

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K16660

研究課題名(和文) 分子マーカーを用いた軟部肉腫の新規リスク分類の創出

研究課題名(英文) Novel molecular sub-classification of soft tissue sarcomas

研究代表者

小松 正人 (Komatsu, Masato)

神戸大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50531753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：軟部腫瘍において、悪性度を定める明確な分子マーカーはほぼ皆無であり、肉腫患者の予後向上を目指した客観性のある分子マーカーの創出が急務である。軟部腫瘍の遺伝子発現データベースから4つの癌精巣抗原の発現に着目し、肉腫症例の切除検体を用いてそれら癌精巣抗原の発現を免疫組織染色で確認した。

平滑筋肉腫では、DEPDC1Aという分子の高発現は無再発生存期間が短縮する傾向がみられ、壊死やKi-67標識率の増加といった高増殖性とも相関がある傾向がみられた。DEPDC1AはNFκBパスウェイと深く関連することも知られており、平滑筋肉腫でもDEPDC1Aを介したNFκBパスウェイの異常が治療標的となりうる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

悪性腫瘍である肉腫は希少腫瘍の一つで、これまでその悪性度を予測する客観的な分子マーカーの研究・あるいは治療標的の開発が癌腫に比べて進んでいないことが問題であった。

我々は癌精巣抗原という、精巣と悪性腫瘍でのみ発現がみられる分子に着目したわけだが、1)正常組織では精巣以外の臓器では非常に発現レベルが低く、2)治療標的となった場合に副作用の低減が期待されるという理由がその着眼理由である。

実際DEPDC1Aの高発現が平滑筋肉腫でその悪性度と関連しうることが示され、すでにDEPDC1Aをターゲットとした治療標的の基礎的研究も進んでいることより、平滑筋肉腫の新たな治療展開が期待される。

研究成果の概要(英文)：In soft tissue sarcomas, there is no objective and reproducible molecular markers predicting its malignant potential. To uncover the molecular sub-classification of soft tissue sarcomas according to the expression of cancer-testis antigens (CTAs), which were statistically extracted from publicly available gene-expression database, we performed immunohistochemical analyses of these CTAs using surgically resected sarcoma specimens. As a result, the higher nuclear expression of DEPDC1A was tend to be associated with shorter progression free survival of patients with leiomyosarcomas and also to be associated with the increased necrotic burden and Ki-67 labeling index, which implying that DEPDC1A is involved in intrinsic malignant manifestation of leiomyosarcomas. As DEPDC1A had been shown to play a critical role for positive regulations in NFκB pathways, DEPDC1A is not only useful for predicting malignant potential, but also would be attractive therapeutic target.

研究分野：人体病理学、分子生物学

キーワード：軟部腫瘍

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

軟部肉腫は希少腫瘍の一つであり、その再発リスク分類・予後予測因子に関しては、研究当初から現在までも分子マーカーを用いた客観性のある指標はほぼ皆無であり、肉腫患者の予後向上を目指した客観性のある分子マーカーの創出が急務と考えられていた。特に、それ自体が治療標的となり、副作用の低減を狙い正常組織で発現が低いものを候補にして、癌精巢抗原に着目した。癌精巢抗原は、例えば滑膜肉腫では FZD10 が非常に有力な治療標的となりうる癌精巢抗原として本邦から初めて報告され、実際に治療薬の開発段階にまで至っている。このような状況を踏まえ、それ以外の肉腫に関してもこのような最終的に治療を見据えた分子マーカーの創出ができないかどうかに着目した。また癌精巢抗原がどのような役割を通じて肉腫の悪性化に関連するかを解明し、謎が多い肉腫の生物学的理解を推し進めることも目指すことにしていた。

2. 研究の目的

客観的で日常病理組織診断で簡易に使用可能で、肉腫再発リスクの層別化が可能な分子マーカーの創出を行い、最終的に肉腫患者の予後向上を目指すことを本研究の目的である。正常組織で発現が低く治療標的となりやすい、特に癌精巢抗原に着目し、その発現が肉腫の高リスクグループの拾い上げに有用かどうかに着目した。

3. 研究の方法

- (1) 肉腫の臨床情報を併せた大規模遺伝子発現データ (TCGA) の情報から、予後予測につながるような遺伝子 (癌精巢抗原) を抽出する。R を用いて、臨床病理学的因子と各種遺伝子の発現の関連を統計学的に解析する。
- (2) 抽出した遺伝子群に対し、実際の肉腫切除症例の標本に対して免疫組織学的手法を用いてその発現を調べ、発現レベルに応じて臨床病理学的因子とどのような相関があるのか統計学的手法を用いて調べる。免疫染色は、自動免疫染色装置 Bond-III (Leica) を使用して自動染色を行った。その他、Ki-67 も同様の手法で染色した。腫瘍細胞における癌精巢抗原の発現は、50%以上の腫瘍細胞に一定の発現を認める症例を強発現群、0-49%の腫瘍細胞に発現みられる症例を弱-中発現症例として扱った。癌精巢抗原の発現は正常精細管における精母細胞をポジティブコントロールとして条件設定を行った (正常精細管は、精巣腫瘍の手術で摘出された正常の精巣の余剰ブロックをコントロールとして用いた)。
- (3) 特に DEPDC1A に着目して研究を進めたわけだが、FFPE 検体から RNAsort FFPE RNA purification kit を用いて RNA を抽出し、NFkB パスウェイの遺伝子群 (特に転写誘導される遺伝子群) と DEPDC1A の 蛋白発現に相関があるかどうかを、リアルタイム RT-PCR 法を利用して検討した。
- (4) 肉腫を含めた軟部腫瘍を組織学的にもう一度整理していく過程で遭遇した、分類不能な腫瘍に対して新規な遺伝子異常 (ドライバー変異) がないかどうかの確認も並行して行った。この際に FFPE 検体から RNA を抽出し、RNA を用いた次世代シーケンス解析 (RNA シーケンス) や FISH 解析を行った。RNA シーケンスは illumina 社の HiSeq を用いた。

4. 研究成果

- (1) 大規模データベースを用いて、肉腫における予後予測につながる癌精巢抗原として 4 つの遺伝子 (DEPDC1A, FHAD1, LHX8, TRIP13) に着目した。これらは高発現群でいずれも無再発生存率が有意に低く、各種臨床病理学的因子を用いた多変量解析においても、無再発生存率に対して独立した予後予測因子となりうるものと判断し、以下の解析に繋げた。表 1 は TCGA のデータベースを用いて R を用いて統計解析を施行したデータであるが、105 例の平滑筋肉腫症例において DEPDC1A の高発現が、独立した再発予後予測因子となることが示された。

指標	ハザード比	95% 信頼区間	P値
術後化学療法(施行なし)	0.7304	0.1158 - 4.607	0.738200
術後放射線療法(施行なし)	0.8284	0.1618 - 4.241	0.821200
組織学的腫瘍の残存(R1)	1.8660	0.3670 - 9.791	0.445200
腫瘍径	0.9362	0.4583 - 1.913	0.856500
性差	0.9685	0.5319 - 1.763	0.916500
DEPDC1 (高発現)	2.7850	1.3770 - 5.632	0.004364

表1. 再発に及ぼす可能性のある因子を含めた多変量解析(平滑筋肉腫症例)

- (2) DEPDC1A に関して、平滑筋肉腫・未分化多形肉腫/粘液線維肉腫・脱分化型脂肪肉腫の症例において、ポリクローナル抗体 (TA590500, ORIGENE 社) を採用して免疫染色を行った。その結果、DEPDC1A の発現に性差はなく、平滑筋肉腫症例に関しては高発現症例・低-中発現症例間において、全生存期間に有意な差はみられなかった。一方、無再発生存期間に関しても統計

学的な有意差は得られなかったものの、高発現症例でややその期間が短縮する傾向がみられた($P=0.0757$) (図 1)。

- (3) 一方、その他の臨床病理学的因子と DEPDC1A の発現の比較解析に関しては、腫瘍の増殖性を反映した壊死巣の分布は、低-中発現症例では 2.2 focus/1 切片平均であったが、高発現症例では 4.7 focus/1 切片平均で、 $P=0.04$ とわずかではあるが、高発現症例で有意に壊死巣が多い結果であった。その他、Ki-67 は低-中発現症例では平均 23.5%であったが、高発現症例では平均 40.1%($P=0.03$)と有意に増殖活性が高い結果であった。二群間で核分裂数の差に統計学的相違は得られず、また肉腫の発生部位に関しては、特に発現の違いでの相違は認められなかった。未分化多形肉腫/粘液線維肉腫・脱分化型脂肪肉腫に関しては、明確に高発現群・低-中等度発現群を分類することが困難であった。LHX8, FHAD1 に関しては有用なポジティブコントロールが得られておらず、抗体を選定して染色する必要がある。いずれにしろ、ここまでの結果において DEPDC1A の高発現を示す症例は術後再発に十分注意すべきということが示唆され、高リスク症例の拾い上げに免疫組織染色がある程度有用であることが分かった。

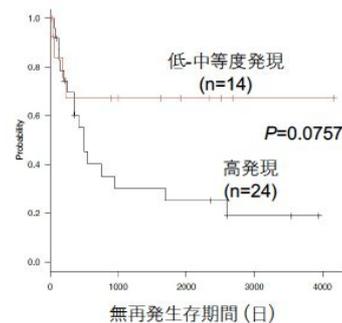


図1. DEPDC1Aの発現レベルによる平滑筋肉腫の予後曲線

- (4) NFkB に転写制御される特に腫瘍発生/腫瘍細胞の生存に関連した遺伝子(サイトカイン・ケモカイン・*bcl-2* 遺伝子)のいくつかに関して RT-PCR を試みたが、FFPE という検体の性質上、個々の遺伝子の発現値に極めてバラツキが多く、DEPDC1A の発現との相関性を確認することが困難であった。今後の展望としては、新鮮凍結検体で DEPDC1A の発現を正しく測定することに加え、複数の平滑筋肉腫細胞培養株を用いて、DEPDC1A の発現を調べ、NFkB パスウェイを正に制御しているかの機能実験を展開し、DEPDC1A を標的としたハイリスク症例の拾い上げ、膀胱がんでは既に DEPDC1A が治療標的となるうる可能性が示唆されており、これに準じて平滑筋肉腫に対しても同様の治療標的の確立に繋げたい。また、肉腫は非常に組織型が多く、(2)であげた組織亜型のもの以外にも、例えば一定数の患者数がみこまれる粘液型脂肪肉腫や、異型脂肪腫様腫瘍/高分化型脂肪肉腫、血管肉腫、骨肉腫、軟骨肉腫にも応用し、また中間悪性腫瘍や局所再発率の高い腫瘍であるとされる孤在性線維性腫瘍や骨巨細胞腫、デスモイド腫瘍などでも一定の症例数の確保が可能のため DEPDC1A の発現を調査し、研究の拡大展開をすることが可能と考える。
- (5) 軟部腫瘍・肉腫症例の組織像を整理していく過程で、3つの腫瘍に遭遇した。一つは成人の大腿深部に発生した、アクチン蛋白や SOX10、GFAP (glial fibrillary acidic protein)などを発現する筋上皮への分化が考えられた高悪性度軟部腫瘍で、FFPE を用いた RNA シーケンス解析において *EWSR1* の新規融合パートナー遺伝子である *VGLL1* (*Vesitigial like family Member-1*) を世界で初めて同定し、その結果を国際誌へ論文報告した (図 2)。

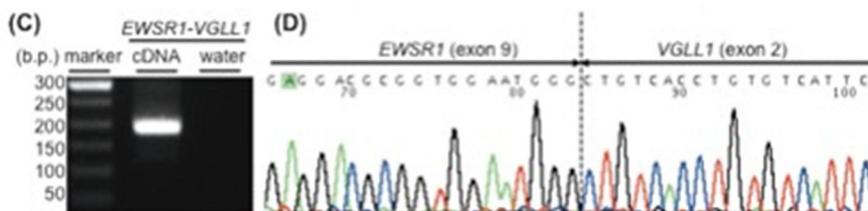


図 2. 軟部発生の悪性筋上皮腫で同定された新規融合遺伝子 *EWSR1-VGLL1*

また、未分化肉腫の組織像を整理する過程で、小児の下肢に発生した軟部悪性腫瘍に関して、組織学的には胞巣状軟部肉腫あるいは筋上皮腫が示唆されたが、*TFE3* 遺伝子や *EWSR1* 遺伝子融合遺伝子が検出されず、診断・分類に難渋した例に遭遇した。新規な分子異常が背景にあることが考慮され、FFPE を用いた次世代シーケンサーによる全 RNA シーケンスを施行したところ、全く新規な融合遺伝子である *NR1D1-MAML1* が in-frame で検出された。*MAML2* に関しては粘表皮癌、*MAML3* に関しては肝腺腫や鼻腔に稀に発生する biphenotypic sinonasal sarcoma のドライバー融合遺伝子として知られているが、*MAML1* あるいは *NR1D1* に関してはこの融合遺伝子を持つ腫瘍は、造血器悪性腫瘍を含め固形腫瘍でも全く報告がこれまでにないため、新規な腫瘍概念である可能性も示唆されたため、この結果を国際誌へ報告した (図 3)

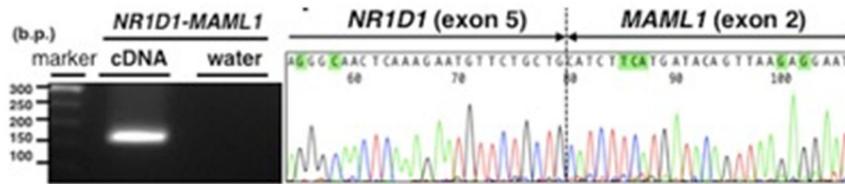


図3. 小児の下肢に発生した軟部腫瘍で同定された新規融合遺伝子 *NR1D1-MAML1*

さらに、成人の肺実質に発生した間葉系腫瘍に関して RNA シーケンス解析で *EWSR1-CREM* という融合遺伝子を持つ腫瘍を同定した(図4)。この融合遺伝子を持つ腫瘍群としては、類血管腫線維性組織球腫(angiomatoid fibrous histiocytoma; AFH)や上皮性腫瘍でいえば硝子型明細胞癌が考えられたが、両者とするには組織像や種々の免疫組織化学の結果が通著しく乖離していたため、この肺腫瘍も新たに特殊な疾患分類の軟部腫瘍(非常にまれな AFH の亜型である可能性も含め)の可能性があり、解析結果を国際誌へ報告した。

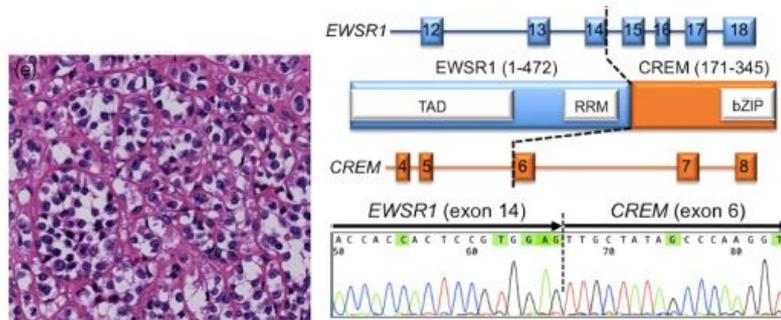


図4. *EWSR1-CREM* 融合遺伝子を持つ肺の間葉系腫瘍

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5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 Komatsu M, Kawamoto T, Kanzawa M, Kawakami Y, Hara H, Akisue T, Kuroda R, Nakamura H, Hokka D, Jimbo N, Itoh T, Hirose T.	4. 巻 59
2. 論文標題 A novel EWSR1-VGLL1 gene fusion in a soft tissue malignant myoepithelial tumor.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genes Chromosomes Cancer	6. 最初と最後の頁 249,254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/gcc.22823.	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 Komatsu M, Hashimoto T, Hanioka K, Itoh T, Hirose T.	4. 巻 68
2. 論文標題 A rare autopsy case of epithelioid angiosarcoma arising in the aorta in a patient with massive multi-organ embolization.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 574-576
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12690. Epub 2018 Jun 19.	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 Komatsu Masato, Yamamoto Nobuyuki, Kawamoto Teruya, Kawakami Yohei, Hara Hitomi, Uemura Suguru, Nishimura Noriyuki, Akisue Toshihiro, Kuroda Ryosuke, Iijima Kazumoto, Jimbo Naoe, Kanzawa Maki, Kajimoto Kazuyoshi, Itoh Tomoo, Hirose Takanori	4. 巻 477
2. 論文標題 Soft tissue tumor with novel NR1D1-MAML1 fusion in a pediatric case	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 891 ~ 895
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-020-02838-0	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 Komatsu Masato, Sakai Yasuhiro, Nishikubo Megumi, Tane Shinya, Nishio Wataru, Kajimoto Kazuyoshi, Hirose Takanori	4. 巻 70
2. 論文標題 EWSR1 CREM fusion in pulmonary mesenchymal neoplasm showing distinctive clear cell morphology	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pathology International	6. 最初と最後の頁 1020 ~ 1026
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.13030	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 Komatsu Masato, Yoshida Akihiko, Tanaka Kazuhiro, Matsuo Kazuya, Sasayama Takashi, Kojita Yasuyuki, Kanda Tomonori, Kodama Yoshinori, Itoh Tomoo, Hirose Takanori	4. 巻 37
2. 論文標題 Intracranial myxoid mesenchymal tumor with EWSR1?CREB1 gene fusion: a case report and literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Brain Tumor Pathology	6. 最初と最後の頁 76 ~ 80
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10014-020-00359-x	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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 小松 正人、阿部 志保、西尾 祐美、原 仁美、神澤 真紀、伊藤 智雄、廣瀬 隆則
2. 発表標題 異型多形脂肪腫性腫瘍と考えられた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 小松正人、吉田朗彦、松尾和哉、篠山隆司、児玉良典、伊藤智雄、廣瀬隆則
2. 発表標題 Myxoid angiomatoid fibrous histiocytomaに類似した組織像を呈するEWSR1遺伝子再構成を伴った頭蓋内腫瘍の1例
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔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
研究協力者	伊藤智雄 (Itoh Tomoo)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	廣瀬隆則 (Hirose Takanori)		

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