

令和元年6月5日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10684

研究課題名(和文) B型胸腺腫を合併する重症筋無力症(MG)におけるMG発症機序の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of myasthenia gravis in B type thymoma with myasthenia gravis

研究代表者

近藤 和也 (KONDO, Kazuya)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授

研究者番号：10263815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胸腺癌7例、重症筋無力症(MG)非合併胸腺腫7例、MG合併胸腺腫8例について、次世代シーケンサーを用いて、全エクソンレベルでの腫瘍の体細胞ポイント変異を検出した。胸腺癌では、178遺伝子のmutationを認めた。複数の症例で認めたのは、MIR1268A遺伝子とSETD2のみであった。胸腺腫では103遺伝子にmutationを認めたが、複数の症例で認めたのはMUC16のみであった。MG合併群がと非MG合併群でpathway解析を行い、MG合併群ではGEFの機能に関する遺伝子がenrichされ、非合併群ではfibronectinやimmunoglobulin関連遺伝子がenrichされた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸腺は細胞性免疫で働くTリンパ球を教育する組織である。胸腺腫や胸腺癌は、胸腺から出現する腫瘍である。胸腺腫は重症筋無力症(MG)などの自己免疫疾患と関連がある。今回の研究は、胸腺癌、MG合併胸腺腫、合併しない胸腺腫で次世代シーケンサーを用い、MG合併胸腺腫で特異的な遺伝子の異常はないかどうかを検討し、guanine nucleotide exchange factorが関連する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We characterized genomic aberrations by whole exome sequencing of next generation sequencing for 7 thymic carcinomas (TC), 7 thymoma without myasthenia gravis (MG) and 8 thymomas with MG. Samples analyzed were 22 pairs of snap-frozen surgical specimens of cancerous and non-cancerous thymic tissue. TC had somatic mutation of 178 genes and 2 recurrent somatic mutations (MIR1268A and SETD2). Thymoma had somatic mutation of 103 genes and one recurrent somatic mutations (MUC16). We performed Cluster, GO and KEGG analysis for thymoma without MG and thymoma with MG. Thymoma with MG is related to guanine nucleotide exchange factor (GEF) related genes and thymoma without MG is related to fibronectin and immunoglobulin related genes.

研究分野：医歯薬学

キーワード：重症筋無力症 胸腺腫 次世代シーケンサー 胸腺上皮細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

重症筋無力症(myasthenia gravis, MG)は神経筋接合部にあるアセチルコリンレセプターに対する抗体(抗AChR抗体)を産生する。50歳未満で発症する **early onset MG(EOMG)**と50歳以上で発症する **late onset MG(LOMG)**、**胸腺腫を合併するMG**に分けられる。**EOMG**は胸腺組織に胚中心を認め、胸腺内で抗AChR抗体が産生され、SNP解析より様々な関連遺伝子(TNF, PTPN22, CTLA4, FOXP3, CHNRA1など)が報告されている。**胸腺腫合併MG**は、MGの原因は、周囲胸腺ではなく、胸腺腫と考えられているが、その詳細は不明である。MGと腫瘍に対する両方の治療が必要となり、難治性の疾患である。**LOMG**、**胸腺腫合併MG**では、抗AChR以外の抗体(titinやryanogine receptorなど)が出現する症例がある(Autoimmunity. 2010; 43:413-)。

私たちは今までに、**胸腺腫合併MG**と**EOMG**の胸腺組織の生物学的な違いを検討してきた。**胸腺腫合併MG**では、胸腺腫内のregulatory T cell (Treg)は少ないが、胸腺組織では、Tregの数が**EOMG**と比べ同程度であった(Neurology 2010 74;10:816-)。**EOMG**の胸腺では、ハッサル小体の数が多く、CCL21の発現が高値であり、naïve B cellsの胸腺への浸潤の原因となる(J Neuroimmunol. 2014 269;1-2:56-)。

autoimmune regulator (AIRE)は胸腺髄質の上皮細胞に発現する転写因子で、ゲノムにコードされたほとんど全ての遺伝子を低いレベルで発現する特殊な遺伝子発現様式“無差別発現様式(promiscuous gene expression)”を示し、胸腺外の各臓器に特異的に発現される自己抗原の分子群(tissue-specific antigens: TSAg)を髄質内に発現させ、自己反応性T細胞のnegative selection 中枢性寛容に関わる。**多腺性自己免疫症候群1型 autoimmune polyendocrine syndrome type I (APS-I)**は、AIREの変異によって生じる多臓器自己免疫疾患である。粘膜皮膚カンジダ症、副甲状腺機能低下症、副腎不全を三徴とし、様々な抗体(NALP leucine-rich-repeat protein 5 (NALP-5)抗体, 21-hydroxylase (21OH)抗体, side-chain cleavage enzyme (SCC)抗体, type I interferons (IFNs)抗体, IL-17A, IL-17F, IL-22抗体など)を産生する。

胸腺上皮性腫瘍は、腫瘍細胞の異型性により、胸腺腫と胸腺癌に分けられ、胸腺腫には未熟T細胞を取り込む機能が維持されており、自己免疫疾患を合併することがある。WHO病理組織分類は、胸腺腫をA, AB, B1, B2, B3に分類した。B1胸腺腫は、正常胸腺の皮質を模倣した領域(cTEC)と髄質を模倣した領域(medullary differentiation)(mTEC)に分けられる。胸腺腫の大部分は、皮質を模倣した領域から成る。B2, B3胸腺腫は、ほとんどが正常胸腺の皮質の上皮(cTEC)に類似した腫瘍細胞で、B3では軽度の異型を生じる。未熟T細胞を取り込む機能もB1 B2 B3の順に少なくなる。MG合併率は、**B1, B2, B2の組織型で高頻度に認め、胸腺癌はMGを合併しない**。私たちは今までに、胸腺腫や胸腺癌のgenetic(p53)またはepigenetic(DNAメチル化)な異常の研究をしている。(Br J Cancer 1997;76:1361-. Lung Cancer 2009;64:155-, 2013 83;.2:279-)。2014年の科学研究費では、課題番号:26462145が採択され、現在、胸腺上皮性腫瘍の網羅的なDNAメチル化を検索している。

胸腺腫合併MGではAPS-1と同様に、NALP5, 21OH, 17OH, SCC, TPH-1, GAD65抗体を発現する症例があるが、EOMG, LOMG, MG非合併胸腺腫症例では、こうした抗体の出現はない。一方、APS-1症例では、抗AChR抗体や他の筋関連抗体を認めない(J Immunol. 2014,193: 3880-)。**胸腺腫合併MG**症例は、胸腺腫瘍内のAIREの発現が有意に低下することが報告されていることから、**胸腺腫合併MG**症例の抗体産生の機序として、AIRE遺伝子の異常または機能低下 髄質微小環境内での各臓器に特異的に発現される分子群(TSAs)の発現低下 低下した分子群のT細胞のnegative selectionの障害 自己反応性T細胞による自己抗体産生 自己免疫疾患、が考えられる。

最近の分子機構の解析により、胸腺のcTECとmTECがthymocyteの分化にそれぞれ独自の役割を果たし、両細胞で特異的に発現されている分子群も明らかになってきた。cTECで高発現している分子は、IL-7, Delta like ligand4 (Dl14), 5t, cathepsin L, thymus-specific serine protease (TSSP) など、mTECで高発現している分子は、CCL19, CCL21, RANK (receptor activator of nuclear factor- B), CD40, LT R, AIREなどである。こうしたcTEC, mTECで発現している分子群、TSAsの遺伝子異常やRNA発現を正常胸腺、MG合併胸腺腫、MG非合併胸腺腫症例で比較することでMG合併胸腺腫症例のMG発症の機序を推測するデータが得られる可能性がある。

2. 研究の目的

MG は 50 歳未満で発症する **early onset MG** と 50 歳以上で発症する **late onset MG**、**胸腺腫に合併する MG** に分けられ、MG の発症の機序は異なる。**胸腺腫合併 MG** は、自己免疫調節遺伝子 AIRE の変異によって生じる **autoimmune polyendocrine syndrome type I** と類似し、様々な抗体が産生される。原因として、AIRE の異常 胸腺内に発現する分子群の異常 自己反応性 T 細胞の negative selection の障害が予想される。胸腺と胸腺腫は、thymocyte が混在するので、皮質上皮細胞(cTEC)、髄質上皮細胞(mTEC)別の検討が難しい。cTEC の特異的な表面マーカーである CD205 抗体を使用し、cell sorting にて cTEC と mTEC を分離し、次世代シーケンサーにより各細胞の遺伝子の異常と mRNA の発現の違いを検討し、**胸腺腫合併 MG** の MG 発症の機序を解明する。

3. 研究の方法

(1)胸腺、胸腺腫組織より cell sorting により、cTEC, mTEC を分離し、DNA, RNA を抽出

小児の正常胸腺組織(心臓血管外科手術時)、胸腺腫非合併 MG 症例からは正常胸腺組織、MG 合併胸腺腫症例からは正常胸腺組織と腫瘍組織、MG 非合併胸腺腫症例からは正常胸腺組織と腫瘍組織について、以下の方法で分離する。

徳島大学病院の手術で得られた新鮮標本を氷上で切離し、すりつぶし、Collagenase/dispase 酵素液を使用し、single cell 化する。CD45 MicroBeads を使用し、thymocytes(CD45-細胞)を分離する。CD45+細胞は APC/Cy7-CD45 (Biolegend クローン HI30)、FITC-EpCAM (MACS クローン HEA125)、PE-CD205 (Biolegend クローン HD30)、APC-HLA-DR (Biolegend クローン L243) 抗体を使用し FACS 解析(cell sorting)を行う。CD45- thymocytes, CD45+/EpCAM- dendritic cells など, CD45+/EpCAM+ TEC CD45+/EpCAM+/HLA-DR+/CD205- mTEC, CD45+/EpCAM+/HLA-DR+/CD205+ cTEC

(2)DNA 断片化と NGS アダプターの付加ならびにエクソームキャプチャー

腫瘍部および正常組織の DNA (最低量 10ng) について、DNA の断片化後に NGS アダプターの付加を行う。全ゲノム上でのタンパク質をコードする全エクソン (37~51Mb) を標的にして hybridization での capture を Agilent 社 SureSelect または Illumina 社 NexteraRapid Capture にて行い、エクソンの配列の濃縮を行う。

(3)Illumina 次世代シーケンサーを用いてシーケンス解析

Illumina NGS 次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて、腫瘍や正常部胸腺 DNA については x100 以上、血液に関しては x70 の depth (深度) を目標にシーケンスを行う。産出された大量のデータは、東大医科研のスーパーコンピューターシステム上にて、理研にて構築されたアルゴリズムによってシーケンスデータ解析を迅速に行い、全エクソンレベルでの腫瘍の体細胞ポイント変異、コピー数異常を検出する。分担者の中川のグループはすでに約 300 例の肝臓癌に関して全ゲノムシーケンス解析が完了しており、技術的なハードルはない。現在の全ゲノムシーケンス解析パイプラインの偽陽性率は約 3%、偽陰性率は推定で約 10%程度である。

(4)RNA シーケンス解析

RNA シーケンス解析も行っており、long non-coding RNA (lincRNA) を含む遺伝子発現、splicing の異常、融合遺伝子などの検出を行う。

(5)小児の正常胸腺、胸腺腫非合併 MG 症例の胸腺、MG 合併胸腺腫症例の胸腺と腫瘍、MG 非合併胸腺腫症例の胸腺と腫瘍に関して、mTEC, cTEC の遺伝子異常や mRNA の発現の違いを検討する。

4. 研究成果

初年度(2016年度)、胸腺、胸腺腫組織より cell sorting により、cTEC, mTEC を分離し、DNA, RNA を抽出作業を行った。以前の私たちの実験で、小児の正常胸腺組織に対して、FACS 解析 (cell sorting) を行い、CD45+/EpCAM+/HLA-DR+/CD205-細胞と CD45+/EpCAM+/HLA-DR+/CD205+細胞を回収し、RNA を抽出し、RT-PCR を施行し、CD45+/EpCAM+/HLA-DR+/CD205-細胞では、AIRE の発現が、CD45+/EpCAM+/HLA-DR+/CD205+細胞では、5t の発現を認め、それぞれ mTEC, cTEC

であることを確認している。しかし、成人の胸腺腫と胸腺組織で、cell sortingで cTEC と mTEC の分離を試みたが、成功しなかった。不成功の要因は、胸腺腫では、小児の胸腺より上皮細胞と間質組織の繋がりが強い可能性がある。成人の胸腺組織は、著明に委縮しているため、採取される cTEC と mTEC が少ない可能性が考えられる。解決方法として、cell sorting はずし、TEC を single cell に分離して、RNA シークエンス解析をおこなうことになった。分離方法を確立するために時間がかかるため、実験計画を変更し、胸腺癌、MG 合併胸腺腫、MG 非合併胸腺腫について、全エクソンレベルでの腫瘍の体細胞ポイント変異、コピー数異常を検出することにした。

2017 年度

切除材料（凍結標本）胸腺癌 7 例、MG 非合併胸腺腫 6 例（B2:5 例, B3:1 例）、MG 合併胸腺腫 7 例（B2:4 例, B3:3 例）の腫瘍部と正常部（胸腺組織）から DNA と RNA を抽出した。DNA の断片化後に NGS アダプターの付加を行った。全ゲノム上でのタンパク質をコードする全エクソン（37-51Mb）を標的にして hybridization での capture を Agilent 社 SureSelect または Illumina 社 NexteraRapid Capture にて行い、エクソンの配列の濃縮を行った。Illumina NGS 次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて、腫瘍や正常部胸腺 DNA については x100 以上、血液に関しては x70 の depth（深度）を目標にシーケンズを行った。産出された大量のデータは、東大医科研のスーパーコンピューターシステム上にて、理研にて構築されたアルゴリズムによってシーケンズデータ解析を迅速に行い、全エクソンレベルでの腫瘍の体細胞ポイント変異、コピー数異常を検出した。BRWD3、OGFOD1、PTEN、SETD2、SOD3、VPS13D、WDR64 遺伝子の mutation をより悪性である胸腺癌において認めた。

2018 年度

正常胸腺組織に対して、EpCAM 抗体を使用し、cell sorting を行い、上皮細胞を単離できた。リンパ球の混在するタイプ B1 胸腺腫にも適応し、上皮細胞のみ次世代シーケンサーで解析し、胸腺皮質上皮と髄質上皮で特異的に発現している遺伝子を同定することができた。切除材料（凍結標本）胸腺癌 7 例、重症筋無力症(MG)非合併胸腺腫 7 例（B2:5 例, B3:1 例, AB:1 例）、MG 合併胸腺腫 8 例（B2:4 例, B3:3 例, B1:1 例）の腫瘍部と正常部（胸腺組織）から DNA と RNA を抽出した。Illumina NGS 次世代シーケンサー HiSeq2500 を用いて、腫瘍や正常部胸腺 DNA について全エクソンレベルでの腫瘍の体細胞ポイント変異、コピー数異常を検出した。胸腺癌では、178 遺伝子の mutation を認めた。しかし、複数の部位に mutation を認めたのは 4 遺伝子(C2orf16, KIT, MIR1268A, SETD2)で、複数の症例で mutation を認めたのは、MIR1268A 遺伝子と SETD2 のみであった。KIT, SETD2, ASXL1, EP300, TET2, TP53 遺伝子は、以前の報告で胸腺癌で mutation が認められている遺伝子であった。胸腺腫では 103 遺伝子に mutation を認めしたが、複数の部位に mutation を認めたのは 3 遺伝子(LOC101929596, MUC16, RPS14P3)で、複数の症例で mutation を認めた遺伝子は MUC16 のみであった。MG 合併群が 6 例（56 遺伝子）と非 MG 合併群が 6 例（48 遺伝子）について、クラスター解析, GO 解析, KEGG を用いた pathway 解析を行った。MG 合併群では GEF の機能に関する遺伝子が enrich され、非合併群では fibronectin や immunoglobulin 関連遺伝子が enrich された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究分担者

研究分担者氏名：滝沢 宏光
ローマ字氏名：(TAKIZAWA, Hiromitsu)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：大学院医歯薬学研究部（医学系）
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90332816

研究分担者氏名：松井尚子
ローマ字氏名：(MATSUI, Naoko)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：病院
職名：特任講師
研究者番号（8桁）：10547954

研究分担者氏名：中川 英刀
ローマ字氏名：(NAKAGAWA, Hidewaki)
所属研究機関名：国立研究開発法人理化学研究所
部局名：生命医科学研究センター
職名：チームリーダー
研究者番号（8桁）：50361621

研究分担者氏名：坪井 光弘
ローマ字氏名：(TSUBOI, Mitsuhiro)
所属研究機関名：徳島大学
部局名：病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：10711872

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。