頭頸部横紋筋肉腫の細胞・分子生物学的診断

杉本 徹¹⁾・細井 創²⁾・松村 隆文²⁾
白井 千晶²⁾・峯 宏²⁾・沢田 淳²⁾
河田 了³⁾・竹中 洋³⁾・村上 泰³⁾

Cellular and Molecular Biological Diagnosis of Rhabdomyosarcoma
Originating in the Head and Neck

Tohru Sugimoto

(Miyazaki Medical College)

Hajime Hosoi, Takafumi Matsumura, Chiaki Shirai,
Hiroshi Mine, Tadashi Sawada, Ryo Kawata,
Hiroshi Takenaka and Yasushi Murakami
(Kyoto Prefectural University of Medicine)

Histological differential diagnosis of malignant head and neck tumors in childhood, including malignant lymphoma, neuroblastoma and rhabdomyosarcoma, is occasionally difficult, since these tumors are classified as small-round-cell tumors. Recently we diagnosed and treated four children with rhabdomyosarcoma, originating in the head and neck. In three patients, immunohistological diagnosis using monoclonal antibodies against cytoskeletal proteins led to the accurate diagnosis of rhabdomyosarcoma. In the remaining one patient, the myogenic regulatory gene (MyoD1) RNA expression in the tumor tissue facilitated a final diagnosis of immature rhabdomyosarcoma.

The usefulness of immunohistological and molecular diagnosis of rhabdomyosarcoma is emphasized.

Key words : rhabdomyosarcoma, diagnosis, cytoskeletal protein, myogenic regulatory gene (MyoD1)

はじめに

頭頸部に見られる原発悪性腫瘍は、小児悪性腫瘍の約5%と比較的まれである¹⁾。頭頸部の原発悪性腫瘍には、悪性リンパ腫、軟部組織腫瘍、神経芽腫などがある。軟部組織腫瘍では横紋筋肉腫が多く、眼窩、鼻咽頭、耳、乳様突起、上顎、舌、顔面の軟部組織を原発部位とし、頸部リンパ節転移で発症することがある¹⁾²⁾。

我々は最近4例の頭頸部原発の小児横紋筋肉腫を経験

した。これら4症例での横紋筋肉腫の確定診断には、細胞骨格蛋白の解析が3例で有効であった。また分子生物学的手法を用いて検討した筋分化制御遺伝子 (MyoD1) 発現が、残りの1例で有効であったので報告する。

対象と方法

1) 症 例

当院で経験した頭頸部原発の横紋筋肉腫4症例の臨床

1) 宮崎医科大学小児科学教室

2) 京都府立医科大学小児科学教室

3) 京都府立医科大学耳鼻咽喉科学教室

像を表 1 に示す.

①症例 ■ : 6 歳女児. 左上顎・鼻腔部腫瘍. 1987年 8 月左鼻閉塞, 9 月に左眼球結膜充血と眼球突出が出現した. MRI で左上顎洞に腫瘍を認め, 上顎洞前壁と側壁に骨欠損, また眼窩に腫瘍の浸潤を認めた. 前院での生検, HE 染色で小円形細胞腫瘍を認め, 嗅神経芽腫が最も疑われた. 中枢神経系への浸潤や遠隔転移は認められなかった. 血管塞栓術後, シスプラチン (CDDP) とピラルビシン (THP-ADR) で治療が開始されたが, 家族の希望で当院転科となった.

②症例 ■ : 14 歳男児. 左上顎・鼻腔部腫瘍. 1990年 1 月左眼球突出にて近医を受診, 当院入院となった. MRI で左上顎と鼻腔に腫瘍を認めた (図 1 A). 入院時

の骨髓検査で 65% の異常細胞を認めた (図 1 B).

③症例 ■ : 16 歳女子. 左頸部腫瘍. 1986 年 5 月左頸部腫瘤にて発症, 前院で横紋筋肉腫を疑われ, VAC 療法 (ビンクリスチン, アクチノマイシン D とシクロフォスファミド) の化学療法と手術が行なわれた. しかし局所再発のため, 1991 年 4 月当院転科となった. MRI では左頸部内頸動脈背外側に腫瘍が認められた (図 2). 当院での再発腫瘍の生検 HE でも, 横紋筋肉腫が疑われた.

④症例 ■ : 12 歳男児. 右上顎部腫瘍. 1992 年 1 月に右耳下腺部の腫脹が出現, 2 月に同部位に圧痛を認め, 近医を受診, 当科に入院となった. 初診時右頬部から耳下腺部にかけて腫脹, 局所の疼痛と開口障害を認め, 右

表 1 頭頸部原発の横紋筋肉腫 4 症例の臨床像

症例	■	■	■	■
年 齢	6 歳	14 歳	16 歳	12 歳
性 別	女	男	女	男
病期分類 (日本小児外科学会)	II	IV	Ia	Ia
組織診断	神経芽腫	横紋筋肉腫疑い	横紋筋肉腫疑い	未分化肉腫

図 1 骨髓転移細胞で横紋筋肉腫と診断可能であった症例 DH の MRI と細胞骨格蛋白の解析

A : MRI で左上顎と鼻腔に矢印で囲まれた腫瘍を認めた.

B : 骨髓検査では 65% に異常細胞を認めた (1,000 倍).

C : 骨髓転移細胞は, desmin と α -sarcomeric actin 陽性 (1,000 倍), その他の反応性より横紋筋肉腫と診断.

図2 細胞骨格蛋白の解析で横紋筋肉腫と診断された症例の頸部腫瘍
A, B: MRI で左頸部内頸動脈背外側に腫瘍を認めた。

頬粘膜には凹凸不整の腫瘍が突出していた。MRI では右下顎骨周辺、耳介下部から脳底部、側頭葉腹側に及ぶ腫瘍を認めた。右下顎骨は腫瘍の浸潤で融解していた(図3A)。原発腫瘍の生検では、紡錘形の腫瘍細胞を認め(図3B)、PAS染色陽性の顆粒が腫瘍細胞内に認められ、未分化肉腫と診断した。

2) 細胞骨格蛋白の解析

我々の研究室で腫瘍細胞の鑑別診断に用いている、細胞骨格蛋白と細胞質蛋白(myoglobin)抗体計7種の特異性と反応性を表2に示す³⁴⁾。

3) 筋肉分化制御遺伝子 MyoD1 の発現

total RNA を症例 KN の腫瘍組織より guanidine isocyanate cesium chloride で抽出した。10 μ g の total RNA を変性後、ホルムアルデヒドを含む1%アガロースゲルで分離、Northern blot 法で MyoD1 遺伝子発現を検討した。ヒト MyoD1 のプローブは、pBluescript SK⁺ からの 1.9 kb EcoRI full-length cDNA を使用した⁵⁾。

結 果

1) 細胞骨格蛋白と MyoD1 発現の解析

表3に4症例の細胞骨格蛋白の解析、MyoD1 発現と

確定診断を示す。

①症例: 生検材料を用いた腫瘍細胞の細胞表面膜抗原(KP-NAC8, KP-NAC9, KP-NAC10, HSAN1.2, PI153/3 と CD56 抗体による)の解析で、神経芽腫は否定された³⁶⁾。次に行なった細胞骨格蛋白の解析では、vimentin, desmin, α and γ -muscle actin と myoglobin が陽性を示し、免疫組織学的に横紋筋肉腫と診断した。確定診断は、組織学的所見と合わせ、胎児型横紋筋肉腫であった。

②症例: 初診時の骨髄検査で65%の異常細胞が認められた。細胞表面膜抗原の解析では、白血病・悪性リンパ腫と神経芽腫は否定された³⁶⁾。細胞骨格蛋白の解析では、vimentin, desmin, α and γ -muscle actin と α -sarcomeric actin が陽性で、入院当日に横紋筋肉腫の診断が可能であった(図1BとC)。頸部リンパ節転移巣の生検の組織学的診断は胞巣型横紋筋肉腫疑いであった。免疫組織学的には、vimentin, desmin, α and γ -muscle actin と α -sarcomeric actin が陽性で横紋筋肉腫と確定診断した。

③症例: 転院後の横紋筋肉腫が疑われた生検材料で、さらに細胞骨格蛋白の解析を行なった。その結果、vimentin と myoglobin が陽性を示し、横紋筋肉腫の確

図3 MyoD1 の発現で未分化横紋筋肉腫と診断可能であった症例の MRI と細胞骨格蛋白の解析
 A : MRI で右下顎骨周辺, 耳介下部から脳底部, 側頭葉腹側に及ぶ巨大な腫瘍を認めた.
 B : 生検腫瘍組織の HE 染色では, 紡錘形細胞が密に増殖, 未分化肉腫と診断(400倍).
 C : 間接蛍光抗体法による細胞骨格蛋白の解析では, 腫瘍細胞は vimentin のみ陽性(400倍).

表2 細胞骨格蛋白の解析に用いたモノクローナル抗体

抗体名	特異性	特異性
V-9	vimentin	間葉系細胞
DEU-10	desmin	骨格筋・心筋・平滑筋細胞
α -sr-1	α -sarcomeric actin	骨格筋・心筋細胞
HHF35	α and γ -muscle actin	骨格筋・心筋・平滑筋細胞
myoglobin	myoglobin	骨格筋細胞
neurofilament	neurofilament	神経細胞
K8, 13	cytokeratin	上皮細胞

定診断が可能となった。

④症例：生検腫瘍材料で細胞骨格蛋白の解析をさ
 らに行なった。その結果, vimentin のみ陽性で(図3C),
 desmin, α - and γ -muscle actin, cytokeratin, myoglobin
 と neurofilament はいずれも陰性で, 未分化肉腫と診断
 した。結局組織学的診断を上回る, 細胞骨格蛋白の解析
 の結果は, 得られなかった。

そこで生検腫瘍組織で筋肉分化制御遺伝子 MyoD1 の
 発現を検討した。図4に示すように, 横紋筋肉腫と診断
 された陽性コントロール(RMS1)と本患児の腫瘍組織
 (RMS2)で, MyoD1 発現が2.0 kb に認められた。以上

より未分化横紋筋肉腫と確定診断した。

考 案

横紋筋肉腫は, 小児期の最も頻度が高い軟部組織腫瘍
 で, 小児悪性腫瘍の4~8%を占める。その発生母地は,
 未分化な骨格筋細胞に由来, 腫瘍組織中に骨格筋分化に
 対応するさまざまな分化段階の腫瘍細胞が, 認められ
 ることがある。しかし腫瘍細胞の大多数は, いわゆる小円
 形細胞腫瘍であり, 神経芽腫, Ewing 肉腫, 悪性リン
 パ腫などの小円形細胞腫瘍との形態学的鑑別診断が困難
 なことが多い³⁾。頭頸部原発の小児悪性腫瘍は, 小児悪

表3 頭頸部原発の横紋筋肉腫4症例の細胞骨格蛋白解析と MyoD1 発現と確率診断

症 例				
vimentin	+	+	+	+
desmin	+	+	—	—
α -sarcomeric actin	NT	+	—	—
α and γ -muscle actin	+	+	—	—
myoglobin	+	NT	+	—
neurofilament	—	—		—
cytokeratin	—	—		—
免疫組織学的診断	横紋筋肉腫	横紋筋肉腫	横紋筋肉腫	未分化肉腫
MyoD1 mRNA 発現	NT	NT	NT	+
確定診断	胎児型横紋筋肉腫	胞巣型横紋筋肉腫	横紋筋肉腫	未分化横紋筋肉腫

NT=未検査

症例 DH では骨髓と生検腫瘍細胞の細胞骨格蛋白を検討した。

鑑別診断への有効性を検討した。

横紋筋肉腫の確定診断は、①組織学的に好酸性の豊富な細胞質と横紋を持つ腫瘍細胞(横紋筋芽細胞)、また②desmin, α and γ -muscle actin, α -sarcomeric actin と myoglobin などの筋特異的骨格蛋白の存在を免疫組織学的に証明することである。しかしすべての横紋筋肉腫の細胞が、これらの組織学的特徴や筋特異的骨格蛋白を発現しているわけではない。我々の4症例でも、注意深い組織学的観察で1例(症例■)のみで横紋筋芽細胞を認めることが出来た。

細胞骨格蛋白は、真核細胞の中に張りめぐらされた線維状の構造で、微小管、マイコフィラメントと中間フィラメントの3種の細胞内線維構造がある。細胞骨格蛋白は、特定の細胞に分布、細胞の同定または分化のマーカーになりうる。我々は、モノクローナル抗体を用いた細胞骨格蛋白の解析で、迅速かつ正確に横紋筋肉腫細胞株と腫瘍組織の同定が出来ることを報告してきた³⁾⁴⁾。用いた抗体の中では desmin, α and γ -muscle actin, α -sarcomeric actin と myoglobin が、横紋筋肉腫の鑑別診断に有効であった。

今回の頭頸部原発横紋筋肉腫4症例のうち、3症例で細胞骨格蛋白の解析は有効であった。すなわち症例■は、前院で神経芽腫と診断されていたが、細胞骨格蛋白の解析で、横紋筋肉腫の確定診断が可能となった。症例■は、骨髓転移細胞の細胞骨格蛋白の解析で、入院当日(頸部リンパ節転移の生検結果の1週間前)に、横紋筋肉腫の診断が可能となった。症例■は、再発腫

図4 症例■の腫瘍組織での MyoD1 遺伝子の発現

患児の腫瘍組織(RMS2)では2.0 kbにその発現を認めた。陽性コントロールとして横紋筋肉腫(RMS1)、陰性コントロールとしてWilms腫瘍(WT), malignant rhabdoid tumor (MRTK), 神経芽腫(NB1~4)を用いた。

性腫瘍の約5%を占め¹⁾、横紋筋肉腫、悪性リンパ腫、神経芽腫などの悪性腫瘍がある。

我々は、最近経験した頭頸部原発横紋筋肉腫4例の細胞骨格蛋白と1例の筋分化制御遺伝子(Myod1)を検討、

瘍組織の生検で組織学的に横紋筋肉腫が疑われ、細胞骨格蛋白の解析で横紋筋肉腫の確定診断が可能となった。しかし症例¹⁾は、組織学的検討と細胞骨格蛋白の解析では未分化肉腫としか診断出来なかった(表 3)。

近年 MyoD1, myogenin, MRF4 と myf-5 の 4 つの核蛋白が、胎生期の多能中胚葉細胞(mesodermal stem cell)を筋芽細胞(myoblast)、さらに筋管細胞(myotube)への分化を調節する筋分化制御遺伝子として同定された⁷⁾。MyoD1 遺伝子は、1986年 Lasser ら⁹⁾、Davis ら⁷⁾により発見された筋分化制御遺伝子である。最近 MyoD1 遺伝子を用いた横紋筋肉腫診断の有用性が、我々¹⁰⁾¹¹⁾、Tonin ら¹²⁾と Dias ら¹³⁾により報告されている。そこで組織学的に未分化肉腫と考えられる、症例¹⁾の腫瘍組織の MyoD1 の発現を検討した。その結果腫瘍組織に MyoD1 mRNA 発現が認められ、未分化横紋筋肉腫と確定診断した(図 4)。

近年腫瘍の診断は、腫瘍細胞の①組織学的検討のみならず、②細胞表面膜抗原、③細胞骨格蛋白、④染色体、⑤DNA・RNA 遺伝子診断などの検討で、一層正確に診断、また予後の予測が可能になってきた。このため生検または摘出腫瘍は、そのまま全部をホルマリン固定用のビン(病理パラフィン切片用)に入れず、種々の検討に用いることが大切である。DNA・RNA 解析用の検体保存のため、手術場に液体窒素を持参する必要がある。

以上最近経験した頭頸部原発横紋筋肉腫 4 症例で、細胞骨格蛋白と MyoD1 mRNA の解析が、その早期診断と鑑別診断に有用であった。特に MyoD1 mRNA の解析は、従来の方法では診断が困難な未分化横紋筋肉腫の診断に役立ったことを報告した。

ま と め

頭頸部原発の悪性腫瘍は、小児悪性腫瘍の約 5 % を占め、悪性リンパ腫、神経芽腫、横紋筋肉腫などがある。これらの腫瘍は、形態学的に小円形細胞腫瘍に分類され、その鑑別診断は困難なことがある。最近我々は、4 例の頭頸部原発の横紋筋肉腫を経験した。組織学的診断以外に細胞骨格蛋白を用いた免疫組織学診断が 3 例で有効、また筋分化制御遺伝子(Myod1)を用いた分子生物学的診断が 1 例で有効であった。生検または摘出腫瘍組織の細胞・分子学的検討の必要性を強調した。

文 献

- 1) Bonilla JA : Management of malignant head and neck tumors in children. *Pediatr Clin North Am* **36** : 1443~1450, 1989.
- 2) 杉本 徹, 沢田 淳 : 小児の頸部腫脹. *JOHNS* **7** : 125~129, 1991.
- 3) 杉本 徹, 松村隆文, 堀井由博, 他 : 細胞表面膜抗原, 細胞骨格蛋白と N-myc 癌遺伝子による小児固形悪性腫瘍の診断と問題点. *Hum Cell* **5** : 1~11, 1992.
- 4) 杉本 徹, 細井 創, 峯 宏, 他 : 横紋筋肉腫の細胞・分子生物学的診断. *小児科* **34** : 105~116, 1993
- 5) Scrabble HJ, Johnson DK, Rinchik EM, et al : Rhabdomyosarcoma-associated locus and MyoD1 are syntenic but separate locus and short arm of human chromosome 11. *Proc Natl Acad Sci* **87** : 2182~2186, 1990.
- 6) Sugimoto T, Sawada T, Matsumura T, et al : Identical expression of cell surface membrane antigens on 2 parent and 18 cloned cell lines derived from 2 different neuroblastoma metastases of the same patient. *Cancer Res* **46** : 4765~4769, 1986.
- 7) Davis RL, Cheng PE and Weintraub H : The MyoD DNA binding domain contains a recognition code for muscle-specific gene activation. *Cell* **60** : 733~746, 1990.
- 8) Wright WE, Sassoon DA and Lin VK : Myogenin, a factor regulating myogenesis, has a domain homologous to MyoD. *Cell* **56** : 607~617, 1989.
- 9) Lasser AB, Patterson BM and Weintraub H : Transfection of a DNA locus that mediates the conversion of 10T1/2 fibroblasts to myoblasts. *Cell* **47** : 649~656, 1986.
- 10) 細井 創, 杉本 徹, 堀井由博, 他 : 小児固形悪性腫瘍細胞株での骨格筋分化制御遺伝子(Myod1 と Myogenin) の発現. *医学のあゆみ* **162** : 489~490, 1992.
- 11) Hosoi H, Sugimoto T, Hayashi Y, et al : Differential expression of myogenic regulatory genes, MyoD1 and myogenin, in human rhabdomyosarcoma sublines. *Int J Cancer* **50** : 977~983, 1992.
- 12) Tonin PN, Scrabble H, Shimada H, et al : Muscle-specific gene expression in rhabdomyosarcoma and stages of human fetal skeletal muscle development. *Cancer Res* **51** : 5100~5106, 1991.
- 13) Dias P, Parham DM, Shapiro DN, et al : Myogenic regulatory protein(Myod1) expression in childhood solid tumors. *Am J Pathol* **137** : 1283~1291, 1990.

(原稿受付 : 平成 7 年 6 月 8 日
原稿採択 : 平成 7 年 8 月 3 日
別刷請求先 : 杉本 徹
〒889-16 宮崎県宮崎郡清武町大字木原5200
宮崎医科大学小児科学教室)