

令和 4 年 6 月 15 日現在

機関番号：32665

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17651

研究課題名(和文)混合型小細胞肺癌の腫瘍進展機構の解明と新たな治療標的の探索

研究課題名(英文) Investigation of tumor progression mechanism for search of therapeutic targets in combined small cell lung cancer

研究代表者

飯田 由子 (IIDA, Yuko)

日本大学・医学部・専修医

研究者番号：60835221

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,600,000円

研究成果の概要(和文)：混合型小細胞肺癌(combined small cell cancer:cSCLC)の症例において、認められた遺伝子変異のほとんどが各組織型成分で共通していることを確認した。また遺伝子発現解析において、Achaete-scute homolog like 1 (ASCL1)の発現がNSCLC成分においてSCLC成分に比べ低値であった。cSCLCの各組織型成分は遺伝子変異の背景が共通していることから、共通の前駆細胞から起源していると考えられ、さらに各組織型成分は、獲得された遺伝子変異の違いによるのではなく、ASCL1の発現の違いによって分化していく可能性が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

混合型小細胞肺癌(combined small cell lung cancer:cSCLC)は治療効果が乏しく予後不良な疾患である。cSCLCに対する効果的な治療法の開発は急務であるが、cSCLCの分子生物学的特徴は現在まで十分に分かっていない。本研究では、cSCLC症例の組織検体を用いて、cSCLCに含まれる各組織型部位のタンパク発現、遺伝子発現、遺伝子変異の蓄積状況を解析し、cSCLCの分子生物学的特徴を明らかにすることを目的とした、本研究の成果は、予後不良なcSCLCの効果的な治療法を検討する上で、意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In genetic mutation analysis, the same major somatic mutations were shared in the different histological component of combined small cell cancer (cSCLC). The gene expression analysis showed Achaete-scute homolog like 1 (ASCL1) expression was significantly lower in the NSCLC component than in the SCLC component. This study showed that each histological component of cSCLC may be originated from common precursor cells because of common genetic background. And this study suggest differentiation of heterogeneous histological components in cSCLC may be associated with the difference in ASCL1 expression level, not in acquired somatic gene mutations.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：small cell lung cancer ASCL1 次世代シーケンシング heterogeneity somatic mutations

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌は2017年の死亡者数が7万人を超える日本で最も多い癌死の原因であり、より効果的な治療法の開発が急務である。肺癌は小細胞肺癌 (SCLC) と非小細胞肺癌 (NSCLC) に分類される。NSCLC は近年、上皮成長因子受容体 (EGFR) 遺伝子変異や anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子などの様々な治療標的分子が発見され¹⁾、これらに対する特異的阻害薬の開発により治療の個別化が可能となった。しかし、SCLC は特異的な治療標的分子が発見されていないため、予後の改善が進んでいない。

SCLC は病理組織学的に神経内分泌癌の一種で、単一の組織型からなる pure SCLC と、同一組織内に腺癌や扁平上皮癌などの NSCLC の混在を認める cSCLC に分類される。cSCLC は報告例が少なく、その特性は不明な点が多い。現在、SCLC において、cSCLC と pure SCLC は組織型の違いに関わらず同様の治療が施行されているが、その治療効果は異なっており、cSCLC はさらに予後不良であることが知られている²⁾。現在の診療上の取扱いでは、cSCLC は SCLC に含まれているが、pure SCLC と比較して、腫瘍進展機構が異なるために予後や治療効果が異なっているのではないかという点が本研究の核心である。

これまで SCLC の腫瘍進展機構として、NOTCH シグナル不活性化を介した、転写因子 Achaete-scute homolog like 1 (ASCL1) の発現が、SCLC の神経内分泌分化や腫瘍発生や増殖に必要であると報告されてきた³⁾。また ASCL1 の発現は、癌抑制遺伝子である網膜芽細胞腫 1 (RB1) 遺伝子変異を誘導し、SCLC の腫瘍形成に重要であることが報告されている⁴⁾。

現在まで、pure SCLC において以上を含む腫瘍進展機構が報告されているが、cSCLC では様々な組織型の成分を含むことから、より複雑な腫瘍進展機構が考えられ、さらに異なるタンパク発現や遺伝子変異の蓄積が考えられる。

2. 研究の目的

本研究では、様々な組織型成分を含む cSCLC の複雑な腫瘍進展機構に注目し、cSCLC に含まれる各組織型について (SCLC 成分、NSCLC 成分) それぞれの組織型毎に遺伝子変異、遺伝子発現について検討し、pure SCLC との違いを比較することで、cSCLC の分子生物学的特徴を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 組織型的多様性の検討: cSCLC の各組織型成分において、免疫組織学的に、組織型の多様性に関わる因子について検討した。

・2010年1月1日から2018年12月31日までに日本大学医学部附属板橋病院で SCLC と診断され、臨床情報に不備のない症例を選定し、ヘマトキシリン・エオジン染色された病理組織標本を評価し、cSCLC を選定した。

・ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織を 4 μm に薄切し、SCLC マーカー (CD56, synaptophysin, chromogranin A) や、SCLC との関係が知られている RB1, ASCL1, brain-2 (BRN2), nuclear factor 1 B (NF1B), insulinoma-associated protein 1 (INSM1), thyroid transcription factor-1 (TTF-1) などの免疫組織化学検査を各組織型毎に行い、各タンパク発現の有無や強度などについて各組織型成分において評価した。

(2) 腫瘍進展に関する検討: cSCLC の腫瘍進展機構を解明するため、各組織型成分において以下を検討した。

・組織型成分毎に DNeasy FFPE Kit, RNeasy FFPE Kit (Qiagen) により DNA, RNA を抽出した。

・RNA より cDNA 合成, Taqman プローブを用いた RT-PCR (Thermo Fisher Scientific) を行い ASCL1, BRN2, NF1B, INSM1 などの SCLC に関連する遺伝子発現を組織型毎に評価した。さらにそれらの発現について、pure SCLC と比較を行った。

・DNA より QIaseq Targeted DNA Human Lung Cancer Panel (QIAGEN) を用いた次世代シーケンサー (NGS) で癌特異的遺伝子変異 (体細胞遺伝子変異のみを対象とする) の蓄積状況について解析を行った。NGS で得られた遺伝子変異について、サンガーシーケンスで確認を行った。

4. 研究成果

(1) 対象症例として、免疫組織学的検査を行い、5例の cSCLC (1例の異時性 SCLC を含む)、6例の pure SCLC を選定した。cSCLC において、SCLC 成分で NSCLC 成分より有意に SCLC マーカーである synaptophysin, CD56, ASCL1, INSM1 の陽性率が高く、Ki67 指数が高いことが認められた。

FFPE 組織より各組織型成分ごとに DNA を抽出し、量と質が十分であった 4例の cSCLC について、組織型成分毎の癌特異的体細胞遺伝子変異について、NGS 検査を行った。対象症例において、

9つの遺伝子 (*EGFR*, *RB1*, *TP53*, *MUC16*, *SMARCA4*, *KDR*, *PKHD1*, *KMT2D*, *RBM10*) で合計 17 の変異が見つかり、各症例において大部分の遺伝子変異が SCLC 成分と NSCLC 成分で共通していることが認められた。cSCLC の各組織型で最も多く共通して認められた遺伝子変異は、*TP53* 遺伝子変異であり、次いで *EGFR* 遺伝子変異であった。*EGFR* 遺伝子と *RB1* 遺伝子において pathogenic somatic mutations が認められ、*TP53* 遺伝子において、pathogenic/likely pathogenic somatic mutation が認められた。

さらに FFPE 組織より抽出した RNA 量と質が十分であった 4 例の cSCLC と 6 例の pure SCLC について、quantitative RT-PCR 解析を行った。cSCLC の各組織型成分間において、*BRN2*, *NF1B*, *TTF-1*, *INSM1* の発現レベルに有意な違いは認められなかったが、SCLC 成分よりも NSCLC 成分で *ASCL1* mRNA 発現レベルが有意に低く、また cSCLC よりも pure SCLC で *ASCL1* の発現レベルが高い傾向が認められた。

(2)本研究では、cSCLC の各症例で、SCLC 成分と NSCLC 成分において、大部分の遺伝子変異の共通が認められた。一方で、NSCLC 成分において、SCLC 成分と比較して *ASCL1* 発現が有意に低値であることが示された。

本研究の結果より、cSCLC の各組織型成分は同じ遺伝的背景を有していることから、それらが同じ祖先細胞から発生している可能性が考えられた。また本研究において SCLC 成分、NSCLC 成分の間で最も多く共有が認められた遺伝子変異は *TP53* 遺伝子変異であった。また、*RB1* 遺伝子変異の共有も認められた。*TP53* と *RB1* の遺伝子変異は pure SCLC でそれぞれ約 90%、65% に認められるとされ⁵⁾、pure SCLC の癌化に必須であるとされている。cSCLC のそれぞれの組織型でそれらの遺伝子変異が共通して認められたことから、cSCLC の細胞起源は、NSCLC よりも pure SCLC に近い可能性が示唆された。以上より、本研究では cSCLC は pure SCLC に近い細胞起源を有し、各組織型成分はそれぞれの成分が独立して発生したものでなく、同一の細胞起源から発生した可能性があることが示された。

一方、遺伝子発現検査において、cSCLC の NSCLC 成分で SCLC 成分より *ASCL1* の発現が有意に低いことが示された。前述した遺伝子変異解析の結果で cSCLC の異なる組織型成分の体細胞遺伝子変異は共通していることから、体細胞変異の蓄積の違いがそれぞれの組織型の腫瘍進展に関わっているのではなく、*ASCL1* の発現の違いが各組織型成分の腫瘍進展に関わっている可能性が示唆された。

また、cSCLC の各組織型成分で *EGFR* 遺伝子変異の共有が認められた。現在 *EGFR* チロシンキナーゼ阻害薬 (*EGFR*-TKI) による治療は *EGFR* 遺伝子変異を有する NSCLC に行われているが、本研究の結果より、治療選択肢の少ない cSCLC においても *EGFR* 遺伝子変異検査や *EGFR*-TKI による治療の有用性について検証する必要があると考えられた。

本研究の結果についてまとめた論文を現在投稿中である。

参考文献：

- 1.Hirsch FR, Scagliotti GV, Mulshine JL, Kwon R, Curran WJ, Jr., Wu YL, et al. Lung cancer: current therapies and new targeted treatments. *Lancet* (London, England). 2016.
- 2.Zhao X, McCutcheon JN, Kallakury B, Chahine JJ, Pratt D, Raffeld M, et al. Combined Small Cell Carcinoma of the Lung: Is It a Single Entity? *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer*. 2018;13(2):237-45.
- 3.Demelash A, Rudrabhatla P, Pant HC, Wang X, Amin ND, McWhite CD, et al. Achaete-scute homologue-1 (ASH1) stimulates migration of lung cancer cells through Cdk5/p35 pathway. 2012;23(15):2856-66.
- 4.Meder L, Konig K, Ozretic L, Schultheis AM, Ueckerth F, Ade CP, et al. NOTCH, ASCL1, p53 and RB alterations define an alternative pathway driving neuroendocrine and small cell lung carcinomas. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2016;138(4):927-38.
- 5.George J, Lim JS, Jang SJ, Cun Y, Ozretic L, Kong G, et al. Comprehensive genomic profiles of small cell lung cancer. *Nature*. 2015;524(7563):47-53.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 飯田由子, 中西陽子, 高橋典明, 清水哲男, 増田しのぶ, 権寧博
2. 発表標題 混合型小細胞肺癌における臨床病理学的特徴の検討
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yuko Iida, Yoko Nakanishi, Noriaki Takahashi, Tetsuo Shimizu, Shinobu Masuda, Yasuhiro Gon
2. 発表標題 Clinicopathological Characteristics of Combined Small-Cell Lung Cancer
3. 学会等名 IASLC 2020 第21回世界肺癌学会議
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 飯田由子, 高橋典明, 中西陽子, 清水哲男, 増田しのぶ, 権寧博
2. 発表標題 混合型小細胞肺癌における組織学的多様性に関する臨床病理学的検討
3. 学会等名 第60回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2019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
---------	---------