

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5 月 18 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21790356

研究課題名（和文） 類上皮肉腫と悪性ラブドイド腫瘍の分子生物学的解析および鑑別診断

研究課題名（英文） Molecular-biological analysis and differential diagnosis in epithelioid sarcoma and malignant rhabdoid tumor

研究代表者

孝橋 賢一（KOHASHI KENICHI）

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：10529879

研究成果の概要（和文）：

microRNA プロファイル解析によって、類上皮肉腫と悪性ラブドイド腫瘍とは互いに異なる腫瘍であることが示唆された。一方、形態学的に悪性リンパ腫類似の小円形細胞腫瘍である SMARCB1/INI1 蛋白欠失の小児未分化肉腫は、悪性ラブドイド腫瘍の組織亜型である可能性が考えられた。

グリピカン3は、類上皮肉腫と比較して、悪性ラブドイド腫瘍に有意に多く発現しており、互いに異なる腫瘍である可能性や両者の鑑別に有用である可能性が示唆された。また、グリピカン3は悪性ラブドイド腫瘍における新規ペプチドワクチン療法のターゲットになりうる可能性が考えられた。

研究成果の概要（英文）：

Epithelioid sarcoma (ES) and malignant rhabdoid tumor (MRT) are suggested to be distinct tumor entities with respect to the microRNA profiles. Meanwhile, pediatric undifferentiated sarcoma with loss of SMARCB1/INI1 protein expression, morphologically resembling malignant lymphoma, may have the same spectrum as MRT.

Evaluation of glypican 3 (GPC3) immunorexpression may be a useful diagnostic tool to distinguish ES from MRT. It is suggested that MRTs with glypican 3 overexpression may become a new target of GPC3 immunotherapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：悪性ラブドイド腫瘍、類上皮肉腫、SMARCB1/INI1

1. 研究開始当初の背景
類上皮肉腫（epithelioid sarcoma、以下 ES）は

若年成人の軟部組織に発生する比較的稀な腫瘍で、最新の WHO 分類によると、分化方

向不明群に分類されている。化学療法抵抗性で悪性度の高い腫瘍ではあるが、正確な病理診断のもと、早期に治療（広範切除）がなされれば長期生存も期待できる。しかしながら、その病理診断は非常に困難な部類に属する。理由として、免疫組織学的に上皮・非上皮両方の形質を呈する点、多彩な組織像を呈する点、また、ラブドイド細胞（スリ硝子様細胞質内封入体を伴う大型の細胞）とよばれる肉腫・癌問わずに出現する特徴的な細胞を伴う点が挙げられる。従って、癌の転移やその他の肉腫との鑑別を慎重に行う必要がある。特に悪性ラブドイド腫瘍（malignant rhabdoid tumor、以下 MRT）との鑑別は重要で、細心の注意が必要である。

MRT は主に小児に発生する悪性腫瘍で、ES 同様、分化方向不明群に分類されている。治療は多剤併用化学療法が中心であるが、ほとんどの症例が1年以内に腫瘍死する、未だ難治性の腫瘍である。軟部、腹腔内臓器、中枢神経といったあらゆる箇所に発生が報告されており、非常に診断が難しい腫瘍の一つである。組織学的にはラブドイド細胞の出現、上皮・非上皮両方の形質を有することが特徴的で、ES と極めて類似している。MRT と ES は、組織学的類似性、また、双方ともに、SMARCB1/INI1（以下、INI1）タンパク欠失を認めると言う点で同一の腫瘍であるとの見解もあるが、CD34 や β カテニンの染色性、予後の相違から現在のところ別腫瘍とされている。

ES の診断、特に MRT との鑑別は、経験のある病理医でさえ苦慮することも多い。しかし、その予後および治療方針の差から必ず鑑別が必要であると考えられる。

2. 研究の目的

ES と MRT の分子生物学的解析（網羅的遺伝子解析）を行うことで、両者の遺伝子レベル

での差異を明らかにし、鑑別診断に有用な手法を確立することを目的とする。また、ES、MRT 共に既存の化学療法には抵抗性であるが、分子標的治療薬のターゲットになりうる特異的遺伝子異常についてもあわせて検討する。

3. 研究の方法

症例は、ES48 例（proximal-type 21 例、conventional-type 27 例）、MRT14 例。また、MRT や ES の特徴である INI1 蛋白欠失が確認されている、骨外性粘液型軟骨肉腫（extraskelatal myxoid chondrosarcoma、以下 EMCS）4 例、小児未分化肉腫（pediatric undifferentiated sarcoma、以下 PUS）5 例。尚、これらの症例は、以前われわれのグループで INI1 蛋白欠失が免疫組織化学染色で確認されており、また、real-time PCR 法、direct sequence 法により、INI1 遺伝子異常について、精査されているものである。

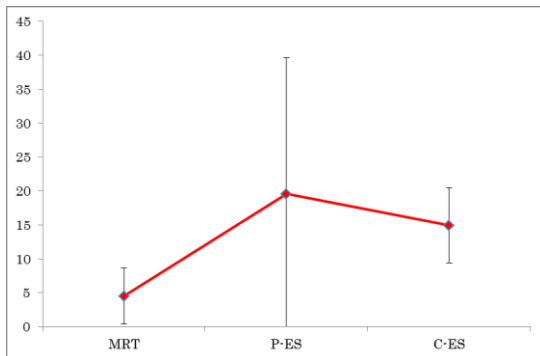
方法は、microRNA array、免疫組織化学染色、real-time PCR、ELISA である。

4. 研究成果

①MRT と ES との microRNA 解析

microRNA プロファイルに基づく、MRT と ES の相関係数は 0.665（MRT vs proximal-type ES: 0.741、MRT vs conventional-type ES: 0.752）であるのに対し、conventional-type ES と proximal-type ES との相関係数は 0.879 であった。また、ANOVA 解析で、MRT と ES との間に、有意差のある 56 遺伝子を確認した。これら有意差のある遺伝子の中で、INI1 蛋白の制御にかかわる候補遺伝子として、has-miR-193a-5p を同定しパラフィン包埋標本を使用して、多数例で real-time PCR を施行したところ、INI1 遺伝子異常が確認されている MRT が 4.48 であるのに対し、INI1 遺伝子

異常が認められなかった ES では proximal-type が 19.56、conventional-type が 14.94 と有意に高値であった ($P=0.02$)。



[has-miR-193a-5p 発現。(MRT: 4.48、P-ES: 19.56、C-ES: 14.94。 $P=0.02$)]

以上の結果より、MRT と ES は互いに異なる microRNA プロファイルを有しており、異なる種類の腫瘍であることが示唆された。また、INI1 遺伝子異常を伴わない ES における、INI1 蛋白欠失の制御を microRNA が行っているとするならば、その蛋白発現を has-miR-193a-5p が調節している可能性が考えられた。

②MRT と US との microRNA 解析

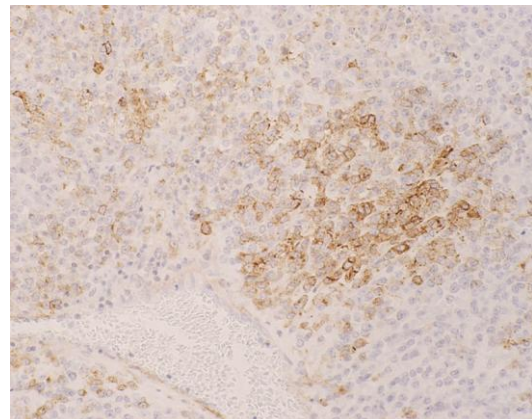
今回解析した INI1 蛋白欠失を伴う US 群は、いずれも悪性リンパ腫類似の小円形細胞腫瘍であった。それらの免疫組織化学染色では、いずれも MRT 同様の上皮・非上皮の形質を有していた。microRNA プロファイルについては、INI1 蛋白陰性である US と MRT との相関係数は、0.796 であった。

以上の結果より、INI1 陰性の US 群（小円形細胞腫瘍群）は免疫組織化学染色、また、microRNA プロファイル上、非常に類似した性質を有しており MRT の 1 亜型である可能性が示唆された。しかしながら、過去の文献では、MRT に比べて予後が良好であるとの報

告もなされており、その相違に関する解析が課題となる。

③MRT と ES とのグリピカン 3 (glypican 3、以下 GPC3) 解析

ES では、GPC3 蛋白の陽性率が 2.1%であるのに対し、MRT では 42.9%と有意に陽性率が高値であった ($P=0.0003$)。また、mRNA 発現に関しては、免疫組織化学染色上、GPC3 陽性であった MRT が 270 であるのに対し、GPC3 陰性である MRT、proximal-type ES、conventional-type ES では各々、8.73、17.6、12.9 と低値であった。MRT の GPC3 陽性例、陰性例で、予後の比較を行ったが、有意差は認められなかった ($P=0.99$)。ごく少数例の解析ではあるが、血清 GPC3 値を測定したところ、免疫組織化学染色上、GPC3 陽性例と陰性例との間に有意差は認められなかった。



[GPC3 陽性例 (4 か月男児、肝臓原発 MRT)]

以上の結果より、GPC3 蛋白発現は、その mRNA 発現とも相関を認め、GPC3 蛋白発現が MRT と ES との鑑別診断の補助として有用である可能性が示唆された。また、GPC3 は肝細胞癌において、ペプチドワクチン療法のターゲットとして有用であるとの報告もなされており、MRT の新規治療ターゲットとなりうる可能性が示された。過去の報告で、血清 GPC3 値が、新規腫瘍マーカーとして有用

であるとの報告がなされているが、今回の解析からは、それを支持する所見は得られなかった。また、肝腫瘍において、GPC3 蛋白発現と予後との相関を示す文献があるが、少なくとも、MRT においては、GPC3 は予後因子とはならず、腫瘍の増殖や伸展への影響は少ないと考えられた。

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 9 件)

1. Setsu N, Kohashi K, et al. Inhibin- α and synaptophysin immunoreactivity in synovial sarcoma with granular cell features. Hum Pathol. In Press. 査読有 10.1016/j.humpath.2011.07.012
2. 孝橋賢一, 小田義直. 上皮様軟部肉腫の鑑別診断. 病理と臨床. 2012 30:154-59. 査読無
3. 孝橋賢一, 小田義直. 骨軟部腫瘍. 最新医学. 2012 67: 437-44. 査読無
4. Setsu N, Yamamoto H, Kohashi K, et al. The Akt/mammalian target of rapamycin pathway is activated and associated with adverse prognosis in soft tissue leiomyosarcomas. Cancer. 2012 118: 1637-48. 査読有 10.1002/cncr.26448
5. Yamamoto H, Kohashi K, et al. Heterozygosity loss at 22q and lack of INI1 gene mutation in gastrointestinal stromal tumor. Pathobiology. 2011 78: 132-39. 査読有 10.1159/000323564
6. Endo M, Kobayashi C, Setsu N, Takahashi Y, Kohashi K, et al. Prognostic significance of p14ARF, p15INK4b, and p16INK4a inactivation in malignant peripheral nerve sheath tumors. Clin Cancer Res. 2011 43: 1289-93. 査読有 10.1158/1078-0432.CCR-10-2393
7. Kohashi K, Oda Y, et al. Reduced expression of SMARCB1/INI1 protein in synovial sarcoma. Mod Pathol. 2010. 23: 981-90. 査読有 10.1038/modpathol.2010.71
8. 孝橋賢一, 田口智章, 小田義直. 小児軟部腫瘍の病理診断と遺伝子異常. 日本小児科学会雑誌. 2009 11: 1626-35. 査読無
9. Kohashi K, Oda Y, et al. Re: Direct evidence of mutational inactivation of SMARCB1/INI1 in epithelioid sarcoma. Hum Pathol. 2009. 40: 1362-64. 査読無 10.1016/j.humpath.2009.04.015

[学会発表] (計 6 件)

1. 孝橋賢一, 他. INI1 蛋白欠失腫瘍群における glypican 3 発現. 日本病理学会. 2011.4.30. 横浜市
2. 孝橋賢一, 他. 肝腫瘍の 1 例. 小児腫瘍分類委員会 症例検討会. 2010.9.3. 大阪市
3. 孝橋賢一, 他. 滑膜肉腫における SMARCB1/INI1 蛋白発現. 日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会. 2010.7.15. 東京
4. 孝橋賢一, 他. 類奇形腫成分を伴った肝芽腫の 1 例. 九州地区小児固形悪性腫瘍研究会. 2010.2.27. 福岡市
5. 孝橋賢一, 他. INI1 蛋白陰性腫瘍群における Glypican 3 を用いた鑑別診断. 日本小児がん学会. 2009.11.27. 千葉県浦安市
6. 孝橋賢一, 他. 先天性肺腫瘍の 1 例. 小児腫瘍分類委員会 症例検討会. 2009.9.4. 東京

〔図書〕（計 2 件）

1. **孝橋賢一**. 組織型と診断の実際 その他の腫瘍 類上皮肉腫. 腫瘍病理鑑別診断アトラス 軟部腫瘍. 長谷川匡, 小田義直編集. 文光堂: 2012. 126-31.
2. **Kohashi K.**, et al. Pediatric rhabdomyosarcoma: Role of cell cycle regulators alteration. Pediatric Cancer, Volume 2 Teratoid/Rhabdoid, Brain Tumors, and Glioma. M.A.Hayat editor. Springer: 2012. 23-30. 10.1007/978-94-007-2957-5

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

孝橋 賢一 (KOHASHI KENICHI)

九州大学・医学研究院・助教

研究者番号：1 0 5 2 9 8 7 9

(2)研究分担者

なし ()

研究者番号：-

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：-