

令和 6 年 6 月 12 日現在

機関番号：72602

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2023

課題番号：19K16570

研究課題名（和文）粘液型脂肪肉腫におけるテロメア維持機構を通じた腫瘍進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）Elucidation of Tumor Progression Mechanisms through Telomere Maintenance Mechanisms in Myxoid Liposarcoma

研究代表者

山下 享子（YAMASHITA, Kyoko）

公益財団法人がん研究会・有明病院 病理部・副医長

研究者番号：50754975

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）：TERTプロモーター変異が高頻度に認められる数少ない肉腫として知られている粘液型脂肪肉腫について、臨床病理学的検討とテロメア維持機構の解析を行った。TERTプロモーターのhotspot変異は7割強の症例で認められたが、予後と有意な関連を示さなかった。またhotspot変異陰性例でもTERT mRNAの発現が全例で認められ、陽性症例と同程度のTERT mRNA発現が認められた症例が半数近く存在した。結論として、粘液型脂肪肉腫におけるTERT異常は、腫瘍発生の早期に生じ、腫瘍形成に重要な現象である可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

実験結果を総合すると、他の多くの腫瘍とは異なり、粘液型脂肪肉腫におけるTERT異常は、悪性度と関連するような2次的な現象ではなく、腫瘍発生の早期に生じ、腫瘍形成に重要な現象である可能性が考えられた。さらに、TERTプロモーターのhotspot変異以外にも、TERTプロモーターの別箇所での変異や、TERT付近での染色体再構成によってTERTの高発現をきたす機序を示した。腫瘍形成におけるTERTの役割について新たな観点が得られたとともに、TERT発現上昇をきたす分子機構についても明らかになった。

研究成果の概要（英文）：We performed a clinicopathological study and analyzed the mechanism of telomere maintenance in myxoid liposarcoma. Tumor size, FNCLCC grade, and necrosis were associated with prognosis, while hotspot mutations in the TERT promoter (C228T or C250T), which were observed in more than 70% of the cases, were not associated with prognosis. All of the hotspot mutation-negative cases also showed TERT mRNA expression, and seven cases (47%) of them showed the same level of TERT mRNA expression as the positive cases. Among the 19 cases without hotspot mutation, chromosomal rearrangements around TERT were observed in three cases, and mutations in other locations of the TERT promoter (A161C, C237G) were observed in two cases. In conclusion, TERT abnormalities in myxoid liposarcoma should not be a secondary phenomenon associated with malignancy, but may be an early event which would be important in tumorigenesis.

研究分野：Pathology of bone and soft tissue tumors

キーワード：テロメア維持機構 粘液型脂肪肉腫

1. 研究開始当初の背景

軟部肉腫の中で最も発生頻度が高い腫瘍は脂肪肉腫であり、粘液型脂肪肉腫はその 15~20% を占め、特に若年者(若年成人)に多く発生する。軟部肉腫は、特徴的な融合遺伝子を有する腫瘍と有さない腫瘍とに大別され、粘液型脂肪肉腫は前者で 95%以上の症例が *FUS-DDIT3*、2~5%が *EWSRI-DDIT3* の融合遺伝子を有している。

一方、がん細胞の無限増殖性に重要な役割を果たすテロメア維持機構には、①テロメラーゼ活性化と、②テロメラーゼに依存しない Alternative lengthening of telomeres (ALT; テロメラーゼ非依存性テロメア伸長)の2種類が知られている。テロメラーゼ活性化は、*TERT* 遺伝子のプロモーター領域における点突然変異(C228T or C250T)を主な原因とする、*TERT* (テロメラーゼ逆転写酵素)の発現上昇によって生じ、ALTの最も大きな誘因は、ヒストン H3.3 をテロメアに誘導する *ATRX* もしくは *DAXX* の機能欠損である。

肉腫は一般的に、*TERT* プロモーター変異の頻度が低く、多形性肉腫は ALT の頻度が高い。粘液型脂肪肉腫は *TERT* プロモーター変異が高頻度(約 22~79%)に認められる数少ない肉腫であり、テロメア維持機構としてはテロメラーゼ活性化が主体(約 59%)であるが、ALT も約 5~18%に認められ、相互排他的ではないとされる。またこれらはいずれも、腫瘍の進展過程で生じる2次的な変化と考えられ、組織学的に悪性度の高い症例でより頻度が高いと報告されている。脂肪肉腫全体を対象とした研究では、ALTの方が予後悪化と強く関連し、組織型や組織学的悪性度で補正した多変量解析でも、ALTを示す症例は有意に予後不良であった。しかし、粘液型脂肪肉腫において、テロメア維持機構と、予後を含め臨床病理学的な関連について、詳細に検討した報告はない。

特徴的な融合遺伝子をもつ肉腫は、一般的に比較的単純な染色体異常を示すが、その代表的な疾患であるユーイング肉腫や滑膜肉腫では、ゲノムの不安定性を示唆する染色体異常の複雑性が予後と相関すると報告されており、粘液型脂肪肉腫でも、悪性度の高い症例ほど染色体異常の複雑性が増していることが予想される。また特定の融合遺伝子をもたない複雑な染色体異常を示す肉腫では、ALTが高頻度にみられることから、組織型にかかわらず複雑な染色体異常を示す症例では ALT が認められる可能性がある。

2. 研究の目的

この研究では、ALTが多いとされる肉腫において、テロメラーゼ活性化の頻度が高い粘液型脂肪肉腫に注目し、テロメア維持機構に関して検討する。免疫染色や PCR, fluorescent in situ hybridization (FISH)法などを用いてテロメラーゼ活性化と ALT 両方のテロメア維持機構、さらにその原因となる遺伝子変化について調査し、予後や組織像との関連についてこれらの結果を解析することで、粘液型脂肪肉腫における腫瘍の悪性度と進展過程を、テロメア維持機構の観点から明らかにすることが目的である。

3. 研究の方法

1. FFPE 標本が利用可能な脂肪肉腫の症例を、当院の病理データベースより収集
2. 組織アレイ(TMA)作製
3. 疾患に特徴的な遺伝子異常の確認
FISH 法を用い、粘液型脂肪肉腫では *DDIT3*, *FUS*, *EWSRI* の再構成、脱分化型脂肪肉腫では *MDM2* 増幅の有無を判定した。
4. 組織像による病理学的評価
高悪性度領域の割合による悪性度(分化度)評価、さらに核分裂像数、壊死領域の有無・割合によるスコアリングを含めた FNCLCC system による悪性度評価を行った。
5. 免疫染色による評価
p53, *FOXM1*, *NY-ESO-1*, *Ki-67* に対する抗体を用いて発現量を検討した。
6. Telomere-specific (immunostaining) FISH
ALT 細胞ではテロメア DNA の非常に強いシグナルがみられることを利用して ALT の有無を判定した。ALT 細胞における PML 構造体とテロメアとの共局在も確認した。
7. *TERT* プロモーター変異の有無を判定
FFPE 標本あるいは凍結標本から DNA 抽出し、サンガー法で行った。粘液型脂肪肉腫については、まず *TERT* プロモーターの hot spot における変異(C228T or C250T)の有無を調査した。さらにこの hot spot 変異が陰性の症例では、*TERT* プロモーターとその周囲約 360bp の範囲で、その他の mutation の有無を検索した。

8. *TERT* 遺伝子の FISH 法による評価
TERT の再構成と増幅の有無を、FISH 法で判定した。
9. *TERT* の発現量測定
凍結検体より RNA が採取できた 31 例で、*TERT* mRNA の発現量を real-time RT-PCR で判定した。
10. テロメア長測定
凍結検体から抽出した DNA を用い、the Absolute Human Telomere Length Quantification qPCR Assay Kit (ScienCell Research Laboratories) を使用してテロメア長を測定した。
11. 予後解析
全生存期間、無転移生存期間について、各パラメーターとの関連を解析した。
12. 総合評価

4. 研究成果

がん研有明病院で 2008 年～2020 年に切除された初発の粘液型脂肪肉腫 83 症例を対象とし、2009 年～2017 年に切除された初発の脱分化型脂肪肉腫 36 症例をコントロールとして用いた。粘液型脂肪肉腫は 83 症例全例で *DDIT3* の再構成がみられ、74 症例で *FUS* の、9 症例で *EWSR1* の再構成が見られた。脱分化型脂肪肉腫は全例で *MDM2* の増幅が見られた。

Telomere-specific FISH では、今回対象とした粘液型脂肪肉腫 83 例には 1 例も ALT は認められず、一方コントロールとして用いた脱分化型脂肪肉腫 36 例では、過去の報告と同程度に ALT 陽性症例を認めた (11/36, 31%)。

TERT 遺伝子の検索では、77% (63/82) に *TERT* プロモーターの hot spot 変異 (C228T or C250T) が認められたが、これらの変異と予後 (全生存期間、無転移生存期間) との関連は見られなかった (それぞれ $P=0.559, 0.832$)。また、これらの変異陽性 16 例、陰性 15 例を含む粘液型脂肪肉腫 31 症例を使用した *TERT* mRNA の発現解析では、全例で *TERT* mRNA の発現が認められ、*TERT* プロモーター-hotspot 変異陰性例の中に、陽性症例と同程度の *TERT* mRNA 発現を示す症例が 7 例 (47%) 認められた。一方、非腫瘍軟部組織 (筋肉、脂肪組織) は、11 検体中 10 例で検出感度以下であった。

そこで、粘液型脂肪肉腫では、頻度の高い *TERT* プロモーター-hot spot 変異 (C228T or C250T) 以外に、*TERT* mRNA を発現させるような *TERT* 異常が存在する可能性を考え、*TERT* プロモーター領域のより広い範囲で変異の有無を検索したところ、hotspot 変異陰性の 19 症例において A161C と C237G の点変異をそれぞれ 1 例ずつ認めた。A161C を認めた症例では、*TERT* mRNA の高発現がみられた。さらに TMA を用いて *TERT* の FISH を施行したところ、83 例中 3 例で *TERT* 付近での再構成が認められた。3 例はいずれも *TERT* プロモーター変異陰性例で、うち 2 例で *TERT* mRNA の高発現を認めた (もう一例は凍結検体がなく RNA 未検出)。FISH プロブは BAC clone から自作しているが、そのプロブの作製位置とシグナルの分布・強度から、これらの *TERT* 付近での切断点は、これまで文献で報告されている領域にほぼ一致すると推測された。*TERT* 高発現の機序は、再構成によってスーパーエンハンサーが *TERT* に近接した上流に移動したためと考えられる。*TERT* の増幅は一例も認められなかった。

次に、凍結検体より DNA が採取できた 50 検体で平均テロメア長 (TL) を測定した。50 検体の内訳は、粘液型脂肪肉腫 24 例 (*TERT* プロモーター変異陽性例 16 例、陰性例 8 例) と、それらの患者の非腫瘍部の軟部組織 20 例分、脱分化型脂肪肉腫 6 例 (ALT 陽性 3 例と陰性 3 例) である。*TERT* プロモーター hotspot 変異の有無に関係なく、粘液型脂肪肉腫の TL の平均は非腫瘍部の TL の平均よりも短かったのに対し、脱分化型脂肪肉腫では、ALT 陽性症例の TL の平均は、ALT 陰性症例のものより著しく長くなっていた。

予後解析では、既報告通り、年齢 (50 歳以上)、腫瘍の大きさ、壊死の有無、FNCLCC grade は全生存期間との相関が認められた。一方、p53, FOXM1, NY-ESO-1, Ki-67 に対する免疫染色は、全生存期間、無転移生存期間のいずれとも有意な関連は指摘できなかった。*TERT* プロモーター hotspot 変異は、全生存期間、無転移生存期間のみならず、予後との相関がみられた年齢・腫瘍の大きさ・壊死の有無・FNCLCC grade、および予後不良との関連が指摘されている免疫染色結果のいずれとも、関連は認められなかった。

結論として、粘液型脂肪肉腫では他の多くの腫瘍と異なり、*TERT* プロモーター hotspot 変異は予後と関連しなかった。またこの hotspot 変異の有無にかかわらず全例で *TERT* mRNA の発現を認めたことから、粘液型脂肪肉腫において *TERT* 異常は、悪性度を上昇させるような 2 次的変化ではなく、腫瘍発生の早期に生じ、腫瘍形成に重要な事象である可能性が示唆された。また発現量を上昇させる *TERT* 異常として、hotspot 以外の *TERT* プロモーターにおける点突然変異や、*TERT* 遺伝子内あるいはその付近に切断点を有する染色体再構成などの機序が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamashita K, Funauchi Y, Hayakawa K, Ae K, Matsumoto S, Ikuta K, Nishida Y, Ueno T, Shimoyama Y, Hiruta N, Machinami R, Kawachi H, Takeuchi K	4. 巻 480
2. 論文標題 S100-negative epithelioid malignant peripheral nerve sheath tumor with possible perineurial differentiation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 1269-1275
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03218-y.	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 Kunieda J, Yamashita K, Togashi Y, Baba S, Sakata S, Inamura K, Ae K, Matsumoto S, Machinami R, Kitagawa M, Takeuchi K.	4. 巻 113
2. 論文標題 High prevalence of TERT aberrations in myxoid liposarcoma: TERT reactivation may play a crucial role in tumorigenesis.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 1078-1089
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15256.	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 Yamashita K, Baba S, Togashi Y, Dobashi A, Ae K, Matsumoto S, Tanaka M, Nakamura T, Takeuchi K.	4. 巻 83
2. 論文標題 Clinicopathologic and genetic characterization of angiofibroma of soft tissue: a study of 12 cases including two cases with AHRR::NCOA3 gene fusion.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Histopathology	6. 最初と最後の頁 57-66
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/his.14899.	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7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 國枝純子, 山下享子, 土橋映仁, 阿江啓介, 松本誠一, 植野映子, 蛭田啓之, 町並陸生, 竹内賢吾.
2. 発表標題 TERTの融合遺伝子が認められた紡錘形細胞肉腫の2例.
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下享子, 馬場郷子, 富樫由紀, 阿江啓介, 松本誠一, 植野映子, 中村卓郎, 蛭田啓之, 町並陸生, 竹内賢吾.
2. 発表標題 軟部血管線維腫の臨床病理学的検討.
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下享子, 國枝純子, 池畑浩一, 伊藤崇彦, 藤山淳三, 阿部仁, 谷澤泰介, 阿江啓介, 蛭田啓之, 杉山裕子.
2. 発表標題 高度の多形性を示す孤立性線維性腫瘍の一例.
3. 学会等名 第63回日本臨床細胞学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 伊藤崇彦, 山下享子, 早川景子, 石井脩平, 山田麻里沙, 山崎奈緒子, 池畑浩一, 藤山淳三, 千葉知宏, 佐藤由紀子, 阿江啓介, 河内洋, 松本誠一, 阿部仁, 杉山裕子.
2. 発表標題 軟骨形成を伴う粘液型脂肪肉腫の1例.
3. 学会等名 第61回日本臨床細胞学会秋期大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山下享子, 馬場郷子, 富樫由紀, 阿江啓介, 松本誠一, 植野映子, 中村卓郎, 蛭田啓之, 町並陸生, 竹内賢吾.
2. 発表標題 軟部血管線維腫の臨床病理学的検討
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國枝純子, 山下享子, 土橋映仁, 阿江啓介, 松本誠一, 植野映子, 蛭田啓之, 町並陸生, 竹内賢吾
2. 発表標題 TERTの融合遺伝子が認められた紡錘形細胞肉腫の2例.
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 國枝純子, 山下享子, 阿江啓介, 河内洋, 竹内賢吾, 北川昌伸
2. 発表標題 粘液型脂肪肉腫におけるテロメア維持機構
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021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