

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：17102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790352

研究課題名(和文) SMARCB1/INI1 蛋白陰性悪性腫瘍の再分類と治療への応用

研究課題名(英文) Re-classification for therapeutic application in SMARCB1/INI1 deficient tumors

研究代表者

孝橋 賢一 (Kohashi, Kenichi)

九州大学・大学病院・講師

研究者番号：10529879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000 円、(間接経費) 1,050,000 円

研究成果の概要(和文)：小児INI1蛋白陰性悪性腫瘍は"conventional type"、"AT/R type"、"small cell type"の3つのグループに再分類が可能であった。AT/R typeとsmall cell typeでは、conventional typeよりもAkt-mTOR経路の活性化の頻度が高かった。また、類上皮肉腫でも活性化が高頻度に認められた。

以上の結果より、小児INI1蛋白陰性悪性腫瘍の内、AT/R typeやsmall cell type、類上皮肉腫では、mTOR阻害薬が治療に有用である可能性、また、悪性ラブドイド腫瘍と類上皮肉腫とは互いに異なる腫瘍群であると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Pediatric SMARCB1/INI1 (INI1)-deficient tumors were able to be re-classified into the three groups: conventional type, atypical teratoid/rhabdoid (AT/R) type and small cell type. Activation in Akt-mTOR pathway was found more frequently in AT/R and small cell types than in conventional type. Meanwhile, in most cases of epithelioid sarcoma (ES) including both conventional and proximal types, the Akt-mTOR pathway was activated.

It is suggested that mTOR inhibition is a potential treatment option for AT/R and small cell types of pediatric INI1-deficient tumor and ES. ES and malignant rhabdoid tumor are suggested to be distinct tumor entities.

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 Akt-mTOR

### 1. 研究開始当初の背景

SMARCB1/INI1 (以下 INI1) 蛋白は SWI/SNF 型クロマチン再構成因子複合体を構成する 1 因子で、ATP 依存性にクロマチン構造を修飾し翻訳を調節することで細胞分化に関わるとされている。INI1 蛋白は当初は悪性ラブドイド腫瘍 (malignant rhabdoid tumor、以下 MRT) や非定型奇形腫様/ラブドイド腫瘍 (atypical teratoid/rhabdoid tumor、以下 AT/RT) に特異的に欠失しているとされていたが、近年類上皮肉腫 (epithelioid sarcoma、以下 ES) や骨外性粘液型軟骨肉腫、類上皮型悪性末梢神経鞘腫瘍、小児軟部未分化肉腫 (pediatric undifferentiated soft tissue sarcoma、以下 US) の一部の腫瘍などで欠失が報告された。これらの腫瘍は INI1 蛋白欠失以外にも、ラブドイド腫瘍を伴う、上皮・非上皮両方の形質を有するなど互いに共通する特徴があり、総称して INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群と呼称されている。

臨床病理学的に INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群は極めて予後不良で、既存の化学療法への反応性は極めて乏しい。従って、現在では模索的な治療が続けられており、極めて限定的に長期生存例が報告されているが、総じて予後の改善には至っていない。また、診断と言う点でも互いに類似する特徴を有しているため鑑別診断が極めて困難である。さらには、MRT と近位型の ES とは同一の腫瘍であるとの報告も散見される。

### 2. 研究の目的

INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群においては、明快な診断基準の作成や、新規分子標的治療のターゲットとなりうる蛋白の探索およびそれに基く腫瘍の再分類 (層別化) を行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群を 2 群、小児群と成人群に分けて検討した。症例は小児群として、MRT 26 例、AT/RT 4 例、非中枢神経組織原発 US 8 例。成人群として ES 48 例 (古典型 28 例、近位型 20 例)。我々が今までに行っていた INI1 蛋白陰性腫瘍群の研究の成果の中で着目していた Akt-mTOR 経路関連蛋白 (Akt、mTOR、S6RP、4E-BP1) に関して、これらの活性化状況 (リン酸化) を免疫組織化学的に検討した。

免疫染色の評価方法は、血管内皮細胞などの内因性コントロールとの比較において染色強度が同等もしくはそれ以上の強さである腫瘍細胞の割合が 10% 以上である場合を陽性 (リン酸化している) とした。

また、リン酸化の程度を予後などの臨床病理学的因子と比較検討した。

### 4. 研究成果

#### (1) 小児 INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群

#### 組織学的検討

まず、上皮系、非上皮系の形質発現について検討したところ、非上皮 (vimentin) と上皮 (EMA、CAM5.2、AE1/AE3 はおおむね一致していた。

それらを組織学的特徴に基き再分類すると、既知の MRT の組織像に合致するものが 26 例あり、それらは全て MRT と診断していたものであった (以下 conventional type) (図 1)。

また、AT/RT の組織像に合致するものは 6 例あり、それらは AT/RT と診断していた 4 例に加えて、US と診断していた 2 例であった (以下 AT/R type) (図 2)。これら 2 例の US は口ゼット構造や上皮様の腺腔構造を認めた。

さらには、ラブドイド細胞を伴わず、細胞質が乏しく悪性リンパ腫類似の小円形細胞から構成されるものが 6 例あり、それらは全て US と診断されていたものであった (small cell type) (図 3)。

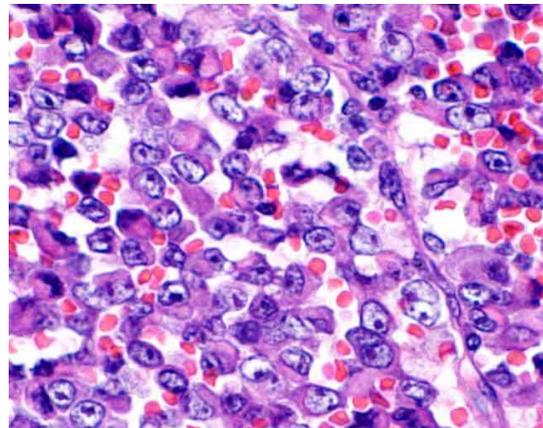


図 1. Conventional type、2 歳女児、背部原発

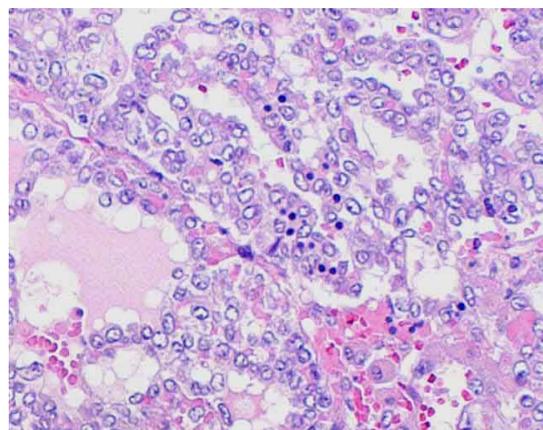


図 2. AT/R type、0 歳男児、肝臓原発

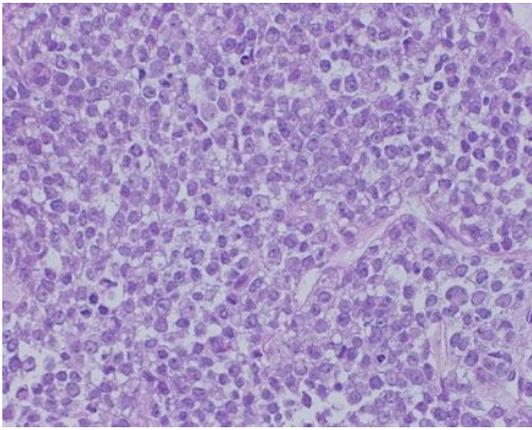


図 3. Small cell type、4 歳男児、後腹膜原発

#### Akt-mTOR 経路関連蛋白発現

Akt, mTOR, S6RP, 4E-BP1 各々のリン酸化率は、conventional type では 20%、15%、25%、75%。AT/R type では 80%、80%、80%、100%。また、small cell type では 80%、40%、40%、60%であった。以上のように、AT/R type や small cell type では conventional type よりも Akt-mTOR 経路がより活性化していると考えられた。

また、経路順の各蛋白の相関関係は、Akt から mTOR へは  $P=0.00002$  (conventional type では  $P=0.004$ )、mTOR から S6RP へは  $P=0.000004$  (conventional type では  $P=0.009$ )、また、mTOR から 4E-BP1 へは  $P=0.057$  (conventional type では  $P=0.399$ ) であった。

#### 予後との関連

Akt, mTOR, S6RP, 4E-BP1 の活性化群と非活性化群に関して検討したところ、いずれにも有意差は認めなかった ( $P=0.61$ ,  $P=0.76$ ,  $P=0.76$ ,  $P=0.10$ )。しかし、20 ヶ月以上の長期生存例では mTOR, S6RP で活性化がみとめられないことから、mTOR 阻害薬が治療に有用である可能性も考えられる。(図 4)

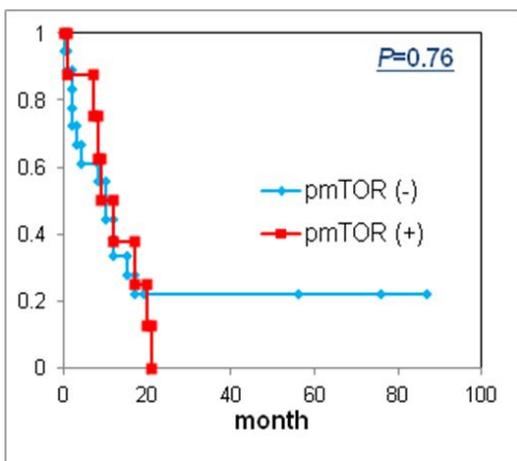


図 4. 小児 INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群の mTOR 活性化別の予後

以上の結果から、小児 INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群を組織学的特徴をもとに "conventional

type", "AT/R type", "small cell type" に分類することは Akt-mTOR 経路の活性化と言う点からも意味があることと考えられ、mTOR 阻害薬の使用と言う点でも有用であると考えられた。

#### (2) 成人 INI1 蛋白陰性悪性腫瘍群

##### 組織学的検討

検討した ES 症例に関して、古典型では中心壊死を伴う肉芽腫様の増殖、近位型では大型で異型の強い類上皮細胞の多結節状の増殖を認め、最新の WHO 分類の基準に合致していた。

##### Akt-mTOR 経路関連蛋白発現

Akt, mTOR, S6RP, 4E-BP1 各々のリン酸化率は、古典型では 71.4%、78.6%、67.9%、85.7%。近位型では 60.0%、75.0%、65.0%、90.0%であった (図 5、6)。以上のように、古典型、近位型ともに Akt-mTOR 経路が高度に活性化していると考えられた。

また、経路順の各蛋白の相関関係は、Akt から mTOR へは  $P=0.26$  (古典型では  $P=0.21$ 、近位型では  $P=0.70$ )、mTOR から S6RP へは  $P=0.02$  (古典型では  $P=0.06$ 、近位型では  $P=0.21$ )、また、mTOR から 4E-BP1 へは  $P=0.12$  (古典型では  $P=0.19$ 、近位型では  $P=0.45$ ) であった。

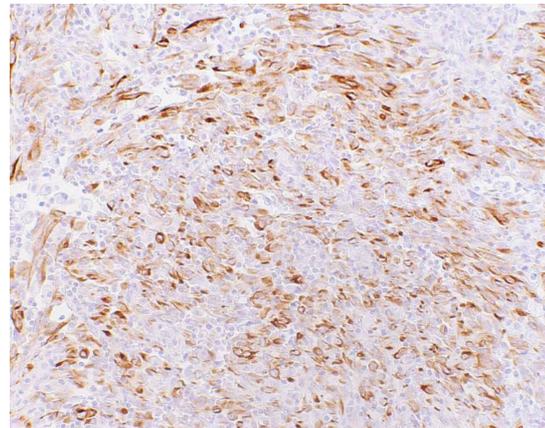


図 5. 遠位型類上皮肉腫 (71 歳女性、大腿部原発) の mTOR 発現

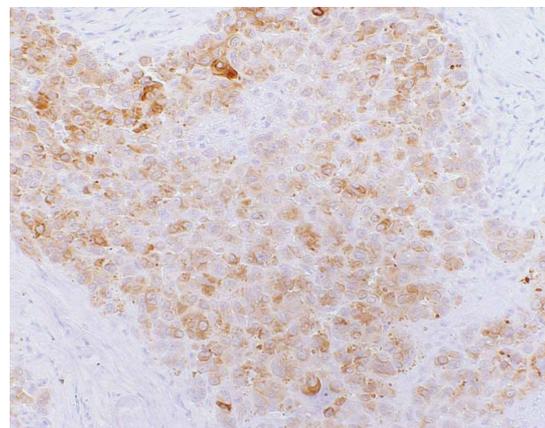


図 6. 近位型類上皮肉腫 (59 歳男性、腹壁原発) の mTOR 発現

#### 予後との関連

Akt、mTOR、S6RP、4E-BP1の活性化群と非活性化群に関して検討したところ、古典型 ( $P=0.70$ 、 $P=0.16$ 、 $P=0.76$ 、 $P=0.047$ )、近位型 ( $P=0.69$ 、 $P=0.47$ 、 $P=0.94$ 、 $P=0.92$ ) となり、古典型の4E-BP1に関して活性化群の方が非活性化群よりも予後良好であったほかは有意差を認めなかった。尚、古典型4E-BP1に関して非活性化群が少数しか認められなかったため、症例数を増やしての検討が必要と考えられた。

以上の結果から、ESについては予後にこそ相関は認めなかったが、Akt-mTOR経路の活性化が高頻度に認められた。

小児群特にMRTと近位型ESとの差異に関しては、MRTがAkt-mTOR経路の活性化が低いのに対し、近位型ESでは活性化が高く、互いに異なる腫瘍であることが示唆される結果となった。

#### 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14件)

1. Kohashi K, Yamamoto H, et al. Differential microRNA expression profiles between malignant rhabdoid tumor and epithelioid sarcoma: miR193a-5p is suggested to downregulate SMARCB1 mRNA expression. *Mod Pathol.* 2013 Nov 29. doi: 10.1038/modpathol.2013.213. 査読有
2. Setsu N, Kohashi K, et al. Phosphorylation of signal transducer and activator of transcription 3 in soft tissue leiomyosarcoma is associated with a better prognosis. *Int J Cancer.* 132(1):109-15, 2013 doi: 10.1002/cncr.28255. 査読有
3. Kohashi K, Nakatsura T, et al. Glypican 3 expression in tumors with loss of SMARCB1/INI1 protein expression. *Hum Pathol.* 44(4):526-33, 2013 doi: 10.1016/j.humpath.2012.06.014. 査読有
4. Yamamoto H, Kohashi K, et al. Fascin-1 overexpression and miR-133b downregulation in the progression of gastrointestinal stromal tumor. *Mod Pathol.* 26(4):563-71, 2013 doi: 10.1038/modpathol.2012.198. 査読有
5. Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, et al. Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clin Cancer Res.* 19(2):450-61, 2013 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-1067. 査読有
6. Imada K, Shiota M, Kohashi K, et al. Mutual regulation between Raf/MEK/ERK signaling and Y-box-binding protein-1 promotes prostate cancer progression. *Clin Cancer Res.* 19(17):4638-50, 2013 doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3705. 査読有
7. Setsu N, Kohashi K, et al. Prognostic impact of the activation status of the Akt/mTOR pathway in synovial sarcoma. *Cancer.* 119(19):3504-13, 2013 doi: 10.1002/cncr.28255. 査読有
8. Souzaki R, Ieiri S, Uemura M, Ohuchida K, Tomikawa M, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Kohashi K, et al. An augmented reality navigation system for pediatric oncologic surgery based on preoperative CT and MRI images. *J Pediatr Surg.* 48(12):2479-83, 2013 doi:

- 10.1016/j.jpedsurg.2013.08.025. 査読有
9. 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*. 118(6):1637-48, 2012 doi: 10.1002/cncr.26448. 査読有
  10. Setsu N, Kohashi K, et al. Inhibin- $\alpha$  and synaptophysin immunoreactivity in synovial sarcoma with granular cell features. *Hum Pathol*. 43(6):850-7, 2012 doi: 10.1016/j.humpath.2011.07.012. 査読有
  11. Tajiri T, Souzaki R, Kinoshita Y, Yosue R, Kohashi K, et al. Surgical intervention strategies for pediatric ovarian tumors: experience with 60 cases at one institution. *Pediatr Surg Int*. 28(1):27-31, 2012 doi: 10.1007/s00383-011-3004-3. 査読有
  12. Matsuura T, Kohashi K, et al. A morphological study of the removed livers from patients receiving living donor liver transplantation for adult biliary atresia. *Pediatr Surg Int*. 28(12):1171-5, 2012 doi: 10.1007/s00383-012-3183-6. 査読有
  13. Tajiri T, Kimura O, Fumino S, Furukawa T, Iehara T, Souzaki R, Kinoshita Y, Koga Y, Suminoe A, Hara T, Kohashi K, et al. Surgical strategies for unresectable hepatoblastomas. *J Pediatr Surg*. 47(12):2194-8, 2012 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.006. 査読有
  14. Kinoshita Y, Suminoe A, Inada H, Yagi M, Yanai F, Zaizen Y, Nishi M,

Inomata Y, Kawakami K, Matsufuji H, Suenobu S, Handa N, Kohashi K, et al. The prognostic significance of blastemal predominant histology in initially resected Wilms' tumors: A report from the Study Group for Pediatric Solid Tumors in the Kyushu Area, Japan. *J Pediatr Surg*. 47(12):2205-9, 2012 doi: 10.1016/j.jpedsurg.2012.09.009. 査読有

〔学会発表〕(計5件)

1. 孝橋賢一、山元英崇、山田裕一、小田義直：  
小児軟部腫瘍。  
第55回日本小児血液・がん学会学術集会。2013年11月29日，福岡
2. 孝橋賢一、高橋祐介、山田裕一、石井武彰、井浦国生、前川啓、山元英崇、岩本幸英、小田義直。  
類上皮肉腫における Akt/mTOR 経路関連蛋白の発現検討  
第46回日本整形外科学会骨軟部腫瘍学術集会，2013年7月11日，東京
3. 孝橋賢一、山元英崇、山田裕一、小田義直：  
小児軟部腫瘍のゲノミクス。  
第102回日本病理学会総会。2013年6月7日，札幌
4. Kohashi K, Endo M, Setsu N, Takahashi Y, Yamada Y, Yamamoto H, Oda Y:  
Akt-mTOR pathway Activation Analysis in Re-Classified Pediatric SMARCB1/INI1-Deficient Tumor  
2013 Annual Meeting of USCAP. 2013.3.4, Baltimore, Maryland
5. Kohashi K, Kishimoto H, Tanaka Y, Yamada Y, Yamamoto H, Taguchi T, Oda Y:

Re-classification of pediatric  
SMARCB1/INI1-deficient tumor,  
according to microRNA and  
immunohistochemical expression  
第71回 日本癌学会学術総会 2012年9  
月20日 札幌

〔図書〕(計3件)

1. 孝橋賢一, 小田義直. 横紋筋肉腫. 編集: 青笹克之, 小田義直. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 骨・軟部腫瘍. pp268-279, 中山書店, 東京, 2013.
2. 孝橋賢一, 小田義直. 軟部悪性ラブドイド腫瘍. 編集: 青笹克之, 小田義直. 癌診療指針のための病理診断プラクティス 骨・軟部腫瘍. pp386-389, 中山書店, 東京, 2013.
3. Kohashi K, Takahashi Y, Taguchi T, Oda Y: Pediatric Rhabdomyosarcoma: Role of Cell Cycle Regulators Alteration. In: Hayat MA (ed): Pediatric Cancer, Volume 2. Teratoid/Rhabdoid, Brain Tumors, and Glioma. pp 23-30, Springer, Dordrecht Heidelberg New York London, 2012

〔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  
なし

6. 研究組織

(1)研究代表者  
孝橋 賢一 (KOHASHI KENICHI)  
九州大学病院・講師  
研究者番号: 10529879

(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: -