

が一般的である。すなわちウイルス腫瘍は後腎組織由来の腫瘍で、同組織を構成する後腎芽細胞が胎生30週以前に尿管芽に誘導されて糸球体や尿細管に分化する途上の細胞が腫瘍化したものと考えられる。従って、腫瘍組織は腎臓の皮質構造を模倣した像を示す。腫瘍性の後腎芽細胞(blastemal cell)は多分化能を有しており、糸球体様ならびに尿細管上皮に分化した上皮様細胞(epithelial cell)と同時に横紋筋、平滑筋、軟骨、脂肪などの間葉系細胞にも分化し、腫瘍構成成分の一部となる。このような典型的な腫瘍は古典的ウイルス腫瘍(腎芽腫, nephroblastoma)と称されている。

また、腫瘍の前駆病変(または前がん病変)として腎芽腫症(nephroblastomatosisまたはnephrogenic rest)が存在する。本病変には腎小葉内に存在する葉内腎芽腫症(intralobular nephroblastomatosis)および辺葉腎芽腫症(perilobular nephroblastomatosis)がある。それぞれの組織像およびこれらから発生する腫瘍の組織像も異なる。詳細は各論にゆずる。さて、ヒトのウイルス腫瘍に類似した腫瘍は、多くの動物種に自然発症あるいは実験的に作成できることが知られている。特に、自然発症する動物は広汎で、ほ乳類をはじめとしてウナギ、マスなどの魚類にも生じる。

ウイルス腫瘍の特異性は、家族内発生が多いこと、患児の胚細胞系列に染色体異常を伴い奇形をししばしば合併することにある。ウイルス腫瘍と染色体異常、奇形の合併は古くから知られていた。しかも、染色体異常と奇形の発生に強い相関が認められることも、特記すべきことである。単独奇形としては、無虹彩症、停留精巣、尿道下裂などの生殖泌尿器系奇形が主なものである。奇形症候群としては無虹彩症・生殖泌尿器奇形・精神発達遅滞を伴うWAGR症候群(ウイルス腫瘍, 無虹彩症, genitourinary malformation, mental retardation syndrome), 早期に発症し、急速に進行する腎不全, 性分化異常およびウイルス腫瘍を合併するDenys-Drash症候群(Drash症候群)が知られている。

この種の単独奇形ないしは奇形症候群では11p13領域の欠失が認められることから、この領域からウイルス腫瘍に関わるがん抑制遺伝子の一つであるWT1遺伝子(WT1)が単離され、ウイルス腫瘍の発生ばかりでなく腎および生殖器の器官形成、性の分化に重要な機能を有することが明らかにされつつある。この点は後に詳述する。一方、片側肥大などの

単独奇形、または奇形症候群として巨舌、片側肥大症、臍ヘルニア、副腎の巨細胞を伴うウイルス腫瘍もあり、Beckwith-Wiedemann症候群と呼ばれている。これらは11p15領域に存在する一連の刷り込み遺伝子(imprinting genes)が関与していることが明らかとなった。この詳細も各論で解説されている。また、家族性ウイルス腫瘍の発生は欧米に多く、わが国には少ない。1969年に始まった米国のウイルス腫瘍多施設共同研究であるNational Wilms Tumor Study (NWTs)の集計によると、少なくとも40家系以上が報告されている。それらの症例の腫瘍および胚細胞系列(germline)の染色体を解析すると、11番染色体短腕または17番に異常がみられる。

このようにウイルス腫瘍は胎児性腫瘍の中でも器官形成の異常と腫瘍の発生が密接に関連した極めて興味深い腫瘍である。本腫瘍の治療に関しては、主に先に述べた米国のNWTsや欧州を中心としたInternational Society of Pediatric Tumor(SIOP)の治療法改善の努力によって、古典的ウイルス腫瘍では平均して90%以上の5年生存率を得ている。わが国では1996年に日本ウイルス腫瘍研究グループ(JWiTs)が発足し、NWTsのプロトコールに準じた治療法を全国に広めている。毎年40例内外の登録症例がある。JWiTsでは今までわが国で試みられることのなかった腫瘍の中央病理診断に基づいて治療法の決定を行っている。また、新鮮腫瘍組織が各施設から遺伝子検索センターに送付され、人種差のあるウイルス腫瘍のわが国の生物学的特性を明らかにすべく解析が行われている。

本特集では器官形成と腫瘍化の接点にあるこの興味深い腫瘍の研究の現状について、詳しく取り上げた。本特集を通じて多くの研究者がウイルス腫瘍に興味を持ち日本発の研究成果が発信されることを期待したい。

文 献

- 1) Pochedry C, Miller D.: Wilms' tumor. John Wiley & Sons. NY, 1976.
- 2) Gonzalez-Crussi F.: Wilms' tumor(nephroblastoma) and related renal neoplasms of childhood. CRC Press. Florida. 1984.
- 3) Green DM, et al.: Wilms' tumor. In Principle and Practice of Pediatric Oncology 3rd ed.pp733-760 edited by Pizzo, PA, Poplack, DG, Lippincott-Raven, NY, 1997.

■ 表紙写真の説明 ■

(写真提供・解説：国立成育医療センター研究所 所長 秦 順一)



図1 ヒト胎児（胎生6-7週）
後腎(MT)、中腎(M)およびその先端に生殖隆起(G)をみる。

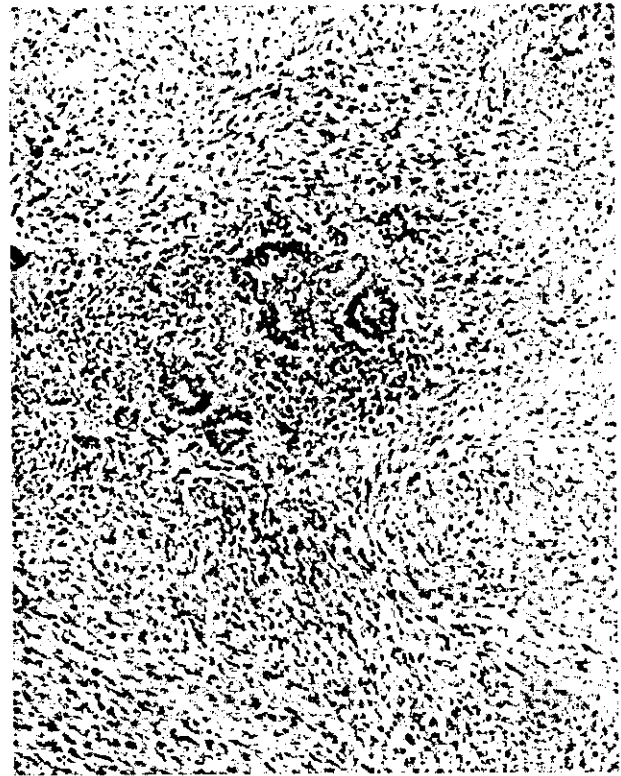


図2 WT1免疫染色
後腎組織、未熟な腎上皮細胞の核に陽性所見をみとめる。

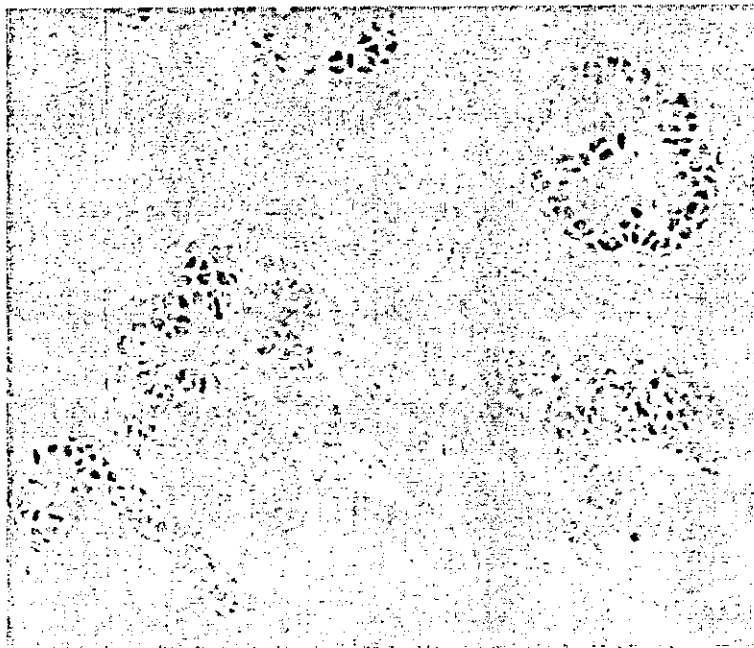


図3 ウィルムス腫瘍組織像
未熟後腎芽細胞、上皮様に分化した腫瘍細胞および間葉系成分よりなる間葉系成分は横紋筋細胞に分化を示している。

【ウイルス腫瘍と WT1 遺伝子】

Wilms' Tumor and WT1 Gene

秦 順一

Hata Jun-ichi

Key words

WT1, Denys-Drash syndrome,
Frasier Syndrome, FRN
Wilms tumor-related anomaly complex

1. WT1 遺伝子(WT1)の構造・機能および発現

先に述べたように、ウイルス腫瘍を発生する患児に形成異常(奇形)を伴うことが古くから知られていた。このような奇形は染色体異常のパターンと密接に関連している。11p13 領域の欠失を伴う奇形として無虹彩症、尿道下裂、WAGR 症候群、Drash 症候群があり、同領域にウイルス腫瘍の発生と器官形成に関わる遺伝子の存在が想定されてきた。1990年にほぼ同時に2つのグループより11p13 領域からウイルス腫瘍の発生に関連する WT1 と命名された遺伝子が単離された^{1,2)}。WT1 は全長約 50kb で10個のエクソンからなり、mRNA の大きさは 3.5kb である。エクソン5とエクソン9の2カ所に alternative splice の部位があり、4種の splicing variants が存在する。WT1 のNH側は glutamine-proline-glycine rich 構造で、COOH側の4個のエクソンはそれぞれ(Cys)₂-(His)₂ zinc finger 構造を持つ(図1)。同部はDNAの特定の配列(-GCGGGGGCG-)に結合することが証明され、転写調節因子であることが判明した。実際に EGR-1, IGF-2, IGF-2 receptor, PDGF, Pax-2 などの発現を転写レベルで調節し、分化を促進させる機能をもつことが明らかにされた³⁾。一方、WT1 蛋白は胎児期では腎糸球体の原基である後腎芽細胞の糸球体性上皮に分化する細胞限局に発現していることが *in situ* hybridization や抗体を用いた免疫組織学的検索で証明された。また、精巣、卵巣の間質細胞の原基である生殖隆起、中皮細胞、脾臓、中枢神経などにも時期特異的に発現している。成人では糸球体上皮、精巣の Sertoli 細胞お

よび卵巣の濾胞細胞に発現している⁴⁾。Keridberg らによって行われた WT1 のターゲッティングによって、本遺伝子の個体レベルでの機能が明らかにされた⁵⁾。すなわち、同遺伝子が欠失した胎仔は後腎芽細胞にアポトーシスが生じ、その結果腎組織は形成されなかった。また、生殖器の分化に重要な Sertoli 細胞や卵巣の濾胞細胞の原基である生殖隆起の萎縮が生じていたという。このような実験結果から、WT1 が腎形成のほか、生殖器の形成に重要な機能を有することが判明した。

2. WT1 異常とウイルス腫瘍発生のメカニズム

散発性ウイルス腫瘍での WT1 変異の頻度は 15%程度といわれている。われわれは97例の散発性ウイルス腫瘍の解析の結果、サザン解析で5例、PCR産物の塩基配列決定で15例に異常を認めた。微小変異の範囲はエクソン1-10、殆んど全てのエクソンにわたっているが、多くは zinc finger domain の変異であり、エクソン8,9のナンセンス変異を伴った点突然変異のほか数10塩基対の重複や欠失例の報告を含めて、後述する奇形症候群を伴うものよりも多彩であった。変異を有する症例の組織像は FRN を含めたウイルス腫瘍で15例中9例に葉内腎芽腫症を伴っていた。しかしながら、散発性ウイルス腫瘍における WT1 変異と腫瘍発生機序の詳細はいまだ明確にされていない。同遺伝子の変異がウイルス腫瘍の発生に必ずしも十分条件でない可能性も指摘されている⁶⁾。腫瘍の発生には異常のほ

か、11p15に主座を有す imprinting 遺伝子 *H19*, *IGF2* などとの関連についても解析する必要がある。

3. *WT1*異常とウィルムス腫瘍の組織像

*WT1*が腎発生→成熟に重要な機能を有することが判明し、その異常がウィルムス腫瘍の発生に関連していることが明らかになったが、*WT1*の機能消失が組織型にどのように反映しているのかについては不明な点が多い。Schumacherらはウィルムス腫瘍の中で、生殖系列(germline)において*WT1*変異があるものは間葉成分優位な組織型を示す傾向があると報告している⁷⁾。また、Miyagawarらは*WT1*の機能喪失によって、ウィルムス腫瘍における異所性の筋発生が生じ、本遺伝子の正常な発現は、腎臓の後腎-間葉系幹細胞の骨格筋への分化を妨げると推測している⁸⁾。このような報告を基に、われわれはウィルムス腫瘍のうち、腫瘍組織に横紋筋細胞を多く含む胎児性横紋筋腫様腎芽腫(fetal rhabdomyomatous nephroblastoma, FRN)または腫瘍の間葉成分として横紋筋成分が腫瘍の約1/4を占める組織型を示した5症例の腫瘍組織で*WT1*変異を検索した結果、いずれもエクソン9における¹¹⁶⁶C→Tの変異となり、結果として³⁰⁰Argが⁵stop codon(R360x)になるナンセンス

変異を認めた。しかもこれらは1例を除いて全て、両側性の腫瘍であった。また、このような両側性発生の患児ではgermlineで、腫瘍に認められた変異と同一の変異を認めた(表)。これら4症例の身体的特徴を詳細に検索すると、驚くべきことに4例中3例が男児で、停留精巣および尿道下裂を伴い、1例の女児でも卵巢低形成の生殖泌尿器系の小奇形を合併していた。*WT1*の特定部位のgermline変異(¹¹⁶⁶C→T)は同遺伝子の機能喪失を招来し、生殖泌尿器系の小奇形とともに、極めて特異的な組織像を示すウィルムス腫瘍を発生せしめる可能性が示唆される⁹⁾。このR390Xによりtruncateされた蛋白はDNA結合に必要なzing finger領域の最後の部分が失われ、その標的遺伝子に結合できなくなるということが証明されている。Huffらは*WT1*変異の結果生ずるtruncateされた蛋白は非機能性であり、正常の*WT1*蛋白の量が減少するというdose effectによって泌尿生殖器系の奇形が惹起されると推論している¹⁰⁾。

4. ウィルムス腫瘍・奇形症候群における*WT1*異常

散発性ウィルムス腫瘍は異なり、Drash症候群では*WT1*変異が責任遺伝子であることが明らかにされた。本症候群はウィルムス腫瘍の発生と乳児期に

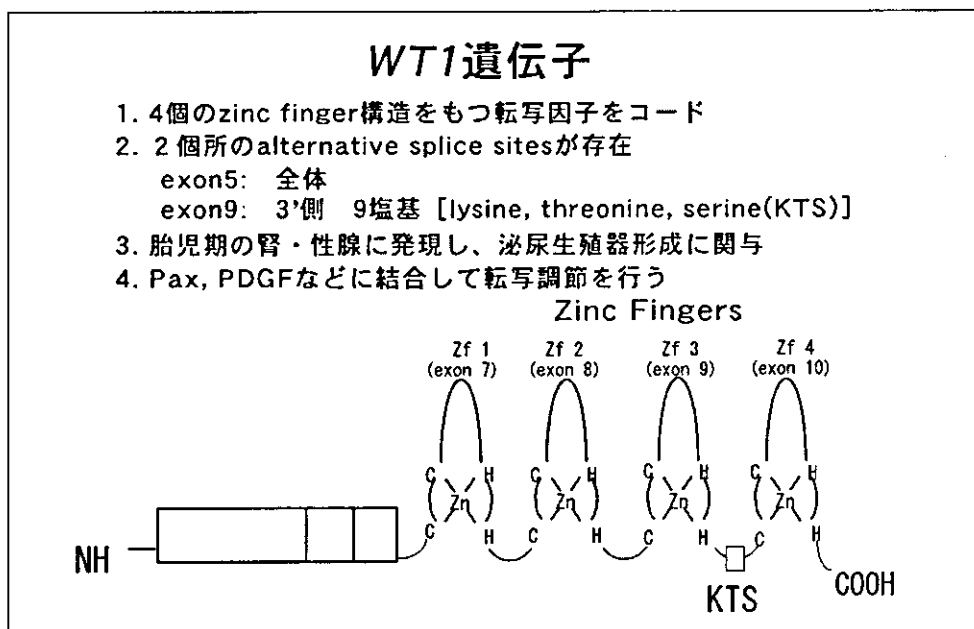


図1 *WT1*の構造
 エクソン7-10はzinc finger domainをコードしている

発症し、進行性に経過する diffuse mesangial sclerosis による腎不全および46XYの核型を示しながら女性型外性器を伴う、いわゆるXY gonadal dysgenesisから構成される¹³⁾。外性器の異常は生殖隆起の間質細胞に発現する *WT1* の機能不全によると考えられている。すなわち、間質細胞から分化する Sertoli 細胞由来の Muller 管退縮因子の機能不全のため、卵巣、卵管ないし付属器様の構造が遺残するとともに女性外性器様を示し、男性化の不全（精巣性女性化症候群, testicular feminization, XY female）が生じる。Drash 症候群では *WT1* の zinc finger domain の点突然変異が体細胞レベルで一方の対立遺伝子に生じるとドミナントネガティブ効果で腎障害・性分化の異常を、さらに腎で両方の対立遺伝子に生じるとウィルムス腫瘍を発生し、同症候群を惹き起こすという仮説が Pelletier によって提唱された¹²⁾。Drash 症候群では報告例も含めほぼ100%, zinc finger 領域の点突然変異が認められる。一方、興味深いのは同症候群に類似した Frasier 症候群（晩発性の腎障害, 精巣性女性化症候群, ウィルムス腫瘍発生なし）¹⁴⁾ では、イントロン9の splicing donor sites に点突然変異を示すことが明らかにされた。エクソン9は *WT1* の alternative splicing site の一カ所で, splicing isoform として9塩基対で構成される3つのアミンの酸

lysine, threonine, serine (KTSと略) が存在する isoform(+KTS)とそれらを含まない isoform(-KTS)が構成される。Splicing donor sites に点突然変異が生じると +KTS isoform が形成されない。その結果, 正常のアリルからは +KTS/-KTS が正常に構成されるのに対して, 異常を持つ対立遺伝子からは -KTS しか生じない。そのため, +KTS/-KTS の不均衡が生じることになる。すなわち, Frasier 症候群が *WT1* isoform の均衡の異常が原因である可能性が示唆される¹⁴⁾。Drash 症候群は本来, 病態の詳細な観察で規定された症候群であり, *WT1* が発見されたことによって, その変異による遺伝子病であることが新たに判明した疾患である。また, Drash 症候群に類似した疾患として報告されてきた Frasier 症候群においても *WT1* splicing isoform の不均衡が病因と深く関わっている疾患であることが明らかになった。エクソン7-10における質の異なる遺伝子異常によって異なった症候群が生じるが判明した (genotype-phenotype correlation) (図2)。このような *WT1* 変異の同定は難治性腎障害の予後や, Drash 症候群では, 6歳以上になると80%以上の確率でウィルムス腫瘍が発生するといわれているので, 腫瘍発生の予測診断としても有用である。

表 横紋筋成分を多量に含むウィルムス腫瘍の遺伝子型と表現型

症例	年齢/性	組織型	腫瘍	<i>WT1</i> 遺伝子変異 生殖系列	<i>WT1</i> 遺伝子変異 腫瘍	泌尿生殖器系の 奇形
1	7m/F	FRN	両側	¹¹⁶⁸ C → C/T	¹¹⁶⁸ C → T(R390X) ROH	左卵巣発育不全
2	9m/M	腎芽型 横紋筋成分有り	両側	¹¹⁶⁸ C → C/T	¹¹⁶⁸ C → T(R390X) ROH	停留睾丸 尿道下裂
3	11m/M	FRN	両側	¹¹⁶⁸ C → C/T	¹¹⁶⁸ C → T(R390X) ROH	停留睾丸
4	1y/M	腎芽型 横紋筋成分有り	両側	¹¹⁶⁸ C → C/T	¹¹⁶⁸ C → T(R390X) LOH	停留睾丸
5	1y/M	FRN	片側	(-)	¹¹⁶⁸ C → T(R390X) LOH	(-)

FRN:fetal rhabdomyomatous nephroblastoma
LOH:loss of heterozygosity
ROH:retention of heterozygosity

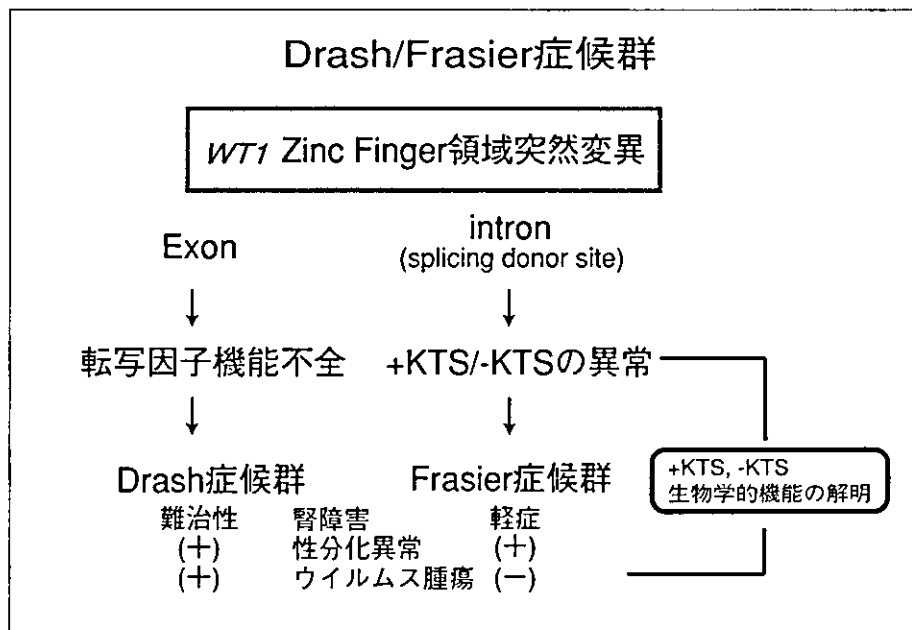


図2 Drash/Frasier症候群の遺伝子型と表現型の対比

おわりに

典型的な胎児性腫瘍であるウィルムス腫瘍とWT1について、最近の話題を含めて概説した。従来、先天性形成異常と腫瘍とは病理総論的にもかけ離れた疾患と考えられてきた、しかしながら、本項で示したように同じ遺伝子の変異が奇形と腫瘍化を惹起することが判明し、器官形成過程での異常が腫瘍化に密接に関与していることが理解できるようになった。WT1の生殖泌尿器系形成とその異常発生における機能については、個体における器官形成レベルでの研究成果がさらに蓄積されることが期待される。また、その腫瘍発生の意義については、さらに詳細に検討をすすめる必要がある。

文献

- 1) Call KM, Glaze T, Ito CY, et al.: Isolation and characterization of a zinc finger polypeptide gene at the human chromosome 11 Wilms' tumor locus. Cell. 60: 509, 1990.
- 2) Gessler M, Poustka A, Cavence W, et al.: Homozygous deletion of Wilms' tumors of a zinc finger gene identified by chromosome jumping. Nature. 343: 774, 1990.
- 3) Drummond IA, Madden SL, Rohwer-Nutter P, Bell GI, et al.: Repression of the insulin-like growth factor II gene are associated by the Wilms' tumor suppressor WT1. Science. 257: 674, 1992.
- 4) Pritchard-Jones K, Flemming S, Davidson D, et al.: The candidate Wilms' tumor gene is involved in genitourinary

- development. Nature. 346: 194, 1990.
- 5) Keridberg JA, Sariola H, Loring JM, et al.: WT1 required for early kidney development. Cell. 74: 679, 1993.
- 6) Kikuchi H, Akasaka Y, Hata J, et al.: A critical mutation in both WT1 alleles is not sufficient to cause Wilms' tumor. FEBS Lett. 360: 16-28, 1995.
- 7) Schumacher V, et al.: Correlation of germline mutations and two-hit inactivation of the WT1 gene with Wilms tumors of stromal-predominant histology. Proc Natl Acad Sci U S A. 94: 3972-3977, 1997.
- 8) Miyagawa K, et al.: Loss of WT1 function leads to ectopic myogenesis in Wilms' tumour. Nat Genet. 18: 15-17, 1998.
- 9) Shibata R, Hata J.: Correlation between a specific Wilms' tumour suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms' tumour (WT). J Med Genet. 39: E83-85, 2002.
- 10) Huff V: Genotype/phenotype correlations in Wilms' tumor. Med Pediatr Oncol. 27: 408-414, 1996.
- 11) Drash A, Sherman F, Hartman WH, Blizzard RM.: A syndrome of pseudohermaphroditism, nephritis, Wilms' tumor, hypertension and degenerative renal disease J Pediat. 76: 585, 1970.
- 12) Pelletier J, Bruening W, Bardeesy N, Silberman BL, et al.: Germ line mutations in the Wilms' tumor suppressor genes are associated with abnormal urogenital development in Dyncs-Drash syndrome. Cell. 67: 437, 1991.
- 13) Moorhy AV, Chesney RW, Lubinsky M, et al.: Chronic renal failure and XY gonadal dysgenesis: "Frasier syndrome" - a commentary on reported cases. Am J Med Genet Suppl. 3: 297-302, 1987.
- 14) Kikuchi H, Takata A, Hata J.: Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? J Med Gnet. 35: 45-48, 1998.

4. 小児腫瘍

大喜多 肇*1 秦 順一*2

はじめに

小児腫瘍は頻度が少ないうえ、多彩な種類があるため一般病理医にとって、確定診断に困難を感じるものが少なくない。一方、最近小児腫瘍における分子遺伝学的な研究が進み、発症機序がかなり明確になってきた。同時に、これらの知見から腫瘍の確定診断や予後の推定を含む病態診断を客観的に行える指標が確立され、日常的に応用されている。本稿では、小児の固形腫瘍を中心に診断や治療方針の決定に有用な分子遺伝学的所見を取り上げる。

I. 神経芽腫群腫瘍

1. 病理学的特徴

神経芽腫群腫瘍は、神経堤に由来し交感神経節細胞に分化成熟する途上で腫瘍化したものである。典型的な胎児性腫瘍(発生母地が胎児性組織で乳幼児に好発する腫瘍を指す)の代表的な腫瘍である。病理学的に、大きく神経芽腫、神経節芽腫、神経節腫の3群に分類される。本腫瘍群には自然に分化・成熟し、退縮する予後の良好な腫瘍と同時に、進行性で予後不良な腫瘍が含まれている。したがって、予後良好な腫瘍と不良なそれを客観的指標で鑑別することは治療の選択にもきわめて重要である。そのために、予後を確定できる組織分類と分子遺伝学的解析が必須となる¹⁾。

神経芽腫群腫瘍の組織学的分類は、小児腫瘍組織分類図譜第3篇の分類が用いられてきた。一方、神経芽腫の治療法の改善や生物学的特性の解明を国際規模で行うことを目的に、本腫瘍の共通言語となる組織分類を策定する作業が開始され、その成果として1999年に、International Neuroblastoma Pathology Classi-

fication(以下、INPC分類)が発表された。本分類は、神経芽細胞の分化・成熟度とシュワン様細胞からなる間質の多寡により組織亜型を決定し、発症年齢および細胞増殖の指標としての mitosis karyorrhexis-index (MKI)を加味した予後判定基準として導入している。本分類は、Shimada分類に準じているが組織亜型の定義を明確にした点病理学的にも取り入れやすくなっている。すでに、米国、カナダ、オーストラリアで取り入れられており、近々ヨーロッパ諸国でも使用される。我が国においても、近々出版される小児腫瘍組織アトラス(旧小児腫瘍組織分類図譜)で詳細に紹介され、病理学的診断に用いられることになる。ここでは、INPC分類に加えて本腫瘍の病態の指標となる分子遺伝学的指標を取り上げる。

2. 分子遺伝学的所見

a. 染色体倍数(ploidy)

神経芽腫群腫瘍では、染色体倍数がその予後因子に重要であることが明らかになった。すなわち、2倍体や4倍体に近い腫瘍は、後述する MYCN の増幅や第1染色体短腕(1p)の欠失を伴い、1歳以上の症例に多く、予後も悪い。一方、3倍体に近い腫瘍は、1歳未満で、MYCN の増幅はみられない。これらは予後が良好であるとされている。染色体倍数は染色体の解析で明らかになるが、新鮮材料が必要なことに加え、間期核を得られないと解析できないため制約も多い。フローサイトメトリーによってDNA量を測定し、染色体倍数を推定することができるが、この方法はパラフィン包埋材料から行うことも可能で、ルーチン検査として実施可能な施設も多いと思われる。

b. MYCN の増幅

神経芽腫細胞を染色体分析すると、第2染色体の homogenously staining regions (HSR, G band法で薄く均一に染まる染色体領域)や double minute chromatin bodies (DMs, 多数の微小な染色体断片)が認められることが知られている。これらの領域には、高度に増幅した MYCN 遺伝子が存在する。本遺伝子は転写因子をコードする癌遺伝子で、第2染色体短腕(2p24)に存在する。症例の中には MYCN が数十

*1国立成育医療センター研究所発生・分化研究部

*2国立成育医療センター研究所

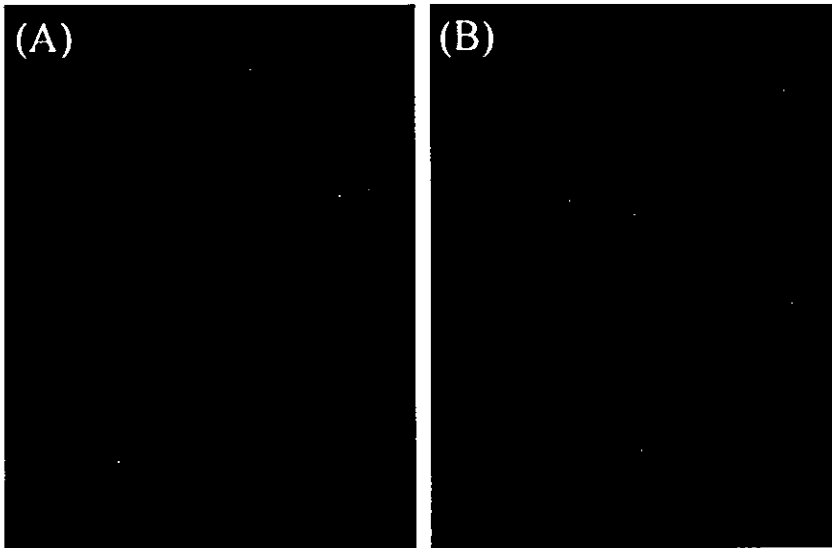


図1 FISH法によるMYCN増幅の解析
赤はMYCN遺伝子を、緑は、第2染色体
短腕テロメアプローブを示す。緑のシグナル
と赤のシグナルの比によって増幅の有無を判
定する。A: MYCN非増幅症例(腫瘍擦印)。
B: MYCN増幅神経芽腫細胞(国立成育医療
センター, 松岡健太郎博士による)。

から数百コピーまで増幅し、その結果、mRNAや蛋白も増加するものもある。MYCNが増幅する症例は、進行例に多い。したがってMYCN増幅は、予後不良因子である。遺伝子コピー数が10以上では、予後不良であるとされている。しかしながら、MYCNの増幅が神経芽腫の進展に直接的にどのように関連するか、今のところ不明である。MYCN蛋白過剰発現が細胞周期や細胞増殖を促進するという報告もある。

MYCNの増幅は、FISHあるいはサザンプロット法によって検出することができる。FISHによるMYCN増幅検出は正確な定量には欠ける面があるが、腫瘍成分(または細胞)ごとにまたは少量の腫瘍組織でも行うことが可能である点有用である。また、凍結標本だけではなく、touch smearあるいはパラフィン包埋標本も利用できることも有利である(図1)。一方、サザンプロット法では、凍結腫瘍組織が必要であるが、MYCNの増幅を定量することが可能である。

c. 1p36を中心とする第1染色体短腕の欠失

1pの欠失は、25~35%の神経芽腫にみられ、1歳以上の症例やMYCN増幅例に多い。このように、1p欠失は予後不良因子であることが示唆されているが、独立した予後因子かどうかは議論が多い。1pのなかで最も共通して欠損している領域は1p36であり、この領域に神経芽腫の進展に関わる癌抑制遺伝子が存在すると推測されている。また、第17染色体長腕の獲得は、予後不良例に多いと報告されているが、予後因子としての価値はさらに詳細な検討が必要である。

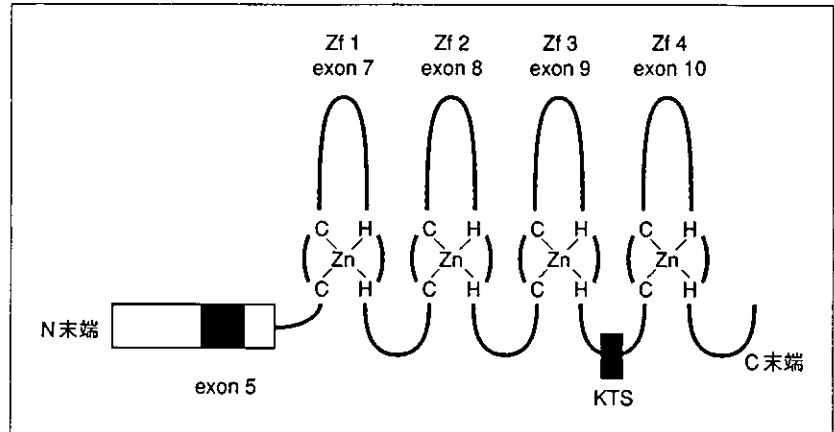
d. TrkAの発現

神経栄養因子の高親和性受容体であるTrkA遺伝子は、未熟な神経堤細胞から正常な交感神経節細胞への分化を促進すると考えられている。本腫瘍の予後因子に発症年齢との関連が重要であることは既述したが、年齢が1歳未満の腫瘍であれば、その時点で未分化な腫瘍でもTrkAが発現している腫瘍は分化、成熟が期待できる。一般に予後良好な神経芽腫では、高い発現を示すが、予後不良例では、発現が消失している。予後因子としての価値はMYCNや1p欠失よりも低い。

II. 小児腎腫瘍

小児腎腫瘍の中には古典的なウィルムス腫瘍の他、肉腫型腫瘍である腎明細胞肉腫 clear cell sarcoma of the kidney (CCSK)、腎ラブドイド腫瘍 malignant rhabdoid tumor (MRTK)、先天性間葉芽腎腫 congenital mesoblastic nephroma (CMN)等が含まれる。これらの腫瘍は組織像が類似している腫瘍が多いうえ、予後がまったく異なる腫瘍が含まれており、正確な鑑別診断がきわめて重要である。その診断確定に遺伝子解析が有用である。

図2 *WT1* 遺伝子の構造 *WT1* 遺伝子は、C末端側に4個の zinc finger 構造を有する転写因子である。エクソン5とエクソン9の3'側の9塩基の有無による splicing isoform が存在する。エクソン9の splicing isoform は、9塩基に由来する3アミノ酸(lysine, threonine, serine)の略をとって、それぞれ、+KTS, -KTSとよばれる。



1. ウィルムス腫瘍

a. 病理学的特徴

ウィルムス腫瘍は、典型的な胎児性腫瘍で小児期に発症する悪性腎腫瘍の中で最も頻度が高い。小児固形腫瘍の約8%を占め、1~3歳に好発する。本腫瘍は、腎の原基である後腎芽組織由来と考えられ、腫瘍組織は未熟な腎芽細胞と上皮系細胞成分、間葉系細胞成分が種々の割合で混在する。間葉系成分には、横紋筋、平滑筋、骨軟骨、脂肪等が含まれる。中でも、特に横紋筋の豊富な腫瘍は、胎児性横紋筋腫型腎芽腫 fetal rhabdomyomatous nephroblastoma (以下FRN)とよばれている。

b. 分子遺伝学的所見

1) ウィルムス腫瘍と *WT1* 遺伝子

ウィルムス腫瘍で特筆すべきことは、単発の奇形または奇形症候群を伴うことである。また、しばしば家族内発症も多く報告されている。このような所見から、その腫瘍発生に遺伝的要因が強く関連していることが想定されてきた²⁾。腎芽腫を伴う奇形として11p13領域の欠失を伴う無虹彩症、尿道下裂がある。また、奇形症候群としてWAGR症候群〔ウィルムス腫瘍, aniridia(無虹彩症), genitourinary malformation(泌尿生殖器奇形), mental retardation(精神発達遅滞) syndrome], Denys-Drash症候群(以下、Drash症候群), Beckwith-Wiedemann症候群が知られている。無虹彩症やWAGR症候群では、11p13領域が欠失している。この領域から癌抑制遺伝子である *WT1* 遺伝子が単離された。本遺伝子は、10のエクソンからなり、mRNAは約3.5 kbである。エクソン5とエクソン9の2ヵ所の alternative splicing があり、エクソン9の splicing isoform として3個のア

ミノ酸 lysine, threonine, serine(KTS)を含む isoform(+KTS)と含まない isoform(-KTS)ができる(図2)。*WT1* 産物は、C末端側に(Cys)₂-(His)₂ zinc finger 構造を有し、転写因子と考えられる。*WT1* は、EGR-1, IGF-2, PDGF, Pax-2等の発現を調節し、泌尿生殖器系の分化、成熟を制御すると考えられる。

奇形を伴わない散発性ウィルムス腫瘍では、*WT1* 変異の頻度は15%程度であるが、変異は広範囲の欠失から点突然変異までさまざま、その範囲はすべてのエクソンに及んでいる。間葉系成分が優位な組織型を示す腫瘍や両側性の腫瘍は *WT1* 変異を示すものが多い。我々の検討では、*WT1* のエクソン9の1168番目のCがTとなり、その結果390番目のアルギニンが stop codon になる変異を有する腫瘍は、いずれもFRNあるいは横紋筋成分の多い腎芽腫であり、特定の変異と横紋筋成分が多いという組織学的特徴に相関が認められた³⁾。この変異によって生じる蛋白は、最後の zinc finger が欠損しており、標的遺伝子に結合できなくなると考えられる。この変異が腫瘍だけでなく生殖系列においても認められた症例では、尿道下裂、停留精巣等の泌尿生殖器の小奇形を伴っており *WT1* の機能喪失により泌尿生殖器奇形が発症することが示唆される。

2) Denys-Drash 症候群と Frasier 症候群

Drash 症候群は、1970年にDrashらによって提唱されたウィルムス腫瘍、乳児期に発症する進行性の diffuse mesangial sclerosis による腎不全、性分化異常からなる症候群である。*WT1* のクローニングにより本症候群が *WT1* エクソン7~10の zinc finger 領域の点突然変異による遺伝子病であることが明らかに

なった。一方、Frasier 症候群は、Drash 症候群と類似しているが独立しウィルムス腫瘍は合併しない。我々は、本症候群が *WT1* イントロン 9 の特定の部位に点突然変異が存在することによりエクソン 9 の splicing が異常となり、+KTS 産物が生じないことにより惹起されることを明らかにした⁴⁾。すなわち、正常アレルからは、+KTS/-KTS 産物が正常に産生されるのに対して、変異アレルからは-KTS 産物しか生じず、+KTS と-KTS の産物の量の不均衡が生じることになる。このように Frasier 症候群は splicing isoform の不均衡によって生じる疾患であることが明らかとなった。なお、-KTS 産物は、主に転写因子として作用し、+KTS 産物は、post transcriptional regulation をつかさどると考えられている。すなわち、Drash 症候群は Frasier 症候群に近似した症状を呈するが、遺伝子レベルでは異なった異常によって生じることが明らかとなった (phenotype-genotype correlation)。両症候群ともまれな疾患であるが、*WT1* の変異を明らかにすることによって、腎障害の予後やウィルムス腫瘍発生を予知できる。ウィルムス腫瘍やこれらの奇形症候群の解析により、*WT1* が腫瘍発生とともに正常の器官形成にも深く関連していることが明らかになりつつある。

3) ウィルムス腫瘍と 11p15 領域

散発性ウィルムス腫瘍では、*WT1* 変異が必ずしも腎芽腫発生の十分条件でないことから、他の要因による腫瘍発生が想定されてきた。一部のウィルムス腫瘍では、第 11 染色体の欠失が 11p15 に限局していることから、11p15 領域が責任遺伝子の第 2 の候補となった。同領域には、*H19* や *IGF2* をはじめとし、インプリンティングによって片親由来のアレルのみが発現する遺伝子群が存在する。確かにウィルムス腫瘍で *IGF2* のインプリンティングの喪失により両アレル性に *IGF2* が発現している (loss of imprinting: LOI) 例や、*WT1* 変異と *IGF2* の LOI 双方を伴っている例もある。ウィルムス腫瘍の発症機序を明らかにするためには、*WT1* 異常とともに 11p15 領域の異常を系統的に検討する必要がある。

2. 先天性間葉芽腎腫および肉腫型腎芽腫

先天性間葉芽腎腫 (CMN) は、新生児・乳児期に好発する腎腫瘍である。手術による完全摘出のみによって根治が期待される予後良好な腫瘍である。本腫瘍は、その病理形態学的特徴から線維腫型、富細胞型、混合型に分類される。線維腫型では、紡錘形細胞が束

状に増殖し、腎実質内に浸潤性に増殖する。一方、富細胞型では、卵円形の核を有する腫瘍細胞が密に増殖し、核分裂像が目立つ。混合型は、線維腫型の形態の部と富細胞型の形態の部が混在する。

富細胞型では、染色体転座 t(12;15) (p13;q25) に由来する *ETV6-NTRK3* キメラ遺伝子が同定された。このキメラ遺伝子は、乳児線維肉腫に認められる遺伝子と同一である。このような事実から CMN、富細胞型と乳児線維肉腫は同一の entity の腫瘍と考えられるようになってきた⁶⁾。この染色体転座によって ets family に属する転写因子である *ETV6* の 5' 側と *NTRK3* の 3' 側が融合する。このキメラ遺伝子は凍結組織を用いた RT-PCR 法によって検出可能である。CMN と組織学的に鑑別の難しい腫瘍として腎明細胞肉腫があげられる。CMN に比較して予後が悪い。したがって、CMN の診断がキメラ遺伝子の同定で確定できれば有用である。また、腎ラブドイド腫瘍には *hSNF5/INI1* 遺伝子の変異が 70% 程度に認められる⁶⁾。本腫瘍はきわめて予後不良で、治療方針が異なるためウィルムス腫瘍との鑑別が重要である。鑑別診断には組織学的所見が重要であるが、以上述べた遺伝子解析を加えることによって確定診断を行うことが重要である。

III. 小児に好発する骨軟部腫瘍

一部の軟部肉腫は、腫瘍に特異的な染色体転座を有することが知られている (表 1)。これらの染色体転座では、ある遺伝子が切断され他の遺伝子と融合することによりキメラ遺伝子 (融合遺伝子) が形成されるが、この数年で各々の染色体転座に由来するキメラ遺伝子が、続々と同定されている。これらのキメラ遺伝子は、腫瘍の発生機序に深く関連しているのみならず、凍結組織を用いた RT-PCR 法による発現同定が、確定診断に非常に有用であることが示されている。その利点として、方法論 (手法) が確立していること (ただし、ホルマリン固定パラフィンブロックからの RT-PCR 法は、その感度と特異性についてさらなる検証が必要である)、迅速に行えること、少量の検体で可能であること等があげられる。ただし、この検出にあたっては腫瘍組織を確実に検索しているか、RT-PCR 法に際してコンタミネーションがないかを厳重に確かめる必要がある。特に前者では検体を直接病理

表1 小児に好発する腫瘍において検出される染色体転座とキメラ遺伝子

腫瘍	転座の核型	キメラ遺伝子
Ewing/PNET 腫瘍群	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLI1</i>
	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>
	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETV1</i>
	t(17;22)(q12;q12)	<i>EWS-EIAP</i>
	t(2;22)(q33;q12)	<i>EWS-FEV</i>
線維形成小細胞腫瘍	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WTI</i>
	t(2;13)(q35;q14)	<i>PAX3-FKHR</i>
胞巣型横紋筋肉腫	t(1;13)(p36;q12)	<i>PAX7-FKHR</i>
	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX1</i>
滑膜肉腫	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX2</i>
	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
乳児線維肉腫	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>
先天性間葉芽腎腫	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>
巨細胞性線維芽細胞腫	t(17;22)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>
隆起性皮膚線維肉腫	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-ATF1</i>
明細胞肉腫	t(X;17)(p11;q25)	<i>ASPL-TFE3</i>
胞巣状軟部肉腫		

医が確認して腫瘍であることを確かめることが必須である。いずれにせよ、腫瘍の確定診断には、組織学的診断とこのようなキメラ遺伝子の同定とが相補的に行われることによって、有用性が高くなる。小児期に好発する骨軟部腫瘍のうち、特にEwing/PNET腫瘍群を中心に、分子生物学的解析が診断上、有用と考えられる腫瘍を取り上げる。

1. Ewing/PNET腫瘍

Ewing肉腫、末梢性未分化神経上皮腫 peripheral primitive neuroectodermal tumor(以下PNET)は、いずれも、小児ないし若年成人の骨軟部組織に発生する悪性腫瘍である。病理組織学的には、Ewing肉腫では、小型類円形の核と明るい胞体を有する腫瘍細胞が、一定の配列を示さず増殖する。一方、PNETでは、Ewing肉腫同様の腫瘍細胞がびまん性に増殖し、しばしばHomer Wright型のロゼットが認められるなど神経形質が認められるのが特徴である。歴史的には、異なる腫瘍として報告されてきたEwing肉腫とPNETは、共通した染色体転座t(11;22)(q24;q12)が存在すること、未分化なEwing肉腫細胞でも神経形質を有するよう分化すること等の結果から、現在では、Ewing/PNET腫瘍(Ewing sarcoma family of tumor: ESFT)とも称せられるようになった⁷⁾。

Ewing/PNET腫瘍に存在するt(11;22)(q24;q12)では、第22染色体に由来する*EWS*遺伝子の5'側と

第11染色体上の*FLI1*遺伝子の3'側が融合して*EWS-FLI1*キメラ遺伝子が形成される(図3)。その産物は*EWS*のN末端側と*FLI1*のC末端側からなる新たな蛋白質である。本腫瘍群では、*EWS-FLI1*に加え4種類の染色体転座と、それに由来するキメラ遺伝子が同定されている(表1)。いずれも3'側は転写因子である*ets* familyに属する遺伝子から構成されることが特徴であり、*EWS-ets*キメラ遺伝子ともよばれている。*EWS*は、本腫瘍の転座点より単離された遺伝子で、その産物はRNA結合蛋白と考えられているが、その機能はいまだに詳細になっていない。一方、*FLI1*は、85アミノ酸からなる*ets* domainとよばれるDNA結合領域を有しており、GGA(A/T)を中心配列とする約10bpの塩基配列を認識、結合し、転写活性化を行う。主として細胞の増殖に関与する転写因子と考えられている。*EWS-ets*キメラ遺伝子は、*EWS*のN末端領域と*ets* familyの転写因子のDNA結合ドメインから構成されるので、その産物が特定の遺伝子の発現を調節することによって腫瘍化に強く関連していると想定されている。*EWS-ets*キメラ蛋白が、転写活性化作用やtransform活性を有することが知られており、かつ、*c-myc*や*Id2*等がその標的遺伝子として報告されているものの、いまだにキメラ遺伝子による腫瘍化のメカニズムは解明されていない。

Ewing/PNET腫瘍は、特徴的な形質に乏しく、組織学的にも確定診断が困難である。そこで、RT-

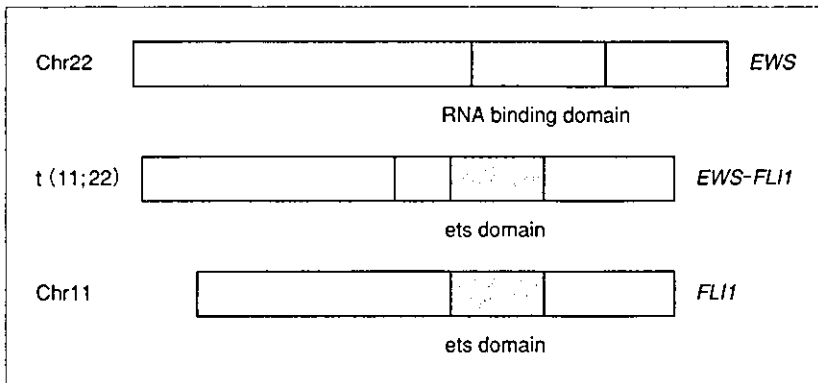


図3 EWS-FLI1キメラ遺伝子の模式図
EWS遺伝子の5'側とFLI1遺伝子のets domainを含む3'側が融合している。

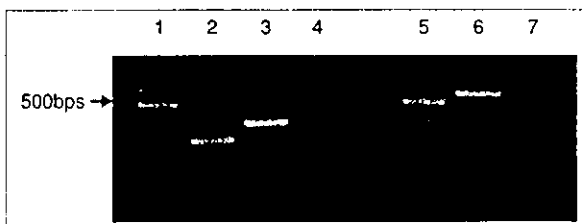


図4 RT-PCR法によるキメラ遺伝子の検出 lane 1~4: Ewing/PNET腫瘍と診断された腫瘍(lane 2)からEWS-FLI1キメラ遺伝子を同定した。シーケンスによりEWSのエクソン7とFLI1のエクソン6の組み合わせを確認した。Ewing肉腫細胞であるNCR-EW2細胞(lane 3)では、EWSのエクソン7とFLI1のエクソン5が融合している。lane 5~7: 線維形成小細胞腫瘍と診断された腫瘍(lane 6)からEWS-WTIキメラ遺伝子を同定した。神経芽腫細胞であるNCR-NB3細胞(lane 4, 7)では、EWS-FLI1, EWS-WTIキメラ遺伝子の発現を認めない。

PCR法によるキメラ遺伝子の同定が病理診断に客観的な根拠を与えるものとして期待されている(図4)。我々の経験では、病理形態像、免疫染色結果等からEwing/PNET腫瘍が強く疑われた腫瘍の約90%でEWS-etsキメラ遺伝子が同定された。キメラ遺伝子が検出された57例の内訳は、EWS-FLI1が46例、EWS-ERGが9例、EWS-ETV1が1例、EWS-EIAFが1例であった(表2)。EWS-FLI1, EWS-ERGでは、転座によるEWSとFLI1あるいはERGの切断点は腫瘍ごとに異なっている。キメラ遺伝子の融合点の塩基配列を解析した結果、キメラ遺伝子のmRNAは表2のようなエクソンの組み合わせからなっていた。EWSのエクソン7とFLI1のエクソン6が融合した組み合わせが最も頻度が高く約半数を占め、EWSのエクソン7とFLI1のエクソン5の組み合わせがそれに続いていた。これらのEWS関連キメラ遺伝子の検出率とその内訳は、欧米のそれとは差はないようである。

表2 我々が検出したEWS-etsキメラ遺伝子

EWS-FLI1	46
EWS exon 7-FLI1 exon 6	27
EWS exon 7-FLI1 exon 5	12
EWS exon 10-FLI1 exon 8	2
EWS exon 10-FLI1 exon 5	2
EWS exon 7-FLI1 exon 8	1
EWS exon 7-FLI1 exon 4	1
EWS exon 10-FLI1 exon 6	1
EWS-ERG	9
EWS exon 7-ERG exon 7	6
EWS exon 7-ERG exon 9	3
EWS-ETV1	1
EWS-EIAF	1
計	57

2. 線維形成小細胞腫瘍

線維形成小細胞腫瘍は、小児および若年成人の腹腔に好発する悪性腫瘍である。病理組織学的には小円形の腫瘍細胞よりなり、間質の線維形成を伴うのが特徴である。まれな腫瘍であるが、Ewing/PNET腫瘍、横紋筋肉腫等との鑑別が問題となることがある。本腫瘍には、特徴的な染色体転座t(11;22)(p13;q12)が存在し、それに由来するEWS-WTIキメラ遺伝子の発現が報告された。このキメラ遺伝子をRT-PCR法によって同定することが確定診断に有用である(図4)。

3. 横紋筋肉腫

横紋筋肉腫は、小児期に発生頻度の高い軟部肉腫の

一つである。胎児型、胞巣型、多形型に亜分類される。胞巣型横紋筋肉腫では、特徴的な染色体転座 $t(2;13)(q35;q14)$, $t(1;13)(p36;q12)$ が認められ、それに由来する *PAX3-FKHR*, *PAX7-FKHR* キメラ遺伝子が形成される。これらのキメラ遺伝子では、転写因子である *PAX3* 遺伝子あるいは *PAX7* 遺伝子の 5' 側と *FKHR* 遺伝子の 3' 側の forkhead domain を含む領域が融合する。胞巣型横紋筋肉腫では、RT-PCR 法によって約 80% の症例でキメラ遺伝子を同定することができることとされており、他の小円形細胞腫瘍との鑑別が難しい本腫瘍の確定診断に応用することが可能である。同時に、胞巣型は胎児型に比し予後が不良であり、亜分類の決定は治療方針に強く影響する。さらに最近、*PAX7-FKHR* を発現する腫瘍は、*PAX3-FKHR* を発現する腫瘍と比較して予後が比較的良好であるという報告もある⁹⁾。一方、胎児型横紋筋肉腫では、第 8 染色体の trisomy, 11p15.5 の LOH 等が観察される。

4. 滑膜肉腫

滑膜肉腫は、若年成人の四肢に好発する肉腫である。病理組織学的には、裂隙ないし管腔を形成する上皮様細胞成分と線維肉腫様の紡錘形細胞成分が混在し、二相性を呈することが特徴であるが、上皮様構造のほとんどみられない単相型もある。本腫瘍には、 $t(X;18)(p11;q11)$ が存在し、その結果 *SYT-SSX1*, *SYT-SSX2* キメラ遺伝子が生じる。*SYT-SSX1* を有する腫瘍は、二相型に多く、*SYT-SSX2* と比較して予後不良と報告されている⁹⁾。臨床像、病理組織像とキメラ遺伝子のタイプが相関していると考えられている。

5. その他

上述した腫瘍の他にも、染色体転座とそれに由来するキメラ遺伝子が報告されている。乳児線維肉腫は、前述したように $t(12;15)(p13;q25)$ と *ETV6-NTRK3* キメラ遺伝子が存在することから CMN と近縁の腫瘍と考えられつつある。一方、成人型の線維肉腫では、キメラ遺伝子は認めない。また、巨細胞性線維芽細胞腫は、隆起性皮膚線維肉腫と共通の遺伝学的異常として $t(17;22)(q22;q13)$ および余剰環状染色体、キメラ遺伝子 *COL1A1-PDGFB* が報告されており、隆起性皮膚線維肉腫の早期病変あるいは小児型と考えられている。明細胞肉腫や胞巣状軟部肉腫においても染色体転座とキメラ遺伝子が報告されている。また、炎症性筋線維芽細胞腫瘍においては、一部の症例で、

2p23 上の *ALK* の再構成が存在することが報告されはじめている。

おわりに

小児固型腫瘍の中で分子遺伝学的所見が、病理診断に応用されつつある疾患を中心に取り上げた。小児腫瘍の分子遺伝学的知見は近年蓄積されつつあり、それを用いた病態診断(病理診断および治療法の決定)は日常の臨床検査のレベルに達しているものが少なくなく、成人の腫瘍に比し有用性が高い。小児腫瘍では形質に乏しい難治性腫瘍が多く、今後さらにこれらの腫瘍の分子遺伝学的特性を明らかにし、その知見を臨床応用することが必要である。

文 献

- 1) Brodeur, G. M. : Neuroblastoma : biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003, 3(3) : 203-216
- 2) Hata, J. : Wilms' tumor and the WT1 gene. *Contrib Nephrol* 1999, 128 : 62-74
- 3) Shibata, R., Hashiguchi, A., Sakamoto, J. et al. : Correlation between a specific Wilms tumour suppressor gene (WT1) mutation and the histological findings in Wilms tumour (WT). *J Med Genet*. 2002, 39(12) : e83
- 4) Kikuchi, H., Takata, A., Akasaka, Y. et al. : Do intronic mutations affecting splicing of WT1 exon 9 cause Frasier syndrome? *J Med Genet* 1998, 35(1) : 45-48
- 5) Rubin, B. P., Chen, C. J., Morgan, T. W. et al. : Congenital mesoblastic nephroma $t(12;15)$ is associated with *ETV6-NTRK3* gene fusion : cytogenetic and molecular relationship to congenital (infantile) fibrosarcoma. *Am J Pathol* 1998, 153(5) : 1451-1458
- 6) Sevenet, N., Lellouch-Tubiana, A., Schofield, D. et al. : Spectrum of hSNF/IN1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Human Mol Genet* 1999, 8(13) : 2359-2368
- 7) de Alava, E., Gerald, W. L. : Molecular biology of the Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol* 2000, 18(1) : 204-213
- 8) Sorensen, P. H., Lynch, J. C., Qualman, S. J. et al. : *PAX3-FKHR* and *PAX7-FKHR* gene fusions are prognostic indicators in alveolar rhabdomyosarcoma : a report from the children's oncology group. *J Clin Oncol* 2002, 20(11) : 2672-2679
- 9) Ladanyi, M., Antonescu, C. R., Leung, D. H. et al. : Impact of *SYT-SSX* fusion type on the clinical behavior of synovial sarcoma : a multi-institutional retrospective study of 243 patients. *Cancer Res* 2002, 62(1) : 135-140

第19回日本小児がん学会

教育講座

神経芽腫新国際分類 INPCについて

—従来の分類との関連を含めて—

秦 順一

はじめに

近年、神経芽腫の病期の統一、治療法の改善、生物学的特異性の解明を多面的な領域を、国際レベルで行う International Neuroblastoma Risk Group(INRG)が結成された。その中で本腫瘍の国際病理組織分類の策定を目的とする International Neuroblastoma Pathology Committeeが6名のメンバーで組織された。筆者もそのメンバーの一人として加わってきた。4年ほどの討議の後1999年に International Neuroblastoma Pathology Classification (INPC)が発表されるに至った。本組織分類は神経芽腫の亜型を病理学的に明確に定義し、分類の再現性(reproducibility)、予後を含む本腫瘍の生物学的特異性(biological relevance)、分類が容易であることを目指している(user friendly)。神経芽腫の腫瘍細胞は年齢とともに分化・成熟を果たすという事実が知られており、本分類では Shimada 分類に準じて発症年齢と組織型との対応によって予後判定基準(age-linked histological classification and prognosis system)を取り入れた。この分類はすでに米国、カナダ、オーストラリアで使用が開始され、EU諸国でもその導入が考慮されている。わが国においても、腫瘍の病態、生物学的特性の解明ならびに治療法の開発を進める点からも、国際的な共通言語(組織分類)を取り入れる必然性が共通認識となりつ

つある。本年3月に改訂、出版された日本病理学会小児腫瘍アトラス「神経芽腫群腫瘍」では全面的にこの分類を取り入れている。本稿では INPC を紹介するとともに従来の分類との相違点を述べる。

1. NPC 分類とその方針について

分類の概要は以下に記載した。国際分類であり、和訳による誤解を避けるためオリジナルの診断名で統一した。

- 1) Neuroblastoma/subgroup
 - a) undifferentiated
 - b) poorly differentiated
 - c) differentiating
- 2) Ganglioneuroblastoma, intermixed
- 3) Ganglioneuroma/subgroup
 - a) maturing
 - b) mature
- 4) Ganglioneuroblastoma, nodular

A) INP 組織学的分類の方針

神経芽腫の組織像は、基本的には腫瘍細胞である神経冠由来の神経芽腫細胞(腫瘍性、以下同様)と反応性に増生すると考えられるシュワン様細胞から成る間質によって構成される。このような観点から本組織学的分類は、1) シュワン様細胞の量、腫瘍細胞である神経芽細胞の増殖巣との関連、2) 増殖している神経芽細胞の分化・成熟度、3) 腫

瘍細胞の増殖性の目安となる Mitosis-Karyorrhexis-Index(MKI)を取り入れる, 4) 神経芽腫の腫瘍細胞の分化・成熟度は年齢と極めて高い相関があるので, 発生年齢と組織像によって腫瘍の予後を推定する. すなわち, この分類では単なる組織像の記載にとどまらず, 予後の推定をも行うことを特徴としている (表 1, 2) ¹⁻⁴⁾.

B) INP の説明

1. Neuroblastoma(NB, Schwannian stroma-poor tumor)

神経芽細胞の増殖が主体で間質であるシュワン細胞は認められないか, わずかに腫瘍細胞増殖巣を取り囲むように存在する血管結合組織周囲にみられる. 以下の亜群が存在する.

a) Undifferentiated sub type

小型ないし中型の未熟な神経芽細胞からなり, 胞体に乏しい, 腫瘍細胞間に顕明上明らかな神経細線維 (neuropil) がみられない. この亜型に診断されると年齢に関連なく予後不良群にはいるので, 診断は慎重にする必要がある.

b) Poorly differentiated sub type

神経細線維が増殖する腫瘍細胞間に明らかに介在する腫瘍をいう. 腫瘍細胞は小型, 裸核状である. 時には好酸性の胞体と核小体が明瞭な交感神経節細胞への分化を窺わせる細胞が混じるが, これらの細胞は腫瘍組織全体として 5% 以下に止まる. なお, 交感神経節細胞への分化傾向を示す細胞の形態学的基準として, ①細胞の腫大 (核面積の 2 倍以上), ②胞体の好酸性の増加, ③核が腫大すると同時に核小体が明瞭化する, と定められている.

c) Differentiating neuroblastoma sub type

腫瘍細胞の多くは, なお未熟な神経芽細胞であるが前述した交感神経節細胞へ分化傾向を示す細胞が腫瘍全体で 5% を超える腫瘍をいう.

d) Mitosis karyorrhexis-Index(MKI)

Neuroblastoma では腫瘍細胞の増殖性を示し, 予後とも密接に関連する組織学的所見として MKI の程度を必ず付記する. MKI はその出現頻度に従って高度 (high, > 4%: 200 個 / 5000 細胞), 中等度 (intermediate, 2-4%: 100-200 個 / 5000 細胞), 軽度 (low, < 2%: 100 個 / 5000 細胞) に分類される. 神経芽腫の組織学的予後判定に重要な指標となるので, 正確なカウントが必要である.

2. Ganglioneuroblastoma(GNB), intermixed type

成熟したシュワン様細胞が腫瘍組織の 50% 以

表 1 INPC の基本的考え方

1. 全ての神経芽腫群腫瘍に適用できる
2. 組織分類の定義を明確にする組織分類の基準
<ul style="list-style-type: none"> ・神経芽細胞の分化度 ・間質であるシュワン細胞の発達 ・Mitosis-Karyorrhexis-Index (←細胞増殖の指標)
3. 予後との相関 (予後を推定しうる) を重視する組織分類とする
Age-linked Morphologic Classification ←Shimada system

表 3 日本病理学会分類との相違

1. 腫瘍の間質であるシュワン細胞の量を考慮している (vs 神経芽細胞の分化度を重視)
2. MKI を採用←腫瘍細胞の増殖指標
3. 発生年齢を加味した組織分類 予後を推定し得る組織分類

表 2 INPC 腫瘍亜分類とシュワン細胞の発達との関連

<u>Neuroblastoma(NB)</u>	
Undifferentiated(UD)	➡ 50%未満
Poorly differentiated(PD)	
Differentiating(D)	
<u>Ganglioneuroblastoma(GNB)</u>	
Intermixed	50%以上
<u>Ganglioneuroma(GN)</u>	
Maturing GN	➡ シュワン細胞が主体
Mature GN	
<u>Ganglioneuroblastoma(GNB)</u>	
Nodular	Composite Stroma poor/rich

上を占め、その中に神経節細胞様の大型な腫瘍細胞や小型で未熟な神経芽細胞の増殖巣がする。

3. Ganglioneuroma (GN, Schwannian stroma-rich)

シュワン様細胞からなる間質が腫瘍の大部分を占めるもので、その他の構成細胞は分化したまたは分化途上にある交感神経節様細胞である。分化した神経節様細胞には外套細胞を伴う。以下の亜群が存在する。

a) Ganglioneuroma, maturing sub type

腫瘍のほとんどが神経節腫様組織から成るが、一部に神経細線維を伴った神経芽細胞が散在している腫瘍をいう。

b) Ganglioneuroma, mature sub type

成熟したシュワン様細胞から成る間質が腫瘍組織の殆どを占め、神経突起を伴った成熟した神経節細胞が散在性に存在する。未熟な神経芽細胞は認められない。

4. Ganglioneuroblastoma, nodular type (GNB, nodular)

肉眼的に神経節腫様組織から成る腫瘍で、その中に出血を伴う未熟神経芽細胞の増殖巣が結節状にみとめられる腫瘍をいう。すなわち、前者は後者とは明らかに異なるクローンから成ると考えられる。組織学的には未熟神経芽細胞の

増殖巣（結節）と成熟した神経節腫様組織との間には明瞭な境界が存在する。また、予後の判定のため未熟神経芽細胞から成る胞巣の所見は neuroblastoma のそれに準じて評価する。

C) INPCによる組織分類の手順

- i) 大項目としてまず NB, GNB, GNに分類する。
- ii) それぞれの腫瘍の亜型(subtype)を決定する
- iii) NBについては腫瘍細胞の分化度とともにMKIの程度を決定する。
- iv) NBでは組織像が一様でなく、しばしば組織型が混在する 경우가少なくない。その際には優勢度で診断するのが原則であるが、判断が困難な場合はその成分を所見として記載する。
- v) 転移先から採取された腫瘍の組織分類

INPCでは未治療で原発巣の摘出腫瘍に対して腫瘍分類を付すことを原則としている。しかしながら神経芽腫の場合、腫瘍が進展し原発腫瘍が採取不可能で、転移巣を生検する 경우가少なくない。この場合、転移腫瘍であっても未治療の腫瘍であれば十分に予後を推定できる情報が得られるので、原発巣に準じた組織分類をすることができる。

D) 発生年齢と組織分類から判断（推定）される神経芽腫の予後

表4 INPC/従来分類との比較

INPC/Category and Subtype	日本病理学会 小児腫瘍分類委員会	Shimada Classification
Neuroblastoma(NB) undifferentiated	神経芽腫 円形細胞+花冠細線維形成型	NB(Stroma-poor) undifferentiated
poorly differentiated	花冠細線維形成型	
differentiating	花冠+神経節芽腫・低分化型	differentiating
Ganglioneuroblastoma intermixed/Ganglioneuroma	神経節芽腫/神経節腫 (GN)	GNB/GN (Stroma-rich)
GNB intermixed	神経節芽腫 分化型	GNB intermixed
GN maturing	神経節芽腫分化型+神経節腫	GNB, well differentiated
mature	神経節腫	GN
Ganglioneuroblastoma, nodular	神経節芽腫・混成型	GNB, nodular

(Prognostic risk grouping)

米国 Children's Cancer Group (CCG) study で取り扱われた手術後5年経過し、その間の予後が判明している腫瘍 (CCG-3881, low and intermediate risk group および CCG-3891, high risk group) 500 例について、INPC による組織分類、発生年齢と disease free survival (DFS) の解析によって年齢を加味した組織型と予後との関連が以下のように決定された。

(1) 神経芽腫について

- i) high MKI を示す腫瘍は、腫瘍細胞の分化度、年齢に拘わらず常に予後不良グループである。
- ii) Undifferentiated NB は年齢に関係なく予後不良グループである。
- iii) 1.5 歳以上の NB, poorly differentiated は予後不良グループである。
- iv) 1.5 歳以上で発生した中等度 MKI を示す NB は予後不良グループである。
- v) 上記以外の腫瘍は予後良好群である。

(2) GNB・nodular について

発生年齢と結節を形成する神経芽腫成分の分化度および MKI の程度によって予後が決定される。すなわち神経芽腫成分が上記 (i) から (iv) までに相当する際は予後不良であるが、それ以外は予後良好群である。

(3) GNB・intermixed type, GN は年齢にかかわらず予後良好群である。

2. INPC と従来の分類との関連について

日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会⁶⁾の神経芽腫分類との比較は表3に、さらに同分類と Shimada 分類⁷⁾との対応は表4に示した

おわりに

INPC の概要について概説した。本分類は、従来の分類とほぼ対応しており、理解されやすい。先に記したようにすでに多くの国々でこの組織分類に基づいて神経芽腫が分類されており、標準的な分類法として確立されつつある。わが国でもこのほど改訂された日本病理学会小児腫瘍分類委員会による小児腫瘍組織分類アトラス「神経芽腫群

腫瘍」(2004年3月金原出版刊行)⁵⁾でも INPC の分類を全面的に取り入れて詳細に解説した。従ってわが国においても本腫瘍の標準的な病理診断は今後 INPC に準じて行われることになる。なお、INPC の詳細はこのアトラスを参照して頂きたい。本分類が病理医をはじめわが国の小児腫瘍を携わる方々全てに広く理解され、活用されることを強く望むものである。

文 献

- 1) Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B: Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors. Recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86:349-363,1999
- 2) Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, et al: The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86:364-372,1999
- 3) Peuchmaur M, d'Amore ESG, Joshi VV, Jata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H: Revision of the International Neuroblastoma Classification: Confirmation of favorable and unfavorable prognostic subset in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 98:2274-2281 2003 (in press).
- 4) Ambros IM, Hata J, Joshi VV, Roald B, Dehner LP, Tuchler H, Potschger U, Shimada H: Morphologic features of neuroblastoma (Schwannian stroma-poor tumors) in clinically favorable and unfavorable groups. *Cancer* 94:1574-1583,2002
- 5) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会:小児腫瘍組織カラーアトラス第2巻 神経芽腫群腫瘍-国際分類 INPC による-, 金原出版, 東京, 2004
- 6) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会:新訂版小児腫瘍分類図譜 第3篇, 神経芽腫群腫瘍および類縁腫瘍, 金原出版, 東京, 1992
- 7) Shimada, H, Chatten, J, Newton, WA, Sachs, N, Hamoudi, AB, Chiba, T, Marsden, HB, Misusgi, K: Histopathologic prognostic factor in neuroblastic tumors: Definition of subtypes of ganglioneuroblastoma and an age-linked classification of neuroblastomas *JNCI* 73:405-416,1984

1. 骨軟部腫瘍

黒田雅彦* 及川恒輔* 吉田恵一* 向井 清*

はじめに

近年の細胞生物学や分子生物学的技法の進歩により、多くの疾患の分子基盤が明らかにされつつある。肉腫を含む骨軟部腫瘍についても例外ではなく、症例の集積とともに詳細な解析が進んでいる。特に軟部肉腫には、上皮性腫瘍にはみられない種々の染色体異常が知られていたが、この10年間でほぼすべての特異的染色体転座による遺伝子異常、すなわちキメラ遺伝子の同定が行われた。この結果、いくつかの骨軟部腫瘍の分類がよりわかりやすく、また論理的に整理された。*EWS-Fli-1* キメラ遺伝子の発見は、従来その関連が問題となっていた Ewing 肉腫と peripheral neuroectodermal tumor (PNET) が、同一のタイプの腫瘍であることを明らかにした。また、*EWS-ATF1* キメラ遺伝子の発見は、軟部の悪性黒色腫と考えられていた明細胞肉腫が、皮膚の悪性黒色腫とはまったく関係のないことを明白にした。これらの知見は、当然のことながら病理診断にも大きな変化をもたらした¹⁾。

腫瘍発生の機構を考えた場合、このような特異的キメラ遺伝子がどのように実際の腫瘍化に関与しているのかは非常に難しい問題で、いまだに不明な点が多い。しかしながら、この個々の腫瘍特異的な遺伝子異常を病理診断の補助として応用することが、現実によくの施設で行われつつある。また、組織学的に判定が難しい症例で、キメラ遺伝子の検出により確定診断に至ったという報告も多くなされている。本稿では、特に骨軟部腫瘍に的を絞って、実際に実用化されつつある遺伝子診断方法を解説し、さらに今後の遺伝子診断の発展の可能性、研究の方向性について述べたい。

I. 軟部腫瘍の遺伝子異常

多くの上皮性腫瘍においては、癌遺伝子群や癌抑制遺伝子群のうちの複数の遺伝子に変異が存在することが明らかになっているが、軟部腫瘍ではこれらの遺伝子群の変異はきわめて少ない。その一方で、上皮性腫瘍にはみられない種々のクローナルな染色体異常、特に染色体の相互あるいは均衡型の転座が、多くの軟部腫瘍に認められる。近年の分子レベルでの解析により、これら転座型の染色体変異によって形成されたキメラ遺伝子の存在が明らかにされてきた(表1)。興味深い点は、個々の転座に関与する遺伝子は異なるが、その構成には共通する特徴が認められることである。まず、それらのキメラ遺伝子の多くは、RNA 結合能をもつ蛋白と、転写因子あるいは DNA 結合因子の特徴をもつ蛋白とをそれぞれコードする2つの遺伝子が融合して、新たな転写因子をコードしている¹⁾。もう一つの特徴として、病理学的に同一の腫瘍であっても、転座に関与する遺伝子の組み合わせが異なる場合があり、その場合5'側の遺伝子が共通していて、3'側の遺伝子にバリエーションが存在する。ただし3'側の遺伝子にバリエーションが存在する場合でも、そこには同一の遺伝子ファミリーの中のいずれかの遺伝子が入る場合が多い。骨腫瘍の Ewing/PNET 腫瘍の例でも、キメラ遺伝子の3'側の遺伝子は、いずれも ETS ファミリーの遺伝子群である。これらのキメラ遺伝子群に共通した腫瘍化の分子機構として、個々のキメラ遺伝子産物が、各々の腫瘍特異的な転写因子としてその腫瘍発生において必要な標的遺伝子を決定し、その遺伝子の活性化を導くという機構が想定されている。

II. 骨腫瘍における遺伝子異常

軟部腫瘍とは対照的に、骨腫瘍においては、上記の

*東京医科大学病理学第一講座

表1 軟部腫瘍にみられるキメラ遺伝子とその機能

組織型	特異的染色体転座	キメラ遺伝子	想定される機能	Southern
PNET/Ewing's sarcoma	t(11;22)(q24;q12)	<i>EWS-FLI1</i>	Ets-like DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	文献 7
	t(21;22)(q22;q12)	<i>EWS-ERG</i>	Ets-like DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	
	t(7;22)(p22;q12)	<i>EWS-ETV1</i>	Ets-like DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	
	t(9;22)(q12;q12)	<i>EWS-E1A-F</i>	DNA binding (adenovirus E1A enhancer -binding) Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	
clear cell sarcoma	t(12;22)(q13;q12)	<i>EWS-ATF1</i>	bZIP DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	文献 8
desmoplastic small round cell tumor	t(11;22)(p13;q12)	<i>EWS-WT1</i>	DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	文献 9
extraskeltal myxoid chondrosarcoma	t(9;22)(q22;q12)	<i>EWS-CHN</i>	DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	
	t(9;17)(q22;q11)	<i>TAFII68/RBP56-CHN</i>	DNA binding Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	
alveolar rhabdomyosarcoma	t(2;13)(q35;q14)	<i>FKHR-PAX3</i>	Paired box/homeodomain Forkhead DNA binding	文献 9
	t(1;13)(p36;q14)	<i>FKHR-PAX7</i>	Paired box/homeodomain Forkhead DNA binding	文献 9
myxoid liposarcoma	t(12;16)(q13;p11)	<i>TLS/FUS-CHOP</i>	DNA binding/ZIP Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	文献 10
	t(12;22)(q12;q13)	<i>EWS-CHOP</i>	DNA binding/ZIP Gln-Ser-Try/Gly-rich/RNA binding	
synovial sarcoma	t(X;18)(p11;q11)	<i>SYT-SSX</i>	Kruppel-associated box/None identified None identified None identified	
dermatofibrosarcoma protuberans	t(17;12)(q22;q13)	<i>COL1A1-PDGFB</i>	Extracellular matrix Growth factor	
congenital/infantile fibrosarcoma	t(12;15)(p13;q25)	<i>ETV6-NTRK3</i>	helix-loop-helix (HLH) protein tyrosine kinase receptors	

Ewing 肉腫を除いて疾患特異的な遺伝子異常は少ないが、その中では骨肉腫における *p53*, *Rb* 遺伝子の変異が知られている。また、軟骨肉腫においても、高悪性度の症例には *p53* の変異が存在することが報告されている。ただし、病理診断に有用なマーカーとなるような遺伝子変異は、Ewing 肉腫以外には知られていない。

III. 骨軟部腫瘍における遺伝子診断

さて、個々のキメラ遺伝子がそれぞれ特定の軟部腫

瘍に特異的に発現する事実から、キメラ遺伝子を検出することが、診断の補助、また確定診断の重要な根拠として実際に臨床の現場で用いられつつある。また、多くのキメラ遺伝子が腫瘍特異的な転写因子として機能する事実から、個々のキメラ遺伝子によって特異的に発現が誘導される遺伝子を腫瘍のマーカーとして検出しようとする試みがある。一方、多くの上皮性の腫瘍と同様に、骨肉腫には、比較的高頻度に癌抑制遺伝子である *p53* 遺伝子や *Rb* 遺伝子の変異が観察される。しかし、実際の診断に際しては、これらの癌抑制遺伝子の変異は特異的でないことから、腫瘍のマーカーとはなりにくいことも事実である。以上のことを考慮し、全体の診断の流れ(図1)と具体的に行われてい

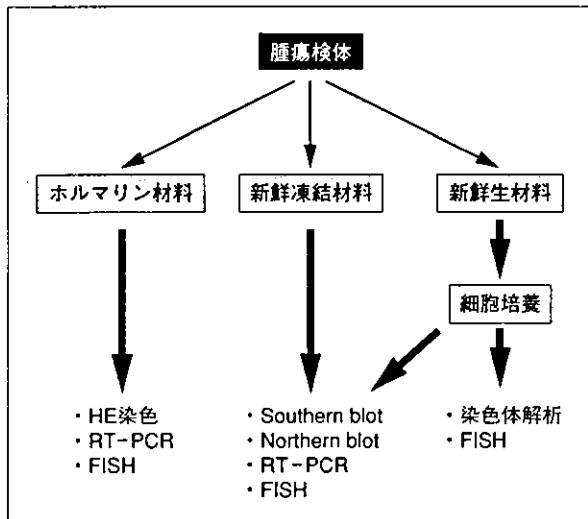


図1 病理診断における、従来の組織検査と分子生物学を利用した遺伝子診断の流れ

る方法を述べる。

1. 染色体解析, サザンブロッティング法

軟部腫瘍とEwing肉腫には、上述したように特異的な染色体転座が存在し、その結果腫瘍内でキメラ遺伝子が構成される。そのため、実際にキメラ遺伝子の切断点が分子クローニングによって同定されている場合には、わざわざ手間をかけて腫瘍細胞を培養し染色体標本作製する意義は乏しいのではないかという意見も耳にする。しかしながら、腫瘍によってはEwing肉腫のように多様なキメラ遺伝子が存在する例もある。また、我々の経験でも、組織学的には明らかに粘液型脂肪肉腫の像を呈するにも関わらず、その腫瘍特異的なキメラ遺伝子と考えられる *TLS-CHOP* や *EWS-CHOP* が検出できない症例がある。さらに、胞巣型横紋筋肉腫にみられる *PAX3-FKHR* キメラ遺伝子などの場合には、ゲノムの切断点領域が非常に複雑なため、キメラ遺伝子の検出が困難である。一方で、軟部腫瘍の中でも、高分化脂肪肉腫のように比較的特徴的な染色体像を示す腫瘍も存在する。以上のことからわかるように、骨軟部腫瘍の領域では、染色体解析は病理診断をしていくうえでいまだに重要な解析手段の一つであると考えられる。

サザンブロッティング法も、染色体転座を同定するための有用な手段の一つである。サザンブロッティング法によって染色体の転座によるゲノムの再構成を確認することができた腫瘍について、表1に文献番号を

記載した。実際の解析にあたっては、用いるプローブと制限酵素の選択が重要である。粘液型脂肪肉腫において我々がやっている具体的な解析例を図2に示す。腫瘍細胞を短期培養する必要がある染色体解析と違い、サザンブロッティング法はゲノムDNAさえあれば解析可能であるという事実は重要である。また、キメラ遺伝子の中には発現が低いものも知られており、PCRで増幅しにくい配列も存在する。そのような症例においては、サザンブロッティング法はきわめて有効である。

2. ノーザンブロッティング法

ノーザンブロッティング法は、ある種類のキメラ遺伝子の検出には応用可能である。しかし、キメラ遺伝子の転写産物が、融合する前の遺伝子の転写産物と区別することが困難な場合が少なくないことから、あまり一般的には応用されていない。しかしながら、融合する前と比べて転写産物の大きさが明確に異なるようなキメラ遺伝子や、融合する前の3'末端側のwild typeの遺伝子発現レベルが非常に低く(キメラ遺伝子を形成する5'末端の遺伝子はほとんどの場合発現が高い)、なおかつ転座を起こし融合した際に発現が上昇するキメラ遺伝子を対象とする場合、ノーザンブロッティング法は有用である(図3)。その例として、我々が実際に行っている例を紹介する(図4)。粘液型脂肪肉腫には、第16染色体に存在する *TLS* 遺伝子と第12染色体に存在する *CHOP* 遺伝子の融合からなる *TLS-CHOP* キメラ遺伝子が認められる。通常キメラ遺伝子と同様に、5'側の *TLS* 遺伝子は多くの組織で発現が高い。これに対し *CHOP* 遺伝子は、すべての組織で発現が低く、細胞に小胞体ストレスが加わってはじめて発現が誘導される。このことから、*CHOP* 遺伝子に対応するプローブを用いることで、粘液型/円形細胞型脂肪肉腫において *TLS-CHOP* 遺伝子が特異的に検出できる。

3. RT-PCR法

骨軟部腫瘍における分子生物学的なキメラ遺伝子の検出には、大別して図1に示すような方法がある。その中でも、実際に結果が得られるまでの時間、検体量の制約、また解析方法の簡便さを考慮すると、凍結材料またはホルマリン固定・パラフィン包埋材料からのreverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)による検出法が最も実用性が高いと思われる。特に、凍結材料がある場合は、RT-PCRによ