

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K19065

研究課題名(和文) 分類不能小円形細胞肉腫における新規遺伝子変型の探索

研究課題名(英文) Genetic characterization of unclassifiable small round cell sarcomas

研究代表者

吉田 朗彦 (YOSHIDA, AKIHIKO)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医師

研究者番号：80574780

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：小円形細胞肉腫とは、小型の円形細胞の増殖からなる肉腫の総称である。この中にはユーイング肉腫など既知の腫瘍型も複数含まれるが、5-10%ほどの症例は現在の診断基準では分類できず、そうしたなかにも再認可能な腫瘍型を同定することが、最適な治療法の選択や開発に不可欠である。我々は、次世代シーケンスをはじめとした遺伝子解析や臨床病理学的解析を用いて分類不能小円形細胞肉腫を詳しく調べ、CIC遺伝子融合陽性肉腫やSMARCA4欠損型胸部肉腫といった、新しい腫瘍型の臨床病理像や遺伝子異常を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Small round cell sarcoma is a diagnostic category that encompasses a variety of sarcoma entities which share predominantly small round-shaped tumor cytology. Most small round cell sarcomas are readily classifiable; however, approximately 5-10% of tumors defy definitive classification based on the present nosologic scheme. These unclassifiable small round cell sarcomas are hypothesized to consist of multiple distinct entities, each of which should be recognized and treated by specific strategy. In this study, we first identified a number of unclassifiable small round cell sarcomas in our archive, and then analyzed them by using clinicopathological and molecular methods including next generation sequencing. We identified a relatively large series of novel entities such as CIC-rearranged sarcoma and SMARCA4-deficient thoracic sarcoma, and characterized them in detail to better understand these under-recognized malignancies.

研究分野：病理診断学

キーワード：肉腫 分類 遺伝子変異 融合遺伝子 病理診断

### 1. 研究開始当初の背景

小円形細胞肉腫とは、顕微鏡的に小型の小円形細胞の増殖からなる肉腫の総称であり、一般に予後不良で集学的治療を必要とする。小円形細胞肉腫という総称には、ユーイング肉腫や胞巣型横紋筋肉腫など複数の腫瘍単位が含まれ、その各々が特異的な免疫形質や遺伝子異常を有し、それぞれが特異的な治療法を必要とする。多くの小円形細胞肉腫は、現在病理学的に確定診断をつけることができ、この診断のためには古典的な病理組織学的解析や免疫染色のほか、RT-PCR や FISH といった方法により特異的な遺伝子異常 (例えば EWS 遺伝子再構成) を同定する分子的手法が用いられる。

しかしながら、小円形細胞肉腫のなかには、現行 WHO 分類や最新の文献的知見を用いてもなお分類が確定できず、「分類不能小円形細胞肉腫」と呼ばざるを得ない症例が 5-10% 程度存在する。こうした分類不能小円形細胞肉腫は均一な腫瘍単位ではなく、この中には何種類もの腫瘍型があると考えられているが、それらを同定することがそれぞれの腫瘍型に応じた最適な治療法の選択や開発に不可欠である。

近年、こうした分類不能小円形細胞肉腫を分類する試みの努力が遺伝子解析を通して実を結んだ例が少数報告されており、そうした遺伝子亜型の特徴的な臨床像や病理像も次第に判明しつつある。分類不能小円形細胞肉腫のなかには、こうした遺伝子的に同定可能なグループがいくつも存在することが期待されており、その効率的な発見は、分類不能肉腫という肉腫診療の難所を切り崩す有効な手法と考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、小円形細胞肉腫のうち、分類不能症例を検索し集積し、次世代シーケンスをはじめとした遺伝子解析や臨床病理学的解析、免疫染色を通して、新たな疾患単位の発見、あるいは既存の疾患単位における新規形質の発見を目指した。

### 3. 研究の方法

国立がん研究センター中央病院の病理アーカイブないし研究者個人の診断コンサルテーションファイルに保存されている小円形細胞肉腫に、詳細な病理組織学的解析を加え、現行の診断基準に照らして分類不能と考えられる症例を集積した。こうした症例について、次世代シーケンスや新規プローブによる FISH 解析を行い、遺伝子的に類似性のある腫瘍群を同定し、臨床病理像や遺伝子異常から予想される蛋白発現パターン等をあわせ、独立した疾患単位としての特徴づけが可能か検証した。

このほか研究期間中に、スペイン・イタリアの研究グループから小円形細胞肉腫に関する共同研究提案があり、本研究課題と強

い関連があったため協力した。

### 4. 研究成果

(1) 分類不能小円形細胞肉腫や非典型的ユーイング肉腫と診断されていた多数症例の診断見直しと、FISH 検査を通して、CIC 遺伝子の融合を有する小円形細胞肉腫を 20 例発見し、これらを臨床病理学的に解析した。これは当時として世界最大規模の症例集積であり、その結果、CIC 再構成陽性肉腫は、EWSR1 遺伝子再構成を有するユーイング肉腫と比較して、発生部位、治療反応性、予後、組織像、ならびに免疫形質 (WT1 陽性、NKX2-2 陰性) にいたるまで、大きく異なることが判明した。CIC 遺伝子融合を有する肉腫はしばしばユーイング様肉腫とも称され、その分類学的位置づけが議論されてきたが、この詳細な臨床病理学的研究によりユーイング肉腫とは異なる特異な疾患単位であることがわかった。

(2) 分類不能小円形細胞肉腫複数例を RNA シーケンスで解析したところ、うち 4 例において、FISH では CIC 再構成シグナルを検出しなかったにも関わらず、CIC-DUX4 融合遺伝子を予期せず検出した。この 4 例は CIC 肉腫として典型的な組織像を呈し、免疫染色でも ETV4 陽性、WT1 陽性であり、FISH 偽陰性の CIC 肉腫と考えられた。FISH 偽陰性例を、FISH 陽性となった CIC-DUX4 陽性肉腫 9 例と比較したところ、CIC-DUX4 の融合点を含め FISH の結果以外には有意な差は見られなかった。この研究から CIC 遺伝子の分離プローブを用いた FISH 解析ではおよそ 15% ほどの症例で偽陰性を呈することが判明したため、CIC 肉腫の病理診断法について現実的な提言を行った。なお、我々の論文と同時期にアメリカからはほぼ同内容の論文が出版され、相互の結果の確からしさを補強しえた。

(3) 研究開始直後、フランスから SMARCA4 変異と発現消失を伴う未分化な胸部肉腫の一群が文献報告された。これを受け、研究開始時に分類不能小円形細胞肉腫と判断していた症例すべてにおいて SMARCA4 免疫染色を行ったところ、この新規概念に合致する症例を 12 例同定した。臨床病理学的検討の結果、こうした腫瘍は成人男性の重喫煙者に多く、胸部に巨大な腫瘍として発生し、特徴的な組織像と免疫形質 (全例で SMARCA4 消失、ほとんどの症例で CD34 陽性、SALL4 陽性、SOX2 陽性、p53 陽性、SMARCA2 消失) を呈し、特異な腫瘍単位と考えられた。5 例では次世代ターゲットシーケンス解析により、SMARCA4 不活性化変異のほか、喫煙関連肺腺癌との関係を示唆する遺伝子異常を複数同定し、真の肉腫なのか肉腫様肺癌の一亜型なのかという議論を惹起する重要な知見を得た。この報告はフランスからの疾患概念提唱後をはじめでの多数症例シリーズであり、また病理組織

像や免疫形質について病理診断の観点から論じた最初の報告であったことから注目を集め、アメリカ・カナダ病理学会での口頭発表表に選出され、世界肺癌学会病理パネル会議でも招待発表を行った。

(4) 分類不能小円形細胞肉腫に関する共同研究をスペイン・イタリアの研究グループから提案されたため協力した。まず典型的Ewing肉腫多数例における既報のバイオマーカー(NKX2.2, ETV4, BCOR)発現の頻度を調べ、小円形細胞肉腫の分類におけるそれらの有用性を確立した。

(5) スペイン・イタリアの研究グループにより提出され、ヨーロッパ各地で集積された分類不能小円形細胞肉腫 41 例に新規バイオマーカーや遺伝子検索を用いた検討を加えた結果、その大部分が稀な疾患単位(EWSR1-NFATC2 肉腫や CIC-DUX4 肉腫など)を含め既存の腫瘍型に分類しうることを示すと共に、やはり分類不能となる腫瘍群を同定した。

(6) 小円形細胞型の富細胞性亜型を含む骨外性粘液性軟骨肉腫の新規マーカーとして INSM1 を発見した。感度・特異度ともに完璧ではないものの比較的良好で、遺伝子検索困難な状況では診断に有用な可能性が示唆された。

(7) 今後の展望としては、最近になり概念の確立されつつある BCOR 遺伝子異常を伴う肉腫(BCOR 融合遺伝子あるいは BCOR-internal tandem duplication)について、その臨床病理像や遺伝子的特徴を RNA シーケンスを含め解析中である。また、研究開始時には実装できていなかった FFPE 検体からの RNA シーケンス解析が可能となったため、分類不能小円形細胞肉腫 8 例において FFPE からの RNA シーケンスを施行し、3 例において新規融合遺伝子を同定した。新規疾患単位の可能性があり、現在類似症例の探索を進めている。

#### 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 7 件)

Toki S, Motoi T, Miyake M, Kobayashi E, Kawai A, Yoshida A. Minute Mesenchymal Chondrosarcoma within Osteochondroma: An Unexpected Diagnosis Confirmed by HEY1-NCOA2 Fusion. *Hum Pathol*. 2018 Mar 26. doi:10.1016/j.humpath.2018.03.014. [Epub ahead of print] 査読有

Yoshida A, Makise N, Wakai S, Kawai A,

Hiraoka N. INSM1 expression and its diagnostic significance in extraskeletal myxoid chondrosarcoma. *Mod Pathol*. 2018 May;31(5):744-752. doi:10.1038/modpathol.2017.189. 査読有

Machado I, Yoshida A, Morales MGN, Abrahao-Machado LF, Navarro S, Cruz J, Lavernia J, Parafioriti A, Picci P, Llombart-Bosch A. Review with novel markers facilitates precise categorization of 41 cases of diagnostically challenging, "undifferentiated small round cell tumors". A clinicopathologic, immunophenotypic and molecular analysis. *Ann Diagn Pathol*. 2017 Nov 29;34:1-12. doi:10.1016/j.anndiagpath.2017.11.011. 査読有

Machado I, Yoshida A, Lopez-Guerrero JA, Nieto MG, Navarro S, Picci P, Llombart-Bosch A. Immunohistochemical analysis of NKX2.2, ETV4, and BCOR in a large series of genetically confirmed Ewing sarcoma family of tumors. *Pathol Res Pract*. 2017 Sep;213(9):1048-1053. doi:10.1016/j.prp.2017.08.002. 査読有

Yoshida A, Arai Y, Kobayashi E, Yonemori K, Ogura K, Hama N, Mukai W, Motoi T, Kawai A, Shibata T, Hiraoka N. CIC break-apart fluorescence in-situ hybridization misses a subset of CIC-DUX4 sarcomas: a clinicopathological and molecular study. *Histopathology*. 2017 Sep;71(3):461-469. doi:10.1111/his.13252. 査読有

Yoshida A, Kobayashi E, Kubo T, Kodaira M, Motoi T, Motoi N, Yonemori K, Ohe Y, Watanabe SI, Kawai A, Kohno T, Kishimoto H, Ichikawa H, Hiraoka N. Clinicopathological and molecular characterization of SMARCA4-deficient thoracic sarcomas with comparison to potentially related entities. *Mod Pathol*. 2017 Jun;30(6):797-809. doi:10.1038/modpathol.2017.11. 査読有

Yoshida A, Goto K, Kodaira M, Kobayashi E, Kawamoto H, Mori T, Yoshimoto S, Endo O, Kodama N, Kushima R, Hiraoka N, Motoi T, Kawai A. CIC-rearranged Sarcomas: A Study of 20 Cases and Comparisons With Ewing Sarcomas. *Am J Surg Pathol*. 2016 Mar;40(3):313-23. doi:10.1097/PAS.0000000000000570. 査読有

[学会発表](計 2 件)

Yoshida, A, Kobayashi, E, Kubo, T, et al. Clinicopathological and Molecular Characterization of SMARCA4-Deficient Thoracic Sarcomas with Comparisons to Potentially Related Disease Entities. The 106th Annual Meeting of the United States and Canadian Academy of Pathology. 2017年3月(テキサス、USA)

( )

吉田朗彦、小林英介、久保崇ら. SMARCA4欠損型胸部肉腫 12 例の臨床病理学的・遺伝子的解析. 第 106 回日本病理学会総会. 2017年4月(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔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

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

吉田 朗彦 (YOSHIDA, Akihiko)  
国立がん研究センター中央病院・病理科・  
医員  
研究者番号：80574780

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者