

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16563

研究課題名(和文) 高分化型脂肪肉腫の組織亜型を通じた、線維増生と炎症細胞誘導に関わる分子機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of molecular mechanisms involved in fibrosis and inflammation by comparing subtypes of well-differentiated liposarcoma

研究代表者

加藤 生真 (KATO, Ikuma)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：80644939

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)：高分化型脂肪肉腫はMDM2遺伝子増幅という共通した特徴を有する一方で、脂肪腫様・硬化型・炎症性という主に3つの組織亜型が不均一に混在する組織像を示す。MDM2増幅に加えてそれらの組織亜型の形成に関与する分子メカニズムが存在すると考えられることから、網羅的RNA発現データの比較を亜型間で行い、特徴となる分子を探索した。本研究では、脂肪腫亜型と硬化性亜型を有する6症例の網羅的発現データから、線維化に関与する分子の探索に特に注力した。結果として、硬化性亜型において高発現するRNAが9個見出され、そのいくつかはタンパク発現の検討が可能であった。しかし多数例の検討で、亜型に対する特異性は見出せなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

比較的均一な遺伝子異常を有するとされる軟部腫瘍において、組織学的不均一性を説明する分子機構の解明を試みたことは、より複雑な遺伝子異常を有する癌腫における組織学的不均一性の解析にも寄与すると考えられた。また、一般的な施設で保管されている、ホルマリン固定パラフィン包埋材料からも一定の質の網羅的RNA発現データを得られたことは、今後類似の手法で解析を試みる際の足掛かりとなった。

研究成果の概要(英文)：While well-differentiated liposarcoma commonly has MDM2 gene amplification, they exhibit a heterogeneous histological appearance. To investigate molecular mechanisms involved in fibrosis and inflammation in addition to MDM2 gene amplification, we analyzed RNA sequencing data of 6 case having both lipoma-like and sclerosing areas. As a result, 9 highly expressed RNAs in sclerosing areas were found, some of which could be studied for protein expression. However, no specificity for the subtype was proven after studying many cases.

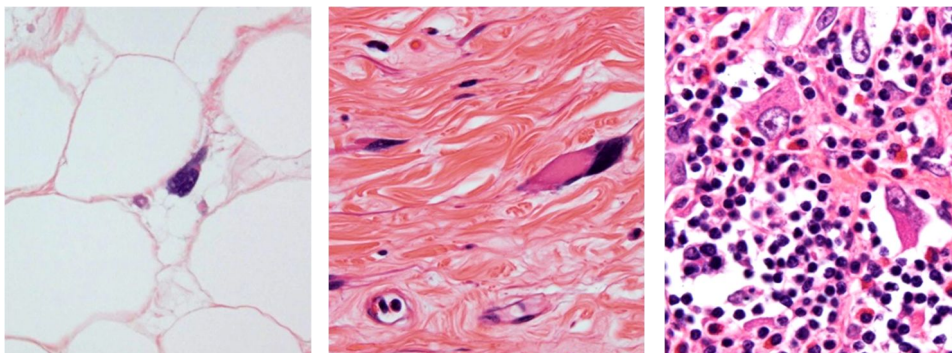
研究分野：人体病理学

キーワード：高分化型脂肪肉腫 組織像 遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

【高分化型脂肪肉腫は多彩な組織像をとる】

高分化型脂肪肉腫(異型脂肪性腫瘍)は境界悪性腫瘍に分類される代表的な軟部腫瘍である。脂肪分化を示す腫瘍細胞が増殖する典型的な像(脂肪腫様亜型)とともに、種々の割合で線維増生(硬化性亜型)や炎症細胞浸潤(炎症性亜型)を伴うことがある(図参照)。これら3つの組織亜型それぞれで像の類似した別の腫瘍が複数存在している。



(図) 高分化型脂肪肉腫における3組織亜型の像

同一腫瘍内において、脂肪腫様亜型(左)・硬化性亜型(中央)・炎症性亜型(右)の像が種々の割合で混在し多彩な像をとる。

【高分化型脂肪肉腫は、特徴的な細胞遺伝学的異常を有する】

組織像が多彩な一方で、高分化型脂肪肉腫には特徴的な細胞遺伝学的異常がドライバー的遺伝子異常として知られている。12番染色体 q14-15 領域を含む環状染色体、巨大マーカー染色体であり、12q14-15 領域に存在する MDM2 遺伝子の増幅と結果として生じる MDM2 タンパク過剰発現は代表的診断マーカーとなっている。

【MDM2 遺伝子増幅では、多彩な組織像を説明できない】

MDM2 遺伝子増幅は重要な診断マーカーであるが、そのみでは多彩な組織像をとるメカニズムについて説明することができない。線維増生の目立つ領域には MDM2 遺伝子増幅細胞が多いことは経験的に知られているが、どのような分子メカニズムが線維増生を誘導するのか、あるいは炎症細胞の動員を誘導するのかについて、現状では十分なデータが得られていない。同一腫瘍内での組織亜型ごとの遺伝子発現や微小環境の違いに注目してメカニズムの一端を明らかにすることは、高分化型脂肪肉腫の診断精度を高めるのみにとどまらず、線維増生・炎症細胞動員という腫瘍横断的にみられる現象の理解にもつながると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、代表的脂肪性腫瘍である高分化型脂肪肉腫における組織亜型ごとの網羅的遺伝子解析による遺伝子発現の違いを解析することで、多彩な組織像をとるメカニズムを解明することを目的とした。多くの癌腫で次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子解析が行われ一定の成果を挙げているが、軟部腫瘍においては特徴的な遺伝子異常による疾患の枠組みが比較的明確にあるにもかかわらず(あるいはそれ故に)、網羅的遺伝子発現を取り入れた解析の報告は多くはない。今回は、同一の遺伝子異常によって規定される腫瘍の、さらにその先の詳細なメカニズムに関して、腫瘍内の病理組織像の違いに着目し、マクロダイセクションの手法を組み合わせることで、価値の高いデータが得られると考えられた。

3. 研究の方法

- (1) 症例の選定: 病理診断の完了したホルマリン固定パラフィン包埋検体から各症例を選定した。高分化型脂肪肉腫の3つの亜型(脂肪腫様・硬化型・炎症性)のうち、炎症性亜型に関しては非腫瘍細胞が多く含まれることから解析に不適切と判断し、脂肪腫様(A領域)と硬化型(B領域)の亜型を同一腫瘍内に含む9例を選定した。陰性コントロールとしては脂肪腫5例、非腫瘍性脂肪組織5例を用いた。
- (2) Total RNA の抽出: 全例で total RNA を抽出し、網羅的 RNA 発現解析が可能かの質の検討を行った。解析可能な質と認定された検体に関して、RNA sequencing を実施した。
- (3) 得られた fastq ファイルから、データの quality check, mapping, 発現定量を行った(ゲノモンを使

用)。TCC-GUI(version 2020.11.16)を用いて、A領域とB領域で有意に発現の異なる遺伝子を検索した。また、Pathway解析(Inguinity Pathway Analysis)も実施した。
 (4)硬化型領域(B領域)で高発現を示した遺伝子に関して、免疫組織化学的検討が可能なものを見出し、多数例での検討・組織像が類似する別疾患との比較を行った。

4. 研究成果

(1)計38検体からtotal RNAを抽出し、高分化型脂肪肉腫(AおよびB領域を有する)6例、脂肪腫2例でライブラリー作製に成功した。がなされ、RNA sequencingによる網羅的発現データを取得できた。過去に報告のあるホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いた検討での結果と遜色のない成功率であった(16/38=42%)。

(2)A領域とB領域の比較における発現変動遺伝子は95個検出された。A領域で高発現を示すものは86個、B領域で高発現を示すものは9個であった。Pathway解析では、腫瘍微小環境に関連する遺伝子群のB領域での高発現が示唆された。なお、脂肪腫とA領域との発現変動遺伝子としてMDM2が確かにA領域での高発現遺伝子として検出されたことから、本検討での発現データは信頼に値するものと考えられた。

(3)B領域で高発現を示す9遺伝子のうち、タンパク発現にも差が生じているものを検索し、MMP14を見出した。免疫組織化学的にMMP14の発現を半定量的に評価し、各組織像間での比較を行った(表1)。

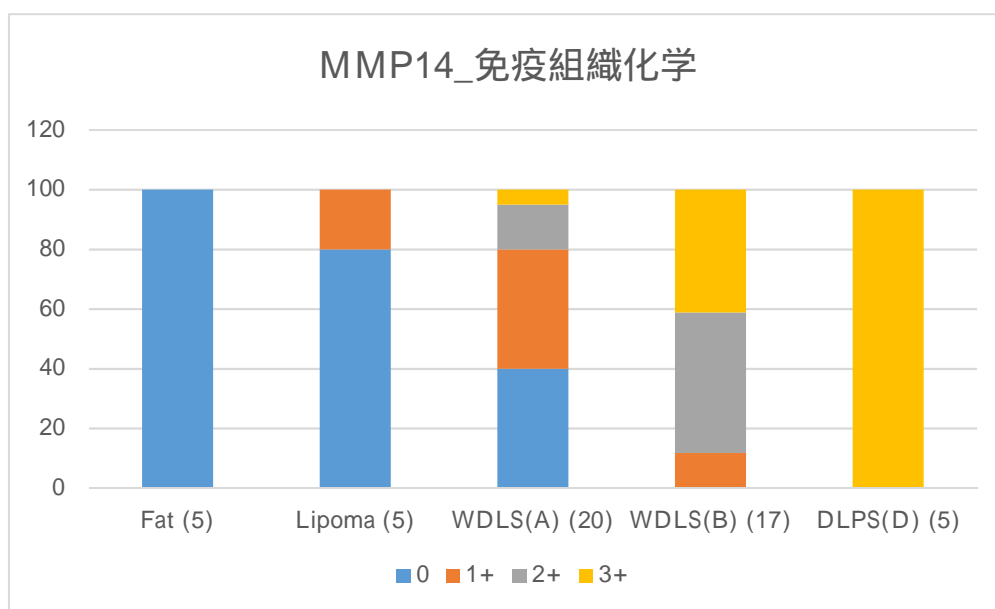


表1: 各組織像におけるMMP14タンパクの発現

* Fat; 正常脂肪組織, Lipoma; 脂肪腫, WDLS(A); 高分化型脂肪肉腫(A領域), WDLS(B); 高分化型脂肪肉腫(B領域), DLPS(D); 脱分化型脂肪肉腫。カッコ内の数字は症例数。

* 陽性細胞率に関しては、0; 0%, 1+; <10%, 2+; 10-50%, 3+; >50% である。

組織学的に線維成分の多い組織像ではMMP14陽性細胞が多い傾向が認められた。ただし、良性の脂肪腫でも陽性細胞を認める例も含まれた。また硬化型亜型と脱分化型脂肪肉腫(ときに鑑別診断上問題となる)の鑑別に有用となるほどの明瞭な発現の違いは見出せなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 加藤生真、笠島理加、宮城洋平、藤井誠志
2. 発表標題 高分化型脂肪肉腫の組織亜型間でのmRNA発現プロファイルの比較
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 加藤生真、古屋充子、川端佑介、大橋健一
2. 発表標題 異型の弱い高分化型脂肪肉腫の4例
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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