Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-05-05

# CYP1A1 Is a Useful Diagnostic Marker for Angiofibroma of Soft Tissue

植村，光太郎

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
2023-09-25
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲第8699号
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100485883

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

（課程博士関係）

# 学位論文の内容要旨

# CYP1A1 Is a Useful Diagnostic Marker for Angiofibroma of Soft Tissue

CYP1A1 は軟部血管線維腫の診断に有用なマーカーである

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻

小児外科学

（指導教員：尾藤 祐子 教授）

Kotaro Uemura

植村 光太郎

【はじめに】

軟部血管線維腫 angiofibroma of soft tissue (AFST)は Marino-Enriquez と Fletcher らによって 2012 年に報告された良性の軟部組織腫瘍である。AFST の分子遺伝学的特徴として、t(5;8)(p15;q13)の染色体転座を認め、その結果 *AHRR* (aryl hydrocarbon receptor repressor)-*NCOA2* (nuclear receptor coactivator 2)、もしくは *NCOA2* -*AHRR* の相互転座による遺伝子融合が見られる。稀な融合遺伝子として *GTF2I* (general transcription factor 2-I)-*NCOA2* あるいは *GAB1* (GRB2-associated-binding protein 1)-*ABL1* (tyrosine receptor kinase ABL1)がそれぞれ 1 例ずつに報告されている。AFST の病理組織像は異型のない均質な紡錘形細胞の腫瘍性増殖と、その間隙を縫うように壁の薄い細かい血管の増生が特徴的である。背景は粘液性、線維性の間質が混在し、部位によって様々な組織学的スペクトラムを示す。

【研究の背景】

前述のように AFST は特徴的な病理組織像を認めるものの、幅広い組織形態学的スペクトラムを示すため、粘液線維肉腫、孤在線維性腫瘍、粘液型脂肪肉腫などの悪性のものを含むさまざまな軟部組織腫瘍との鑑別が、病理組織学的に困難であることが知られている。AFST の診断においては Fluorescence in-situ hybridization (FISH)や reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)によって変異遺伝子を同定する方法などの報告はあるが、臨床病理の場において簡易に高精度で適応できる診断マーカーは存在しない。融合遺伝子により転写調節を受けるマーカーを用いた免疫染色 (immunohistochemistry: IHC)は、臨床病理において Ewing 肉腫などの診断に応用されているが、既知の軟部組織腫瘍の鑑別に用いられる IHC マーカー (EMA, S100, SMA, Desmin, CD34, STAT6, ER など)は AFST の診断には有用ではないと報告されている。2012 年に報告された AFST の包括的遺伝子発現解析で、染色体転座の結果合成されたキメラ遺伝子の発現によって AhR/ARNT (aryl hydrocarbon receptor/AhR nuclear translocator) シグナル系の標的遺伝子であるシトクロム p450 1A1 (*CYP1A1*)の発現が、粘液線維肉腫と比較して亢進していることが明らかにされた。このことから、CYP1A1 が AFST の診断に有効な簡便な IHC マーカーとなりうるのではないかという仮説を立てた。

【研究の目的】

AFST と鑑別すべき類似疾患における CYP1A1 の発現を IHC によって明らかにし、AFST の病理診断において CYP1A1 の IHC に診断的有用性があるかを調べることを目的とした。

【対象】

AFST 16 症例（神戸大学医学部附属病院、兵庫県立がんセンター、神戸市立医療センター中央市民病院)を対象とし、IHC (CYP1A1, EMA, S100, SMA, Desmin, CD34, STAT6, ER)、FISH (*NCOA2*)、RT-PCR (forward *AHRR*, reverse *NCOA2*)を行った。AFST と鑑別すべき類似疾患として、様々な程度で粘液性、線維性の間質を背景に血管増成を特徴とする 224 症例（神戸大学医学部附属病院； aggressive angiomyxoma 2 例、angioleiomyoma 15 例、cellular angiofibroma 2 例、desmoid fibromatosis 17 例、fibroma of tendon sheath 18 例、low-grade fibromyxoid sarcoma 11 例、myxofibrosarcoma 31 例、myxoid liposarcoma 13 例、myxoma 14 例、nodular fasciitis 9 例、hybrid nerve sheath tumor 7 例、schwannoma 29 例、neurofibroma 27 例、perineurioma 2 例、solitary fibrous tumor 22 例、superficial angiomyxoma 2 例、deep thrombus 3 例)を対象に CYP1A1 IHC を行った。

【方法 - IHC】

4μm ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE)切片を使用。

16 症例の AFST と 224 症例の鑑別すべき類似疾患に CYP1A1 に対する IHC を行った。脱パラフィン・水和処理を行ったのち抗原賦活化 (5mM EDTA buffer (pH 8.0), 95-99℃ 60 分, 室温 30 分)、内在性ペルオキシダーゼのブロッキング (Dako REAL Peroxidase-Blocking Solution; Agilent, 室温 5 分)を行い、一次抗体を反応させた (primary mouse monoclonal anti-CYP1A1 antibody, clone B-4, dilution 1:50; Santa Cruz Biotechnology, 4℃, overnight incubation)。インキュベーション後、二次抗体を反応させ(ヒストファインシンプルステインMAX―PO (Multi); ニチレイ, 室温 30 分)、発色 (DAB Peroxidase Substrate Kit ImmPACT; VECTOR Laboratories, 室温 5 分)、ヘマトキシリンによる核の対比染色を行い脱水・透徹・封入を行い検鏡した。

16 症例の AFST に既知の軟部組織腫瘍の鑑別に用いられる EMA, S100, SMA, Desmin, CD34, STAT6, ER の IHC を行った。

CYP1A1 IHC の評価は既報を参照に immunoreactivity staining score (IRS)を用いた。IHC 陽性細胞の割合を評価する proportion score (PS; score 0 = 0% positive cells, score 1 = <10%, score 2 = 10-50%, score 3 = 51-100%)と IHC の染色強度を評価する intensity score (IS; 0 = negative, 1 = weak, 2 = intermediate, 3 = strong)の積で IRS を求め、IRS ≧ 2 の症例を CYP1A1 positive とした。

【方法 - FISH】

4μm FFPE 切片を使用。プローベは dual-color *NCOA2* break-apart probes (CytoCell Ltd)を使用した。判定は既報に倣い、最低 50 個の核をカウントし、オレンジとグリーンのシグナルが、シグナルの直径の 2 倍以上の離れていた場合に split signal 陽性とし、7%以上の細胞に split signal が認められる場合を *NCOA2* rearrangement ありとした。

【方法 - RT-PCR】

FFPE 検体から RNA を抽出（RNAstorm FFPE RNA Isolation Kit; Cell data Sciences)、逆転写（SuperScript IV First-Strand Synthesis System; ThermoFisher)で得られた cDNA を PCR にかけた（GoTaq Green Master Mix; Promega)。PCR に使用したプライマーは forward *AHRR* (exon 9, NM_020731.4; 5'-AGCGGAGATGAAATGAGGAGCG-3')と reverse *NCOA2* (exon 16, NM_006540.4; 5'-ACTCAGCTGCAGGATGTGGACA-3')。PCR 産物を精製し、サンガー法で junctional point を含む塩基配列のシーケンスを行なった。

【結果 - AFST の臨床病理学的、組織学的特徴】

AFST 16 症例の内訳は、女性 9 例、男性 7 例、年齢の中央値は 56 歳（17-78 歳）であった。75%の症例（12/16)が四肢に発生しており、臀部、会陰、体幹、骨盤腔の発生例がそれぞれ 1 例ずつであった。最大腫瘍径の中央値は 4.9cm (1.7-11cm)であった。7 例が辺縁切除、4 例が拡大切除で摘出されており、残りの 5 例の切除方法については情報が得られなかった。全症例において豊富な小型血管網を介在させ、異型に乏しい紡錘形細胞が増生する AFST に特徴的な病理組織学像を認めた。血管周皮腫パターンを示す腫瘍もあり、稀な変化として amianthoid fiber の沈着や泡沫組織球が集簇する例もみられた。既知の軟部組織腫瘍の鑑別に用いられる IHC マーカーに対する染色性は EMA 63%, S100 0%, SMA 0%, Desmin 50%, CD34 13%, STAT6 0%, ER 80%であり、既報の如く特徴的な所見は認めなかった。

【結果 - AFST の分子遺伝学的分析】

AFST 16 症例のうち、FISH 法で *NCOA2* rearrangement が認められた症例は 8 症例(50%)あり、5 症例（31%)は陰性、3 症例（19%)は蛍光プローブの発光を認めず判定不能であった。Split signal 陽性細胞の割合は平均 14.9%（9-22%)であった。RT-PCR 法では 3 症例(19%)で *AHRR* (exon 9)と *NCOA2* (exon 16)の融合遺伝子が認められた。既報告の AFST の融合遺伝子である *AHRR* (exon 10)-*NCOA2* (exon 14)、*AHRR* (exon 9) -*NCOA2* (exon 14)、*AHRR* (exon 8) -*NCOA2* (exon 14)、*NCOA2* (exon 15)- *AHRR* (exon 10)、*NCOA2* (exon 13)-*AHRR* (exon 11)、稀な遺伝子融合である *GTF2I* (exon 14)-*NCOA2* (econ 15)、*GAB1* (exon 6)-*ABL1* (exon 2)に関しても RT-PCR で検索を行ったが、これらの融合遺伝子は認めなかった。

【結果 - AFST と鑑別疾患群における CYP1A1 の発現】

AFST 16 症例に対する抗 CYP1A1 抗体を用いた IHC では、13 症例で IRS≧2 であり感度は 81.2%であった。AFST における CYP1A1 IHC の染色性は、細胞質に中から強度の反応を示し（IS 2-3)、IHC 陽性細胞の割合は全症例で平均 39% (10-70%、PS 1-3)であった。IHC は紡錘形細胞のみに陽性反応がみられ、増生血管を構成する細胞には認められなかった。

CYP1A1 IHC が陰性であった３症例では、FISH と RT-PCR のいずれにおいても融合遺伝子は同定されなかったが、全症例とも典型的な AFST に特徴的な組織学的特徴を認めた。

AFST 16 症例のうち、摘出検体とは別に生検検体が得られた 5 症例についても CYP1A1 IHC を行い、全症例とも陽性の結果であった。

AFST と鑑別すべき類似疾患に対する CYP1A1 IHC の結果は myxofibrosarcoma 3/31 例（１症例 IRS 3、２症例 IRS 6; 9.6%）、solitary fibrous tumor 2/22 例（IRS 3、IRS6; 9.1%）、neurofibroma 1/27 例（IRS 2; 3.7%)のみに認め、特異度は 97.3%であった。

【考察】

AFST が 2012 年にはじめて報告されて以降、AFST の様々な形態学的、分子遺伝学的特徴が明らかになってきている。しかし、AFST は幅広い組織形態学的スペクトラムを示すため病理組織学的診断に難渋することが多く、特に小さな検体における診断は疾患特異的な診断マーカーがないこともあり、困難であるといえる。AFST では 60-80%の症例で *AHRR-NCOA2* 遺伝子変異を認めることが知られており、その遺伝子変異の結果発現が増幅する AhR/ARNT シグナル系の CYP1A1 に着目した。AFST と鑑別すべき類似疾患に対し抗 CYP1A1 抗体を用いた IHC を行い、感度 81.2%、特異度 97.3%の結果を得た。

我々の研究では、FISH もしくは RT-PCR による分子遺伝学的検索で 50%の症例に *NCOA2* rearrangement を認めた。FISH における Split signal 陽性細胞の割合は平均 14.9%であり、比較的低いものであったが、既報においても 7-36%程度であり、増殖した紡錘形細胞のうち腫瘍細胞の割合は比較的低い可能性が考えられた。このことは、CYP1A1 IHC 陽性細胞の割合の平均が 39% (10-70%)であった結果と相反するものであり、全ての CYP1A1 IHC 陽性細胞が腫瘍細胞であるかについては議論の余地があると考えられる。ただし、CYP1A1 IHC と FISH については異なる検査法であるため、真に腫瘍細胞であるか否かについての判定や比較はできないが、CYP1A1 IHC 陽性細胞の一部が非腫瘍細胞である可能性も否定することはできない。この結果については、腫瘍細胞における増幅した CYP1A1 によるリガンドの代謝物が傍分泌によって非腫瘍細胞の内因性 AhR/ARNT シグナル系を活性化させ、非腫瘍細胞においても CYP1A1 の過剰発現をきたしている可能性を推察した。

AHRR は AhR と ARNT へのヘテロ二量体化の競合をし、C 末端に転写抑制ドメインを有すると考えられている。AHRR-ARNT ヘテロ二量体は *AHRR* を含む標的遺伝子へ結合し遺伝子の発現を抑制することが知られている。我々の RT-PCR の結果得られた *AHRR* (exon 9) と *NCOA2* (exon 16)によるキメラ蛋白には AHRR の C 末端に見られる転写抑制ドメインの欠損がみられた。一方、AhR と高い相同性をもつ AHRR の N 末端側のドメインと、NCOA2 の C 末端に存在する転写活性ドメインが AHRR/NCOA2 キメラ蛋白には残っているため、AHRR/NCOA2 キメラ蛋白は内在性の ARNT と二量体を形成し、AhR/ARNT シグナル系の活性化を惹起し、最終的に *CYP1A1* をはじめとする下流遺伝子の転写活性が起こっているものと考えられた。

CYP1A1 陽性であった AFST の症例のうち、3 例を除いて詳細な融合遺伝子の証明をすることはできなかったが、CYP1A1 の過剰発現という結果から *AHRR* 、*NCOA2* を含む既報以外の融合パターンも考えられた。また、CYP1A1 陽性であったにもかかわらず *NCOA2* の split signal を認めなかった 1 例と CYP1A1 陰性かつ *NCOA2* rearrangement を認めなかった 3 症例はいずれも典型的な AFST の病理所見を認めることから、AFST の病因となる融合遺伝子は *NCOA2* 以外にも存在する可能性が考えられた。一方、*AHRR-NCOA2* 融合遺伝子が検出されたものにも関わらず FISH で偽陰性だった症例が 1 例あり、*NCOA2* の複雑な分離メカニズムが存在する可能性も示唆された。

最後に、AFST の対象症例、遺伝子変異が同定できた症例の少なさという制約はあるものの、CYP1A1 IHC は AFST において感度、特異度ともに高く、診断的有用性があるものと考える。

神戸大学大学院医学研究科（博士課程）

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|---|---|---|---|
| 受付番号 | 甲　第3301号 | 氏　　名 | 植村　光太郎 |
| 論文題目<br>Title of Dissertation | CYP1A1 Is a Useful Diagnostic Marker for Angiofibroma of Soft Tissue<br><br>CYP1A1は軟部血管線維腫の診断に有用なマーカーである | | |
| 審査委員<br>Examiner | 主　　査<br>Chief Examiner 寺師浩人<br>副　　査<br>Vice-examiner 仁田亮<br>副　　査<br>Vice-examiner 黒田良祐 | | |

（要旨は１，０００字～２，０００字程度）

軟部血管線維腫 angiofibroma of soft tissue (AFST)は Marino-Enriquez と Fletcher らによって 2012 年に報告された良性の軟部組織腫瘍である。AFST の分子遺伝学的特徴として、t(5;8)(p15;q13) の染色体転座を認め、その結果 *AHRR* (aryl hydrocarbon receptor repressor)-*NCOA2* (nuclear receptor coactivator 2)、もしくは *NCOA2*-*AHRR* の相互転座による遺伝子融合が見られる。 AFST の病理組織像は異型のない均質な紡錘形細胞の腫瘍性増殖と、その間隙を縫うように壁の薄い細かい血管の増生が特徴的である。背景は粘液性、線維性の間質が混在し、部位によって様々な組織学的スペクトラムを示すため、粘液線維肉腫、孤在線維性腫瘍、粘液型脂肪肉腫などの悪性のものを含むさまざまな軟部組織腫瘍との鑑別が、病理組織学的に困難であることが知られている。 AFST の診断においては Fluorescence in-situ hybridization (FISH)や reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR)によって変異遺伝子を同定する方法などの報告はあるが、臨床病理の場において簡易に高精度で適応できる診断マーカーは存在しない。2012 年に報告された AFST の包括的遺伝子発現解析で、染色体転座の結果合成されたキメラ遺伝子の発現によって AhR/ARNT (aryl hydrocarbon receptor/AhR nuclear translocator) シグナル系の標的遺伝子であるシトクロム p450 1A1 (*CYP1A1*)の発現が、粘液線維肉腫と比較して亢進していることが明らかにされた。このことから、CYP1A1 が AFST の診断に有効な簡便な IHC マーカーとなりうるのではないかという仮説を立てた。

AFST 16 症例を対象とし、IHC (CYP1A1, EMA, S100, SMA, Desmin, CD34, STAT6, ER)、FISH (*NCOA2*)、RT-PCR (forward *AHRR*, reverse *NCOA2*)を行った。AFST と鑑別すべき類似疾患として、様々な程度で粘液性、線維性の間質を背景に血管増成を特徴とする 224 症例 (aggressive angiomyxoma 2 例、angioleiomyoma 15 例、cellular angiofibroma 2 例、desmoid fibromatosis 17 例、fibroma of tendon sheath 18 例、low-grade fibromyxoid sarcoma 11 例、myxofibrosarcoma 31 例、myxoid liposarcoma 13 例、myxoma 14 例、nodular fasciitis 9 例、hybrid nerve sheath tumor 7 例、schwannoma 29 例、neurofibroma 27 例、perineurioma 2 例、solitary fibrous tumor 22 例、superficial angiomyxoma 2 例、deep thrombus 3 例)を対象に CYP1A1 IHC を行った。 CYP1A1 IHC の評価は既報を参照に immunoreactivity staining score (IRS)を用いた。IHC 陽性細胞の割合を評価する proportion score (PS; score 0 = 0% positive cells, score 1 = <10%, score 2 = 10-50%, score 3 = 51-100%)と IHC の染色強度を評価する intensity score (IS; 0 = negative, 1 = weak, 2 = intermediate, 3 = strong)の積で IRS を求め、IRS ≧ 2 の症例を CYP1A1 positive とした。FISH の判定は既報に倣い、最低 50 個の核をカウントし、オレンジとグリーンのシグナルが、シグナルの直径の 2 倍以上の離れていた場合に split signal 陽性とし、7%以上の細胞に split signal が認められる場合を *NCOA2* rearrangement ありとした。RT-PCR 産物を精製したものをサンガー法で junctional point を含む塩基配列のシーケンスを行なった。

AFST 16 症例の内訳は、女性 9 例、男性 7 例、年齢の中央値は 56 歳（17-78 歳）であった。75%の症例 (12/16)が四肢に発生していた。最大腫瘍径の中央値は 4.9cm (1.7-11cm)であった。7 例が辺縁切除、4 例が拡大切除で摘出されており、残りの 5 例の切除方法については情報が得られなかった。全症例において豊富な小型血管網をさせ、異型に乏しい紡錘形細胞が増生する AFST に特徴的な病理組織学像を認めた。既知の軟部組織腫瘍の鑑別に用いられる IHC マーカーに対する染色性は既報の如く特徴的な所見は認めなかった。

AFST 16 症例のうち、FISH 法で *NCOA2* rearrangement が認められた症例は 8 症例 (50%)あり、5 症例 (31%)は陰性、3 症例 (19%)は蛍光プローブの発光を認めず判定不能であった。Split signal 陽性細胞の割合は平均 14.9% (9-22%)であった。RT-PCR 法では 3 症例 (19%)で *AHRR* (exon 9)と *NCOA2* (exon 16)の融合遺伝子が認められた。AFST 16 症例に対する抗 CYP1A1 抗体を用いた IHC では、13 症例で IRS≧2 であり感度は 81.2%であった。AFST における CYP1A1 IHC の染色性は、細胞質に中から強度の反応を示し (IS 2-3)、IHC 陽性細胞の割合は全症例で平均 39% (10-70%、PS 1-3)であった。IHC は紡錘形細胞のみに陽性反応がみられ、増生血管を構成する細胞には認められなかった。CYP1A1 IHC が陰性であった 3 症例では、FISH と RT-PCR のいずれにおいても融合遺伝子は同定されなかったが、全症例とも典型的な AFST に特徴的な組織学的特徴を認めた。AFST 16 症例のうち、摘出検体とは別に生検検体が得られた 5 症例についても CYP1A1 IHC を行い、全症例とも陽性の結果であった。AFST と鑑別すべき類似疾患に対する CYP1A1 IHC の結果は myxofibrosarcoma 3/31 例 (1 症例 IRS 3、2 症例 IRS 6; 9.6%)、solitary fibrous tumor 2/22 例 (IRS 3、IRS6; 9.1%)、neurofibroma 1/27 例 (IRS 2; 3.7%)のみに認め、特異度は 97.3%であった。

本研究は AFST の分子遺伝学的知見から CYP1A1 の異常発現を免疫染色によって明らかにしたものであるが、FISH や RT-PCR といった AFST に対する従来の分子遺伝学的検索よりも感度が高く、また、鑑別疾患群との比較においても特異度が高いという結果から CYP1A1 が AFST の IHC マーカーとして有用であるという重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって本研究は博士 (医学)の学位を得る資格があると認める。