

令和 5 年 5 月 10 日現在

機関番号：82713

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16210

研究課題名（和文）未分化肉腫と粘液線維肉腫の分子生物学的解析および鑑別診断

研究課題名（英文）Molecular biological analysis and differential diagnosis of undifferentiated sarcoma and myxofibrosarcoma

研究代表者

鷲見 公太（washimi, kota）

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・医師

研究者番号：30716733

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）：我々は粘液線維肉腫（MFS）/未分化肉腫（US）の85症例を解析した。浸潤性増生を示す症例では粘液腫状間質の割合が高く、遠隔転移は少なく、全生存率は高い傾向にあることを明らかにした。USには、SMA陽性細胞の被覆が少ない形態学的に特徴的な鎌状血管が観察された。鎌状血管の多寡によりUSを2群に分類すると、転移や予後と有意に相関していた。RNAシーケンスを行うと、プロテアソーム、NF-κB、VEGF経路が形態学的に分類した群間で異なる制御を受けていることが示された。これらの結果から、鎌状血管形成機序を解明することは、遠隔転移に関わる因子の同定や治療戦略を開発するのに役立つ可能性があると考えた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

未分化肉腫に関しては、診断根拠や予後について不明な点が多い。未分化肉腫は血行性の遠隔転移が重要な予後不良因子であり、血行性転移の予測は重要である。本研究から未分化肉腫に関して、鎌状血管が多く見られる症例では有意に血行性転移が多い傾向が見られ、鎌状血管形成が目立つ症例ではNF-κB、VEGF経路の遺伝子変異が関与している可能性が示唆された。この鎌状血管形成機序を解明することで、未分化肉腫の血行性転移に関わる因子の解明につながる可能性があり、未分化肉腫の予後予測因子として利用するだけでなく、治療戦略に役立つ可能性があると考えられる。

研究成果の概要（英文）：We examined 85 patients with myxofibrosarcoma (MFS)/undifferentiated sarcoma (US) and found that tumors with infiltrative growth patterns tended to have more myxoid areas and higher local recurrence rates but fewer distant metastases and better overall survival. Morphologically characteristic sickle shaped blood vessels, which tended to have fewer SMA positive cells, were also observed in these tumors, compared with normal vessels. Based on the incidence of these sickle shaped blood vessels, we subdivided conventionally diagnosed US into two groups. This stratification was significantly correlated with metastasis and prognosis. RNA sequencing of 24 tumors demonstrated that the proteasome, NF-κB, and VEGF pathways were differentially regulated among these tumors. Elucidating the mechanisms of sickle-shaped blood vessels could help identify factors involved in distant metastasis and develop therapeutic strategies.

研究分野：骨軟部腫瘍

キーワード：未分化肉腫 粘液線維肉腫 鎌状血管

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

粘液線維肉腫 (Myxofibrosarcoma: MFS) と未分化肉腫 (undifferentated sarcoma: US) は、成人の軟部肉腫の一つである。組織学的には、MFS は粘液腫状間質と周辺組織への染み入る様な浸潤性増生を特徴とする。US は、特定の分化方向を示さない高悪性度の軟部肉腫であるが、その腫瘍の性状や組織形態は非常に多彩であり、予後にも幅がある。US 症例の中には、粘液腫状間質を部分的に含むことがある。

US と MFS を区別するための明確な基準がない。The Cancer Genome Atlas (TCGA) に基づく最近の研究結果では、US や MFS のサブタイプである未分化多形肉腫 (UPS) の遺伝子/エピジェネティクスプロファイルを詳述したデータセットから、UPS と MFS は異なるがん種ではなく、単一のスペクトラムに含まれることが示されている。また、世界保健機関 (WHO) の分類システムでは、MFS と US を判別するための粘液腫状間質割合のカットオフ値は明確に示されていない。しかし、MFS は特徴的な組織所見を呈し、US と比較して予後良好な症例が多い。MFS/US は希少がんである肉腫の中でも占める割合は高く、その病態を把握し、予後予測因子を解明した上で、得られた研究成果を臨床現場に応用・発展させる事は喫緊の課題である。

2. 研究の目的

MFS/US の予後は様々であり、遠隔転移をせずに局所再発を繰り返す比較的予後が良好な症例や早期に肺や骨・脳転移をきたす予後不良な症例が混在しており、その詳細な病態は未だ不明である。これらの問題に対処するため、本研究では、組織学的特徴に基づいて MFS/US をサブクラス化し、遺伝子発現データと相関させることで、MFS/US の予後に関連する組織所見の評価方法の確立および系統的な概念の確立を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

2000 年から 2018 年に神奈川県立がんセンターで MFS/US および未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫と診断された症例を、軟部腫瘍診断を専門とする病理医が病理診断を再評価し、85 例の MFS/US を同定した。なお、未分化小円形細胞肉腫の症例は除外した。臨床所見として、無再発生存期間、無遠隔転移生存期間と全生存期間 (overall survival: OS) に関して評価し、病理組織学的所見と比較検討した。

病理組織学的所見は、腫瘍の最大断面のヘマトキシリン-エオジン染色 (H&E 染色) 標本を用いて再評価した。手術検体において腫瘍が切除断端に露出している症例を R1、露出していない症例を R0 とした。核分裂数 (10 high power field (1HPF=0.24mm²)), 粘液腫状間質割合 (%), 壊死割合 (%) を評価した。腫瘍細胞密度は、低 (20%未満)、中 (20~50%)、高 (50%以上) に分類した。また、Elastica van Gieson (EVG) 染色で弾性線維を観察し、脈管侵襲像を評価した。拡張血管の中でも、中心あたりが膨らみ、3 つ以上に分岐し、先端が鋭角な拡張血管を鎌状血管と定義し、腫瘍最大断面での数を計測した。さらに、血管拡張が顕著な 10 症例について、CD31 の免疫染色を行い、これらの拡張血管がアーチファクトによる裂け目ではないことを確かめた。また、SMA の免疫染色を行い、血管周囲の被覆割合を測定した。

周囲組織浸潤様式に関しては、周囲組織との境界が明瞭な症例を INFa とし、周囲組織に染み入る様に浸潤性に増生をしている症例を INFc とし、その中間を INFb と定義した。また、肉眼所見の腫瘍の範囲と顕微鏡的な腫瘍の差を tail-like infiltration length (TIL) と定義してその長さを測定した。

臨床病理学的所見を評価した 85 症例の中で凍結試料を利用できた 24 症例に関して RNA の塩基配列を決定した。各症例サンプルのマッピングされたリード数を Relative Log Expression (RLE) 法を用いて正規化し、リードカウントデータを主成分分析した。また、KEGG、BioCarta、Gene Ontology、Reactome の各データベースから生物学的経路に基づく 64 の遺伝子リストを用いて、遺伝子発現の階層的クラスタリング分析を実施した。

4. 研究成果

手術断端評価に関して、R1 群では R0 群と比較して局所再発が有意に多い傾向が見られ (P<0.001)、腫瘍を取り切ることが局所再発を防ぐ上で重要であり、再発を予測するためには病理学的な断端評価が重要であることが分かった。また、INFc 症例では R1 が 83% であり、INFa 症例では R1 が 16% であり、INFc 症例は INFa よりも局所再発しやすい傾向があった。INFc の腫瘍は手術で取り切ることが難しいことが示された。一方、有意差はないものの、OS に関して、INFc 症例は INFa 症例よりも比較的良好的な傾向を示した。TIL の平均値は INFb 症例で 8mm、INFc 症例で 20mm、最大 TIL は 45mm であった。TIL が 10mm 未満の症例の R1 割合は 26% であり、TIL が 10mm 以上を示す症例の R1 割合は 68% であり、両群間に有意差があった (P<0.001)。また、TIL が 10mm 以上の症例では、TIL が 1~9mm の症例と比較して局所再発率が有意に高い傾向が見られた (P=0.047)。OS に関しては、TIL が 1~9mm の症例と TIL 10mm で有意な差は認められなかった (P=0.138)。

INFa 症例における粘液腫状間質の平均割合は 17%であったのに対し、INFb 症例と INFc 症例ではそれぞれ 41%と 38%であり、有意に高い傾向にあることが示された ($P=0.001$)。これは INFc/INFb 症例にいわゆる MFS が多く含まれていたためと考える。

OS と関連を示した臨床病理学的な因子は、遠隔転移の有無、核分裂数、壊死割合、鎌状血管の多寡、粘液腫状間質割合であった。6 例の H&E 染色と 9 例の EVG 染色で検出された脈管侵襲像は、OS と有意な関係はなかったが、無遠隔転移生存率と関連していた ($P<0.001$)。また、粘液腫状間質割合が高い症例ほど予後が良好な傾向がみられ、粘液腫状間質割合 5%をカットオフ値として 2 群に分けた場合、遠隔転移の有無および OS との関連性で最も大きな差が認められた ($P=0.001$)。MFS の形態的特徴である粘液腫状間質、浸潤性増殖と細胞密度、核分裂数をスコア化して 2 群 (いわゆる MFS 群といゆる US 群) に分類したところ、いわゆる MFS 群はいゆる US 群に比べ有意に予後が良好であり、いわゆる MFS 群では観察期間中に死亡した患者はいなかった ($P<0.001$)。

鎌状血管 42 本と非鎌状血管である円形血管 42 本の SMA 陽性細胞の被覆割合を計測した。それぞれの直径の平均値と標準偏差は、それぞれ $64.5 \pm 39.8 \mu\text{m}$ (最小 19、最大 185) $65.1 \pm 33.1 \mu\text{m}$ (最小 13、最大 174) であり、有意差はなかった ($P = 0.934$)。血管周囲の SMA 陽性細胞の被覆割合は円形血管と比較して鎌状血管では有意に小さかった ($P<0.001$)。周皮細胞は平滑筋分化を伴い、SMA が陽性となることから、鎌状血管周囲を覆う周皮細胞が少ないか、未熟な周皮細胞で覆われている可能性が疑われ、独特な血管形態の形成に関与している可能性を疑っている。また、鎌状血管の数は、遠隔転移および OS と関連しており、腫瘍の最大切片で鎌状血管が 100 本以上ある患者では、有意に OS が不良の傾向が認められた ($P<0.001$)。血管浸潤像を示した 12 例のうち、鎌状血管が 100 本以上あったのは 4 例のみで、血管浸潤像と鎌状血管の間に相関はなかった ($P=0.286$)。いわゆる MFS 群と US 群では、鎌状血管の数に有意差はなかった ($P=0.063$) が、MFS 症例で鎌状血管が 100 本以上あった症例はなかった。さらに、いわゆる US 群を鎌状血管が 0-99 本である US1 サブグループと 100 本以上の US2 サブグループに分けると、US2 群の OS は有意に低い傾向を示した。

今回解析した 85 例のうち、RNA シーケンスデータが得られたのは、MFS 群が 9 例、US1 群が 12 例、US2 群が 3 例の計 24 例である。遺伝子発現プロファイルの PCA を用いて、プロットすると MFS 群と US1 群、US2 群である程度のみとまとまりが見られた。プロテアソーム、NF- κ B、VEGF パスウェイに関連する遺伝子セットを用いた階層的クラスタリング解析の結果、組織所見によるサブグループを基準に症例のクラスタリングが可能であることが示された。新たに定義した MFS/US グループ間で有意に発現量が異なる遺伝子を選択し、さらに SWI/SNF 複合遺伝子を含めた階層的クラスタリング解析の検討を行ったところ、US2 群・SMARCA2 発現が顕著な US1 群・SMARCB1 発現が顕著な US1 群・MFS + US1 群の 4 群にクラスタリングされた。

MFS/US を粘液腫状間質の割合、核分裂数、細胞密度、周囲組織浸潤様式をスコア化し分類した上で、鎌状血管の多寡によりサブグループに分類すると、予後及び RNA シーケンスの結果から、ある程度の層別化ができる可能性が示唆された。MFS/US は組織学的所見を詳細に解析することで、予後予測がある程度可能であった。また、鎌状血管形成が目立つ症例では遠隔転移をきたす割合が高く、予後不良な傾向がみられた。遠隔転移は MFS/US の非常に重要な予後不良因子であり、今後、鎌状血管の形成機序を解明することで高悪性度肉腫の遠隔転移に関わる因子の一部を同定できる可能性があると考えられる。

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 3件）

1. 著者名 Sugiyama Kana, Washimi Kota, Sato Shinya, Hiruma Toru, Sakai Mai, Okubo Yoichiro, Miyagi Yohei, Yokose Tomoyuki	4. 巻 50
2. 論文標題 Differential diagnosis of lipoma and atypical lipomatous tumor/well differentiated liposarcoma by cytological analysis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Diagnostic Cytopathology	6. 最初と最後の頁 112 ~ 122
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/dc.24928	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 Hasegawa Chie, Washimi Kota, Hiroshima Yukihiko, Kasajima Rika, Kikuchi Keiji, Notomi Tsuguto, Kato Hisamori, Hiruma Toru, Sato Shinya, Okubo Yoichiro, Yoshioka Emi, Ono Kyoko, Miyagi Yohei, Yokose Tomoyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Differential diagnosis of uterine adenosarcoma: identification of JAZF1-BCORL1 rearrangement by comprehensive cancer genomic profiling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Diagnostic 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) 10.1186/s13000-022-01279-4	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 Washimi Kota, Kasajima Rika, Shimizu Eigo, Sato Shinya, Okubo Yoichiro, Yoshioka Emi, Narimatsu Hiroto, Hiruma Toru, Katayama Kotoe, Yamaguchi Rui, Yamaguchi Kiyoshi, Furukawa Yoichi, Miyano Satoru, Imoto Seiya, Yokose Tomoyuki, Miyagi Yohei	4. 巻 13
2. 論文標題 Histological markers, sickle-shaped blood vessels, myxoid area, and infiltrating growth pattern help stratify the prognosis of patients with myxofibrosarcoma/undifferentiated sarcoma	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	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) 10.1038/s41598-023-34026-w	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 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鷺見公太
2. 発表標題 未分化肉腫の血管形態と転移の解析
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
---------------------------	-----------------------	----

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