

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 13 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26870876

研究課題名(和文)大細胞神経内分泌肺癌の標的遺伝子解析による新しい治療法の探索

研究課題名(英文) Genomic profiling of large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung for the development of new targeted therapies

研究代表者

梅村 茂樹 (Umemura, Shigeki)

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院呼吸器内科・医員

研究者番号：80623967

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：分子生物学的な特徴がほとんど知られていない大細胞神経内分泌肺癌(LCNEC)78例を対象として、切除例(65例)と進行例(13例)の両方で標的遺伝子解析を行い、LCNEC遺伝子変化の全体像を把握した。小細胞肺癌(SCLC)と同様、がん抑制遺伝子TP53、RB1に高頻度に遺伝子変異を認めた。一方PI3K/AKT/mTOR経路の遺伝子異常は13例(17%)に認められ、またEGFR、ERBB2遺伝子に、それぞれ1例(1%)、1例(1%)の既知の活性型変異を認め、いずれも治療標的の候補と考えられた。LCNECとSCLCの遺伝子プロファイルは似通っており、本研究で有望な治療標的候補を同定できた。

研究成果の概要(英文)：Little is known about the molecular features of large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung (LCNEC). We performed targeted capture sequencing of 78 LCNEC samples (65 surgically resected cases and 13 advanced cases) and obtained the overview of the biologically relevant genetic alterations of LCNEC. We found a relatively high prevalence of inactivating mutations in TP53 and RB1 in the same way as SCLC. Genetic alterations in the PI3K/AKT/mTOR pathway were detected in 13 (17%) of the tumors and other well-known activating alterations were detected in EGFR (1 case, 1%) and ERBB2 (1 case, 1%). LCNEC had a similar genomic profile to SCLC, including promising therapeutic targets such as the PI3K/AKT/mTOR pathway and other well-known gene alterations.

研究分野：呼吸器内科学

キーワード：分子標的薬 癌遺伝子 大細胞神経内分泌癌

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 大細胞神経内分泌肺癌の現状と問題点

大細胞神経内分泌肺癌 large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) は、形態からは非小細胞肺癌 (NSCLC) に分類されるも、小細胞肺癌 (SCLC) と同じく神経内分泌学的性格を有する腫瘍である。つまり形態から NSCLC に分類されながら、その生物学的特徴や臨床経過が SCLC と酷似しているため、SCLC と NSCLC のいずれの治療を選択すべきかについて明確な結論が出ておらず、その結果として治療方針が確立されていないのが現状である。

また LCNEC は他の肺癌と比較して腫瘍の増殖速度が速く、切除例でも 5 年生存率が 40% 程度と極めて予後不良な疾患である。しかし希少な腫瘍であることから大規模な遺伝子解析が行われておらず、既存の殺細胞性抗癌剤を上回る新規の分子標的薬剤は、ここ 10 年来見つかっていない。LCNEC の予後の改善には、従来の作用機序とは異なる新たな治療法の開発が極めて重要である。

### (2) 本研究に関連した国内外の研究動向

LCNEC は切除肺癌のわずか 3% の稀な腫瘍であるため、研究開始当初、大規模な遺伝子解析は世界中で実施されていなかった。

我々は、先行研究にて SCLC の網羅的遺伝子解析を実施し、PI3K/AKT/mTOR 経路や受容体チロシンキナーゼ等、SCLC の治療標的として有望な遺伝子変異を複数同定したが、これらは同じ神経内分泌学的性格を有する LCNEC にも存在する可能性が高いと考えられる。LCNEC において、これら候補遺伝子群の標的遺伝子解析 (ターゲットシーケンス) を実施することにより、SCLC との類似性を確認することができ、また新たな治療開発につながる事が期待される。

## 2. 研究の目的

難治性で治療法が確立されていない LCNEC を対象とし、今までに行われていない大規模な標的遺伝子解析を行い、新しい分子標的治療法を確立することを目的とする。

また LCNEC でこれら標的遺伝子群の解析を行うことにより、SCLC とのゲノムレベルでの類似性の有無を確認することを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) 対象症例の臨床因子の抽出

国立がん研究センター東病院、肺癌データベース (総計約 14000 例) の中から、肺切除術が行われていて術後病理診断が LCNEC であった症例、および生検により LCNEC との診断が得られた進行例を抽出する。これら切除例と進行例の両者に関して、年齢、性別、喫煙状態、病期、治療法等の臨床因子を抽出する。

で得られた切除例および進行例に関し

て、病理標本を再評価し形態学的に LCNEC の特徴を有していることを確認する。さらに chromogranin, synaptophysin, CD56 等、神経内分泌マーカーの染色も行い、免疫組織学的に標本の均質性が保たれているかについても再確認を行う。

により病理組織学的に LCNEC であること確認できた症例においては、Tissue microarray を作製して免疫染色を行い、遺伝子変異に伴う関連遺伝子の発現を検証する。免疫染色の評価は半定量的スコアリングを行い、それらを各組織型別に比較する。

### (2) ゲノム DNA の抽出

(1) で得られた対象症例 (切除例、進行例の両者) において、ホルマリン固定もしくはメタノール固定のパラフィン包埋病理組織標本のブロックを Tissue microarray 作製と同様に棒状に打ち抜き、腫瘍組織のみを取り出す。

で得られた腫瘍組織から、DNA 抽出キットを用いて、ゲノム DNA を抽出する。

### (3) 標的遺伝子のエクソン解析

(2) で抽出した LCNEC 切除例及び進行例のゲノム DNA を用いて、標的遺伝子群 (244 遺伝子: size 1.49Mb) で作成したカスタムパネルによる標的遺伝子解析を行い、その頻度と変異部位を確認する。この 244 個の候補遺伝子群の内訳は、以下のとおりである。

TP53, RB1, MYC family 等、既報で SCLC に高頻度に異常が報告されている遺伝子群

先行研究の SCLC の網羅的遺伝子解析で新たに見つかった、SCLC に高頻度で異常が認められる遺伝子群

分子標的治療の対象となり得る遺伝子群  
ここで検出された変異、異常については適宜サンガー法等による確認を行う。また遺伝子増幅の解析も行う。

### (4) 機能解析

(3) の解析で検出された遺伝子群について、症例間での重複、遺伝子産物の機能等を加味した二次集計による特徴づけを行う。遺伝子変異、遺伝子増幅が認められた遺伝子を統合的に収集し、既知の細胞内シグナル経路へのマッピングや、遺伝子産物のもつ機能ドメインによる分類を行い、LCNEC で重複して異常が検出される遺伝子群の同定を行う。この中から細胞増殖 (疾患の発生) に関与すると考えられる遺伝子異常を中心に、治療標的となり得るドライバー遺伝子異常の候補の同定を行う。

## 4. 研究成果

### (1) 対象症例の臨床因子の抽出

国立がん研究センター東病院、肺癌データベース (肺癌全体 約 14000 例) の中から、肺切除術が行われていて、術後病理診断が大細胞神経内分泌肺癌 (LCNEC) であった症例を抽出したところ、65 例が抽出された。また生検により LCNEC と診断された進行例を抽出したところ、13 例が抽出された。これら 78 例

(切除例 65 例+進行例 13 例)につき、年齢、性別、喫煙状態、病期、治療法等の臨床因子を抽出した。更に病理標本を再評価して、形態学的に LCNEC の特徴を有していることも確認した。

	全体 (n=78)
年齢中央値 (範囲)	70 (22-84)
男性/女性	67/11
喫煙 (無/有)	2/76
組織 (混合型以外/混合型)	68/10
病期 (I/II/III/IV)	38/15/17/8
組織採取法 (切除/生検)	65/13

図 1 : LCNEC 78 例の患者背景

(2) 切除例を用いた受容体チロシンキナーゼタンパク発現の検証

(1) で抽出した 65 例の LCNEC 切除例のうち 51 例に関して、遺伝子変異に伴う関連タンパク発現の変化を検証するために Tissue microarray を作成し、10 個の受容体チロシンキナーゼ蛋白の免疫染色を行った。

この結果、受容体チロシンキナーゼタンパクの、症例毎に異なる発現パターンが明らかとなった。

Strong
Weak
Negative

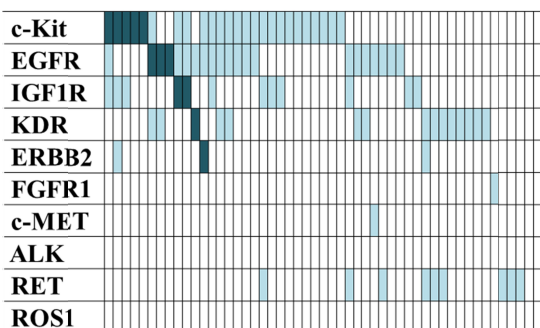


図 2 : LCNEC 51 例の個々の症例における免疫染色強度

(3) ゲノム DNA の抽出と標的遺伝子解析  
(1) で対象とした LCNEC 78 例 (切除例 65 例及び進行例 13 例) において、ホルマリン固定もしくはメタノール固定のパラフィン包埋病理組織標本のブロックからゲノム DNA を抽出した。その後 3. 研究の方法 (3) に示した、標的遺伝子群 (244 遺伝子 : size 1.49Mb) で作成したカスタムパネルによる標的遺伝子解析を行い、候補遺伝子群の頻度と変異部位を確認した。更にシークエンスのリード数をもとに、遺伝子増幅の解析を行った。

(4) 機能解析

(3) で対象とした 65 例の LCNEC 切除例の遺伝子解析結果と 13 例の進行例の解析結果を統合し、日本人 LCNEC 遺伝子変化の全体像 (全 78 例) を把握した。

TP53、RB1、MYC ファミリー、PI3K/AKT/mTOR 経路の遺伝子異常

統合解析の結果、LCNEC では SCLC と同様に、がん抑制遺伝子 : TP53、RB1 遺伝子に高頻度に変異を認めたが、RB1 遺伝子の変異頻度は SCLC よりやや少ない傾向にあった。

一方、PI3K/AKT/mTOR 経路を構成する遺伝子群に変化を認めたのは、13 例 (17%) であった。また MYC ファミリーを構成する遺伝子群 : MYC、MYCL1、MYCN 遺伝子に、それぞれ 2 例 (3%)、8 例 (10%)、1 例 (1%) の増幅を認めた。MYC、MYCL1、MYCN 遺伝子の増幅の間には、SCLC と同様に相互排他性の関係が成り立っていた。

また PI3K/AKT/mTOR 経路の遺伝子異常と、MYC ファミリーの遺伝子異常の頻度は、SCLC との間に差は認めなかった。

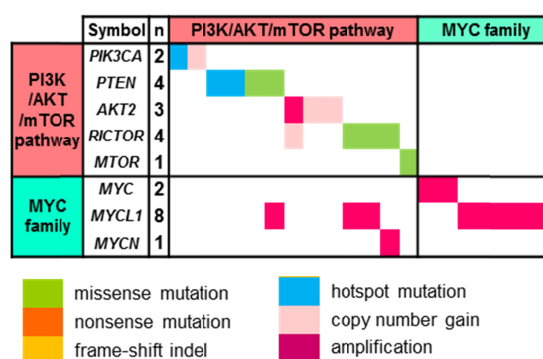


図 3 : LCNEC に認められた PI3K/AKT/mTOR 経路の遺伝子異常と MYC ファミリーの遺伝子増幅

既知の活性型遺伝子変異

KRAS、EGFR、ERBB2 遺伝子に、それぞれ 3 例 (4%)、1 例 (1%)、1 例 (1%) の既知の活性型変異を認めた。

Symbol	Mutation type	N	Mutation site
KRAS	G12D	1	Ras family domain
	G12V	1	Ras family
	Q61R	1	Ras family
EGFR	E746_A750 del	1	Protein tyrosine kinase
ERBB2	V842I	1	Protein tyrosine kinase

図 4 : LCNEC に認められた既知の活性型変異

(5) 結論と今後の展望

本研究において、LCNEC 切除例及び進行例の両方で合計 78 例の標的遺伝子解析を行い、日本人 LCNEC 遺伝子変化の全体像を把握した。希少肺癌である LCNEC では、依然として網羅的な遺伝子解析の報告は少ないため、この 78 例の遺伝子変異プロファイルは、LCNEC の今後の治療開発の上で、重要なデータベースとなる。

また PI3K/AKT/mTOR 経路の遺伝子異常は SCLC と同様に検出され、有望な治療標的の候補と考えられた。加えて、EGFR 遺伝子や ERBB2 遺伝子等にも既知の活性型変異を認め、い

れも治療標的の候補と考えられた。LCNEC では、今までに有望な治療標的が同定されていなかったが、本研究により新たな治療標的の候補が同定できたことは、今後の難治性LCNEC の治療開発の進展に役立つと考えられた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

##### [雑誌論文](計 1 件)

Matsumura Y, Umemura S, et al. Expression profiling of receptor tyrosine kinases in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: a comparative analysis with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma. J Cancer Res Clin Oncol. 2015; 141: 2159-70.

##### [学会発表](計 4 件)

松村勇輝・梅村茂樹 他、「高悪性度神経内分泌肺癌における受容体型チロシンキナーゼの発現の特徴：腺癌，扁平上皮癌との比較解析」, 日本肺癌学会、2014年11月15日、国立京都国際会館(京都府京都市)

松村勇輝・梅村茂樹 他、「Expression profiling of receptor tyrosine kinases in high-grade neuroendocrine carcinoma of the lung: A comparative analysis with adenocarcinoma and squamous cell carcinoma.」 AACR、2015年4月22日、フィラデルフィア(米国)  
三好智裕・梅村茂樹 他、「Genomic profiling of large-cell neuroendocrine carcinoma of the lung.」, ASCO、2015年6月1日、シカゴ(米国)

三好智裕・梅村茂樹 他、「次世代シーケンサーを用いた大細胞神経内分泌肺癌の遺伝子プロファイリング」, 日本肺癌学会、2015年11月28日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

##### [図書](計 件)

##### [産業財産権]

出願状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：

国内外の別：

#### 取得状況(計 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

梅村 茂樹 (UMEMURA, Shigeki)  
国立研究開発法人国立がん研究センター  
東病院呼吸器内科 医員  
研究者番号：80623967

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：