

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590386

研究課題名（和文） Dual-color CISH法の骨軟部肉腫の病理診断、
予後因子検出への応用

研究課題名（英文） Application of dual-color CISH for pathological diagnosis and
extraction of prognostic factors in bone and soft tissue sarcomas

研究代表者

元井 亨 (MOTOI TOORU)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号：50291315

研究成果の概要（和文）：

肉腫の病理診断は治療の基礎となり極めて重要性が高い。しかし、実際の診断はその希少さや種類多さから困難な場合が多い。本研究では光学顕微鏡下で染色体、遺伝子異常と病理組織像あるいは細胞診像を同時に観察可能な手法を新たに確立し、その有効性を明らかにした。本法は、高度な分子生物学的な分析機器を必要とせず、病理検査室で実施可能であるため肉腫の診断精度の向上に寄与できる。

研究成果の概要（英文）：

Accurate pathological diagnosis of sarcoma is indispensable for appropriate therapy. However, rarity and wide variety of histological types make tumor diagnosis difficult. In this study, a detection method which enables simultaneous visualization of morphology and cytogenetic abnormalities under a light microscope is established and verified. The new method is applicable for routine pathological diagnosis without using special equipment for molecular biology. Therefore diagnostic accuracy may be improved by the present method.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学、人体病理学

キーワード：CISH法、肉腫、分子病理診断、染色体相互転座、融合遺伝子、遺伝子増幅

1. 研究開始当初の背景

間葉系細胞由来の悪性腫瘍である肉腫は細胞遺伝学的に1) 肉腫全体の1/3程度を占める、染色体核型異常が単純で腫瘍特異

的な染色体相互転座を有するグループと2)残り2/3程度の染色体の複雑な数的,質的な異常を有するグループの2つに大別される。このような明確な細胞遺伝学的特徴

の一方で、肉腫の病理診断には難渋する場合が多い。それは肉腫の種類が多く、組織像や細胞形態の多様性が顕著であるためである。この問題の克服のため、染色体相互転座を中心とした細胞遺伝学的異常の検出が肉腫の補助的診断手法として用いられるようになってきた。近年では分子標的治療が急速に進歩しつつあり、その結果、肉腫の診断精度の向上が急務となっている。すなわち、組織細胞形態像と細胞遺伝学異常の解析を精密に合致させ、腫瘍像の統合的に理解した上での病理診断精度の向上、治療の適応や効果の判定、細胞遺伝学的な予後予測因子の解明する必要がある。

Chromogenic In Situ Hybridization (CISH) 法は組織細胞形態像と細胞遺伝学的な異常を細胞レベルで同時に検出可能な新しい手法であり、上記問題の克服に適している。**Dual-color CISH (dc-CISH)**法では対象遺伝子の近傍の遺伝子配列を **Texas-Red** あるいは **FITC** 標識した2種類のプローブを検体とハイブリダイゼーションした後、これらに対する抗体を用いて免疫組織化学的二重染色によりシグナルを検出する。これにより、光学顕微鏡を用いて染色体相互転座や遺伝子の増幅、欠失が細胞レベルで同定できる。本研究では **dc-CISH** 法を用いて組織細胞形態像との関連性に焦点を当て肉腫を統合的に理解しようとする従来とは異なった独創的なアプローチを用いて、肉腫の病理診断精度の向上や肉腫の細胞遺伝学的多様性の解析を目指す。

2. 研究の目的

ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 検体を対象とした **dc-CISH** 法を確立し、日常の病理診断に適用可能な精度の高い病理診断法を構築する。さらに特定の遺伝子異

常を有する細胞群の腫瘍内での分布や組織細胞形態との関連性を詳細に検討し、腫瘍の分化など腫瘍特性と細胞遺伝学的異常の関係の解明を目指す。

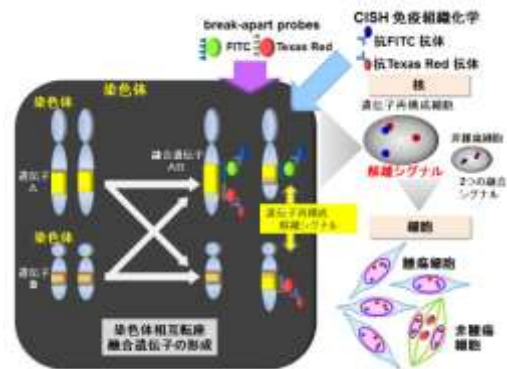
3. 研究の方法

頻度の高い肉腫の染色体相互転座、融合遺伝子形成に関わる遺伝子の両端に異なる色素 (Texas-Red, FITC) で標識した一対のプローブを作成し、転座の結果生じるシグナルの解離を肉腫の FFPE 上で検出する手法を確立する (表 1、図 1)。その後、複雑な染色体異常を有する肉腫の転移、予後に関連する数的、質的な細胞遺伝学的異常の検出にその手法を適用する。後者に関しては、高分化型、脱分化型脂肪肉腫に特異的な細胞遺伝学的異常である **MDM2** 遺伝子の増幅に着目して、**dc-CISH**法に在る検出系の確立と **p53-MDM2** 経路の解析を行う。

表 1 dc-CISH 法の検出対象

肉腫	染色体相互転座	融合遺伝子	CISH プローブ
ユーイング肉腫	t(11;22)(q24;q12) など	EWS-Flil1 など	EWSR1
明細胞肉腫	t(12;22)(q13;q12)	EWS-ATF1	EWSR1
骨外性粘液性軟骨肉腫	t(9;22)(q22;q12) など	EWSR1-NOR1 など	EWSR1
滑膜肉腫	t(X;18)(q11;q11)	SS18-SSX1 SS18-SSX2	SS18
粘液性脂肪肉腫	t(12;16)(q13;q11) t(12;22)(q13;p12)	FUS-DDIT3 EWSR1-DDIT3	DDIT3
胞巣型軟部肉腫	t(X;17)(p11;q25)	ASPSR1-TFE3	TFE3

図 1 dc-CISH 法による遺伝子再構成検出原理

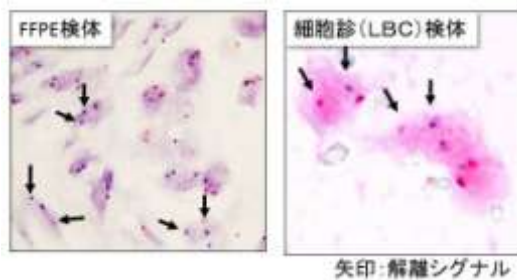


4. 研究成果

(1) 染色体相互転座に伴う遺伝子再構成の検出

滑膜肉腫(SS)12例及びSSと鑑別が問題となる軟部肉腫(Non-SS;4種類9例)のFFPE材料を用いて、検出系を確立した。SS特異的染色体相互転座t(X;18)の結果生じるSS18遺伝子の再構成を検出した結果、SSの全例で借りシグナルが検出され、対照例は陰性であった(図2)。この結果は従来のdc-FISH法、RT-PCR法による特異的な融合遺伝子SS18-SSX1, SS18-SSX2の検出結果と一致した。

図2 滑膜肉腫のSS18 dc-CISH像



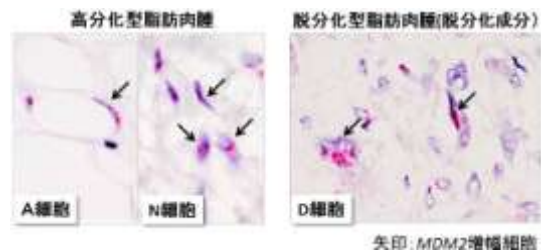
さらに表1に挙げたプローブを作成し、dc-CISH法を施行し、陽性所見が得られた。また組織標本のみならず、液状細胞診検体上で遺伝子再構成検出法をSS及びユーイング肉腫を用いて確立した。肉腫の細胞遺伝学的異常をFFPE標本上あるいは細胞診標本上でdc-CISH法で検出し、病理診断に応用した報告は以前にない。本法の利点は、①煩雑な蛍光顕微鏡操作や暗室の必要性がなく、②蛍光色素と異なり染色標本が他の病理標本と同様に半永久的に保存でき、③組織、細胞形態像と細胞遺伝学的異常が光学顕微鏡下に同時に観察可能となる点であると考えられた。本法の確立により研究室ではなく病理検査室でも細胞遺伝学的な解析を行うことができ、肉腫のみならず特異的な細胞遺伝学的異常を有する腫瘍の病理診断、細胞診の精度向上や遺伝子の存在状態の解析に有用であることが明らかにされた。

(2) 高分化型、脱分化型脂肪肉腫でのMDM2遺

伝子増幅の検出

高分化型脂肪肉腫(WLPS)は頻度の高い低悪性度軟部肉腫であり、この10%は高悪性度の脱分化型脂肪肉腫(DLPS)に転化する。病理診断学的にはWLPSは良性脂肪腫(LP)、DLPSは多形型悪性線維性組織球腫(PMFH)との鑑別が問題となる。DLPS, WLPSに共通の細胞遺伝学異常として第12番染色体上のMDM2遺伝子の増幅が知られている。WLPS6例及びDLPS6例の脱分化巣(DD)、高分化型成分(DW)で、MDM2、CEN12プローブを用いたdc-CISH法を構築後、WLPS及びDWの脂肪腫様細胞(A)、非脂肪細胞類似細胞(N)、DDの腫瘍細胞(D)の3群の増幅シグナル陽性細胞(MDM2/CEN12>2.0)の割合(60個中)を計測し、MDM2の免疫組織化学的陽性率と比較した(図3)。その結果、異常細胞の陽性率はWLPS:A46%/12%, N66%/29%, DLPS:A34%/8%, N54%/30%, D:75%/42%(CISH法/免疫組織化学)であった。以上よりCISH法は免疫組織化学より高率に陽性であるため、脂肪肉腫の診断の新しい診断手法として有用であることが明らかにされた。本研究によりCISH法は転座に関連した遺伝子再構成の検出のみではなく、遺伝子増幅の検出にも適用可能であることが示された。また、脂肪肉腫細胞の遺伝子異常及びタンパク過剰発現は一樣ではなく、腫瘍の分化傾向の減弱と遺伝子増幅陽性細胞の増加の相関性が示唆された。さらに細胞診検体上においても同様にMDM2遺伝子増幅の検出が可能であった。

図3 脂肪肉腫のMDM2 dc-CISH像

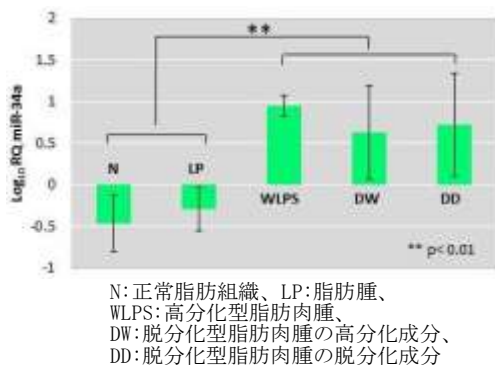


(3) 高分化型、脱分化型脂肪肉腫における

MDM2-p53 経路の解析

MDM2は癌抑制遺伝子p53の分解を促進する働きがあるため、結果としてとしてのp53機能が低下する。したがって、MDM2遺伝子増幅及びそれに由来するMDM2タンパクの高発現の見られる高分化型、脱分化型脂肪肉腫ではp53機能が抑制されていると想定されてきた。p53の制御を強く受けていることが知られているmicroRNA-34aの発現レベルをFFPEを用いて定量的RT-PCR法で相対定量的に検索したところ、高分化型脂肪肉腫、脱分化型脂肪肉腫の発現レベルは、コントロールとして用いた4例の正常脂肪組織、5例の脂肪腫よりも有意に高かったが(p<0.01)、2つの肉腫間では有意差はなかった(図4)。

図4 定量的RT-PCR法によるmiR-34aの発現



したがって通説に反して、高分化型、脱分化型脂肪肉腫では細胞レベルではMDM2遺伝子増幅が必ずしもMDM2タンパクの高発現に結びつかない場合があり、さらにMDM2の発現がp53の機能抑制に関係しない可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計11件)

①Yoshida A, Ushiku T, Motoi T, 他4名, MDM2 and CDK4 immunohistochemical coexpression in high-grade osteosarcoma:

correlation with a dedifferentiated subtype, Am J Surg Pathol, 査読有, 36(3), 2012, 423-31

DOI: 10.1097/PAS.0b013e31824230d0

②Setsu N, Kohashi K, Endo M, Yamamoto H, Ohishi Y, Sueyoshi K, Iwamoto Y, Tsuneyoshi M, Motoi T, Kumagai A, Oda Y, Inhibin- α and synaptophysin immunoreactivity in synovial sarcoma with granular cell features, Hum Pathol, 査読有, 43(6), 2012, 850-7

doi:10.1016/j.humpath.2011.07.012

③Wang L, Motoi T, 他12名, Identification of a novel, recurrent HEY1-NCOA2 fusion in mesenchymalchondrosarcoma based on a genome-wide screen of exon-level expression data, Genes Chromosomes Cancer, 査読有, 51(2), 2012, 127-39

DOI: 10.1002/gcc.20937

④元井亨、加藤生真、軟部腫瘍の細胞遺伝学的診断法、軟部腫瘍I-診断と研究の進歩-、今日の軟部腫瘍の治療と分子生物学、病理と臨床、査読なし、30巻、2号、2012年、127-135 ページ

<http://www.bunkodo.co.jp>

⑤Uno T, Kawai K, Kunii N, Fukumoto S, Shibahara J, Motoi T, Saito N, Osteomalacia caused by skull base tumors: report of 2 cases, Neurosurgery, 査読有, 69(1), 2011, E239-44

doi: 10.1227/NEU.0b013e31821867f7

⑥Yoshida A, Ushiku T, Motoi T, 他3名, Well-differentiated liposarcoma with low-grade osteosarcomatous component: an underrecognized variant, Am J Surg Pathol, 査読有, 34(9), 2010, 1361-6

doi: 10.1097/PAS.0b013e3181ebcc45

⑦Kumagai A, Motoi T, 他 3 名, Detection of SYT and EWS gene rearrangements by dual-color break-apart CISH in liquid-based cytology samples of synovial sarcoma and Ewing sarcoma/primitive neuroectodermal tumor, Am J Clin Pathol, 2010, 134(2), 査読有, 2010, 323-31
doi: 10.1309/AJCPTLSM15XKPDDU

⑧Yoshida A, Ushiku T, Motoi T, 他 4 名, Immunohistochemical analysis of MDM2 and CDK4 distinguishes low-grade osteosarcoma from benign mimics, Mod Pathol, 査読有, 23(9), 2010, 1279-88
doi:10.1038/modpathol.2010.124

⑨Motoi T, Kumagai A, 他 3 名, Diagnostic utility of dual-color break-apart chromogenic in situ hybridization for the detection of rearranged SS18 in formalin-fixed, paraffin-embedded synovial sarcoma, Hum Pathol, 査読有, 41(10), 2010, 1397-404
doi:10.1016/j.humpath.2010.02.009

⑩元井亨, 熊谷有紗, 骨・軟部腫瘍特異的融合遺伝子, 病理形態学キーワード, 病理と臨床, 査読なし, 28(臨増), 2010年, 368-370
<http://www.bunkodo.co.jp>

⑪Motoi T, Kumagai A, Application of CISH Technology on Diagnosis of Translocation-Associated Soft Tissue Sarcomas, Connection (DAKO), 査読なし, 13, 2009, 83-91
http://www.dako.jp/index/knowledgecenter/kc_publications/kc_publications_connection/kc_publications_connection13-2.htm

[学会発表] (計 23 件)

①元井亨, 他 9 名, 確定診断が困難な軟部原発粘液性腫瘍 3 症例の捺印細胞像の検討, 第

53 回日本臨床細胞学会総会春季大会、2012 年 6 月 2 日、千葉市

②加藤生真, 元井 亨, 他 8 名, 著明なメラニン産生を示した軟部原発 Perivascular epithelioid cell tumor の捺印細胞像及び CISH 法を用いた細胞遺伝学解析, 第 53 回日本臨床細胞学会総会春季大会, 2012 年 6 月 2 日, 千葉市

③Motoi T, 他 6 名, TFE3 Gene Rearrangement Status Is Heterogeneous in Alveolar Soft Part Sarcomas: A Study by Dual-Color Chromogenic In Situ Hybridization on Formalin-Fixed Paraffin-Embedded Samples, 101st Annual meeting, United States and Canadian Academy of Pathology, 2012 年 3 月 19 日, カナダ, バンクーバー

④Motoi T, Kumagai A, Yoshida A, Imamura T, Fukusato T, MicroRNA 200a is Related to Epithelial Differentiation of Synovial Sarcoma, 100th Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology, 2011 年 3 月 1 日, アメリカ合衆国, サンアントニオ

⑤Kumagai A, Motoi T, 他 4 名, MDM2-p53 Pathway Status in Clinical Samples of Well-Differentiated and Dedifferentiated Liposarcoma, 100th Annual Meeting, States and Canadian Academy of Pathology, 2011 年 2 月 28 日, アメリカ合衆国, サンアントニオ

⑥Wang L, Motoi T, 他 11 名, Identification of a Novel, Recurrent HEY1-NCOA2 Fusion in Mesenchymal Chondrosarcoma Based on a Genome-Wide Screen of Exon-Level Expression Data, 100th Annual Meeting, United States and Canadian Academy of Pathology, 2011 年 2 月 28 日, 米国, サンアントニオ

⑦元井亨、光学顕微鏡下での骨軟部肉腫の細胞遺伝学的異常の解析、LBC 標本上の CISH 法を用いて、要望講演、第 49 回日本臨床細胞学会秋期大会、2010 年 11 月 22 日、神戸市

⑧Motoi T, Kumagai A, 他 4 名, Diagnostic Utility of MDM2 Gene Amplification

Detected by Dual-Color Chromogenic In Situ Hybridization on Liquid Based-Cytology of Well Differentiated Liposarcoma, 17th

International Congress of Cytology, 2010 年 5 月 18, 19 日, イギリス, エディンバラ

⑨Kumagai A, Motoi T, 他 4 名, Cytogenetic Analyses of MDM2 status by Dual-Color

Chromogenic In Situ Hybridization in Liquid-Based Cytology Samples of Dedifferentiated Liposarcoma and

Pleomorphic Malignant Fibrous Histiocytoma, 17th International Congress of Cytology, 2010 年 5 月 18, 19 日, イギリス, エディンバラ

⑩ Kumagai A, Motoi T, 他 6 名 , Immunohistochemical and Cytogenetic

Analyses of FGF23 and Chondrogenic and Osteogenic Transcription Factor Expression in Phosphaturic Mesenchymal

tumor, 99th Annual meeting, United States Canadian Academy of Pathology, 2010 年 3 月 22 日, 米国, ワシントン

⑪Motoi T, Kumagai A, 他 4 名, Cytogenetic and Immunohistochemical Analyses of c-MET

in Peripheral Nerve Sheath Tumors, 99th Annual meeting, United States Canadian Academy of Pathology, 2010 年 3 月 22 日, 米国, ワシントン

⑫元井亨、滑膜肉腫における分子病理学的検討、教育研修講演、第 7 回関東骨軟部腫瘍の基礎を語る会、2009 年 4 月 11 日、東京

⑬Kumagai A, Motoi T, 他 7 名, Cytological

and Molecular Cytogenetic Feature of Phosphaturic Mesenchymal Tumor: A case report, 35th European Congress of Cytopathology, 2009 年 9 月 28 日, ポルトガル, リスボン

⑭Motoi T, Kumagai A, 他 4 名, Detection of SYT and EWS Gene Rearrangements by Dual-Color Break-apart CISH on

Liquid-based Cytology Samples of Synovial Sarcoma and Ewing Sarcoma, 35th European Congress of Cytopathology, 2009 年 9 月 28 日, ポルトガル, リスボン

[図書] (計 2 件)

①元井亨, 熊谷有紗, 福里利夫, 日本臨床社,

別冊日本臨床新領域別症候群シリーズ肝・胆道系症候群 (第二版), 肝外胆管領域の脂肪性腫瘍, 2011 年, 41-44 ページ

②元井亨, 熊谷有紗, 腫瘍病理鑑別診断アトラス軟部腫瘍, 滑膜肉腫, 文光堂, 2011 年, 116-125 ページ

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元井 亨 (MOTOI TORU)

東京医科大学・医学部・兼任講師

研究者番号 : 50291315

(2) 研究分担者

熊谷 有紗 (KUMAGAI ARISA)

帝京大学・医学部・教務職員

(H23 のみ)

研究者番号 : 50596963

(3) 連携研究者

今村 哲夫 (IMAMURA TETSUO)

帝京大学・医学部・教授

(H21 のみ)

研究者番号 : 40010566