

令和 4 年 6 月 6 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：19K18215

研究課題名（和文）肺高悪性度神経内分泌癌のPhenotype分類と新規分子標的治療開発

研究課題名（英文）Phenotype classification of high grade neuroendocrine lung cancer and development of novel molecular target therapy

研究代表者

春木 朋広（HARUKI, Tomohiro）

鳥取大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：20529416

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小細胞肺癌（Small cell lung cancer: SCLC）は悪性度が高く予後不良である。近年、4つの転写因子ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1の発現状況でSCLCのサブタイプを分類する方法が提案された。それらの転写因子の発現状況と、新規薬剤であるLurbinectedinの効果との関連を検討した。8つのSCLC細胞株で検討したところ、POU2F3発現とLurbinectedinの効果に有意な相関関係を認めた。外科切除されたSCLCの免疫組織化学ではPOU2F3サブタイプは約15%に認め、Lurbinectedinの効果予測バイオマーカーとしての可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小細胞肺癌は難治がんの代表で、外科切除が出来た症例でも早期に再発を来すことが多い。根治には薬物療法が必須だが、効果が得られる薬剤は少なく、予後不良の原因となっている。近年、新規薬剤による治療開発が少しずつ進んでいるが、薬剤の効果が予測できるバイオマーカーは少ない。本研究では、小細胞肺癌細胞株における転写因子のPOU2F3発現が、新規薬剤のLurbinectedinの効果と有意な相関関係を認め、このPOU2F3がLurbinectedinの効果予測バイオマーカーとなる可能性が示唆された。治療薬の選択肢が少ない小細胞肺癌で、個別化医療を推進する発見の一つであり、本研究は一定の学術的意義を有する。

研究成果の概要（英文）：Small cell lung cancer (SCLC) is a progressive disease with a poor prognosis. Recently, a method to classify SCLC by the expression status of four transcriptional factors, ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1, was proposed. We investigated the potential relationships between expression of these four transcription factors and the effect of lurbinectedin. Based on the results of qRT-PCR and western blot analyses, the eight SCLC cell lines examined were classified into NEUROD1, POU2F3, and YAP1 subtypes, as well as five ASCL1 subtypes. We found that the higher the mRNA expression level of POU2F3, the lower the IC50 of lurbinectedin. Evaluation of resected SCLC tissue revealed that the composition of subtypes defined by the relative dominance of ASCL1, NEUROD1, POU2F3, and YAP1 was as follows: 61% ASCL1, 15% NEUROD1, 14% POU2F3, 5% YAP1, and 5% all-negative. In our experiments, high mRNA expression of POU2F3 in SCLC cell lines correlated with the effect of lurbinectedin

研究分野：呼吸器外科

キーワード：小細胞肺癌 Lurbinectedin POU2F3

1. 研究開始当初の背景

原発性肺癌の中でも、肺腺癌では、癌の発生に関わるドライバー遺伝子変異と、それに対する選択的阻害薬による分子標的治療が定着しはじめ、実臨床においても Precision medicine の典型的・模範的な形として発展を示している。組織の網羅的な解析などから、各遺伝子異常は相互排他的で、その頻度も明らかになってきており、今後の研究により、未知の原因遺伝子異常が無くなる可能性がある。一方で、肺腺癌以外の組織型では、ドライバー遺伝子変異やそれに対する選択的阻害薬の開発はまだ発展段階であり、実臨床においては、依然として殺細胞性抗癌剤が使用されることが多い。原発性肺癌のうち、高悪性度神経内分泌癌(High-grade neuroendocrine cancer: HGNEC)に分類される、小細胞肺癌 (Small cell lung cancer: SCLC)及び肺大細胞神経内分泌癌(Large cell neuroendocrine carcinoma: LCNEC)は、他の組織型の肺癌に比べて生物学的悪性度が高く、進行も早いため、仮に早期で根治切除ができた場合においても術後に転移再発を来すことも多い。この HGNEC において最も問題とされているのは、薬物治療が過去 30 年以上にわたって大きく変化しておらず、それが一つの原因で予後の改善が全く得られていないことである。米国でも、小細胞肺癌は膵臓癌と並んで代表的な“Recalcitrant cancer”であるとされ、その病態の解明、新規治療薬の開発や実用化が急務であるとされている。

肺 HGNEC の病理学的特徴としては、核細胞質比の比較的大きい腫瘍細胞が、神経内分泌パターンを示しながら比較的均一に増殖している。浸潤性肺腺癌で見られるような、様々な組織型が混在する Intratumoral heterogeneity は、肺 HGNEC では少ないと考えられてきた。しかし、近年の研究から、この肺 HGNEC でも、その発生段階から腫瘍は heterogeneity を有し、そのことが生物学的悪性度や薬剤・放射線感受性、治療後再発と関連していることが報告されている。肺 HGNEC の heterogeneity の指標となる代表的なバイオマーカーとして、ASCL1 と NEUROD1 がある。これらは肺 HGNEC の発生に関わる driving transcriptional factor genes であるとされ、in situ 病変から invasive な病変へと進展する際に、腫瘍細胞レベルでのそれらの発現が変化すると考えられている。これらの発現パターンによる Phenotype 分類は、形態的特徴 (Classic form と Variant form) を明確に区別でき、さらに肺 HGNEC の生物学的特徴を正確に表し、治療選択を行う上でも重要な情報となるという可能性を秘めている。

また近年、肺 HGNEC における遺伝子変異の網羅的解析が行われ、従来言われていたとおり、p53 と RB1 の遺伝子変異が高頻度に認められることがわかった。しかし、これらはいずれもがん抑制遺伝子の変異であり、分子標的治療という観点からは、良い targetable gene となることはない。代わりに近年着目されているのが、合成致死 (Synthetic lethality) に基づく新規治療標的であり、肺 HGNEC においてもいくつかの標的遺伝子が発見されてきている。これらの標的遺伝子の高発現は、多くの場合で各種治療薬における効果予測バイオマーカーとなり得るため、肺 HGNEC の腫瘍や細胞株でのそれらの遺伝子発現やタンパク発現の状況を解析することは、今後の新たな治療展開の上で重要と考えられる。MYC family 遺伝子 (MYC, MYCL1, MYCN) 高発現や遺伝子増幅は肺 HGNEC の 20~30% に認められ、Aurora kinase inhibitor や serine/threonine-protein kinase 1 (Chk1) inhibitor などの標的遺伝子となり、遺伝子高発現がこれらの薬剤の効果予測バイオマーカーとなり得るといって報告されている。また、Schlafen 11 (SLFN11) 遺伝子の高発現も同様に肺 HGNEC で高頻度に認められ、これは DNA 修復経路を遮断する Poly ADP ribose polymerase (PARP) inhibitor の効果予測バイオマーカーとなり得ることが最近報告された。さらには、Notch シグナルのリガンドである Delta-like protein 3 (DLL3) 遺伝子の高発現は、Rovalpituzumab tesirine (Rova-T) の効果予測バイオマーカーであることが確認されている。

これらの分子標的治療薬は、近年になり臨床的な効果が確かめられているが、肺腺癌のように効果予測バイオマーカーとの相互関係は未だ確立されておらず、細胞株や切除組織などの臨床検体を用いた検討が必要と考えられる。また、上記のような肺 HGNEC の Phenotype が少しずつ解明され分類が可能となっている中、腫瘍形態と遺伝子異常との関連、即ち“Phenotype-Genotype correlation”について明らかにしていくことは、今後の肺 HGNEC の治療を発展させていくためにも、大きな意義を持つと考えられる。

2. 研究の目的

この研究は、悪性度の高い肺 HGNEC の生物学的特徴を解明し、今後の予後改善に結びつけることを主たる目的とする。肺 HGNEC については、これまでも様々な学術研究が行われ、臨床での大きなインパクトに結びつく研究も数多く存在する。しかし、そのような状況にも関わらず、この肺 HGNEC に対する治療選択肢が依然として不足しているのも事実である。癌の Precision medicine の普及が求められる近年において、とりわけ難治がんへの新規治療の開発と、効果予測バイオマーカーを用いた効率的な実用が急務と考えらる

る。本研究は、肺 HGNEC の細胞・組織形態と遺伝子異常との関連を解明することでその本質的な病態を理解し、さらに、これまでにあまり着目されてこなかった肺 HGNEC に対する新たな分子標的治療の展開へ結びつけていくという点で、今までにない学術的独自性を有する。

3. 研究の方法

(1) 小細胞肺癌細胞株における Subtype の同定：

小細胞肺癌 8 細胞株における ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 の遺伝子発現を RT-PCR 法で、蛋白発現を Western blotting でそれぞれ解析する。ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 は相互排他的に高発現を認めることが多いことが知られており、これにより各細胞株の Subtype を分類する。

(2) 小細胞肺癌細胞株に対する治療薬の薬剤感受性試験：

(1) で Subtype を同定した小細胞肺癌細胞株を用いて、それに対する治療薬である Cisplatin、Etoposide、また新規分子標的治療薬である Lurbinectedin の薬剤感受性を MTS assay で解析し、得られた IC₅₀ と Subtype との関連を検討する。

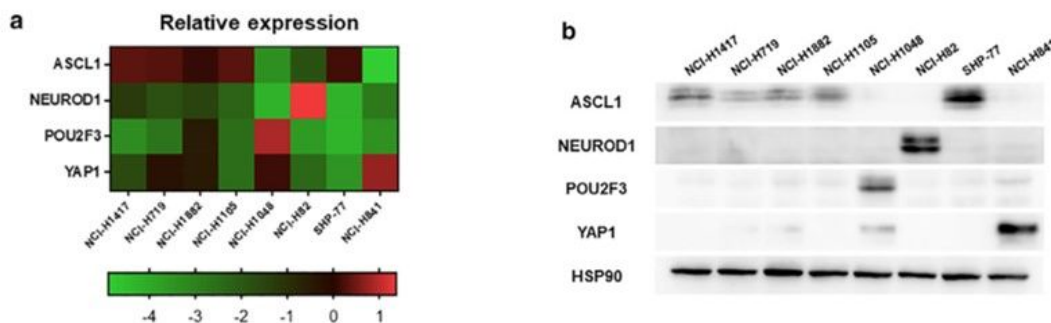
(3) 肺 HGNEC 切除症例に対する免疫染色と Subtype 分類

鳥取大学呼吸器外科及び関連病院で切除された肺 HGNEC 症例 105 例の腫瘍組織に対して、ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 の免疫組織化学検査により蛋白発現を解析し、分類した Subtype 別の臨床病理学的背景因子との関連を解析する。

4. 研究成果

(1) 小細胞肺癌の細胞株、及び切除された腫瘍組織検体における Subtype の同定：

< 図 1 a, b >



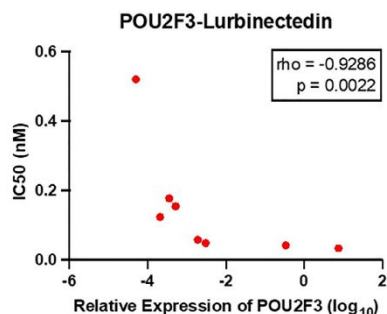
qRT-PCR 法による遺伝子発現解析では、NCI-H1417、NCI-H719、NCI-H1882、NCI-H1105 で ASCL1 高発現を認め、NCI-H82 で NEUROD1 高発現、NCI-H1048 で POU2F3 高発現、NCI-H841 で YAP1 高発現を認めた。Western blot 法による蛋白発現解析でも、同様の発現結果であった。

(2) 小細胞肺癌細胞株に対する治療薬の薬剤感受性試験

< 表 1 >

Cell line	Subtype	Cisplatin (μM)	Etoposide (μM)	Lurbinectedin (nM)
NCI-H1417	ASCL1	4.68 (0.83)	1.75 (0.11)	0.154 (0.001)
NCI-H719	ASCL1	1.51 (1.11)	0.15 (0.02)	0.058 (0.015)
NCI-H1882	ASCL1	1.95 (0.28)	0.45 (0.13)	0.042 (0.002)
NCI-H1105	ASCL1	1.20 (0.01)	0.36 (0.07)	0.049 (0.009)
NCI-H1048	POU2F3	6.00 (1.81)	0.30 (0.01)	0.034 (0.002)
NCI-H82	NEUROD1	1.16 (0.33)	0.56 (0.17)	0.124 (0.025)
SHP-77	ASCL1	15.81 (3.15)	44.08 (23.32)	0.520 (0.052)
NCI-H841	YAP1	11.35 (2.52)	0.81 (0.12)	0.177 (0.030)

MTS assay 法による薬剤感受性試験の結果を表 1 に示す。



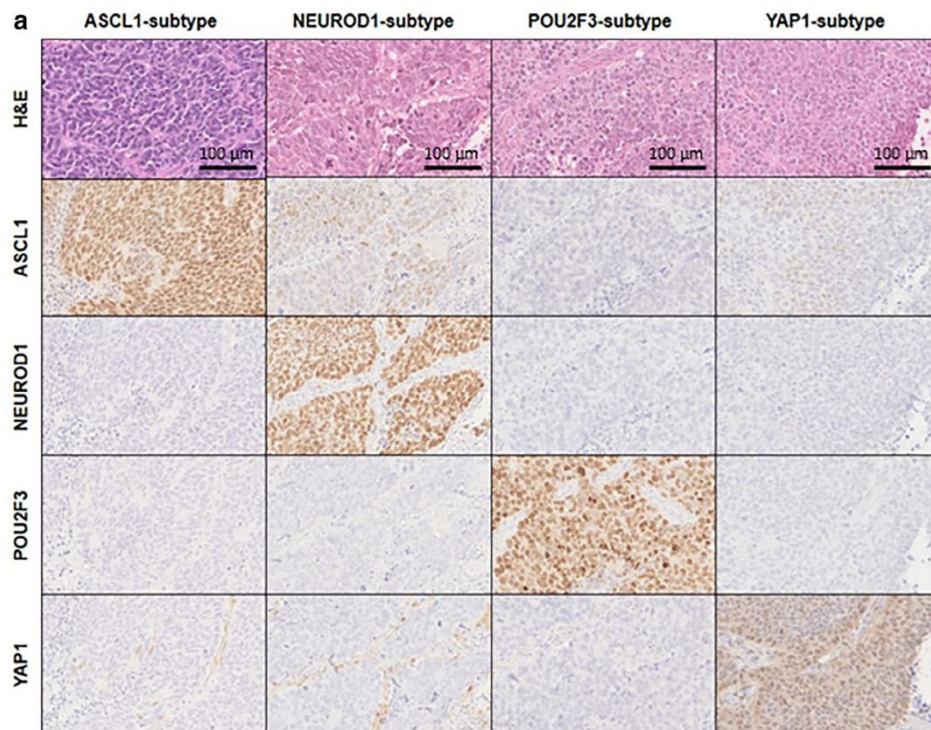
< 図 2 >

小細胞肺癌の遺伝子発現と治療薬剤感受性との関連

POU2F3 の遺伝子発現と Lurbinectedin の IC₅₀ に有意な相関関係を認めた ($\rho = -0.9286$, $p = 0.0022$)

(3) 肺 HGNEC 切除症例に対する免疫染色と Subtype 分類

< 図 3 >



鳥取大学呼吸器外科及び関連病院で切除された肺 HGNEC 症例 105 例の腫瘍組織に対して、ASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1 の免疫組織化学検査により蛋白発現を解析し、分類した。小細胞肺癌切除症例 59 例における Subtype 分類では、ASCL1-subtype が 61%、NEUROD1-subtype が 15%、POU2F3-subtype が 14%、YAP1-subtype が 5%、Not otherwise specified (NOS) が 5%であった。Subtype と臨床病理学的背景因子の間に有意な関連は認めなかった。

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 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Matsui Shinji, Haruki Tomohiro, Oshima Yuki, Kidokoro Yoshiteru, Sakabe Tomohiko, Umekita Yoshihisa, Nakamura Hiroshige	4. 巻 13
2. 論文標題 High mRNA expression of POU2F3 in small cell lung cancer cell lines predicts the effect of lurbinectedin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 1184 ~ 1192
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.14382	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 該当する

1. 著者名 Haruki Tomohiro, Matsui Shinji, Oshima Yuki, Maeta Hiroyuki, Fukino Shunsuke, Yurugi Yohei, Araki Kunio, Umekita Yoshihisa, Nakamura Hiroshige	4. 巻 14
2. 論文標題 Prognostic impact of surgical treatment for high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: a multi-institutional retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 1070 ~ 1078
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.21037/jtd-21-1938	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 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松居真司、春木朋広、大島祐貴、城所嘉輝、坂部友彦、梅北善久、中村廣繁
2. 発表標題 NEUROD1発現は肺高悪性度神経内分泌癌における予後不良因子である
3. 学会等名 第39回日本呼吸器外科学会学術集会
4. 発表年 2022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
---------	---------