

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 10 日現在

機関番号：12301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25430047

研究課題名(和文) 中枢神経系ラブドイド腫瘍の新たな分類と概念の確立

研究課題名(英文) Establishment of new entities in central nervous system rhabdoid tumors

研究代表者

平戸 純子 (Hirato, Junko)

群馬大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：60208832

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)：中枢神経系に発生するラブドイド細胞要素を有する神経上皮性腫瘍は数種類あり、概念が確立されている非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍(AT/RT)以外の腫瘍は分類が混乱していたが、代表的な症例について病理学的特徴とarray CGH, シークエンス、FISH法などを用いた分子遺伝学的な解析を行った結果から、新たな知見を見出し、二次性AT/RTやepithelioid glioblastomaなどの新たな腫瘍概念の確立に貢献した。

研究成果の概要(英文)：There are several types of neuroepithelial tumors with rhabdoid cell components in the central nervous system. In these tumors atypical teratoid/rhabdoid tumor is an established tumor entity, but the classification of the others has not been performed appropriately. In the present study we analyzed several representative cases with rhabdoid tumors about the histopathological features and molecular genetic abnormalities using array CGH, DNA sequencing and FISH method. We verified that AT/RT arose from ependymoma, and found a novel specific gene alteration of epithelioid glioblastoma. These novel findings contributed to establish new entities like secondary AT/RT and epithelioid glioblastoma.

研究分野：脳腫瘍病理学

キーワード：中枢神経系ラブドイド腫瘍 INI1 混合型ラブドイド腫瘍 二次性非定型奇形腫様ラブドイド腫瘍 上皮様/ラブドイド膠芽腫 array CGH INI1, BRG1陽性胎児性腫瘍 SWI/SNF complex

1. 研究開始当初の背景

中枢神経系に発生するラブドイド細胞の出現を伴う腫瘍(中枢神経系ラブドイド腫瘍)は atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) と他の腫瘍型が混在する composite rhabdoid tumor (CRT) に分けられおり、前者は *SMARCB1/INI1* 遺伝子の不活性化に伴う INI1 蛋白の陰性化が起こるが¹⁾、後者は INI1 蛋白が保たれるとされてきた²⁾。近年 INI1 蛋白の免疫組織化学による検索が進んだ結果、単純に 2 つのグループに分けられないことが明らかとなった。特に以下の 3 点が問題と考えられた。

(1) CRT の中にもラブドイド細胞要素のみ INI1 陰性で、従来の組織型の要素は INI1 が保たれている腫瘍がある。

(2) ラブドイド細胞に良く類似した細胞要素(ここでは epithelioid/rhabdoid cell とする)が出現する悪性星細胞系腫瘍が 2 種類あり、Kleinschmidt-DeMasters ら³⁾によって epithelioid/rhabdoid cell が INI1 陽性の腫瘍は epithelioid glioblastoma、INI1 陰性の腫瘍は rhabdoid glioblastoma の腫瘍名が提唱されたが、rhabdoid glioblastoma の腫瘍概念が研究者間で統一されておらず、混乱が生じている。

(3) 臨床病理学的に AT/RT とほぼ一致しているが、INI1 陽性の症例が稀に存在している。一部は *SMARCA4/BRG1* 遺伝子の不活性化によって生じると報告されたが⁴⁾、実際の症例では BRG1 陰性例は非常に稀で INI1、BRG1 が保たれた腫瘍がある。これらの腫瘍の位置づけが不明となっている。

これらの問題を解決し中枢神経系ラブドイド腫瘍の中での分類と腫瘍概念の確立が必要と考えられた。

2. 研究の目的

上記に挙げた問題点について具体的な研究目的を記載し、最後に全体をまとめた目的について述べる。

(1) CRT の症例の中にもラブドイド細胞要素のみ INI1 蛋白陰性を示す腫瘍が存在する。Wyatt-Ashmead や Kleinschmidt-DeMasters らによって rhabdoid glioblastoma と報告された症例³⁾、また、pleomorphic xanthoastrocytoma (PXA) や ganglioglioma の一部に INI1 陰性化を示すラブドイド細胞要素が存在し、従来の腫瘍型の中に AT/RT が発生したという考え方がなされている症例があげられる⁵⁻⁷⁾。著者らも high grade astrocytoma と ependymoma の症例で INI1 陰性のラブドイド細胞要素を有する症例を見出した。これらの腫瘍例について、染色体・遺伝子解析を行い、従来の腫瘍型要素との関連性を明らかにする。

(2) INI1 陽性の epithelioid/rhabdoid cell が出現する悪性星細胞系腫瘍があり、研究者によっては、epithelioid glioblastoma³⁾や rhabdoid glioblastoma と異なる名称で報告されている腫瘍型がある。これを epithelioid/rhabdoid glioblastoma とし、臨床病理学的のみならず、染色体・遺伝子異常の観点からも特徴を明らかにし、腫瘍概念を確立したいと考えている。現在までに検索した症例の中で 9 例ほど該当し、この中の一例の array CGH 法による検索で、epithelioid/rhabdoid cell の領域と星細胞腫の要素に共通する異常のほか、前者の要素のみに見られる欠失を 3 番染色体に見出した。さらに詳細に解析を進め、この欠失がどの遺伝子の不活性化に対応しているのかが明らかにし、INI1 蛋白と同様に遺伝子の不活性化を免疫染色で可能か否かについて検討したい。さらに多数例を検索して、この腫瘍グループを特徴づける異常か否か検討する必要があると考えている。

(3) INI1 陽性の AT/RT の存在が報告されており、*INI1/SMARCB1* と同じ SWI/SNF remodeling complex に属する *BRG1/SMARCA4* の不活性化によるとされている⁴⁾。先行する研究で 4 例同様の症例が認められたが、いずれも BRG1 陽性であった。SWI/SNF remodeling complex に属する他の遺伝子の不活性化によって発生した可能性がある。SWI/SNF remodeling complex に属する他の遺伝子の異常を検索して、責任遺伝子を見出し INI1 陽性 BRG1 陽性の AT/RT の存在を確認したいと考えている。

以上の 3 つの点について検索を進め、その結果のもとに中枢神経系ラブドイド腫瘍の分類と概念を確立し提案する。

3. 研究の方法

先行した研究で収集された症例とコンサルテーションや中央診断に寄せられた症例で検索許可を得られた症例の中から、研究目的(1)~(3)に合致する症例をえらび、臨床病理学的な特徴やマーカー発現の特徴を検索し、可能なものでは電顕的検索も行う。さらにパラフィン切片から DNA を抽出し、それぞれの特定の染色体・遺伝子について検索する。CRT や epithelioid/rhabdoid glioblastoma のような通常の腫瘍型の要素とラブドイド細胞や epithelioid/rhabdoid cell 要素をふくむ腫瘍では、要素別に array CGH 法で全般的な染色体異常を調べ、DNA シークエンスや FISH 法での解析を加えて両者の関係を明らかにする。腫瘍概念を変えるような重要な症例で凍結検体が保存されているような症例があれば、次世代シーケンスの応用も視野に入れている。

4. 研究成果

(1)については、従来の組織型の腫瘍で INI1 陰性ラブドイド細胞要素を伴った症例を 4 例収集することができた。High grade astrocytoma 2 例、low grade astrocytoma 1 例、ependymoma 1 例である。このうち ependymoma 症例について、array CGH 法にて ependymoma の要素とラブドイド細胞からなる要素を解析したところ、INI1 遺伝子をコードする領域を含む 22q の LOH など、25 個のコピー数異常が共通して認められ、両者は一元的に発生したものと考えられた。また、テント上に発生する ependymoma に特異的に存在する C11orf95-PELA 癒合遺伝子が両者に存在することを FISH 法で確認し、この症例のラブドイド腫瘍は ependymoma から発生した secondary AT/RT であることが明らかとなった。また、免疫組織化学的に INI1 陰性であるため、INI1 遺伝子のコーディング領域、およびスプライス部位を DNA シークエンスにて検索したが、INI1 遺伝子の不活性化の原因となるような残存アレルの点突然変異は確認できなかった。他の腫瘍から二次性に発生したラブドイド腫瘍は de novo の AT/RT とは異なる分子遺伝学的異常によって発生する可能性が考えられる。この点については、他の 2 例の詳細な解析が必要である。

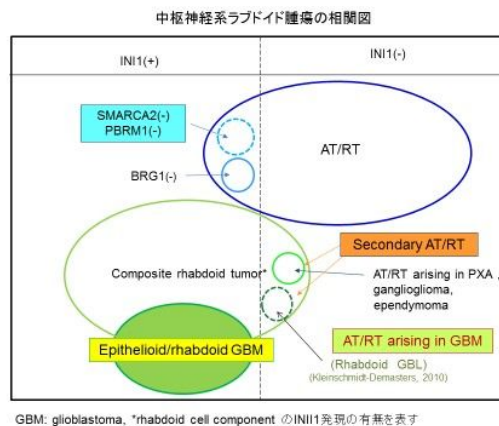
このような従来の組織型の腫瘍に AT/RT が発生したものと考えられた症例の親腫瘍は、前述したように PXA, ganglioglioma が報告されているが、ependymoma 例は初めてであり、以前の症例は BRAF-V600E の変異の存在のみで両者の関係を推定していたが、今回の症例を加えることで、secondary AT/RT の存在を明瞭に示すことができたことは AT/RT の腫瘍発生を解明するうえに新たな知見を提供するものとなった。Secondary AT/RT という概念を当てはめれば、Kleinschmidt-DeMasters ら⁴⁾が提唱している rhabdoid glioblastoma は high grade astrocytoma に二次性に発生した AT/RT とみなすべきであり、rhabdoid glioblastoma の名称は適切でないと考えられる。

(2) INI1 陽性のラブドイド細胞に類似した細胞が出現する epithelioid/rhabdoid glioblastoma の 1 例についてさらに解析をすすめた。この症例はびまん性星細胞腫 (DA)、紡錘形細胞要素、および epithelioid/rhabdoid cell 要素からなり、array CGH 法により解析を行ったところ、3 者に共通する 8 個のコピー数異常と epithelioid/rhabdoid cell 要素のみに 3 個のコピー数異常が見出された。これらは LSAMP の homozygous deletion と ODZ3 および LRP1B の heterozygous deletion である。また、DA 要素と epithelioid/rhabdoid cell 要素に IDH の変異はなく BRAF-V600E の変異が認められた。LSAMP については免疫染色も試みたが、良い結果は得られなかった。以上の <https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsp>

ho/ 結果から、epithelioid/rhabdoid glioblastoma は primary glioblastoma, secondary glioblastoma とは異なる遺伝子異常の経路で発生すること、BRAF-V600E の変異を伴う低悪性度星細胞腫から二次的に発生する可能性があること、および epithelioid cell の形態学的な特徴や生物学的悪性度の高さに LSAMP を含む 3 つの遺伝子の欠失が関連している可能性が示唆された。それ以後の他施設の研究で、ODZ3 の欠失が、多くの症例で見出されており⁸⁾、ODZ3 遺伝子の腫瘍発生における役割を明らかにする必要があると考えられる。

(3) INI1, BRG1 が保たれた AT/RT 類似の胎児性腫瘍の 4 例について、臨床病理学的に検索したところ、INI1, BRG1 が保たれている以外、組織像、多様なマーカー発現、臨床的特徴、転帰など AT/RT と同様であった。さらに免疫組織化学的に SWI/SNF complex に属する subunit である SMARCA2, PBRM1, ARID1 について発現の有無を検索したところ、SMARCA2 と PBRM1 の陰性化が認められた。この 2 個の遺伝子の不活性化が腫瘍発生に関与している可能性が示された。分子遺伝学的な解析が将来の課題である。

以上の 3 点について今回の研究で得られた知見に基づいて、著者が以前に提唱した分類図⁹⁾を改訂した、以下のような相関図がそれぞれの腫瘍型の関係をよく表しているものと考えられた。



このうち黄色の背景で示した epithelioid/rhabdoid glioblastoma は最近改訂された WHO 2016 年分類では、epithelioid glioblastoma との腫瘍名が採用された¹⁰⁾。

引用文献)
 1) Judkins AR, Mauger J, Rorke LB et al. Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 in pediatric CNS neoplasms. Am J Surg Pathol 2004, 28: 644-650
 2) Perry A, Fuller CE, Judkins AR et al. INI-1 expression is retained in composite

rhabdoid tumors, including rhabdoid meningiomas. *Mod Pathol* 2005, 18: 951-958

3) Kleinschmidt-DeMasters BK, Alassiri AH, Birks DK et al.: Epithelioid versus rhabdoid glioblastomas are distinguished by monosomy 22 and immunohistochemical expression of INI-1 but not claudin 6. *Am J Surg Pathol* 2010, 34:341-354

4) Hasselblatt, M., Gesk, S., Oyen, F. et al.: Nonsense mutation and inactivation of SMARCA4 (BRG1) in an atypical teratoid/rhabdoid tumor showing retained SMARCB1 (INI1) expression. *Am J Surg Pathol* 2011, 35: 933-935

5) Allen JC, Judkins A., Rosenblum MK et al.: Atypical teratoid/rhabdoid tumor evolving from an optic pathway ganglioglioma: case study. *Neuro-Oncology* 2005, 8: 79-82

6) Dougherty MJ, Santi M, Brose MS et al.: Activating mutations in BRAF characterize a spectrum of pediatric low-grade gliomas. *Neuro-Oncology* 2010, 12: 621-630

7) Kleinschmidt-DeMasters BK, Birks DK, Aisner DL et al.: Atypical teratoid/rhabdoid tumor arising in a ganglioglioma: genetic characterization. *Am J Surg Pathol* 2011, 35: 1894-1901

8) Alexandrescu S, Korschnov A, Lai SH et al.: Epithelioid glioblastoma and anaplastic epithelioid pleomorphic xanthoastrocytoma - same entity or first cousins? *Brain Pathology* 2016, 26: 215-223

9) 平戸純子 Rhabdoid feature を示す神経上皮性腫瘍. *病理と臨床* 2012, 30: 422-428

10) Ellison DW, Kleinschmidt-DeMasters BK, Park S-H. Epithelioid glioblastoma. In: Louis DN, Ohgaki H, Wiestler OD et al. editors. WHO classification of tumours of the central nervous system. Lyon: IARC Press; 2016, p.50-51

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 4 件)

Sumihito Nobusawa, Junko Hirato, Tsutomu Sugai, Naoki Okura, Tatsuya Yamazaki, Seiji Yamada, Hayato Ikota, Yoichi Nakazato, Hideaki Yokoo. Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) arising from ependymoma: a type of AT/RT secondarily developing from other primary central nervous system tumors. *Journal of Neuropathology and Experimental Neurology*, 査読有, 0, 2016, 1-8, DOI:10.1093/jnen/nlv017

平戸純子, 小児脳腫瘍の病理, *The Japanese Journal of Pediatric*

Hematology/Oncology, 査読有, 51, 2014, 344-351,

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/jsp/ho/>

平戸純子, 胎児性脳腫瘍の鑑別病理診断, *Neuro-Oncology* の進歩, 査読有, 21, 2014, 1-21,

<https://www.jstage.jst.go.jp/browse/neurooncology/-char/ja/>

Sumihito Nobusawa, Junko Hirato, Hideyuki Kurihara, Akira Ogawa, Naoki Okura, Masaya Nagaishi, Hayato Ikota, Hideaki Yokoo, Yoichi Nakazato. Intratumoral heterogeneity of genomic imbalance in a case of epithelioid glioblastoma with BRAF V600E mutation. *Brain Pathology* 査読有, 24, 2014, 239-246, DOI: 10.1111/bpa.12114

〔学会発表〕(計 4 件)

Junko Hirato, Sumihito Nobusawa, Hiroshi Kishimoto, Kensuke Oikawa, Mie Takakuwa. Clinicopathological features of atypical teratoid/rhabdoid tumor-like embryonal tumors with retained INI1 and BRG1 expression. 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2016年4月12日, 万国津梁館(沖縄県・名護市)

Sumihito Nobusawa, Junko Hirato, Tsutomu Sugai, Yoichi Nakazato, Hideaki Yokoo. Atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) arising from ependymoma: a type of secondary AT/RT. 21st International Conference on Brain Tumor Research and Therapy, 2016年4月12日, 万国津梁館(沖縄県・名護市)

信澤純人, 平戸純子, 菅井 勉, 横尾 英明, AT/RT arising from ependymoma: a type of AT/RT secondarily developing from other primary central nervous system tumors. 第33回日本脳腫瘍病理学会, 2015年5月30日, JR ホテルクレメント高松(香川県・高松市)

児玉 千明, 信澤純人, 鈴木 文, 伊古田 勇人, 平戸純子, 横尾 英明, 部分的に epithelioid cell を伴う BRAF V600E 変異陽性の anaplastic ganglioglioma の一例. 第103回日本病理学会総会, 2014年4月26日, 広島国際会議場(広島県・広島市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平戸 純子 (HIRATO Junko)
群馬大学・医学部附属病院・准教授
研究者番号： 6 0 2 0 8 8 3 2

(2) 研究分担者

信澤 純人 (NOBUSAWA Sumihito)
群馬大学・医学系研究科・助教
研究者番号： 8 0 6 3 5 3 1 8

(3) 連携研究者

宮永 朋実 (MIYANAGA Tomomi)
群馬大学・医学部附属病院・助教
研究者番号： 3 0 4 5 5 9 5 1