

令和 4 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15086

研究課題名(和文) 高悪性度EGFR変異型肺腺癌の分子病理(MUC21を指標とした網羅的変異検索)

研究課題名(英文) Molecular pathology of EGFR-mutated lung adenocarcinoma

研究代表者

松村 舞依 (MATSUMURA, Mai)

横浜市立大学・医学部・助教

研究者番号：50812997

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、高悪性度EGFR肺腺癌に特徴的な、微小乳頭状組織亜型の悪性度を規定する分子基盤の解明である。報告者はMUC21がこのような微小乳頭状成分に特異的に発現し、MUC21を高発現するがん細胞は特に悪性度が高いことを明らかにした。その後MUC21を指標に、同一腫瘍から微小乳頭状成分と非微小乳頭状成分をマイクロダイセクションで採り分け、次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、微小乳頭状成分のみに起こっている遺伝子変異を同定、特に高悪性化に関連すると予想される20個の遺伝子からなる「高悪性度EGFR肺腺癌パネル」を作成した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで肺がん臨床の現場で分子治療標的となる遺伝子変異は、腫瘍発生に関わるドライバー変異であった。我々が作成した「高悪性度EGFR肺腺癌パネル」に含まれる後発変異が治療標的となれば、EGFRチロシンキナーゼ阻害薬(EGFR-TKI)との併用により、腫瘍の悪性化や薬剤耐性化の阻止に役立つ可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our recent study demonstrated that malignant grade of EGFR-mutated lung adenocarcinoma (LADC) was determined by micropapillary (mPAP) element. I revealed that MUC21 was related to mPAP element of EGFR-mutated LADCs, and the tumors expressed MUC21 protein had poor prognosis. To uncover the potential molecular basis of mPAP element, I investigated somatic mutations specific to mPAP element in EGFR-mutated LADC. mPAP and other elements were separately collected from frozen tissue sections of EGFR-mutated LADC by the laser capture microdissection system and were subjected to whole exomes sequencing analyses. Through bioinformatics analysis, somatic mutations which was cofirmed by sanger-sequencing specific to mPAP elements were identified. Finally, I made "Highly malignant EGFR-mutated LADCs gene panel". These gene mutations might be related to the highly malignant activity of mPAP element.

研究分野：肺病理

キーワード：EGFR変異肺腺癌 MUC21 微小乳頭状亜型 全エクソーム解析 バイオインフォマティクス解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 研究開始当初の分子標的療法の進歩は目覚ましく、特に EGFR 遺伝子変異を持つ肺腺癌(以下 EGFR 肺腺癌)に対しては多くの分子標的薬が開発されていた。一方で、EGFR 肺腺癌は外科切除で完治するものも多く、全ての病変が分子標的療法の適応となるわけではなかった。実際に分子標的療法を要する高悪性度病変の性質を明らかにすることは、選択的な術後補助療法の適応を広げる可能性があると考えた。

(2) 報告者は、先行研究において、転移・再発を来した外科切除例と非切除進行例の病理組織学的特性の多数例解析から、EGFR 肺腺癌の悪性度が微小乳頭状の組織亜型の有無によって規定されていることを明らかにしていた (Matsumura M et al. 2016 PLoS One)。また、ポリクローナル抗体を用いた検証で、MUC21 が微小乳頭状成分に特異的に発現しており、中でもリンパ管侵襲を示すような高悪性度成分では特に高い発現がある可能性に迫りつつあった。この MUC21 陽性がん細胞は一つの腫瘍のなかでも領域を形成して広がる傾向があり、何らかの後発的な遺伝子変異の結果に生じたクローンであると推察された。

### 2. 研究の目的

- (1) MUC21 陽性がん細胞が EGFR 肺腺癌の悪性度を規定する重要な因子であることを多数例で検証し、MUC21 陽性肺腺癌の臨床病理学的性質を明らかにすること。
- (2) さらに、MUC21 陽性がん細胞(微小乳頭状成分)を単離し全エクソンシーケンスを行って高悪性度 EGFR 肺腺癌に特有の遺伝子異常の同定を試みることに。

### 3. 研究の方法

#### (1) MUC21 陽性肺腺癌の臨床病理学的性質の解析

神奈川県立循環器呼吸器病センターにおいて外科切除された肺腺癌 246 症例で、異なる糖鎖を認識する 3 種類の抗 MUC21 モノクローナル抗体を用いて免疫染色し、MUC21 と EGFR 肺腺癌の微小乳頭状成分との相関を調べた。さらに MUC21 陽性肺腺癌の臨床病理学的性質を解析した。

#### (2) 次世代シーケンスを用いた EGFR 肺腺癌の悪性度を規定する遺伝子変異の探求

MUC21 染色を用いることで高悪性度成分(微小乳頭状成分)を選別し、同一腫瘍からマイクロダイセクション法を用いて MUC21 陽性成分(微小乳頭状成分)と MUC21 陰性成分(非微小乳頭状成分)を採り分け DNA を抽出した。次世代シーケンサーによる全エクソン解析を行い、互いの遺伝子変異プロファイルを比較し、微小乳頭状成分のみに起こっている遺伝子変異を同定した。

これらの遺伝子変異を全エクソン解析に用いた症例においてサンガー法で検証し、候補遺伝子を絞り込んだ。

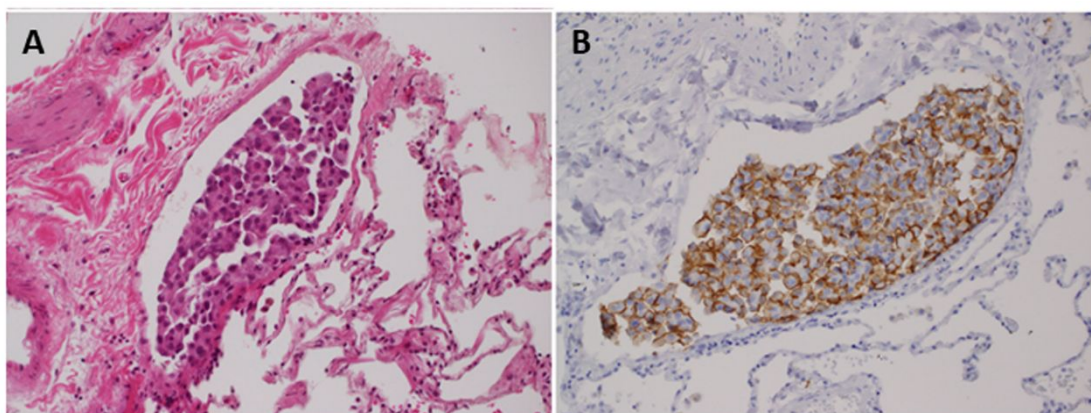
症例数を拡張し、EGFR 肺腺癌 30 例の凍結検体(微小乳頭状成分 20 例、非微小乳頭状成分 10 例)でアンプリコンシーケンスを行い、候補遺伝子における変異の頻度を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) MUC21 が EGFR 肺腺癌の高悪性度成分に特異的に発現する

ポリクローナル抗体を用いた MUC21 の免疫染色データをもとに、異なる糖鎖修飾を認識する 3 種類のモノクローナル抗体(MUC21-B, MUC21-C, MUC21-D)を用いた免疫染色を肺腺癌 246 例で行った。その結果、MUC21 そのものの発現レベルに加えて特殊な糖鎖修飾が、微小乳頭状亜型の構築やリンパ管侵襲性に関連し、中でも MUC21-D を高発現する肺腺癌は予後不良であることが解明され、論文化された(図 1:Matsumura M et al. 2019 PLoS One から引用)。

図 1: リンパ管侵襲を伴う MUC21-D 高発現肺腺癌の代表的な組織像

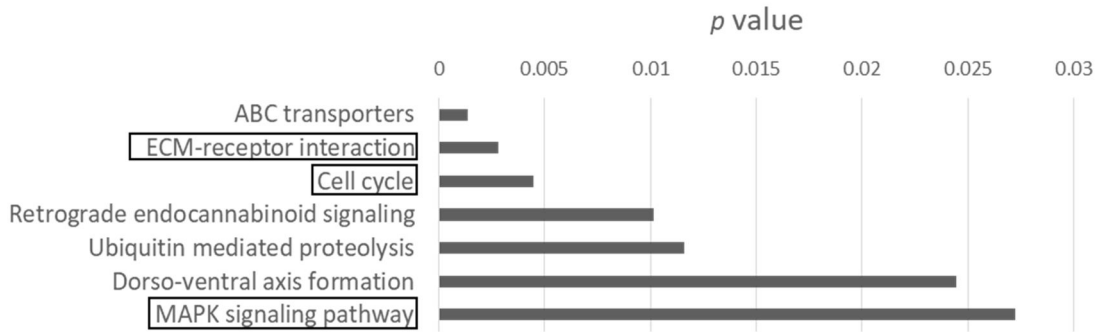


リンパ管内(A)に MUC21-D(B)を高発現する微小乳頭状亜型を示す腺癌を認める。

##### (2) 全エクソーム解析を用いた EGFR 肺腺癌の微小乳頭状成分に特異的な体細胞変異の検出

MUC21 染色を補助的に用い、EGFR 肺腺癌から微小乳頭状成分と非微小乳頭状成分を単離し、次世代シーケンサーを用いた全エクソームの比較解析を行った。その結果、微小乳頭状成分と非微小乳頭状成分それぞれの、tumor mutational burden は、前者で 2.9,後者で 2.6 と、微小乳頭状成分で高値を示した。Mutational burden は一般的に進行癌などの悪性度が高いほど多くなることが言われており、微小乳頭状成分の方が高悪性度であることを裏付けた。さらに、微小乳頭状成分に特有のサブクローナル遺伝子変異が複数同定され(Single-nucleotide variant 276 個、Insertion/deletion 27 個)、その中には細胞接着や細胞増殖など、がんの進展に関わる重要な遺伝子が多く含まれていた(図 2: 松村舞依 他, 日本癌学会学術総会, 2019 年)。

図2. EGFR肺腺癌の微小乳頭状成分に特異的な変異遺伝子のKEGG pathway 解析結果

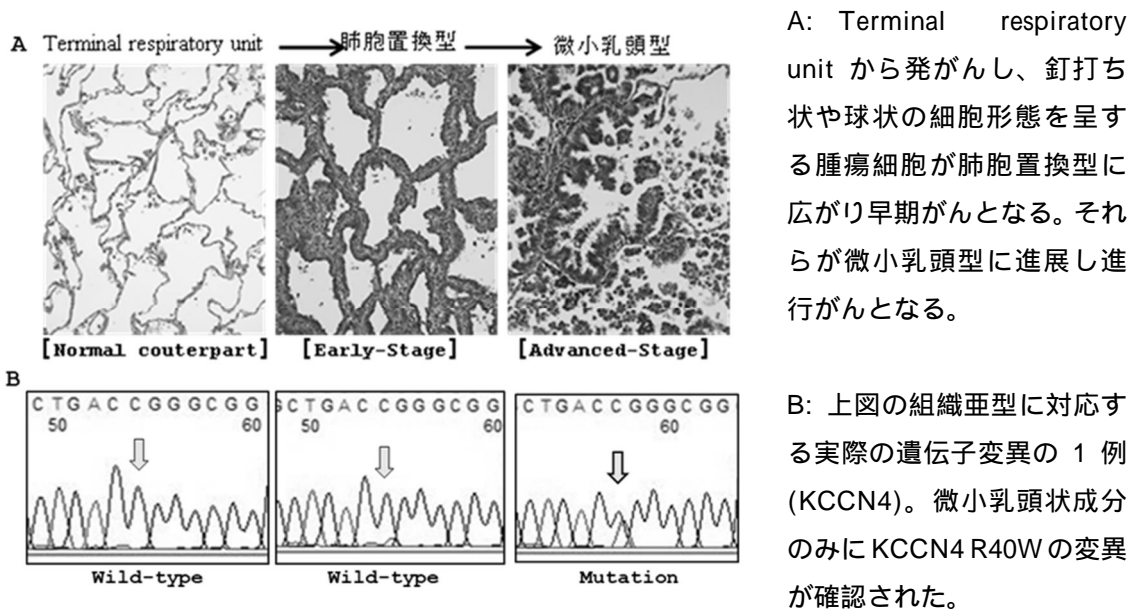


細胞接着に寄与するECM-receptor interaction (  $p=0.003$  ) やCell cycle (  $p=0.005$  ) に関係する遺伝子変異が有意に多く認められた。

### (3) 「高悪性度 EGFR 肺腺癌パネル」の作成

この中から TCGA(The Cancer Genome Atlas)や COSMIC (Catalogue of Somatic Mutations in Cancer)を用いた in silico 解析により、タンパク質機能に重要な影響を与える変異や病的意義が既に報告されている変異を抽出し、同一症例を用いたサンガー法での検証により 12 個の候補に絞り込んだ(図3)。さらに文献上で微小乳頭状成分や予後不良 EGFR 肺腺癌との関連が報告されている遺伝子 8 個(MET 増幅, CTNNB1 変異等)を加え、EGFR 肺腺癌の高悪性化に関連すると考えられる 20 個の遺伝子からなる「高悪性度 EGFR 肺腺癌パネル」を作成した(松村舞依他, 日本病理学会学術総会, 2021 年)。

図3. EGFR 変異型肺腺癌の組織発生の仮説図 (HE 染色)と実際のサンガーシーケンス波形



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 13件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Chihiro Koike, Koji Okudela, Mai Matsumura, Hideaki Mitsui, Takehisa Suzuki, Hiromasa Arai, Toshiaki Kataoka, Yoshihiro Ishikawa, Shigeaki Umeda, Yoko Tateishi, Kenichi Ohashi	4. 巻 Online ahead of print.
2. 論文標題 Frequent DYRK2 gene amplification in micropapillary element of lung adenocarcinoma - an implication in progression in EGFR-mutated lung adenocarcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Histology and Histopathology .	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-294	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsumura Mai, Okudela Koji, Nakashima Yu, Mitsui Hideaki, Denda-Nagai Kaori, Suzuki Takehisa, Arai Hiromasa, Umeda Shigeaki, Tateishi Yoko, Koike Chihiro, Kataoka Toshiaki, Irimura Tatsuhiro, Ohashi Kenichi	4. 巻 14
2. 論文標題 Specific expression of MUC21 in micropapillary elements of lung adenocarcinomas ? Implications for the progression of EGFR-mutated lung adenocarcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0215237
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0215237	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Kataoka T1, Okudela K2, Nakashima Y1, Mitsui H1, Matsumura M1, Umeda S1, Arai H3,4, Baba T5, Suzuki T1, Koike C1, Tateishi Y1, Tajiri M4, Takemura T6, Ogura T5, Masuda M3, Ohashi K1.	4. 巻 34(11)
2. 論文標題 Unique expression profiles of mucin proteins in interstitial pneumonia-associated lung adenocarcinomas.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 1243-1254
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-114	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Okudela Koji, Matsumura Mai, Arai Hiromasa, Woo Tetsukan	4. 巻 112
2. 論文標題 The nonsmokers' and smokers' pathways in lung adenocarcinoma: Histological progression and molecular bases	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 3411 ~ 3418
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/cas.15031	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計9件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Mai Matsumura, Koji Okudela, Chihiro Koike, Jun Nakabayashi, Hideaki Mitsui, Takehisa Suzuki, Toshiaki Kataoka, Shigeaki Umeda, Yoko Tateishi, Hiromasa Arai, Kenichi Ohashi
2. 発表標題 EGFR肺腺癌の微小乳頭状組織亜型に特徴的な体細胞遺伝子変異の解明
3. 学会等名 第108回日本病理学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mai Matsumura, Koji Okudela, Chihiro Koike, Jun Nakabayashi, Hideaki Mitsui, Takehisa Suzuki, Toshiaki Kataoka, Shigeaki Umeda, Yoko Tateishi, Hiromasa Arai, Kenichi Ohashi
2. 発表標題 Somatic mutations specific to micropapillary element in EGFR-mutated lung adenocarcinoma
3. 学会等名 第78回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 松村 舞依
2. 発表標題 Identification of somatic mutations promoting progression of EGFR-mutated adenocarcinoma
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------