

非定型奇形腫様・ラブドイド腫瘍の診断における fluorescence *in situ* hybridization を用いた22番染色体長腕欠失検索の有用性

曾根美智子 岩井 艶子¹⁾ 夫 敬 憲²⁾ 中 島 公 平²⁾
平生 三 郎 横 田 一 郎³⁾ 伊 藤 道 徳¹⁾ 中 川 義 信²⁾

IRYO Vol. 61 No. 7 (466-471) 2007

要 旨

非定型奇形腫様・ラブドイド腫瘍 atypical teratoid/ rhabdoid tumor (AT/RT) は中枢神経系胎児性腫瘍の中でもきわめて悪性の腫瘍である。分子発病的に AT/RT の発生には22番染色体長腕11.2 (22q11.2) 領域にある *SMARCB1* 癌抑制遺伝子が関与することが知られている。AT/RT の腫瘍分類において *SMARCB1* 遺伝子の分子遺伝学的解析は重要であるが、臨床検査として *SMARCB1* 遺伝子の突然変異を同定するのは困難である。そこで市販プローブ (DiGeorge/VCFS region probe: CYTOCELL 社, LSI *BCR/ABL* probe: VYSIS 社) を使い、*SMARCB1* 遺伝子を含む22q11.2領域の検索を行った。プローブは近位マーカーとして *BCR* と *TUPLE1*, 遠位マーカーとして22qtelomere を使用した。検査したのは AT/RT が疑われた中枢神経系胎児性腫瘍の4症例 (AT/RT 3例, 脈絡叢癌1例) である。凍結標本を用いた fluorescence *in situ* hybridization (FISH) により、4例すべてにおける22q11.2領域の欠失を迅速に検出した。染色体検査で4例中2例の22番染色体長腕部分欠失と、1例の22番染色体モノソミーを確認し、他の染色体異常を認めなかった。FISHの結果は、*SMARCB1* 遺伝子領域の欠失を示唆するものであった。*SMARCB1* 遺伝子領域欠失を迅速に検索するために、凍結標本を用いた FISH は臨床検査として有用と考えられた。

キーワード 非定型奇形腫様・ラブドイド腫瘍, *SMARCB1* 遺伝子, *SNF5/INT1* 遺伝子, FISH, 22番染色体長腕11.2

はじめに

中枢神経系胎児性腫瘍の中で非定型奇形腫様／ラブドイド腫瘍 atypical teratoid/rhabdoid tumor (AT/RT) は2000年にWHO脳腫瘍分類に新規登録された乳幼児に発生するきわめて悪性の腫瘍である¹⁾。この腫瘍には染色体22q11.2の欠失が認められる²⁾。この領域から、Versteeg³⁾らによって9つ

のエクソンを含み、およそ50kbにわたるがん抑制遺伝子 *SMARCB1*(*SNF5/INI1*) の突然変異が特定された。多くの AT/RT で *SMARCB1* 遺伝子の欠失や突然変異が検出されている⁴⁾⁻⁶⁾。生殖細胞にも変異が認められており、*SMARCB1* 遺伝子の突然変異による家族例も報告されている⁷⁾。

AT/RT の予後はきわめて悪く、適切な治療を行うために早期の正確な診断が必須である。この腫瘍

国立病院機構香川小児病院 研究検査科 1) 小児科 2) 脳神経外科 3) 臨床研究部
別刷請求先: 曾根美智子 国立病院機構香川小児病院 研究検査科 〒765-8501 善通寺市善通寺町2603番地
(平成18年10月6日受付, 平成19年1月19日受理)

Fluorescence *in situ* Hybridization Useful in Clinical Analysis to Search Quickly for Deletion of the Chromosome 22 for Diagnosis of Atypical Teratoid/rhabdoid Tumor

Michiko Sone, Tsuyako Iwai¹⁾, Kyonhon Pooh²⁾, Kouhei Nakajima²⁾, Saburo Hirabae, Ichiro Yokota³⁾, Michinori Ito¹⁾ and Yoshinobu Nakagawa²⁾

Key Words: atypical teratoid/rhabdoid tumor, *SMARCB1*, *SNF5/INI1*, FISH, 22q11.2



Line drawing depicting chromosome 22q and the locations of various loci. the distance between individual genes is given in megabases (Mb), and the centromere (C) and telomeric (T) end are also indicated.

Fig. 1

を組織型のみで診断することは困難であり，識別のために免疫組織学的所見が必要である⁸⁾⁹⁾．免疫組織化学的検索に加えて *SMARCB1* 遺伝子検索をルーチン検査として実施することができれば，診断的有用性が高まることが期待される．

われわれは *SMARCB1* 遺伝子を含んだ領域を検索するために，近位マーカーとして *BCR* と *TUPLE1*，遠位マーカーとして22テロメアの3つの市販プローブを使用して間期細胞 FISH を行い，併せて染色体分析を行った．この検査は中枢神経系胎児性腫瘍のうち AT/RT が疑われた4症例において，早期診断の補助として有用であったので報告する．

症 例

症例1 7カ月男児．主訴；嘔吐．既往歴，家族歴；特記すべきことなし．現病歴；CT, MRT にて小脳橋角部に腫瘤を認めた．腫瘍は小脳直下であり，暗褐色でやや硬く易出血性であり，病理診断で AT/RT と診断された．9カ月を経過した現在も画像・髄液細胞診で再発は認められていない．

症例2 2歳女児．主訴；元気がない，食欲低下，嘔吐，右眼瞼下垂．既往歴，家族歴；特記すべきことなし．現病歴；CT, MRT にて右側頭葉内側部に脳腫瘍を認め，腫瘍摘出術を行った．病理診断は AT/RT であった．再手術で残存腫瘍を摘出し，化学療法に一時反応したが髄膜内播種を認め，次第に病状が進行して8カ月の経過で永眠した．

症例3 1歳男児．主訴；発熱，不機嫌．既往歴；水頭症にてシャント施行．家族歴；特記すべきことなし．現病歴；CT, MRT にて第3脳質内に腫瘤を認めた．病理診断は AT/RT であった．4カ月の経過で永眠した．

症例4 7カ月女児．主訴；嘔吐．既往歴；水頭症にてシャント施行．家族歴；特記すべきことなし．現病歴；CT, MRT にて両側小脳橋角部に腫瘤を認め，腫瘍摘出術を行った．その後化学療法と2回の手術を行うも，髄膜内転移を認め次第に病状が進行し1年7カ月の経過で永眠した．脈絡叢癌と診断された．

すべての症例において，両親からのインフォームドコンセントを得て検査が行われた．

使用プローブ

使用したプローブは，*TUPLE1* (DiGeorge / VCFS region probe with control probe two color direct labeled unique sequence probe: CYTOCELL 社) と *BCR* (LSI *BCR/ABL* dual color single fusion translocation probe: VYSIS 社) である．*SMARCB1* 遺伝子は22q11.2上であり，*TUPLE1* より4.3Mb，*BCR* より0.6Mb テロメア寄りに位置している (Fig. 1)．プローブの分析感度と特異性を評価するために，コントロールとして5人のPHA刺激正常ヒトのリンパ球培養細胞を用いた分析を行った．感度は各々50のメタフェーズにおいて，正確な領域にある4つの領域特異的シグナルの割合を確認した．また特異性は各々50のメタフェーズにおいてクロス交雑している割合を確認した (Table 1)．この分析特性から両プローブの当院での分析能力を95%として分析結果を判定した．

方 法

腫瘍の一部はただちに凍結し，厚さ4μmの凍結標本を作成した．HE染色にて腫瘍細胞が確認された (Fig. 2) 凍結標本を用いて，FISH基準法¹⁰⁾に従って実施した．すなわち標本をただちに風乾し，2×SSCにて37℃30分間の前処理を行ったの

Table 1 Analytical validation (counting data for 50 nuclei)

DiGeorge/VCFS region probe with control probe two colour direct labeled unique sequence probe : CYTOCELL

ID No.	sensitivity	specificity
060146	100.0	98.0
060147	98.0	100.0
060149	96.0	88.0
060152	90.0	100.0
060157	98.0	100.0
mean	96.4	97.2

LSI BCR/ABL dual color single fusion translocation probe: VYSIS

ID No.	sensitivity	specificity
060146	100.0	96.0
060147	98.0	98.0
060149	98.0	98.0
060152	98.0	94.0
060157	100.0	100.0
mean	98.8	97.2

sensitivity : percentage of score able metaphase cells with appropriate number of distinct signals

specificity : percentage of signals from non target sites

Analytical sensitivity and specificity established by analysis of the probe to chromosome representing 200 distinct genomic targets. We used cells from 5 chromosomally characterized individuals.

Table 2 Results of G-banded metaphase cells and FISH analyses

Case No.	Age & Sex	Karyotype	FISH (TUPLE1, 22qtelomere)	FISH (BCR)
1	7m Male	46,XY,del(22)(q11.2)[9]	TUPLE1×1, 22qtel×1[50]	BCR×1[50]
2	2y Female	46,XX,del(22)(q11.2)[30]	TUPLE1×2, 22qtel×1[50]	BCR×1[50]
3	1y Male	not done	TUPLE1×1, 22qtel×1[16]	BCR×1[13]
4	7m Female	45,XX,-22[7]	TUPLE1×1, 22qtel×1[80]	BCR×1[80]

The number of cells that constitute a clone is given in square brackets [] after the karyotype or information of FISH.

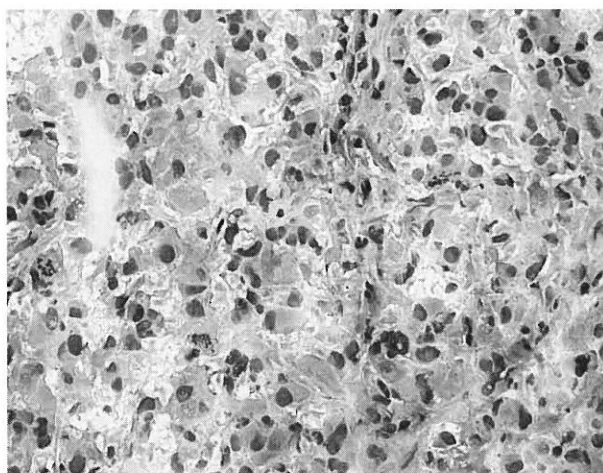
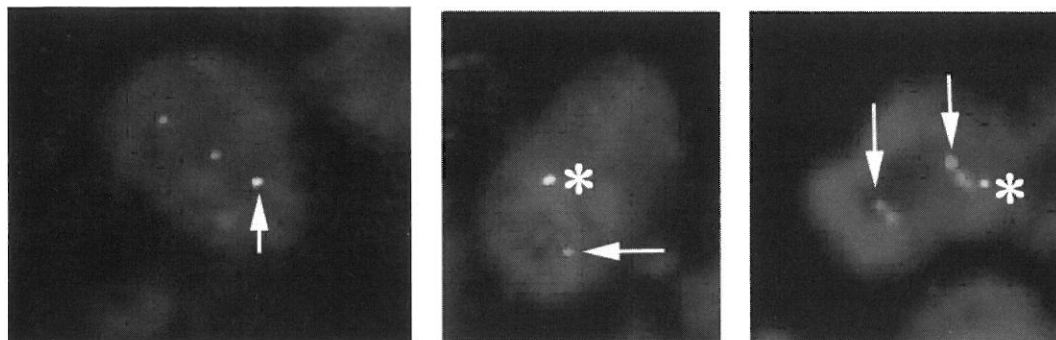


Fig. 2 HE staining frozen section of case No. 3 rhabdoid tumor suspected.

ちに脱水した。変性はプローブと標本を重ね合わせてホットプレート上で75℃ 5分間行った。ハイブリダイゼーションは37℃で一晩行った。翌日73℃ 2分間ホルムアミドフリー洗浄したのち、40ng/ml DAPI/antifade にて対比染色し、蛍光顕微鏡で細胞を観察した。細胞は独立して重なりのないものを選び、13細胞から80細胞カウントし、クローナルな異常を検出した。

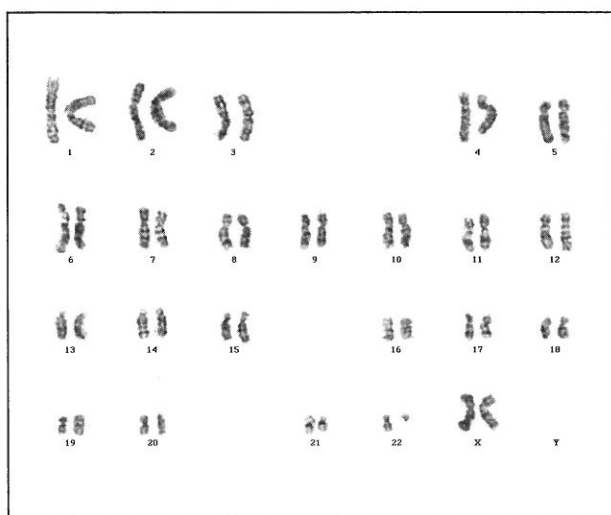
結 果

FISH によって *BCR*, *TUPLE1* および 22 テロメアに欠失を認めた (Table 2, Fig. 3). 症例 2 では *TUPLE1* を 2 コピー認めたため、この座位は正常であり、*BCR* と 22q テロメアは 1 コピーであったため、切断が *TUPLE1* と *BCR* の間で生じていると判定した。染色体検査では症例 1, 2 が 46,XY,del(22)(q11.2) で 22 番染色体長腕部分欠失であり (Fig. 4), 症例 4 が 45,XX,-22 で 22 番染色体モノソミーであった。症例 3 は実施しなかった。



Left: nuc ish 9 q34 (ABL× 2), 22q11. 2 (BCR× 1) ↑, a deletion of BCR signal.
 Center: nuc ish 22q11. 2 (TUPLE 1× 1) ←, 22q ter(22qtelomere× 1) *, a deletion of TUPLE 1 signal and 22q telomere signal.
 Right: nuc ish 22q11. 2 (TUPLE 1× 2) ↓, 22q ter(22q telomere× 1) *, a deletion of only 22q telomere signal.

Fig. 3 FISH analysis



A karyotype with terminal deletion in band 22q11.2 (Case No. 2)

Fig. 4

考 察

Sevenetら⁴⁾は高精度液体クロマトグラフィーによる分析で229例の起源の異なる腫瘍の *SMARCB1* 遺伝子突然変異を検索して、31例のホモ接合欠失と36例の突然変異を検出しており、腎外軟部組織発生の悪性ラブドイド腫瘍では18例中17例の突然変異を検出している。Biegel¹¹⁾らはcPNET、髄芽腫と診断された52例について *SMARCB1* 遺伝子を検索し、16例(30%)の22モノソミー、22q11.2部分欠失を検出している。うち4例(4/16)には *SMARCB1* 遺伝子の突然変異があり、追加検索が可能であった1例において小さなラブドイド細胞領域を検出し

たため、診断がAT/RTに変更されている。またJudkins¹²⁾らは、28例の脈絡叢癌の *INI1* 蛋白を検索して7例の非発現を認めており、これらの著者はAT/RTや脈絡叢癌、cPNET、髄芽腫を含む中枢神経性腫瘍の多様性への、*SMARCB1* 遺伝子突然変異の関与を示唆している。Rickert¹³⁾らは comparative genomic hybridization (CGH) による報告で、7例のAT/RT中7例(100%)において22番染色体の欠失を認めており、22番染色体の欠失はAT/RT診断の実用的価値が高い検査であることを強調している。22番染色体の欠失はCGHや loss of heterozygosity (LOH)、およびFISHによる研究で、cPNETや髄芽腫、脈絡叢癌、脈絡叢乳頭腫においてもしばしば認められる。しかしこれらの腫瘍では、他の染色体異常を併せて認めることが特徴である^{14),15)}。われわれの症例では1例で確認できなかったが、他の3例のすべてにおいて22番染色体の欠失だけが認められた。*SMARCB1* 遺伝子の突然変異は生殖細胞においても認められることが報告されており^{6),7),11),16)}、Janson¹⁶⁾らは2人の健康なキャリアーを含むAT/RTの3代の家族を調査し、AT/RTが疑われるすべての患者において突然変異の検索が重要であるとしている。

われわれは凍結標本を用いてFISHを実施した4症例において、BCRから22qテロメアまでの欠失があると迅速に判定した。凍結標本を用いた腫瘍細胞のFISHの標準法はなく、検査室内の基準に任されている。ACMGの細胞FISHの標準とガイドライン¹⁷⁾によれば、95%の信頼度で90%の感度の分析を実施し、30%モザイクを検出するためのカウント

数は39である。われわれは平均48 (13-80) の細胞において同じパターンのシグナル欠失を認め、染色体22q11.2領域の欠失があると迅速に判定した。4例中2例は染色体検査で22番染色体長腕部分欠失、1例は22番染色体モノソミーが確認された。その他の染色体異常は認めなかった。

SMARCB1 遺伝子領域はCGHやLOH, RT-PCRによって突然変異の検索が実施されているが、ルーチン検査としての実施は困難である。また*SMARCB1* 遺伝子領域のプローブを、確立した臨床検査試薬として検査室内で作成するのも困難といわざるを得ない。さらに22番染色体以外の染色体異常を確認するために染色体検査は重要であるが、検査に日数がかかることから早期の診断には適さない。われわれが行ったFISHは、①分析特異性が保証された市販プローブを使用している、②感度と特異性を検査室で管理している、③悪性が確認された凍結標本を用いた、④信頼性の高い正確な結果を迅速に得られた、⑤FISHを導入している施設が比較的多いことから、ルーチン検査としての使用が可能と考えられた。22q11.2領域の欠失が認められた症例はAT/RTの可能性があると、強力な化学療法を選択する有力な根拠とされた。4例中1例は9カ月を経過した現在も画像・髄液細胞診上再発は認められていない。今後AT/RTの診断と治療において、*SMARCB1* 遺伝子領域検索の必要性が高まることが予想されるが、われわれが行った凍結標本を用いたFISHはルーチン検査として有用な検査と考えられる。

ま と め

われわれは中枢神経系胎児性腫瘍の4症例(AT/RT 3例, 脈絡叢癌1例)において、*SMARCB1* 遺伝子を含んだ領域を迅速に検査するために、近位マーカーとして*BCR* と*TUPLE1*, 遠位マーカーとして22g テロメアの3つの市販プローブを使用して間期細胞FISHを行い、併せて染色体分析を行った。この結果、*BCR*, *TUPLE1* および22g テロメアに欠失を認めた。うち2例は染色体検査で22番染色体長腕部分欠失を、1例は22番染色体モノソミーを確認した。FISHによって得られた迅速な結果は、強力な化学療法を選択する有力な根拠のひとつとされた。凍結標本を用いたFISHによる22q11.2領域の検索は、迅速性と正確性から、臨床所見、組織所見、

MRIや免疫組織化学を補完する有用な検査であった。

本研究の要旨は第60回国立病院総合医学会において発表した。

[文献]

- 1) Kleihues P, Louis DN, Scheithauer BW et al: The WHO classification of tumors of the nervous system. *J Neuropathol Exp Neurol* 61: 215-229, 2002
- 2) Biegel JA, Rorke LB, Packer RJ et al: Monosomy 22 in rhabdoid or atypical tumors of the brain. *J Neurosurg* 73: 710-714, 1990
- 3) Versteeg I, Sevenet N, Lange J et al: Truncating mutations of hSMARCB1 in aggressive paediatric cancer. *Nature* 394: 203-206, 1998
- 4) Sevenet N, Lellouch-Tubiana A, Schofield D et al: Spectrum of hSMARCB1 somatic mutations in human cancer and genotype-phenotype correlations. *Hum Mol Genet* 8: 2359-2368, 1999
- 5) Rousseau-Merck MF, Versteeg I, Legrand I et al: hSMARCB1 inactivation is mainly associated with homozygous deletions and mitotic recombinations in rhabdoid tumors. *Cancer Res* 59: 3152-3156, 1999
- 6) Biegel JA, Tan L, Zhang F et al: Alterations of the hSMARCB1 gene in central nervous system atypical teratoid/rhabdoid tumors and renal and extrarenal rhabdoid tumors. *Clin Cancer Res* 8: 3461-3467, 2002
- 7) Sevenet N, Sheridan E, Amram D et al: Constitutional mutations of the hSMARCB1 gene predispose to a variety of cancers. *Am J Hum Genet* 5: 1342-1348, 1999
- 8) Sigauke E, Rakheja D, Maddox DL et al: Absence of expression of SMARCB1/INI1 in malignant rhabdoid tumors of the central nervous system, kidneys and soft tissue: an immunohistochemical study with implications for diagnosis. *Mod Pathol* 19: 717-725, 2006
- 9) Oda Y, Tsuneyoshi M: Extrarenal rhabdoid tumors of soft tissue: clinicopathological and molecular genetic review and distinction from other soft-tissue sarcomas with rhabdoid features. *Pa-*

- thol Int 56 : 287-295, 2006
- 10) 曾根美智子, 吉田繁, 河治康則他 : 臨床検査としての間期細胞 FISH 基準法の確立. 医学検査 54 : 1303-1309, 2005
- 11) Biegel JA, Fogelgren B, JY Zhou et al : Mutations of the INI 1 rhabdoid tumor suppressor gene in medulloblastomas and primitive neuroectodermal tumors of the central nervous system. Clin Cancer Res 6 : 2759-2763, 2000
- 12) Judkins AR, Burger PC, Hamilton RL et al : INI 1 protein expression distinguishes atypical teratoid/rhabdoid tumor from choroid plexus carcinoma. J Neuropathol Exp Neurol 64 : 391-397, 2005
- 13) Rickert CH, Paulus W : Chromosomal imbalances detected by comparative genomic hybridization in atypical teratoid /rhabdoid tumors. Childs Nerv Syst 20 : 221-224, 2004
- 14) Rickert CH, Wiestler OD, Paulus W : Chromosomal imbalances in choroid plexus tumors. Am J Pathol 160 : 1105-1113, 2002
- 15) Zakrzewska M, Rieske P, Debiec-Rychter M et al : Molecular abnormalities in pediatric embryonal brain tumors—analysis of loss of heterozygosity on chromosomes 1, 5, 9, 10, 11, 16, 17 and 22. Clin Neuropathol 23 : 209-217, 2004
- 16) Janson K, Nedzi LA, David O et al : Predisposition to atypical teratoid/rhabdoid tumor due to an inherited INI 1 mutation. Pediatr Blood Cancer 47 : 279-284. 2006
- 17) American College of Medical Genetics : Standards and Guidelines for Clinical Genetics Laboratories. 2006 Edition. E : Clinical Cytogenetics.

Fluorescence *in situ* Hybridization Useful in Clinical Analysis to Search Quickly for Deletion of the Chromosome 22 for Diagnosis of Atypical Teratoid/ Rhabdoid Tumor

Michiko Sone, Tsuyako Iwai¹⁾, Kyonhon Pooh²⁾, Kouhei Nakajima²⁾,
Saburo Hirabae, Ichiro Yokota³⁾, Michinori Ito¹⁾ and Yoshinobu Nakagawa²⁾

Abstract Atypical teratoid/ rhabdoid tumors (AT/RT) among the central nervous system tumors are highly malignant embryonal tumors. Mutation in the *SMARCB1* tumor suppressor gene located in the long arm of chromosome 22 band q11.2 (22q11.2) is regarded as a crucial step of AT/RT in the molecular pathogenesis. Analysis of molecular genetics of the *SMARCB1* gene is important in tumor classification of AT/RT, but the identifying of mutations in the *SMARCB1* gene is difficult in routine clinical analysis. Therefore commercial probes (DiGeorge / VCFS region probe: CYTOCELL, LSI *BCR/ABL* probe: VYSIS) were used for the search of the 22q11.2 region included in the *SMARCB1* gene, *TUPLE1* locus and *BCR* locus as proximal markers. A telomere probe of chromosome 22 was used as a distal marker. Using frozen specimens, we investigated four central nervous system tumors (three AT/RT, one choroid plexus carcinoma) by FISH (fluorescence *in situ* hybridization) and did chromosome analyses. The deletions of the 22q11.2 region were observed quickly in all four cases by FISH. Four of two cases were confirmed to have terminal deletions of the 22q11.2, one case was 22 monosomy as the only cytogenetic abnormality by chromosome analyses. The result of FISH suggested that loss of the *SMARCB1* gene region. It was concluded that using FISH on frozen specimens was useful as a clinical analysis to quickly search for deletion of the *SMARCB1* gene region for diagnosis of AT/RT.