

【要約】

Gene mutation analysis of sclerosing pneumocytoma: A possible
relevance of MARK3 (microtubule affinity regulating kinase 3)
abnormality to its development and peculiar histopathology

(硬化性肺胞上皮腫の遺伝子変異解析：MARK3 異常と同腫瘍の
発生および特異な病理組織像との関連性について)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：池田純一郎教授)

太田 昌幸

1. 背景

硬化性肺胞上皮腫 (sclerosing pneumocytoma, SP) は稀な良性肺腫瘍で、組織学的に surface cuboidal cell と stromal round cell の 2 種類の細胞から構成される。SP は放射線画像や病理組織形態が肺癌に類似するため、しばしば診断に苦慮する。

超微形態や免疫組織化学を用いた検討により、SP は II 型肺胞上皮への分化を示す肺胞上皮由来の腫瘍であることが明らかになったが、その腫瘍発生は不明な部分が多い。2016 年に Jung らは 68 例の SP を対象とした whole exome sequencing (WES) により、SP の 45.6% に *AKT1* の遺伝子異常を認めることを報告したが、遺伝子異常が同定されない症例も含まれており、遺伝子異常を含めた SP の腫瘍発生については未解明な部分も多く残されている。

本研究では、SP の腫瘍発生に関わる遺伝子異常を明らかにし、得られた知見から診断に有用なマーカーを同定すること目的に、*in vivo* および *in vitro* の解析を行った。WES により検出した遺伝子変異の中から、細胞極性保持に重要な役割を担う *MARK3* のミスセンス変異 (c.551T>C, p.L184P) に注目した。

2. 方法と材料

千葉大学大学院医学研究院の生命倫理審査委員会の承認を得たうえで、2010 年～2018 年に千葉大学医学部附属病院で外科的に切除された SP 症例 9 例を対象とした。

9 例の SP のうち、2 例の新鮮凍結組織を用いて、次世代シーケンサーによる全エクソームおよびトランスクリプトーム解析を行った。また、9 例の SP の組織切片を用いて、*MARK3*, *E-cadherin*, *N-cadherin*, β -*catenin*, *vimentin*, *EMA*, *pan-CK*, *CK7*, *TTF-1* の各抗体について免疫組織化学染色を行い、その染色性を H-score により評価した。さらに、組織から抽出した DNA を用いた Sanger シーケンスによる *MARK3* p.L184 および *AKT1* p.E17K, p.Q79 & W80 変異の有無を検討した。

また、CRISPR/Cas9 システムを用いて *MARK3* をノックアウトした不死化気道上皮細胞株 NL20 に、野生型および変異型 *MARK3* を遺伝子導入した培養細胞を用いて、RT-PCR による *MARK3* と *N-cadherin*, *ZEB1*, *E-cadherin*, *vimentin*, β -*catenin* といった上皮間葉転換 (epithelial-to-mesenchymal transition, EMT) 関連分子の mRNA 発現を検討した。

3. 結果

3.1 SPにおける全エクソームおよびトランスクリプトーム解析

2例のSPから合計28個の遺伝子変異を検出した。挿入・欠失はみられなかった。検出された遺伝子変異の中から *MARK3* ミスセンス変異 (c.551T>C, p.L184P) に注目した。

3.2 SPにおける免疫組織化学

MARK3 は9例中8例に弱く発現していた。E-cadherin は surface cuboidal cell で強く発現し、stromal round cell で減弱する傾向を示した。N-cadherin は両方の成分に発現していた。pan-CK および CK7 は surface cuboidal cell のみに、vimentin は stromal round cell のみに発現した。TTF-1 および EMA は両方の成分に発現していた。 β -catenin は、9例中5例で異常発現パターンを示す細胞を認めた。

3.3 *MARK3* 導入 NL20 における EMT 関連分子の発現解析

野生型および変異型 *MARK3* を安定発現させた NL20 において、EMT 関連分子である N-cadherin の mRNA 発現がそれぞれ 2.5 倍、3.5 倍に増加した。ZEB1 は野生型優位に増加していた。E-cadherin, vimentin, β -catenin の発現には大きな増減を認めなかった。

3.4 SPにおける *MARK3* および *AKT1* 変異解析

9例のSPのうち、*MARK3* p.L184P を WES でも検出された1例に認めた (1/9)。*AKT1* p.E17K は9例全てにおいて検出されなかった (0/9)。解析できた6例のうち、*AKT1* p.Q79K & p.W80R を1例 (1/6)、*AKT1* p.Q79K & p.W80G を1例 (1/6) に認めた。

4. 考察

MARK3 は細胞極性保持に関与するリン酸化酵素である。*MARK3* 変異に注目した理由として、SPの発生に関係することが過去に報告されているシグナル伝達経路に *MARK3* も関与していることが挙げられる。*MARK3* を含む PAR1/*MARK* キナーゼファミリーは、先行研究で遺伝子異常が報告された *AKT1* や β -catenin が関係する PI3K/*AKT*/mTOR 経路や、Wnt/ β -catenin 経路に関与することが多数報告されており、先行研究で未解明な遺伝子異常の中に、*MARK3* 変異が含まれていると予想した。

免疫組織化学の検討では、*MARK3* はほぼ全例に発現し、stromal round cell において EMT 様の変化を認めた。また、9例中5例に β -catenin の異常発現パターンを認めた。

EMTの一部は、MARK3も関与する細胞極性制御により生じることが報告されており、SPの一部において、MARK3の異常による細胞極性の乱れやWnt/ β -catenin経路の活性化により、EMT様の変化が生じることが示唆された。

MARK3導入NL20におけるEMT関連分子の発現解析の結果から、MARK3がN-cadherinおよびZEB1といった一部のEMT関連分子の発現を誘導したと考えられた。これはSPの免疫組織化学で認められたEMT様変化に合致する結果であった。一方で、E-cadherinやvimentinの発現に大きな増減はなかった。この理由としてMARK3安定発現下での検討のため、SPの免疫組織化学で弱陽性であったような生体内におけるMARK3タンパクの弱い発現環境を*in vitro*では再現しきれなかった可能性が考えられた。

SPの遺伝子変異解析では、AKT1 p.E17Kは先行研究で報告された頻度よりも少なかった。しかしながら、少数例での検討のため、より正確なAKT1変異頻度の推定には症例の蓄積が必要である。

5. 結論

WESにより、1例のSPに新たなMARK3ミスセンス変異(c.551T>C, p.L184P)を発見した。MARK3の異常は、細胞極性消失とそれに引き続くEMT様変化に関与し、SPの腫瘍発生に関連している可能性がある。