

平成 30 年 5 月 10 日現在

機関番号：37116

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08389

研究課題名(和文)次世代シーケンシングによる骨軟部腫瘍特異的融合遺伝子検出の試み

研究課題名(英文)Next generation sequencing-based molecular detection of tumor-type specific fusion genes in bone and soft tissue tumors

研究代表者

久岡 正典(HISAOKA, Masanori)

産業医科大学・医学部・教授

研究者番号：40218706

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：腫瘍特異的融合遺伝子を有する骨軟部腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織から抽出したRNAを用いて次世代シーケンシング(NGS)解析を行ったが、当該融合遺伝子をうまく検出できなかった。通常ホルマリン固定された腫瘍組織はNGS解析には不適であり、固定に緩衝ホルマリンを用いるなどの工夫が必要と考えられた。一方、凍結新鮮腫瘍組織を用いた解析では当初想定しなかった融合遺伝子(PAX3-MAMAL3等)が検出され、類似した特徴を示す腫瘍の症例を収集して検討することにより、それらの腫瘍における臨床病理学的な多様性を見出すことができ、同解析は骨軟部腫瘍における有用な補助的診断法と考えられた。

研究成果の概要(英文)：Our initial attempt to detect tumor type-specific fusion genes by next generation sequencing (NGS) was unsuccessful when we used ordinary formalin-fixed, paraffin-embedded (FFPE) bone and soft tissue tumors. The result suggested that FFPE tumor tissue is not suitable for such a state-of-the-art molecular analysis. We, therefore, subjected snap frozen tumor tissues to NGS, and could identify a few unique fusion genes (i.e. PAX3-MAMAL, etc) that had been unpredictable. Subsequent clinicopathologic and molecular analyses of accumulated tumor samples harboring the identical genetic alternations demonstrated some clinicopathologic diversities in such tumors. Thus, we believe that NGS is a potentially useful molecular technique as a diagnostic adjunct of bone and soft tissue tumors.

研究分野：人体病理学

キーワード：骨軟部腫瘍 融合遺伝子 次世代シーケンシング RT-PCR FISH FFPE

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 骨軟部腫瘍は発生頻度が低く日常診療で遭遇する機会が少ないことに加え、分化の方向性やそれらの組織像が多彩であるため、一般に病理診断が困難とされています。骨軟部腫瘍の中には組織型に特異的な融合遺伝子を有する一群が存在することが知られており、それらを reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) 法や fluorescence in situ hybridization (FISH) 法で検出することが今日可能なため、これらの分子遺伝学的手法が腫瘍の診断にも応用されています。

(2) 骨軟部腫瘍の中には、病理組織像や免疫組織化学的特徴が既存の疾患単位のものとは合致しない例や、既知の遺伝子変異が検出されない例などがあり、これまでの知見を基に確定診断に至ることが出来ず治療法の選択にも苦慮するような症例が稀ながら存在します。そのような腫瘍の中には、これまでに報告されていないタイプの融合遺伝子などの未知の遺伝子変異を有する例が含まれていることが想定されますが、RT-PCR 法や FISH 法ではそのような変異を検出することは困難であり、遺伝子の網羅的な探索が必要です。

### 2. 研究の目的

(1) RT-PCR 法や FISH 法に代わり、骨軟部腫瘍の正確な病理診断に寄与すると想定される新たな分子遺伝学的手法の候補として、網羅的な遺伝子変異の探索が可能な次世代シーケンシング法 (NGS) を取り上げ、NGS を用いて骨軟部腫瘍のホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織 (FFPE) から融合遺伝子を検出する手法の実行可能性と有用性の検証を行うことを目的としました。

(2) 上記の実効性を確認したのち、これまでに予想される融合遺伝子が検出されない、あるいは病理組織学的・免疫組織化学的に既存の疾患概念に合致しないなど、確定診断に至ることのできなかった症例を対象に、これまでに知られていない新規の融合遺伝子や既報告の融合遺伝子の亜型などを検出することを第2の目的としました。

### 3. 研究の方法

(1) NGS の受託解析で実績のある専門民間業者の中から適切な業者を選定し解析を委託しました。RT-PCR などの検索により融合遺伝子が存在することを既に確認している骨軟部腫瘍症例を対象に、それらの FFPE から抽出された RNA を NGS 解析に供しました。具体的には、腫瘍特異的な融合遺伝子をもつ代表的な骨軟部腫瘍として、SS18-SSX、EWSR1-FLI1、FUS-DDIT3 融合遺伝子が各々既に検出されている滑膜肉腫、ユーイング肉腫、粘液型脂肪肉腫の症例を対象とし、日常の病理診断に用いられているそれらの FFPE から抽出した RNA を解析用サンプルとしました。

解析結果の妥当性を検証するため、同一例の新鮮凍結腫瘍組織から抽出された RNA を対照として用いました。

(2) RNA サンプルのライブラリ調整、品質調査を行い、TruSeq RNA Access Library Prep Kit のプロトコルにおいて、パイオアナライザ測定で算出される DV200 値 (200nt 以上の RNA 断片のパーセンテージ) により Quality が Medium 以上 (DV200 値>50%) と判定される例を解析可能とみなし、Illumina HiSeq を用いて NGS 法によるデータ解析を行いました。

(3) 同解析結果を受け、過去に確定診断できなかった骨軟部腫瘍症例の中から、今回の解析で見出された既知の腫瘍特異的な融合遺伝子あるいは新規の融合遺伝子候補となる遺伝子異常を有する例の有無について、RT-PCR 法や FISH 法を用いて検索しました。同一の融合遺伝子が見られた場合には、臨床病理学的所見を基に、独立した疾患概念としての妥当性を検証しました。

### 4. 研究成果

(1) 上記のように融合遺伝子 SS18-SSX、EWSR1-FLI1、FUS-DDIT3 融合遺伝子が既に検出されている滑膜肉腫、ユーイング肉腫、粘液型脂肪肉腫を対象とし、日常の病理診断に用いられているそれらのホルマリン固定パラフィン包埋腫瘍組織 (FFPE) から抽出した RNA を解析用サンプルとしました。このうち1例の滑膜肉腫の新鮮凍結腫瘍組織から抽出した RNA を対照とし、RNA サンプルの品質調査を行ったところ、約7割のサンプルで解析可能と判定されました。その中で特に FFPE から抽出したサンプルのうち特に DV200 値の高い9サンプルと、その中の1例の滑膜肉腫の新鮮凍結腫瘍組織から抽出した RNA の1サンプルを用いて NGS 解析を行いました (図1)。その結果、FFPE のサンプルからは目的とする SS18-SSX、EWSR1-FLI1、FUS-DDIT3 融合遺伝子は残念ながら検出されませんでした。組織の固定や長期保存等により遺伝子が細断片化されていたことが原因ではないかと想像され、固定の過程に不明な点の多い過去の FFPE を試料として NGS で解析することは目下困難であると考えられました。なお、近年遺伝子検索のために推奨されている緩衝ホルマリンでの短時間固定を行った FFPE が NGS 解析に利用可能かどうかについては今後検討すべき課題であると考えています。

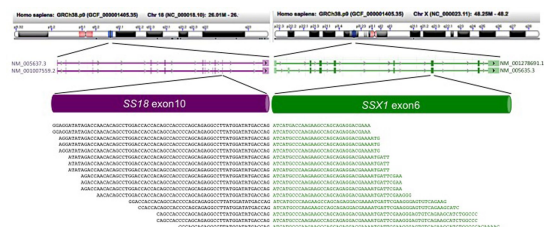


図1 NGS 法による滑膜肉腫における SS18-SSX1 融合遺伝子転写産物の検出

(2)(1)の解析結果から、FFPE から抽出した RNA を解析サンプルとして用いるのは目下困難であると考えられたため、解析サンプルを FFPE から凍結新鮮腫瘍組織に変更し、臨床病理学的に既存のいずれの疾患概念にもあてはまらず、既知の融合遺伝子が検出されていない未分化骨軟部腫瘍 10 例を対象に、新規の融合遺伝子の検出を目的として NGS で解析しました。その結果、PAX3-MAML3、BCOR-CCNB3 融合遺伝子が各々 1 例で検出されました。これらのうち、前者は免疫組織化学的に S-100 陰性、後者は腫瘍全体に出血を伴ったカボジ肉腫類似の組織像を示す紡錘形細胞腫瘍であり、いずれもこれらの融合遺伝子を有するとは予測しえない臨床病理学的に非典型的な例でした。この結果を受け、融合遺伝子がこれまで検出されておらず多少とも類似した臨床病理学的特徴を有する腫瘍を含む症例を対象に RT-PCR 法を用いて検索したところ、PAX3-MAML3 融合遺伝子を有する例を他に 1 例(図 2) また、RT-PCR 法(図 3) FISH 法(図 4) 及び抗 CCNB3 抗体を用いた免疫組織化学(図 5)により BCOR-CCNB3 融合遺伝子を有する例を計 10 例見出しました。これらの融合遺伝子と新たに見出された臨床病理学的知見について関連学会ならびに専門誌上で報告しました。

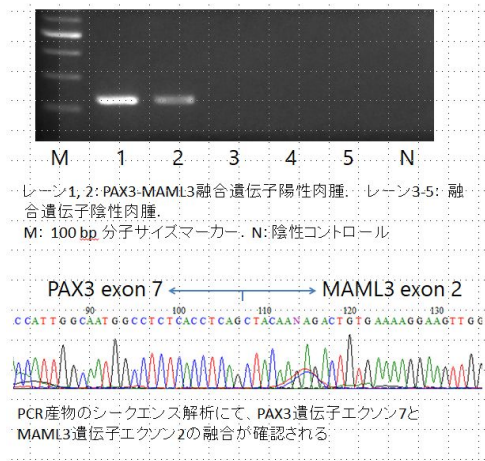


図 2 PAX3-MAML3 融合遺伝子転写産物の検出

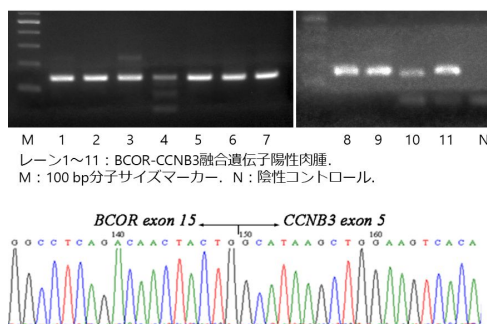


図 3 BCOR-CCNB3 融合遺伝子転写産物の検出

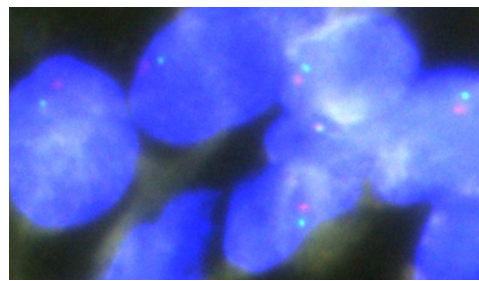


図 4 BCOR 遺伝子分離プローブを用いた FISH 解析

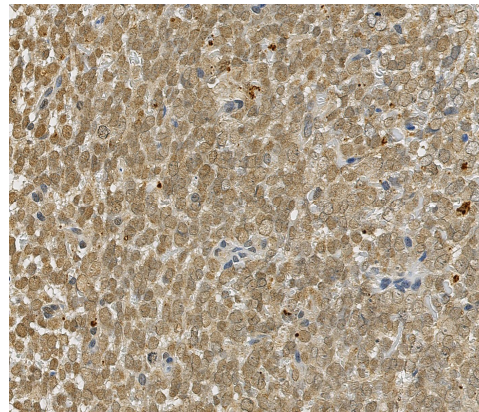


図 5 抗 CCNB3 抗体を用いた免疫組織化学

(3)上記の結果に加え、NGS 解析によりこれまで報告のない融合遺伝子の候補が 23 種類得られました。1 例のみの検出ではその腫瘍の発生に重要な意義を持つ融合遺伝子であるのか、あるいは腫瘍型に特異的な遺伝子異常であるのかの判断が困難であるため、臨床病理学的に類似する例を対象に RT-PCR 法を主な手法として同様の融合遺伝子を有する例がないかについて検討しましたが、目下のところ同様の遺伝子異常を有する例を見出すことはできませんでした。今後も類似の臨床病理学的所見を示し、他の融合遺伝子が検出できない例において、今回検出された融合遺伝子の候補の有無を引き続き検索していく予定です。

## 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)

Matsuyama A, Shiba E, Umekita Y, Nosaka K, Kamio T, Yanai H, Miyasaka C, Watanabe R, Ito I, Tamaki T, Hayashi S, Hisaoka M. Clinicopathologic diversity of undifferentiated sarcoma with BCOR-CCNB3 fusion: Analysis of 11 cases with a reappraisal of the utility of immunohistochemistry for BCOR and CCNB3. *American Journal of Surgical Pathology* 41:1713-1721, 2017. 査読有

DOI : 10.1097/PAS.0000000000000934.

Sato N, Aoki T, Mukai N, Yotsumoto S, Irie K, Hisaoka M. Protuberant fibroosseous lesion of the skull: two cases with occipital lesions. Virchows Archiv 470: 717-720, 2017. 査読有  
DOI : 10.1007/s00428-017-2111-5.

久岡 正典、骨軟部腫瘍、臨床病理、査読無、Vol. 65、No. 9、2017、pp. 1028-1037、<https://www.jslm.org/books/journal/index.html>

〔学会発表〕(計2件)

松山 篤二 他、BCOR-CCNB3 陽性未分化肉腫11例の臨床病理学的解析ならびにCCNB3ならびにBCOR免疫組織化学の診断学的有用性の再検討、第63回日本病理学会秋期特別総会、2017年11月2日、日本教育会館(東京都千代田区)

松山 篤二 他、Biphenotypic sinonasal sarcomas with PAX3-MAML3 fusion: report of 2 cases、第106回日本病理学会総会、2017年4月27日、京王プラザホテル(東京都新宿区)

〔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

久岡 正典 (HISAOKA, Masanori)  
産業医科大学・医学部・教授  
研究者番号： 40218706

### (2) 研究分担者

松山 篤二 (MATSUYAMA, Atsuji)  
産業医科大学・大学病院・講師  
研究者番号： 80351021

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：

### (4) 研究協力者

( )