

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26830095

研究課題名(和文) 個別化治療を目的とした胸腺腫瘍に対する分子生物学的解析

研究課題名(英文) Molecular biological analysis of thymic epithelial tumor for personalized medicine

研究代表者

大瀧 容一(Ohtaki, Yoichi)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：00625402

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)：胸腺上皮腫瘍(TET)31例において、KRAS2例(6.5%)、BRAF1例(3.2%)に変異を認めた。また、網羅的トランスクリプトーム解析では胸腺癌では低酸素関連マーカーが有意に発現しており、特にCA9(carbonic anhydrase IX)が高発現していた。免疫染色による評価ではCA9タンパク発現は正岡分類、WHO分類とも有意に相関し、術後無再発生存の有意な予後不良因子であった。*in vitro*の実験系においても、胸腺癌細胞株Ty-82はCA9を抑制すると増殖が抑制され、放射線感受性が上昇することを確認した。CA9は胸腺癌治療の新規標的分子として有望である。

研究成果の概要(英文)：In this study, we revealed that hypoxia related genes were highly expressed in thymic carcinoma compared with thymoma and normal thymus, and especially CA9 was shown to be one of extremely high expression genes. CA9 protein expression was shown to be higher in thymic carcinoma and high grade malignant thymoma, which was also proportional to CA9 mRNA expression with Next Generation Sequencer. High CA9 expression was also related to advanced clinical stage and poor prognosis. Finally, *in vitro* study using thymic carcinoma cell line Ty-82 led reduction of CA9 to inhibition of proliferation and improvement of radiosensitivity. A series of our study could be directly linked to therapy for TET.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：トランスクリプトーム解析 胸腺癌 胸腺上皮腫瘍 CA9

### 1. 研究開始当初の背景

胸腺上皮腫瘍(TET)は縦隔腫瘍のなかでは最も高頻度に発生する疾患であるが、他の固形癌と比すと比較的稀な疾患である。そのため、遺伝子変異や RNA・蛋白レベルでの発現異常について十分明らかになっていない。

TET は早期で外科治療を行えば良好な予後を得られるが、完全切除後であっても長期経過後に再発することも稀ではなく、再発・隣接臓器への浸潤・遠隔転移を来たした進行例では致死的な悪性腫瘍である。現在までに、胸腺腫に関してはいくつかの遺伝子や蛋白発現の異常が報告されており、その発生や進展に参与することが明らかになっている。しかし、現在までに報告されている遺伝子変異や蛋白発現の異常のみでは胸腺腫瘍の発生・進展の機構、免疫疾患合併の機構は十分に説明できず、未だ関係性が明らかとなっていない遺伝子変異、発現異常分子などが存在すると考えられている。

### 2. 研究の目的

本研究では、TET の切除検体に対して高感度アッセイ系による遺伝子変異解析と免疫染色とマイクロアレイ法を用いた蛋白・RNA レベルでの網羅的解析を行い、胸腺腫瘍の発生・進展に参与する遺伝子変異や発現異常分子を明らかとすることを目的とした。さらに、同定された変異や、発現異常分子に関しては胸腺腫瘍細胞株を用いた *in vitro* の実験系で、実際に胸腺腫瘍の発生や進展に、どの様に参与しているかを確認し、確認された変異や発現異常分子に関しては WHO 分類などの臨床病理学的因子や予後との相関を明らかにし、今後の胸腺腫における個別化医療に利用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) TET31 例に対して、次世代シーケンサー(NGS)を用いて KRAS, BRAF, PIK3CA, HER2, EGFR および T790M 変異の amplicon sequence による変異解析を行った。

(2) RNA の quality が十分であった TET23 例および正常胸腺 4 例(control)より RNA を抽出し、NGS による網羅的トランスクリプトーム解析を行い、胸腺癌での発現上昇遺伝子について検討した。

(3) トランスクリプトーム解析で確認した胸腺癌の発現上昇遺伝子(CA9)について、免疫組織化学による TET 切除検体でのタンパク発現解析および予後解析を行った。

(4) SiRNA を用いた CA9 のノックダウンによる proliferation assay および radiosensitivity assay について検討した。

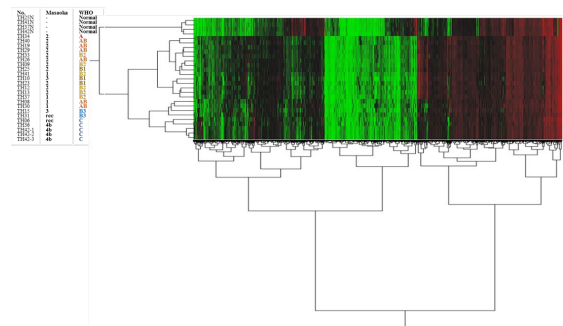
### 4. 研究成果

(1) amplicon sequence による変異解析で

は、胸腺腫で KRAS 変異 2 例(6.5%)、BRAF 変異(3.2%)を認めた。特に BRAF 変異についてはこれまでに報告がなかった。しかし、変異を検出した症例はいずれも低悪性度(typeA, AB)の胸腺腫症例であった。

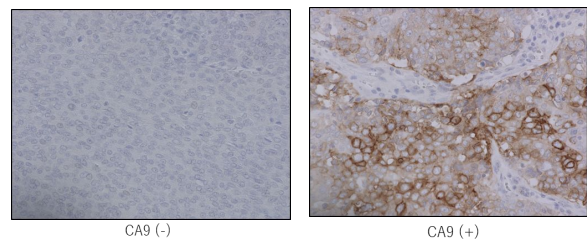
(2) TET に対する網羅的トランスクリプトーム解析では、胸腺腫・正常胸腺と比較して、胸腺癌では低酸素関連マーカーが有意に発現していた。特に本解析では HIF1a の下流分子である CA9(carbonic anhydrase IX)が胸腺癌において高発現していることが明らかとなった。

(図1) TET23 例の Heat map

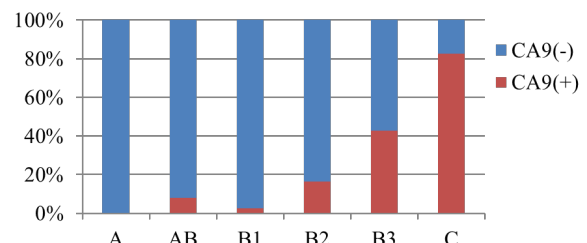


(3) TET 切除症例 188 例について、免疫組織化学で CA9 タンパク発現についての評価を行ったところ、TET 全体の 22%に発現陽性となり、RNA 発現と同様胸腺癌で発現陽性例が有意に高かった。CA9 タンパク発現は、正岡分類の他、WHO 分類(病期)とも有意に相関し、術後無再発生存について有意な予後不良因子であった。

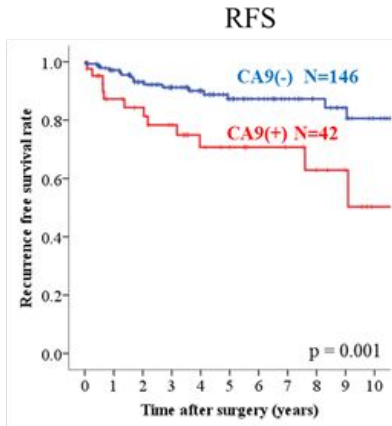
(図2) 免疫組織化学による CA9 発現の評価



(図3) 各組織型での CA9 発現陽性症例の割合

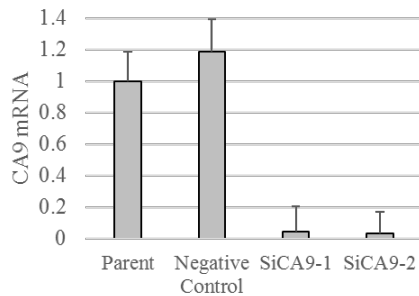


( 図 4 ) CA9 発現別の Kaplan-Meier 曲線

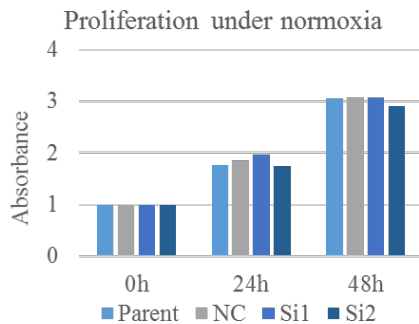


( 4 ) 胸腺癌細胞株( Ty-82 )を用いて *in vitro* の実験系で CA9 の発現による腫瘍の増殖能や放射線感受性について検討を行った。Ty-82 は低酸素状態により CA9 の発現が誘導され、SiRNA を用いて胸腺癌細胞株の低酸素状態で発現が上昇した CA9 を knock down すると胸腺癌細胞株の増殖が抑制され、放射線感受性が上昇することを確認した。

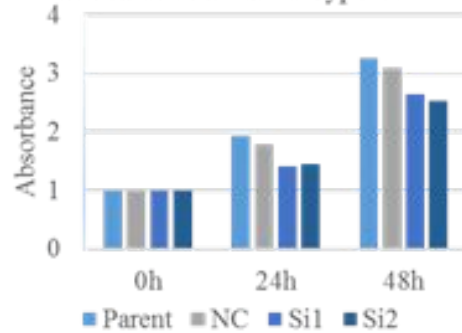
( 図 5 ) SiRNA による CA9 発現抑制の確認



( 図 6 ) SiRNA による CA9 ノックダウンによる増殖抑制の検討



Proliferation under hypoxia



### 5 . 主な発表論文等

( 研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線 )

[ 雑誌論文 ] ( 計 0 件 )

[ 学会発表 ] ( 計 1 件 )

大瀧容二、清水公裕、横堀武彦、金 泉、永島宗晃、尾林 海、中澤世識、矢島俊樹、東陽子、茂木 晃、桑野博行 胸腺上皮腫瘍における STMN1 発現の意義 第 33 回日本呼吸器外科学会総会 2016 年 5 月 京都

[ 図書 ] ( 計 0 件 )

[ 産業財産権 ]

出願状況 ( 計 件 )

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

取得状況 ( 計 件 )

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[ その他 ] なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大瀧 容一 (OHTAKI Yoichi)  
群馬大学・大学院医学系研究科・助教  
研究者番号：00625402

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者 なし

(4) 研究協力者

清水 公裕 (SHIMIZU Kimihiro)  
解良 恭一 (KAIRA Kyoichi)