

平成 21 年 3 月 23 日現在

研究種目：基盤研究（C）	
研究期間：2006～2008	
課題番号：18590344	
研究課題名（和文）	脂肪性腫瘍の発生機構に関する分子遺伝学的解析とその病理診断学的応用
研究課題名（英文）	Molecular cytogenetic analyses of lipomatous tumors and their diagnostic application on soft tissue tumors
研究代表者	
廣瀬 隆則(HIROSE TAKANORI)	
埼玉医科大学・医学部・教授	
研究者番号：00181206	

研究成果の概要：

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、*CDK4* および *MDM2* 遺伝子の高度の増幅が認められることを示した。この所見は、鑑別の対象となる悪性線維性組織球腫、血管筋脂肪腫などでは認められず、高分化型および脱分化型脂肪肉腫の病理診断に有用である。また異種成分を含む脱分化型脂肪肉腫でも同様の遺伝子異常がみられることを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	1,700,000	0	1,700,000
2007 年度	900,000	270,000	1,170,000
2008 年度	900,000	270,000	1,170,000
総計	3,500,000	540,000	4,040,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：軟部腫瘍、高分化型脂肪肉腫、脱分化型脂肪肉腫、悪性線維性組織球腫
CDK4、*MDM2*

1. 研究開始当初の背景

脂肪細胞性腫瘍は比較的発生頻度が高く、日常よく経験される非上皮性腫瘍の一つである。

軟部腫瘍のWHO 分類には多数の脂肪性腫瘍が記載されており、良性腫瘍として脂肪腫、脂肪芽腫（症）、血管脂肪腫、紡錘形細胞/多形性脂肪腫、褐色脂肪腫などが、中間悪性群として異型脂肪腫様腫瘍/高分化型脂肪肉腫が、悪性腫瘍として脱分化型脂肪肉腫、粘

液型脂肪肉腫、多形型脂肪肉腫などが分類されている。

近年、これら脂肪性腫瘍の分子遺伝学的解析が進み、それぞれに特徴的な染色体や遺伝子の異常が見出されてきた。例えば脂肪腫では、12q13-15 領域での転座と *HMGIC* 遺伝子の変異、6p21-23 領域での転座、13q の部分欠失などの異常が高頻度で認められる。中間悪性群の異型脂肪腫様腫瘍では12q14-15 領域

からなる余剰環状染色体と巨大桿状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*, *HMGIC* 遺伝子などに増幅が認められる。この異常は悪性腫瘍である脱分化型脂肪肉腫でも認められ、両者は共通の腫瘍化機構を有していると考えられている。一方、粘液型および円形細胞型脂肪肉腫には特異的な染色体転座 $t(12;16)(q13;p11)$ があり、その結果キメラ遺伝子 *TLS-CHOP* が形成される。

2. 研究の目的

種々の脂肪性腫瘍および鑑別の対象となる軟部腫瘍の分子遺伝学的解析を行い、脂肪性腫瘍の発生機構を明らかにするとともに、その応用により病理診断の精度を上げることを目的に、以下の研究課題を計画した。

(1) 脂肪肉腫の遺伝子解析と診断への応用
先に述べたよう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には共通する分子遺伝学的異常の存在が知られている。そこでこれらの異常を日常診断で用いられるホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて検討し、その診断的価値を明らかにする。また脱分化型脂肪肉腫の脱分化領域は多形性を示すことが多く、他の多形性軟部肉腫との鑑別が難しい。特に悪性線維性組織球腫はその代表であり、後腹膜に発生する悪性線維性組織球腫の大部分は脂肪成分を欠いた脱分化型脂肪肉腫であるという説もある。そこで脂肪肉腫に特徴的な染色体および遺伝子異常を、悪性線維性組織球腫を含む多形性肉腫でも検討し、その診断的意義を評価する。

(2) 脱分化型脂肪肉腫における異種性分化
脱分化型脂肪肉腫には、横紋筋細胞などの異種性分化を伴うもの、高度の炎症細胞浸潤を伴い炎症型悪性線維性組織球腫との鑑別を要するもの、髄膜腫様の渦巻き状構造 (whorl formation) が目立つものなど、特有の組織所

見を示す例が知られている。しかし、これらの臨床病理学的特徴や分子遺伝学的異常は十分検討されていない。特徴ある組織所見を示す症例を集積し、遺伝子解析を行い、組織所見の違いの意味を明らかにする。

(3) その他の脂肪性腫瘍

脂肪細胞をその構成要素として持つ腫瘍は稀ではない。その代表的なものに血管筋脂肪腫がある。これは腎に好発する良性腫瘍であるが、稀に後腹膜に発生し、脂肪成分が主体をなす場合には高分化型脂肪肉腫との鑑別が難しい。この脂肪成分に関する分子遺伝学的研究はほとんど行われていない。高分化型脂肪肉腫に特徴的な遺伝子異常の検討を、血管筋脂肪腫でも行い、その診断的意義を明らかにする。

(4) 隆起性皮膚線維肉腫の遺伝子解析

脱分化型脂肪肉腫と並んで、隆起性皮膚線維肉腫も脱分化を来す代表的な軟部肉腫として知られている。そこで軟部腫瘍における脱分化機構を明らかにするため、本腫瘍の遺伝子、染色体異常を解析する。

(5) 後腹膜シュワン腫の解析

脱分化型脂肪肉腫は後腹膜が好発部位である。後腹膜に発生し鑑別の対象となる腫瘍の代表としてシュワン腫があげられる。後腹膜シュワン腫はしばしば巨大となり、黄色調を呈し、多形細胞が混在してくるため、脱分化型脂肪肉腫を含め種々の悪性軟部腫瘍との鑑別が難しい。しかし、後腹膜発生シュワン腫に関するまとまった研究はなされていない。

3. 研究の方法

(1) 脂肪肉腫の遺伝子解析と診断への応用

5 例の異型脂肪腫様腫瘍/高分化型脂肪肉腫と 8 例の脱分化型脂肪肉腫のホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いて、遺伝子、染色体解析を行った。また鑑別の対象となる 5 例

の粘液型脂肪肉腫、1例の多形型脂肪肉腫、21例の悪性線維性組織球腫、3例の平滑筋肉腫、5例の悪性末梢神経鞘腫瘍、23例の脂肪腫についても同様の検討を行った。遺伝子解析に関しては、パラフィン切片からDNAを抽出し、real-time polymerase chain reaction(PCR)法により、*MDM2* および *CDK4* の増幅を定量的に解析した。またパラフィン切片上で、fluorescence in situ hybridization (FISH)法により、12q13-15領域の増幅を検討した。

(2) 脱分化型脂肪肉腫における異種性分化横紋筋性分化を伴った後腹膜の脱分化型脂肪肉腫で3例の免疫組織化学的および分子遺伝学的解析を行った。免疫染色では、myoglobin、desmin、muscle actin、myogeninなどの筋原性マーカーの発現を検討した。遺伝子検索としては、*MDM2*および*CDK4*の増幅をreal-time PCRで検索した。

(3) その他の脂肪性腫瘍
71歳女性の後腹膜に発生した巨大な血管筋脂肪腫の検討を行った。本例のほとんどの領域は脂肪細胞で占められており、高分化型脂肪肉腫との鑑別が困難であった。免疫組織化学的検索と共に、real-time PCRで*MDM2*および*CDK4*の増幅を調べた。

(4) 隆起性皮膚線維肉腫の遺伝子解析
隆起性皮膚線維肉腫(DFSP)は時に線維肉腫様変化(FS)を示し、転移する可能性が高くなる。この悪性転化の機構を明らかにするために、分子遺伝学的解析を行った。検討した症例は19例で、13例は通常型DFSP、6例は線維肉腫様DFSP(DFSP-FS)である。免疫組織化学的にCD34、p53、Ki-67の発現を検討した。またホルマリン固定、パラフィン包埋材料を用いて、reverse transcriptase (RT)-PCR法によりDFSPに特徴的とされるfusion gene、*COL1A1-PDGFB*を、またFISH法により*PDGFB*

の転座の検出を試みた。

(5) 後腹膜シュワン腫の解析

後腹膜原発シュワン腫12例を、縦隔原発10例およびその他の部位に発生した10例と比較検討し、その特徴を明らかにした。組織学的検討とともに、S-100 protein、Sox 10、INI1、CD68、CD31、Ki-67の免疫染色を実施した。

4. 研究成果

(1) 脂肪肉腫の遺伝子解析と診断への応用
脂肪肉腫のreal-time PCRによる遺伝子解析の結果、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*CDK4*が平均35.3、*MDM2*が平均38.9と著しい増幅を示していることが明らかとなった。この増幅はFISHでもシグナルの著しい集積像として確認された。一方、鑑別診断として問題となる以下の腫瘍の*CDK4*および*MDM2*増幅率は、粘液型脂肪肉腫(2.3; 2.5)、多形型脂肪肉腫(2.1; 2.7)、脂肪腫(0.6; 1.2)、悪性線維性組織球腫(1.5; 1.5)、平滑筋肉腫(0.7; 0.4)、悪性末梢神経鞘腫瘍(0.7; 0.3)であり、遺伝子の著明な増幅は認められなかった。FISH法でもほぼ同様の結果が得られた。以上、パラフィン包埋材料を用いたreal-timePCRおよびFISH法により、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*CDK4*および*MDM2*の著しい増幅を証明することができた。一方、これらと鑑別が問題となる各種軟部腫瘍では、増幅はあっても軽微であり、高度の増幅は確認できなかった。すなわちこれらの遺伝子増幅の解析は、脂肪性腫瘍の診断に極めて有用であることが示された。

(2) 脱分化型脂肪肉腫における異種性分化横紋筋性分化を示す脱分化型脂肪肉腫の3例では、横紋筋性腫瘍細胞にdesmin、myoglobin、myogenin、muscle actinが発現していた。また横紋筋性分化は、電子顕微鏡による検索で

も確認された。real-time PCR では、高分化型脂肪肉腫の領域と横紋筋を含む脱分化領域の両方で、*MDM2*および*CDK4*の増幅が検出された。この結果、異種性分化を伴う脱分化型脂肪肉腫でも、それ以外の脱分化型脂肪肉腫と同様の遺伝子異常を有していることが明らかとなり、またその分子遺伝学的な検索が診断上有用であることが示された。

(3) その他の脂肪性腫瘍

後腹膜に発生した血管筋脂肪腫は16X13cm大と巨大であり、組織学的には脂肪細胞のびまん性増殖が認められた。またその間に肥厚した血管が混在しており、血管壁に上皮様の細胞が散在性に分布していた。さらに本例ではアミロイドの沈着を伴っていた点が特異であった。免疫染色で上皮様細胞にHMB-45とsmooth muscle actinが発現しており、血管筋脂肪腫と診断された。Real-timePCRによる*MDM2*および*CDK4*の検索で、これらの増幅は示されなかった。以上の所見から、血管筋脂肪腫は後腹膜の高分化型脂肪肉腫と誤診される可能性があり、鑑別には*MDM2*および*CDK4*の分子遺伝学的解析が有用であることが示された。

(4) 隆起性皮膚線維肉腫の遺伝子解析

隆起性皮膚線維肉腫の免疫組織化学的検討で、CD34陽性所見はDFSP領域で16/17例(94.1%)、FS領域は5/6例(83.3%)で得られた。Ki-67標識率はDFSPで1-15.5%(平均4.7%)、FSで9.7-31.4(平均20.2%)で、後者での標識率が有意に高かった。またp53の過剰発現が認められたのはわずかにDFSP-FSの2例であった。RT-PCR法により*COL1A1-PDGFB* fusion transcriptが、DFSPの14/15(93.3%)、FSの5/5(100%)と、大部分の症例で確認された。*COL1A1*の切断点は、exon 5(2例)、8(1)、11/46(1)、20(1)、23(4)、26/31(1)、32(4)、38(1)と多彩であり、DFSPとDFSP-FS

では明らかな違いはなかった。また両領域の比較が可能であったDFSP-FSの4例では、両者の切断点は同一であった。FISH法による*PDGFB*の再構成はDFSP領域で12/13例(92.3%)、FS領域で4/5例(80%)で確認された。今回の検討から、DFSPおよびDFSP-FSのほぼ全例でRT-PCR法とFISH法により*PDGFB*遺伝子の再構成が確認され、これらがDFSP腫瘍群の診断に有用であることが示された。p53過剰発現はDFSP悪性化の主要因とは考えられず、別の分子機構の関与が推測された。

(5) 後腹膜シュワン腫の解析

組織学的に、シュワン腫は通常型、陳旧型、富細胞・束状型の3型に分類された。富細胞・束状型では、紡錘形の腫瘍細胞が密に束状配列を示し、通常型の特徴は目立たない。後腹膜シュワン腫12例のうち、半数の6例は富細胞・束状型であった。後腹膜以外では、縦隔の1例だけが富細胞・束状型で、他は通常型あるいは陳旧型であった。免疫組織化学的に、すべてのシュワン腫で、S-100 protein、Sox 10がびまん性に陽性であった。CD68免疫染色により、富細胞・束状型の4例に泡沫細胞の集簇が認められ、特徴的な所見と考えられた。また同型ではCD31陽性の異常血管の出現頻度が低かった。Ki-67は、ほとんどの例が低標識率であったが、富細胞・束状型では部分的に比較的高い標識率を示す部分が含まれていた。今回の結果から、後腹膜に発生するシュワン腫は、約半数が富細胞・束状型の組織所見を示し、またKi-67標識率の高い部位が混在するため、悪性末梢神経鞘腫瘍、平滑筋肉腫、滑膜肉腫、線維肉腫、脱分化型脂肪肉腫などの紡錘形細胞肉腫との鑑別を要する。診断には、シュワン細胞マーカーであるS-100protein、Sox 10のびまん性陽性像が有用であると考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌発表] (計5件)

廣瀬隆則. 23. 関節. 病理と臨床 (臨時増刊号)、2006; 24: 159-166. 査読なし

Shimada S, Ishizawa T, Ishizawa K, Matsumura T, Hasegawa T, Hirose T. The value of MDM2 and CDK4 amplification levels using real-time polymerase chain reaction for the differential diagnosis of liposarcomas and their histologic mimickers. *Human Pathology* 2006; 37: 1123-1129.

査読あり

Shimada S, Harada H, Ishizawa K, Hirose T. Retroperitoneal lipomatous angiomyolipoma associated with amyloid deposition masquerading as well-differentiated liposarcoma. *Pathology International* 2006; 56: 638-641.

査読あり

廣瀬隆則. 20. 軟部腫瘍. 病理と臨床 (臨時増刊号)、2007; 25: 201-208. 査読なし

Hirose T, Shimada S, Tani T, Hasegawa T. Ossifying fibromyxoid tumor: Invariable ultrastructural and diverse immunophenotypic expression. *Ultrastructural Pathology* 2007;

31:233-239. 査読あり

[学会発表] (計5件)

廣瀬隆則. シンポジウム3 骨・軟部腫瘍の病理診断におけるHE染色の限界と免疫染色の問題点. 末梢神経性腫瘍における病理診断のピットフォール. 第39回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会. 2006年7月6日、札幌市

Hirose T, Shimada S, Ishizawa K, Harada H. The value of MDM2 and CDK4 amplification

levels using real-time PCR and FISH for the differential diagnosis of liposarcomas and their histologic mimickers. 26th International Congress of the International Academy of Pathology, 2006, September 16-21, Montreal

廣瀬隆則. 症例から学ぶ鑑別診断シリーズ. 第52回日本病理学会秋期特別総会. 2006年11月24日、和歌山市

廣瀬隆則. シンポジウム1 多角的アプローチによる骨・軟部腫瘍の病理診断. 電顕的検索が病理診断に有用な骨・軟部腫瘍. 第41回日本整形外科学会 骨・軟部腫瘍学術集会. 2008年7月17日、浜松市

Hirose T, Shimada S, Ishizawa K. Molecular cytogenetic studies on fibrosarcomatous transformation of dermatofibrosarcoma protuberans. 27th International Congress of the International Academy of Pathology, 2008 October 12-17, Athens

[図書]

村田晋一、廣瀬隆則. 骨軟部. 清水道生編. 実用細胞診トレーニング. 秀潤社、2008年、156-160.

木村鉄宣、廣瀬隆則. 皮膚軟部腫瘍アトラス. 秀潤社、2009年.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

廣瀬 隆則 (HIROSE TAKANORI)
埼玉医科大学・医学部・教授
研究者番号: 00181206

(2) 研究分担者

石澤 圭介 (ISHIZAWA KEISUKE)
埼玉医科大学・医学部・講師
研究者番号: 10327025