

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 2 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26861166

研究課題名(和文) 頭蓋底脊索腫、軟骨肉腫の分子生物学的解析と新しい鑑別方法の構築

研究課題名(英文) Genetic characterization of skull base chondrosarcoma and chordoma

研究代表者

北村 洋平 (Kitamura, Yohei)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号：30445382

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：頭蓋底部に生じる軟骨肉腫と脊索腫とは画像所見や病理組織所見が非常に似ているため、鑑別が困難な事がしばしばあります。今回私たちは頭蓋底軟骨肉腫について染色体コピー数異常、isocitrate dehydrogenase (IDH) 遺伝子突然変異、brachyuryタンパク質の発現を調べ、脊索腫のそれらと比較をしました。その結果、軟骨肉腫において高頻度でIDH1遺伝子の突然変異を認めただの対し、脊索腫では認めませんでした。また脊索腫で多く見られるbrachyuryタンパク質の発現は軟骨肉腫では認めませんでした。今回の結果から、これらの検査が鑑別において非常に有用であると考えられました。

研究成果の概要(英文)：Although chondrosarcomas rarely arise in the skull base, chondrosarcomas and chordomas are the two major malignant bone neoplasms occurring at this location. The distinction of these two tumors is important, but it is occasionally problematic because of radiological and histological overlap. We analyzed seven skull base chondrosarcoma specimens for chromosomal copy number alterations (CNAs), isocitrate dehydrogenase (IDH)1/2 mutations and brachyury expression. We detected CNAs in six of the seven cases, including chromosomal gains of 8q21.1, 19. Mutation of IDH1 was found with a high frequency, of which R132S was most frequently mutated. Immunohistochemical staining for brachyury was negative in all cases. To the best of our knowledge, this is the first whole-genome study of an SBSC case series. Our findings suggest that these tumors are molecularly consistent with a subset of conventional central chondrosarcomas and different from skull base chordomas.

研究分野：脳神経外科

キーワード：頭蓋底軟骨肉腫 脊索腫 IDH1/2 brachyuryタンパク質

## 1. 研究開始当初の背景

脊索腫(chordoma)は脊索遺残組織から発生し、頭蓋底に好発する腫瘍である。頭蓋内腫瘍全体に占める割合は0.5%程度と報告されている(Brain Tumor Registry of Japan. *Neurol Med Chir.* 2009;49Suppl:1-96)。手術で到達することが困難な部位に生じるため通常全摘出する事は難しく、高率に再発する難治性の腫瘍である。放射線治療の有効性が報告されているものの効果は限定的である(Takahashi et al. *Acta Neurochir.* 2009;151:759-69)。

脊索は上皮組織であり、脊索腫は上皮に由来する腫瘍であるが、部分的に軟骨組織に非常に近い組織像を呈するなど、一部間葉系腫瘍に近い性格を併せ持つという特徴を有している。事実、軟骨成分が豊富な脊索腫は軟骨性脊索腫(chondroid chordoma)という別の名称が与えられてきた。

一方、軟骨肉腫(chondrosarcoma)は軟骨組織から発生する間葉系の腫瘍であるが、脊索腫と同様に頭蓋底部に好発し(頭蓋内腫瘍の0.05%)、病理組織学的にも非常に類似の所見を示すため、脊索腫との鑑別が常に必要とされてきた腫瘍である。

上皮系由来と間葉系由来という全く異なる母地から発生した脊索腫と軟骨肉腫という2つの腫瘍が何故非常に類似した形態を呈するのは長い間不明であり、両者の臨床経過や予後は異なるため、これらを区別する事は非常に重要であり、両者の鑑別に難渋する事例が臨床の現場において頻繁に存在した。

近年、脊索腫の発生や進行においてT遺伝子とその産物であるbrachyuryタンパク質が非常に大きな役割を果たしているという報告が相次いだ(Yang et al. *Nat Genet.* 2009;41:1176-78,等)。これらは主にin vitroの実験結果に基づいたものであったが、2013年本研究代表者は頭蓋底脊索腫においてbrachyuryの発現が脊索腫における予後不良因子であることをアメリカ神経病理学会雑誌に報告し(Kitamura et al. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2013;9:816-23、科研費研究課題番号24791519)、臨床的側面からこれらの研究結果を裏付けた。Brachyuryは現在では脊索腫における感度、特異度の高いマーカーであると考えられており、本研究代表者は上記の報告の中でbrachyuryが陰性である脊索腫は生物学的には異なる腫瘍、つまりは低悪性度の軟骨肉腫に近い腫瘍と考えた方がよいのではないかと結論づけた。

一方、軟骨肉腫についても近年ブレイクスルーが相次いだ。細胞周期において重要な役割を担うIDH1/2(Isocitrate dehydrogenase 1および2)のmutationが軟骨肉腫において高頻度で見つかり、軟骨肉腫の発生において重要な役割を担うマーカーであることが報告された(Amary et al. *Nat genet.* 2011;43:1262-5)。

これまで臨床の現場においては、脊索腫と

軟骨肉腫の鑑別が難しい症例ではpankeratinやEMA(epithelial membrane antigen)などの上皮マーカーの染色を行い参考としてきた。しかし、これらの手法にも限界があり、最終的には主観的な判定方法である病理形態学的所見が最も重要視されてきた。T(Brachyury)とIDH1/2の解析の組み合わせはこれまで長く臨床の場で困難であった両腫瘍の鑑別において、非常に有効かつ客観的な手段となる可能性が高いと考えられた。また、これら分子生物学的解析による分類が従来の病理形態学的な分類と必ずしも一致しない場合、組織形態学的分類よりも分子生物学的な分類の方がより予後と深く相関する可能性が強く示唆される。これらの情報は、今後これらの腫瘍に対する治療方針や予後の判定において重要な情報をもたらす事になると考えられた。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、過去の研究において頭蓋底脊索腫の分子生物学的特徴に関するデータの蓄積を有していた。そこで、今回頭蓋底軟骨肉腫の網羅的な遺伝子解析を行うことにより、過去のデータと比較し、脊索腫と軟骨肉腫との違いを調べた。

具体的にはComparative Genomic Hybridization(CGH)法による全染色体解析、免疫染色法によるbrachyuryタンパク質の発現の解析、ダイレクトシーケンス法によるIDH1/2のmutationの有無の解析を行った。

## 3. 研究の方法

当院手術で摘出された頭蓋底軟骨肉腫のホルマリン固定パラフィン包埋切片を使用した。

この研究は当施設の倫理委員会での承認を受けて行った。

診断は病理の先生と組織形態学的に行い、脊索腫との鑑別が難しい症例では上皮マーカーの免疫染色(pankeratin, EMA)を追加した。

### (1) CGH法

過去の手術標本のパラフィン包埋切片を薄切し、連続するHE標本から、病理医が腫瘍と診断した範囲の細胞からのみDNA抽出を行った。DNAをDegenerate Oligonucleotide Primed-Polymerase Chain Reaction(DOP-PCR)法にてDNAを非特異的かつ均一に増幅させた。腫瘍DNAをFITCで標識した。同時に性別を一致させた正常DNAをrhodamineで標識した。スライドガラス上に展開された正常リンパ球のmetaphase spreadに競合的に腫瘍のDNAと正常DNAをhybridizeさせた。蛍光顕微鏡を使用して、スライドをコンピューターに取り込み、を利用してgainとlossを判定した。解析には、CGH解析用ソフトウェア(CytoVision)を使用した。

## (2) brachyury の免疫染色

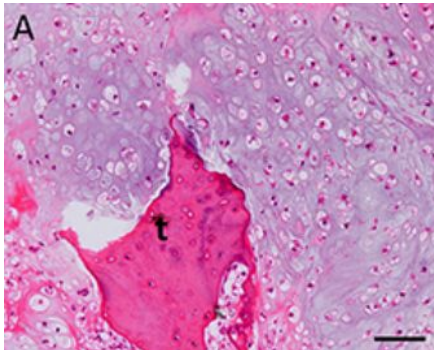
腫瘍の薄切切片をクエン酸 buffer に入れ microwave で antigen retrieval を 20 分間行った。抗 brachyury 抗体を使って、一晚 incubate を行った。過去の文献に従い、核が強く、びまん性に染色されている標本を陽性と判定した。

## (3) ダイレクトシーケンス法

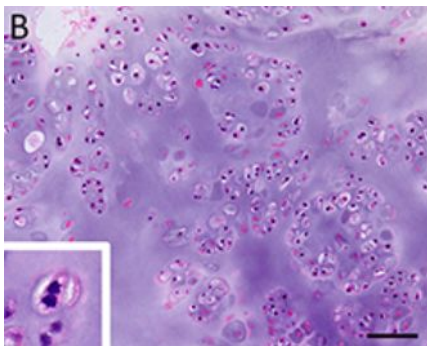
(1) で使用した DNA を使用して施行した。IDH1 codon132 と IDH2 codon172 をターゲットとしたプライマーを使用し、PCR にて増幅させた。PCR 産物をシーケンサーにて解析し、コンピューターソフトウェアで判定を行った。

## 4. 研究成果

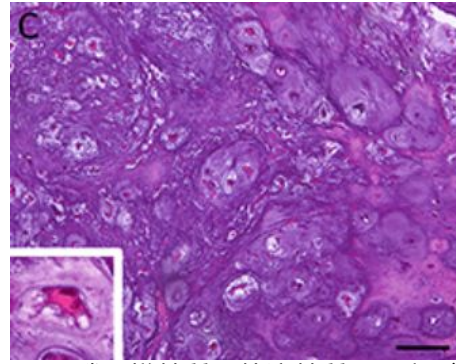
当施設で手術が行われた計 7 例について遺伝子解析が行われた。年齢は 21 歳から 77 歳で、中央値は 50 歳であった。術後のフォローアップ期間は 8 ヶ月から 132 ヶ月で、中央値は 83 ヶ月であった。7 例のうち、3 例が Grade I であり、4 例が Grade II であった。Grade III の軟骨肉腫は含まれてはなかった。再発は 5 例で認められており、再発までの期間は 21 ヶ月から 57 ヶ月 (中央値 21 ヶ月) であった。



軟骨肉腫の病理組織写真の一つ。骨(t)が破壊性に腫瘍に取り込まれている像が認められる。



軟骨肉腫の一例。硝子様基質が広い範囲を占めており、硝子軟骨と非常に類似するが、細胞密度が上昇しており、核の腫大や重複(囲み)が認められる。

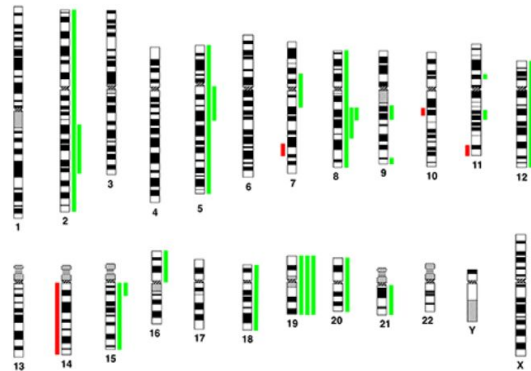


硝子様基質と粘液基質の両方が見られる症例。核が 2 つ存在する細胞が認められる(囲い)。

## (1) CGH

CGH を施行した結果、6 例で何らかの異常が認められた。染色体 8 番長腕 21.1 と 19 番の gain が 3 例ずつに認められた。

その他、染色体 2 番長腕 22-31、5 番長腕 セントロメアから 14、8 番長腕 21.2-22 の部分も複数の症例で gain が認められた。2、5、8、15 番の異常は、Grade II の軟骨肉腫に多い傾向が認められた。

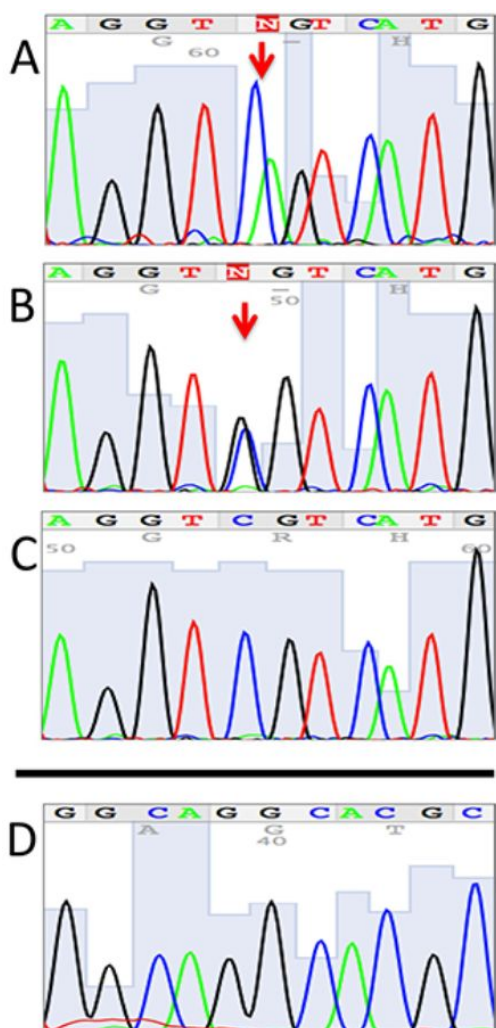


CGH 結果のまとめ。染色体の右側の緑色の線の部分が gain、左側の赤色の部分が loss を表している。

## (2) IDH1/2 mutation

IDH1 の mutation は 7 例中 5 例と比較的高い頻度で認められた。このうち、R132S が 4 例で、R132G が 1 例で認められた。これらは、IDH1 が高頻度で認められる神経膠腫や慢性骨髄性白血病における傾向とは異なるものであった。IDH2 の mutation は全例で認められなかった。これに対し、比較ために施行した、典型的な組織所見の脊索腫 10 例における IDH1/2 のダイレクトシーケンスでは、全例で野生型であった。

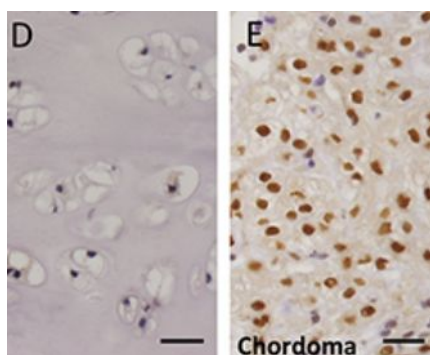
また、これらの結果は頭蓋底軟骨肉腫が conventional central chondrosarcoma の範疇に属することを示唆するものであった。



ダイレクトシーケンスの結果の一例。IDH1 の R132S(A), R132G(B)が認められる。Cは IDH1 野生型。Dは IDH2 野生型。

### (3)brachyury タンパク質の免疫染色

軟骨肉腫7例はいずれも brachyury タンパク質の発現を認めなかった。これは以前研究代表者らが報告した脊索腫とは対照的な結果であった。



brachyury タンパク質免疫染色結果。左が軟骨肉腫、右が脊索腫。脊索腫では通常 brachyury タンパク質が発現しているのに対し、

軟骨肉腫では全例で陰性であった。

### (4)軟骨肉腫と脊索腫の鑑別について

IDH1 の mutation は軟骨肉腫において高頻度に認められ、脊索腫では認められなかった。逆に brachyury タンパク質の発現は脊索腫では高頻度で認められ、軟骨肉腫では認められなかった。これらの結果から、軟骨肉腫と脊索腫の鑑別において IDH1/2 の mutation と brachyury タンパク質の発現の両方を調べることは非常に有用であるということが明らかとなった。

今後はこれらの遺伝子学的情報を基にした分類での予後の比較を行うなどの研究が考慮された。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

- 1) Kanamori H, Kitamura Y, Kimura T, Yoshida K, Sasaki H. Genetic characterization of skull base chondrosarcomas. Journal of Neurosurgery 2015; 123: 1036-41. DOI: 10.3171/2014.12.JNS142059. 査読あり

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

なし

## 6 . 研究組織

(1)研究代表者

北村 洋平 (Kitamura, Yohei)

慶應義塾大学・医学部・共同研究員

研究者番号 : 30445382