科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 6 年 6 月 2 1 日現在

機関番号: 17301 研究種目: 若手研究 研究期間: 2020~2023

課題番号: 20K16194

研究課題名(和文)浸潤性粘液腺癌の原因遺伝子解析研究

研究課題名(英文)Study on the Causative Gene Analysis of Invasive Mucinous Adenocarcinoma

研究代表者

黒田 揮志夫 (Kuroda, Kishio)

長崎大学・医歯薬学総合研究科(医学系)・客員研究員

研究者番号:10772808

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):本研究では、142例の肺腺がんを解析し、ムチン産生に基づいて2つのタイプに分類した。細胞質と気腔の両方にムチンが存在するA型は浸潤性粘液腺癌(IMA)と診断されやすく、HNF4a陽性であった。一方、主に気腔にムチンが存在するB型は浸潤性非粘液性腺癌に近く、TTF-1陽性であった。ムチンの存在は、予後不良因子であるSpread Through Air Spaces(STAS)の存在と有意な相関を示した(P=0.046)。さらに、A型7例とB型6例のRNAシーケンス解析を行い、111個の異なる遺伝子を同定した。これらの結果は、IMAの生物学的特徴の理解を深めるものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義 稀な肺腺癌である浸潤性粘液腺癌(IMA)の新たな分子病理学的分類の構築を目指し、ムチン産生に着目した2つの タイプの分類(A型:細胞質と気腔の両方にムチンが存在、B型:主に気腔にムチンが存在)を提案した。 この 分類は、IMAの診断や治療法開発に貢献できる。ムチン産生と予後不良因子であるSTASの関連性を明らかにした ことは、IMAの予後予測の精度向上に寄与でき、A型とB型で異なる111個の遺伝子を同定したことでIMAの発生メ カニズムの解明や治療標的の探索に役立てる。これらの成果は、IMAの理解を深め、診断・治療法開発、予後予 測の改善に繋がる可能性があり、社会的にも意義のある研究成果と言える。

研究成果の概要(英文): In this study, 142 cases of lung adenocarcinoma were analyzed and classified into two types based on mucin production. Type A, where mucin was present in both the cytoplasm and air spaces, was more likely to be diagnosed as invasive mucinous adenocarcinoma (IMA) and was HNF4a positive. On the other hand, Type B, where mucin was primarily present in the air spaces, was closer to invasive non-mucinous adenocarcinoma and was TTF-1 positive. The presence of mucin showed a significant correlation with the presence of Spread Through Air Spaces (STAS), a poor prognostic factor (P=0.046). Additionally, RNA sequencing analysis of 7 Type A cases and 6 Type B cases identified 111 different genes. These findings enhance the understanding of the biological characteristics of IMA.

研究分野: 外科病理

キーワード: 浸潤性肺腺癌

1. 研究開始当初の背景

浸潤性粘液腺癌 (Invasive mucinous adenocarcinoma: IMA)は、2015年から新たに肺腺癌の亜型の一つとして分類された。頻度は低いが、時に肺内転移をきたす予後不良の肺癌の一つである。病理組織学的に、多量の粘液を細胞内に産生すると定義されているが、杯細胞や円柱上皮で構成されるなど多彩な組織型を取ることが知られている。新規の亜型であることから、免疫染色や遺伝子学的特徴が十分に整理されていない。

2. 研究の目的

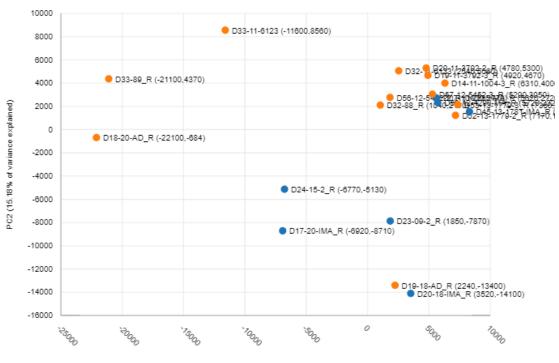
そこで我々は、新分類として提唱された稀な浸潤性粘液腺癌について、予後決定因子と考えられている免疫染色(HNF4a)の発現を調べ、次世代シークエンサーにより網羅的遺伝子解析を行う。これらの免疫組織化学的特徴と遺伝子情報により、浸潤性粘液腺癌の生物学的特徴を明らかにし、その他の肺腺癌亜型との相違を分析することで、これまでの腺癌分類に浸潤性粘液腺癌を加えた、分子病理学的腺癌分類の再構築を試み、悪性度の層別化を行う。

3. 研究の方法

- (1). 根治的外科切除を行った原発性肺腺がんの142例のコホートを検討した。それらにおける病理組織学的な組織検体を用いた、ムチン産生状態は2人の異なる病理医により評価をおこなった。まずは、病理組織学的診断および臨床的な評価項目のパラメータとの相関を解析した。生存データはlog-rank検定を用いて解析され、Kaplan-Meier曲線を評価した。
- (2). (1)の結果をもととして、TypeA7例とTypeB6例の粘液を産生する肺腺癌において、マクロ的に腫瘍部分をダイセクトした材料から、Qiagen RNeasy FFPE kit(Qiagen、Hilden、Germany)を使用してRNAを抽出した。New England Biolabs(イプスウィッチ、マサチューセッツ州)のNEBNextUltra II Directional RNA Library prep for Illumina kitおよびIllumina次世代シーケンサー(Illumina、カリフォルニア州サンディエゴ)を使用してシーケンスを実施した。RNAリードの生データは、Trimmomatic(v0.39)18を使用してトリムされ、リード品質管理はFastQC(v0.11.9)19とMultiQC(v1.14)20で実行した。トリムされたRNA-seqデータは、CLC Genomics Workbench(v23.0.4、Qiagen、Hilden、Germany)を使用してリードマッピングおよび変異呼び出し、融合遺伝子検出のためのSTAR-Fusion21、およびがんスプライシング異常のためのTrinity CTATスプライシングモジュールで分析した。TypeAとTypeBの差異遺伝子発現は、RaNA-seqプラットフォームを使用して解析した。RaNA-seqから得られた結果は、Gene Ontology(GO)および機能豊富な解析を通じてMetascapeプラットフォームを使用して確認された。

4. 研究成果

- (1). まずは、病理組織学的検体の免疫染色を詳しく観察すると、ムチン産生が確認された症例は30例であった。それらを、2つのタイプに分類した: A型(細胞質と気腔の両方にムチンが存在;n=6)とB型(主に気腔にムチンが存在;n=24)である。A型症例は一貫して浸潤性粘液性腺癌と診断され、HNF4a陽性であった。一方、B型症例は浸潤性非粘液性腺癌に近く、TTF-1陽性であった。B型24例のうち、浸潤性粘液腺がんと診断されたのは1例のみであった。ムチンの存在は生存期間、性別、喫煙歴、リンパ節転移と有意な相関を示さなかった。しかしながら、ムチン陽性症例はSpread Through Air Spaces(STAS)の存在と有意な相関を示した(P=0.046)。特に、我々の研究におけるSTASを伴う肺腺がんは予後不良であった(P=0.018)。我々は、TTF-1とHNF4aの陽性像における分類を構築しようとしていたが、いずれの形態の中でも特にムチン産生がSTASとの関連を強く示唆する結論であった。STASは予後増悪因子の一つと考えられており、今度はムチン産生の有無について形態学だけでなく、免疫組織学や遺伝子に変異についての研究が期待される。
- (2). PCA解析では、図1のような結果を示した。



PC1 (30.57% of variance explained)

図1) PCA解析の結果

これらの結果をもとにして、異なる遺伝子として、図2の111遺伝子が同定された。

PPAN-P2RY11 EPHA8	AC068790.1 STRCP1	MRPL45 LIMK2	MYO15B C6orf132	BMP3 ITGB8	TINAGL1 ARHGEF40	DONSON PPFIBP2
PRYP3	AC145285.4	GLUD2	DDA1	FMO3	CYP2D8P	ZYX
TMEM189-UBE2V1	AC241640.4	DNAJC3	AL606490.8	EPS8L1	ADAP1	ZDHHC8
EIF3CL	AL355987.3	PDZD3	PLPP2	ZNF85	RAPGEFL1	PRRX1
GPR25	AL390840.1	ATP7B	CAMK2N1	POSTN	RINT1	NBEAL2
AC005041.2	SPDYE2B	MUC6	AC108751.5	SLC7A2	TMEM63C	AC008799.1
IBSP	REEP6	KCNK5	PPP1R1B	BTNL8	IGHV4-39	ARFRP1
ZNF488	GIMAP1	CXCL13	VILL	LRRC37A2	PSG6	ELOVL5
MOGAT2	MST1R	CDC42EP3	LRRC73	ESR1	GTF2IP13	SAR1B
PAX7	UGT1A9	TM4SF5	SLITRK4	BAG6	SESN3	ONECUT3
ANKRD63	MBIP	SLC29A2	TRAK1	SHROOM3	SULT1C2	LMF1
LCN6	AL357153.4	IL6ST	ASPN	OR7A19P	CDC42EP1	ANXA11
HSPD1P9	FAM102A	JAG1	SLC6A20	SFTPD	LDLR	MICB
SLC7A5P2	CEP170B	CYP3A5	ITGB4	HOPX		
VSIG10L2	MUC6	C4BPA	PLXNB1	ERGIC2		
SUCLA2P3			RECQL5	PRKAR1A		

図2)同定された111個の遺伝子

これら、111遺伝子について、生物学的経路(パスウェイ)に関連するデータを解析し、 A型(細胞質と気腔の両方にムチン)とB型(主に気腔にムチン) の生物学的プロセスや経路に関連する遺伝子やタンパク質の役割を同定する。これらの結果から、浸潤性粘液腺癌の発生プロセスを解明することで、新たな治療法の解析の手助けを期待できる。

5		主な発表論文等
J	•	上る元化冊入寸

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

_

6 . 研究組織

 ・ M プロが日が日		
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
---------	---------