

令和 6 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15418

研究課題名（和文）肺高悪性度神経内分泌癌におけるYAP1発現の臨床病理学的検討

研究課題名（英文）Clinicopathological Study of YAP1 Expression in High-Grade Neuroendocrine Carcinoma of the Lung

研究代表者

松岡 亮太（Matsuoka, Ryota）

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：70833804

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：当院で切除された小細胞癌（SCLC）と大細胞型神経内分泌癌（LCNEC）の検体を用いて、サブタイプを規定する因子（ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1）などの免疫染色を行い、腫瘍内での各因子の不均一性を解析していく中でHNF4⁺という消化管マーカーを発現するグループがあることを発見した。HNF4⁺を発現するグループはしないグループと比較し、有意に予後不良であった。またNFE2L2/KEAP1遺伝子変異を特異的に有することがわかった。さらに細胞株を用いた実験ではHNF4⁺が神経内分泌癌においてアポトーシスを抑制することで細胞増殖を促進することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

SCLCとLCNECは、高悪性度神経内分泌癌（HGNEC）に分類され、侵襲性が高く予後不良である。有効な薬剤も限られており新たな治療法の創出が必要である。本研究ではHGNEC内にHNF4⁺を発現する新たなグループを発見しHNF4⁺発現は悪性度に関連している可能性を示した。HNF4⁺発現HGNECはHGNEC内でも特殊なプロファイルおよび生物学的挙動を有しており、従来とは異なった治療の効果が予想される。今後はHNF4⁺発現HGNECの特性を解析することで、HNF4⁺の発現に立脚したHGNECの新たなサブタイプ分類と、それに合わせた最適な治療法の創出を目指す。

研究成果の概要（英文）：We conducted immunohistochemistry using specimens of small cell lung cancer (SCLC) and large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) resected at our institution to analyze the heterogeneity of various factors (ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1) that define subtypes. During this analysis, we discovered a group expressing HNF4⁺, a gastrointestinal marker. Compared to the group that did not express HNF4⁺, this group had significantly poorer prognosis. Furthermore, it was found that they specifically possessed mutations in the NFE2L2/KEAP1 genes. Additionally, experiments using cell lines demonstrated that HNF4⁺ promotes cell proliferation in neuroendocrine carcinomas by inhibiting apoptosis.

研究分野：人体病理

キーワード：神経内分泌癌 大細胞型神経内分泌癌 小細胞癌 ASCL1 NEUROD1 POU2F3 YAP1 HNF4

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

小細胞癌 (SCLC) と大細胞型神経内分泌癌 (LCNEC) は、高悪性度神経内分泌癌 (HGNEC) に分類され、肺癌の中でも侵襲性が高く、予後不良である。有効な薬剤も限られており、かつ高率に耐性化する。したがって、HGNEC の biology をより詳細に解析した上で、予後を改善させるような新たな治療法の創出が必要である。

昨今 SCLC は ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 の発現により 4 つのサブタイプに分類できることがわかった。

組織形態、神経内分泌 (NE) マーカー発現や肺胞上皮マーカーである TTF-1 の発現など SCLC ではより均一にみられる因子が LCNEC では腫瘍内で非常に不均一であるが先行研究により明らかになっている。上記の 4 つのサブタイプを規定するマーカーもヘテロに発現する傾向にあり、特に YAP1 はその傾向が顕著である。

2. 研究の目的

筆者らは LCNEC の不均一さが治療抵抗性や薬剤耐性に関係しているのではないかと、この仮説を立て様々な病理学的観点から LCNEC の不均一さを解析することを目的とした。特に LCNEC の細胞形態、4 つのサブタイプマーカー、NE マーカー [Chromogranin A (CHGA), Synaptophysin (SYP), CD56, insulinoma associated 1 (INSM1)]、TTF-1 の発現のほかにも当研究室で注目している消化管上皮マーカーでありかつ、肺腺癌の特殊型である浸潤性粘液性腺癌の特異的マーカーである HNF4 の発現についても検討した。

HNF4 発現する NEC が存在することを研究期間中に発見し、HNF4 発現 NEC の特徴について特に詳細に解析した。

3. 研究の方法

免疫組織化学: 手術で得られた SCLC 37 例、LCNEC 46 例に対して、ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1, HNF4 α , TTF-1, CHGA, Synaptophysin SYP, CD56, INSM1 の免疫組織化学を行った。

細胞形態スコアリング: 各症例について SCLC の形態に特徴的な 6 つの要素; 核の大きさ、nuclear molding、クロマチンの繊細さ、長さとの比率、細胞質の広さ、核小体の有無を評価した。各要素において SCLC に非常に類似した形態には 0 点、異なる形態には 2 点、中間的な形態には 1 点とし、6 つの点数の合計を細胞形態スコアとした。低いスコアは SCLC に近い形態を示し、高いスコアは LCNEC に近い形態であることを示す。

上記 LCNEC 46 例の内、10 例において whole exome sequence を行った。

細胞株を用いた実験: 14 個の HGNEC の細胞株において ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1, HNF4 α , TTF-1 の発現をウエスタンブロッティングで確認した。さらに HNF4 の機能について確認するために、HNF4 高発現細胞株である VMR-LCD に HNF4 をノックダウン、HNF4 低発現細胞株である SBC 細胞株にノックインし増殖能やアポトーシス回避能の変化を解析した

4 . 研究成果

病理切片における各因子の発現と、各サブタイプの臨床病理学的因子との比較

-1 ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 の発現

免疫染色の結果、SCLC, LCNEC いずれも 4 つのサブタイプに分けられた。ASCL1, NEUROD1, YAP1 はいずれの症例も症例内で相互排他的な染色性がみられた。しかしながら一部の症例では ASCL1, NEUROD1 がオーバーラップする症例もみられた。一方で POU2F3 が ASCL1/NEUROD1 とオーバーラップすることはなかった。SCLC では YAP1 発現が少なかった一方、LCNEC では YAP1 陽性群が多くみられた。この他、YAP1 は ASCL と NEUROD1 とは相互排他的な染色性を示す一方、POU2F3 と共発現する部分が見られた。

-2 ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 と NE マーカーおよび TTF-1, HNF4 発現との関係

ASCL1, NEUROD1 陽性群は NE マーカーと強い正の相関がみられた一方、POU2F3, YAP1 陽性群は NE マーカーと負の相関がみられた。TTF-1 陽性群と HNF4 陽性群はほとんどが ASCL1/NEUROD1 陽性群に属しており、いずれも NE マーカーと強い相関がみられた。興味深いことに、TTF-1 と HNF4 の染色性は相互排他的であった。また TTF-1 陽性群と HNF4 陽性群は POU2F3 陽性群にはみられなかった。

-3 各因子と予後との関係

各因子の発現が予後にどれほど関与するかを調べるために、症例を各因子の陽性群と陰性群に分けて、両群に予後に違いがないか解析した。その結果、HNF4 陽性群は陰性群と比較し有意に予後が悪かった。このほか POU2F3 陽性群でも有意に予後が悪いくことがわかった。YAP1 陽性群と陰性群では予後に有意な違いは見られなかった。

細胞形態と各因子との関連

各因子の発現がどの程度細胞形態と相関するかを調べるために、各因子の発現と細胞形態スコアの相関を解析した。その結果、既報通り POU2F3 陽性群は中間的なスコアを示した。一方で HNF4 陽性群も SCLC と LCNEC の間である中間的なスコアであり形態的にも特徴があることが示唆された。

HNF4 発現 NEC における遺伝子変化

LCNEC 10例 (HNF4 高発現: 3例, HNF4 低発現: 7例)において whole exome sequence を行ったところ、HNF4 高発現 2例に *NFE2L2* 変異が、1例に *KEAP1* 変異がみられ、HNF4 低発現群ではこれらの変異はみられなかった。*NFE2L2/KEAP1* 経路は抗酸化ストレスに重要な経路である。肺癌の中では NSCLC に *NFE2L2/KEAP1* 変異がしばしばみられる。本研究では HNF4 を発現する LCNEC に特異的にみられる変異である可能性が示唆された。

細胞株における各タンパクの発現と HNF4 の機能

HGNEC 細胞株 14 個のウエスタンブロットティングでは ASCL1, NEUROD1, POU2F3, および YAP1 の発現が相互排他的であることが示され、ASCL1 サブタイプの細胞株

(VMRC-LCD、 H446、 Lu139、 H889、 H510A) においてのみ HNF4 および TTF-1 の高発現が見られた。また VMRC-LCD 細胞株における HNF4 の小干渉 RNA (siHNF4) 導入により細胞数が減少し、一方、SBC5 細胞株における HNF4 のノックインにより細胞数が増加した。さらに VMRC-LCD 細胞株に siHNF4 を導入した場合の Annexin V-FITC アポトーシスアッセイでは、アポトーシス細胞数の増加が示された。これらのことから HNF4 は神経内分泌癌細胞株においてアポトーシスを抑制することで細胞増殖を促進することが示唆された。

まとめ

LCNEC の不均一性を解析していく中で、NEC 内に HNF4 を発現する新たなグループを発見した。本研究では NEC において HNF4 発現は悪性度に関連している可能性を示した。HNF4 発現 NEC は NEC 内でも特殊なプロファイルおよび生物学的挙動を有しており、従来とは異なった治療の効果が予想される。今後さらに HNF4 発現 NEC の特性を解析しながら、HNF4 の発現に立脚した NEC の新たなサブタイプ分類と最適な治療法を見出していきたい。

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 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hitomi Kawai, Ryouta Matsuoka, Takeshi Ito, Daisuke Matsubara	4. 巻 27
2. 論文標題 Molecular Subtypes of High-Grade Neuroendocrine Carcinoma (HGNEC): What is YAP1-Positive HGNEC?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Bioscience-Landmark	6. 最初と最後の頁 108
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.31083/j.fbl2703108	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 -

1. 著者名 Ryota Matsuoka, Hitomi Kawai, Takeshi Ito, Daisuke Matsubara	4. 巻 17
2. 論文標題 Determining Whether YAP1 and POU2F3 Are Antineuroendocrine Factors	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of thoracic oncology	6. 最初と最後の頁 1070-1073
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.jtho.2022.07.001	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 朝山慶, 松岡亮太, 松原大祐
2. 発表標題 Immunohistochemical analysis of high-grade neuroendocrine carcinoma (HGNEC) in lung
3. 学会等名 第112回日本病理学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 朝山慶, 松岡亮太, 舘涼華, 柴綾, 古橋陽輔, 中川智貴, 村田佳彦, 松原大祐
2. 発表標題 Pulmonary high-grade neuroendocrine carcinoma with a high level of hepatocyte nuclear factor 4 alpha
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 松岡 亮太、朝山 慶、中川 智貴、村田 佳彦、松原大祐
2. 発表標題 Clinicopathologic comparison of primary lung SCLC and LCNEC with high expression of ASCL1
3. 学会等名 第113回日本病理学会総会
4. 発表年 2024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
---------	---------