

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：37111

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23590419

研究課題名(和文)軟部肉腫の発生起源と分化に関する研究

研究課題名(英文)Histogenesis and differentiation of soft tissue sarcomas

研究代表者

岩崎 宏 (IWASAKI, Hiroshi)

福岡大学・医学部・教授

研究者番号：90101170

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：1. 脂肪腫様粘液型脂肪肉腫と高分化脂肪肉腫は混同されるが、前者ではt(12;16)と融合遺伝子FUS-DDIT3が特異的であるのに対して、後者は余剰環状染色体と巨大マーカー染色体を有していた。

2. 単クローン抗体FU3は未分化多形肉腫および血管周囲間葉系細胞と強く反応するが、今回FU3抗原がCD13であることを同定した。

3. GFP発現骨髄細胞を、骨髄抑制したマウスに移植し、皮下に3-メチルコランソレンを投与すると、小血管周囲に未熟な間葉系細胞が出現し、未分化多形肉腫が発生し、約1/4のマウスで肉腫細胞がGFPを発現した。肉腫の起源には骨髄間葉系幹細胞と局所の間葉系細胞の二つの経路がある。

研究成果の概要(英文)：1. Lipoma-like myxoid type liposarcoma and well-differentiated liposarcoma exhibited a similar histology, but different cytogenetic profiles. The former possessed specific t(12;16) and FUS-DDIT3, whereas the latter was characterized by giant marker and supernumerary ring chromosomes.

2. The monoclonal antibody FU3 against undifferentiated pleomorphic sarcoma reacted strongly with sarcoma cells and perivascular mesenchymal cells. The present study demonstrated that FU3 antigen is identical to CD13.

3. The bone marrow cells expressing GFP were transplanted into mice under bone marrow suppression. After administration of 3-methylcholanthrene subcutaneously, immature mesenchymal cells appeared around small blood vessels, then high-grade sarcoma developed. The sarcoma cells expressed GFP in approximately 1/4 of the mice. There are two possibilities concerning the origin of the sarcoma: bone marrow-derived mesenchymal stem cells, and resident mesenchymal cells of local soft tissues.

研究分野：人体病理学，腫瘍病理学

キーワード：軟部組織腫瘍 肉腫 遺伝子検索 染色体異常 骨髄幹細胞 間葉系幹細胞

### 1. 研究開始当初の背景

ヒト軟部組織には多種類の肉腫が発生するが、これらの腫瘍は病理学的診断が困難であり、治療法も確立されておらず、予後不良のものが多い。肉腫の診断を容易にし、治療成績を改善するためには、腫瘍の発生起源と本態を解明することが必要である。しかし、現在のところいずれの軟部肉腫においても、起源細胞の同定に関する研究はきわめて不十分である。

特に未分化多形肉腫/悪性線維性組織球腫 (malignant fibrous histiocytoma; MFH) は軟部肉腫の中で、高頻度に認められるにもかかわらず、起源と本態が不明であり、診断基準が曖昧で特異的なマーカーに乏しく、有効な治療法もない。我々は長年に亘り、軟部腫瘍の病理学的研究に従事し、多くの腫瘍から培養細胞系を確立し、さらに免疫組織化学的分析および染色体・遺伝子分析に取り組んできた。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は軟部肉腫の起源と本態を明らかにし、肉腫の診断・治療法の確立に有用な基礎的データを得ることである。

### 3. 研究の方法

本研究では、ヒト軟部肉腫、特に脂肪肉腫と MFH の病理学的検討のために、新鮮凍結検体およびパラフィン包埋組織について、形態学的、免疫組織化学的および分子生物学的検索を行なった。また新鮮腫瘍組織から細胞培養を行い、染色体・遺伝子検索を行なった。さらに、骨髄由来間葉系幹細胞および血管周囲間葉系細胞が軟部肉腫の発生に関与しているかを解明するために、GFP 遺伝子改変骨髄細胞移植系を用いて肉腫細胞の由来を検討した。

### 4. 研究成果

(1) ヒト軟部肉腫の起源と分化に関する研究: 脂肪肉腫について

ヒト軟部肉腫の中で最も発生頻度の高い脂肪肉腫について、腫瘍の起源と分化を明らかにするために、病理組織学的、免疫組織化学的ならびに分子生物学的検討を行なった。一部の粘液型脂肪肉腫は脂肪腫様の分化を示し、高分化脂肪肉腫に類似の形態を呈するが、両者の鑑別はきわめて困難であり、病理組織診断の際に誤診される危険性がある。我々は脂肪腫様の形態を示す粘液型脂肪肉腫の本態と起源を解明するために、多数の軟部腫瘍の中から本腫瘍 8 例を抽出し、染色体分析、FISH 分析、RT-PCR 分析を行った。

組織学的に脂肪腫様粘液型脂肪肉腫は腫瘍の 30%~90% が成熟脂肪細胞からなり、高分化型脂肪肉腫に類似していたが、免疫組織化学的に MDM2 および CDK4 は陰性であっ

た。粘液状部は通常の粘液型脂肪肉腫と同様の形態を示していた。染色体分析では脂肪腫様粘液型脂肪肉腫は特異的染色体転座  $t(12;16)(q13;p11)$  を示し、組織切片の FISH で *DDIT3* の break apart が認められ、さらに全例で特徴的な融合遺伝子 *FUS-DDIT3* が検出された。脂肪腫様粘液型脂肪肉腫の脂肪腫様の部分と粘液状の部分はいずれも *DDIT3* の break apart と *FUS-DDIT3* を示し、同一の遺伝子異常を有することが明らかとなった。これに対して、高分化型脂肪肉腫と脱分化型脂肪肉腫は MDM2 および CDK4 に陽性で、余剰環状染色体と巨大マーカー染色体を有していたが、 $t(12;16)(q13;p11)$  や *DDIT3* の break apart はなく、*FUS-DDIT3* も陰性であった。

これらの所見から、脂肪腫様粘液型脂肪肉腫と高分化脂肪肉腫は類似の組織像を示すが、免疫組織化学的発現パターン、および染色体・遺伝子異常は全く異なることが分った。脂肪腫様粘液型脂肪肉腫は通常の粘液型脂肪肉腫と同一起源の腫瘍であることが明らかとなった。

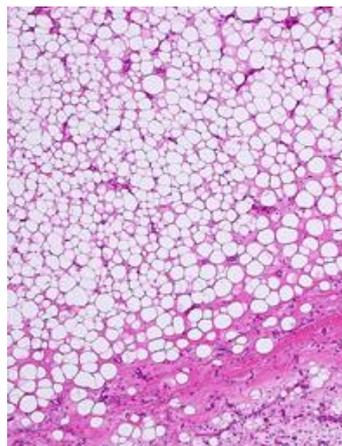


図 1. 高分化の脂肪腫様分化を示す粘液型脂肪肉腫で、高分化脂肪肉腫に類似の形態を示しているが、右下に粘液状部がみられる。HE 染色。

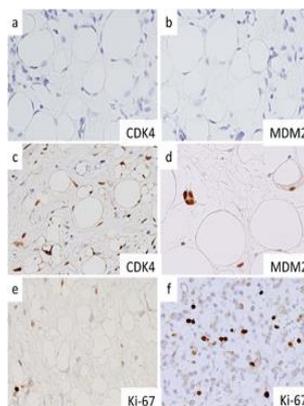


図 2. 脂肪腫様成分を主体とする粘液型脂肪肉腫 (a,b) は CDK4 および MDM2 に陰性であるが、対照の高分化脂肪肉腫 (c,d) では陽性である。Ki-67 は粘液型脂肪肉腫の脂肪腫様部 (e) では陽性細胞は少ないが、粘液状部 (f) では多くの腫瘍細胞核が陽性を示す。

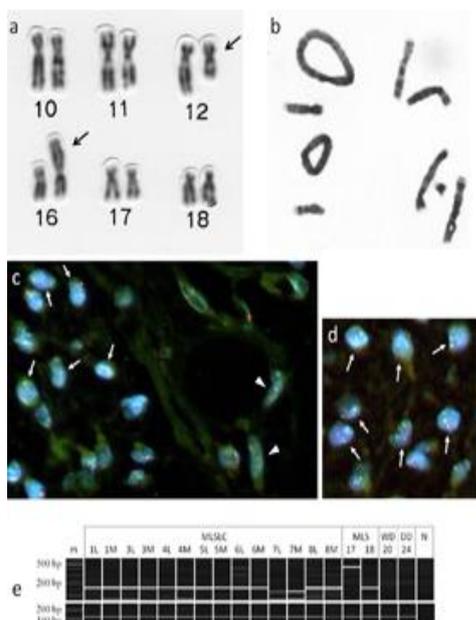


図3 染色体分析で、脂肪腫様分化を示す粘液型脂肪肉腫(a)は特異的転座  $t(12;16)(q13;p11)$ を示す。高分化型脂肪肉腫(b)では、余剰感常染色体が特徴的である。FISH分析で、脂肪腫様分化を示す粘液型脂肪肉腫では粘液状部(c左、d)と脂肪腫様部(c右)のいずれにおいても、*DDIT3* 断裂が検出された。RT-PCR法(e)で、脂肪腫様分化を示す粘液型脂肪肉腫の各症例で、粘液状部と脂肪腫様部の両方において同一の特異的融合遺伝子 *FUS-DDIT3* が検出された。(Iwasaki H, et al. Virchows Arch. 2015;466:453-464)

## (2)抗 MFH モノクローナル抗体 FU3 の抗原解析と未分化多形肉腫の起源

未分化多形肉腫 /MFH の腫瘍細胞は FU3 に陽性に染色され、正常組織では血管周囲間葉系細胞が FU3 と強く反応する。本研究では、FU3 抗体アフィニティクロマトグラフィと N 末解析および CD13 siRNA 法で、FU3 抗原は CD13 であることを明らかにした(Aoki M, et al. Int J Oncol. 2013;43:57-62)。CD13 は骨髄前駆細胞にも強く発現することが知られており、未分化多形肉腫/MFH の一部は骨髄由来の間葉系幹細胞と関連していると考えられた。

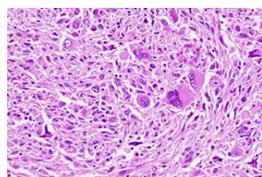


図4. 未分化多形肉腫(MFH)の組織像。異型の紡錘形細胞、円形細胞および多核巨細胞が混在している。HE染色。

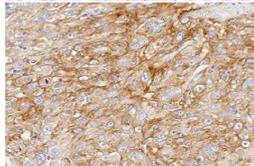


図5. 免疫組織化学的にMFH細胞はFU3抗原を強く発現する。

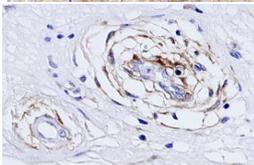


図6. FU3/CD13抗原は血管周囲間葉系細胞に強く発現する。

## (3)グリーンマウス骨髄移植と発がん実験による肉腫モデルの研究

肉腫発がん実験として、GFP 発現グリーンマウスから採取した骨髄細胞を、骨髄抑制したマウス (C57BL/6)の尾静脈から注射して移植し、骨髄が GFP 発現細胞で置換された状態の C57BL/6 マウスの背部皮下に 3-メチルコラントレン(3-MC)を週1回ずつ、計10回投与すると、投与終了から数週間で局所の肉芽組織の小血管周囲に腫大した間葉系細胞が出現した。さらに経過を追うと 16~20 週で多形型 MFH 類似の高悪性度の肉腫が発生し、約 1/4 のマウスで腫瘍細胞が GFP を発現した。肉腫の発生と血管周囲未分化間葉系細胞の間に密接な関係があることが推測された。発生した肉腫の多くは MFH に類似していたが、一部のマウスでは線維肉腫や横紋筋肉腫に類似した腫瘍も発生した。

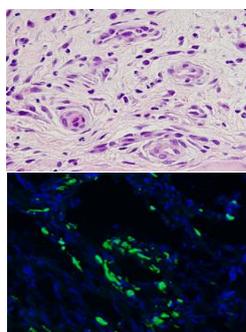


図7. GFP 骨髄を移植したマウスの皮下に 3-MC を投与すると、小血管周囲に異型間葉系細胞が出現する(上)。異型細胞は自家蛍光を発する(下)。

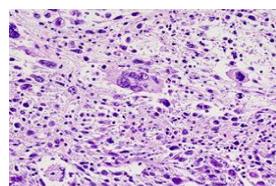


図8. GFP 骨髄移植マウスに発生した未分化多形肉腫(MFH)。

肉腫の起源をさらに究明するために、骨髄由来間葉系幹細胞の *in vitro* 発がん実験として、グリーンマウスから骨髄細胞を採取し、培養フラスコ壁面に接着する間葉系幹細胞を回収し、3-MC に1週間暴露した後、さらに培養をつづけたところ、トランスフォームした細胞が得られ、*in vivo* の発癌実験で得られた肉腫細胞と同様の形態を示した。これらの結果から、肉腫の発生には骨髄由来間葉系幹細胞(bone marrow-derived MSC)ないし前駆細胞が腫瘍化する経路と局所の間葉系細胞(resident MSC) が腫瘍化する経路の二つの可能性が考えられた。(Jimi S, et al. 準備中)

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 38 件)

- ① Iwasaki H, Ishiguro M, Nishio J, Aoki M, Yokoyama R, Yokoyama K, Taguchi K, Nabeshima K. Extensive lipoma-like changes of myxoid liposarcoma: morphologic, immunohistochemical, and molecular cytogenetic analyses. *Virchows Arch.* 2015;466:453-464. 査読有 doi:10.1007/s00428-015-1721-z
- ② Shibata T, Nishio J, Matsunaga T, Aoki M, Iwasaki H, Naito M. Giant cell tumor of the patella: An uncommon cause of anterior knee pain. *Molecular and clinical oncology.* 2015;3:207-211. 査読有 doi:10.3892/mco.2014.433
- ③ Nishio J, Iwasaki H, Nabeshima K, Naito M. Immunohistochemical, cytogenetic, and molecular cytogenetic characterization of both components of a dedifferentiated liposarcoma: implications for histogenesis. *Anticancer Res.* 2015;35:345-350. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25550570>
- ④ Satoh K, Nimura S, Aoki M, Hamasaki M, Koga K, Iwasaki H, Yamashita Y, Kataoka H, Nabeshima K. Tumor budding in colorectal carcinoma assessed by cytokeratin immunostaining and budding areas: possible involvement of c-Met. *Cancer Sci.* 2014;105:1487-1495. 査読有 doi:10.1111/cas.12530
- ⑤ Nishio J, Kamachi Y, Iwasaki H, Naito M. Diffuse-type tenosynovial giant cell tumor with t(1;17)(p13;p13) and trisomy 5. *In vivo.* 2014;28:949-952. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25189912>
- ⑥ Nishio J, Iwasaki H, Nagatomo M, Naito M. Fibroma of tendon sheath with 11q rearrangements. *Anticancer Res.* 2014;34:5159-5162. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25202108>
- ⑦ Nishio J, Iwasaki H, Nabeshima K, Kamachi Y, Naito M. Atypical lipomatous tumor with structural rearrangements involving chromosomes 3 and 8. *Anticancer Res.* 2014;34:3073-3076. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24922675>
- ⑧ Nishio J, Iwasaki H, Hayashi H, Nabeshima K, Naito M. Soft tissue perineurioma of the foot with 10q24 rearrangements: unique MRI features with histopathologic correlation. *Skeletal Radiol.* 2014;43:1017-1022. 査読有 doi:10.1007/s00256-014-1839-0
- ⑨ Nishio J, Iwasaki H, Aoki M, Nabeshima K, Naito M. FDG PET/CT findings of superficial angiomyxoma. *Clinical nuclear medicine.* 2014;39:367-370. 査読有 doi:10.1097/RLU.0b013e3182995e15
- ⑩ Nishio J, Inamitsu H, Iwasaki H, Hayashi H, Naito M. Calcifying aponeurotic fibroma of the finger in an elderly patient: CT and MRI findings with pathologic correlation. *Experimental and therapeutic medicine.* 2014;8:841-843. 査読有 doi:10.3892/etm.2014.1838
- ⑪ Kosaka H, Nishio J, Matsunaga T, Aoki M, Iwasaki H, Naito M. Imaging features of periosteal chondroma manifesting as a subcutaneous mass in the index finger. *Case reports in orthopedics.* 2014;2014:763480. 査読有 doi:10.1155/2014/763480
- ⑫ Aoki M, Nishio J, Iwasaki H, Masaki M, Kawakami Y, Nishino T, Ohjimi H, Tamura K, Nabeshima K, Naito M. Osteosarcoma of the patella mimicking giant cell tumor: imaging features with histopathological correlation. *Anticancer Res.* 2014;34:2541-2545. 査読有 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24778073>
- ⑬ Ohishi J, Aoki M, Nabeshima K, Suzumiya J, Takeuchi T, Ogose A, Hakozaiki M, Yamashita Y, Iwasaki H. Imatinib mesylate inhibits cell growth of malignant peripheral nerve sheath tumors in vitro and in vivo through suppression of PDGFR-beta. *BMC cancer.* 2013;13:224. 査読有 doi:10.1186/1471-2407-13-224
- ⑭ Nishio J, Kuwabara Y, Nabeshima S, Iwasaki H, Naito M. PET-positive polyostotic fibrous dysplasia mimicking

- Ollier disease. *In vivo*. 2013;27:821-826. 査読有
- ⑮ Nishio J, Iwasaki H, Yano S, Naito M. Collagenous fibroma (desmoplastic fibroblastoma) with trisomy 8 as the sole cytogenetic abnormality. *Anticancer Res*. 2013;33:3259-3262. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23898088>
- ⑯ Nishio J, Ideta S, Iwasaki H, Naito M. Scapular osteochondrolipoma: Imaging features with pathological correlation. *Oncology letters*. 2013;6:817-820. 査読有 doi:10.3892/ol.2013.1455
- ⑰ Nishio J, Ideta S, Aoki M, Hamasaki M, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Fibrolipoma of the ring finger: MR imaging and histological correlation. *In vivo*. 2013;27:541-544. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812228>
- ⑱ Nishio J, Aoki M, Tanaka Y, Iwasaki H, Naito M. Painless angioleiomyoma of the first web space of the hand. *In vivo*. 2013;27:519-522. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812223>
- ⑲ Nishio J, Aoki M, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Imaging features of desmoid-type fibromatosis in the teres major muscle. *In vivo*. 2013;27:555-559. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23812231>
- ⑳ Ideta S, Nishio J, Aoki M, Ishimatsu T, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Imaging findings of ossifying fibromyxoid tumor with histopathological correlation: A case report. *Oncology letters*. 2013;5:1301-1304. 査読有 doi:10.3892/ol.2013.1170
- ㉑ Harada T, Watanabe K, Nabeshima K, Hamasaki M, Iwasaki H. Prognostic significance of fibroblastic foci in usual interstitial pneumonia and non-specific interstitial pneumonia. *Respirology*. 2013;18:278-283. 査読有 doi:10.1111/j.1440-1843.2012.02272.x
- ㉒ Endo M, Yamamoto H, Setsu N, Kohashi K, Takahashi Y, Ishii T, Iida K, Matsumoto Y, Hakozaki M, Aoki M, Iwasaki H, Dobashi Y, Nishiyama K, Iwamoto Y, Oda Y. Prognostic significance of AKT/mTOR and MAPK pathways and antitumor effect of mTOR inhibitor in NF1-related and sporadic malignant peripheral nerve sheath tumors. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19:450-461. 査読有 doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-1067
- ㉓ Emori M, Tsukahara T, Murase M, Kano M, Murata K, Takahashi A, Kubo T, Asanuma H, Yasuda K, Kochin V, Kaya M, Nagoya S, Nishio J, Iwasaki H, Sonoda T, Hasegawa T, Torigoe T, Wada T, Yamashita T, Sato N. High expression of CD109 antigen regulates the phenotype of cancer stem-like cells/cancer-initiating cells in the novel epithelioid sarcoma cell line ESX and is related to poor prognosis of soft tissue sarcoma. *PloS one*. 2013;8:e84187. 査読有 doi:10.1371/journal.pone.0084187
- ㉔ Aoki M, Nabeshima K, Hayashi H, Hamasaki M, Iwasaki H. Identification of APN/CD13 as the target antigen of FU3, a human monoclonal antibody that recognizes malignant fibrous histiocytoma. *Int J Oncol*. 2013;43:57-62. 査読有 doi:10.3892/ijo.2013.1940
- ㉕ Saito T, Yokotsuka M, Motoi T, Iwasaki H, Nagao T, Marc Ladanyi M, Yao T. EWS-WT1 Chimeric Protein in Desmoplastic Small Round Cell Tumor is a Potent Transactivator of FGFR4. *J Cancer Sci Ther*. 2012;4:335-340. 査読有 doi:10.4172/1948-5956.1000164
- ㉖ Nishio J, Iwasaki H, Takagi S, Seo H, Aoki M, Nabeshima K, Naito M. Low-grade central osteosarcoma of the metatarsal bone: a clinicopathological, immunohistochemical, cytogenetic and molecular cytogenetic analysis. *Anticancer Res*. 2012;32:5429-5435. 査読有  
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23225447>
- ㉗ Nishio J, Isayama T, Yoshimura I, Ohjimi H, Iwasaki H, Naito M. Myxoid liposarcoma of the ankle: a case report. *The Journal of foot and ankle surgery : official publication of the American College of Foot and Ankle Surgeons*.

- 2012;51:76-79. 査 読 有  
doi:10.1053/j.jfas.2011.09.005
- ⑳ Nishio J, Isayama T, Iwasaki H, Naito M. Elastofibroma dorsii: diagnostic and therapeutic algorithm. *Journal of shoulder and elbow surgery / American Shoulder and Elbow Surgeons* [et al]. 2012;21:77-81. 査 読 有  
doi:10.1016/j.jse.2011.01.043
- ㉑ Nishio J, Aoki M, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Characterization of giant marker and ring chromosomes in a pleomorphic leiomyosarcoma of soft tissue by spectral karyotyping. *Oncol Rep*. 2012;28:533-538. 査 読 有  
doi:10.3892/or.2012.1835
- ㉒ Nishio J, Aoki M, Nabeshima K, Iwasaki H, Naito M. Cytogenetic and molecular cytogenetic findings in giant dedifferentiated liposarcoma of the thigh. *Oncol Rep*. 2012;27:764-768. 査 読 有  
doi:10.3892/or.2011.1584
- ㉓ Nishio J, Iwasaki H, Nabeshima K, Naito M. Cytogenetics and molecular genetics of myxoid soft-tissue sarcomas. *Genetics research international*. 2011; 2011:497148. 査 読 有  
doi:10.4061/2011/497148
- ㉔ 石黒 晶子, 溝口 幹朗, 金子 安比古, 横山 良平, 竹下 盛重, 岩崎 宏. t(2;8;14)(q33;q13;q13)を示した脂肪芽細胞腫の一例. *日本染色体遺伝子検査学会雑誌*. 2014;32:26-29. 査 読 有  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2014259626
- ㉕ 石黒 晶子, 金子 安比古, 横山 良平, 福重 智子, 溝口 幹朗, 竹下 盛重, 岩崎 宏. 組織学的に二相性を示した脂肪肉腫の一例. *日本染色体遺伝子検査学会雑誌*. 2013;31:51-56. 査 読 有  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2014071105
- ㉖ 今城 有芸, 廣田 智子, 阿南 春分, 中村 寿美得, 白橋 淨彦, 高橋 庸子, 近藤 晴彦, 植田 多恵子, 宮本 新吾, 宮川 三代子, 青木 光希子, 岩崎 宏. 子宮頸部原発横紋筋肉腫の一例. *福岡産科婦人科学会雑誌*. 2013;36:3-8. 査 読 有  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2015023402
- ㉗ 境 哲平, 佐藤 典子, 今福 信一, 古賀 佳織, 岩崎 宏, 中山 樹一郎. Myxofibrosarcoma. *西日本皮膚科*. 2013;75:117-118. 査 読 有  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2013281941
- ㉘ 岩崎 宏. 【軟部腫瘍 II-病理診断と最近の話題-】腫瘍概念をめぐるトピックス いわゆる悪性線維性組織球腫. *病理と臨床*. 2012;30:280-286. 査 読 有  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2012150267
- ㉙ 大石 純, 久野 敏, 岩崎 宏. 鼻腔奇形癌肉腫の1例. *診断病理*. 2011;28:58-61. 査 読 有  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2011194064
- ㉚ 石黒 晶子, 岩崎 宏, 竹下 盛重, 溝口 幹朗, 菊間 幹太, 山田 梢, 金子 安比古. 悪性線維性組織球腫の細胞株の樹立と異なる継代数での核型と CGH(comparative genomic hybridization)法の比較検討. *日本染色体遺伝子検査学会雑誌*. 査読有  
2011;29:18-26.  
http://search.jamas.or.jp/link/ui/2011324989

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

岩崎 宏 (IWASAKI, Hiroshi)  
福岡大学・医学部・教授  
研究者番号: 90101170

### (2) 連携研究者

自見 至郎 (JIMI, Shirou)  
福岡大学・医学部・講師  
研究者番号: 30226360

### (3) 研究協力者

青木 光希子 (AOKI, Mikiko)  
福岡大学・医学部・助教  
研究者番号: 80469379

石黒 晶子 (ISHIGURO, Masako)  
福岡大学・医学部・病理学研究室