその細胞の持つ遺伝子の発現によって支配されるという考えに基づき、腫瘍細胞と正常細胞との間あるいは組織型の異なる腫瘍細胞間で遺伝子発現の相違を検討することはその腫瘍の生物学的特性を知る上で有用と考えられるからである。

当該研究者はこれまで通常の病理検査で作成されるホルマリン固定パラフィン包埋骨軟部腫瘍組織を材料として腫瘍特異的な遺伝子異常の検出を網羅的に試み、それを分子病理学的診断へと還元することを一貫した研究テーマとしている。材料としてパラフィン包埋組織を用いることは今後種々の骨軟部腫瘍の遺伝子解析に応用できると予見され、分子病理診断が臨床の場で広く応用される可能性を開くという観点から意義がある。

本研究の対象である粘液型脂肪肉腫はヒト軟部悪性腫瘍のうち主に成人以降に発生する比較的頻度の高い腫瘍である。本腫瘍は粘液状基質を背景に未熟な間葉系細胞が増生する粘液腫様部が主体であるが、より退形成性の強い円形細胞部や分化が良く成熟した白色脂肪組織からなる部がしばしばみられ、さらには褐色脂肪組織からなる部が混在することもある。このように本腫瘍は形態学的な形質発現に多様性を示すが、いずれの形質においてもほぼ同一の染色体転座、 $t(12;16)(q13;p11)$ や $t(12;22)(q12;q13)$ をもち、これらに基づく融合遺伝子、それぞれ TLS/FUS-CHOP や EWS-CHOP の存在が知られている。これらの融合遺伝子産物は腫瘍特異的な転写因子として本腫瘍の発生に強く関わっていると想定される、その詳細は未だ明らかでなく、また本腫瘍の形態学的多様性と融合遺伝子の関連性についても不明である。

通常の病理診断の場において変異 CHOP 遺伝子の検出が本腫瘍の確定診断の一助とされる機会が増えてきている。検出のための材料として核酸の保存が良好な新鮮凍結腫瘍組織や腫瘍からの培養細胞を用いるのが望ましいが、実際の医療現場ではこのような材料は入手困難であることが多い。本研究では通常の病理組織診断の過程で作製されるホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織切片を材料として用いる。このことにより過去に遡って蓄積された症例を対象とすることが可能となる。また組織切片上で FISH (fluorescent in situ hybridization) 法を行うことにより同一腫瘍内での多様な形質成分別に變異 CHOP 遺伝子の有無を調べることができ、その結果、腫瘍の組織発生や分化についての手掛かりが得られる。

2. 研究の目的

(1) 粘液型脂肪肉腫が従来報告のような特異的遺伝子変異、染色体異常をもつことを確認する。加えて粘液型脂肪肉腫と組織像が類似する他の腫瘍（高分化型脂肪肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫/未分化型多形肉腫など）が同遺伝子変異をもたないことを確認する。

(2) 變異 CHOP 遺伝子を検出する手段としてホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織を材料とする RT-PCR (reverse transcriptase-polymerase chain reaction) 法と FISH 法を用いる。これらの方法における検出感度の向上を目指すと共にいずれの方法がこの点で優れているかを比較検討する。その上でこれらの方法の病理診断への有用性を検討する。

(3) FISH 法では腫瘍切片の粘液腫様部と白色脂肪部、褐色脂肪部を分けて解析し、各部の変異 CHOP 遺伝子の発現の有無を調べ、この變異遺伝子の腫瘍内局在を明らかにする。この結果を踏まえて腫瘍クローンと組織分化能との関係について考察する。

3. 研究の方法

(1) 対象の選出

所属する大学病院およびがん専門病院で過去3年間に病理診断された粘液型脂肪肉腫をレビューし、約20症例を選ぶ。各症例について代表的なホルマリン固定パラフィン包埋ブロック1個を対象材料とする。その他の粘液型脂肪肉腫と鑑別すべき肉腫（高分化型脂肪肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫/未分化型多形肉腫）についても同様に選び出す。

(2) RT-PCR 法

パラフィンブロックから薄切した腫瘍組織から RNA を抽出し、逆転写反応後、TLS/FUS-CHOP プライマーを用いた PCR を行う。得られた産物をポリアクリルアミドゲル上で泳動し、バンドを検出する。同産物をクローニングし、塩基配列を確認する。逆転写、PCR、電気泳動、クローニングのいずれも市販の検出キットを用いる。

(3) FISH 法

パラフィンブロックを薄切し、スライドガラスに貼り付けた組織切片を用いて市販の二色分離 CHOP プローブを利用した間期核 FISH 解析を行う。同一腫瘍内に組織型の異なる成分をもつ症例については各成分における變異 CHOP 遺伝子の有無を分析する。

4. 研究成果

(1) 約20例の対象材料においてPCRに有効な長さ、質のRNAの採取ができたのはごく少数例で、かつそれらの採取し得た材料においても TLS/FUS-CHOP 融合遺伝子の存在を示唆するバンドは検出できなかった。今回用いたようなホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織から RT-PCR にて同融合遺伝子を検出するのは多くの場合極めて困難と考えられる。腫瘍のホルマリン固定状況の良し悪し、腫瘍の細胞密度が低いために採取細胞数が少ないことが検出不可の要因に挙げられる。

(2) FISH 法ではほとんどの症例で分離した CHOP 遺伝子のシグナルがみられ、この遺伝子の再構成が示された。前述の(1)の結果と比較すると、FISH法は検出感度において RT-PCR 法より優れ、再現しやすいと考えられる。

(3) FISH 法を用いて同一腫瘍内で形態学的に異なる部(粘液腫様部、円形細胞部、白色脂肪組織部、褐色脂肪組織部)における分離シグナルの局在を観察した結果、いずれの部においても CHOP 遺伝子の再構成を示唆する分離シグナルが検出された。この結果より、おそらく TLS/FUS-CHOP 融合遺伝子は形態学的な腫瘍の分化の形質発現に直接的に関与していない可能性が示唆される。このような同一腫瘍内の異なる成分において同融合遺伝子の局在について調べた研究は現在までなく、本研究のユニークかつインパクトのある点と考えられる。

(4) 粘液型脂肪肉腫以外の肉腫(高分化型脂肪肉腫、骨外性粘液型軟骨肉腫、悪性線維性組織球腫/未分化型多形肉腫)では PCR 法、FISH 法いずれにおいても結果は陰性で、これらの肉腫は変異 CHOP 遺伝子を有していないと考えられる。従ってこの遺伝子異常が粘液型脂肪肉腫に特異的であることを更に裏付ける結果が得られたと見做される。このことは本腫瘍の希少性から従来報告を検証するという意味で価値がある。

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5件)

- ① Okamoto S, Machinami R, Lee GH, Ishikawa Y, Dedifferentiated liposarcoma with rhabdomyoblastic differentiation in an 8-year-old girl, Pathol Res Pract, 査読有, 206, 2010, 191-196

② Kuroda N, Kazakov DV, Okamoto S, Lee GH, Hybrid peripheral nerve sheath tumor of the nasal cavity showing schwannomatous, neurofibromatous, and perineuriomatous areas, Mod Mod Morphol, 査読有, 43, 2010, 82-85

③ Yamasaki K, Hayashi Y, Okamoto S, Lee GH, Insulin-independent promotion of chemically induced hepatocellular tumor development in genetically diabetic mice, Cancer Sci, 査読有, 101, 2010, 65-72

④ Kuroda N, Sakaida N, Okamoto S, Tanaka Y, Carcinosarcoma arising in mixed epithelial and stromal tumor of the kidney, APMIS, 査読有, 116, 2008, 1013-1015

⑤ Hayashi Y, Toda K, Okamoto S, Lee GH, Expression of fascin-1, an actin-bundling protein, in migrating hepatoblasts during rat liver development, Cell Tissue Res, 査読有, 334, 219-226

[学会発表] (計1件)

① 岡本純佳, 町並陸生, 李康弘, 石川雄一, 小児に発生した横紋筋芽細胞への分化を伴う脱分化型脂肪肉腫の1例, 第97回日本病理学会総会, 平成20年5月17日, 石川県金沢市

[図書] (計1件)

① 岡本純佳, 他, 文光堂, 腫瘍病理鑑別診断アトラス 軟部腫瘍, 2011, 145-151

6. 研究組織

(1) 研究代表者

岡本 純佳 (OKAMOTO SUMIKA)
高知大学・教育研究部医療学系・助教
研究者番号: 10279325

(2) 研究協力者

石川 雄一 (ISHIKAWA YUICHI)
(財) 癌研究会・癌研究所・部長
研究者番号: 80222975

李 康弘 (LEE GANG-HONG)
高知大学・教育研究部医療学系・教授
研究者番号: 10261405

小山内 誠 (OSANAI MAKOTO)
高知大学・教育研究部医療学系・准教授
研究者番号：60381266

林 芳弘 (HAYASHI YOSHIHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・技術職員

川崎 元敬 (KAWASAKI MOTOHIRO)
高知大学・教育研究部医療学系・講師
研究者番号：50398054

黒田 直人 (KURODA NAOTO)
高知赤十字病院・病理診断科・部長
研究者番号：60291457