

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K17738

研究課題名（和文）肺腺癌におけるドライバー遺伝子変異ごとの核異型と細胞像の特徴の解明

研究課題名（英文）Examination of relation between nuclear atypia and cytomorphological features for lung adenocarcinoma sub-types based on driver mutation

研究代表者

小林 さやか（Sayaka, Kobayashi）

群馬大学・大学院保健学研究科・助教

研究者番号：80765694

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）： 遺伝子変異特異的microRNAが癌細胞のEGFR，KRAS変異そのものに特異的な変化を示さないことを明らかにし、論文発表した（小林さやから：ヒト肺腺癌細胞株におけるドライバー遺伝子変異特異的microRNA発現の解析．The Kitakanto Medical Journal．74(1)．2024）。

核膜関連蛋白であるエメリン，ラミンA，B1，B2発現と核所見の連続変数データや臨床病理学的所見との関連を統計解析し、成果を現在論文投稿している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ヒト組織に対する遺伝子変異特異的microRNA解析は他の手法よりも比較的簡便な手法であるが、上記microRNAは培養細胞の検討で癌細胞そのもののEGFR，KRAS変異を反映せず、EGFR，KRA変異検査としては使用できないことが明らかとなり、臨床的に意義深い。

またエメリン，ラミンの発現の有無と核所見や臨床病理学的所見（特に組織亜型）との関連を明らかにしたことは我々が初めてであり学術的意義がある。

研究成果の概要（英文）：We revealed that driver mutation-specific microRNA did not change specifically even if lung adenocarcinoma cells have EGFR or KRAS mutation. These results were published in Japanese.

In addition, we examined the association between expression of emerin, lamin A, B1, B2 and nuclear morphological factor (nuclear area, perimeter and shape factor), clinicopathological features in human lung adenocarcinoma cases utilizing formalin-fixed paraffin-embedded tissues by immunohistochemistry. These results are summarized and being submitted to a journal.

研究分野：病理組織・細胞診断学

キーワード：肺腺癌 遺伝子変異特異的microRNA EGFR遺伝子変異 KRAS遺伝子変異 エメリン ラミン 核の形状因子 臨床病理学的所見

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、研究者個人に帰属します。

## 1. 研究開始当初の背景

病理組織診断(組織診)または細胞診断(細胞診)では、核の大きさ、形や色の濃さの程度等の核形状を捉えて診断している。特に組織診に比し細胞診では、核形状の細かな所見を捉えることが重要であるが、症例によって核形状は多彩な像を示しており、良・悪性の診断に苦慮する。他方で、肺腺癌ではドライバー遺伝子異常が多く認められ<sup>1)</sup>、それらの遺伝子異常例における核形状の変化について報告があり<sup>2-7)</sup>、ドライバー遺伝子異常毎に核形状を特徴づけられる可能性がある。またこれにより肺腺癌細胞における核形状の診断基準が明確になる可能性がある。ただし、これらの核形状の特徴を明確にするためには客観的な核形状の所見を得ることが重要であるが、現在、上記の報告はいずれも核の染色にヘマトキシリン染色のみを用いており、定量的な解析を行っている研究は少ない。

## 2. 研究の目的

(1) まずは肺腺癌切除例の組織診検体を対象とし、EGFR, KRAS, ALK, p53 遺伝子異常ごとの核形状の特徴を画像解析手法によって明らかにすることを目的とした。  
(2) 加えて、遺伝子異常が共存していた場合の核形状の変化や、癌の進展課程での遺伝子異常と核形状の変化の推移を明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象症例の抽出、臨床情報の収集およびホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) ブロックの借用

2011年11月~2013年12月までに群馬大学医学部付属病院で手術された肺腺癌の切除例83例を抽出し、同時に性別、年齢、組織型、組織亜型、腫瘍径、ステージなどの情報も診療情報から得た。また対象症例のFFPEブロックを借用した。尚、1例検討が不可能であったため、最終的な対象症例数は82例となった。

### (2) 各種染色の施行、染色標本の Whole-slide Imaging (WSI) の作製および核の形状に関する画像解析

FFPE ブロックより未染色標本作製し、フォイルゲン染色、エメリンの免疫染色を施行し、これらの染色標本のWSIの作製を行いデジタル画像化し、核の面積、周囲長、真円度について画像解析ソフトを用いて計測した。

### (3) 核膜関連蛋白であるエメリン、ラミンの免疫染色の施行、WSI の作製および蛋白発現に関する画像解析

(2)のようにエメリンの免疫染色を施行したところ、蛋白発現が低下または消失していると思われる症例が約半数程度認められたことから、エメリンの免疫染色標本を画像解析し、肺腺癌細胞中のエメリン蛋白発現陰性、陽性の細胞数、陽性細胞率を計測した。これに関連して、エメリンと機能的に相互作用をしていると考えられているラミンA, B1, B2の免疫染色を施行し、エメリン同様、各々の染色標本について画像解析によって核の面積、周囲長、真円度、蛋白発現陰性、陽性の細胞数、陽性細胞率を計測した。

### (4) EGFR, KRAS 遺伝子変異の解析

当初、FFPEブロックからDNA抽出を行い、EGFR, KRAS 遺伝子の塩基配列を検索することで両遺伝子変異の有無を検索する計画であったが、両遺伝子変異の有無をある種のドライバー遺伝子変異特異的microRNA (miRNA)の発現量により予測することが可能であるという論文を発見し、当初計画の手技よりも比較的簡便で時間も短縮ができるmiRNAを用いた両遺伝子変異の予測によって対象症例を非変異群と変異群に分けて前述した画像解析結果との対比を行うこととした。

そこで、まず当研究室が保有するヒト肺腺癌細胞株9株からRNA抽出し、シーケンス受託サービスにより7株はEGFR遺伝子変異の有無を検索し、9株はKRAS遺伝子変異の有無を検索し、変異状態を明らかにした。そしてこれらの細胞株を用いてmiRNAの抽出を行い、遺伝子変異特異的miRNAとの報告があったmiR-1253, 504-5p, 26a-5p, 21-3p, 495-3pの発現量を計測した。

### (5) 画像解析結果の統計解析

各種核膜関連蛋白発現の有無に関するデータが得られたため、統計解析ソフトを用いて、核の面積、周囲長、真円度と各種蛋白発現の関連、各種蛋白同士の関連、臨床病理学的因子(組織亜型、分化度、腫瘍径、ステージなど)と各種蛋白発現の関連を検討した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ヒト肺腺癌細胞株におけるドライバー遺伝子変異特異的 miRNA の解析

###### EGFR, KRAS 遺伝子変異状態の検討

ヒト肺腺癌細胞株である H1650, H1975 は予め EGFR 遺伝子変異が起こっている細胞株を購入したため、ABC-1, RERF-LC-MS (MS), VMRC-LCD, A549, RERF-LC-Ad1 (Ad1), RERF-LC-Ad2 (Ad2) および HCC827 の細胞株について EGFR のエクソン 19 および 21 の変異を DNA シーケンス解析によって検索した。結果を表 1 に示す。また全 9 株については KRAS 遺伝子変異が未知であったため、KRAS のエクソン 2 の変異を DNA シーケンス解析によって検索した。結果、HCC827 に EGFR エクソン 19 の E746 - A750 変異が、A549 に KRAS エクソン 2 の G12S 変異が、Ad1 に KRAS エクソン 2 の G12A 変異が、Ad2 に KRAS エクソン 2 の G12V 変異が認められた。ABC-1, VMRC-LCD, MS には EGFR, KRAS 遺伝子変異は認められなかった。

表 1 ヒト肺腺癌細胞株における EGFR, KRAS 遺伝子変異状態

| Cell lines and mutation                                     |
|---|
| Examined in this study                                      |
| EGFR mutation-negative and KRAS mutation-negative           |
| ABC-1   |
| RERF-LC-MS  |
| VMRC-LCD  |
| KRAS mutation+  |
| A549 ( KRAS G12S mutation )                                 |
| RERF-LC-Ad1 ( KRAS G12A mutation )                          |
| RERF-LC-Ad2 ( KRAS G12V mutation )                          |
| EGFR mutation+  |
| HCC827 (EGFR exon19 E746-A750 deletion)                     |
| Already reported by the literature                          |
| EGFR mutation+  |
| H1650 <sup>10</sup> (EGFR exon19 E746-A750 deletion)        |
| H1975 <sup>10</sup> (EGFR exon 21 T790M and L858R mutation) |

##### EGFR, KRAS 遺伝子変異状態と変異特異的 miRNA の発現量の比較

で EGFR, KRAS 遺伝子変異状態が明らかとなったヒト肺腺癌細胞株における遺伝子変異特異的 miRNA の発現量を計測し、シーケンス解析結果と比較し、遺伝子変異特異的 miRNA が EGFR, KRAS 遺伝子変異状態を本当に反映するか検討した。

現在までの報告によると、miR-1253 の発現が増加した症例で高率に ALK 転座が認められ、miR-1253 の発現が増加した症例を除く miR-504-5p の発現が増加した症例で高率に EGFR 変異が認められ、miR-504-5p の発現を増加した症例を除く miR-26a-5p の発現が増加した症例の半数程度に EGFR, KRAS 変異および ALK 転座は認められず、発現が低いままであった症例の全例に KRAS 変異が認められたと報告されている<sup>8)</sup>。また別に miR-21-3p の高発現症例は有意に KRAS 変異していると報告があり<sup>9)</sup>、KRAS 変異群では、正常組織に比較し肺腺癌組織で miR-495-3p の発現量が増加しているとの報告もある<sup>10)</sup>。本研究の結果を表 2 に示す。今回、miR-504-5p の発現量に関して、EGFR 変異株 (HCC827) だけではなく KRAS 変異株 (Ad1)、EGFR および KRAS 変異陰性株 (MS) で発現量が他の細胞株よりも高かった。また miR-26a-5p の発現量は細胞株間で大きな差が認められず、EGFR および KRAS 変異陰性株 (MS) でも miR-21-3p や miR-504-5p の発現量の増加が認められた。以上の結果より、miR-504-5p, 26a-5p, 21-3p, 495-3p の全てにおいて EGFR または KRAS 遺伝子変異状態を反映していないことが明らかとなった。なお、miR-1253 の発現量は全ての細胞株で発現は低かったが、細胞株の ALK 転座を検討することができなかったため、ALK の転座状態を反映しているかは不明だった。

上記のように、遺伝子変異特異的 miRNA が EGFR, KRAS 遺伝子変異状態を反映していなかったため、ヒト組織を対象とした遺伝子変異特異的 miRNA を使用した EGFR, KRAS 遺伝子変異検索は検討不可能であった。

現在までの報告はヒト組織を用いた検討であったが本検討では培養細胞を用い、癌細胞自体の EGFR, KRAS 遺伝子変異状態を遺伝子変異特異的 miRNA は反映せず、遺伝子変異特異的とは言いがたいことを明らかにした点で、本検討は意義深いと考えられる。

表2 ドライバー遺伝子変異特異的 microRNA の Ct 値

| Cell lines  | Mutation                 | Ct of miRNAs: Average ( $\pm$ SD) |                         |                        |                         |                         |
|-------------|--------------------------|-----------------------------------|-------------------------|------------------------|-------------------------|-------------------------|
|             |                          | 1253                              | 504-5p                  | 26a-5p                 | 21-3p                   | 495-3p                  |
| ABC-1       | EGFR/KRAS <sup>nor</sup> | -15.12<br>( $\pm$ 0.26)           | -11.98<br>( $\pm$ 0.19) | -5.58<br>( $\pm$ 0.00) | -8.96<br>( $\pm$ 0.08)  | -16.67<br>( $\pm$ 0.83) |
| RERF-LC-MS  | EGFR/KRAS <sup>nor</sup> | -16.70<br>( $\pm$ 0.04)           | -10.78<br>( $\pm$ 0.03) | -7.52<br>( $\pm$ 0.08) | -6.35<br>( $\pm$ 0.05)  | -5.32<br>( $\pm$ 0.22)  |
| VMRC-LCD    | EGFR/KRAS <sup>nor</sup> | -14.80<br>( $\pm$ 0.59)           | -11.64<br>( $\pm$ 0.00) | -7.91<br>( $\pm$ 0.05) | -7.04<br>( $\pm$ 0.05)  | -17.59<br>( $\pm$ 2.46) |
| A549        | KRAS <sup>mut</sup>      | -16.66<br>( $\pm$ 0.23)           | Un<br>(Un)              | -8.10<br>( $\pm$ 0.02) | -6.00<br>( $\pm$ 0.16)  | -7.95<br>( $\pm$ 0.14)  |
| RERF-LC-Ad1 | KRAS <sup>mut</sup>      | -16.73<br>( $\pm$ 0.03)           | -10.60<br>( $\pm$ 0.01) | -6.65<br>( $\pm$ 0.01) | -7.26<br>( $\pm$ 0.01)  | Un<br>(Un)              |
| RERF-LC-Ad2 | KRAS <sup>mut</sup>      | -16.61<br>( $\pm$ 0.52)           | Un<br>(Un)              | -5.46<br>( $\pm$ 0.05) | -7.04<br>( $\pm$ 0.02)  | -8.19<br>( $\pm$ 0.05)  |
| HCC827      | EGFR <sup>mut</sup>      | -14.80<br>( $\pm$ 0.68)           | -10.06<br>( $\pm$ 0.01) | -7.18<br>( $\pm$ 0.09) | -9.27<br>( $\pm$ 0.05)  | -13.48<br>( $\pm$ 0.38) |
| H1650       | EGFR <sup>mut</sup>      | -15.53<br>( $\pm$ 0.77)           | -15.06<br>( $\pm$ 0.83) | -5.15<br>( $\pm$ 0.05) | -9.04<br>( $\pm$ 0.01)  | -14.64<br>( $\pm$ 0.65) |
| H1975       | EGFR <sup>mut</sup>      | -14.51<br>( $\pm$ 0.08)           | -14.27<br>( $\pm$ 0.34) | -6.61<br>( $\pm$ 0.12) | -10.12<br>( $\pm$ 0.07) | -14.49<br>( $\pm$ 0.20) |

Abbreviations: EGFR/KRAS<sup>nor</sup>, EGFR and KRAS mutation negative; KRAS<sup>mut</sup>, KRAS mutation positive; EGFR<sup>mut</sup>, EGFR mutation positive; Un, Undetermined

これら および の研究成果を論文発表した<sup>11)</sup> (小林さやか ら . ヒト肺腺癌細胞株における  
ドライバ遺伝子変異特異的 microRNA 発現の解析 . The Kitakanto Medical Journal. 74(1).  
2024 )

## (2) ヒト肺腺癌組織を対象とした核形状因子および核膜関連蛋白発現の画像解析による検討 フォイルゲン染色標本の画像解析における核形状因子の検索

ヒト肺腺癌組織 82 例のフォイルゲン染色標本の WSI デジタル画像を画像解析によって核面積、周囲長、真円度の連続変数データを得ることができた。

### 核膜関連蛋白であるエメリン、ラミン A, B1, B2 免疫染色標本の画像解析における核形状因子および蛋白発現の検索

ヒト肺腺癌組織 82 例のフォイルゲン染色標本の WSI デジタル画像を画像解析によって核面積、周囲長、真円度、蛋白発現陰性、陽性の細胞数、陽性細胞率の連続変数データを得ることができた。

### 核の形状因子および各種核膜関連蛋白発現の関連および各種核膜関連蛋白と臨床病理学的所見の関連

上記、 のようにヒト肺腺癌細胞の核面積、周囲長、真円度や各種核膜関連蛋白発現の有無に関するデータが得られたため、統計解析ソフトを用いて、核の面積、周囲長、真円度と各種蛋白発現の関連、各種蛋白同士の関連、臨床病理学的因子 (組織亜型、分化度、腫瘍径、ステージなど) と各種蛋白発現の関連を検討した。これらの検討結果は現在、論文投稿中である。

本検討により、肺腺癌におけるエメリン、ラミン A, B1, B2 とった核膜関連蛋白発現を画像解析にて連続変数データを得ることができた点是我々が初めてであり、各種核膜関連蛋白発現と臨床病理学的所見との関連を明らかにすることにより、今まで明らかにされていなかった肺腺癌細胞におけるエメリンやラミンの機能に関する新たな知見を得ることができた点で意義深い。

<引用文献>

Dearden S, Stevens J, Wu YL, et al. Mutation incidence and coincidence in non small-cell lung cancer: meta-analyses by ethnicity and histology (mutMap). *Ann Oncol* 2013; 24: 2371-2376.

Nishino M, Klepeis VE, Yeap BY, et al. Histologic and cytomorphologic features of ALK-rearranged lung adenocarcinomas. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2012; 25: 1462-1472.

Rekhtman N, Ang DC, Riely GJ, et al. KRAS mutations are associated with solid growth pattern and tumor-infiltrating leukocytes in lung adenocarcinoma. *Modern pathology: an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc* 2013; 26: 1307-1319.

Nishiyama N, Taguchi K, Yokoyama T, et al. Morphometric and cytomorphologic characterization of EGFR-mutated cancer cells-comparison between cultured lung cancer cell lines and lung adenocarcinoma clinical samples. *Diagnostic cytopathology* 2016; 44: 717-724.

Brachtel EF, Iafrate AJ, Mark EJ, et al. Cytomorphological correlates of epidermal growth factor receptor mutations in lung carcinoma. *Diagnostic cytopathology* 2007; 35: 257-262.

Okudela K. An association between nuclear morphology and immunohistochemical expression of p53 and p16INK4A in lung cancer cells. *Med Mol Morphol* 2014; 47: 130-136.

Ozer E, Canda T, Kuyucuodlu F. p53 mutations in bilateral breast carcinoma. Correlation with Ki-67 expression and the mean nuclear volume. *Cancer Lett* 1998; 122: 101-106.

Gasparini P, Cascione L, Landi L, et al. microRNA classifiers are powerful diagnostic/prognostic tools in ALK-, EGFR-, and KRAS-driven lung cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015; 112: 14924-14929.

Izzotti A, Vargas GC, Pulliero A, et al. Relationship between the miRNA Profiles and Oncogene Mutations in Non-Smoker Lung Cancer. Relevance for Lung Cancer Personalized Screenings and Treatments. *J Pers Med* 2021; 11: 182

Dacic S, Kelly L, Shuai Y, et al. miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol* 2010; 23: 1577-1582.

小林さやか, 兼平裕貴, 大内美月ら: ヒト肺腺癌細胞株におけるドライバー遺伝子変異特異的 microRNA 発現の解析. *The Kitakanto Medical Journal*. 74(1): 43-50, 2024 年

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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<br>Kobayashi Sayaka, Kanehira Yuki, Ouchi Miduki, Mukade Yui, Kushibiki Raia, Oi Mizuha, Nishijima Yoshimi, Saio Masanao | 4. 巻<br>74            |
| 2. 論文標題<br>Examination of Driver Mutation-Specific MicroRNA Expression in Human Lung Adenocarcinoma Cell Lines                  | 5. 発行年<br>2024年       |
| 3. 雑誌名<br>The Kitakanto Medical Journal   | 6. 最初と最後の頁<br>43 ~ 50 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.2974/kmj.74.43  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Sayaka Kobayashi, Yuki Kanehira, Raia Kushibiki, Mizuha Oi, Yoshimi Nishijima, Masanao Saio |
| 2. 発表標題<br>Analysis of driver mutation-specific microRNA in lung adenocarcinoma cell line              |
| 3. 学会等名<br>The 20th Japan-Korea Joint Meeting for Diagnostic Cytopathology（国際学会）                       |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

| 氏名<br>（ローマ字氏名）<br>（研究者番号） | 所属研究機関・部局・職<br>（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 |
|---------|---------|
|---------|---------|