

令和 5 年 4 月 28 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K16171

研究課題名(和文) MELF patternの網羅的遺伝子解析による類内膜癌の浸潤メカニズムの研究

研究課題名(英文) The invasion mechanism of MELF pattern in endometrioid carcinoma

研究代表者

田原 紳一郎 (Tahara, Shinichiro)

大阪大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：20792584

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)：MELF patternを有する症例のホルマリン固定パラフィンブロックからレーザーマイクロダイセクションを行い、表層部とMELF patternをとる浸潤先進部を別個に切り出した。それらの検体からトランスクリプトーム解析を行い、腫瘍の表層部とMELF patternをとる浸潤先進部の発現の比較を行った。その結果、ヒストンのメチル化を減少させるNNMTがMELF patternの浸潤先進部で高発現していた。またPD-L1がMELF patternの浸潤先進部で強発現することを明らかにし、MELF patternを有する類内膜癌にPD-L1阻害薬が有用な治療となる可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮体部の類内膜癌には形態学的に悪性度が低く予後が良いとされるGrade 1であるにもかかわらず、高い浸潤性を示すMELF (microcystic, elongated, and fragmented) patternという特徴的な形態を有するものがある。MELF patternは組織形態から提唱された概念であるが、その分子メカニズムに関してははっきりしていなかった。本研究ではNNMTがMELFの浸潤メカニズムに関わっていることを示した。またMELF patternを有する類内膜癌にPD-L1阻害薬が有用な治療となる可能性を示した。

研究成果の概要(英文)：We searched for genes preferentially expressed in the invasive front area of endometrioid carcinoma (EC) with the MELF pattern using laser microdissection and RNA sequencing, and showed that nicotinamide N-methyltransferase (NNMT) is related to MELF pattern invasiveness. Immunohistochemical analyses confirmed high NNMT expression in the invasive front area of the MELF pattern, and using EC cell lines, NNMT promoted migration, invasion, colony formation, epithelial-mesenchymal transition (EMT) and chemoresistance. Moreover, we performed immunohistochemical analysis of the distribution of PD-L1 (programmed cell death-ligand 1) expressing cells in G1 with MELF pattern. In cases of G1 with MELF pattern, tumor cells expressed PD-L1 significantly higher in invasive front area than in surface area. Significant therapeutic effect can be expected by applying PD-1/PD-L1 immunotherapy to the treatment of G1 with MELF.

研究分野：子宮体癌

キーワード：MELF NNMT PD-L1 Laser microdissection RNA sequencing

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

従来子宮体癌は予後が良い Type I と、予後が悪い Type II に大別され、最も多い組織型である類内膜癌は Type I に属する。また形態学的な分類として、充実成分の割合に応じて Grade 1~3 の 3 つに分けられる。一般には Grade が上がるにつれて悪性度も高くなるとされているが、形態学的には予後が良いとされる Grade 1 の一部に、浸潤性の高い MELF pattern を有するものが存在することが知られている。我々は子宮体癌の幹細胞マーカー ALDH1 (aldehyde dehydrogenase 1) の解析を進め、ALDH1 以外に S100A4 や SDPR の高発現が MELF pattern に関連することを明らかにした。一方近年 TCGA プロジェクトによる子宮体癌の統合的ゲノム解析が行われた。その結果、子宮体癌は POLE ultramutated, microsatellite instability hypermutated, copy-number low, copy-number high の 4 つに分類され (Nature 2013; 497: 67-73)、類内膜癌は copy-number low に属する。このゲノム解析の結果からは類内膜癌の形態学的な知見は反映されていない。

2. 研究の目的

MELF pattern の病理組織検体における次世代シーケンサーの解析から得たデータと、培養細胞のゲノム編集から MELF pattern の形成に関わる因子を網羅的に解析し、なぜ形態学的には悪性度が低くみえるにも関わらず高い浸潤傾向を示すのかを明らかにし、子宮体癌の新たな浸潤メカニズムを見出すことを目指す。

3. 研究の方法

(1) レーザーマイクロダイセクションを利用した RNA sequence による候補の選定

MELF pattern を有する症例においてホルマリン固定パラフィンブロック (FFPE) からレーザーマイクロダイセクションを行い、表層部と MELF pattern をとる浸潤部を別個に切り出した。それらの検体から RNA sequence によるトランスクリプトーム解析を施行した。症例による偏りを防ぐため、2 症例から得られたデータを組み合わせ、いずれの症例にも同じ傾向が見られたものを候補とした。その中で有力なものとして、NNMT (Nicotinamide N-methyltransferase) が同定された。

(2) 培養細胞を用いた機能解析

各種類内膜癌培養細胞 (AN3CA、HEC-1A、HEC-1B、HEC-108、HEC-116、SNG-M) のうち、AN3CA にのみ NNMT の発現が見られた。そのため AN3CA の NNMT ノックアウト細胞を製作した。また発現の見られなかった HEC-1B と HEC-108 に対し、NNMT を一過性に発現させた。

4. 研究成果

(1) 類内膜癌の手術症例における免疫染色

抗 NNMT 抗体を用いて MELF pattern を有する G1 症例 30 例に免疫組織染色を行ったところ、RNA sequence と同様に、NNMT の発現が浸潤先進部で強い傾向が見られた。MELF pattern を有さない G1 症例、G2 症例、G3 症例でも免疫組織染色を行ったが、そのような傾向は見られなかった (図 1)。

(2) NNMT ノックアウト細胞及び一過性発現細胞の機能解析

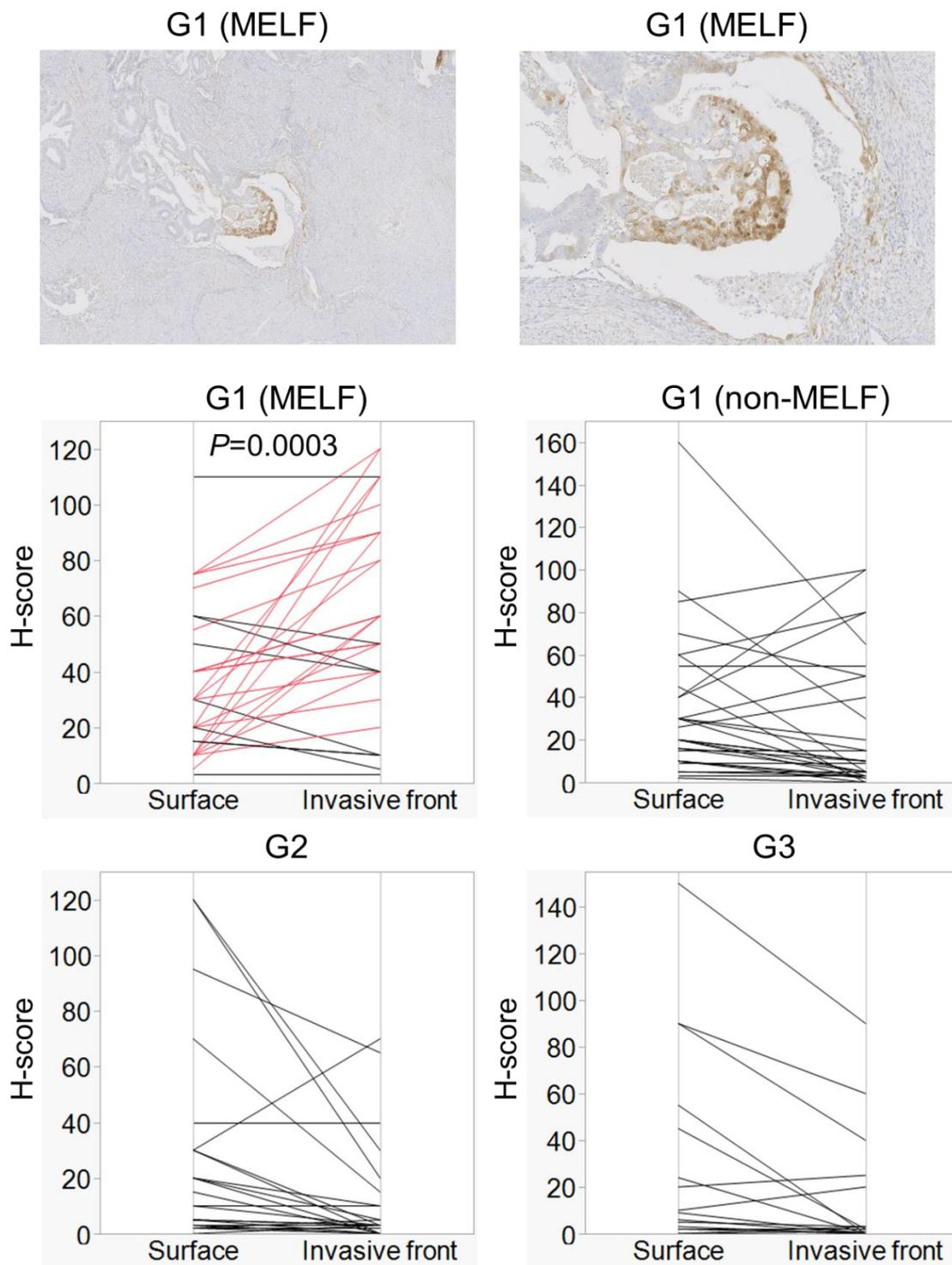
AN3CA の NNMT ノックアウト細胞、HEC-1B と HEC-108 の NNMT 一過性発現細胞を、それぞれコントロール細胞と比較し解析した。NNMT が移動能、浸潤能、コロニー形成能、epithelial-mesenchymal transition (EMT) を促進することが分かった。また NNMT ノックアウト細胞では ERK のリン酸化の低下、Matrix metalloproteinase 2 (MMP2) の分泌の減少、N-cadherin の発現の低下、reactive oxygen species (ROS) の産生増加に伴う抗がん剤耐性能の低下を認めた。これらの変化には NNMT が H3K9me2 のメチル化を促進することが関わっていることが示唆された。

(3) MELF pattern を有する類内膜癌の治療標的の検討

トランスクリプトーム解析において、PD-L1 (programmed death ligand 1) の発現が MELF pattern の浸潤先進部で高いことが判明した。抗 PD-L1 抗体を用いた免疫組織染色においてもこのことが確認された。またリンパ管侵襲巣内に PD-L1 を発現する腫瘍細胞がしばしば見られ、MELF pattern を有する症例ではリンパ節転移が多いことの原因であることが示唆された。さらに浸潤先進部では PD-L1 は炎症細胞にも発現していた。腫瘍細胞と炎症細胞の両方

が腫瘍免疫の抑制に寄与していると言われていることから、MELF pattern を有する類内膜癌に PD-L1 阻害薬が有用である可能性が示された。

図 1. 類内膜癌の手術症例における NNMT の免疫染色



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7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 Tahara Shinichiro, Nojima Satoshi, Ohshima Kenji, Hori Yumiko, Sato Kazuaki, Kurashige Masako, Matsui Takahiro, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Nicotinamide N methyltransferase is related to MELF pattern invasion in endometrioid carcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Medicine | 6. 最初と最後の頁 8630 ~ 8640 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.4359 | 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 Tahara Shinichiro, Kohara Masaharu, Sato Kazuaki, Morii Eiichi | 4. 巻 229 |
| 2. 論文標題 Strong expression of PD-L1 in invasive front of MELF pattern in endometrioid carcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Pathology - Research and Practice | 6. 最初と最後の頁 153699 ~ 153699 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.prp.2021.153699 | 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 Tone Mitsuyo*, Tahara Shinichiro*, Nojima Satoshi, Motooka Daisuke, Okuzaki Daisuke, Morii Eiichi *co-first author | 4. 巻 111 |
| 2. 論文標題 HTR3A is correlated with unfavorable histology and promotes proliferation through ERK phosphorylation in lung adenocarcinoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Science | 6. 最初と最後の頁 3953 ~ 3961 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14592 | 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 Tahara Shinichiro, Kohara Masaharu, Honma Keiichiro, Morii Eiichi | 4. 巻 70 |
| 2. 論文標題 Detection of synovial sarcoma with an atypical fusion transcript by using SS18 SSX and SSX antibodies | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Pathology International | 6. 最初と最後の頁 689 ~ 691 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pin.12976 | 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 Kusumoto Shinya, Kurashige Masako, Ohshima Kenji, Tahara Shinichiro, Matsui Takahiro, Nojima Satoshi, Hattori Satoshi, Morii Eiichi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 An immature inhibin expressing subpopulation of ovarian clear cell carcinoma cells is related to an unfavorable prognosis | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Medicine | 6. 最初と最後の頁 1485 ~ 1500 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3801 | 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 Luo Wenjuan*, Tahara Shinichiro*, Kawasaki Keisuke, Kobayashi Ayaka, Nojima Satoshi, Morii Eiichi *co-first author | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 The expression of trefoil factor 3 is related to histologic subtypes and invasiveness in lung adenocarcinoma | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Oncology Letters | 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) 10.3892/ol.2020.12325 | 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 Nojima Satoshi, Ishida Shoichi, Terayama Kei, Matsumoto Katsuhiko, Matsui Takahiro, Tahara Shinichiro, Ohshima Kenji, Kiyokawa Hiroki, Kido Kansuke, Ukon Koto, Yoshida Shota Y., Mitani Tomoki T., Doki Yuichiro, Mizushima Tsunekazu, Okuno Yasushi, Susaki Etsuo A., Ueda Hiroki R., Morii Eiichi | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 A Novel Three-Dimensional Imaging System Based on Polysaccharide Staining for Accurate Histopathological Diagnosis of Inflammatory Bowel Diseases | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology | 6. 最初と最後の頁 905 ~ 924 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jcmgh.2022.07.001 | 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 1件 / うち国際学会 0件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 田原紳一郎 |
| 2. 発表標題 NNMTは子宮体部類内膜癌のMELF patternに関連し、浸潤及び抗がん剤耐性を促進する |
| 3. 学会等名 第110回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田原紳一郎 |
| 2. 発表標題 HTR3Aは肺腺癌の予後不良な組織型と関連し、増殖を促進する |
| 3. 学会等名 第109回日本病理学会総会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 田原紳一郎 |
| 2. 発表標題 The molecular mechanism of MELF pattern invasion in endometrioid carcinoma |
| 3. 学会等名 第111回日本病理学会総会（招待講演） |
| 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|