

令和 4 年 6 月 16 日現在

機関番号：12601
研究種目：若手研究
研究期間：2018～2021
課題番号：18K15111
研究課題名(和文) 逆相蛋白質アレイを用いた胎児型肺腺癌の蛋白質発現解析と新たな治療標的候補の探索

研究課題名(英文) Expression analysis and search for novel molecular target of the fetal adenocarcinoma of the lung using a reverse phase protein array

研究代表者
鈴木 理樹 (Suzuki, Masaki)
東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：00770108
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：高悪性度胎児型肺腺癌(H-FLAC)は肺腺癌の稀な亜型である。本研究では、当初は逆相蛋白質アレイにより発現解析を行う予定であったが、ホルマリン固定後の組織検体による解析が困難だったため、RNA-seqにより発現解析を行った。その結果、通常型腺癌群に比べてH-FLAC群において有意なKMT2Cの発現低下が認められた。免疫組織化学的解析においても通常型腺癌群に比べてH-FLAC群において有意なKMT2Cの発現低下を認めた。一部のH-FLACではp53のびまん性陽性像や β -cateninの核への異常集積を認めた。H-FLACにおけるKMT2Cの機能異常がその腫瘍特性に関与している可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高悪性度胎児型肺腺癌(H-FLAC)では通常型腺癌に比べてKMT2Cの発現が低下している症例が多いことが明らかとなり、KMT2Cの機能異常が高頻度に生じていることが示唆された。KMT2Cはヒストンメチル化酵素として機能しており、この機能異常に基づくエピゲノム異常がH-FLACの特徴的な組織形態や臨床病理学的特徴に寄与している可能性が考えられる。また、これまでCTNNB1変異や β -cateninの異常集積はL-FLACの特徴とされてきたが、これらの所見はH-FLACにおいても低頻度にみられることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：High-grade fetal adenocarcinoma of the lung (H-FLAC) is a rare variant of pulmonary adenocarcinoma. Although expression analysis using a reverse phase protein array (RPPA) has planned in this study, we performed RNA-seq analysis because of difficulty of RPPA analysis using formalin fixed paraffin embedded tissues. The RNA-seq analysis showed that KMT2C expression was significantly lower in H-FLACs compared to that in common type pulmonary adenocarcinomas. Immunohistochemical analysis also showed significantly lower levels of KMT2C in H-FLACs compared to that in common type adenocarcinomas. Some H-FLACs showed diffuse p53 expression or aberrant β -catenin nuclear localization. Therefore, it was suggested that KMT2C dysfunction are potentially associated with the biological features of H-FLACs.

研究分野：人体病理学

キーワード：高悪性度胎児型腺癌 胎児型腺癌 肺腺癌 KMT2C

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌は肺癌の最も頻度の高い組織型であり、ドライバー遺伝子変異を基盤とした分子標的療法の開発が最も進歩している腫瘍の一つである。肺腺癌には形態学的にさまざまな組織亜型が存在し、そのうちの稀な組織亜型として胎児型肺腺癌がある。胎児型肺腺癌は胎児期の肺上皮に類似した特徴的な組織学的形態をとる腫瘍で、1982年にKradinらによって初めて報告された。その後、臨床病理学的な特徴により、胎児型腺癌を低悪性度の low-grade fetal adenocarcinoma (L-FLAC) と高悪性度の high-grade fetal adenocarcinoma (H-FLAC) に分類することが提唱され、新 WHO 分類(2015年)に取り入れられた。

L-FLAC と H-FLAC の大きな違いとして、L-FLAC は *CTNNB1* 変異を有し、免疫組織学的 β -catenin の核/細胞質への異常集積を示すのに対し、H-FLAC は *CTNNB1* 変異を示さず、免疫組織学的に膜陽性パターンを示す。また、H-FLAC は α -fetoprotein (AFP) をしばしば発現していることや、通常型肺腺癌に比べて既知のドライバー遺伝子変異(*EGFR* や *KRAS* など)の頻度が低率であることなどがわかっている。H-FLAC は L-FLAC や通常型肺腺癌とは異なる特徴的な腫瘍だが、腫瘍発生に関わる分子生物学的特徴についてはよくわかっていない。これを明らかにし、新たな治療標的の候補分子を同定することが本研究の課題である。

2. 研究の目的

蛋白質発現レベルの解析により H-FLAC の分子生物学的特徴を明らかにすることが本研究の目的である。本研究により H-FLAC に特徴的な分子生物学的異常を同定し、特有の腫瘍発生機序を解明することができれば、新たな分子標的治療法の開発へと発展していく可能性がある。また、H-FLAC は胃や卵巣などに生じる AFP 産生腫瘍と形態学的特徴や免疫組織学的特徴が類似しており、これらの腫瘍と共通した分子生物学的異常を有している可能性がある。AFP 産生腫瘍は高悪性で現在のところ有力な治療法はないが、H-FLAC の解析を進めることにより AFP 産生腫瘍の発生機序を統一的に理解し、新たな治療戦略の開発につながることを期待される。

3. 研究の方法

H-FLAC 成分を有する肺癌 16 例(以下、H-FLAC 症例)と通常型肺腺癌 16 例を対象とし、いずれも外科的切除材料のホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を用いた。通常型肺腺癌症例は H-FLAC 症例と年齢、性別、喫煙歴の有無、腫瘍病期がほぼ一致する症例から無作為に選んだ。

我々の全エクソシーケンシングを用いた先行研究 (Translational Lung Cancer Research 2021;10: 1292-1304) により、H-FLAC 症例において比較的高い頻度で *KMT2C* 変異を認めたため、*KMT2C* を対象に発現解析を行った。当初は逆相蛋白質アレイによる発現解析を行う予定だったが、条件検討の結果、FFPE 組織による解析は困難と判断されたため、RNA-seq と免疫染色による発現解析を行った。RNA-seq では、H-FLAC 症例では H-FLAC の成分を、通常型肺腺癌症例では腫瘍成分をそれぞれマクロダイセクションし、そこから RNA を抽出し、解析に用いた。KMT2C の免疫染色では、発現強度に応じて score 0~3+ (score 0: 陰性または 50% 未満の腫瘍細胞で弱陽性, score 1+: 50% 以上の腫瘍細胞で弱陽性, score 2+: 50% 以上の腫瘍細胞で中等度陽性, score 3+: 50% 以上の腫瘍細胞で強陽性) に分類して評価した。また、先行研究では一部の H-FLAC 症例において *TP53* や *CTNNB1* の変異も認めたため、p53 や β -catenin の免疫染色も行った。

4. 研究成果

対象症例の臨床情報のまとめを表 1 に示す。H-FLAC 症例は喫煙歴のある高齢男性例が多く、腫瘍病期 II 期以上の進行例が半数を占めていた。

RNA-seq の結果、通常型腺癌群に比べて H-FLAC 群において有意な *KMT2C* の発現低下が認められた ($p < 0.01$)。また *KMT2C* の免疫染色の結果では、通常型腺癌症例の半数が *KMT2C* 高発現だったのに対し、H-FLAC の腫瘍成分では半数が低発現を示した (図 1)。統計学的に解析 (Mann-Whitney U test) を行ったところ、H-FLAC の腫瘍成分における *KMT2C* の免疫染色の結果は通常型腺癌と比べて有意に低下していた ($p = 0.04$)。H-FLAC 症例における H-FLAC 成分と非 H-FLAC 成分の免疫染色の結果には有意差はみられなかった。また、*TP53* 変異を認めた 7 例のうち 6 例において p53 のびまん性陽性像を認めた。さらに、*CTNNB1* 変異を 2 例に認めていたが、その 2 例を含む計 3 例に β -catenin の核への異常集積を認めた。

以上より H-FLAC では通常型肺腺癌に比べて *KMT2C* の発現が低下している症例が多いことが明らかとなり、*KMT2C* の機能異常が高頻度に生じていることが示唆された。*KMT2C* はヒストンメチル化酵素として機能しており、この機能異常に基づくエピゲノム異常が H-FLAC の特徴的な組織形態や臨床病理学的特徴に寄与している可能性が考えられる。また、これまで *CTNNB1* 変異や β -catenin の異常集積は L-FLAC の特徴とされてきたが、これらの所見は H-FLAC においても低頻度にみられることが明らかとなった。

図 1

症例	KMT2C	
	胎児型成分	非胎児型成分
F1	1+	
F2	1+	2+
F3	1+	
F4	1+	1+
F5	2+	2+
F6	1+	2+
F7	1+	
F8	1+	1+
F9	1+	
F10	2+	3+
F11	2+	2+
F12	2+	2+
F13	3+	3+
F14	3+	3+
F15	3+	3+
F16	2+	2+
C1		3+
C2		3+
C3		2+
C4		3+
C5		3+
C6		3+
C7		2+
C8		2+
C9		1+
C10		3+
C11		1+
C12		2+
C13		3+
C14		1+
C15		2+
C16		3+

F1-16 : H-FLAC症例

C1-16 : 通常型肺腺癌症例

表1

	H-FLAC	通常型肺腺癌
症例数	16	16
年齢		
中央値	67	68
年齢幅	52-81	55-78
性別		
女性	3	3
男性	13	13
喫煙歴		
なし	2	2
あり	14	14
腫瘍病期		
IA	3	3
IB	5	5
IIA	3	3
IIB	2	2
IIIA	3	3

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Masaki Suzuki, Rika Kasajima, Tomoyuki Yokose, Hiroyuki Ito, Eigo Shimizu, Seira Hatakeyama, Kazuaki Yokoyama, Rui Yamaguchi, Yoichi Furukawa, Satoru Miyano, Seiya Imoto, Emi Yoshioka, Kota Washimi, Yoichiro Okubo, Kae Kawachi, Shinya Sato, Yohei Miyagi	4. 巻 10
2. 論文標題 Comprehensive molecular analysis of genomic profiles and PD-L1 expression in lung adenocarcinoma with a high-grade fetal adenocarcinoma component	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Translational Lung Cancer Research	6. 最初と最後の頁 1292-1304
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/tlcr-20-1158	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木 理樹
2. 発表標題 全エクソーム解析による高悪性度胎児型肺腺癌の遺伝子異常の解明
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 鈴木 理樹
2. 発表標題 Whole-exome sequencing of high-grade fetal lung adenocarcinomas
3. 学会等名 第16回日韓合同スライドカンファレンス（国際学会）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 理樹
2. 発表標題 高悪性度胎児型肺腺癌におけるKMT2C発現の解析
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------