

令和 5 年 5 月 22 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K18213

研究課題名(和文) 新たな亜型分類に基づく肺高悪性度神経内分泌癌の新規予後マーカー探索と個別化治療確立

研究課題名(英文) Search for new prognostic markers and establishment of personalised treatment for pulmonary high-grade neuroendocrine carcinoma based on a new subtype classification

研究代表者

神保 直江 (Jimbo, Naoe)

神戸大学・医学部附属病院・特命助教

研究者番号：00773772

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：小細胞癌とLCNECに対して、免疫染色ベースの分子分類(ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1)を行い、臨床病理学的要素との相関を調べた。POU2F3陽性小細胞癌とPOU2F3陽性LCNECでは細胞組織学的特徴が近寄るという結果が得られ、POU2F3陽性癌は、TTF-1、神経内分泌マーカーが有意に低く、bcl-2、c-kitの発現が有意に高いことがわかった。さらにPOU2F3陽性癌は、POU2F3陰性癌と比べて、有意に予後良好であった。POU2F3陽性癌には、臨床病理学的な独立性があり、この特殊なタイプを同定することは、最適な個別化治療を考慮する上で、重要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

分子分類(ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1)は、元来、小細胞癌において提唱された分類方法であったが、LCNECでも当てはめることができることが示唆されたほか、小細胞癌とともにLCNECと同時に検討したことで、POU2F3の独自性を見出すことができた。分子分類と形態の相関を見出したシリーズでの研究報告としては世界初であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Immunostain-based molecular classification (ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1) was performed on small cell carcinoma and LCNEC and correlated with clinicopathological factors. POU2F3-positive small cell carcinoma and POU2F3-positive LCNEC showed overlapping in cytohistological features. Additionally, POU2F3-positive carcinoma showed significantly higher expression of TTF-1, neuroendocrine markers, and significantly lower expression of bcl-2 and c-kit. Furthermore, POU2F3-positive carcinoma had a significantly better prognosis than POU2F3-negative carcinoma. POU2F3-positive carcinoma have clinicopathological independence, therefore the identification of this particular type is important when considering optimal personalised treatment.

研究分野：肺癌

キーワード：POU2F3 小細胞癌 LCNEC 分子分類 神経内分泌癌 tuft cell

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 肺の神経内分泌癌(以下 NEC)は小細胞癌と大細胞神経内分泌癌(以下 LCNEC)から成る。肺癌全体の 15~20%程度を占める代表的な癌であるが、一般的に進行が早く、飛躍的に治療・予後が改善した腺癌・扁平上皮癌に比べて、予後不良状態が続いている。小細胞癌と LCNEC の基本的な治療方法は異なっており、小細胞癌は手術適応が極めて限局的であるが、LCNEC は非小細胞癌に準じた治療が推奨されており手術適応が広い。ただ LCNEC は臨床経過や化学療法感受性に個人差が見られ、治療方針に迷うことも多い。病理学的には、小細胞癌と LCNEC は主に細胞・組織の形態学的所見で鑑別するが、鑑別困難な症例も多い。
- (2) 2018 年頃より、LCNEC は遺伝子異常によって小細胞癌型、非小細胞癌型など 2~3 の亜型に細分化されるという報告や、形態学的所見に基づく小細胞癌、LCNEC という亜型分類と比較して遺伝子発現パターンに基づく亜型分類の方がより強く臨床経過を反映するという報告が散見された。これらの事実を踏まえると、小細胞癌と LCNEC は完全に別個の集団でなく、病理学的、臨床的、遺伝子学的な重なりが想定され、肺 NEC 全体において、遺伝子異常に基づく亜型に再分類したうえで新規予後マーカー創出が望まれる。

### 2. 研究の目的

肺の NEC(小細胞癌および LCNEC)を遺伝子異常によって適切に細分化・整理し、細分化した組織亜型ごとに、新規予後マーカーを同定する。これにより適切な個別化治療の構築、予後の改善、予後の予測を可能にすることが目的である。

### 3. 研究の方法

研究を始めて以降、小細胞癌は 4 つの因子(ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1)の発現により 4 タイプに、LCNEC は主に Rb1 の不活性化の有無で非小細胞癌型と小細胞癌型の 2 タイプに分類することが提唱され(文献 1)、この考えは、肺 NEC の分子分類として受け入れられつつある。小細胞癌における分子分類は免疫染色でも再現可能であり、小細胞癌及び LCNEC に対して、ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1 の免疫染色を行い、臨床病理学的要素との相関を調べた。後述の通り、POU2F3 陽性 NEC が POU2F3 陰性 NEC と比べて、有意に予後が良好であることがわかった。分子分類そのものが予後と関連しており、当初予定していた亜型ごとに予後マーカーを選出する必要性が低いこと、また亜型ごとの予後マーカー選出には当初予定していた症例数では足りないことが予想されるため、当初予定していた、亜型ごとの予後マーカー選出については見送ることとし、POU2F3 陽性癌の特徴を多様な側面から、検証することに焦点を当てることとした。

- (1) 肺 NEC 手術症例 146 例について改めて HE 標本を 2 人の病理医によりそれぞれ見直して、小細胞癌か LCNEC かを決定する。判断が分かれた症例については、2 人の討議により、小細胞癌か LCNEC に決定する。
- (2) それぞれの症例について、以下の免疫染色を施行する。  
ASCL1, NEUROD1, POU2F3, YAP1, 古典的神経内分泌マーカー(Synaptophysin, chromogranin A, CD56, INSM-1), TTF-1, c-kit, bcl-2, c-myc, p40, CK5/6, Rb1
- (3) 免疫染色による分子分類の決定  
ASCL1, NEUROD1, POU2F3 の中で、最も発現が高く、かつ IHC-score(以下参照)が 50 以上の分子を優勢タイプと定義する。  
IHC-score: 染色強度(0, 1, 2, 3)と染色強度の染色面積(0-100%)として、(染色強度 1 の領域の染色面積) $\times$ 1+(染色強度 2 の領域の染色面積) $\times$ 2+(染色強度 3 の領域の染色面積)と定義される。
- (4) 146 例に対して、細胞学的スコア、特異的組織所見(以下)の程度を評価する。  
細胞学的スコア(0-12): 核の大きさ、核の鑄型形成、クロマチンパターン、縦横比、細胞質、核小体の 6 項目について、小さい値が小細胞癌らしくなるよう、それぞれ 0, 1, 2 でスコア化する。  
特異的組織所見: 腫瘍間質の広さ、胞巣形成の程度について 0, 1, 2 でスコア化する。コメド壊死、気管支上皮内進展、背景肺の線維化の有無について 0, 1 でスコア化する。
- (5) 予後、臨床病理学的要素との相関、他の免疫染色マーカー発現との相関を検索する。

## 4. 研究成果

### (1) 患者構成

肺 NEC146 例は、2 人の病理医のレビューにより、95 例が小細胞癌、51 例が LCNEC と判断された。16 例 (11%) は、2 人の病理医による判断が分かれ、討議を要した。免疫染色の優勢発現パターンにより、POU2F3 陽性小細胞癌、POU2F3 陰性小細胞癌、POU2F3 陽性 LCNEC、POU2F3 陰性 LCNEC は、それぞれ、24, 71, 14, 37 例であった。

### (2) POU2F3 陽性 NEC の臨床学的特徴

POU2F3 陽性 NEC の患者は、POU2F3 陰性 NEC の患者と比べて、有意に喫煙指数が高いという結果が得られた。(p=0.02)

POU2F3 陽性小細胞癌の患者は、POU2F3 陰性小細胞癌に比べて、有意に Stage I の患者の割合が高かった。(p=0.02)

非小細胞癌との混合型 NEC の割合については、POU2F3 陽性群と陰性群で有意差がなかったが、POU2F3 陽性混合型 NEC の 8 例は全て扁平上皮癌を有していたが、POU2F3 陰性混合型 NEC では 40 例中 20 例に扁平上皮癌の成分が認められた。

### (3) POU2F3 陽性 NEC の予後

無再発生存率について、POU2F3 陽性 NEC は POU2F3 陰性 NEC と比べて、有意に予後良好であった(p=0.026)。全生存率については、POU2F3 陽性 NEC と POU2F3 陰性 NEC の間に有意差はみられなかった。

### (4) POU2F3 陽性 NEC の病理形態学的特徴

#### 細胞学的スコア

POU2F3 陽性小細胞癌と POU2F3 陰性小細胞癌、POU2F3 陽性 LCNEC と POU2F3 陰性 LCNEC の間には有意な差がみられたが(p<0.001)、POU2F3 陽性 NEC と POU2F3 陰性 NEC の間には、有意差は見られなかった。POU2F3 陽性小細胞癌と POU2F3 陽性 LCNEC の間にも有意差は見られたが(p<0.001)、分布に重なりが見られた。

このことから、POU2F3 陽性小細胞癌と POU2F3 陽性 LCNEC では細胞組織学的特徴が近寄ることが示唆された。

#### 特異的組織所見

POU2F3 陽性 NEC では、POU2F3 陰性 NEC に比べて、より広い腫瘍間質、より顕著な胞巣形成を示していた。(それぞれ p<0.001, 0.01)

POU2F3 陽性 NEC では 50%の症例に気管支上皮内進展が見られ、POU2F3 陰性 NEC に比べて有意に頻度が高かった。(p<0.001)

背景肺の線維化については、POU2F3 陽性 NEC では POU2F3 陰性 NEC に比べて、有意に頻度が低かった。(p=0.007)

小細胞癌か LCNEC かの鑑別を要した 16 症例のうち 10 例が NEC-P であった。

### (5) POU2F3 陽性 NEC の免疫組織化学的特徴

POU2F3 陽性 NEC は、POU2F3 陰性 NEC に比べて、TTF-1, 神経内分泌マーカーが有意に低く、bcl-2, c-kit, c-myc の発現が有意に高いことがわかった。これらの発現パターンは、tuft cell の発現パターンとも類似し、POU2F3 陽性癌が tuft cell-like 癌であるとする最近の既報とも一致する結果であった。また、低値ではあったものの、POU2F3 陽性 NEC は、POU2F3 陰性 NEC に比べて p40, CK5/6 など、いわゆる扁平上皮マーカーの発現が高く、POU2F3 陽性 NEC では、神経内分泌と扁平上皮への 2 つの系統への分化が示唆された。

以上の通り、POU2F3 陽性 NEC には、多数の面で臨床病理学的な独立性があることが示唆され、多くの POU2F3 陽性 NEC は、小細胞癌と LCNEC の中間的な細胞組織学的特徴を示すことがわかった。また、特徴的な発現パターンからは、通常の NEC とは違った治療反応が想定され、この特殊なタイプを同定することは、最適な個別化治療を考慮する上で、重要であると結論づけた。

### < 引用文献 >

Rudin CM, Poirier JT, Byers LA, et al. Molecular subtypes of small cell lung cancer: a synthesis of human and mouse model data. *Nat Rev Cancer*. 2019;19:289-297.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3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 Minami Kazuhiro, Jimbo Naoe, Tanaka Yugo, Ogawa Hiroyuki, Hokka Daisuke, Nishio Wataru, Yoshimura Masahiro, Itoh Tomoo, Maniwa Yoshimasa	4. 巻 1
2. 論文標題 Insulinoma associated protein 1 is a prognostic biomarker in pulmonary high grade neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 1-11
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/jso.25960	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 -

1. 著者名 Minami Kazuhiro, Tanaka Yugo, Ogawa Hiroyuki, Jimbo Naoe, Nishio Wataru, Yoshimura Masahiro, Itoh Tomoo, Maniwa Yoshimasa	4. 巻 10
2. 論文標題 Neuroendocrine marker staining pattern categorization of small sized pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Thoracic Cancer	6. 最初と最後の頁 2152 ~ 2160
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/1759-7714.13202	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 Koyama K, Katsurada N, Jimbo N, Tachihara M, Tamura D, Nakata K, Nagano T, Yamamoto M, Kamiyo H, Kobayashi K, Itoh T, Nishimura Y	4. 巻 69
2. 論文標題 Overexpression of CD 133 and BCL-2 in non-small cell lung cancer with neuroendocrine differentiation after transformation in ALK rearrangement-positive adenocarcinoma.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Pathology international	6. 最初と最後の頁 294-299
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pin.12782.	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1件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 神保直江
2. 発表標題 分子分類を想定した肺神経内分泌癌の病理診断
3. 学会等名 第111回日本病理学会総会
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
---------	---------