

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：83802

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19960

研究課題名(和文) 胃神経内分泌細胞癌における新規バイオマーカーに関する研究

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene mutation and expression profiles in neuroendocrine carcinoma of the stomach

研究代表者

幕内 梨恵(MAKUUCHI, Rie)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・医師

研究者番号：50723235

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃神経内分泌細胞癌(Neuroendocrine carcinoma; NEC)は腺癌に比べて有意に遺伝子変異数が多く、特にTP53の変異率が高いことが判明した。遺伝子発現解析結果を用いてOPLS-DA法で判別モデルを作成した結果、NECと腺癌を明確に分離することが可能であった。NECに特徴的に発現している遺伝子のうち、CPLX-2(Complexin-2)はNECの腫瘍細胞に特異的な蛋白が発現していることが免疫組織学的染色で確認され、CPLX-2はNECの診断マーカーとなりうることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that neuroendocrine carcinoma (NEC) of the stomach showed a significantly higher average number of somatic mutations per tumor than gastric adenocarcinoma. In particular, TP53 mutation was more frequently observed in NEC than in adenocarcinoma, and genes related to the nervous system were more frequently mutated in NEC. Moreover, NEC and adenocarcinoma were found to be completely different tumors based on gene expression profiles and 40% of the genes expressed strongly in NEC were related to the nervous system. CPLX-2 (Complexin-2) was detected as one of the genes which may contribute to the differences between NEC and adenocarcinoma. CPLX-2 was exclusively expressed in NEC, as demonstrated by immunohistochemistry, and is suggested to be a potential novel biomarker for the diagnosis of NEC.

研究分野：外科学

キーワード：胃癌 神経内分泌細胞癌 遺伝子発現 遺伝子変異

1. 研究開始当初の背景

(1) 胃原発の神経内分泌細胞癌 (neuroendocrine carcinoma: NEC) は胃全体の約 0.6% を占める希少癌であるが、早期からリンパ節転移や肝転移を生じ、生存期間中央値は 19 ヶ月、5 年生存率 40% と、胃腺癌と比べて悪性度が高いことが知られている。

(2) NEC の診断における問題点として、HE 染色では組織像が充実型低分化腺癌と類似している点がある。そのため神経内分泌マーカー (Chromogranin A, Synaptophysin, NCAM) を用いた免疫組織学的染色が鑑別に不可欠である。しかしながら、これらの神経内分泌マーカーの感度、特異度は 100% ではなく、更に特異的な診断方法の開発が望まれている。

(3) 治療法は胃腺癌に準じたリンパ節郭清を伴う胃切除術が第一選択であるが、その悪性度の高さから、集学的治療が必要な場合が多い。胃腺癌と異なり、肺小細胞癌に準じた化学療法が行われることが多いが、未だ有効な治療法は確立していないのが現状である。

(4) また NEC は組織発生的に不明な点も多く、胃腺癌には NEC の性格を有する細胞が混在し、癌幹細胞が多方向性に分化した可能性も示唆される。このような特徴的な性格を持ちながら、NEC はその希少性のためこれまで包括的な遺伝子研究は行われていない。

2. 研究の目的

NEC の網羅的遺伝子変異・発現解析を行い、新しい臨床的に有用なバイオマーカーを見つけることを目的として、研究を行った。

3. 研究の方法

(1) 2014 年 1 月～2015 年 3 月の間に静岡がんセンター胃外科で手術を受けた計 104 例の胃癌切除検体を対象とした。切除直後に腫瘍部、非腫瘍部の新鮮外科切除検体を得て、Next Gene Sequencing (NGS: IonProton) を用いた全エクソン解析と DNA microarray (SurePrint G3 Human GE ver2.0) を用いた遺伝子発現解析を行った。104 例のうち、腺癌の混在のない NEC のみを検体として採取できている 6 例と 13 例の胃腺癌症例を対象として、NEC と腺癌の遺伝子変異、発現を比較した。Orthogonal partial least-squares-discriminant analysis (OPLS-DA) 法で判別モデルを作成し、2 群の腫瘍間の遺伝子発現を多変量解析し、NEC に特異的に発現している遺伝子を同定した。

(2) NEC に特異的に発現している遺伝子を用いて免疫組織学的染色 (immunohistochemistry: IHC) を NEC, 腺癌の両方でを行い、NEC の腫瘍細胞中のタンパ

ク発現を評価した。

(3) 症例数を増やして確認するため、2002 年 9 月～2017 年 4 月の間に静岡がんセンター胃外科で手術を受け、NEC と診断された、もしくは組織学的に NEC が強く疑われた 55 例を抽出した。これらを対象に既存の神経内分泌マーカーと本研究で抽出された遺伝子を用いて IHC 染色を行い、その陽性率を評価した。

4. 研究成果

(1) 全エクソン解析の結果、NEC 6 例中に、557 遺伝子、588 の非同義体細胞変異が確認された。遺伝子変異解析の結果、平均体細胞変異数は NEC:  $98.0 \pm 32.7$  に対して腺癌  $62.6 \pm 75.7$  個であり有意に NEC で変異数が多かった ( $P=0.023$ )。また TP53 変異率は NEC 100% に対して腺癌 46% であり、有意に NEC で高率であった ( $P=0.044$ )。NEC 6 例と腺癌 13 例の遺伝子変異の結果を下記に示す。TP53 以外の遺伝子は、NEC 6 例中最大 2 例に変異を認めるのみであり、腺癌と比較して NEC に特異的な遺伝子変異は検出できなかった。しかしながら、これら NEC の 2/6 例で変異を認めた遺伝子群は、神経との関与が指摘されている遺伝子が多かった (TPH2, TSHZ3, SYNE1, SEMA5A, NTM, PLXNA1, LAR1B)。

Gene	NEC						total	GAD													total			
	N1	N2	N3	N4	N5	N6		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	A9	A10	A11	A12	A13				
TP53	■	■	■	■	■	■	6																	6
TPH2							2																	2
TSHZ3							2																	2
SYNE1							2																	2
VGLL3							2																	2
SEMASA							2																	2
SDK1							2																	2
NTM							2																	2
PLXNA1							2																	2
NUAK1							2																	2
LRP1B							2																	2
FILIP1							2																	2
MAGI2							2																	2
FLG							2																	2
MECOM							2																	2
DIO2							2																	2
CNTNAP5							2																	2
CNR1							2																	2
CSMD1							2																	2
ATL1							2																	2
BCAT1							2																	2

図 1 NEC と腺癌の遺伝子発現プロファイル

(2) Microarray を用いた遺伝子発現解析を行い、これを SIMCA-P + software (ver12.0.1.0; Umetrics) を用いて OPLS-DA score plot を行った。この結果 NEC と腺癌 (Ad) が遺伝子発現の観点で明確に異なる腫瘍群であることが示された。

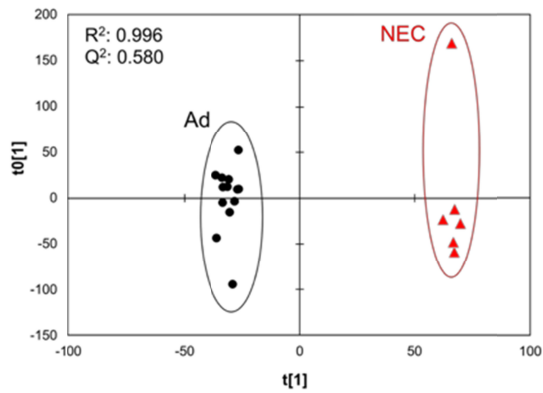


図2 OPLSDA score plot

続いてS-plotを作成し、NECと腺癌の分離に影響を及ぼす遺伝子を抽出した。その結果を下記に記す。P値>|0.8|を示した44遺伝子が2つの腫瘍の分離に有意に影響を与えている遺伝子として抽出された。S-plotと抽出された遺伝子を下記に記す。

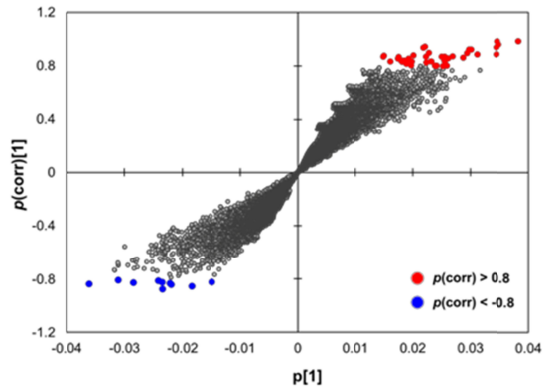


図3 S-plot values

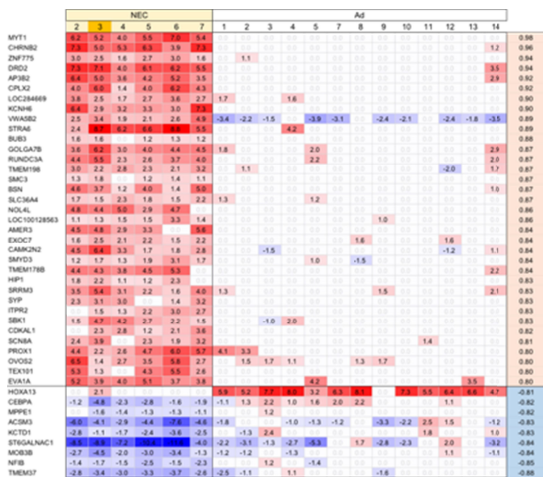


図4 44遺伝子のプロファイル

(3) 44遺伝子のうち、その高発現がNECに強く影響を与えられたのは35遺伝子であった。この内14遺伝子は神経に関連する遺伝子であり、NECが神経組織の性格を有する可能性があることが示唆された。これ

の35遺伝子中、5遺伝子(MYT1, CPLX2, SLC36A4, HIP1, PROX1)について、実際のNECと腺癌のタンパク発現をIHCで評価した。その結果、CPLX2はNEC全例で陽性を示した(図5)。一方、腺癌では2/13例(15%)のみに陽性を示した。その他MYT1とPROX1はNEC、腺癌とも発現を認めず、SLC36A4, HIP1はNEC、腺癌共に同程度の発現を認めた。以上より、CPLX2はNECに有意に高頻度に発現する遺伝子であり、NECの診断の一助となる新しいバイオマーカーとなりうる可能性が示唆された。

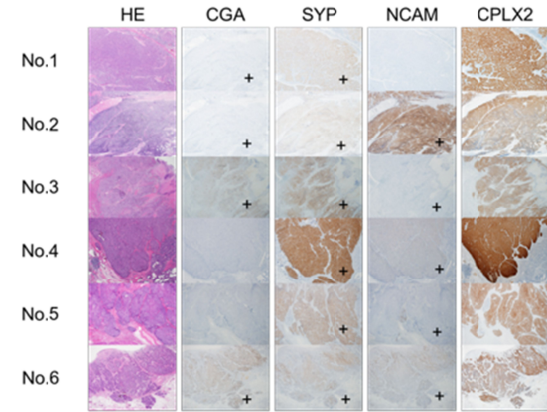


図5 NEC6例の免疫染色検査結果

(4) 以上の結果を確認するため、過去の手術症例中、NECと診断またはNECが強く疑われる55例に対して、既存の神経内分泌マーカーとCPLX2のIHCを行った。その結果、CPLX2の陽性率は43/55(78%)であり、他の神経内分泌マーカーよりも高かった(Chromogranin A: 58%, Synaptophysin: 74%, NCAM: 62%)。

(5) 本研究は希少性の高い胃NECに対してNGSを用いた包括的遺伝子解析を行い、NECの遺伝子変異を評価した。その結果、NECは腺癌と比べて変異頻度が高く、特にTP53遺伝子の変異率が高いこと、更に神経系に関連する遺伝子の変異が多いことが明らかになった。過去の研究では、胃NECにおいてERBB1, ATM, RB1の変異が報告されているが、この中で調査された遺伝子は54の癌関連遺伝子のみであった。本研究では800以上の癌関連遺伝子を含めた包括的解析を行っており、より精度の高い評価が行われたものと考えられる。興味深いことに、NECで遺伝子変異が認められた遺伝子の多くは、腺癌では変異が認められず(517/557, 92.8%)、その多くは神経に関連する遺伝子であった。このことは、遺伝子的背景においてもNECが腺癌と異なることを示している。

(6) CPLX2 (Complexin-2) は complexin/synaphin family のひとつで、これからコードされる complexin は可溶性シナ

プス前タンパクとして、神経終末において神経伝達物質放出を制御する機能分子であると考えられている。しかしながら、その機序については不明な点が多いのが現状である。CPLX2 と統合失調症、うつ病などの神経疾患との関連が報告されている。他、肺の大細胞癌や小細胞癌においてCPLX2 の発現亢進が予後不良因子であることが報告されている。しかしながら胃のNEC とCPLX2 との関連はこれまでに報告されておらず、本研究で初めて明らかになった。

(7) 残念ながら、NEC に特徴的な遺伝子変異の同定には至らなかったが、計 60 例以上の症例をもとに、CPLX2 が診断のマーカーとして有用である可能性が示された。

#### <引用文献>

- Solica E, et al. Neuroendocrine neoplasms of the stomach. *WHO Classification of Tumours of the Digestive System. Fourth ed.* 64-68
- Scardoni M, et al. Mixed adenoneuroendocrine carcinomas of the gastrointestinal tract: targeted next-generation sequencing suggests a monoclonal origin of the two components. *Neuroendocrinology*, (2014), 100:310-316
- Giraud CG, et al. A clamping mechanism involved in SNARE-dependent exocytosis. *Science*, (2006), 313:676-680
- Tang J, et al. A complexin/syntaxin 1 switch controls fast synaptic vesicle exocytosis. *Cell*, (2006), 126:1175-1187
- Glynn D, et al. Clorgyline-mediated reversal of neurological deficits in a Complexin 2 knockout mouse. *Hum Mol Genet* (2010) 19, 3402-3412
- Komatsu H, et al. Complexin-2 as a potential prognostic biomarker in human lung high grade neuroendocrine tumors. *Cancer Biomark*, (2013)13, 171-180

#### 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)

Rie Makuuchi, Masanori Terashima, Masatoshi Kusahara, Takashi Nakajima, Masakuni Serizawa, Keiichi Hatakeyama, Keiichi Ohshima, Kenichi Urakami, Ken Yamaguchi. Comprehensive analysis of gene mutation and expression profiles in neuroendocrine carcinoma of the

stomach, Biomedical Research, 査読有、Vol. 38, No 1, 2017、pp.19-27  
DOI:10.2220/biomedres.38.19.

#### [学会発表](計2件)

Rie Makuuchi, Masanori Terashima, Masatoshi Kusahara, Takashi Nakajima, Masakuni Serizawa, Keiichi Hatakeyama, Sanae Kaji, Makoto Hikage, Masanori Tokunaga, Yutaka Tanizawa, Etsuro Bando, Taiichi Kawamura, Keiichi Ohshima, Kenichi Urakami, Ken Yamaguchi. Comprehensive analysis of gene mutation and expression profiles in neuroendocrine carcinoma of the stomach, 日本胃癌学会、2017

幕内 梨恵、寺島 雅典、楠原 正俊、芹澤 昌邦、畠山慶一、入野誠之、徳永正則、谷澤豊、坂東悦郎、川村泰一、大島啓一、浦上研一、杉浦禎一、絹笠祐介、上坂克彦、中島孝、山口建、胃神経内分泌細胞癌に関する包括的遺伝子検索、日本外科学会、2017年

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

幕内 梨恵 (MAKUUCHI, Rie)  
静岡県立静岡がんセンター・その他部局等・医師  
研究者番号：50723235

##### (2)研究協力者

寺島 雅典 (TERASHIMA, Masanori)  
中島 孝 (NAKAJIMA, Takashi)  
楠原 正俊 (KUSUHARA, Masatoshi)  
浦上 研一 (URAKAMI, Kenichi)  
芹澤 昌邦 (SERIZAWA, Masakuni)  
畠山 慶一 (HATAKEYAMA, Keiichi)