

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：33303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2022

課題番号：17K08748

研究課題名(和文) Wntシグナル伝達経路に着目した未分類肉腫分類の試み

研究課題名(英文) Classifying undifferentiated/unclassified sarcomas by focusing on the Wnt signaling pathway

研究代表者

甲野 裕之 (KOHNO, Hiroyuki)

金沢医科大学・看護学部・教授

研究者番号：20221236

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)：発生頻度が低くかつ多彩な組織型を呈する未分化/未分類肉腫には特異性の高いマーカーがなく、この腫瘍の診断には新たな特異的マーカーを検索することが重要である。

病院病理部保存のundifferentiated pleomorphic sarcoma/未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫を研究に供した。

分化/未分類肉腫のマーカー遺伝子の候補としてSTAT3に着目した。そのBacterial Artificial cloneとしてRP11-341F8を選出し、BAC DNAを増幅しFISH probeを作成した。未分化/未分類肉腫に対してFISH法を行ったところ、STAT3の遺伝子増幅は認められなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未分化/未分類肉腫に分類される悪性軟部腫瘍は、頻度が低く特異性の高いマーカーも無いため、しばしば病理診断に難渋し病理医間でも診断が分かれることが多く、現時点においても分類のカテゴリーが変更になる可能性もあり得る。このような未分化/未分類肉腫に分類される悪性軟部腫瘍を診断する際の補助として、特異性の高いマーカーが求められている。

本研究では、候補遺伝子としてSTAT3に着目し、遺伝子増幅を検索したが、増幅は確認できなかった。STAT3遺伝子は、遺伝子再構成やDNAメチル化によってその機能を変化させている可能性も考えられるので、今後は次世代シーケンサーやメチローム解析を含めた解析を予定している。

研究成果の概要(英文)：Undifferentiated/unclassified sarcomas, which occur infrequently and present a variety of histologic types, lack highly specific markers, and the search for new specific markers is important for the diagnosis of these tumors.

We collected information on undifferentiated pleomorphic sarcoma/undifferentiated pleomorphic sarcoma/malignant fibrous histiocytoma archived in the pathology department of our hospital, with key clinical information such as the presence or absence of metastases.

We focused on STAT3 as a candidate marker gene for differentiated/unclassified sarcomas. RP11-341F8 was selected as its Bacterial Artificial clone, from which BAC DNA was amplified and fluorescent labeled to create a FISH probe. FISH was performed on undifferentiated/unclassified sarcomas, and no STAT3 gene amplification was observed.

研究分野：病理学

キーワード：未分化/未分類肉腫 Array CGH FISH Wnt pathway b-catenin 免疫組織化学

1. 研究開始当初の背景

悪性軟部腫瘍は、本邦において発生率が10万人に約2人と稀でありかつ多彩な組織型を呈するため、病理医にとって診断が困難であることが多い腫瘍である。

本邦における悪性軟部腫瘍患者登録(2006~2009年)での病理組織別発生頻度は、脂肪肉腫(36.0%)、悪性線維性組織球腫(malignant fibrous histiocytoma: MFH)(23.1%)、滑膜肉腫(9.66%)、平滑筋肉腫(7.9%)、滑膜肉腫(5.5%)、粘液線維肉腫横紋筋肉腫(5.5%)、悪性末梢神経鞘腫瘍(malignant peripheral nerve sheath tumor: MPNST)(4.9%)である。これらのうち頻度の高いものの一つである悪性線維性組織球腫は、WHO分類2002年版で未分化多形肉腫(undifferentiated pleomorphic sarcoma)、粘液線維肉腫、多形型平滑筋肉腫などに再分類されたが、2013年の改訂で未分化多形肉腫(undifferentiated pleomorphic sarcoma)がさらに未分化/未分類肉腫(undifferentiated/unclassified sarcoma)という名称に改められた。未分化/未分類肉腫は undifferentiated round cell sarcoma、undifferentiated spindle cell sarcoma、undifferentiated pleomorphic sarcoma、undifferentiated epithelioid sarcoma、undifferentiated sarcoma, not otherwise specified (NOS) という5つの亜型に細分化されており、従来の悪性線維性組織球腫あるいは未分化多形肉腫は undifferentiated pleomorphic sarcoma に相当するとされている。

未分化/未分類肉腫には、これまでのところ特異性の高い免疫染色マーカーはなく、多形型脂肪肉腫、粘液型脂肪肉腫、多形型平滑筋肉腫、多形型横紋筋肉腫、多形性癌腫、隆起性皮膚線維肉腫、Hodgkin disease, mixed cellularity などの厳密な除外診断によってなされるなど、未だ分類や起源に関して不明な点が多い。

2. 研究の目的

Wnt シグナル伝達経路に含まれる遺伝子群に対する包括的な知見は未だ得られていない。Wnt シグナル伝達経路に属する APC は、家族性大腸腺腫症の原因遺伝子としてあまりにも著名であり、過去に我々もマウスの大腸腺腫において DKK1 の発現が低下していることを見出し、報告している(Oyama T et al., 2008)。

そこで、未分化/未分類肉腫及び少数の多形型脂肪肉腫に対して特に Wnt 伝達経路およびその関連遺伝子に着目し網羅的コピー数解析を行うことにより、未分化/未分類肉腫において Wnt 伝達経路上の遺伝子とその特異的なマーカーとなる可能性に関して検索することとした。

3. 研究の方法

(1) ヒト悪性軟部腫瘍の手術材料の検体収集

金沢医科大学病院臨床病理部および金沢大学附属病院病理部に保管されている undifferentiated pleomorphic sarcoma/未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫の症例を選出し、それらのパラフィンブロックを遠隔転移の有無などの主な臨床情報とともに収集する。

(2) The UCSC Genome Browser にて、STAT3 遺伝子を含む染色体領域をカバーする Bacterial Artificial clone として、RP11-341F8 を選出し、そこから BAC DNA を増幅し、蛍光ラベルを行うことにより FISH probe を作成する。Probe により STAT3 遺伝子の検出可能であることを確認する。

(3) undifferentiated pleomorphic sarcoma/未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫の症例のパラフィン切片に対して FISH 法を行う。

(4) undifferentiated pleomorphic sarcoma/未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫の症例のパラフィン切片に対して FISH 法を行い、増幅が認められた群と認められなかった群に分け、予後等の臨床情報との関連性について検索する。

4. 研究成果

(1) 金沢医科大学病院臨床病理部および金沢大学附属病院病理部に保管されている

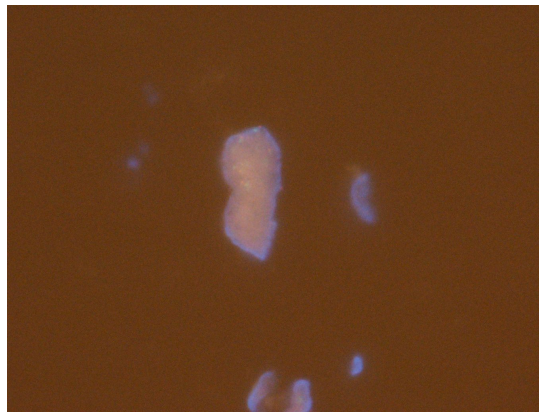
undifferentiated pleomorphic sarcoma/未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫の症例を選出し、それらのパラフィンブロックを遠隔転移の有無などの主な臨床情報とともに集め研究に供した。未分化/未分類肉腫における Wnt シグナル伝達経路の関与を検索するために、Wnt シグナル伝達経路に属し、かつ軟部腫瘍でのタンパク過剰発現が示唆されている DKK1 ならびに β カテニンに関して、遺伝子増幅の有無の確認を行った。解析結果より高度な遺伝子コピー数の増加が認められた Wnt シグナル伝達経路関連遺伝子として DKK1 遺伝子を見出した。

(2) 遺伝子コピー数の増加が認められた DKK1 遺伝子に注目し、DKK1 遺伝子を含む染色体領域をカバーする Bacterial Artificial clone として、RP11-341F8 を選出し、そこから BAC DNA を増幅し、蛍光ラベルを行うことにより FISH probe を作成した。この Fish probe を用

いて、未分化/未分類肉腫に対して FISH 法を試みたところ、Wnt pathway に属するいくつかの遺伝子に対して、遺伝子増幅が確認された。

(3) The Cancer Genome Atlas (TCGA)において、軟部組織においてコピー数の増加がしきられている Wnt pathway 関連遺伝子である *LRP* 遺伝子や Apolipoprotein(Apo)遺伝子について、この Fish probe を用いて未分化/未分類肉腫に対して FISH 法を試みたところ、Wnt pathway に属するいくつかの遺伝子に対して、遺伝子増幅が確認された。

(4) 全ゲノム解析において増幅が確認された遺伝子コピー数増加の validateion に供するために Fluorescence in situ hybridization (FISH)法を行った。具体的には、The UCSC Genome Browser にて、STAT3 遺伝子を含む染色体領域をカバーする Bacterial Artificial clone として、RP11-341F8 を選出し、そこから BAC DNA を増幅し、蛍光ラベルを行うことにより FISH probe を作成した。未分化/未分類肉腫に対して、FISH 法を行ったところ遺伝子の検出は可能であったが、遺伝子増幅は明らかとはならなかった (図 1)。



(図 1) FISH 法による STAT3 遺伝子の検出

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Nakamura Ritsuko, Oyama Takeru, Inokuchi Masafumi, Ishikawa Satoko, Hirata Miki, Kawashima Hiroko, Ikeda Hiroko, Dobashi Yoh, Ooi Akishi	4. 巻 70
2. 論文標題 The relation between anti TGBFR1 immunohistochemical reaction and low Ki67, small tumor size and high estrogen receptor expression in invasive breast cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 330 ~ 339
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12914	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Zheng J, Guo X, Shioya A, Yoshioka T, Matsumoto K, Hiraki T, Kusano H, Oyama T, Kurose N, Yamaguchi R, Uramoto H, Ieiri S, Okajima H, Kohno M, Yamada S	4. 巻 12
2. 論文標題 Peroxiredoxin 4 promotes embryonal hepatoblastoma cell migration but induces fetal cell differentiation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Am J Transl Res	6. 最初と最後の頁 2726~2737
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 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Tanaka T, Oyama T, Sugie S	4. 巻 65
2. 論文標題 Dietary Tricin Suppresses Inflammation-Related Colon Carcinogenesis in Mice.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Nutr Sci Vitaminol	6. 最初と最後の頁 S100-S103
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 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 Terakawa H, Gabata R, Ishikawa S, Hirata M, Inokuchi M, Kawashima H, Miyashita T, Tajima H, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Ohta T, Oyama T, Ikeda H	4. 巻 46
2. 論文標題 A Case of Histiocytoid Breast Carcinoma Accompanied by Multiple Axillary Lymph Node Metastases.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Gan To Kagaku Ryoho	6. 最初と最後の頁 1049-1051
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 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 Tsuda Toyonobu, Tada Hayato, Tanaka Yoshihiro, Nishida Naoto, Yoshida Taiji, Sawada Takeshi, Sakata Kenji, Hayashi Kenshi, Kawashiri Masa-aki, Oyama Takeru, Sasaki Motoko, Kurose Nozomu, Yamagishi Masakazu	4. 巻 12
2. 論文標題 Amiodarone-induced reversible and irreversible hepatotoxicity: two case reports	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Journal of Medical Case Reports	6. 最初と最後の頁 95 ~ 95
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s13256-018-1629-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ooi Akishi, Oyama Takeru	4. 巻 1726
2. 論文標題 Detection of CCND1 Gene Copy Number Variations Using Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification and Fluorescence In Situ Hybridization Methods	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Methods Mol Biol.	6. 最初と最後の頁 101 ~ 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-4939-7565-5_10	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 Nakamura Ritsuko, Oyama Takeru, Inokuchi Masafumi, Ishikawa Satoko, Hirata Miki, Kawashima Hiroko, Ikeda Hiroko, Dobashi Yoh, Ooi Akishi	4. 巻 71
2. 論文標題 Neural EGFL like 2 expressed in myoepithelial cells and suppressed breast cancer cell migration	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 326 ~ 336
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.13087	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 -

〔学会発表〕 計11件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 工藤誠也, 北井隆平, 笠原数麻, 井手久史, 白崎直樹, 山内貴寛, 尾山武
2. 発表標題 斜台部悪性リンパ腫の一例
3. 学会等名 第26回北陸間脳下垂体腫瘍研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 尾山武, 中村律子、甲野裕之
2. 発表標題 Association of VEGFR1/2 expression in the tumor microenvironmental cells with VEGFA in the tumor cells in gastric cancer
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾山武, 中村律子
2. 発表標題 VEGFR1 and VEGFR2 expression in the tumor microenvironmental cells of human gastric cancer
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 尾山武, 甲野裕之
2. 発表標題 Investigation of vascular endothelial growth factor receptors expression in the macrophages at the tumor front in human gastric cancer.
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾山武, 中村律子, 大井章史
2. 発表標題 Effects of VEGFA amplification on the localizaion of M2 macrophage and T cellll in gastric cancer.
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 甲野 裕之、尾山 武
2. 発表標題 ヒト軟部腫瘍におけるVEGFA遺伝子発現と腫瘍内微小血管密度との関連性に関する検討
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾山 武、中村 律子、大井 章史
2. 発表標題 ヒト胃癌においてVEGFA遺伝子増幅がマクロファージおよびリンパ球局在に及ぼす影響
3. 学会等名 第77回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾山 武、中村 律子、大井 章史
2. 発表標題 ヒト胃癌においてVEGFA遺伝子増幅が腫瘍関連マクロファージ局在に及ぼす影響
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 甲野裕之、尾山武
2. 発表標題 Possible association between VEGF gene amplification and intratumoral microvessel density in human gastric cancer.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾山 武、中村 律子、大井 章史
2. 発表標題 Dosage quotient analysis of VEGF gene in human gastric cancers by multiplex ligation-dependent probe amplification.
3. 学会等名 第76回日本癌学会学術集会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾山 武、中村 律子、大井 章史
2. 発表標題 The relationship between VEGF gene amplification and angiogenesis in advanced gastric cancer.
3. 学会等名 第106回日本病理学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 水富 香織, 金谷 麻央, 戸島 史仁, 米田 憲秀, 岡崎 充善, 田島 秀浩, 尾山 武, 蒲田 敏文	4. 発行年 2021年
2. 出版社 金原出版	5. 総ページ数 7
3. 書名 臨床放射線	

〔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
研究 分担者	尾山 武 (OYAMA Takeru) (00515314)	金沢大学・医学系・助教 (13301)	

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
---------	---------