

令和 2 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K08724

研究課題名(和文) 特発性間質性肺炎に合併する肺腺癌の病理学的特性と組織発生

研究課題名(英文) Pathological features and histogenesis of interstitial pneumonia-related lung adenocarcinoma

研究代表者

奥寺 康司 (Okudela, Koji)

横浜市立大学・医学部・准教授

研究者番号：10326027

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)：「目的」間質性肺炎に合併する肺腺癌の組織発生を明らかにする。「方法」気管支上皮化生を腺癌の間で分子異常プロファイルと比較した。「結果」網羅的遺伝子解析の結果、変異量は、健常、化生、腺癌の順に多かった。デジタルPCRによるKRAS変異解析の結果、化生部では、健常部に比し、変異頻度が有意に高かった。免疫染色でHNF4a陽性細胞を検出した結果、健常、化生、腺癌の順に頻度が高かった。TTF1プロモータメチル化解析の結果、メチル化レベルは、健常、化生、腺癌の順に高かった。「結論」分子異常が、健常-化生-腺癌の順に蓄積する傾向が示され、「気管支上皮化生から腺癌に至る発癌経路の存在」が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
間質性肺炎と肺癌の診療水準の向上に寄与する。

研究成果の概要(英文)：[Purpose] The purpose of this study is to elucidate histogenesis of interstitial pneumonia-related lung adenocarcinoma (IP-LADC). [Methods] We focused on bronchiolar metaplasia that lines honeycomb lesions as the potential precursor for IP-LADC and investigated molecular alterations by comprehensive mutational analyses, digital PCR for KRAS mutations, immunohistochemistry for HNF4a, and bisulfite sequencing for TTF1 promoter to confirm metaplasia-LADC pathway. [Results] 1) Mutational burden, some KRAS point mutations, HNF4a-positive cell frequency, and the levels of TTF1 methylation increased in healthy part, metaplastic lesion, and IP-LADC in this order. [Conclusions] The results supported the notion that IP-LADC develops through bronchiolar metaplasia in honeycomb lesions.

研究分野：医学

キーワード：病理学 肺腺癌 間質性肺炎 遺伝子異常 発癌経路

## 1. 研究開始当初の背景

特発性間質性肺炎（以下、間質性肺炎）は原因不明の進行性難治性疾患であり、その4-15%に肺癌を併発する。その約半数が腺癌である（Fujimoto D et al. Lung Cancer 80:159-160, 2013）。間質性肺炎に合併する肺腺癌は、細胞分化形質や遺伝子変異プロファイルにおいて、通常の肺腺癌とは異なる性質を持つことが指摘されている。間質性肺炎に合併する肺腺癌は、多くが気管支表面上皮型の細胞亜型（non-terminal respiratory unit (TRU) subtype）を示し、間質性肺炎患者の殆どが重喫煙者であるが、このような肺腺癌の性質は、喫煙の影響のみでは説明できない間質性肺炎に固有の特徴であることが申請者らの最近の研究で明らかになっている（Kojima Y, Okudela K, Histopathology 2016）。

間質性肺炎に合併する肺腺癌では、標的遺伝子変異の頻度も極めて低く、進行例においては有効な治療法がないのが実状である（Kojima Y, Okudela K, Histopathology 2017）。一方、間質性肺炎の多彩な病変のうちどのような性質のものが肺腺癌の発生母地となっているのかも不明であり、経過中に肺腺癌の併発を予測するのは難しい。間質性肺炎に合併する肺腺癌の分子特性と組織発生を明らかにすることは診療戦略の向上に繋がると考えられた。

申請者らは、これまでの研究から、1) 間質性肺炎に合併する肺腺癌の多くが気管支表面上皮型の細胞亜型（non-TRU subtype）を示すこと、2) このような腺癌の発生した背景にはしばしば高度の気管支上皮化生が広がり、3) 腺癌病変と化生病変が互いに連続していること、また、3) 腺癌周囲の化生病変のなかには細胞異型を示すものがあることを明らかにしている（Kojima Y, Okudela K, Histopathology 2017）。これらは通常の肺腺癌には見出し難い特徴であり、間質性肺炎に合併する肺腺癌が、気管支上皮化生を前癌病変として発生する特異な病変であることを示唆する興味深い結果であった。

## 2. 研究の目的

本課題の目的は、間質性肺炎に合併する肺腺癌の病理学的特性を明らかにし診療戦略の向上に有用な知見を提示することである。また、その組織発生を明らかにすることである。間質性肺炎に合併した肺腺癌と気管支上皮化生の両者の遺伝子異常を次世代シーケンサーなどによって網羅的に解析し、両者の遺伝子変異発現プロファイルを比較、気管支上皮化生から肺腺癌に至る発癌経路の存在を検証する。

## 3. 研究の方法

### 1) 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異検索

マイクロダイセクション法で、がん細胞、気管支上皮化生細胞、健常部の気管支上皮細胞を選別して採取し、次世代シーケンサー（comprehensive cancer panel：タカラバイオ；800,000 bases を網羅し、平均デプスが1000程度で、低頻度の体細胞変異の検出が可能である）を用いて網羅的に変異を解析した。

### 2) デジタルPCR法を用いた高感度KRAS遺伝子変異の検出・定量

マイクロダイセクション法で、気管支上皮化生細胞、健常部の気管支上皮細胞を選別して採取し、デジタルPCR法でKRAS遺伝子変異（主な9種類）を高感度に検出した。

### 3) 免疫染色によるHNF4a陽性細胞の出現頻度の比較

免疫染色で、がん細胞、気管支上皮化生細胞、健常部の気管支上皮細胞のそれぞれにおけるHNF4a陽性細胞の出現頻度を求めた。

### 3) TTF1 遺伝子プロモータのメチル化プロファイル解析

がん細胞、気管支上皮化生細胞、健常部の気管支上皮細胞のそれぞれにおける TTF1 遺伝子プロモータ領域のメチル化をパイサルファイトシーケンス法で解析した。

### \* ) mRNA/miRNA 発現プロファイル解析

予備実験は良好な結果が得られていたが、研究開始初期の段階で、発現解析に十分な量・質の RNA 抽出を安定して行うことが困難であると判断し、本解析を断念した。

## 4. 研究成果

### 1) 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異検索

遺伝子変異量は、健常部、化生、腺癌の順に多くなる傾向があり、化生病変が前癌病変である可能性が支持された(論文投稿準備中)。また、気管支上皮化生と腺癌の間で共通に生じている遺伝子変異(Noch1 他)を幾らか見いだすことが出来た。但し、個々の症例において、化生と腺癌の連続性を示す明確な遺伝子変異の類似性を見いだすことはできなかった。

### 2) デジタル PCR 法を用いた高感度 KRAS 遺伝子変異の検出・定量

そこで、間質性肺炎合併腺癌のしばしば見いだされる KRAS 遺伝子変異に着目し、高感度デジタル PCR 法(0.01%の変異を検出可能)を用いて、化生病変に生じている変異の検出を試みた。化生病変では、健常部肺に比較して、変異蓄積量が多く、化生病変が前癌病変である可能性が支持された(図1)(論文投稿準備中)。

### 3) 免疫染色による HNF4a 陽性細胞の出現頻度の比較

一方で、間質性肺炎合併腺癌の多くで発現する HNF4a に着目して、発現陽性細胞の頻度を健常細気管支、化生、腺癌で比較した。健常部、化生、腺癌の順に多くなる傾向があり、化生病変が前癌病変である可能性が支持された(図2)((Okudela et al 2018, 2019)。

### 4) TTF1 遺伝子プロモータのメチル化プロファイル解析

上記で示した HNF4a の発現は、TTF1 遺伝子の失活によって起こることが、既に報告されている。また、間質性肺炎のしばしば合併するタイプの腺癌では、TTF1 遺伝子変異やプロモータのメチルが起こっているとの知見が、本計画の期間中に、他の複数の研究グループから報告された。そこで、健常部、化生、腺癌における TTF1 遺伝子プロモータのメチル化プロファイル解析を行い。結果を比較した。メチル化の程度は、健常、化生、腺癌の順に高くなる傾向が見られた(図3)(論文投稿準備中)。

### 5) 総括

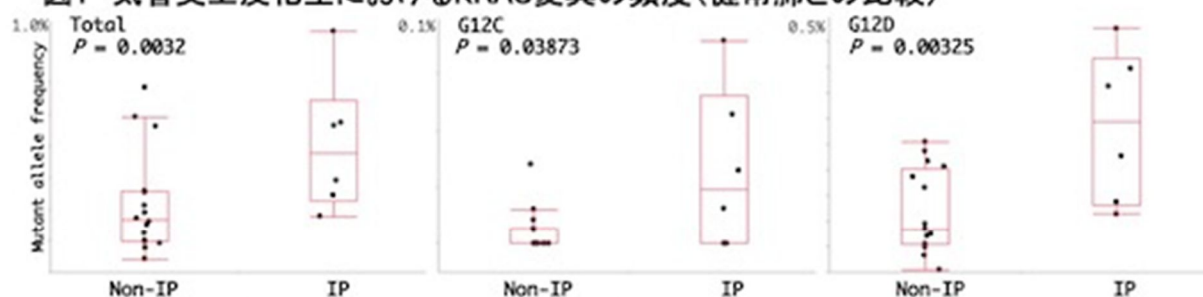
総じて、解析した分子異常が、健常部-化生-腺癌の順に、シーケンシャルに蓄積する傾向が見られ、化生病変が前癌病変であることが示唆された。これは、計画当初の申請者の仮説を支持するものであった。

## <引用文献>

Kojima Y, Okudela K, Matsumura M, et al. The pathological features of idiopathic interstitial pneumonia-associated pulmonary adenocarcinomas. *Histopathology*. 2017; 70: 568-78.

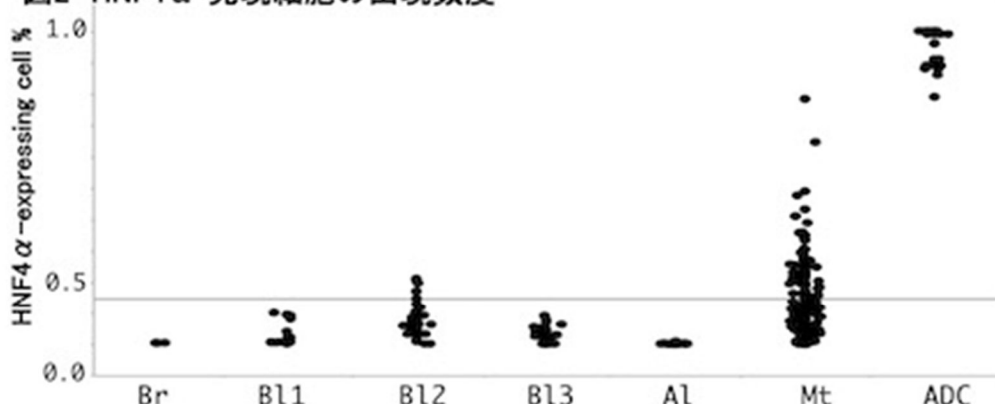
Fujimoto D, Tomii K, Otoshi T, et al. Preexisting interstitial lung disease is inversely correlated to tumor epidermal growth factor receptor mutation in patients with lung adenocarcinoma. *Lung Cancer*. 2013; 80: 159-64.

図1 気管支上皮化生におけるKRAS変異の頻度(健常肺との比較)



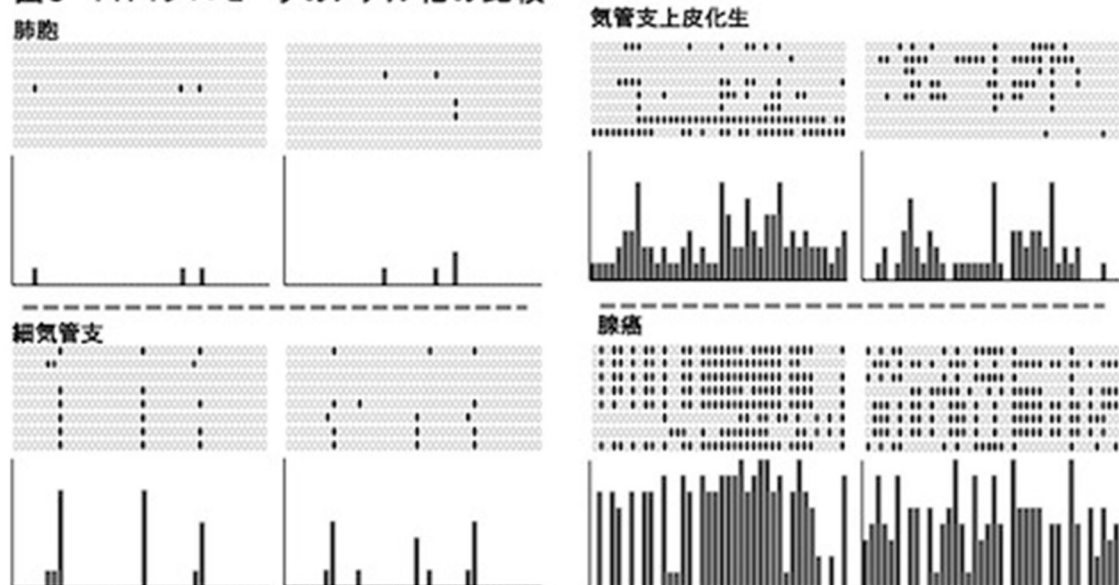
間質性肺炎患者(6例)の蜂巣肺を裏打ちする気管支上皮化生細胞(IP)をマイクロダイセクション法で採取し、KRAS変異の頻度をデジタルPCR法で解析した。非間質性肺炎患者(16例)の気道上皮細胞(non-IP)を対照とし、変異頻度の相違をWilcoxon signed-rank testで検定した。有意水準(P)を示す。“Total”は全ての変異型の合算、“G12C”は喫煙と関連性が高い変異型、“G12D”は喫煙との関連性が低い変異型。KRAS変異の頻度は気管支上皮化生細胞で有意に高く、それらは喫煙+ $\alpha$ の要因で引き起こされていることが示唆された。

図2 HNF4 $\alpha$  発現細胞の出現頻度



HNF4 $\alpha$ 発現細胞の出現頻度の比較 Br 気管支; B11 小葉細気管支; B14 終末細気管支; B13 呼吸細気管支; Al 肺胞; Mt 化生; ADC 腺癌

図3 TTF1プロモータのメチル化の比較



タイルパネル(黒はメチル化を示す)。グラフは各ポジションのメチル化頻度。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Okudela K, Arai H, Kitamura H et al.	4. 巻 34
2. 論文標題 A subpopulation of airway epithelial cells that express hepatocyte nuclear factor 4alpha - its implication in the development of non-terminal respiratory unit-type lung adenocarcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-098	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 Okudela K, Kojima Y, Matsumura M et al.	4. 巻 33
2. 論文標題 Relationship between non-TRU lung adenocarcinomas and bronchiolar metaplasia - potential implication in their histogenesis	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 317-326
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-11-935	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 Kataoka T, Okudela K, Nakashima Y	4. 巻 34
2. 論文標題 Unique expression profiles of mucin proteins in interstitial pneumonia-associated lung adenocarcinomas	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Histol Histopathol	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.14670/HH-18-114	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0件

〔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	宮城 洋平 (Miyagi Yohei)  (00254194)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・臨床研究所・所長  (82713)	

## 6. 研究組織（つづき）

	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	横瀬 智之 (Yokose Tomoyuki)  (10221665)	地方独立行政法人神奈川県立病院機構神奈川県立がんセンター（臨床研究所）・その他部局等・その他  (82713)	
研究分担者	荒井 宏雅 (Arai Hiromasa)  (10381493)	横浜市立大学・医学研究科・客員講師  (22701)	
研究分担者	立石 陽子 (Tateishi Yoko)  (20644438)	横浜市立大学・医学部・助教  (22701)	
研究分担者	梅田 茂明 (Umeda Shigeaki)  (30644439)	横浜市立大学・附属病院・助教  (22701)	
研究分担者	大橋 健一 (Ohashi Kenichi)  (40231203)	横浜市立大学・医学研究科・教授  (22701)	
研究分担者	石川 善啓 (Isikawa Yoshihiro)  (40384838)	横浜市立大学・附属病院・助教  (22701)	
研究分担者	禹 哲漢 (Woo Tetsukan)  (90537177)	横浜市立大学・医学部・講師  (22701)	