

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：82729

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K08946

研究課題名(和文) 小児呼吸器腫瘍の網羅的遺伝子解析とプロテオーム解析を用いた創薬ターゲットの検索

研究課題名(英文) Comprehensive genetic and proteomic analysis of pediatric lung tumors for identification of drug targets

研究代表者

田中 水緒 (TANAKA, Mio)

地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・部長

研究者番号：60565232

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：小児呼吸器腫瘍は肺の発生異常や家族性の腫瘍素因が背景にあることや、喫煙などの環境要因の関与が少ないことなど成人の肺癌とは異なる病因で発症することが多い。腫瘍の種類も小児や若年に特有のものがあり、腫瘍の診断・治療には成人とは異なるアプローチが必要である。本研究では、次世代シーケンサーを用いて小児呼吸器腫瘍の細胞遺伝学的背景を解明し、創薬ターゲットとなりうる診断マーカーの確立を試みた。9例の小児肺腫瘍の検討を行い、新生児・乳児期に発生する胎児肺間質腫瘍(fetal lung interstitial tumor, FLIT)でFGFR4遺伝子の病的変異を見いだした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胎児肺間質腫瘍(fetal lung interstitial tumor, FLIT)は比較的新しい疾患概念であり、世界的にも20例程度の報告例を認めるのみである。FLITの一部にALK融合遺伝子が検出されることが既に報告されている。今回我々はALK融合遺伝子陰性・ $\beta$ -cateninのFLITにFGFR4遺伝子の病的変異を検出し、この結果、従来FLITと診断されてきた腫瘍が分子病理学的な異常を背景に少なくともALK融合遺伝子とFGFR4遺伝子の病的変異を持つ2グループが存在することが示され、これら遺伝子異常はいずれも遺伝子標的治療の開発進行中であり、治療法の選択肢が広がる可能性が期待される。

研究成果の概要(英文)：Pediatric lung tumors develop from different etiologies from adult lung cancer. They associate with congenital anomalies of lung development and familial tumor predisposition, and environmental factors such as smoking are less involved. Some tumor types are also unique to children and young adults, requiring a different approach to tumor diagnosis and treatment from that for adults. In this study, we tried to clarify the molecular background of pediatric lung tumors using next-generation sequencing and to identify diagnostic markers serving as potential drug targets. We reviewed nine cases of pediatric lung tumors, and found a pathological variant of the FGFR4 gene in fetal lung interstitial tumors (FLIT) developing exclusively in the neonatal and infant periods.

研究分野：小児固形腫瘍の病理

キーワード：小児呼吸器腫瘍 胎児肺間質腫瘍 RNAシーケンス FGFR4遺伝子  $\beta$ -catenin

## 1. 研究開始当初の背景

小児呼吸器腫瘍は、(1)先天性嚢胞性肺疾患からの発生がある、(2)間葉系腫瘍の頻度が高い、(3)上皮性悪性腫瘍(癌)は特に難治性で予後不良の傾向がある、という特殊性がある。

**(1)先天性嚢胞性肺疾患からの発生：**肺の発生段階の異常で生じる先天性肺気道奇形 (congenital pulmonary airway malformation, CPAM) に代表される先天性嚢胞性肺疾患は周産期領域では少なからず経験される。一方、胸膜肺芽腫 (pleuropulmonary blastoma, PPB) は小児の胸腔内悪性腫瘍性病変では最も多く、かつ小児にほとんど特異的にみられる。CPAM は嚢胞の肉眼的および組織学的所見で type1 から type4 まで、5 つの亜型に分類され、従来肺の発生異常・奇形として診断・治療されてきた。そのため、呼吸不全を来さないような病変については経過観察されるなど、基本的には良性病変としての対応が臨床的にはとられてきた。10 年ほど前より、CPAM type4 が *DICER1* 遺伝子の異常を背景に PPB を発症すると認知されてきた[1]。また、CPAM type1 に *KRAS* 遺伝子異常が検出され[2, 3]、長期経過を経た CPAM に腺癌の発症が報告された[4]。一方、CPAM type0 は肺の発生異常に関わる遺伝子異常が報告されたものの、腫瘍発生についての関与は指摘されていない[5]。症例数の多い CPAM type2、および稀な type3 については十分には解明されていない。

**(2)間葉系腫瘍の頻度が高い：**成人の呼吸器腫瘍では上皮性悪性腫瘍(癌)が最多であるが、小児では癌の頻度は低く、最多は筋線維芽細胞由来の炎症性筋線維芽細胞腫瘍 (inflammatory myofibroblastic tumor, IMT) であり、他にも多彩な間葉系腫瘍がみられる。間葉系腫瘍は種類が多岐にわたり、しばしば病理診断が容易ではなく、良悪性の鑑別も難しいことがある。当施設からは組織所見が典型的ではない乳児 IMT が特異的な *ALK* 融合遺伝子を有することを見出し同腫瘍の有用な診断のマーカーとなることを報告した[6]。このように診断の決め手となりうるマーカーの根拠となる遺伝子異常を同定することは正確な診断に基づいた治療選択のために必須である。

**(3)若年の上皮性悪性腫瘍(癌)は難治性で予後が悪い：**小児・若年の癌の多くは難治性で進行が速く予後が悪い。一方で小児・若年は成人よりがん化に際して環境要因の程度が低く、特定の遺伝子の関与が大きい症例が散見される。このような症例からは分子標的薬の創薬の根拠となりうる遺伝子異常の同定が期待される。予後不良の若年の癌に対して高い効果の期待できる創薬は強く望まれる。このような背景より、小児呼吸器腫瘍、我々は、小児の予後不良の肺癌より *NUTM1* 融合遺伝子を検出して報告した[7]。その後、同融合遺伝子を有する腫瘍は NUT carcinoma と称され、幅広い年代に発症することが知られるようになり、また標的治療の開発も進んでいる。このように、小児・若年成人に発症する腫瘍の研究が、成人発症の腫瘍の解明への糸口となることも期待できる。

## 2. 研究の目的

本研究では小児呼吸器腫瘍およびその全病変である可能性がある先天性嚢胞性肺疾患の遺伝子異常を網羅的に検討して、診断マーカー、さらに分子標的薬の創薬の標的となりうる特異的な遺伝子異常を同定することを目的とした。小児腫瘍の中でも呼吸器腫瘍は頻度が低く、類似の研究は世界的にも乏しい。当施設は腫瘍と周産期医療いずれも開設以来多くの診療実績があり、先天性や発育過程で発症する呼吸器・肺疾患と小児がんの双方の診断に長年関わってきた。その過程で小児腫瘍の持つ特異性・問題点について多数の基礎研究・臨床研究が遂行されてきた。小児呼

吸器腫瘍についても、周産期施設を併設する小児医療専門施設としての視点で、成人の腫瘍や、基礎研究に限った研究施設にはない発想で研究を進めた。小児呼吸器腫瘍、およびその前病変である先天性嚢胞性肺疾患の遺伝子を網羅的に検討することで、有用な診断マーカーおよび分子標的薬の開発に寄与しうる遺伝子異常を見出すことが期待された。

### 3. 研究の方法

**【対象】**神奈川県立こども医療センター開設以来、病理組織診断目的、もしくは剖検目的で提出された、呼吸器腫瘍および嚢胞性肺疾患を対象とする。

#### **【方法】**

- (1) 当センターアーカイブより症例を抽出した。
- (2) RNA シーケンスを施行する対象として、呼吸器腫瘍については本研究開始時に腫瘍発生に関わる主要な遺伝子異常が検出されていないものを、嚢胞性肺疾患については、組織学的に診断困難例を選択した。
- (3) 選択された症例について、RNA シーケンスを施行した。
- (4) RNA シーケンスの結果から腫瘍発生に関与の可能性がある遺伝子異常をピックアップして、それぞれ PCR(polymerase chain reaction)法や RT-PCR(reverse transcription-polymerase chain reaction)法で確認する。
- (5) 確認された遺伝子異常について、サロゲートマーカーとしての有用性を市販のプロープを用いた FISH(fluorescence in situ hybridization)法、もしくは市販の免疫組織学的検討が可能な遺伝子異常については免疫染色を追加で行った。
- (6) 分子病理学的検査の概要は下記の通りである。

#### **RNA シーケンス (次世代シーケンサーを用いた検討)**

腫瘍の凍結検体もしくは FFPE 検体より total RNA を抽出し、逆転写反応により得た cDNA を用いて TruSight RNA Pan-Cancer Panel (Illumina 社)によるターゲットシーケンスを行った。シーケンスで得られたデータは、RNA-seq alignment app(v.1.0.0)で解析を行った。

#### **PCR 法・RT-PCR 法**

腫瘍の凍結検体もしくは Formalin fixed paraffin embedded (FFPE)検体より genomic DNA を抽出し PCR 法を行った。また同様に total RNA を抽出し、逆転写反応により cDNA を得て RT-PCR 法を行った。各々の腫瘍の組織診断をもとにそれぞれに特異的な遺伝子変異もしくは融合遺伝子を標的としたプライマーを設計し、PCR 法にて遺伝子増幅を行った。得られた増幅産物をアガロースゲル中で電気泳動し、標的とする遺伝子の確認を行った。

#### **塩基配列の確認**

PCR 産物のダイレクトシーケンスを行い、塩基配列を明らかにした。

#### **FISH 法**

市販のプロープを用いて行った (SureFISH ALK BA probe, Agilent Technologies, Palo Alto, CA)。FFPE 切片はプロープの浸透性を改善するために温熱処理して作成した。プロープを組織切片と反応させ、蛍光顕微鏡で観察して、1 切片につき 50 細胞確認したうえで、結果を判定した。

- (7) 免疫組織学的検討の概要は下記の通りである。

10%ホルマリン液で固定された腫瘍組織片をパラフィン包埋し 4 $\mu$ m の切片を作成し、市販

の抗体を用いて、間接免疫ペルオキシダーゼ法を用いて免疫組織学的検索を行った。

#### 4. 研究成果

##### 検討症例抽出：

(1) **呼吸器腫瘍**：原発性呼吸器腫瘍は 17 例抽出され、胸膜肺芽腫(pleuropulmonary blastoma, PPB)が 8 例で最多であった。その他炎症性筋線維芽細胞腫瘍(inflammatory myofibroblastic tumor, IMT)が 4 例、NUT carcinoma が 2 例、FLIT、granular cell tumor、lipomatous hamartoma がそれぞれ 1 例ずつであった。PPB の 2 例からは *DICER1* 遺伝子の hot spot に variant が、NUT carcinoma の 2 例からは *NUTM1::BRD4* の融合遺伝子が既知の異常として検出されている。IMT の 4 例はいずれも免疫組織学的に ALK 陰性であった。既知の遺伝子異常が同定されている症例を除き、十分な核酸抽出可能な検体の保存がされていた IMT 3 例、FLIT 1 例で RNA シーケンスを行った。

(2) **嚢胞性肺疾患**：嚢胞性肺疾患は 193 例抽出された。組織学的に再検討を行い、従来の Stocker の分類に準じて組織診断を行った。CPAM type1 は KRAS 遺伝子異常を優先的に行うこととして、RNA シーケンスの対象として、肺の発生段階での遺伝子異常の検出が期待された pulmonary dysplasia の 2 例を RNA シーケンスの対象とした。

##### RNA シーケンスの結果、および検出された遺伝子異常の検討 (表 1)：

IMT の 3 例からはそれぞれ、*EML4::ALK* 融合遺伝子、*HMBBOX1::ALK* 融合遺伝子、*FN1::ROS1* 融合遺伝子が検出された。*ALK* 融合遺伝子が検出された 2 例はいずれも免疫組織学的に ALK 陰性であり、FISH 法でも検出が困難であった。*ROS1* 融合遺伝子が検出された 1 例は免疫組織学的に ROS1 陽性が確認され、FISH 法でも split signal が検出された。IMT の *ALK* 融合遺伝子を免疫組織学的や FISH 法で検出する際、感度が 50%ほどと十分でないことは知られており、さらにパートナー遺伝子が多彩であることもその診断を困難にしている。今回検出された *HMBBOX1* 遺伝子も IMT では報告のないものであった。RNA シーケンス施行が可能な施設が限られていること、しかし *ALK* 融合遺伝子を有する腫瘍に対しては標的治療が可能であることを鑑みると、ALK 陽性 IMT の正確な診断は必要である。RNA シーケンスより簡便な検査法の開発が望まれる。

FLIT の 1 例からは *FGFR4* 遺伝子(p.G388A)と *CANT1* 遺伝子(p.V226A)の病的 variant を検出した。FLIT に *ALK* 融合遺伝子が検出されることが既報にあり、すべてそのパートナー遺伝子は A2M 遺伝子である[6, 8, 9]。今回検討した FLIT からは *A2M::ALK* を含めて *ALK* 融合遺伝子は検出されなかった。報告されている FLIT で免疫組織学的に ALK 陰性も散見される[10]。自験例 FLIT が免疫組織学的に  $\beta$ -catenin が陽性となることを我々は 2013 年に報告している[11]。*FGFR4* 遺伝子変異が GSK3 /  $\beta$ -catenin シグナルカスケードに参与していることが、免疫組織学的に  $\beta$ -catenin の核陽性として検出されている可能性が示唆される。今回我々は *ALK* 融合遺伝子陰性の FLIT に *FGFR4* 遺伝子の病的変異を検出し、またこの遺伝子異常を持つ FLIT が免疫組織学的に  $\beta$ -catenin 核陽性であることを見いだした。この結果、従来 FLIT と診断されてきた腫瘍が分子病理学的な異常を背景に少なくとも *ALK* 融合遺伝子と *FGFR4* 遺伝子の病的変異を持つ 2 つの亜型が存在することが示された。これら病因となる遺伝子異常はいずれも遺伝子標的治療の開発が進んでおり、現時点では完全切除のみが選択されるが、より侵襲の少ない治療法の選択肢が広がる可能性が期待される。

Pulmonary dysplasia 2 例では、いずれも病的意義が不明な variant がいくつか検出された。先天異常に伴う遺伝子異常が本研究に利用したパネルに搭載されていない可能性も十分ある。今後 whole exome sequence や whole genome sequence による解析を検討している。

表 1. RNA シーケンスで検討した症例と同定された遺伝子異常

Histological diagnosis	Gene abnormality candidate
Inflammatory myofibroblastic tumor	<i>EML4::ALK</i>
Inflammatory myofibroblastic tumor	<i>HMBOX1::ALK</i>
Inflammatory myofibroblastic tumor	<i>FNI::ROS1</i>
Fetal lung interstitial tumor	<i>FGFR4</i> p.G388A/ <i>CANT1</i> p.V226A
Pulmonary dysplasia	<i>FLT4</i> G1276R/ <i>AH11</i> G536R
Pulmonary dysplasia	<i>PTK2</i> R474G/ <i>ASXL1</i>

## 文献

1. Messinger, Y.H., et al., *Pleuropulmonary blastoma: a report on 350 central pathology-confirmed pleuropulmonary blastoma cases by the International Pleuropulmonary Blastoma Registry*. *Cancer*, 2015. **121**(2): p. 276-85.
2. Nelson, N.D., et al., *Morphologic Features in Congenital Pulmonary Airway Malformations and Pulmonary Sequestrations Correlate With Mutation Status: A Mechanistic Approach to Classification*. *Am J Surg Pathol*, 2023. **47**(5): p. 568-579.
3. Pogoriler, J., et al., *Congenital Cystic Lung Lesions: Redefining the Natural Distribution of Subtypes and Assessing the Risk of Malignancy*. *Am J Surg Pathol*, 2019. **43**(1): p. 47-55.
4. de Cordova, X.F., et al., *Mucinous Adenocarcinoma With Intrapulmonary Metastasis Harboring KRAS and GNAS Mutations Arising in Congenital Pulmonary Airway Malformation*. *Am J Clin Pathol*, 2021. **156**(2): p. 313-319.
5. Vincent, M., et al., *Clinical, Histopathological, and Molecular Diagnostics in Lethal Lung Developmental Disorders*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019. **200**(9): p. 1093-1101.
6. Tanaka, M., et al., *Inflammatory myofibroblastic tumors of the lung carrying a chimeric A2M-ALK gene: report of 2 infantile cases and review of the differential diagnosis of infantile pulmonary lesions*. *Hum Pathol*, 2017. **66**: p. 177-182.
7. Tanaka, M., et al., *NUT midline carcinoma: report of 2 cases suggestive of pulmonary origin*. *Am J Surg Pathol*, 2012. **36**(3): p. 381-8.
8. Onoda, T., et al., *Identification of novel ALK rearrangement A2M-ALK in a neonate with fetal lung interstitial tumor*. *Genes Chromosomes Cancer*, 2014. **53**(10): p. 865-74.
9. Tan-Garcia, A., et al., *Spontaneous Partial Regression of Fetal Lung Interstitial Tumor With A2M::ALK Rearrangement in a Neonate*. *Pediatr Dev Pathol*, 2024. **27**(2): p. 187-192.
10. Shah, S.N., et al., *Fetal lung interstitial tumor: An uncommon pediatric pulmonary neoplasm*. *Lung India*, 2021. **38**(2): p. 186-190.
11. Yoshida, M., et al., *Fetal lung interstitial tumor: the first Japanese case report and a comparison with fetal lung tissue and congenital cystic adenomatoid malformation/congenital pulmonary airway malformation type 3*. *Pathol Int*, 2013. **63**(10): p. 506-9.

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 2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 西野 彰悟, 黒田 靖浩, 畠山 理, 玉置 祥子, 芳本 誠司, 長谷川 大一郎, 小阪 嘉之, 杉岡 勇典, 赤坂 好宣, 田中 水緒, 吉田 牧子	4. 巻 59
2. 論文標題 Fetal lung interstitial tumorの1例	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 日本小児血液・がん学会雑誌	6. 最初と最後の頁 86
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 田中水緒	4. 巻 2
2. 論文標題 【先天性嚢胞性肺疾患診療ガイドライン】肺の発生と病理	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 小児外科	6. 最初と最後の頁 116-119
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 田中水緒	4. 巻 3
2. 論文標題 小児・AYAがん	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 265-270
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 田中水緒, 田中祐吉	4. 巻 8
2. 論文標題 【小児非腫瘍性疾患の病理と臨床】小児嚢胞性肺疾患の臨床病理	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 病理と臨床	6. 最初と最後の頁 687-693
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Miyagi Hisayuki, Ishii Daisuke, Hirasawa Masatoshi, Yasuda Shunsuke, Toriumi Naohisa, Sarashina Takeo, Tanino Mishie, Tanaka Mio, Tanaka Yukichi, Miyamoto Kazutoshi	4. 巻 6
2. 論文標題 Spontaneous pneumothorax caused by an inflammatory myofibroblastic tumor-like lesion in a 14-year-old girl: a case report	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surgical Case Reports	6. 最初と最後の頁 109
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40792-020-00873-2	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 岡崎 英人、高澤 慎也、篠原 正樹、横川 英之、渡辺 栄一郎、西 明、大木 健太郎、平戸 純子、田中 水緒	4. 巻 60
2. 論文標題 DICER1遺伝子変異を伴った肺嚢胞性腫瘍および多房性嚢胞性腎腫の1例	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 日本小児外科学会雑誌	6. 最初と最後の頁 50～56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11164/jjssps.60.1_50	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0件

〔図書〕 計3件

1. 著者名 田中水緒	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 448
3. 書名 【非腫瘍性疾患病理アトラス 肺】 先天性肺気道奇形(CPAM) 肺分画症/bronchopulmonary foregut malformation/ 気管支原性嚢胞	

1. 著者名 田中水緒	4. 発行年 2022年
2. 出版社 文光堂	5. 総ページ数 336
3. 書名 【縦隔腫瘍・胸膜腫瘍】 NUT癌	

1. 著者名 Mio Tanaka, Emi Takakuwa	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 140
3. 書名 Congenital Cystic Lung Disease Comprehensive Understanding of its Diagnosis and Treatment from Fetus to Childhood	

〔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
研究分担者	永原 則之  (Nagahara Noriyuki)  (10208043)	日本医科大学・医学部・准教授   (32666)	
研究分担者	田中 祐吉  (Tanaka Yukichi)  (50420691)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立こども医療センター(臨床研究所)・臨床研究所・医師   (82729)	

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
---------	---------