

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06989

研究課題名(和文) 脂肪性軟部腫瘍は正確に病理診断されているか？ 実践的診断アルゴリズムの確立

研究課題名(英文) Approaches to establish the algorithm for the pathologic diagnosis of lipogenic mesenchymal tumors

研究代表者

廣瀬 隆則 (Hirose, Takanori)

神戸大学・医学研究科・特命教授

研究者番号：00181206

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：脂肪肉腫は脂肪細胞への分化を示す悪性腫瘍であり、適切な診断と治療を行う必要がある。そこで脂肪肉腫の病理診断の精度を高めることを目的に種々の検討を行った。その結果、良性と悪性の区別にはp16免疫染色が有用であること、他の悪性腫瘍との鑑別にはMDM2遺伝子の増幅やMDM2蛋白の過剰発現の証明が役立つこと、また脂肪肉腫は予想以上に周囲に浸潤する腫瘍であることなどを明らかにした。この成果に基づき、脂肪肉腫の診断精度が高まり、治療法の改善につながることを期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

脂肪肉腫は発生頻度の低い悪性腫瘍であり、その病理診断は必ずしも容易ではない。良性の脂肪腫や他の悪性軟部腫瘍と間違われることも稀ではなく、正しく病理診断を行うことが適切な治療の前提となる。今回の研究成果で、脂肪肉腫の診断に補助的診断手段(p16およびMDM2免疫染色など)の活用が有効であることを明らかにした。これを用いることで、脂肪肉腫の診断精度が向上し、適切な治療法を選択することが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Liposarcoma, a malignant mesenchymal tumor showing lipogenic differentiation, should be diagnosed correctly and treated appropriately. In order to improve the accuracy of pathologic diagnosis of liposarcoma, several studies were carried out. The results are as follows: p16-immunostaining is useful for the differentiation between intramuscular lipoma and atypical lipomatous tumor (ALT); ALT and dedifferentiated liposarcoma (DDLPS) are characterized by the overexpression of MDM2 protein and the amplification of MDM2 gene; and ALT/DDLPS are more infiltrative than previously thought. Hopefully, the results will improve the diagnostic accuracy and the therapeutic strategies.

研究分野：人体病理学

キーワード：異型脂肪腫様腫瘍 脱分化型脂肪肉腫 異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍 筋肉内脂肪腫 MDM2 p16

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞への分化を示す腫瘍は軟部腫瘍の中でも比較的発生頻度の高い腫瘍群であり、病理学的に良性、中間悪性、悪性に分類されている。良性腫瘍には脂肪芽腫、脂肪腫があり、後者には血管脂肪腫、紡錘形細胞・多形脂肪腫、軟骨様脂肪腫などの亜型が含まれている。また最近、異型性を示す紡錘形細胞や多形細胞を含む異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍という新しい腫瘍型も報告された。次に中間悪性腫瘍に属するのは異型脂肪腫様腫瘍で、不完全切除では再発する可能性がある。悪性腫瘍は脂肪肉腫であるが、これは単一の腫瘍型ではなく、現在、脱分化型、粘液型、多形型、粘液多形型の4型に区別されている。これらは組織学的な相違に加え、年齢・発生部位などの臨床事項、発生に関わる分子機構、さらには生物学的悪性度も異なることが知られている。これらの腫瘍診断は病理組織所見に基づいて行われてきたが、それぞれの腫瘍に対し鑑別すべき腫瘍群があり正確な診断は必ずしも容易でない。

例えば脱分化型脂肪肉腫は異型脂肪腫様腫瘍の成分と脂肪性分化を欠く脱分化領域の両者からなる腫瘍であり、この脱分化領域の組織所見はしばしば未分化多形肉腫や粘液線維肉腫と組織学的に鑑別が困難である。特に異型脂肪腫様腫瘍成分が乏しい、あるいは全く含まれていない場合は、組織学的診断は極めて難しい。未分化多形肉腫や粘液線維肉腫は再発や転移の多い高悪性度腫瘍であるのに対し、脱分化型脂肪肉腫は再発を来すものの転移の頻度は必ずしも高くないため、診療上両者を区別することが重要である。現在、脱分化型脂肪肉腫に特有の分子異常としてMDM2遺伝子増幅が知られており、それをFISH法やreal-time PCR法などで解析しているが、これらは一般的な医療機関では活用することが困難であり、より実用的な解析法が求められている。

後腹膜に発生する異型脂肪腫様腫瘍(同部では高分化型脂肪肉腫と呼ばれることもある)と脱分化型脂肪肉腫はほとんどの例が再発を繰り返し、最終的に手術摘出が困難となり死亡することも稀ではない。従って、これらの切除材料で腫瘍が完全に摘出できているか、切除断端部の評価が重要である。特に異型脂肪腫様腫瘍はよく分化した脂肪細胞が大部分を占めており、周囲の正常脂肪組織と組織学的な鑑別が難しいことがある。肉眼的な境界が不明瞭で、正常組織にあたかも浸潤するような広がりを示すこともあり、正確な断端評価法を確立することが、本腫瘍の診療にとって極めて重要である。

一方、四肢に発生した異型脂肪腫様腫瘍は中間悪性群に分類されており、再発することはあるがその頻度は必ずしも高くない。同じ腫瘍型であるにもかかわらず、四肢発生例と後腹膜発生例の生物学的悪性度が相違する理由は明確ではない。その理由の一つとして発生部位により浸潤様式が異なることが想定される。しかし、異型脂肪腫様腫瘍や脱分化型脂肪肉腫での浸潤様式に関する研究はほとんどなされていない。これらに対する治療戦略の策定には、浸潤様式を明らかにしておくことが必要と考えられる。

異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍は、近年報告された新しい脂肪性腫瘍である。良性の紡錘形細胞脂肪腫や多形脂肪腫との鑑別、さらには中間悪性型の異型脂肪腫様腫瘍との鑑別が必要である。しかし、まだ報告例は少なく、その臨床病理学的特徴や他の脂肪性腫瘍との鑑別点は必ずしも明確とはなっていない。

良性の脂肪腫はありふれた腫瘍であり、簡単に切除され、またあまり注意が払われずに脂肪腫と診断されることが多い。しかし、その後数年で再発を来し、再手術を余儀なくされることが稀ではない。そのような例の多くで原発腫瘍の病理標本を再検鏡してみると中間悪性腫瘍である異型脂肪腫様腫瘍であったことが確認される。脂肪腫と異型脂肪腫様腫瘍はよく分化し異型性に乏しい脂肪細胞を主体とする腫瘍で、組織学的な鑑別は必ずしも容易でない。経過観察の必要性を判断するためには、両者を正しく区別できるような補助的診断手段の開発が求められている。

### 2. 研究の目的

今回の研究課題では、脂肪性腫瘍の診断における問題点を明らかにし、それらを一般的な病理診断部門で解決できるような実践的診断アプローチ法を確立することを目的としている。研究対象として、以下の5項目の検討を行った。

- (1) 脱分化型脂肪肉腫とその他多形肉腫の鑑別
- (2) 後腹膜発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除断端評価
- (3) 四肢発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除断端評価
- (4) 異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍の病理学的解析
- (5) 異型脂肪腫様腫瘍と筋肉内脂肪腫の鑑別

脂肪性腫瘍の分子遺伝学的解析は以前から行われており、異型脂肪腫様腫瘍や脱分化型脂肪肉腫におけるMDM2およびCDK4遺伝子の増幅、粘液型脂肪肉腫におけるFUS-DDIT3融合遺伝子などが特徴的な分子異常として明らかにされている。しかし、これらの解析はreal-time PCR, FISH法, RT-PCRなど分子遺伝学的手法を用いるものであり、我が国の一般的な病理診断部門で日常的に活用できるものではない。従って、先に述べたように異型脂肪腫様腫瘍が脂肪腫と診断されたり、脱分化型脂肪肉腫が未分化多形肉腫と診断されたりすることも稀ではない。これらを鑑別することは治療選択や予後判定の上で極めて重要であり、がん診療の均てん化の視点からもより簡便で一般的に利用可能な手段でこれらの診断を行える診断的アルゴリズムの開発が重要と考えられる。具体的な解析手段として、これらの腫瘍鑑別に有用とされている免疫組織化学

的解析とさらに FISH 法に変わる in situ hybridization 法である dual color in situ hybridization (DISH)法を中心として用いる予定である。今までに脂肪性腫瘍の鑑別に、DISH 法などの実用的な解析手段を用いて検討した報告は乏しく、本研究は独自性の高い課題と考えられる。

### 3. 研究の方法

研究対象は良性、中間悪性、悪性の各種脂肪性腫瘍であり、ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて実施した。この材料を用いて免疫組織化学および DISH 法による解析を行い、以下の5項目について検討し、これらの確定診断に最もふさわしい診断的アルゴリズムを確立することを目標とした。

#### (1) 脱分化型脂肪肉腫とその他多形肉腫の鑑別

脱分化型脂肪肉腫では、時に脂肪性腫瘍成分が不明瞭か、あるいは全く認められないことがあり、その際には診断の難易度が増す。特に多形性を示す非脂肪細胞性肉腫(未分化多形肉腫、粘液線維肉腫、多形型平滑筋肉腫など)との組織学的鑑別が困難である。この問題を解決するために、免疫組織化学的および分子遺伝学的解析を行った。脂肪細胞成分の乏しい脱分化型脂肪肉腫11例を選び、非脂肪性軟部肉腫17例(粘液線維肉腫5例、未分化多形肉腫6例、平滑筋肉腫6例)と比較検討した。組織学的検討と共に、免疫染色は p16, MDM2, CDK4 について行った。また DISH 法を用いて MDM2 遺伝子増幅の有無を検討した。その結果に基づき、脱分化型脂肪肉腫の診断、特にその他の多形肉腫との鑑別に有用な補助的診断手段を明らかにした。

#### (2) 後腹膜発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除断端評価

後腹膜発生脂肪肉腫は高率に再発を来し、予後不良な腫瘍であることが知られている。再発率の高い理由として完全切除が困難であることが挙げられる。しかし、切除断端部の評価や腫瘍の浸潤様式に関する研究はほとんどない。この点を明らかにするために、後腹膜に発生した異型脂肪腫様腫瘍(高分化型脂肪肉腫)2例と脱分化型脂肪肉腫8例の手術材料を対象として、組織学的解析と p16 および HMGA2 免疫染色による検討を行った。いずれも特徴的な組織所見および MDM2 蛋白発現および MDM2 遺伝子増幅で診断が確認されている症例である。これらの解析により、切除断端部での腫瘍細胞浸潤の有無を評価した。さらに正常組織との境界部で、腫瘍細胞の浸潤様式を評価した。膨張性が浸潤性が、どの組織に浸潤していくか、主病巣と離れた娘結節の有無などに注目した。これらの解析により、従来考えられていた以上に、後腹膜の脂肪肉腫は浸潤性の強い腫瘍であることが明らかになった。

#### (3) 四肢発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除断端評価

四肢に発生した異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫は、後腹膜発生例に比べて再発率が低く、予後良好であることが知られている。その理由として、発生部位によって腫瘍浸潤の程度や浸潤様式が異なることが予想される。この点を明らかにするために、四肢に発生した異型脂肪腫様腫瘍4例と脱分化型脂肪肉腫4例を対象とし、(2)で述べたものの同様の手法で、切除断端部の腫瘍浸潤の有無と腫瘍細胞の浸潤様式を評価した。

#### (4) 異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍の病理学的解析

異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍の病理所見に合致する症例を、後方視的および前方視的に検索し、8例を見出した。それらを対象とし、組織学的解析、免疫組織化学的解析(S-100 protein, CD34, MDM2, CDK4, p16, Rb protein, Ki-67 など)、分子遺伝学的解析(DISH法によるMDM2遺伝子増幅)を実施し、本腫瘍と他の脂肪性腫瘍との相違点を検討した。

#### (5) 異型脂肪腫様腫瘍と筋肉内脂肪腫の鑑別

異型脂肪腫様腫瘍は主として成熟脂肪細胞からなり、異型間質細胞を見出すことが病理診断の決め手となる。異型間質細胞が少数であるか、異型性の程度が軽度であると、脂肪腫、特に筋肉内脂肪腫との鑑別が難しい。両者を区別するために有効な補助手段を見出すために、異型脂肪腫様腫瘍5例、筋肉内脂肪腫5例を用いて、免疫組織化学的検討(MDM2, CDK4, p16, HMGA2 など)を行った。

### 4. 研究成果

上記の研究を行い、以下の成果を得た。

#### (1) 脱分化型脂肪肉腫とその他多形肉腫の鑑別

脱分化型脂肪肉腫では、時に脂肪性腫瘍成分が不明瞭か、あるいは認められないことがあり、その際には診断の難易度が増す。そのような症例を11例集積し、非脂肪性軟部肉腫17例と比較検討した。その結果、脱分化型脂肪肉腫の免疫染色で全例が p16, CDK4, MDM2 に陽性となり、また DISH 法でも全例で MDM2 遺伝子増幅が確認された。一方、非脂肪性軟部肉腫でも p16 が8例、CDK4 が9例、MDM2 が3例陽性となった。さらに検討した8例中3例で MDM2 遺伝子増幅も確認された。この増幅のある3例は MDM2 免疫染色陽性の3例と一致していた。そこでこれらの原発病巣を再検討したところ2例で少量の脂肪性領域が見出され、脱分化型脂肪肉腫と診断が訂正された。この結果から、MDM2 蛋白発現と MDM2 遺伝子増幅を証明することが、脱分化型脂肪肉腫と非脂肪性多形肉腫との鑑別に極めて有用であることが明らかとなった。それに対して、p16, CDK4 の特異性は低いことが分かった。また遺伝子増幅の検出法として、DISH 法は自動染色装置で実施可能で、さらに明視野で評価可能であること、標本の保存性に優れていることなど、FISH 法より簡便で利点の多い手法であることも示すことができた。

## (2) 後腹膜発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除断端評価

後腹膜の異型脂肪腫様腫瘍(高分化型脂肪肉腫)と脱分化型脂肪肉腫は高率に再発し、腫瘍死を来することが知られている。そこでこれらの浸潤様式を、手術材料を用いて病理学的に検討した。後腹膜に発生した異型脂肪腫様腫瘍 2例、脱分化型脂肪肉腫 8例を対象とし、すべての病理組織標本を鏡し、切除断端浸潤の有無を評価した。また p16、HMGA2 免疫染色を行い、腫瘍細胞の広がり方を検討した。病理診断の妥当性は MDM2 免疫染色と DISH 法による MDM2 遺伝子増幅で評価した。検討の結果、対象とした 10 例のすべてで組織学的に断端部に腫瘍細胞の存在が確認された。腫瘍辺縁部では、腫瘍との境界が明瞭な領域と不明瞭な領域が観察された。前者では、腫瘍は膨張性に発育し、後者では p16 陽性の異型間葉系細胞が脂肪隔壁に沿って、また骨格筋線維間に広範に浸潤していた。また主腫瘍とは離れた部位に壊結節を認める症例も 2 例存在した。以上の結果から、後腹膜発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫は浸潤傾向の強い腫瘍であり、完全切除が困難なため、高率に再発する可能性が示唆された。また腫瘍浸潤の同定には p16 免疫染色が有用と考えられた。HMGA2 免疫染色でも腫瘍細胞の一部が陽性を示したが、その陽性率は p16 に比べて低く、有用性は低いと判断した。

## (3) 四肢発生の異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除断端評価

四肢に発生した異型脂肪腫様腫瘍 4 例と脱分化型脂肪肉腫 4 例を対象に、手術材料の切除断端部の評価と浸潤様式を、後腹膜発生例と同様に検討した。その結果、四肢発生例でも 7 例で切除断端部に腫瘍浸潤が見出され、6 例で周囲の脂肪組織や骨格筋組織への浸潤性増殖が確認された。さらに 4 例で壊結節も見出され、これは後腹膜発生例より高率であった。免疫染色では p16 による腫瘍細胞の検出率が HMGA2 より格段に優れており、腫瘍細胞の同定に有用であることが確認された。四肢発生例では 1 例で転移が認められたが、再発した症例はない。組織学的な浸潤様式には、四肢発生例と後腹膜発生例との間で明確な相違点は見出せなかった。従って、再発率の違いは浸潤様式以外にあると考えられた。

## (4) 異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍の病理学的解析

最近、提唱された異型紡錘形細胞・多形脂肪腫様腫瘍を 8 例見出し、病理学的解析を行った。これらは紡錘形細胞脂肪腫と多形脂肪腫に類似しているが、間葉系細胞に異型性があり、異型の脂肪芽細胞が出現する。また粘液性基質や線維成分に富むことも特徴と考えられた。異型脂肪腫様腫瘍との鑑別が重要であるが、S-100 protein と CD34 免疫染色が陽性を示すこと、MDM2 遺伝子増幅は見られないこと、Rb protein の発現消失を認めることなどが重要な鑑別点である。

## (5) 異型脂肪腫様腫瘍と筋肉内脂肪腫の鑑別

四肢深部に発生する異型脂肪腫様腫瘍と筋肉内脂肪腫は成熟脂肪組織を主体とする腫瘍で、組織学的な鑑別が難しい場合がある。筋肉内脂肪腫は良性であるが、異型脂肪腫様腫瘍は良悪中間腫瘍で再発を来しやすい。両者を鑑別するために、異型脂肪腫様腫瘍 5 例と筋肉内脂肪腫 5 例を対象とし、p16 および HMGA2 免疫染色を実施した。その結果、両者で p16 および HMGA2 陽性細胞が検出されたが、p16 陽性細胞は異型脂肪腫様腫瘍で有意に高率に陽性であった。一方、HMGA2 では有意な差は見出せなかった。組織学的に異型間葉系細胞を見出すことと共に、p16 のびまん性陽性所見を確認することが、異型脂肪腫様腫瘍の診断には有用と考えられた。

以上の研究成果から、脂肪性腫瘍の病理診断手順として以下の様なアルゴリズムを提唱したい。

- 深部発生の高分化脂肪性腫瘍では、p16 免疫染色を実施し、びまん陽性像が認められた場合には異型脂肪腫様腫瘍の可能性を考える。
- 高分化脂肪性腫瘍で、異型性を示す紡錘形細胞や多形細胞が含まれている場合には、MDM2 免疫染色や DISH による MDM2 遺伝子増幅を検討し、それらが陰性であれば異型紡錘形細胞・多形脂肪性腫瘍の可能性を考える。
- 四肢、後腹膜に発生した多形肉腫で脱分化型脂肪肉腫が鑑別に挙げられる場合には、MDM2 免疫染色および DISH 法による MDM2 遺伝子増幅の検討を行う。これらが陽性であれば、脱分化型脂肪肉腫の可能性が考えられる。
- 異型脂肪腫様腫瘍と脱分化型脂肪肉腫の切除材料で断端評価は p16 免疫染色標本で実施する。特に後腹膜発生例は高率に断端陽性で、再発率が高いため、その情報を伝える必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kobayashi A, Sakuma T, Fujimoto M, Jimbo N, Hirose T.	4. 巻 27
2. 論文標題 Diagnostic utility and limitations of immunohistochemistry of p16, CDK4, and MDM2 and automated dual-color in situ hybridization of MDM2 for the diagnosis of challenging cases of dedifferentiated liposarcoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology	6. 最初と最後の頁 758-763
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/PAI.0000000000000677	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 廣瀬隆則	4. 巻 78
2. 論文標題 肉腫の病理診断 軟部肉腫	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 日本臨床 増刊号5	6. 最初と最後の頁 191-197
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 小林杏奈、廣瀬隆則、佐久間淑子、梶本和義、前田尚子、酒井康裕
2. 発表標題 Atypical spindle cell lipomatous tumorの2症例
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小松正人、阿部志保、西尾裕美、原仁美、神澤真紀、伊藤智雄、廣瀬隆則
2. 発表標題 異型多形脂肪腫様腫瘍と考えられた1例
3. 学会等名 第107回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 稲場礼奈、阿部志保、神保直江、神澤真紀、伊藤智雄、廣瀬 隆則
2. 発表標題 多形型脂肪肉腫様成分を有する後腹膜脱分化型脂肪肉腫の一例
3. 学会等名 第64回日本病理学会秋期特別総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hirose T
2. 発表標題 Infiltrative growth of retroperitoneal liposarcoma may cause recurrence.
3. 学会等名 33rd International Congress of International Academy of Pathology (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 廣瀬隆則 (都築豊徳、中塚伸一、安藤正志、水木満佐央 編集)	4. 発行年 2019年
2. 出版社 中山書店	5. 総ページ数 195
3. 書名 骨・軟部 (癌診療指針のための病理診断プラクティス 原発不明癌)	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------