

論文の内容の要旨

論文題目 脱分化ないし異所性分化を示す肉腫における MDM2 増幅と H3K27me3 消失の
診断的意義に関する研究

氏名 牧瀬 尚大

肉腫の診断において免疫染色は非常に重要である。古典的には、腫瘍細胞の分化方向を示すマーカーに対する免疫染色が主に用いられてきたが、それら分化マーカーの特異性には限界があることがますます明らかになってきた。脱分化ないし異所性分化を示す肉腫においては、分化方向がはっきりしない、あるいは複数の方向に分化を示すことがあり、特に分化マーカーの有用性は限られている。種々の肉腫における遺伝子異常が明らかになっていくに従い、遺伝子異常の代理マーカーとしての免疫染色が診断において重要度を増してきた。例えば、高分化/脱分化型脂肪肉腫における *MDM2/CDK4* 遺伝子共増幅の代理マーカーとして *MDM2/CDK4* 共陽性が、悪性末梢神経鞘腫瘍(malignant peripheral nerve sheath tumor, MPNST)における *SUZ12/EED* 機能喪失の代理マーカーとしてヒストン3の27番リシントリメチル化(H3K27me3)染色性消失が、それぞれ特異性が示され診断に用いられている。脱分化型脂肪肉腫(dedifferentiated liposarcoma, DDLPS)と MPNST は様々な組織像を取りえることに加えて、最も頻繁に異所性分化を示す肉腫でありしばしば診断が難しい。私は、脱分化ないし異所性分化を示すような肉腫における MDM2 や H3K27me3 の状態を調べることにより、それらの病態をより詳細に理解すること、より正確な病理診断を可能にする洞察を得ることを目指した。そのために、このような肉腫において MDM2、H3K27me3 染色、*MDM2* 遺伝子に対する FISH を行い、必要な症例については次世代シーケンサーを用いた遺伝子解析を行った。また、*MDM2* 増幅、H3K27me3 消失の相互排他性も検証し、これらマーカーの診断的意義の考察を試みた。

私はまず、骨外性骨肉腫(extraskelatal osteosarcoma, ESOS)を扱った。ESOS を診断するには、癌、中皮腫、肉腫等悪性腫瘍の異所性分化との鑑別がしばしば難しい。特に DDLPS と MPNST は骨への異所性分化を起こしやすい肉腫の代表例である。そこで私は ESOS の一部は DDLPS, MPNST の形態学的多様性の一端ではないか、と仮説を立てた。19例の ESOS において主に MDM2, H3K27me3 の状態を調べることにより、ESOS と DDLPS, MPNST との

関係性を明らかにすることを試みた。結果として、ESOS が不均一な腫瘍であることを見出した。19 例中 6 例は *MDM2* 増幅を、うち 4 例は *CDK4* 共増幅を示した。これらは中高年の患者の深部軟部組織発生で、一部が低悪性度成分を含み、観察期間中に腫瘍死を認めなかった。また、19 例中 3 例は H3K27me3 消失を示した。女性の乳腺または卵巣原発で、破骨細胞豊富な骨芽細胞性骨肉腫という特徴的な組織像を示し、急激な経過をとった。これらのマーカー異常は相互排他的であった。H3K27me3 消失 ESOS3 例では次世代シーケンサーを用いた DNA 解析を行い、1 例で *EED* ホモ欠失を認めた。3 例全てで *NF1*, *CDKN2A* の機能喪失を認めなかった。以上の結果から、*MDM2* 増幅 ESOS の少なくとも一部は分類学的に DDLPS と関連していることが示唆された。H3K27me3 消失 ESOS は MPNST とは関連していないと考えた。

次に私は、上皮様形態をとり癌や中皮腫との鑑別が問題となる DDLPS について報告し、この上皮様形態の診断学的意義について議論した。DDLPS は多様な組織像を示し、様々な紡錘形細胞腫瘍との鑑別点についてしばしば報告されている。しかしながら、上皮様形態をとるような DDLPS については報告に乏しい。私はコホート 1 において上皮様形態をとる DDLPS6 例を報告し、これは DDLPS の約 3.8%と見積もられた。全例において同時性または異時性に高分化型脂肪肉腫を認め、*MDM2/CDK4* 免疫染色、*MDM2* FISH はいずれも陽性であった。うち 1 例は上皮への異所性分化を示す稀有な例であり、H3K27me3 が消失していた。免疫染色を行った 5 例全例で少なくとも一部にサイトケラチン AE1/3 または EMA 陽性像を認めた。これらの上皮様形態は診断的にピットフォールであり、癌や中皮腫と誤診される危険性が高い。年齢、発生部位、画像所見、高分化型脂肪肉腫の既往などの臨床経過を総合的に判断することが正しい診断のために重要である。*MDM2/CDK4* 免疫染色、*MDM2* FISH が診断の補助となる。これら 6 例のうち 4 例は 1-15 か月で腫瘍死した。DDLPS における上皮様形態が不良な予後と関連する可能性があるがさらなる検討が必要である。私はさらにコホート 2 において、体腔内発生で、*MDM2/CDK4* 共陽性かつ *MDM2* 増幅を伴うが高分化型脂肪肉腫成分を伴わない、分化方向のはっきりしない上皮様形態をとる悪性腫瘍を報告した。これら 2 例は 1-2 か月で腫瘍死した。これらの症例も上皮様形態をとる DDLPS と同一である可能性があるが、さらなる検討が必要と考えられる。

H3K27me3 消失 DDLPS を経験したことから私は肉腫診断における H3K27me3 消失の特異性に疑問を持った。そこで私は MPNST と DDLPS 多数例を用いて、これらの鑑別における *MDM2* 高度増幅と H3K27me3 消失の特異性について考察した。MPNST と DDLPS は異なる臨床病理像を示し異なる遺伝子異常で特徴づけられる腫瘍であるが、多彩な組織像や頻繁な異所性分化などの共通点を持ち、病理組織像のみで鑑別が困難な場合がある。その場合において、分子学的手法やその代替となる免疫染色が MPNST と DDLPS との鑑別を可能にすることが期待されるが、いくつかの先行研究はこの仮説の反例を示している。例えば、

MPNSTの一部で *MDM2* 増幅を認めることがいくつかの研究で独立に報告されている。また、文献的にはおよそ 85 例の DDLPS は H3K27me3 消失を示さないとされている一方で、私は上皮への異所性分化とその部分で H3K27me3 消失を示すような DDLPS を経験した。MPNST と DDLPS の鑑別における *MDM2*, H3K27me3 の有用性を調べるために、私はこれら 2 種類の肉腫多数例を用いてこれらのマーカーの状態を比較した。*MDM2*/*CDK4* 免疫染色はそれぞれ MPNST の 35%, 19% で陽性であり特異度が低かった。それに対して、FISH 法における *MDM2* 高度増幅は MPNST の 62 例中 1 例(1.6%)でしか認めず、DDLPS と MPNST の鑑別において前者を強く支持する所見であることを示した。H3K27me3 消失は MPNST のよいマーカーであるが、DDLPS でも 47 例中 3 例(6%)で認められ、そのうち 1 例では *EED* のホモ欠失を認めた。これまで MPNST に特異的とされていた *PRC2* 複合体の構成要素の機能喪失と H3K27me3 消失を DDLPS においても発見した。また、興味深いことに H3K27me3 消失を伴う DDLPS は 3 例とも異所性分化を示していた。以上のように、多くの場合、適切な臨床病理学的な文脈において *MDM2* FISH と H3K27me3 免疫染色を用いて MPNST と DDLPS の鑑別が可能である。しかしながら、*MDM2* 増幅かつ H3K27me3 消失を示す肉腫がまれに存在し、これらの症例では様々な因子を組み合わせる総合的な判断が必要となる。このような症例の正確な鑑別のためには、他のマーカーを発見することや網羅的遺伝子解析に容易にアクセスできることなどが必要と考えられる。

最後に私は、脱分化型軟骨肉腫(dedifferentiated chondrosarcoma, DDCS)を扱った。H3K27me3 消失はこれまで MPNST に特異的とされてきたが、非 MPNST の腫瘍でも認められることが明らかになってきた。例えば、私は少数例の H3K27me3 消失骨外性骨肉腫を発見した。さらに、脱分化成分で H3K27me3 消失を認め高分化成分で H3K27me3 が保たれていた DDLPS を発見し、DDLPS の脱分化の過程に関わっている可能性も示唆された。私は DDCS においても同様の機序が働いているかどうかを検証することを試みた。DDCS 16 例の高分化、脱分化成分で H3K27me3 染色を行い、染色性と臨床病理学的因子との関連を調べた。H3K27me3 消失例に対しては次世代シーケンサーを用いて DNA 解析を行った。結果として私は DDCS 16 例中 6 例(37%)で H3K27me3 が消失していることを見出した。H3K27me3 消失所見は脱分化成分に限られており、WDCS は保たれていた。DNA 解析を施行できた症例 4 例のうち 3 例は *IDH2* または *COL2A1* の変異を有し、軟骨への異所性分化を示す MPNST ではなく軟骨肉腫であることを証明できた。さらに、4 例のうち 3 例で脱分化成分に *EED* または *SUZ12* の遺伝子異常を認め、それらは高分化成分にはなかった。この結果から、*PRC2* 複合体のメンバー遺伝子の異常とそれに伴うエピゲノム異常が DDCS の脱分化の過程において重要な役割を果たす可能性が示唆された。この DDCS の一群は非常に特徴的な臨床病理像を示していた。すなわち、上半身、特に肋骨に好発し、脱分化成分の組織像は非常に MPNST に類似しており、たまに横紋筋肉腫への異所性分化を伴い、軟骨成分には一部 Grade 3 成分がみられ、転移巣で軟骨成分を含む場合がある。これらの特徴は H3K27me3 非消失

DDCS とは非常に対照的であった。この DDCS の一群の臨床病理学的特徴を理解するためにはさらに多数例での検討が必要である。

以上、私は DDLPS の形態学、分化方向の多様性を明らかにした。加えて、免疫染色と次世代シーケンサーを用い、MPNST に特異的とされてきた H3K27me3 消失と PRC2 変異の非特異性を示した。また、H3K27me3 消失と異所性分化との関連も示唆された。本研究に数例含まれたような *MDM2* 増幅かつ H3K27me3 消失を示す肉腫が DDLPS なのか、MPNST なのか決定するには、古典的な臨床病理学的な対比に加えて、網羅的遺伝子解析やその他のバイオマーカーを開発する必要があると考えられた。本研究の結果は肉腫の正確な診断・分類に貢献することが期待される。