

## 133. 静脈奇形 TEK 標的薬の社会実装への病理検体の応用

廣瀬 勝俊

大阪大学 大学院歯学研究科 口腔病理学教室

Key words : 静脈奇形, TEK, PIK3CA, mTOR, 空間的トランスクリプトミクス解析

### 緒言

血管・リンパ管が健常部より多く含まれる病変は「脈管異常」と総称され、脈管の奇形（生まれつきの形態異常）や腫瘍（細胞が増殖する病態）を含む疾患概念である [1]。脈管奇形は良性病変であるが、病変が大きく広範囲に及ぶ場合には、機能面および整容面において患者の生活の質を著しく低下させる。現在の治療法は外科的切除や硬化療法が主流であるため、外科治療が困難な部位にできた病変や巨大病変の根治は難しく、生涯にわたり苦しむこととなる。

近年、脈管異常には「がんと共通する遺伝子の異常」が存在することが明らかとなり、新規治療法としてがん治療に使用される分子標的薬が注目され、国内外で臨床試験が進行している [2, 3]。本邦では、リンパ管奇形に対して mammalian target of rapamycin (mTOR) 阻害剤であるシロリムスが、世界に先駆けて保険収載された (2021 年 9 月承認)。リンパ管奇形の病態発生には *phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha (PIK3CA)* 遺伝子変異による PIK3CA/AKT/mTOR 経路の異常活性化が関与しており、シロリムスはその異常活性化経路を抑える働きをすると考えられている [2~4]。2019~2022 年には、静脈奇形に対してもシロリムス薬事承認を目指した臨床試験が行われ、2024 年に保険収載が決定した。

静脈奇形は、脈管異常の中で最も発生頻度が高く、原因遺伝子として *TEK* 遺伝子変異 (約 50%) あるいは *PIK3CA* 遺伝子変異 (約 20%) が検出される [2, 5]。両遺伝子変異ともに PI3K/AKT 経路を介して病態発生に関与していると考えられているが [2]、その詳細な分子メカニズムは不明な点が多い。

本研究では、次世代シーケンサーを用いた遺伝子変異解析および空間的トランスクリプトミクス解析により、静脈奇形における変異遺伝子型と、臨床病理学的特徴、PI3K/AKT/mTOR 経路活性化状態、mRNA 遺伝子発現パターンの関連性を明らかとすることを目的とした [6]。

### 方法

#### 1. 症例

大阪大学医学部附属病院で治療を行った静脈奇形患者 114 例の FFPE (ホルマリン固定パラフィン包埋) 病理検体を解析に用いた。静脈奇形の診断は、2 名の病理医が International Society for the Study of Vascular Anomalies (ISSVA) 分類に基づいて行った [1]。

#### 2. 遺伝子変異解析

FFPE 病理検体より DNA を抽出し、カスタムパネルを用いた次世代シーケンサーにより遺伝子変異の解析を行った [7]。SureCall (<https://earray.chem.agilent.com/suredesign>) を用い、*TEK* 遺伝子と *PIK3CA* 遺伝子の全エキソン領域をカバーするようカスタムパネルを設計した。Custom SureSelect Low-Input Target Enrichment System (Agilent Technologies Inc. Santa Clara, CA, USA) を用いてシーケンスライブラリーを調製後、Illumina MiSeq (Illumina, San Diego, CA, USA) を用いてシーケンスを行った。遺伝子変異の

同定解析には、SureCall ver4.0 (<https://www.agilent.com/en/download-software-surecall>) を用いた。検出された遺伝子変異はサンガーシーケンスにより確認した [7]。

### 3. 組織学的解析および免疫組織学的解析

FFPE 病理組織を 4  $\mu$  m 厚さに薄切し、Hematoxylin-Eosin (HE) 染色、Elastica van Gieson 染色、免疫組織化学的染色に用いた。免疫組織化学染色の一次抗体には、 $\alpha$  SMA (clone 1A4, 1:500; Dako, Denmark)、phosphorylated AKT (p-AKT) (#4060, 1 : 100; Cell Signaling Technology, Danvers, MA, USA)、p-mTOR (clone 49F9, 1:100; Cell Signaling Technology)、p-4EBP1 (clone 236B4, 1:500; Cell Signaling Technology)、p-S6K1 (#9204, 1:100; Cell Signaling Technology)、SP1 (#84386, 1:1600; Cell Signaling Technology) を用いた。免疫部位を DAB にて検出し、免疫反応の濃度を negative (score 0)、low (score 1)、intermediate (score 2)、high (score 3) の 4 段階に分類して、H-scores を算出した。H-score = (0 (% cells of score 0) + 1 (% cells of score 1) + 2 (% cells of score 2) + 3 (% cells of score 3))。

### 4. 空間的トランスクリプトミクス解析

FFPE 病理組織を 5  $\mu$  m 厚さに薄切し、空間的トランスクリプトミクス解析に用いた。Visium Spatial Gene Expression User Guide を用いてシーケンスライブラリーを調製後、DNBSEQ-G400RS (MGI) を用いてシーケンスを行った。Space Ranger software v2.1.1 を用いて raw FASTQ files と病理組織像を処理した後に、Loupe Browser software v6.0.0 を用いて raw Visium files を解析した。Gene ontology (GO) enrichment 解析は Metascape (<https://metascape.org/>) を用いて行った。

### 5. 統計

統計解析には、Microsoft Excel と GraphPad Prism 10 (La Jolla, CA, USA) を用い、数値は標準偏差で示す。Steel–Dwass’s multiple comparison test、Fisher’s exact test、Kruskal–Wallis test または Spearman’s rank correlation test により比較を行い、 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

## 結果および考察

### 1. *TEK* 遺伝子と *PIK3CA* 遺伝子の変異解析

静脈奇形 114 症例の FFPE 病理検体より DNA を抽出し、*TEK* 遺伝子および *PIK3CA* 遺伝子の全エクソンを対象としたカスタムパネルを用いて次世代シーケンス解析を行った。その結果、静脈奇形症例の 49% (43 症例) で *TEK* 遺伝子変異、11.4% (13 症例) で *PIK3CA* 遺伝子変異、1.75% (2 症例) で *TEK* 遺伝子と *PIK3CA* 遺伝子の両方の変異が検出された (図 1A)。残りの 43.9% (50 症例) では両遺伝子の変異は検出されなかった (以降、Other 変異症例と記す)。また、*TEK* 変異症例のうち、27.7% で複数個所の *TEK* 遺伝子変異が同定された。*TEK* 遺伝子では、p.L914F 変異が最も多く検出され、p.Y897C/F/N、p.R915C/S、p.R918C/H/L の変異が続いた (図 1B 上段)。また、*PIK3CA* 遺伝子では、Hot-spot である p.E542K、p.E545K、p.H1047R の変異を認めた (図 1B 下段)。

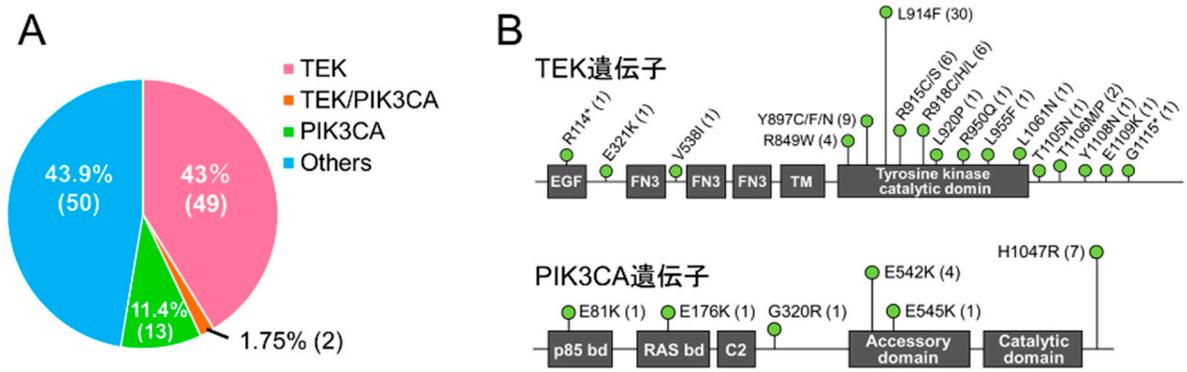


図1. *TEK* 遺伝子と *PIK3CA* 遺伝子の変異解析  
 A) 静脈奇形 114 症例の変異遺伝子の割合。  
 B) *TEK* 遺伝子と *PIK3CA* 遺伝子の変異部位と症例数。( ) は症例数を示す。

## 2. 臨床病理学的所見との変異遺伝子型との比較解析

臨床所見と変異遺伝子型との比較を行った。静脈奇形全体の平均は 41.43 歳 (1~93 歳) で、男女比は 1 : 1.78 (男性 36% : 女性 64%) であった (図 2A、B)。発生部位は頭頸部 47.4%、四肢 38.6%、体幹 14% であった (図 2C)。遺伝子変異ごとでは、*TEK* 変異症例は平均 31.72 歳 (1~93 歳)、*PIK3CA* 変異症例は平均 42.09 歳 (18~68 歳)、Other 変異症例は平均 49.91 歳 (11~84 歳) であった。*TEK* 変異症例は有意に患者年齢が低く、10 歳以下の全例および 10 歳代の半数は *TEK* 変異症例であった (図 2A)。男女比や発生部位には変異遺伝子型による差は認めなかった (図 2B、C)。

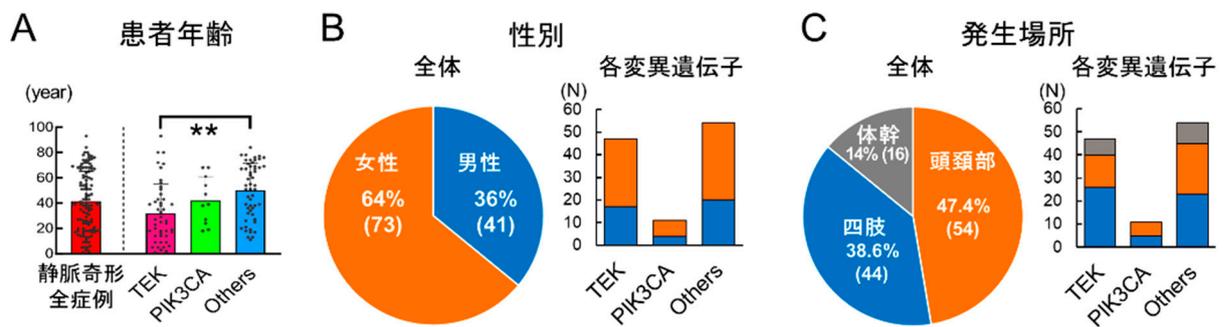


図2. 臨床所見と遺伝子変異との関連性  
 A) 患者年齢。Steel-Dwass's multiple comparison test.  
 B) 性別。Kruskal-Wallis test.  
 C) 発生部位。Kruskal-Wallis test.

病理所見と変異遺伝子型との比較を行った結果、奇形脈管の大きさや血管壁の形態には変異遺伝子間で著変は認めなかった。一方で、*TEK* 変異症例ではリンパ球の集簇巣がなく、真皮へ病変が浸潤する症例が多かった (図 3A、B)。次に、免疫組織化学的染色にて *PIK3CA*/*AKT*/*mTOR* 活性化状態を検討した結果、*TEK* 変異症例で有意に *AKT* が活性化していた。また、正常血管と比較して、変異遺伝子型に関係なく静脈奇形で *PIK3CA*/*AKT*/*mTOR* 経路が活性化していることが明らかとなった (図 3C)。

これらの結果は、静脈奇形に対する *mTOR* 阻害薬シロリムスの治療根拠となることが期待される。また、臨床所見や病理所見の特徴から、遺伝子検査が困難な施設においても、将来的に原因遺伝子に応じた適切な治療薬が使用できることが期待される。

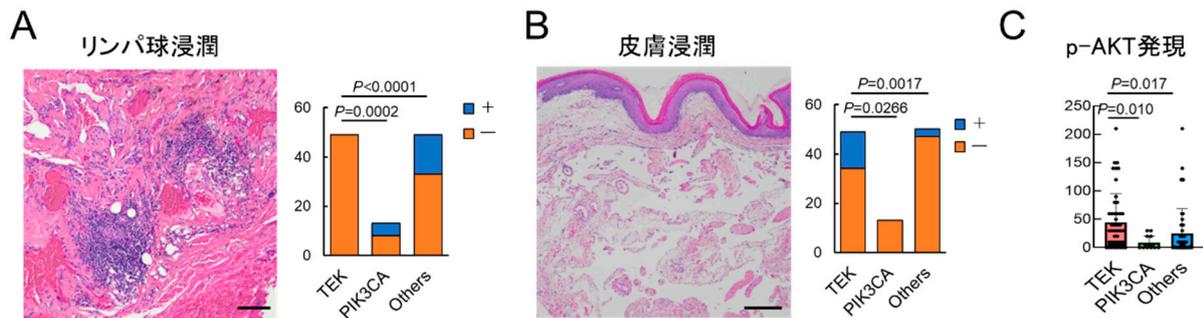


図 3. 病理学的所見と遺伝子変異との関連性

- A) リンパ球浸潤の代表的病理組織像と頻度。Kruskal–Wallis test。スケールバー：100  $\mu$ m。
- B) 皮膚浸潤の代表的病理組織像と頻度。Kruskal–Wallis test。スケールバー：500  $\mu$ m。
- C) p-AKT の H-score。b についての説明。Steel–Dwass’s multiple comparison test。

### 3. mRNA 発現と遺伝子変異との比較解析

TEK (p.L914F) 変異症例 1 例と PIK3CA (p.E545K) 変異症例 1 例を用いて、空間的トランスクリプトミクス解析を行った (図 4A)。症例の選択にあたり、年齢、発生部位、病理所見などの類似性に配慮した。TEK 変異症例の奇形血管を“TEK 血管”、PIK3CA 変異症例の奇形血管を“PIK3CA 血管”とし、各標本内の正常血管との mRNA 発現を比較解した。コントロールとして *CD31* mRNA (脈管マーカー) は高発現しており、*Podoplanin* mRNA (リンパ管マーカー) はほとんど発現していないことを確認した (図 4B)。正常血管と比較して、TEK 血管で高発現する遺伝子 191 種類、PIK3CA 血管で高発現する遺伝子 27 種類を同定した (図 4C)。GO 解析の結果、TEK 血管に高発現する遺伝子は“blood vessel development”、“positive regulation of cell migration”、“extracellular matrix organization”に関連しており (図 4D)、静脈奇形発症に関係している可能性が示唆された。また、TEK 血管で高発現する遺伝子は転写因子 SP1 により制御されている遺伝子が多く含まれていた。免疫組織化学的染色では、TEK 変異症例の奇形血管の血管内皮細胞で SP1 の高発現を認めるとともに、AKT の発現と相関していることが明らかとなった (図 4E、F)。以上のことから、TEK 遺伝子変異を有する静脈奇形では、TEK/AKT/SP1 経路の活性化が病態発生に関与していることが示唆された。この経路の詳細な解析は、将来的に静脈奇形 TEK 遺伝子変異を標的とした治療薬開発へとつながるものと考えられる。

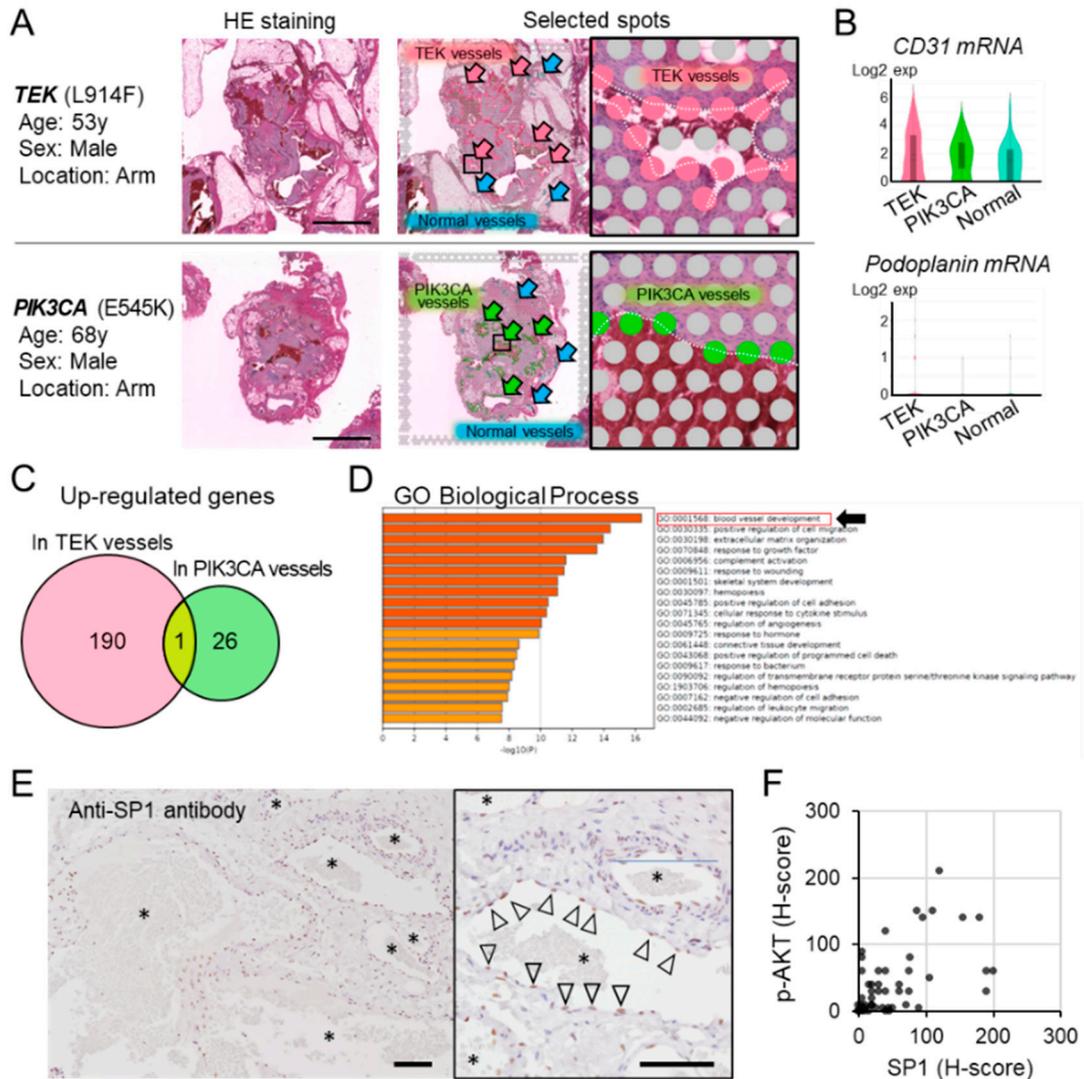


図 4. 空間的トランスクリプトミクス解析

- A) TEK 変異症例と PIK3CA 変異症例の代表的病理組織像と、mRNA 発現の解析部位。スケールバー：2 mm。ピンク色：TEK 血管、黄緑色：PIK3CA 血管、青色：正常血管を示す。
- B) *CD31* mRNA 発現と *Podoplanin* mRNA 発現。
- C) TEK 血管または PIK3CA 血管で mRNA 発現が上昇した遺伝子数。
- D) TEK 血管で発現が上昇した遺伝子の GO 解析結果。
- E) TEK 変異症例における SP1 免疫組織化学染色。スケールバー：100  $\mu$  m。  
 \*は血管腔、黒枠は拡大図、矢頭は血管内皮細胞を示す。
- F) SP1 の H-score と p-AKT の H-score の相関図。

#### 共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、大阪大学大学院歯学研究科顎顔面口腔病理学講座の豊澤悟教授、大阪大学大学院医学系研究科の堀由美子招聘教員、森井英一教授、大阪大学微生物病研究所の元岡大祐講師、岐阜大学大学院医学系研究科の小関道夫准教授である。

## 文 献

- 1) ISSVA classification for vascular anomalies: Available from: <https://www.issva.org/UserFiles/file/ISSVA-Classification-2018.pdf>. Accessed 20 April 2024.
- 2) Queisser A, Seront E, Boon LM, Vikkula M. Genetic Basis and Therapies for Vascular Anomalies. *Circ Res.* 2021 Jun 25;129(1):155-173. Epub 2021 Jun 24. PMID: 34166070. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.121.318145
- 3) Adams DM, Trenor CC 3rd, Hammill AM, Vinks AA, Patel MN, Chaudry G, Wentzel MS, Mobberley-Schuman PS, Campbell LM, Brookbank C, Gupta A, Chute C, Eile J, McKenna J, Merrow AC, Fei L, Hornung L, Seid M, Dasgupta AR, Dickie BH, Elluru RG, Lucky AW, Weiss B, Azizkhan RG. Efficacy and Safety of Sirolimus in the Treatment of Complicated Vascular Anomalies. *Pediatrics.* 2016 Feb;137(2):e20153257. Epub 2016 Jan 18. PMID: 26783326. DOI: 10.1542/peds.2015-3257
- 4) Hori Y, Ozeki M, Hirose K, Matsuoka K, Matsui T, Kohara M, Tahara S, Toyosawa S, Fukao T, Morii E. Analysis of mTOR pathway expression in lymphatic malformation and related diseases. *Pathol Int.* 2020 Jun;70(6):323-329. Epub 2020 Feb 18. PMID: 32067331. DOI: 10.1111/pin.12913
- 5) Du Z, Liu JL, You YH, Wang LZ, He J, Zheng JW, Zhang ZY, Wang YA. Genetic landscape of common venous malformations in the head and neck. *J Vasc Surg Venous Lymphat Disord.* 2021 Jul;9(4):1007-1016.e7. Epub 2020 Nov 26. PMID: 33248299. DOI: 10.1016/j.jvsv.2020.11.016
- 6) Hirose K, Hori Y, Ozeki M, Motooka D, Hata K, Tahara S, Matsui T, Kohara M, Maruyama K, Imanaka-Yoshida K, Toyosawa S, Morii E. Comprehensive phenotypic and genomic characterization of venous malformations. *Hum Pathol.* 2024 Mar;145:48-55. Epub 2024 Feb 15. PMID: 38367816. DOI: 10.1016/j.humpath.2024.02.004
- 7) Hori Y, Hirose K, Ozeki M, Hata K, Motooka D, Tahara S, Matsui T, Kohara M, Higashihara H, Ono Y, Tanaka K, Toyosawa S, Morii E. PIK3CA mutation correlates with mTOR pathway expression but not clinical and pathological features in Fibfibroipose vascular anomaly (FAVA). *Diagn Pathol.* 2022 Jan 30;17(1):19. Erratum in: *Diagn Pathol.* 2022 May 2;17(1):43. PMID: 35094709. DOI: 10.1186/s13000-022-01199-3