

機関番号：37111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21791424

研究課題名（和文） 悪性軟部腫瘍の分子機構の解明とその診断・治療への応用

研究課題名（英文） Contributions of Cytogenetics and Molecular Genetics to the Diagnosis and Treatment of Malignant Soft Tissue Tumors

研究代表者

西尾 淳（NISHIO JUN）

福岡大学・医学部・助教

研究者番号：90360304

研究成果の概要（和文）：

非円形細胞肉腫である悪性線維性組織球腫のヒト細胞株を樹立した。本細胞株の分子細胞遺伝学的解析では癌抑制遺伝子 *p16* の欠失と9番染色体長腕コピー数の増幅を認めた。色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫において *CSFI* 遺伝子再構成を約60%に認めたが、*CSFIR* 遺伝子増幅は認められなかった。脂肪細胞の悪性腫瘍である高分化型脂肪肉腫や脱分化型脂肪肉腫では12番染色体長腕コピー数の増幅を認めるが、鑑別の対象となる脂肪腫では認められないことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

We established a new permanent human malignant fibrous histiocytoma cell line. Molecular cytogenetic analyses revealed a homozygous deletion of *p16* and a high-level amplification of 9q31-34 in this cell line. *CSFI* rearrangement was identified in about 60% of pigmented villonodular synovitis/giant cell tumor of tendon sheath cases. Also, the presence of *CSFIR* amplification was not identified in any cases examined. High-level amplification of 12q13-15 was found in well-differentiated liposarcomas and dedifferentiated liposarcomas but not in benign adipocytic tumors.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・整形外科学

キーワード：軟部腫瘍、悪性線維性組織球腫、脂肪肉腫、色素性絨毛結節性滑膜炎、細胞株

1. 研究開始当初の背景

悪性軟部腫瘍（肉腫）は癌腫に比べて発生頻度が低いため、その研究には実験的に腫瘍を形成する試みや培養の試みがなされてきた。しかしながら、ヒト肉腫由来細胞株の樹立についてはどの研究室が試みても必ず成

功するとはいえないのが現状である。そのため、細胞株が樹立されているのは一部の肉腫に限られており、種々の細胞株の樹立が強く望まれている。

近年、分子細胞遺伝学的技法の発展により種々の軟部腫瘍において特異的な染色体・遺

伝子異常が見出されてきた。例えば、異型脂肪腫様腫瘍/高分化型脂肪肉腫では 12q13-15 からなる余剰環状染色体と巨大マーカー染色体が特徴的であり、その結果この領域に局在する *MDM2*、*CDK4* 遺伝子の増幅が認められる。また、色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫では特異的な染色体相互転座 t(1;2)(p11-13;q35-37) がみられ、本腫瘍の発生には 1p11-13 に局在する *CSF1* 遺伝子の関与が推測されている。

2. 研究の目的

軟部腫瘍の細胞遺伝学的・分子病理学的特性を解明し、その特性を利用した診断法や治療への臨床応用に展開するための基盤となる研究を行う。本研究計画では以下の研究項目を予定した。

(1) 樹立したヒト細胞株の生物学的性状を明らかにする。培養細胞を免疫不全マウスに移植後、*in vivo* での組織学的形態を調べる。

(2) 樹立したヒト細胞株の染色体異常を明らかにする。また、染色体変異を高頻度に認めた細胞株に対しては変異遺伝子を同定する。

(3) 色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫において *CSF1*、*CSF1R* 遺伝子異常を検討し、その診断的意義を評価する。

(4) 脂肪性腫瘍において 12q13-15 領域の増幅を検討し、その診断的価値を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ヒト細胞株の樹立と特性解析

試料提供者よりインフォームド・コンセントを得たうえで、摘出された腫瘍組織のうち病理診断に必要な余剰部分を用いて培養を行った。また、細胞の性状を調べるために、*in vitro* および *in vivo* での HE 染色、特殊染色、免疫染色による組織学的検討を行った。さらに、GTG (G-bands by trypsin using Giemsa) 法を用いて染色体分析を、FISH (fluorescence in situ hybridization) と CGH (comparative genomic hybridization) 法を用いて分子細胞遺伝学的解析を行った。

(2) 色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫の遺伝子解析と診断への応用

染色体分析が可能であった色素性絨毛結節性滑膜炎 13 例と腱鞘巨細胞腫 9 例について *CSF1* 遺伝子再構成と *CSF1R* 遺伝子増幅の解析を行った。また、FISH 法を用いて *COL6A3-CSF1* 融合遺伝子の検出を行った。

(3) 脂肪性腫瘍の分子細胞遺伝学的特性の

解明とその病理診断学的応用

脂肪腫、異型脂肪腫様腫瘍/高分化型脂肪肉腫、脱分化型脂肪肉腫の凍結標本またはホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて CGH 解析を行った。また、足関節部に発生した粘液型脂肪肉腫 2 例の染色体変異と *DDIT3*、*FUS* 遺伝子異常を解析した。

4. 研究成果

(1) ヒト悪性線維性組織球腫細胞株：FU-MFH-2 の樹立と特性解析

悪性線維性組織球腫患者 (72 歳・男性) の検体から細胞株を樹立した (FU-MFH-2 と命名)。FU-MFH-2 細胞は紡錘形または類円形の単核細胞からなり、付着性に増殖した。免疫染色では FU-MFH-2 細胞は vimentin、CD68 に陽性で、上皮性や筋原性マーカーなどは陰性であった。スキッドマウスの背部皮下に 5×10^7 個の細胞を移植すると 100% 移植可能であった。その組織像は培養材料である原腫瘍と同様であった。免疫染色では移植腫瘍細胞は vimentin、CD68 に陽性で、上皮性や筋原性マーカーなどは陰性であった。染色体分析では原腫瘍、細胞株ともに多様な染色体異常を認め、すべての細胞に共通した異常としてマーカー染色体が認められた。Multicolor FISH を用いてマーカー染色体の由来を明らかにした。CGH 解析では染色体コピー数の増加を 1p12-34.3, 2p21, 2q11.2-21, 3p, 4p, 6q22-qter, 8p11.2, 8q11.2-21.1, 9q21-qter, 11q13, 12q24, 15q21-qter, 16p13, 17, 20, X で、減少を 1q43-qter, 4q32-qter, 5q14-23, 7q32-qter, 8p21-pter, 8q23, 9p21-pter, 10p11.2-13, 10q11.2-22 で認めた。さらに、high-level amplification を 9q31-34 領域で認めた。FISH 解析では *p16* 癌抑制遺伝子の欠失を認めた。以上、FU-MFH-2 は原腫瘍と類似した特徴を持ち、悪性線維性組織球腫の有用な腫瘍モデルになりうることが示された。また、9 番染色体長腕には悪性線維性組織球腫の進展に関与する未知の癌遺伝子の存在が示唆され、本領域のさらなる研究が必要であると考えられた。

(2) 色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫の遺伝子解析

染色体分析では 1p11-13 の異常を 8/22 例 (36%) に認めた。FISH 解析では *CSF1* 遺伝子の再構成を 14/22 例 (64%) に認めたが、*CSF1R* 遺伝子の増幅は認められなかった。染色体転座 t(1;2)(p13;q37) を示した 3 例に *COL6A3-CSF1* 融合遺伝子の発現を認めた。以上、FISH 法を用いた *CSF1* 遺伝子再構成の解析は色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫の病理診断の補助として有用であることが示された。今後、免疫染色を用いた蛋白レベルでの *CSF1* および *CSF1R* の発現を解析し、*CSF1R* を標的とし

た新規分子治療の可能性を検討する。

(3) 脂肪性腫瘍の分子細胞遺伝学的解析

①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の染色体分析では余剰環状染色体もしくは巨大マーカー染色体を認めた。CGH解析では異型脂肪腫様腫瘍/高分化型脂肪肉腫と脱分化型脂肪肉腫において12q13-15の染色体コピー数の増幅を認めた。一方、鑑別が問題となる脂肪腫において12q13-15の染色体コピー数の増幅は認められなかった。さらに、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では1番染色体長腕コピー数の増幅も認められた。以上、CGH解析は脂肪性腫瘍の診断に有用であることが示された。

②19歳・男性と36歳・女性の足関節部に発生した粘液型脂肪肉腫の検討を行った。両例ともに良性腫瘍である粘液腫との鑑別が困難であった。染色体分析では相互転座t(12;16)(q13;p11)を認めた。FISH解析ではDDIT3、FUS遺伝子の再構成を認めた。以上、稀な部位に発生した粘液型脂肪肉腫の診断には染色体分析とDDIT3およびFUSの分子細胞遺伝学的解析が有用であることが示された。

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8件)

- ① Nishio J, Isayama T, Iwasaki H, Naito M. Elastofibroma dorsi: diagnostic and therapeutic algorithm. J Shoulder Elbow Surg, in press. 査読有
- ② Nishio J. Contributions of cytogenetics and molecular cytogenetics to the diagnosis of adipocytic tumors. J Biomed Biotechnol 2011:524067, 2011. 査読有
- ③ Sumegi J, Nishio J, Nelson M, Frayer RW, Perry D, Bridge JA. A novel t(4;22)(q31;q12) produces an EWSR1-SMARCA5 fusion in extraskeletal Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor. Mod Pathol 24(3):333-342, 2011. 査読有
- ④ Nishio J, Iwasaki H, Nabeshima K, Ishiguro M, Isayama T, Naito M. Establishment of a new human pleomorphic malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-2: molecular cytogenetic characterization by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization.

J Exp Clin Cancer Res 29:153, 2010. 査読有

- ⑤ Nishio J, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Non-traumatic myositis ossificans mimicking a malignant neoplasm in an 83-year-old woman: a case report. J Med Case Reports 4:270, 2010. 査読有
- ⑥ Hoshino M, Kawashima H, Ogose A, Kudo N, Ariizumi T, Hotta T, Umezumi H, Hatano H, Morita T, Nishio J, Iwasaki H, Endo N. Serum CA 125 expression as a tumor marker for diagnosis and monitoring the clinical course of epithelioid sarcoma. J Cancer Res Clin Oncol 136(3):457-464, 2010. 査読有
- ⑦ Yasuda T*, Nishio J*, Sumegi J, Kapels KM, Althof PA, Sawyer JR, Reith JD, Bridge JA. Aberrations of 6q13 mapped to the COL12A1 locus in chondromyxoid fibroma. Mod Pathol 22(11):1499-1506, 2009. 査読有 *equal contribution.
- ⑧ Iwasaki H, Nabeshima K, Nishio J, Jimi S, Aoki M, Koga K, Hamasaki M, Hayashi H, Mogi A. Pathology of soft-tissue tumors: daily diagnosis, molecular cytogenetics and experimental approach. Pathol Int 59(8):501-521, 2009. 査読有

[学会発表] (計7件)

- ① Nishio J, Iwasaki H, Nabeshima K, Ishiguro M, Isayama T, Naito M. Establishment of a new human pleomorphic malignant fibrous histiocytoma cell line, FU-MFH-2: molecular cytogenetic characterization by multicolor fluorescence in situ hybridization and comparative genomic hybridization. The Combined Conference of 16th Triennial Congress of Asia Pacific Orthopaedic Association and 59th Annual Meeting of Taiwan Orthopaedic Association, November 6, 2010, Taipei, Taiwan
- ② 西尾淳、内藤正俊、Julia Bridge: 分子機構に基づく色素性絨毛結節性滑膜炎/腱鞘巨細胞腫の診断と治療戦略. 第43回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2010年7月16日 東京
- ③ 自見至郎、鍋島一樹、青木光希子、濱崎慎、西尾淳、岩崎宏: 骨髄由来間葉系幹細胞の肉腫発生における関与について. 第43回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2010年7月15日 東京
- ④ 大石純、青木光希子、岩崎宏、鍋島一樹、

古賀佳織、西尾淳、生越章、竹内保、箱崎道之：悪性末梢神経鞘腫瘍(MPNST)における PDG-FR- β の発現と imatinib mesylate (Gleevec) による治療の可能性について。第 43 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2010 年 7 月 15 日 東京

- ⑤ 西尾淳、諫山照刀、吉村一朗、大慈弥裕之、岩崎宏、内藤正俊：足関節に発生した粘液型脂肪肉腫の治療経験。第 119 回西日本・災害外科学会 2010 年 6 月 6 日 福岡
- ⑥ 安田剛敏、西尾淳、金森昌彦、堀岳史、鈴木賀代、木村友厚、Julia Bridge：軟骨粘液線維腫の染色体異常と FISH 法を用いた分子細胞遺伝学的検討。第 42 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2009 年 7 月 17 日 横浜
- ⑦ 石黒昌子、岩崎宏、西尾淳、濱田義浩、濱崎慎、青木光希子、鍋島一樹、平野公一、川本研一郎、原田泰志、池田丈明、茂木愛、松島悠、林博之、三宅徹：軟部腫瘍におけるテロメラーゼによらないテロメア安定機構。第 42 回日本整形外科学会骨・軟部腫瘍学術集会 2009 年 7 月 17 日 横浜

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 淳 (NISHIO JUN)
福岡大学・医学部・助教
研究者番号：90360304

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし