

令和 3 年 5 月 28 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16579

研究課題名(和文) 脳腫瘍における高悪性度を示す新規疾患群の病態解明と疾患概念の確立

研究課題名(英文) Newly proposed high-grade CNS tumor entities

研究代表者

信澤 純人 (Sumihito, Nobusawa)

群馬大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号：80635318

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：多くの脳腫瘍において分子遺伝学的解析が急速に進んだが、頻度が低く、診断に難渋するような腫瘍の病態解明は遅れており、正確な診断や適切な治療に繋がらない症例も多い。本研究では、このような腫瘍の中から、低異型度であるがINI1遺伝子が不活性化している腫瘍を見出し、新規腫瘍としてCNS LGDIT with INI1 deficiencyという腫瘍名で報告した。また、既存の腫瘍に当てはまらない多系統への分化を示す腫瘍を網羅的に検索し、既知のC11orf95-RELAに加え、C11orf95-NCOA1/2を認めた。本腫瘍を新規腫瘍としてELTMDという腫瘍名で報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で見出された新規腫瘍はいずれも希少なもので、診断困難で予後不良である。これらの腫瘍がWHO分類などの国際分類に記載され、広く認識されることにより、今後多数の症例が収集され、網羅的な分子遺伝学的検索を含めた多角的な解析が進むことにより、生物学的理解が深まり、疾患群としての輪郭が明確になっていくことが期待される。正確な診断と適切な臨床的マネジメント、更には今後の治療法の確立に繋がると考える。

研究成果の概要(英文)：1) We identified hitherto unclassifiable tumors, for which we propose the designation of central nervous system low-grade diffusely infiltrative tumors with INI1 deficiency (CNS LGDIT-INI1). CNS LGDIT-INI1 may be clinically indolent but have a high propensity to progress secondarily to aggressive rhabdoid tumors.

2) We reported hitherto histopathologically unclassifiable high-grade tumors, under the tentative label of ependymoma-like tumors with mesenchymal differentiation (ELTMD), harboring C11orf95-NCOA1/2 or -RELA fusion. t-distributed stochastic neighbor embedding analysis of DNA methylation data from cases with C11orf95-NCOA1/2 and a reference set of other CNS tumors revealed that these cases were clustered together and were distinct from all subgroups of ependymomas. Although ELTMD exhibited morphological and genetic associations with supratentorial ependymoma with C11orf95-RELA, they cannot be regarded as ependymoma.

研究分野：脳腫瘍

キーワード：脳腫瘍 INI1/SMARCB1 ependymoma

1. 研究開始当初の背景

1) 分子遺伝学的知見を導入した脳腫瘍分類

近年の網羅的な大規模ゲノム解析により、高頻度の腫瘍型だけではなく稀なものにおいても分子遺伝学的背景が解明され、病態解析が急速に進んできている。特異性の高い診断マーカーや予後マーカーとして利用される遺伝子異常や、分子治療の標的として有望視されるものも多数報告されている。分子遺伝学的異常が組織学的分類よりも再現性・客観性や予後との関連性が高いことが明らかとなり、他臓器の腫瘍と同様に、従来は形態学に基づいていた脳腫瘍分類は、新しい WHO 分類の改訂では分子遺伝学的異常を加味し、腫瘍の生物学的特性をより反映したものへと変わった。腫瘍型の細分化が主体であるが、年齢・発生部位・予後などの臨床的特徴に加え、特異性の高い遺伝子異常を共有する異なる腫瘍型が一つにまとめられる例もある。

2) 二次的に発生する atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT)

AT/RT は乳幼児に好発する悪性腫瘍で、乳幼児に発生する脳腫瘍の約 10%を占める。ラブドイド細胞の出現と、INI1 遺伝子異常に基づく INI1 免疫染色の陰性化を特徴としている。低悪性度、あるいは高悪性度の他の腫瘍を先行病変とした症例が 10 例ほど報告されており、これらは若年成人に発生する。一般的な小児発生例の病態解明は進んでいるが、二次性発生例との臨床病理学的・分子遺伝学的な異同は明らかではない。申請者らは、既に論文にて発表した上衣腫 (ependymoma) から発生した症例 (Nobusawa S, et al. J Neuropathol Exp Neurol. 2016) のほか、未報告の二次性発生例を複数経験している。

3) 多系統への分化 (上衣系・星細胞系・神経細胞系・間葉系) を示す腫瘍

本腫瘍は既存の分類には存在しない腫瘍で、主体となる要素は上皮様の結合性充実性集塊を呈するが、免疫組織化学的には上皮性性格は乏しく、上衣系への分化が窺える。異型に乏しく、明らかな星細胞系や神経細胞系への分化を示す要素も種々の程度で認められる。間葉系成分は細胞密度が低く異型に乏しい部分から、高密度で異型が目立つ部分が連続性を示しながら出現している。これらの各要素の間には、部分的に移行像が認められる。現在までに経験したいずれの症例においても、各要素は類似した病理組織学的・免疫組織化学的所見を呈しており、臨床像も類似している。既存の腫瘍として該当するものはないが、興味深い点は、再発例は全体的に明らかな上衣系の分化を示しており、典型的な上衣腫 (ependymoma) の所見を呈している。本症例が新しい腫瘍型である可能性を考えるが、分子遺伝学的な特徴からこの腫瘍の本質が上衣系腫瘍であることが示される可能性は否定できないと考えている。

2. 研究の目的

1) 対象となる腫瘍はいずれも希少なものであるが、診断困難で予後不良である。これらの腫瘍の病態を解明し疾患群としての輪郭を明確にすることで、WHO 分類などの国際分類に記載され、知名度を上げ、正確な診断と適切な臨床的マネジメント、更には今後の治療法の確立に繋がると考える。

2) 脳腫瘍の分類は多種にわたり、一般的に診断が困難な腫瘍型が多く存在し、本研究課題の対象となる腫瘍はその最たる例である。当施設はそのような確定診断に難渋するような症例が国内外より集まる環境にある。これらの症例を所有し、網羅的に検索できる施設は世界的にも限られていると考えられる。

3) 二次性の AT/RT の先行病変の中には、一般的には予後が良好とされる腫瘍も含まれており、実際に未治療で経過観察中に AT/RT が発生したため不幸な転機をとった症例もある。このような進展を示した症例の前駆病変を詳細に解析し、分子遺伝学的な特徴を解明することで、真に予後が良い群と進展の可能性のある群に分けられる可能性があり、治療戦略の差別化につながると考える。

3. 研究の方法

1) 症例の収集と病理組織学的・免疫組織化学的解析

対象となる症例をさらに収集し、ホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) から組織標本を作製した。各症例の組織像、免疫表現型、および臨床的事項を確認し、比較検討した。

2) 二次性発生の AT/RT における INI1 遺伝子異常と染色体 22 q LOH の検索

乳幼児に発生する典型的な AT/RT は、INI1 遺伝子の homozygous deletion、または INI1 遺伝子が存在する 22q の LOH と残りの相同染色体にある INI1 遺伝子変異により、INI1 遺伝子の biallelic な不活性化が見られる。また、これら典型例の INI1 遺伝子変異には hotspot が知られている。二次的に発生する AT/RT においては INI1 の不活性化機序が明らかになっていないため、その前駆病変も含めて INI1 遺伝子異常、22q LOH を DNA sequencing、multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) 法、FISH 法にて検索した。

3) 多系統への分化を示す腫瘍における分子遺伝学的な上衣系性格の検索

最近の網羅的な大規模解析により、テント上に発生した ependymoma の多くは特異性の高い C11orf95-RELA 融合遺伝子を伴うことが判明している。多系統への分化を示す腫瘍における C11orf95-RELA 融合遺伝子の有無を調べることで、上衣系腫瘍の一亜型として分類されるか、あるいは組織学的・分子遺伝学的に独立した腫瘍であるか否かを検討した。

4) 網羅的な分子遺伝学的解析

FFPE から十分な質と量の DNA 量を得られる症例を選定し、array CGH、次世代シーケンサーを用いた whole exome sequencing により、前述の既知の遺伝子異常とは別の、新たな異常の有無を検索した。ゲノム全体のメチル化の状態は腫瘍の起源を反映しており、腫瘍の分類に最も適していると考えられているため、アレイを用いたゲノムワイドな DNA メチル化解析も加えて行うことで、(1) 一次性と二次性 AT/RT、(2) 多系統への分化を示す腫瘍とテント上 ependymoma にどのような分子遺伝学的な差が存在するのかを検索し、別の腫瘍として分類されるべきなのかを検討した。

4. 研究成果

1) INI1 陽性の前駆病変から二次的に発生する AT/RT

INI1 の発現が保たれている pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA)、anaplastic PXA、low-grade astrocytoma、および ependymoma から発生した INI1 陰性の AT/RT の 4 例を解析した。組織学的に、乳幼児に発生する典型的な AT/RT ではラブドイド細胞が主体となって増殖することは稀であるが、二次性 AT/RT ではラブドイド細胞が主体となることが多く、過去に報告された二次性 AT/RT の症例でも同様であることが分かった。また、典型的な AT/RT では核の大小不同や多形性は目立たないが、(anaplastic) PXA から発生した AT/RT では核の大小不同や多形性が見られた。これは、前駆病変の組織学的な性格を二次的に発生した AT/RT でも引き継がれていること意味すると考えた。過去の報告による結果を合わせた分子遺伝学的な検索から、典型的な AT/RT の INI1 遺伝子異常では、点変異や小さな欠失・挿入の頻度が高いが、二次性 AT/RT ではこれらの異常は少ないことが分かった。また、二次性 AT/RT では、主にホモ欠失により INI1 が不活性化されていることが示された。典型的な AT/RT では染色体異常が稀であることが知られているが、二次性 AT/RT では多数の異常が見られることが分かった。典型的な一次性 AT/RT と二次性 AT/RT には上記のような組織学および分子遺伝学的異常に関する差異が見られることから、二次性 AT/RT を今後とも "AT/RT" と称するべきか否かを検討する必要があると考えた。

2) 低悪性度の INI1 陰性腫瘍、およびそれを前駆病変として二次的に発生する AT/RT

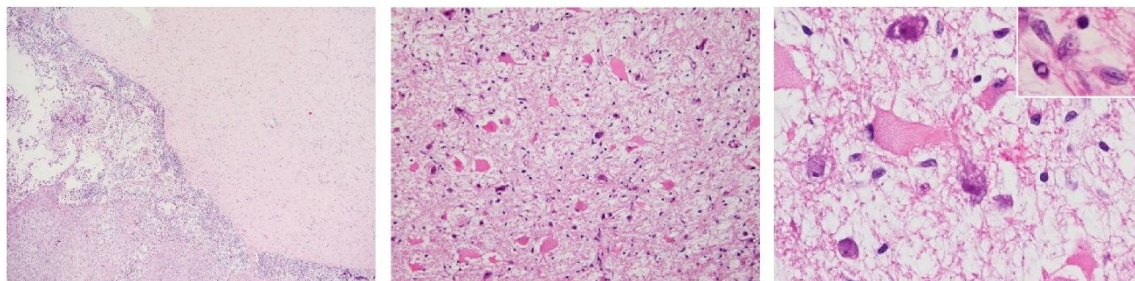


図 1 CNS LGDIT-INI1 の組織像

一般的に INI1 陰性腫瘍は組織学的に悪性度の高い腫瘍で、ラブドイド細胞が特徴的である。我々は、INI1 陰性であるが、組織学的に低悪性度の腫瘍で、大脳皮質主体にびまん性に浸潤性に増殖する腫瘍を 3 例解析し、low-grade diffusely infiltrative tumors with INI1 deficiency (CNS LGDIT-INI1) という名前で報告した。3 例中 2 例では、年単位の経過を経てラブドイド細胞を伴う AT/RT への悪性転化が認められた。組織学的に、CNS LGDIT-INI1 は増殖能の低い小型の核と狭い細胞質を有する異型細胞が増殖し、背景には変性した大型の神経細胞や大型の反応性アストロサイトを伴っており、水腫性あるいは粘液性、線維性の基質が認められた(図 1)。ラブ

ドイド細胞は認められなかった。遺伝子検索では、CNS LGDIT-INI1 および二次性の AT/RT は同じ INI1 遺伝子異常を示しており、全例で INI1 遺伝子の一部分、あるいは全体を含んだホモ欠失が認められた(図2)。DNA メチル化解析では、CNS LGDIT-INI1 および二次性 AT/RT とともに、AT/RT のサブグループである AT/RT-MYC に分類され、前駆病変と悪性化病変の間にエピジェネティックな差は見出されなかった。以上より、CNS LGDIT-INI1 はそれ自体おとなしい経過を示す腫瘍であるが、高率に AT/RT への悪性転化を示す可能性がある、稀な一つの独立した腫瘍であると考えられた。

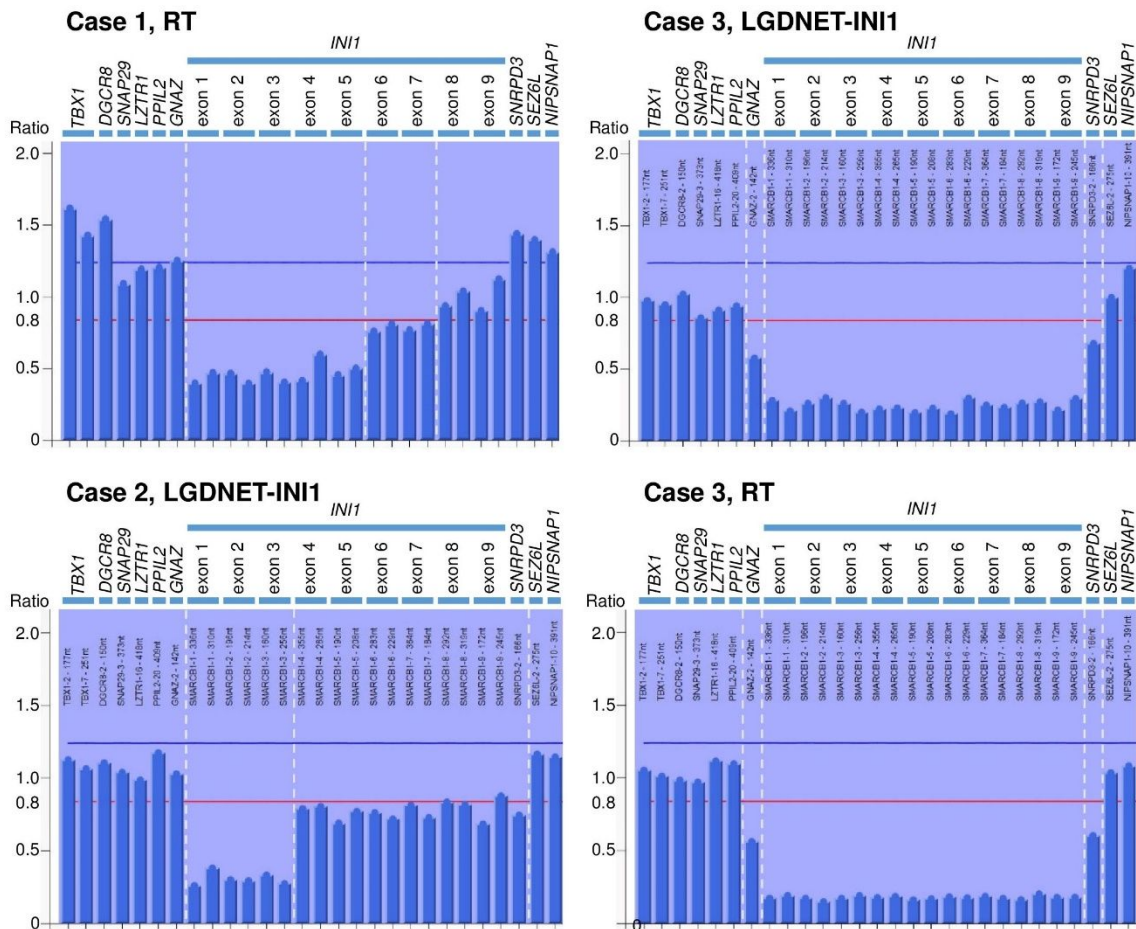


図2 MLPA 法による INI1 遺伝子欠失の検索

3) 多系統への分化(上衣系・星細胞系・神経細胞系・間葉系)を示す腫瘍

多系統への分化を示す同様の腫瘍を5例収集し、解析を行った。5例全て腫瘍の局在は脳半球であった。組織学的に、複数の成分から構成される腫瘍で、主な構成要素は胎児性腫瘍に類似した形態を示す要素と、紡錘形細胞の増殖からなる低～高悪性度の肉腫様の要素であった(図3)。構成要素は胎児性腫瘍に類似した要素では、クロマチンに富む核を有し、増殖能の高い裸核状の細胞が密に増殖し、境界の明瞭な胞巣状構造を形成していた。同要素には部分的に上衣腫様の所見が認められ、小型の管腔様構造や特徴的な EMA の陽性所見が認められたが、上衣腫の組織学的な hallmark である血管周囲性偽ロゼットが認められず、上衣腫に非特異的な所見として CAM5.2 の発現が全体的に認められたため、この成分を上衣腫に相当するものとは考えられなかった。また、明らかな星細胞系や神経細胞系への分化を示す要素も認められた。遺伝子検索の結果、全例に C11orf95 融合遺伝子が認められ、C11orf95-NCOA1 融合遺伝子が2例に、C11orf95-NCOA2 融合遺伝子が1例に、テント上に発生する上衣腫に高頻度で見られる C11orf95-RELA 遺伝子が2例に認められた。C11orf95-NCOA1 融合遺伝子、および C11orf95-NCOA2 融合遺伝子を有する2例を DNA メチル化アレイにて解析したところ、既存のいずれの腫瘍とも一致しなかった。また、DNA メチル化アレイにて得られたデータを380例の多種の中脳神経系腫瘍のデータと比較して t-distributed stochastic neighbor embedding 解析を行ったところ、これら2例は、全ての ependymoma のサブグループを含め、既存の原発性脳腫瘍とは独立したクラスターを形成したため、本腫瘍はエピジェネティックに独立した一つの腫瘍であると考えた。次世代シーケンサーを用いた whole exome sequencing を行ったが、recurrent に見られる点変異、欠失・挿入は認められなかった。以上より、本腫瘍はテント上に発生する上衣腫と組織学的、および分子遺伝学的な類似性を示すが、独立した一つの腫瘍と考えられるため、ependymoma-like tumors with mesenchymal differentiation (ELTMD) という腫瘍名で報告した。

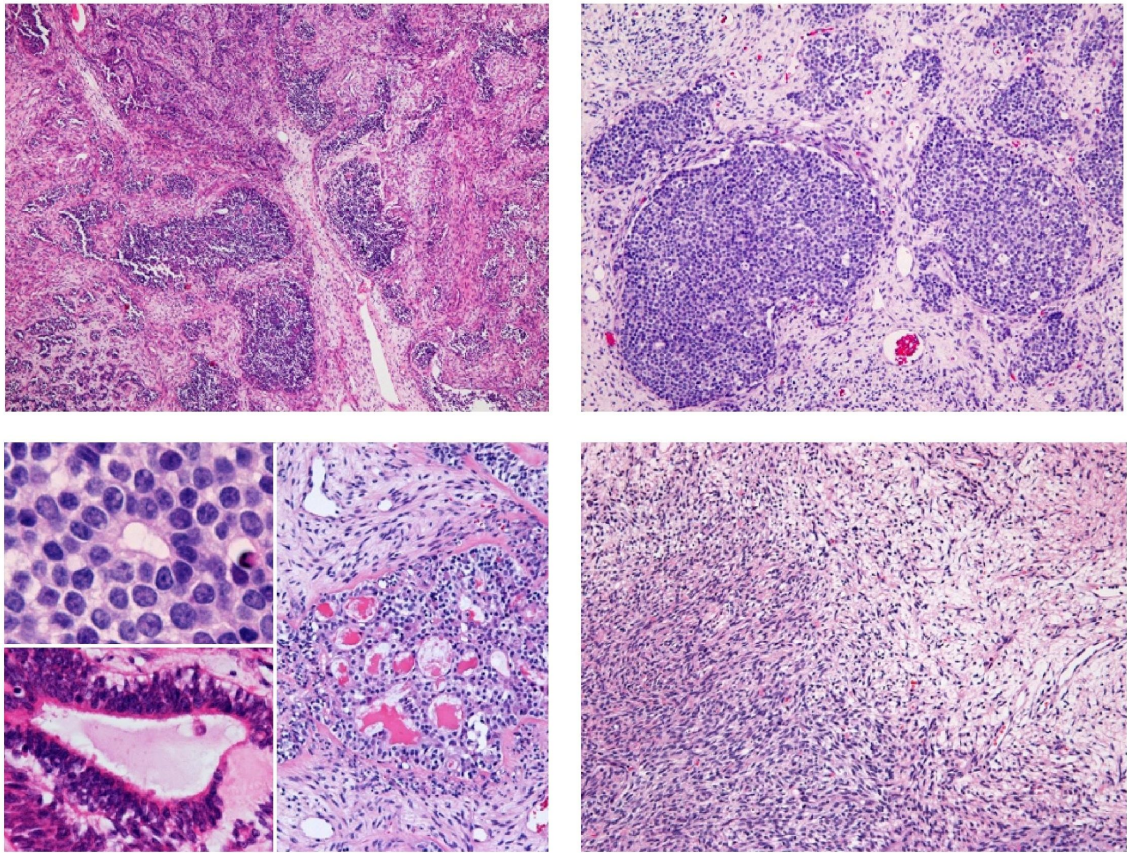


図 3 ELTMD の組織像

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 Nobusawa S, Nakata S, Yoshida Y, Yamazaki T, Ueki K, Amano K, Yamamoto J, Miyahara M, Sugai T, Nakazato Y, Hirato J, Yokoo H.	4. 巻 476
2. 論文標題 Secondary IN11-deficient rhabdoid tumors of the central nervous system: analysis of four cases and literature review	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 763-772
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-019-02686-7.	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 Tomomasa Ran, Arai Yasuhito, Kawabata Iwakawa Reika, Fukuoka Kohei, Nakano Yoshiko, et. al.	4. 巻 -
2. 論文標題 Ependymoma like tumor with mesenchymal differentiation harboring C11orf95 NCOA1 / 2 or RELA fusion: A hitherto unclassified tumor related to ependymoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Brain Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/bpa.12943	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 Nobusawa Sumihito, Nakata Satoshi, Nakano Yoshiko, Kawamura Atsufumi, Yoshida Makiko, Tamura Akihiro, Hasegawa Daiichiro, Kosaka Yoshiyuki, Ito Ichiro, Watanabe Reiko, Oishi Takuma, Hayashi Nakamasa, Ishikawa Eiichi, Sakamoto Noriaki, Okura Naoki, Murakami Chiaki, Ichimura Koichi, Hirato Junko, Yokoo Hideaki	4. 巻 44
2. 論文標題 CNS Low-grade Diffusely Infiltrative Tumors With IN11 Deficiency, Possessing a High Propensity to Progress to Secondary IN11-deficient Rhabdoid Tumors	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 American Journal of Surgical Pathology	6. 最初と最後の頁 1459 ~ 1468
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/PAS.0000000000001520	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0件

〔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
---------	---------