

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 20 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26830034

研究課題名(和文)多層性ロゼットを有する胎児性脳腫瘍の遺伝子解析

研究課題名(英文)Genetic analysis of embryonal brain tumors with multilayered rosettes

研究代表者

信澤 純人(Nobusawa, Sumihito)

群馬大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：80635318

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)：胎児性脳腫瘍であるCNS PNETに属する上衣芽腫、ETANTR、髄上皮腫を包括した多層性ロゼットを有する胎児性腫瘍(ETMR)が、19q13.42増幅を特異的遺伝子異常とした新たな腫瘍型として提唱されている。最近、LIN28Aの発現はETMRに特異的であることが報告された。今回の免疫染色による検討では、LIN28AはETMR、多層性ロゼットを有するAT/RTや未熟奇形腫に陽性で、染色分布もほぼ同様であったが、多層性ロゼットを有する退形成性上衣腫には陰性であった。ETMRとAT/RTや未熟奇形腫の鑑別はLIN28A染色では困難であるが、退形成性上衣腫との鑑別には有用であることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Ependyoblastomas, embryonal tumors with abundant neuropil and true rosettes (ETANTR) and medulloepitheliomas are subtypes of central nervous system primitive neuroectodermal tumors. Recent data suggest that these tumors constitute a single entity, embryonal tumors with multilayered rosettes (ETMR), for which 19q13.42 amplification represents a specific molecular hallmark, and that LIN28A is a specific immunohistochemical marker for ETMR. We analyzed LIN28A immunohistochemical expression in ETMR and their histological mimics with multilayered rosettes, atypical teratoid/rhabdoid tumors (AT/RT), immature teratomas and anaplastic ependymomas, and found that LIN28A can be used for differentiation between ETMR and anaplastic ependymomas but is not useful for differentiation of ETMR from AT/RT and immature teratomas.

研究分野：病理学

キーワード：胎児性脳腫瘍 多層性ロゼット

1. 研究開始当初の背景

脳腫瘍は最も多い小児固型腫瘍で、小児腫瘍学の中で最重要領域の一つである。中でも重要なものが髄芽腫 (medulloblastoma) に代表される胎児性腫瘍で、最も予後の悪い一群である。WHO 分類では medulloblastoma、中枢神経系原始神経外胚葉性腫瘍 (central nervous system primitive neuroectodermal tumor; CNS PNET)、非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍 (atypical teratoid/rhabdoid tumor; AT/RT) の 3 型に分類されている。近年の研究成果により、medulloblastoma と AT/RT は臨床病理学的、分子遺伝学的によく特徴付けられているが、CNS PNET に関しては不明な点が多く残されている。

上衣芽腫 (ependymoblastoma) は CNS neuroblastoma、CNS ganglioneuroblastoma、髄上皮腫 (medulloepithelioma) とともに、CNS PNET における一つの腫瘍亜型と分類されている。ニューロピルと真性ロゼットに富む胎児性腫瘍 (embryonal tumors with abundant neuropil and true rosettes; ETANTR) は 2000 年に初めて報告された腫瘍であり、現行の 2007 年 WHO 分類ではそれまでの報告例の少なさを為 CNS PNET における一つの組織パターンと位置づけられている。他の類似した腫瘍として診断されていた例も多かったが、ここ数年で広く認知され、報告例が増加してきている。次回の WHO 分類の改定においては独立した腫瘍概念として認められると考えられている。両腫瘍は、未分化な細胞からなる特徴的な多層性の上衣芽腫性ロゼットを伴うが、ETANTR にはニューロピル様細線維性基質と神経への分化を示す腫瘍細胞からなる領域が認められるという違いがある。

ETANTR と ependymoblastoma を検索した結果、約 95% に染色体 19q13.42 増幅が報告された。この遺伝子異常は脳腫瘍を含め、他臓器の腫瘍でも報告されておらず、ETANTR と ependymoblastoma に特異的な異常であると考えられた。染色体 19q13.42 の増幅は *DPRX* 遺伝子と *LILRP2* 遺伝子に挟まれた ~1 Mb の領域でみられ、蛋白をコードした 34 の遺伝子と、chromosome 19 microRNA cluster (C19MC) と miR-371-373 の 2 つの miRNA cluster をコードした領域が含まれている。C19MC 領域には 54 もの miRNA 遺伝子がコードされており、*MIR-371-373* の約 100 kb 上流に位置している。染色体 19q13.42 の増幅により、蛋白をコードした遺伝子には優位な発現レベルの上昇が認められないが、miRNA の著しい発現亢進が観察されたため、この miRNA が腫瘍発生に関わっているのではないかと考えられている。

このように、組織学、および分子遺伝学的特徴を共有すること、更にいずれの腫瘍も CNS PNET の中で予後が不良で、やや女兒に多くみられ、大脳半球 (特に前頭葉) 発生が多く、且つ若年発症であるという臨床的特徴が

あるため、ETANTR と ependymoblastoma は発生起源を共有し、同一腫瘍の両極に位置するのではないかと考えられた。そこで、これらを合わせた "多層性ロゼットを有する胎児性腫瘍 (embryonal tumor with multilayered rosettes; ETMR)" という新しい分類が提唱され、染色体 19q13.42 増幅が特異的な分子マーカーになると考えた。

上記の通り、多層性の上衣芽腫性ロゼットに分子遺伝学的な根拠がある可能性が示されたが、medulloepithelioma や AT/RT などの他の胎児性腫瘍にも稀に出現し、胚細胞腫瘍の一つである未熟奇形腫 (immature teratoma) にも類似の構造が認められる。我々は、これらの腫瘍を検索した結果 medulloepithelioma にも染色体 19q13.42 増幅を検出し、medulloepithelioma も ETMR に含まれる可能性を示した。他の脳腫瘍に増幅は認められなかったことから、染色体 19q13.42 増幅は ETMR に特異的な変化であり、診断的意義が高いことが示された。

最近、CNS PNET は LIN28A と Olig2 の発現性により 3 つに分類され、ETMR は予後が最も不良な LIN28A 陽性、Olig2 陰性の群に属することが示された。更に、原発性脳腫瘍における LIN28A の発現性を検討した大規模な研究では、LIN28A は ETMR の特異的なマーカーであると報告された。

2. 研究の目的

(1) LIN28A と Olig2 の発現性は、病理組織学的に ETMR と鑑別を要する AT/RT、immature teratoma、anaplastic ependymoma など多層性ロゼットを伴う他の稀な原発性脳腫瘍では検討されていない。AT/RT は前述の通り、ETMR と同様に胎児性腫瘍に属する腫瘍であり、核小体の明瞭な偏在核と好酸性硝子様の細胞質内封入体を伴ったラブドイド細胞の出現、*IN11* 遺伝子の不活性化による IN11 蛋白の核内発現の消失、組織学的あるいは免疫組織化学的に他方向への分化傾向を示すことを特徴とする。Immature teratoma は胚細胞腫瘍の一つで、外・中・内胚葉に由来する種々の組織から構成され、胎児期に見られるような未成熟な組織を含んでいる。ETMR の好発年齢である乳幼児期に発生する immature teratoma は、ependymoblastic rosettes や神経管様構造を含む未熟な神経外胚葉成分が主体をなし、組織学的に ETMR と鑑別が困難なことがある。Anaplastic ependymoma は上衣細胞への分化を示し、退形成性変化を伴った腫瘍で、管腔を囲んだいっそうの腫瘍細胞からなる ependymal rosettes が出現することがあるが、非常に稀ではあるが多層性の ependymoblastic rosettes が出現することが知られている。今回の研究では、各腫瘍におけるそれらの分子の発現性と染色体 19q13.42 増幅の有無を検索し、LIN28A と Olig2 の診断におけるマーカーとしての有用

性を検討する。

(2) array CGH を用いた網羅的な分子遺伝学的解析を行い、ETMR における各腫瘍亜型に特異的な変化の有無を検索する。

3. 研究の方法

(1) ETANTR、ependymoblastoma、medulloepithelioma、多層性口ゼットを有する AT/RT、未熟な神経外胚葉成分に富む immature teratoma、多層性口ゼットを伴う anaplastic ependymoma を収集し、それらのホルマリン固定パラフィン包埋検体から組織標本を作製した。これらの標本における LIN28A および Olig2 の発現性を免疫染色により検討した。また、各症例における染色体 19q13.42 増幅の有無を FISH 法にて検索した。

(2) 大腸菌株からプローブを作製し、収集した症例の染色体 19q13.42 増幅を FISH 法にて検索した。染色体 19q13.42 を標識するプローブは、BAC クローン RP11-381E3、および RP11-634C1 を使用して作製した。リファレンスプローブには、染色体 19p13.11 に相当する BAC クローン RP11-451E20 を使用した。それぞれの BAC クローンを有する大腸菌株を培養し、プラスミドを抽出し、BAC クローン RP11-381E3、および RP11-634C1 は赤色の蛍光色素で、BAC クローン RP11-451E20 は緑色の蛍光色素でニックトランスレーション法を用いて標識し、それぞれプローブを作製した。

(3) ETANTR に類似した領域を伴う medulloepithelioma において、medulloepithelioma の領域と、ETANTR 類似の領域から別々に、ホルマリン固定パラフィン包埋検体から genomic DNA を抽出し、array Comparative Genome Hybridization (aCGH) 法にて chromosomal imbalance を解析した。

4. 研究成果

(1) ETANTR 12 例、ependymoblastoma 2 例、medulloepithelioma 3 例、多層性口ゼットを有する AT/RT 2 例、未熟な神経外胚葉成分に富む immature teratoma 2 例、多層性口ゼットを伴う anaplastic ependymoma 1 例を収集することができ、LIN28A および Olig2 の発現性を免疫染色により検討した。一般的に、単一施設にて今回の解析対象となる稀な腫瘍を十分に集めることは困難であるが、当施設において長年にわたり受託してきた脳腫瘍のコンサルテーションにより、一定の症例数を確保することができた。

ETANTR において LIN28A は未分化な細胞からなる高密度な領域に強くそまり、ニューロピルに富む疎な領域には少数の陽性細胞が

散在性に認められた。Olig2 は高密度な領域に部分的に陽性を示すものと陰性の症例がみられた。疎な領域では、少数の小型細胞に陽性であった。

Ependymoblastoma、medulloepithelioma では LIN28A は多くの腫瘍細胞に強く染まった。Olig2 は部分的に陽性であった。

多層性口ゼットを伴う AT/RT や immature teratoma では、LIN28A は口ゼット構成細胞を含め、一部の腫瘍細胞に強く染まった。Olig2 も部分的に陽性であった。

多層性口ゼットを伴う anaplastic ependymoma では LIN28 と Olig2 は陰性であった。

以上より、多層性口ゼットを含む AT/RT や immature teratoma と ETMR の鑑別は LIN28A の染色性では困難であるが、多層性口ゼットを含む anaplastic ependymoma との鑑別には有用であることが示唆された。

LIN28A は ETMR に発現しているが、鑑別診断における有用性はそれほど高くない。一方、染色体 19q13.42 増幅は非常に特異性の高い変化であり、診断に応用できる実用的なマーカーであることが再確認された。

ETMR の大部分が LIN28A 陽性、Olig2 陽性を示したが、そのような群は前述の CNS PNET 分類には存在しない。ETMR において、LIN28A の染色結果には一貫性が見られたが、Olig2 に関しては少数の陰性例も認められ、ばらつきが見られた。今後、Olig2 染色性の意義について、予後などとの臨床病理学的な関連性等、更なる検討が必要であると考えられる。

(2) 染色体 19q13.42 増幅は ETANTR 11/12 例、ependymoblastoma 1/2 例、medulloepithelioma 2/3 例に陽性であったが、他は陰性であった。ETMR においては、染色体 19q13.42 増幅の有無により、LIN28A や Olig2 の染色性に差異は認められなかった。

(3) aCGH の結果、ETANTR に類似した領域を伴う medulloepithelioma において、medulloepithelioma の領域と、ETANTR 類似の領域に chromosomal imbalance の差は認められなかった。

両領域から染色体 19q13.42 増幅が検出されており、この遺伝子異常は腫瘍発生の根本にかかわっていると考えられた。さらにそれぞれの領域を aCGH 法によって解析することで、それぞれの組織像に特異的な異常の検出を試みたが、chromosomal imbalance の差異は明らかではなかった。しかし、点変異や epigenetic な変化、aCGH 法で検出困難な小さな chromosomal imbalance の違いが存在する可能性は否定できないと考える。

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 3件)

Hayase T, Morimoto A, Kawahara Y, Yagi M, Kanai N, Nobusawa S, Hirato J, Gomi A. An Infant With Medulloepithelioma Successfully Treated by High-dose Chemotherapy Followed by Autologous Peripheral Blood Stem Cell Transplantation Without Radiotherapy. J Pediatr Hematol Oncol. 37:e394-398, 2015.
査読有

Nobusawa S, Orimo K, Horiguchi K, Ikota H, Yokoo H, Hirato J, Nakazato Y. Embryonal tumor with abundant neuropil and true rosettes with only one structure suggestive of an ependymoblastic rosette. Pathol Int. 64:472-477, 2014
査読有

Nobusawa S, Hirato J. Embryonal tumors with ependymoblastic rosettes--reply. Hum Pathol. 45:658, 2014
査読無

〔学会発表〕(計 5件)

胎児性脳腫瘍の病理と分子遺伝学
信澤 純人
第50回埼玉脳腫瘍病理懇話会
平成27年11月25日
大宮ソニックシティ(埼玉県・大宮市)

小児脳腫瘍の分子病理
信澤 純人
第56回日本神経病理学会総会学術研究会
平成27年6月4日
九州大学(福岡県・福岡市)

胎児性脳腫瘍の病理
信澤 純人
第33回日本脳腫瘍病理学会
平成27年5月29日
JRホテルクレメント高松(香川県・高松市)

Embryonal tumors with multilayered rosettes の分子病理
信澤 純人
第32回日本脳腫瘍病理学会
平成26年5月24日
あわぎんホール(徳島県・徳島市)

小児脳腫瘍の分子病理
信澤 純人
第103回日本理学会総会
平成26年4月25日
ANA クラウンプラザホテル広島(広島県・広島市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

信澤 純人 (NOBUSAWA Sumihito)