

令和 6 年 6 月 18 日現在

機関番号：32620

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06912

研究課題名（和文）膵胆管好酸性乳頭状腫瘍における融合遺伝子の作用機序解明と診断・治療法への展開

研究課題名（英文）The role of fusion genes in the tumorigenesis of intraductal oncocytic neoplasm of the pancreatobiliary system from the diagnostic and therapeutic point of view

研究代表者

福村 由紀（Fukumura, Yuki）

順天堂大学・医学部・先任准教授

研究者番号：90407312

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）：膵胆管好酸性乳頭状腫瘍はPRKACA、PRKACBをパートナーとする融合遺伝子を認める。申請者は既得のデータに基づき、融合遺伝子が腫瘍形成にどのように作用するかを調べ、本腫瘍の分子病理診断手法の確立や新規分子治療標的を見出すことを目的とした。FISH解析で、全構成細胞が融合遺伝子を獲得しているのではなく、様々な割合で獲得細胞が混在する。その割合が高い程、腫瘍悪性度が高い。融合遺伝子獲得領域の周囲に非獲得細胞で構成される領域を時に伴う。融合遺伝子の型による臨床病理学的、組織形態学的、蛋白発現、遺伝子発現における差は認めず、融合遺伝子型に影響されない腫瘍形成機転がはたらいっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵胆管好酸性乳頭状腫瘍において、PRKACAあるいはPRKACB遺伝子をパートナーとする融合遺伝子が高頻度に認められるが、腫瘍形成機転における本融合遺伝子の関与は不明である。申請者の既得のデータである、TGF- β 、EGFR-MAPK経路の異常やアポトーシス抑制が本腫瘍で見られるが、これと融合遺伝子の作用との関連を調べ、膵胆管好酸性乳頭状腫瘍の分子診断法の確立、標的治療法の開拓を目指している。本研究では上記遺伝子異常を確認するとともに、これらが融合遺伝子型にはよらないこと、一方で、腫瘍の進展に伴い融合遺伝子獲得細胞が増加し、悪性度増加に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Intraductal oncocytic neoplasm of the pancreatobiliary systems harbors specific molecular abnormalities, i.e. fusion genes involving PRKACA or PRKACB. Based on our previous research, we aimed to establish molecular diagnostic method and to detect therapeutic targets of these fusion genes. Our fluorescent in situ hybridization clarified that diverse ratio of tumor cells harbor the fusion genes depending on each tumor, and the higher the ratio, more aggressive the tumor is. Some tumor contains fusion-positive areas and -negative areas. The fusion type does not relate with clinicopathological features or immunohistochemical and genetic expressions.

研究分野：人体病理

キーワード：IOPN 前がん病変 膵臓 胆道 PRKACA PRKACB 融合遺伝子 ミトコンドリア

1. 研究開始当初の背景

膵臓・胆管の上皮内癌病変には粘液産生性の腫瘍細胞が膵管・胆管内に乳頭状に発育を示す胆膵 IPMN がある。本研究開始前年まで、胆膵 IPMN は腫瘍細胞の分化の方向から、胃型、腸型、胆膵型、好酸性型の 4 つのサブタイプに分類され研究が進められてきたが、最近、好酸性型は体細胞変異を殆ど伴わず、PRKACA あるいは PRKACB というプロテインキナーゼ(PKA)活性化触媒サブユニット遺伝子をパートナーとする融合遺伝子が高頻度に認められることが報告 [Singhi, et al. Gastroenterology, 2020] され、好酸性乳頭状腫瘍 (pancreatobiliary oncocytic papillary neoplasm, IOPN) と呼称変更された [消化器系 WHO 分類 2019 年]。

ただし、これらの融合遺伝子が膵胆管好酸性乳頭状腫瘍においてどのようにその腫瘍発生・進展に関わるのかについては報告を見ない。本腫瘍は膵胆管内に旺盛な乳頭状発育を示すことや粘液産生性腫瘍であるなど、他の膵胆管の上皮内癌病である胆膵 IPMN と病理組織学的特徴を共有する一方で、腫瘍の細胞質内ミトコンドリア量増加を特徴とする、KRAS や GNAS 変異の頻度が低い等、異なる点もある。

申請者は日常病理診断において、ミトコンドリア増加により細胞質の好酸性変化を呈し、間質に浸潤した後も同様の細胞像を呈するという「奇妙な」病理像を示す膵胆管好酸性乳頭状腫瘍に興味を持ち、本腫瘍に関して検討を行ってきた。本腫瘍は KRAS/GNAS 遺伝子変異を殆ど有さないことを過去に報告し [Mamat O, Fukumura Y, Histochemistry, 2016]、本腫瘍においては、腫瘍アポトーシス像が少ないこと、TGF- β -activin 経路抑制因子である FST 遺伝子発現が増加していること、一方で、TGF- β -Nodal 経路抑制因子である Lefty が低発現状態にあること、MAP2K1, MAP2K2 などの EGFR-MAPK 経路因子の増加があることを発見、報告してきた [Nakahodo J, Fukumura Y, Sci Rep, 2020]。さらに、申請者の施設で保有する膵胆管好酸性乳頭状腫瘍全例 (n=15) で上記の融合遺伝子が確認されること、MAPK 経路との関連が報告されている microRNA の発現が膵胆管好酸性乳頭状腫瘍では膵の IPMN に比べ低いことを見出してきた。上記の検討において、対象に用いた IPMN でも GNAS 変異により G 蛋白質活性化因子である Gsa の放出で cAMP の活性化・PKA 活性化が生じることから、好酸性乳頭状腫瘍における上記の特徴は、PKA 活性化に由来する副現象ではなく、融合遺伝子による PRKACA/PRKACB 遺伝子の機能変化に由来する可能性がある。

このような背景の元、申請者は、好酸性乳頭状腫瘍における融合遺伝子の作用機序として、PKA 活性上昇による下流因子経路の亢進のみならず、(a) TGF- β 経路および EGFR-MAPK 経路の異常、(b) microRNA 発現の変化、(c) ミトコンドリア内でのキナーゼ活性増加によるアポトーシス抑制という 3 つの仕組みを仮説として立てた。特に(c)については、好酸性乳頭状腫瘍は細胞質内ミトコンドリア増加が特徴的な腫瘍であること、アポトーシス促進因子であるミトコンドリア外膜結合タンパクが PKA によって抑制を受けること [Thompson M. Cell Mol Life Sci, 2002] から、本腫瘍におけるアポトーシス低下も上記融合遺伝子形成結果の作用である可能性を考えた。

2. 研究の目的

「好酸性乳頭状腫瘍の腫瘍発生・進展に融合遺伝子はどのように関わっているか？」が本研究課題学術的「問い」である。すなわち、膵胆管好酸性乳頭状腫瘍の分子病理学的診断手法の確立と新規分子治療標的を見つけることを目的としている。特に、上記研究背景に基づき、TGF- β 経路、EGFR-MAPK 経路、アポトーシス経路、microRNA 発現に特に着目し、好酸性乳頭状腫瘍の腫瘍発生・進展に融合遺伝子がどのように作用しているかを調べる研究である。近年の好酸性乳頭状腫瘍における融合遺伝子の発見は、正確かつ生検検体や細胞診検体を用いた病理診断や融合遺伝子を標的とした治療薬の開発を可能にしたと考えられる。申請者は融合遺伝子の作用機序を詳細に解明し、融合遺伝子に代替可能で、より簡易な病理診断法を開発すること、加えて、キナーゼ活性を有する融合遺伝子機能を解析することで、キナーゼ阻害剤の有効性や将来の治療抵抗性を見越した薬剤開発のデータとしたいと考えている。

3. 研究の方法

(1) 膵胆管好酸性乳頭状腫瘍、ヒト手術材料を用いた解析で、融合遺伝子の種類による臨床病理学的・差異の検討、および、EGFR-MAPK 経路因子、アポトーシス経路動態の差異の検討を行った。対象症例は、研究代表者および分担研究者、研究協力者の施設から収集した膵胆管好酸性乳頭状腫瘍 25 例で、比較対象として、胆膵 IPMN 手術症例 15 例を用いた。

融合遺伝子検索はホルマリン固定パラフィン包埋材料から抽出した腫瘍 RNA を用いた RT-PCR 法および Sanger 法で確認し、EGFR-MAPK 経路因子動態は「Cancer Progression Panel」を用いた nCounter 法 (デジタルバーコード法を用いた遺伝子発現解析法) で行った。アポトーシス経路動態は、リン酸化抗体を用いたミトコンドリア膜タンパク質である BID, BIM, BAX に対する免疫染色で確認した。

(2) 膵胆管好酸性乳頭状腫瘍、ヒト手術材料を用い、融合遺伝子の確認された腫瘍部とこれに隣接した部位 (融合遺伝子が認められないことを確認) の病理組織像・蛋白発現・遺伝子変異を比

較検討し、融合遺伝子に伴う変化を解析した。病理組織像としては、粘液高産生の有無、組織構築(篩状・高乳頭状・平坦状)、腫瘍細胞の形態(好酸性細胞質の有無、intracytoplasmic luminaと呼ばれる細胞質内封入体の多寡)、蛋白発現としては、粘液形質(MUC1, MUC2, MUC5AC, MUC6)およびミトコンドリアに対する免疫染色性を、遺伝子変異は KRAS, GNAS について Sanger 法で確認した。

(3)他臓器の類似腫瘍(好酸性腫瘍) ヒト手術材料を用い、融合遺伝子が認められないことを確認した上で、腫瘍細胞へのミトコンドリア蓄積機構に関して比較検討を行った。他臓器類似腫瘍(好酸性腫瘍)は、腎オンコサイトーマ 5 例、甲状腺好酸性腫瘍 5 例、唾液腺オンコサイト型腫瘍 4 手術例のホルマリン固定パラフィン包埋を用いた。

(4) PRKACA breakapart プローベを用いた FISH (fluorescent in situ hybridization)解析により、融合遺伝子を持つ腫瘍細胞割合(融合遺伝子を持つ腫瘍細胞/全腫瘍細胞)がどのように臨床病理像・タンパク発現・遺伝子発現状態に関連するかを調べた。

(5) 不死化された膵管上皮細胞株にプラスミドを用い、PKA 過剰発現系を作成中である。

4. 研究成果

膵胆管好酸性乳頭状腫瘍で報告された 3 種類の融合遺伝子、ATP1B1::PRKACA, DNAJB1::PRKACA, ATP1B1::PRKACB の 3 群で、もしくは、PRKACA 群と PRKACB 群の 2 群に分けて解析した結果、臨床病理像(年齢、性別、腫瘍径、腫瘍深達度、病期、病理組織構築、粘液やミトコンドリアに対する免疫染色性)に差はなく、検討した遺伝子発現においても PKA, PKB 以外の遺伝子発現量に有意差を認めなかった。ムチン産生能、intracytoplasmic lumina の多寡、3 種のミトコンドリア膜タンパク質発現においても融合遺伝子型との関連は認めなかった。このことから、融合遺伝子型による、ひいては、PKA 高発現と PKB 高発現による腫瘍形成・進展機構には明らかな差はないと考えられた。

膵胆管好酸性乳頭状腫瘍症例における融合遺伝子の見られた部位と融合遺伝子を欠いた部位で病理組織像・蛋白発現・遺伝子変異を比較すると、前者では腫瘍細胞密度の増加、腫瘍血管割合の減少を認めた。一方で、特有の腫瘍細胞形態(好酸性細胞質や円形核)においては両者で差を認めなかった。KRAS, GNAS 変異はいずれの部位でも認められなかった。

他臓器の類似腫瘍(腎オンコサイトーマ、甲状腺好酸性腫瘍、唾液腺オンコサイト型腫瘍)では、上記融合遺伝子は認められず、粘液産生、MUC5AC, MUC6 の染色性が異なった(他臓器類似腫瘍では粘液産生例なし、MUC5AC, MUC6 陽性例なし)。細胞質内ミトコンドリア貯留・腫瘍細胞の核形、低アポトーシス状態が共通点として挙げられた。本研究成果については英文論文報告を行った[Maimaitiaili Y, Fukumura Y, et al. Virchows Archiv, 2022]。

融合遺伝子検出のために breakapart プローベを用いた FISH 解析を行った。膵胆管好酸性乳頭状腫瘍では、全腫瘍細胞が当該融合遺伝子を獲得しておらず、10%~90%程度までと様々な割合で融合遺伝子を獲得していることが明らかとなった。融合遺伝子割合は FISH 解析という暗視野での計測のため、血管内皮細胞などの間質細胞の混在を完全には否定することができないため、ややおおまかなデータとして記録した。)そして、融合遺伝子獲得割合と腫瘍の組織型・悪性度(融合遺伝子獲得割合が高い程、篩状パターンの存在(+))高細胞密度、間質浸潤合併(+))病期(高))との間に関連を認めた。

ここまでの結果は、融合遺伝子形成に伴う下流因子経路が悪性度や腫瘍の粘液産生に関わっていることを示すものであり、PKA 亢進であるか PKB 亢進であるかは殆ど影響しないとみられる。また、好酸性乳頭状腫瘍の臨床予後を示唆する組織形態を提唱し、日常病理診断に応用可能なデータを見出すことができたことも本研究の成果である。(本内容については現在論文作成中である。)

現在は、不死化された膵管上皮細胞株に PKA 過剰発現系を作成中であり、リン酸化アレイを用い過剰発現前後に伴い活性化されるシグナル伝達系・因子を同定していく所存である。次に、不死化された膵管上皮細胞株および胆管上皮細胞株を用い、融合遺伝子を導入し、これらを用いて、修飾されるシグナル伝達系・因子を調べる。また、融合遺伝子に関連し動いてくる microRNA に関しては、miRNA assay kit を用いた nCounter 法を行う予定である。その後で、株化細胞で得られた活性化シグナル経路や亢進・抑制 miR をヒト手術ホルマリン固定パラフィン包埋切片材料で検証していく。これにはリン酸化・非リン酸化抗体を用いた免疫染色で行う。miR の検証は定量 PCR で行う。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計14件（うち査読付論文 14件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nakanuma Y, Sugino T, Kakuda Y, Nomura Y, Watanabe H, Terada T, Sato Y, Ohnishi Y, Fukumura Y.	4. 巻 30
2. 論文標題 Pathological survey of precursor lesions in cholangiocarcinoma.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 J Hepatobiliary Pancreat Sci.	6. 最初と最後の頁 893-903
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jhbp.1308	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 Maimaitiaili Y, Fukumura Y, Hirabayashi K, Kinowaki Y, Naito Y, Saito A, Rong L, Nakahodo J, Yao T	4. 巻 481
2. 論文標題 Investigation of -PRKACA/-PRKACB fusion genes in oncocytic tumors of the pancreatobiliary and other systems.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Arch.	6. 最初と最後の頁 865-876
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-022-03415-3	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 Doi R, Fukumura Y, Lu R, Hirabayashi K, Kinowaki Y, Nakanuma Y, Kanai Y, Nakahodo J, Sasahara N, Saito T, Yao T.	4. 巻 42
2. 論文標題 DNMT1 Expression and DNA Methylation in Intraductal Papillary Neoplasms of the Bile Duct.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Anticancer Res.	6. 最初と最後の頁 2893-2902
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21873/anticancerres.15771.	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 Takeda Y, Imamura H, Yoshimoto J, Fukumura Y, Yoshioka R, Mise Y, Kawasaki S, Saiura A.	4. 巻 172
2. 論文標題 Survival comparison of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm versus pancreatic ductal adenocarcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 336-342
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.surg.2022.01.013.	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 Nakanuma Y, Sugino T, Kakuda Y, Okamura Y, Uesaka K, Nomura Y, Watanabe H, Terada T, Fukumura Y, Ohnishi Y, Sato Y.	4. 巻 61
2. 論文標題 Pathologic patterns of invasive carcinoma associated with intraductal papillary neoplasms of bile duct (IPNB).	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Diagn Pathol.	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) 10.1016/j.anndiagpath.2022.152055.	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 Nakanuma Y, Kakuda Y, Sugino T, Sato Y, Fukumura Y.	4. 巻 14
2. 論文標題 Pathologies of Precursor Lesions of Biliary Tract Carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancers (Basel).	6. 最初と最後の頁 5358
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14215358.	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 Takeda Yoshinori, Imamura Hiroshi, Yoshimoto Jiro, Fukumura Yuki, Yoshioka Ryuji, Mise Yoshihiro, Kawasaki Seiji, Saiura Akio	4. 巻 ahead-print
2. 論文標題 Survival comparison of invasive intraductal papillary mucinous neoplasm versus pancreatic ductal adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2022.01.013	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8件 (うち招待講演 1件/うち国際学会 5件)

1. 発表者名 Y. Fukumura, Y. Maimaitiali, R. Lu, J. Nakahodo, T. Yao
2. 発表標題 The specificity of PRKACA/PRKACB fusion genes in intraductal papillary oncocytic neoplasms of the pancreas
3. 学会等名 American Pancreatic Association, 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 イバラ マイマイティアイリ、福村由紀、鹿裕、平林健一、齋藤啓、笹原典子、八尾隆史.
2. 発表標題 胆膵Intraductal oncocytic papillary neoplasmにおける融合遺伝子型とその意義
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 イバラ マイマイティアイリ、福村由紀、仲程純、佐野勝廣、齋浦明夫、石井重登、伊佐山浩通、平林健一、高瀬優、八尾隆史.
2. 発表標題 胆膵Intraductal oncocytic papillary neoplasmにおける融合遺伝子解析
3. 学会等名 第57回日本胆道学会
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
研究 分担者	平林 健一 (Hirabayashi Kenichi) (60514388)	富山大学・学術研究部医学系・教授 (13201)	
研究 分担者	齋藤 剛 (Saito Tauyoshi) (80439736)	順天堂大学・医学部・先任准教授 (32620)	

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