

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：15101

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K18214

研究課題名(和文) 早期浸潤性肺腺癌の充実/微小乳頭型における分子生物学的プロファイル解析

研究課題名(英文) Gene expression profiling using targeted RNA sequencing in early stage lung adenocarcinoma with a solid component or micropapillary component

研究代表者

城所 嘉輝 (Kidokoro, Yoshiteru)

鳥取大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：50768752

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)：肺腺癌は腫瘍細胞の形態が不均一であることがよく知られている。中でも充実型と微小乳頭型は悪性度が高く、同じステージの肺腺癌でもこれら2つの組織型が存在すると予後不良となる。そこで、これら2つの型がもつ遺伝子の特徴について研究を行った。早期であるステージI期の肺癌切除検体から、充実型とその比較として腺房型をそれぞれ顕微鏡を用いて組織を回収した。回収した組織からRNA(リボ核酸)を回収して解析を行った。微小乳頭型は純粋な組織が切り出せずに解析は充実型のみで行った。充実型では細胞増殖に関わるRNAが多数みられ、組織像を反映していた。また充実型にはPDL1が発現しており、免疫抑制の関与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺腺癌の中で、とくに予後不良となる充実型増殖の遺伝子発現状況の研究を行い多数の遺伝子の発現上昇あるいは発現低下を確認した。すでに免疫療法として治療対象となっているPDL1が充実型で多く見られた。加えて、乳癌領域で癌遺伝子の調節を行う因子として報告されているTAF1の発現上昇、転移抑制として働き癌抑制因子としての機能が知られているHOXB3の発現低下、過去の報告で肺癌の増殖能を活性化する可能性が示されているPSMA6などが見られた。さらなる研究は必要であるが、これらの遺伝子は肺癌の新規治療の標的となりえ、予後不良な肺癌の治療に貢献できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Lung adenocarcinoma (LUAD) has histologically intratumor heterogeneity. Especially, a solid component and a micropapillary component are highly malignant, and even in LUAD of the same stage, the presence of these two subtypes shows a poor prognosis. Therefore, we studied the genetic characteristics of these two subtypes. First, tissues were collected from the stage I LUAD resected specimens using a laser microdissection for a solid component and an acinar component which is one of the subtypes of LUAD. Second, RNA was collected from the tissue and we compared the RNA in the solid component with the acinar component. However, in the micropapillary type, pure tissue was not cut out. Finally, the analysis was performed only in the solid component compared with the acinar component. Many RNAs involved in cell proliferation were found in a solid component. In addition, PDL1 was highly expressed in a solid component, suggesting the involvement of immunosuppression.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：浸潤性肺腺癌 充実型増殖 発現変動遺伝子

### 1. 研究開始当初の背景

浸潤性肺腺癌は均一ながん細胞集団ではなく、様々な細胞から成り立つ heterogeneity を有しており、特に通常型の肺腺癌は病理組織学的な構造上、置換型、腺房型、乳頭型、微小乳頭型、充実型の亜型に分類され、最も多い組織が優位亜型となる。浸潤性肺腺癌の特徴は、正常肺における遺伝子的な変化により、上皮内癌を含む非浸潤性病変となり、浸潤能力を獲得することで、微小浸潤性肺腺癌、浸潤性肺腺癌へと段階的に進行することである。なかでも微小乳頭状増殖優位型と充実性増殖優位型では、早期の状態であってもリンパ節転移等が多く予後不良であることが明らかとなっている。しかしながら、どのようなメカニズムで肺腺癌において悪性度が高まり微小乳頭型や充実型が生ずるか未だ不明である。

### 2. 研究の目的

本研究では、浸潤性肺腺癌の外科切除検体を用いて、正常肺、置換型、腺房型、乳頭型、微小乳頭型、充実型の各亜型における特徴的な遺伝子発現プロファイルを網羅的に解析する。同一組織内でこれらの遺伝子発現プロファイルを解析することで、シグナル経路を特定して肺腺癌がそれぞれの増殖形態を獲得するメカニズムを解明し、さらに、予後不良な微小乳頭型と充実型の肺腺癌において、治療標的となり得る遺伝子を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

2014年1月から2018年12月までに鳥取大学医学部附属病院呼吸器外科で根治的手術が施行された病理病期 I 期肺腺癌 227 例のうち、外科手術検体であるホルマリン固定・パラフィン包埋 (FFPE) ブロックから作成したパラフィン切片の Hematoxylin-Eosin (H&E) 染色結果をもとに、各症例の亜型とその割合を再判定した。

充実型および腺房型をととも腫瘍全体の 10% を所有する 8 例、非浸潤部 (置換型増殖) および非浸潤部 (腺房型あるいは乳頭型) を腫瘍全体の 10% を所有する 8 例をそれぞれ対象とした。

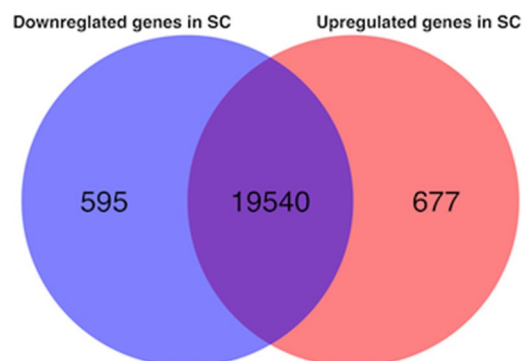
(1) FFPE ブロックから厚さ 10  $\mu\text{m}$  で切片を作成して専用の染色キット (ARCTURUS paradise PLUS FFPE LCM Staining Kit) を用いて染色を行った。同一組織内から充実型と腺房型をそれぞれレーザーマイクロダイセクション (Leica LMD700) で組織採取後に、Recover All Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE を用いて total RNA を抽出した。RNA の品質は DV200 を使用して評価を行った。次世代シーケンサー (Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression Kit) を用いて 20,813 の既知遺伝子の発現量を測定した。RNA の品質が維持されている 6 例を最終の対象として、充実型群と腺房型群とで二群間比較 (ペアワイズ尤度比検定) を用い、発現変動遺伝子 (Differential expressed gene; DEG) を同定した。同定した DEG を元に、これらにおいてエンリッチメント解析およびタンパク質間相互作用解析 (Protein-protein interaction; PPI) から充実型に優位である遺伝子機能の評価を行った。さらに病理病期 I 期肺腺癌の 41 例を新たな対象として、DEG がコードするタンパク質発現を免疫組織化学染色 (TAF7, HOXB3, PDL1) にて検証した。また、細胞株 (RERF-LC-KJ) において、siRNA をもちいて *NRAS*, *CXCL10*, *CMTM6*, *HIF1* を knock down して、PDL1 の発現状況を qRT-PCR/western blot で検証した。

(2) 次に、正常肺組織・置換型をそれぞれレーザーマイクロダイセクションで採取して total RNA を抽出した。次世代シーケンサーで既知遺伝子の発現量を測定し、RNA の品質が維持されている 6 例を最終対象とした。正常肺組織群と置換型群とで二群間比較 (ペアワイズ尤度比検定) と行い DEG を同定した。EGD のエンリッチメント解析と PPI 解析から置換型で特徴的な遺伝子の機能評価を行った。置換型および非浸潤部 (腺房型あるいは乳頭型) をとも腫瘍全体の 10% 以上を含む 30 例と上皮内腺癌または微小浸潤性肺腺癌 30 例を対象に DEG 発現を免疫組織化学染色にて検証した。TCGA データベースから早期肺腺癌患者 (病理病期 IA 期) 119 例の RNA-Seq データを抽出し、生存期間解析を行った。

### 4. 研究成果

(1) 1,272 の DEG を同定した (false discovery rate; FDR < 0.05)。このうち、充実型に発現上昇する遺伝子は 677、発現低下する遺伝子は 595 であった (図 1)。最も上昇している遺伝子は TATA binding protein associated factor 7 (*TAF7*)

図 1. 発現返変動遺伝子におけるベン図



で、最も低下している遺伝子は homeobox B3 (*HOXB3*)であった。最上位の発現変動遺伝子である *TAF7*は細胞増殖に必須のポリアミンの細胞内での維持と、アポトーシスを誘導するポリアミン類似体である Methylglyoxal bis(guanylhydrazone) (MCBG) に対する感受性に関連していることが報告されている<sup>1)</sup>。一方、最下位の発現変動遺伝子(すなわち、最上位の発現抑制遺伝子)である *HOXB3* は、癌抑制遺伝子として知られ、細胞増殖や転移、浸潤、上皮間葉転換などの抑制に関わる転写因子である。*HOXB3* のサイレンシングによって、肺癌の浸潤能が亢進することが報告されている<sup>2)</sup>。1,272 の DEG を用いて行ったエンリッチメント解析では、137 の gene ontology term がアノテーションされ ( $p < 0.05$ )、細胞増殖に関わるものが多く見られた。PPI では ribosomal S27a (*RPS27a*)が最上位のハブ遺伝子であり、*RPS27a* を中心としたネットワークにおいて、proteasome subunit alpha type-6 (*PSMA6*)を含む 94 の DEG がコードするタンパクの直接相互が示された(図2)。*RPS27a* は p53 の応答に作用して細胞周期の停止に関与し、*PSMA6* をサイレンシングすることで癌細胞のアポトーシスを誘導することが報告されており *PSMA6* は治療標的の可能性が報告されている<sup>3)</sup>。また、programmed cell death ligand 1 (PDL1)として知られる *CD274* の発現上昇が認められた(図3)。PDL1, *HOXB3* での免疫組織化学染色ではそれぞれ、充実型、腺房型に有意に陽性であった ( $p = 0.01$ ,  $p = 0.007$ )。TAF7 では有意差は見られなかった ( $p = 0.336$ )。図3において PDL1 と隣接するタンパク質をコードする mRNA の一部(図3)と *HIF1* の siRNA による knock down の検証実験を行ったが、qRT-PCR と western blot では PDL1 の発現には変動が見られなかった。なお、微小乳頭型は純粋な組織の回収ができず、本研究では、充実型に焦点をあてた。

図2 .タンパク質間相互作用ネットワーク

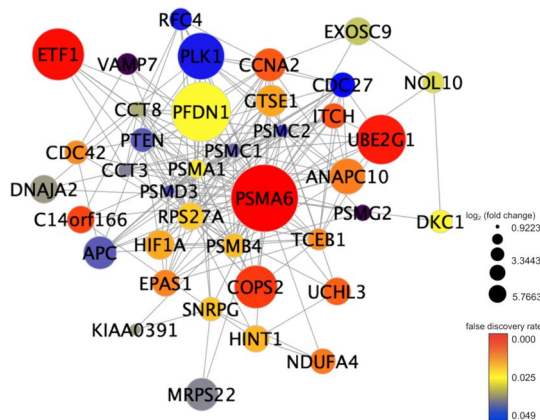
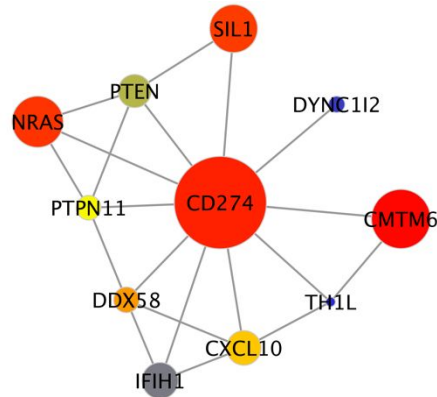
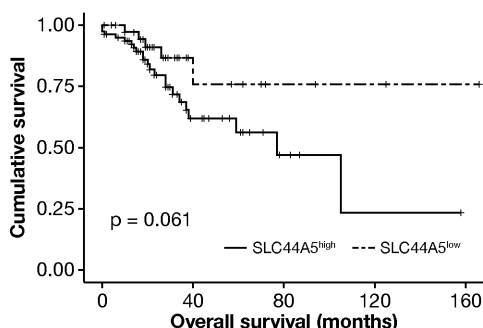


図3 . CD274 におけるサブネットワーク

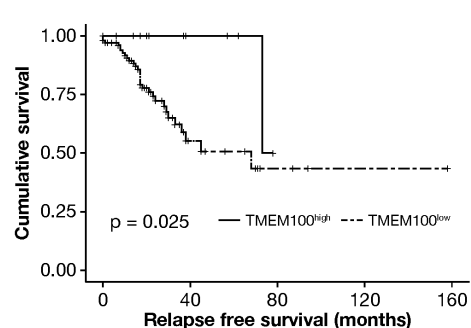


(2) 2,536 の DEG を同定した。このうち、置換型で発現上昇する遺伝子は 863, 発現低下する遺伝子は 1673 であった。Gene set enrichment analysis (GSEA) では、細胞死や免疫反応に関連する遺伝子が DEG に多く含まれていることが分かった。PPI では、発現上昇遺伝子ネットワークにおいて、*CDH1*, *EGF*, *HRAS* などが、発現低下遺伝子ネットワークでは、*IL6*, *TNF*, *VEGFA* などがハブ遺伝子として同定された。置換型で発現上昇していた Choline transporter-like protein 5 (*SLC44A5*)のタンパク発現は、浸潤性肺腺癌患者、上皮内腺癌/微小浸潤腺癌患者において、正常肺組織よりも非浸潤性病変で有意に高値であった。一方、発現現象が認められた Transmembrane protein 100 (*TMEM100*)のこれらの患者における発現は、正常肺組織よりも置換型に有意に低値であった。また、これらは EGFR 変異の有無には影響されなかった。さらに、早期肺腺癌患者の TCGA データベースを用いた生存期間解析では、*SLC44A5* 高発現群で全生存期間が低下傾向(図4A)にあり、*TMEM100* 低値群では無再発生存期間が有意に低下(図4B)していた。

図4 A. 全生存率



B. 無再発生存率



参考

## 文献

- 1) J. Fukuchi, et al. TATA-binding protein-associated factor 7 regulates polyamine transport activity and polyamine analog-induced apoptosis, *J. Biol. Chem.* 279(2004)29921-29929.
- 2) I. Daugaard, et al. Identification and validation of candidate epigenetic biomarkers in lung adenocarcinoma, *Sci. Rep.* 6(2016)35807
- 3) T. Kakumu, et al. Identification of proteasomal catalytic subunit PSMA6 as a therapeutic target for lung cancer, *Cancer Sci.* 108(2017)732-743

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kidokoro Yoshiteru, Sakabe Tomohiko, Haruki Tomohiro, Kadonaga Taichi, Nosaka Kanae, Nakamura Hiroshige, Umekita Yoshihisa	4. 巻 147
2. 論文標題 Gene expression profiling by targeted RNA sequencing in pathological stage I lung adenocarcinoma with a solid component	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 56 ~ 63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2020.06.035	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 Kadonaga Taichi, Sakabe Tomohiko, Kidokoro Yoshiteru, Haruki Tomohiro, Nosaka Kanae, Nakamura Hiroshige, Umekita Yoshihisa	4. 巻 480
2. 論文標題 Gene expression profiling using targeted RNA-sequencing to elucidate the progression from histologically normal lung tissues to non-invasive lesions in invasive lung adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 831 ~ 841
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-021-03250-y	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4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 城所嘉輝, 坂部友彦, 春木朋広, 門永太一, 野坂加苗, 中村廣繁, 梅北善久
2. 発表標題 充実型増殖を有する病理病期 期肺腺癌における遺伝子発現解析 -同一腫瘍内の腺房型増殖と比較して-
3. 学会等名 第109回日本病理学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城所嘉輝, 中西敦之, 野坂祐仁, 大島祐貴, 松居真司, 門永太一, 窪内康晃, 高木雄三, 春木朋広, 梅北善久, 中村廣繁
2. 発表標題 病理病期 期肺腺癌における充実型増殖の遺伝子発現解析
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 城所嘉輝, 中西敦之, 野坂祐仁, 大島祐貴, 松居真司, 窪内康晃, 高木雄三, 春木朋広, 中村廣繁
2. 発表標題 充実型肺腺癌はなぜ予後が不良か -次世代シーケンサーを用いた遺伝子発現解析からの解明-
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 門永太一, 坂部友彦, 城所嘉輝, 牧嶋かれん, 野坂加苗, 梅北善久
2. 発表標題 肺腺癌患者における正常肺組織とlepidic component間の遺伝子発現プロファイルの比較解析
3. 学会等名 第110回日本病理学会総会
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

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