

【要約】

Integrated analysis of Pituitary Neuroendocrine Tumors

by non-target proteomics and RNA-sequencing

(ノンターゲットプロテオミクスと RNA シーケンスを

用いた下垂体神経内分泌腫瘍の統合解析)

千葉大学大学院医学薬学府

先端医学薬学専攻

(主任：岩立康男教授)

高 躍

【背景】

大規模なサンプルセットを用いたハイスループット技術に基づくマルチオミクスアプローチは、複雑な生物学的メカニズムを包括的に調べ、複雑な病理学プロセスを総合的に解釈することが可能になった。下垂体神経内分泌腫瘍の病理学的基盤は、機能細胞の分化と腫瘍形成から構成される。例えば、クッシング病や先端巨大症は、多様な細胞型と複雑な疾患過程を呈している。下垂体神経内分泌腫瘍はほとんどが良性で、局所的にゆっくりと成長するため、悪性腫瘍のように迅速な処置を必要としない。しかしながら、腫瘍のかなりの割合で浸潤性を示す、そして高い再発率を示し、治療を困難な症例が存在する (Ajlani et al., 2017)。これらの症例が、体細胞変異を有した単細胞の制御不能な増殖の結果であることを示している (Alexander ら、1990 ; Herman ら、1990 ; Jacoby ら、1990 ; Ma ら、2002) が、他の証拠は、いくつかの下垂体神経内分泌腫瘍におけるマルチクロナリティの反対の証拠を示している (Clayton ら、2000、Clayton ら、2001、Clayton ら、2004)。下垂体神経内分泌腫瘍は、ホルモン産生細胞の起源により、lactotroph、thyrotroph (Central hyperthyroidism)、somatotroph (Acromegaly)、corticotroph (Cushing's disease)、gonadotroph adenoma に分類されてきた。分類を決定する標準的な手段は組織学的染色であるが、これらの腫瘍の病態はサブセット間で異なっており、下垂体神経内分泌腫瘍の分子機構はまだ解明されていない。

【目的】

下垂体腺腫はホルモン産生と腫瘍性の接点で病態が規定される。したがって正常下垂体の発分化の鍵となる転写制御因子群 (TFs) が病態に重要な役割を果たし、WHO 新基準にも TFs 発現が用いられる。そこで、新技術である multi-omics 解析を施行し、TFs ネットワークの主要病態とフェノタイプにおける役割を調べ、下垂体腺腫の臨床的特徴と分子生物学的な意味を明らかにする。

【方法】

千葉大学脳神経外科及び虎の門病院間脳下垂体外科で手術した 154 症例下垂体腺腫を研究対象とし、摘出した腫瘍検体より RNAseq とプロテオミクスを施行し、臨床情報との比較検討と統合解析を行った。

サンプルの抽出に関しては RNA 抽出に広く用いられる phenol-guanidinium isothiocyanate (P/GTC) を用いることで RNA 抽出後に DNA、タンパク質を同一サンプルから採取できることを利用した。

抽出した RNA は illumine NextSeq 500 を使用し、Single-Read, 75bp, 3' RNA-seq の条件で 100 万リードを取得できた。1 次データ解析は解析プログラム

bcl2fastq ver2.17 を使用した。

そして更深度 DIA 解析、SWATH-MS 法を用いて約 11000 分子の定性、定量を行った。

【結果・考察】

mRNA 対タンパク質量

下垂体神経内分泌腫瘍でプロテオミクスおよび RNA-seq の測定はいままで報告されたことがなく、グローバルに解析することが可能となった。まず、個々のサンプル内の各遺伝子の mRNA とタンパク質の発現量を比較した。その結果、すべてのサンプルで mRNA-タンパク質は有意な正の相関を示し (多重検定調整後 $P < 0.01$ 、スピアマンの相関係数)、個々のサンプルにおける mRNA とタンパク質量の平均相関は 0.479 であり、これは大腸がん先行報告と同程度であった。次に、11134 個の各々の分子の mRNA とタンパク質の相関について調べた。91.3% の遺伝子が mRNA とタンパク質の相関を示した、統計的に有意な相関を示したのは 68.7% であった。mRNA とタンパク質の変動の平均スピアマン相関は 0.355 であった。

タンパク質と mRNA の変動の一致が遺伝子産物の生物学的機能に関係しているかどうかを検証するために、KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) を用いたエンリッチメント解析を行った。いくつかの代謝過程に関与する遺伝子では mRNA とタンパク質の高い相関がみられたものの、他の遺伝子では mRNA とタンパク質の相関が低く、場合によって負の値を示した。

PitNETs の腫瘍特性

RNAseq を用いて UMAP の clustering 解析すると、SF1, Tpit, Pit1 の lineage ごとに腫瘍がグループ形成されることが観察される。同様に Proteomics を用いて UMAP の clustering 解析を行うと SF1, Tpit, Pit1 lineage ごとに腫瘍が分布していることが分かる。したがって PitNETs の腫瘍特性が lineage によって大きく三つに分かれることが確認できた。

Heatmap で上位 2000 の発現変動遺伝子の発現パターンをみると lineage ごとに違うことが分かる。Proteomics のデータで発現変動分子の heatmap をみると同じく lineage によってタンパク発現パターンが大きく違うことが観察される。各々の lineage に特異的に高発現する遺伝子と分子を抽出し、非機能性腺腫に SF1 (NR5A1), GATA2, ACTH 産生腺腫に Tpit (TBX19), POMC, GH, PRL, TSH 産生腺腫に Pit1 (POU1F1) に有意に高いことが分かる。

非機能性腺腫の subtype

非機能性腺腫に ACTH もしく Tpit 陽性の症例は silent ACTHoma と言われている。非機能性腺腫に腫瘍特性の違う subtype 存在する可能性が示唆される。非機能性腺腫 46 症例に対して、consensus clustering という unsupervised 分類方法を使用し、proteomics のデータを解析した。46 症例の proteomics データは大きく 4 グループに分類されることが出来る。特徴として GroupA の 12 症例は Tpit 染色陽性が多く、LH、G H、P R L、T S H の免疫染色は全て陰性であった。そして Group C の症例において硬い腫瘍がほとんどであり、男性が多く見られるのは特徴でした。

非機能性下垂体腺腫の RNAseq データを使用して UMAP で解析すると大きく 3 つのグループに分けることができる。Heatmap で 3 つのグループの発現パターンが違ってくる。そのうちグループ 2 の 6 症例の *TBX19* の発現は他の症例より有意に高い。*TBX19* 高発現である ACTH 産生腺腫の症例と同様な発現量を持っていることがわかる。それに対して *TBX19* タンパク質発現量は ACTH 産生腺腫はグループ 2 症例より有意に高い。

タンパク質と mRNA の相関を検討した、*TBX19* について ACTH 産生腺腫で高い相関を持っているに対してグループ 2 腫瘍は全く相関しない。

SSTR1、EBF1、GZMK、LTA4H などがグループ 2 の非機能性腺腫として同定され、*TBX19* の他に *GAL*、*TCF7L2*、*RSPO3* が ACTHoma 特異的遺伝子として同定されました。

臨床症状との関係

腫瘍の両側海面静脈洞への浸潤性および腫瘍の硬さは手術の難易度に直接影響する。このような臨床的特徴の分子機構を理解する上で手術を進めることが必要である。このような分子の臨床的有用性を探るために、RNA-seq およびプロテオミクスデータを腫瘍の硬さと Knosp Grade 別で解析したところ、下垂体腫瘍の臨床的有用性を示す遺伝子やタンパク質を発見した。まず特徴の症例に有意に上昇する因子を同定し、その内 mRNA とタンパク質発現との強い相関関係を持つ分子を選択した。例えば、*P4HA2* ($r=0.8596$)、*CSRP2* ($r=0.8077$)、*ACSL6* ($r=0.8075$)、*SORCS2* ($r=0.8042$) は、硬性腫瘍と強い相関を示しました (図 5B)。さらに、*VCAN* ($r=0.8512$)、*POSTN* ($r=0.8512$)、*ACTA2* ($r=0.8512$)、*RAB3es1* ($r=0.8512$) が Knosp Grade4 と相関していることを明らかにした。

【結論】 本研究は、分子生物学的特徴に基づいた下垂体神経内分泌腫瘍の臨床的特徴を示し、新しい診断や治療のための探索的臨床試験のための有望な分子を抽出することができた。