

図5 腎ラブドイド腫瘍 a: HE染色, 大型核を有する腫瘍細胞が浸潤性に増殖している。ラブドイド細胞が目立たない領域も多い。b: BAF47染色, 腫瘍細胞の核は、BAF47陰性である。

るrestまで存在する。hyperplastic restでは腎芽腫とほぼ同様の細胞の増殖がみられるため、生検では、腎芽腫との鑑別は不可能なこともある。

3. 腎明細胞肉腫 clear cell sarcoma of the kidney (CCSK)

腎明細胞肉腫は腎ラブドイド腫瘍と共に、旧小児腫瘍組織分類委員会分類において腎芽腫、不全型として分類されていたが、新分類では腎芽腫から除外され、腎明細胞肉腫、腎ラブドイド腫瘍として別個の腫瘍として分類されている。

本腫瘍は、3歳前後に発生し、骨転移の頻度が高いことが特徴的である。被膜をもたないが、肉眼的に周囲との境界明瞭な白色充実性の腫瘍である。組織学的には、樹枝状の血管あるいは血管線維性間質を伴って腫瘍細胞が索状、胞巣状に増殖するパターンが特徴的である。腫瘍細胞の核は、類円形で繊細なクロマチンを有し、核小体は目立たない。定型的な症例では比較的容易に診断できるが、硬化、間質の粘液腫状変化、上皮様形態など、様々なパターンをとることがあり、診断の難しい症例も多い。免疫組織化学的に、ビメンチン陽性となるものの、CD34、S-100、デスミン、MIC2、サイトケラチン、EMAは陰性と報告されている¹⁷⁾。もともと予後不良であったが、NWTsの報告によると化学療法剤にドキソルビシンを加えることにより、生存率が大幅に向上した。

4. 腎ラブドイド腫瘍 rhabdoid tumor of the kidney (RTK)

腎ラブドイド腫瘍は、乳児に好発する高悪性度の腫瘍である。もともと横紋筋肉腫との形態的な類似点か

らラブドイド(横紋筋肉腫様)という名称がつけられたが、横紋筋に由来する腫瘍とする証拠はない。軟部にも発生することが知られており、また脳にも同様の腫瘍が発生する(atypical teratoid/rhabdoid tumor: AT/RT)。ほとんどは3歳までに発症する。

肉眼的には、白色調の軟らかい腫瘍で、出血・壊死を伴い周囲に浸潤性に増殖する。組織学的には、明瞭な核小体と大型核を有する腫瘍細胞が、びまん性に増殖する(図5a)。しばしば、細胞質に好酸性の封入体を認める(ラブドイド細胞)が、必ずしも腫瘍全体に出現するわけではなく、部分的にまとまって出現することが多い。一方で紡錘形の腫瘍細胞が主体を成す部もある。核は大型で、大型の核小体を有し、水泡状のクロマチンを有する。

免疫組織化学的には、ビメンチン陽性であり、サイトケラチン、EMAが一部の細胞に陽性になる。染色体22qの異常とその領域に存在するSMARCB1(hSNF5/INI1/BAF47)遺伝子の欠失や点変異等による不活化が報告されている。また、中枢神経系と腎臓に腫瘍を発症する患児にて本遺伝子の生殖細胞系列での変異も報告されている。BAF47抗体を用いた免疫染色は、ほとんどの細胞に陽性であるが、RTKでは陰性となることが報告されている(図5b)¹⁸⁾。AT/RTでも同様の報告がなされており、RTKやAT/RTの鑑別診断に参考にすることができる。しかしながら、類上皮肉腫、renal medullary carcinomaなどRTK以外の腫瘍でもその発現消失が報告されており、特異度についてさらなる検討が必要である。

III. 胚細胞性腫瘍における *c-kit* 遺伝子変異

胚細胞性腫瘍は、原始生殖細胞が起源と考えられており、卵巣、精巣以外に身体の正中線上に近い部位、すなわち頭蓋内、頸部、縦隔、後腹膜、仙尾部などを好発部位とする。原始生殖細胞は胎生4週までに卵黄嚢に観察され、受容体である *c-kit* (KIT) を発現していく。リガンドである stem cell factor (SCF) は卵黄嚢から生殖隆起にかけて濃度勾配を示しながら発現するため、相互的作用により原始生殖細胞は胎生6週の生殖隆起へと遊走し、その後性腺へと分化する。生殖細胞のほか、Cajal細胞、メラノサイト、赤芽球、肥満細胞の分化・増殖において SCF-KIT システムは必須である。

KIT は *c-kit* 遺伝子にコードされる受容体型チロシンキナーゼであり、細胞外領域、細胞膜貫通領域、細胞内領域 (傍細胞膜領域とチロシンキナーゼ領域 I, II) より構成される。 *c-kit* 遺伝子の突然変異に起因する腫瘍には、gastrointestinal stromal tumor (GIST)、肥満細胞症/肥満細胞性白血病、セミノーマなどの胚細胞性腫瘍、急性骨髄性白血病などがある。GIST にみられる突然変異は傍細胞膜領域 (エクソン11) に集中しており、肥満細胞症/肥満細胞性白血病ではチロシンキナーゼ領域 II (エクソン17) の点突然変異が認められる。一方胚細胞性腫瘍では、1999年に Tian らが seminoma/dysgerminoma 2例にエクソン17 (codon 816) の点突然変異を報告した¹⁹⁾。 *c-kit* 遺伝子の突然変異は、seminoma/dysgerminoma/germinoma の25~38%に認められるが、その他の胚細胞性腫瘍 (yolk sac tumor, gonadoblastoma, immature teratoma など) には認められない²⁰⁻²³⁾。免疫組織化学的に KIT 発現は大部分の seminoma/dysgerminoma に認められ、突然変異の認められない腫瘍でも、細胞膜に陽性となる。yolk sac tumor でも時に KIT 発現がみられるが、細胞質に陽性となる^{19,20)}。GIST では、チロシンキナーゼ阻害剤であるイマチニブが有効であるとされているが、seminoma/dysgerminoma/germinoma に認められるエクソン17の点突然変異のうち、D816V, D816H mutant はイマチニブ抵抗性であることが報告され²⁰⁾、その臨床応用に際してはさらなる検討が望まれる。

文 献

1) Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P. et al. :

- The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada System). *Cancer* 1999, **86** : 364-372
- 2) Shimada, H., Ambros, I.M., Dehner, L.P. et al. : Terminology and morphologic criteria of neuroblastoma tumors : recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 1999, **86** : 349-363
- 3) Ambros, I.M., Zellner, A., Roald, B. et al. : Role of ploidy chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med* 1996, **334** : 1505-1511
- 4) Goto, S., Umehara, S., Gerbing, R.B. et al. : Histopathology and MYCN status in peripheral neuroblastoma tumors : a report from the Children's Cancer Group. *Cancer* 2001, **92** : 2699-2708
- 5) Shimada, H., Nakagawa, A., Julius, P. et al. : TrkA expression in peripheral neuroblastoma tumors. *Cancer* 2004, **101** : 1873-1881
- 6) Mosse, Y.P., Diskin, S.J., Wasserman, N. et al. : Neuroblastoma have distinct genomic DNA profiles that predict clinical phenotype and regional gene expression. *Genes Chromosomes Cancer* 2007, **46** : 936-949
- 7) Iwanaka, T., Yamamoto, K., Ogawa, Y. et al. : Maturation of mass-screened localized adrenal neuroblastoma. *J Pediatr Surg* 2001, **36** : 1633-1636
- 8) Wang, H., Ozaki, T., Shamim Hossain, M. et al. : A newly identified dependence receptor UNC5H4 is induced during DNA damage-mediated apoptosis and transcriptional target of tumor suppressor p53. *Biochem Biophys Res Commun* 2008, **370** : 1594-1598
- 9) 佐野秀樹, London, W.B., Cohn, S.L. 他 : 神経芽腫群腫瘍における MYCN 遺伝子検査と国際病理分類 (INPC) の予後予測効果 : 北米グループスタディの経験. *小児がん* 2007, **44** : 1-8
- 10) 前田尚子, 中川温子, 瀧本哲也 他 : 神経節腫に分化したのち再増大をきたした stage IVA 乳児神経芽腫の1例. *小児がん* 2005, **42** : 238-243
- 11) Shimada, H., Stram, D.O., Chatten, J. et al. : Identification of subsets of neuroblastoma combined histopathologic and N-myc analysis. *J Natl Cancer Inst* 1995, **87** : 1470-1476
- 12) Attiyeh, E.F., London, W.B., Mosse, Y.P. et al. : Chromosome 1p and 11q Deletions and Outcome in Neuroblastoma. *N Engl J Med* 2005, **353** : 2243-2253
- 13) Berrebi, D., Peuchmaur, M., Okamoto, C. et al. : Chromosomal alternations (unb1pLOH and 1pLOH) and histologic changes in peripheral neuroblastoma tumors. *Proceedings Advances in Neuroblastoma Research* 2006
- 14) Umehara, S., Nakagawa, A., Matthay, K.K. et al. : Histopathology defines prognostic subsets of ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 2000, **89** : 1150-1161

- 15) Vujanic, G.M., Sandstedt, B., Harms, D. et al. : Revised International Society of Paediatric Oncology (SIOP) working classification of renal tumors of childhood. *Med Pediatr Oncol* 2002, **38** : 79-82
- 16) 日本病理学会小児腫瘍組織分類委員会 編 : 小児腫瘍組織カラーアトラス, 金原出版, 東京, 2008
- 17) Argani, P., Perlman, E.J., Breslow, N.E. et al. : Clear cell sarcoma of the kidney : a review of 351 cases from the National Wilms Tumor Study Group Pathology Center. *Am J Surg Pathol* 2000, **24** : 4-18
- 18) Hoot, A.C., Russo, P., Judkins, A.R. et al. : Immunohistochemical analysis of hSNF5/INI1 distinguishes renal and extra-renal malignant rhabdoid tumors from other pediatric soft tissue tumors. *Am J Surg Pathol* 2004, **28** : 1485-1491
- 19) Tian, Q., Frierson, H.F.Jr., Krystal, G.W. et al. : Activating *c-kit* gene mutation in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999, **154** : 1643-1647
- 20) Kemmer, K., Corless, C.L., Fletcher, J.A. et al. : *KIT* mutations are common in testicular seminomas. *Am J Pathol* 2004, **164** : 305-313
- 21) Høeiv-Hansen, C.E., Kraggerud, S.M., Abeler, V.M. et al. : Ovarian dysgerminomas are characterized by frequent *KIT* mutations and abundant expression of pluripotency markers. *Mol Cancer* 2007, **6** : 12
- 22) Sakuma, Y., Sakurai, S., Oguni, S. et al. : *c-kit* gene mutations in intracranial germinomas. *Cancer Sci* 2004, **95** : 716-720
- 23) Przygodzki, R.M., Hubbs, A.E., Zhao, F.Q. et al. : Primary mediastinal seminomas : evidence of single and multiple *KIT* mutations. *Lab Invest* 2002, **82** : 1369-1375

Ewing肉腫ファミリー腫瘍の臨床病理

大喜多 肇¹⁾
秦 順一^{1,2)}

I. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の概念

Ewing肉腫は1921年にEwingが“diffuse endothelioma of bone”の名称のもとに、骨に発生し血管に富んだ明るい胞体を有する小円形細胞腫瘍を報告して以来の腫瘍である¹⁾。その後、本腫瘍が軟部組織にも発生することが明らかとなり骨外性Ewing肉腫と呼ばれてきた。一方、末梢性未分化神経外胚葉腫瘍 peripheral primitive neuroectodermal tumor (PNET)は、1918年にStoutがロゼット構造を伴った小円形細胞からなる尺骨神経の腫瘍を peripheral neuroepithelial tumor として報告して以来、その存在が認識されるようになった²⁾。その後、本腫瘍が神経組織と関連しない組織に発生すること、骨に発生することが報告された。また、1979年にAskinらは、胸壁に発生する神経形質を示す小円形細胞腫瘍を、独自の臨床病理学的な概念として報告した³⁾。これらの腫瘍は類似した特徴を有し、同一のentityに属する腫瘍か独立した腫瘍であるか長らく論争されてきたが、近年では病理組織学的な類似点と共通した染色体転座t(11;22)、それに由来する融合遺伝子(キメラ遺伝子)から同一のentityに属する腫瘍と考えられるようになり、Ewing肉腫ファミリー腫瘍Ewing's sarcoma family of tumors (ESFT)、Ewing family tumor (EFT)、Ewing's sarcoma/primitive neuroectodermal tumor などと呼ばれるようになった^{4,5)}。すなわちEwing肉腫は未熟ではっきりした分化形質を示さない腫瘍、PNETは神経形質を示す腫瘍で、一連のスペクトラムを有する腫瘍群との考え方が支配的である。本腫瘍の由来については、種々の説があり、古くは骨髄の血管内皮細胞ないしは細胞網細胞由来とされたこともある。しかしながら、今

日ではこの見解は否定的で、未熟な間葉系細胞あるいは神経堤に由来するとの考え方が優勢である。

II. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の臨床像

Ewing肉腫ファミリー腫瘍は、小児あるいは若年成人に好発する。本邦における正確な頻度は不明であるが、欧米と比較すると低頻度であり日本での発生は年間100例に満たないと考えられる。本腫瘍は、様々な部位の骨、軟部組織に発生しうが、骨では骨盤や大腿骨に、軟部組織では四肢や軀幹の深部組織に好発する。しかしながら遺伝子診断法の導入により、様々な臓器(腎臓、膀胱、子宮、卵巣、食道、小腸、膵臓、胆道、髄膜、肺、心臓、副腎、耳下腺など)より発生することが報告されている。Ewing肉腫ファミリー腫瘍は骨や深部軟部組織に腫瘤を形成し、炎症症状が強いことが特徴で、骨に発生した場合、臨床的にしばしば骨髄炎との鑑別が必要とされている。

III. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の病理組織像

本腫瘍は軟らかい腫瘤を形成することが多く、しばしば広範な壊死を伴う。組織学的に特定の分化形質を示さない腫瘍から明瞭な神経形質を示す腫瘍まで様々である。典型的なEwing肉腫とされた腫瘍は、小型類円形で繊細なクロマチンをもつ核を有し、核小体は小型であるか、目立たない(図1)。細胞質はグリコーゲンが豊富で明るく、細胞境界は不明瞭である(図2)。これらの腫瘍細胞が、繊細な血管性間質を伴って単調に増殖する。時にやや大型で不整な核と明瞭な核小体を有する腫瘍があり atypical Ewing's sarcoma あるいは large cell Ewing's sarcoma と呼ばれる。一見、胞巣状のパターンを呈すること、紡錘形細胞がみられること、間質の硬化を伴うこともある⁶⁾。時に上皮様のパターンを呈することがあり adamantinoma-

¹⁾ 国立成育医療センター研究所発生・分化研究部

²⁾ 常盤大学人間科学部



図1 Ewing肉腫の組織像 小型類円形で濃細なクロマチンを有する核をもつ腫瘍細胞が、特定の配列をとらずに増殖している、細胞質は明るい。



図2 Ewing肉腫のPAS染色 腫瘍細胞の細胞質にPAS染色陽性のグリコーゲンを認める。



図3 PNETの組織像 図1と同様の腫瘍細胞が増殖するが、ロゼット形成が認められる。

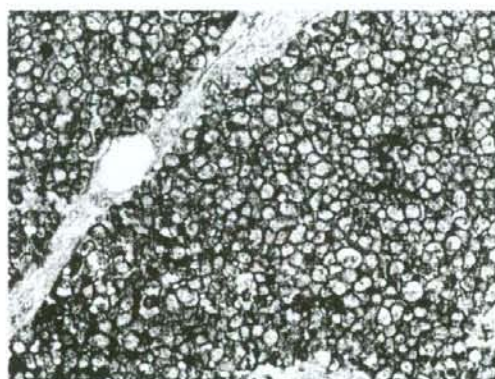


図4 Ewing肉腫のCD99染色 ほとんどの腫瘍細胞の細胞膜にCD99が陽性となる。

like Ewing肉腫と報告されている。典型的なPNETとされてきた腫瘍では、Homer Wright型ないしはFlexner-Wintersteiner型のロゼットがみられる(図3)。しかしながらEwing肉腫とPNETの組織像には、どちらも判別のつかない移行があり、両者を再現性高く区別することは困難である。また、軟骨や骨への分化を示すEwing肉腫ファミリー腫瘍も報告されているが、極めて稀である。

電子顕微鏡的には細胞質の電子密度が低い明るい細胞と暗調な2種類の細胞がみられ、いずれも円形ないし類円形の核を有している。特徴的に集簇したグリコーゲン顆粒を含んでいるが細胞内小器官の発達は悪い。PNETでは細胞突起を認めることがあり、二重膜に囲まれた小型(80~100 nm)の神経内分泌顆粒を極

めて稀に認める。

免疫組織化学的には、95%以上の症例でCD99(MIC2)に陽性、特に、細胞膜に強陽性となるのが特徴である(図4)。当初は本腫瘍に特異性が高いと考えられていたが、実際には多くの小円形細胞腫瘍において陽性となることが判明している。特にリンパ芽球性リンパ腫ではCD99が細胞膜に高率に陽性となる。また、滑膜肉腫、骨肉腫、横紋筋肉腫、線維形成性小細胞腫瘍においても陽性となることがある。これらは形態学的にEwing肉腫ファミリー腫瘍と鑑別を要する腫瘍であり、CD99はEwing肉腫の感度の高いマーカーであるが、これに頼りすぎることなく、形態像、他の免疫染色所見、後に述べる融合遺伝子を併せて診断する必要がある。また、融合遺伝子の産物を検出す

表1 Ewing肉腫ファミリー腫瘍に認められる染色体転座と融合遺伝子

染色体転座	融合遺伝子	頻度
t(11;22)	<i>EWS-FLII</i>	80%程度
t(21;22)	<i>EWS-ERG</i>	15%程度
t(7;22)	<i>EWS-ETV1</i>	稀
t(17;22)	<i>EWS-EIAF</i>	稀
t(2;22)	<i>EWS-FEV</i>	稀
t(16;21)	<i>FUS-ERG</i>	稀
t(2;16)	<i>FUS-FEV</i>	稀

るFLII抗体の免疫染色にEwing肉腫ファミリー腫瘍の大部分が陽性となると報告されているが、こちらも特異的とはいえない。また、近年、本腫瘍の一部はサイトケラチン(AE1/AE3や高分子量ケラチン)に陽性となることが報告されている⁶⁾。多くの場合、一部の腫瘍細胞が陽性となるのみであるが、時にびまん性に陽性となることがあり、特に前述したadamantinoma-like Ewing肉腫では、サイトケラチン陽性となることが報告されている。

IV. Ewing肉腫ファミリー腫瘍に共通する染色体転座と融合遺伝子

Ewing肉腫ファミリー腫瘍では、約80%に特徴的な染色体転座t(11;22)とそれに由来する融合遺伝子*EWS-FLII*が存在する。(表1, 図5)⁷⁾。さらに約15%にはt(21;22)に由来する*EWS-ERG*融合遺伝子が存在する。この2つの融合遺伝子に加え、頻度は低いものの、*EWS-ETV1*, *EWS-EIAF*, *EWS-FEV*融合遺伝子が報告されている。これらはいずれも5'側が*EWS*遺伝子(*EWSR1*: Ewing sarcoma breakpoint region 1)で、3'側がETS familyに属する転写因子であり、*EWS-ETS*融合遺伝子とも呼ばれている。*EWS*遺伝子の産物は、RNA結合蛋白質と考えられ、FUS(fusion in malignant liposarcoma), TAFII68(TATA box binding protein(TBP)-associated factor, 68 kDa)と共にTET familyと呼ばれている。それぞれの融合遺伝子の産物には*EWS*のN末端側のtrans-activation domainとETS familyに属する転写因子のETS DNA binding domainが含まれることが共通した特徴であり、融合遺伝子は異常な転写因子として作用すると考えられている。さらに、近年、*EWS-ETS*融合遺伝子に加え、TETファミリーの一つである

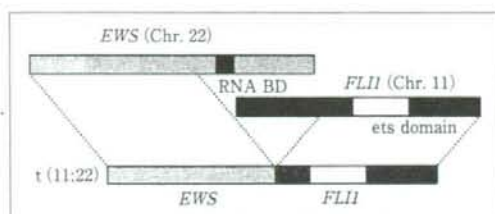


図5 融合遺伝子の模式図 *EWS*遺伝子の5'側と*FLII*遺伝子の3'側が融合し、*EWS-FLII*融合遺伝子が形成される。3'側には*FLII*遺伝子のets domainが含まれている。

*FUS*遺伝子とETSファミリーの転写因子による融合遺伝子(*FUS-ERG*, *FUS-FEV*)が報告された。

これらの融合遺伝子は、Ewing肉腫ファミリー腫瘍の発生に非常に重要な役割を演じていると考えられ、融合遺伝子が発現を調節する標的遺伝子が探索されてきた。融合遺伝子によって発現が上昇する遺伝子として、*c-Myc*, *cyclin D1*, *PDGFC*, *Nkx22*, *NROB1*, *Id2*などが、発現が抑制される分子としてTGF- β type 2 receptorやIGFBP-3などが報告されている。これらの分子に加えて、*EWS-ETS*融合遺伝子の産物はかなり多数の遺伝子の転写を直接的あるいは間接的に制御していると考えられており、融合遺伝子発現による遺伝子ネットワークの変化が腫瘍発生に必要と考えられている。

*EWS-FLII*の強制発現は、マウスの線維芽細胞であるNIH3T3細胞をトランスフォームする。さらに、Ewing肉腫ファミリー腫瘍細胞で*EWS-FLII*をノックダウンするとソフトアガー上でのコロニー形成能が失われ、ヌードマウスでの腫瘍形成能が抑制されることが示され、*EWS-FLII*は腫瘍にとって必須であると考えられている。また、*EWS-FLII*をノックダウンした腫瘍細胞の遺伝子発現プロファイルは、間葉系幹細胞に近づき、脂肪や骨への分化能を獲得することも示された⁸⁾。一方、ヒト間葉系幹細胞に*EWS-FLII*, *EWS-ERG*を発現させると、CD99の発現上昇と共に間葉系幹細胞がEwing肉腫様に形態変化し発現プロファイルもEwing肉腫ファミリー腫瘍に近づく⁹⁾。これらの結果から、間葉系幹細胞あるいはそれに近い間葉系細胞がEwing肉腫ファミリー腫瘍の発生母地であり、キメラ遺伝子がEwing肉腫ファミリー腫瘍様の形質を与えることが示唆される。

表2 EWS-ETS融合遺伝子における融合点のexonの組み合わせ

融合遺伝子	exonの組み合わせ	各融合遺伝子に占める割合
EWS-FLII	EWS exon 7-FLII exon 6(type 1)	50~70%程度
	EWS exon 7-FLII exon 5(type 2)	20~30%程度
	EWS exon 10-FLII exon 8	稀
	EWS exon 10-FLII exon 5	稀
	EWS exon 7-FLII exon 8	稀
	EWS exon 7-FLII exon 4	稀
EWS-ERG	EWS exon 7-ERG exon 7	多
	EWS exon 7-ERG exon 9	少
	EWS exon 7-ERG exon 6	稀
EWS-ETV1	EWS exon 7-ETV1 exon 11	
EWS-EIAP	EWS exon 7-EIAP exon 8	
EWS-FEV	EWS exon 10-FEV exon 2	
	EWS exon 7-FEV exon 2	

V. Ewing肉腫ファミリー腫瘍の遺伝子診断

Ewing肉腫ファミリー腫瘍は、形態学的にも免疫組織化学的にも比較的特徴に乏しく、また、生検にてごく少量しか腫瘍成分が得られない場合もあり、病理組織学的診断の難しいことが少なくない。したがって、融合遺伝子の同定が確定診断を下すうえで、非常に有用である。筋と神経への分化を示すbiphenotypic sarcomaでEWS-FLIIが、線維形成小細胞腫瘍でEWS-ERGが検出されたとの報告があり、FUS-ERGが急性骨髄性白血病の一部で同定されるなど、EWS(あるいはFUS)-ETS融合遺伝子は、Ewing肉腫ファミリー腫瘍に100%特異的とはいえない。しかしながら非常に特異性が高いと考えられており、病理組織学的所見と組み合わせで診断を行うことにより、より正確な診断を下すことが可能となる。一方、頻度は低いものの、融合遺伝子が検出されないが病理学的にはEwing肉腫ファミリー腫瘍と考えざるをえない症例も存在する。このような場合は、リンパ芽球性リンパ腫や低分化型の滑膜肉腫、悪性末梢神経鞘腫瘍など病理組織学的鑑別診断を十分考慮した上で、Ewing肉腫ファミリー腫瘍の診断を下すべきであろう。

1. RT-PCR法を用いた融合遺伝子の検出

RT-PCR法では、腫瘍組織(新鮮組織、凍結組織)よりRNAを抽出し、cDNAを合成し、PCRを行って融合遺伝子の発現を検出する。EWSとETS familyの転写因子が、様々なexonの組み合わせで融合するサブタイプが存在する(表2)。EWS-FLII融合遺伝子で

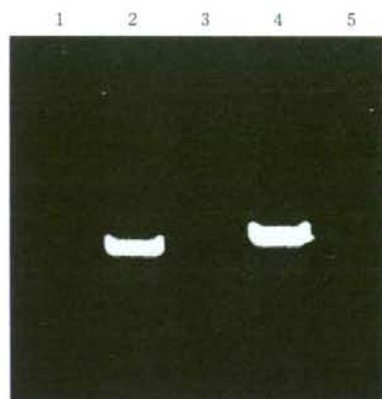


図6 RT-PCR法によるEWS-FLII融合遺伝子の検出 腫瘍(lane 2)はEWS exon 7とFLII exon 6の組み合わせ、陽性コントロール(lane 4; Ewing肉腫細胞株)はEWS exon 7とFLII exon 5の組み合わせである。FLIIのexon 5の長さの分だけ、陽性コントロールのほうがバンドが長い。lane 1: marker, lane 2: 腫瘍, lane 3: 陰性コントロール(逆転写反応無し), lane 4: 陽性コントロール, lane 5: 陰性コントロール。

は、現在知られている全ての組み合わせを検出するためには、EWS遺伝子のexon 6より上流とFLII遺伝子のexon 11より下流のプライマーを用いてPCRを行う必要がある。EWS-FLII融合遺伝子の場合、exonの組み合わせによって増幅されるバンドの長さが600塩基対以上異なり、増幅されたバンドの長さが陽性コントロールのバンドと必ずしも一致しない(図6)。パラフィン包埋ブロックを用いたRT-PCRも報告されているが、標的とする配列を100塩基程度に短くする必要があるので、それぞれのexonの組み合わせに応じたPCRプライマーの設計が必要であり、稀な組み合わせの検出は現実的には困難となる。

各融合遺伝子のサブタイプと予後には関連がないという報告もあるが、EWSのexon 7とFLIIのexon 6の融合遺伝子(type 1)とそれ以外の融合遺伝子を有する腫瘍では、前者のほうが予後が良いという報告もなされており、今後、さらに検討されるべき課題である¹⁰⁾。また、骨髄や末梢血における融合遺伝子の検出によって微小残存病変を感度よく検出できることが報告されているが、これらの臨床的意義は現時点では定まっていない。

2. FISH

捺印標本やホルマリン固定パラフィン包埋組織を用いたFISH(fluorescence in situ hybridization)法によ

り、EWS遺伝子の転座を検出することが可能である。FISH法は、蛍光顕微鏡など特殊な装置が必要であるが、捺印標本など、ごく少量の腫瘍細胞を用いて行うことが可能という利点がある。またEWS-FLI1、EWS-ERGのみならず、稀なタイプの転座であっても、EWSの再構成を示すことができる利点がある。一方で、EWSの転座のパートナーはわからず、線維形成小細胞腫瘍や明細胞肉腫、粘液型軟骨肉腫などEWS遺伝子の関係する転座を有する腫瘍は、病理組織像で鑑別する必要がある。

EWS遺伝子の5'側と3'側にそれぞれ異なる蛍光色素で標識されたプローブが市販されている。転座のない染色体では、2個のプローブ由来のシグナルはごく近接して(あるいは重なっているため黄色に)みえるが、EWS遺伝子内に転座を有する細胞では、2つのシグナルが離れ、明瞭な緑と赤のシグナルとなる(図7)。ホルマリン固定パラフィン切片を用いたFISH法も可能であるが、前処置が必要となること、バックグラウンドが高くなること、感度が低下するなどの問題があり、捺印標本のほうが望ましい。小さな腫瘍検体で凍結検体を保存できない場合も、ホルマリン固定前に、捺印標本を作製しておく、後になって転座の有無の判定に利用できる。

おわりに

ここ数十年でEwing肉腫とPNETが同一のentityに属する腫瘍であるという概念がほぼ確立されてきた。しかしながら、Ewing肉腫ファミリー腫瘍と診断しうる最低限の要件は何であるか、CD99の陽性所見やEWS-ETS融合遺伝子が必須であるのかなどのコンセンサスは得られていないと思われる。いかなる単一のマーカーによっても腫瘍の確定診断をすることができないことを考えると、Ewing肉腫ファミリー腫瘍は、臨床情報や画像情報、病理組織像、免疫組織化学、遺伝子解析結果を総合して診断すべきであると考えられる。また、融合遺伝子が腫瘍発生に果たす役割も解明されつつあり、悪性度の高い本腫瘍の治療法開発も望まれる。

文 献

- 1) Ewing, J.: Diffuse endothelioma of bone. Proc NY Pathol Soc 1921, 21: 17-24
- 2) Stout, A.: Tumor of the ulnar nerve. Proc NY Pathol Soc 1918, 18: 2-12
- 3) Askin, F.B., Rosai, J., Sibley, R.K. et al.: Malignant



図7 EWSプローブによるFISH解析 転座のない染色体に由来するシグナルは、ごく近接して、あるいは重なっているため黄色にみえるが、転座した染色体に由来するシグナルは、緑と赤の2つに離れる。

small cell tumor of the thoracopulmonary region in childhood: a distinctive clinicopathologic entity of uncertain histogenesis. Cancer 1979, 43: 2438-2451

- 4) Delattre, O., Zucman, J., Melot, T. et al.: The Ewing family of tumors—a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. N Engl J Med 1994, 331: 294-299
- 5) Kovar, H.: Ewing's sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors after their genetic union. Curr Opin Oncol 1998, 10: 334-342
- 6) Folpe, A.L., Goldblum, J.R., Rubin, B.P. et al.: Morphologic and immunophenotypic diversity in Ewing family tumors: a study of 66 genetically confirmed cases. Am J Surg Pathol 2005, 29: 1025-1033
- 7) Urano, F., Umezawa, A., Yabe, H. et al.: Molecular analysis of Ewing's sarcoma: another fusion gene, EWS-E1AF, available for diagnosis. Jpn J Cancer Res 1998, 89: 703-711
- 8) Tirode, F., Laud-Duval, K., Priour, A. et al.: Mesenchymal stem cell features of Ewing tumors. Cancer Cell 2007, 11: 421-429
- 9) Miyagawa, Y., Okita, H., Nakajima, H. et al.: Inducible expression of chimeric EWS/ETS proteins confers Ewing's family tumor-like phenotypes to human mesenchymal progenitor cells. Mol Cell Biol 2008, 28: 2125-2137
- 10) de Alava, E., Kawai, A., Healey, J.H. et al.: EWS-FLI1 fusion transcript structure is an independent determinant of prognosis in Ewing's sarcoma. J Clin Oncol 1998, 16: 1248-1255