

機関番号：72602

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590358

研究課題名 (和文) 肺神経内分泌癌の網羅的解析による疾患概念の整理と臨床診断への応用

研究課題名 (英文) Comprehensive analysis of pulmonary neuroendocrine carcinoma,
Evaluation of pathologic classification and application for
clinical diagnosis

研究代表者

元井 紀子 (MOTOI NORIKO)

財団法人癌研究会・癌研究所病理部・研究員

研究者番号：70292878

研究成果の概要 (和文)：

目的：肺神経内分泌腫瘍の正確な診断と治療のために、神経内分泌分化を示す肺癌の遺伝子、蛋白発現プロファイルを解析し、病理学的疾患単位の再検討、診断、治療指標に有用な指標の解明を行う。

方法：肺癌のなかで神経内分泌分化を示す癌の遺伝子発現およびタンパク発現、メチル化状態に関して網羅的手法を用いて解析し、組織像、臨床病理学的特徴、予後との関係を解析した。

結果：神経内分泌腫瘍は、従来、臨床病理学的、形態学的に高悪性度と低悪性度の大きく 2 分類されているが、遺伝子発現解析でも同様に大きく 2 群に分類できた。発現遺伝子のなかから、ASCL1 などの神経内分泌分化に特徴的な遺伝子群が抽出でき、リアルタイム PCR、免疫染色でその発現を確認した。非神経内分泌癌のなかで神経内分泌マーカーが発現している群は、神経内分泌腫瘍とは異なるプロファイルを示した。神経内分泌マーカーの発現のある群はない群と比較すると、組織学的に低分化で増殖能が高い傾向があった。ASCL1 のメチル化状態は有意な差がなかった。

今後の課題：神経内分泌分化の程度を反映する有効な指標の閾値や組合せについて、臨床的意義のある基準を定める必要がある。基準の妥当性については、今後さらに検討する必要がある。神経内分泌分化調整機構については、さらに研究が必要と考えられる。

研究成果の概要 (英文)：

Background: The underlying oncogenic molecular alterations can influence the clinical features and phenotypes of lung cancer. Pulmonary neuroendocrine tumors include various histologic categories; high grade neuroendocrine tumor (HGNET) (e. g. small cell carcinoma (SCLC) and large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC)), low grade NET (LGNET, e. g. typical and atypical carcinoid). It is still controversial whether non-small cell lung carcinoma (NSCLC) with neuroendocrine (NE) morphology or with NE phenotype should be included to NET or not. The goal of this study is to clarify the genetic and immunohistochemical profiling of pulmonary neuroendocrine tumors and to evaluate the clinicopathologic relevance of each tumor category, including NSCLC with NE features and with NE phenotypes, and to investigate new candidate for diagnosis and therapy.

Methods: Surgically resected lung cancers, including HGNET and LGNET, 5 NSCLC with NE-morphology (NS-NEm), NSCLC with NE-phenotype (NS-NEp), and NSCLC, were examined. Comprehensive gene expression analysis was done using Affymetrix U133A-plus2. Out of differentially expressed NE-related genes, expression levels of selected genes (ASCL1, CDH2, NeuroD1, etc.) were examined by quantitative realtime-PCR (qRTPCR) and by QuantiGene Assay (QG). Protein expressions of neuroendocrine markers were examined by immunohistochemistry (IHC) using tissue microarray (TMA) of formalin-fixed paraffin-embedded materials. Methylation status of ASCL1 promoter region in NET was also examined.

Results: Molecular profile revealed that HGNET and LGNET were differentially clustered. Among HGNET, SCLC and LCNEC showed similar mRNA expression profile of examined neuronal differentiation, cell proliferation and apoptosis related genes. LGNET showed different profile to both HGNET and NSCLC. NS-NEm and NS-NEp showed very low level of NE marker genes, but high level of KI67 and Survivin expressions. IHC expression levels of ASCL1 and KI67 (MIB1) were correlated well with mRNA expression levels of each gene. No difference of methylation status of ASCL1 gene in NET was revealed.

Conclusions: Both SCLC and LCNEC could be categorized as a high grade neuroendocrine tumor (HGNET) from a molecular stand point. In contrast, gene expression profile of SC-NEm and NS-NEp showed different from that of HGNET. ASCL1 could be used as neuronal differentiation markers for clinical differential diagnosis. On the methylation point of view, no difference was detected between NET and other lung cancer. Further examination will be needed to clarify the mechanism of neural gene expression in NET and criteria of NE differentiation marker for practical use.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2008年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 800,000 | 240,000 | 1,040,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肺癌、神経内分泌癌、小細胞癌、大細胞神経内分泌癌、網羅的発現解析、分子病理診断、遺伝子発現解析、免疫染色

1. 研究開始当初の背景

肺癌発生数は年々増加し、現在、部位別発生数は第一位である。本研究の対象とする神経内分泌腫瘍は、神経内分泌細胞への分化を示す腫瘍で、高悪性度である小細胞癌 (Small cell carcinoma, SCLC)、大細胞神経内分泌癌 (large cell neuroendocrine carcinoma, LCNEC)、低悪性度である定型的カルチノイド腫瘍、異型カルチノイド腫瘍に大別されている。高悪性度神経内分泌癌は、肺癌の中でも特に予後不良である。SCLCは、化学療法に感受性があるため、治療の第一選択は化学療法であるが、進行が早く生命予後は悪い。一方 LCNEC は、1991年に W. Travis らにより疾患名が提起された比較的新しい疾患概念であるが、治療選択については、十分な臨床試験のデータがなく、未だ統一見解がなかった。

申請者の研究では、肺癌症例を Retrospective に再検討し、腺癌と診断されていたうちの約 10%程度は、現在の基準では LCNEC とすべき症例であった (Motoi et al. 2005, 2006, 2007)。興味深いことに、再検討により LCNEC と分類された症例は、通常の肺腺癌に比べて臨床予後が不良であり、LCNEC を正しく診断する必要性が再確認した。これまでに LCNEC は SCLC と類似した臨床病理学的特徴があることや、遺伝子発現解析では両者を区別することができないという報告があるよう (Ishikawa et al. 2004) に、生物学的には類似した疾患単位と考えられる。SCLC と同様に化学療法感受性が高い可能性があり、NSCLC の中で LCNEC を正しく診断する必要性は高い。また、以下に述べるように、神経内分泌分化をどのように捉えるかという問題は、患者予後予測および治療法の選択のために、解明されるべき課題である。

神経内分泌腫瘍の問題点として、病理診断の面からは大きく3つの点があげられる。

第一には、診断のために電子顕微鏡あるいは免疫組織化学的染色による神経内分泌系細胞への分化を証明することが必須であるが、特異性、精度ともに単独で十分といえる良いマーカーが確立されていないことがあげられる。どのような形態学的特徴や表現型を神経内分泌分化ととらえるべきなのか、形態学と生物学的分化マーカーとの関係を明確にし、実用的かつ有用な指標が定義されるべきである。

第二には、肺腺癌、扁平上皮癌などと移行するいわゆる Combined carcinoma 症例や、形態学的には神経内分泌系腫瘍の分化を疑わせるが、従来の神経内分泌マーカーが陰性である症例や、形態学的には通常の NSCLC であるが神経内分泌マーカーのみが陽性である症例など分類困難症例が存在することである。このような腫瘍の生物学的位置づけが不明であるが、一部は SCLC と同様の化学療法が有効である可能性がある。

第三には、サブグループ間の鑑別診断が難しい症例が存在すること、特に SCLC と LCNEC の鑑別が難しく、2004 年改訂 WHO 分類では、LCNEC は大細胞癌という NSCLC の一亜型に分類されているが、現状では治療法が異なるため大きな問題点といえる。

近年の分子生物学分野における high throughput 技術の進歩に伴い、ゲノム、タンパクなどの発現における網羅的研究が急速に普及している。莫大な情報量が蓄積されており、新たな予後マーカーの抽出や新規遺伝子異常の発見などが報告されている。また、臨床的予後を予測するアルゴリズムの構築など多方面での精力的な研究が行われている。

肺癌では、2000 年以降複数のグループから組織型と網羅的発現解析との相関があることが報告されているが、再現性が得られにくいなど問題点も指摘されている。申請者らは、肺腺癌における網羅的遺伝子発現プロファイルによる亜分類について研究し、病理形態学的亜型分類、臨床病理学的特徴、既知の EGFR, KRAS 遺伝子変異プロファイルと関連した Cluster を抽出できることを報告した。また、Bhattacharjee A ら、Garber ME らも報告しているように、肺腺癌の発現プロファイルによる亜分類

の中には、神経内分泌分化に関わる遺伝子の発現をみるグループを含むものが多く報告されている。申請者らの研究の結果から、本来 LCNEC と診断されるべき症例が混在している可能性があると思われる。

2. 研究の目的

肺神経内分泌腫瘍の正確な診断と治療のために、神経内分泌分化を示す肺癌の遺伝子、蛋白発現プロファイルを解析し、病理学的疾患単位の再検討、診断、治療指標に有用な指標の解明を行うことが研究の目的である。

3. 研究の方法

1). 肺神経内分泌系分化を示す腫瘍の病理学的再検討

癌研に蓄積された肺癌手術症例 (2500 例以上) から、神経内分泌腫瘍 (NET) を収集し、病理組織学的再検討を行う。対象症例は、大細胞神経内分泌癌 (LCNEC)、小細胞癌 (SCLC)、定型的カルチノイド腫瘍 (TC)、異型カルチノイド腫瘍 (AC)、神経内分泌系マーカー陽性の非小細胞癌 (non-SCLC with neuroendocrine phenotype, NSCLC-NE phenotype)、神経内分泌系形態を示すがマーカー陰性の非小細胞癌 (non SCLC with neuroendocrine morphology, NSCLC-NE morphology) および NSCLC と神経内分泌癌の両者が存在する癌 (combined NSCLC and NE tumor, combined NSCLC-NE tumor) とする。選別された症例の病歴から、臨床病理学的事項、すなわち年齢、性別、喫煙歴、家族歴、他部位癌の有無、臨床病期、治療方法、治療反応性、予後などについて検索する。

2). 臨床症例を用いた網羅的遺伝子発現解析による神経内分泌マーカーの抽出

cDNA microarray による遺伝子発現プロファイルの検索

遺伝子発現解析アレイ Affymetrix U133A-plus2 を用いて発現プロファイル検索を行う。対象は上記で抽出させた神経内分泌腫瘍および関連腫瘍である。発現解析の結果、疾患間で発現に差のある遺伝子を抽出し、以下の解析を行った。

3). 臨床応用可能な診断手法の確立

(1) 候補遺伝子群の realtime PCR による定量的発現検討と日常診断への応用を目標としたパラフィン包埋材料を用いた検討

ASCL1, KLK11 などの遺伝子が神経内分泌マーカーとして有用性が高いことを報告している。ASCL1 は、神経系、神経内分泌系分化の proneural gene であるが、神経内分泌分化のマーカーとして注目されている。凍結標

本に加え、ホルマリン固定パラフィン包埋材料を用いる場合は、発現量を検討する場合に、異常値を示す症例や凍結標本との結果が乖離する症例があることが問題点である。RNA抽出法の工夫や、realtime PCRの方法、プローブなどの条件を工夫し、診断補助の手法を確立できれば、より客観的な指標として用いることが可能であり、これらの条件を検討する。

選択遺伝子についてHGNEC (LCNEC 12, SCLC 5), LGNEC (Carcinoid 3)、NE形態のみを示すNSCLC (NE-mo 12), NE形質陽性NSCLC (NE-ph 2), NSCLC (105)におけるmRNA levelを定量RT-PCR、QuantiGene plex (QGP)で、蛋白発現を免疫染色で検討した。

4). 神経内分泌分化関連遺伝子発現制御の検討

特に有用なマーカーとして期待されるASCL1などの遺伝子発現機構を解明するために、遺伝子プロモーター領域のメチル化状態を検索した。

4. 研究成果

Genechip発現解析では、NECでASCL1, KI67, MCM10, DLL3等の発現が亢進、PPAR γ , SFTPC等が低下していた。mRNA発現解析では、NECとNSCLCは異なる発現Profile、さらにHGNECとLGNECは異なるprofileを示し、発生機序が異なる可能性が示唆されたが、HGNECであるLCNEC, SCLCは区別することができなかった。NE-mo, NE-phはNEマーカーの発現は低く、NSCLCと類似したProfileであったが、細胞増殖能は高く、通常のNSCLCとHGNECの中間的な結果を示し、高悪性度であった。また、ASCL1は免疫染色、定量RT-PCRの結果はよく相関し、臨床的に予後不良な症例で高発現していた。メチル化状態は有意な差は認められなかった。

病理形態学的特徴は遺伝子、蛋白発現の特徴を反映しており、組織型相互の関係が解明された。

発現解析によるNECおよびNE分化を示す肺癌の相互の関係性については、組織学的特徴と遺伝子の傾向が関連し、疾患相互の類似点、相違点を解明した。NEC診断に有用なマーカーとしてASCL1の有用性を評価できた。神経内分泌分化の程度を評価するために最も有用な因子の判定基準やどの因子の組合せで判断することが臨床的に妥当であるかは、今後さらに症例を増やして検討する必要がある。ASCL1の遺伝子発現機序の解明については、検索した範囲では不明であり、さらなる検討が必要である。

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 18件)

1. 元井紀子、石川雄一 肺に発生する神経内分泌腫瘍. 病理と臨床 2011, 29(5) 444-450.
2. Kudo K, Ohyanagi F, Horiike A, Motoi N, et al (16人中8番目). Clinicopathological findings of non-small-cell lung cancer with high serum progastrin-releasing peptide concentrations. Lung Cancer. 2011 (Epub ahead of print)
3. Motoi N, Szoke J, Riely GJ, Seshan VE, Kris MG, Rusch VW, et al. Lung adenocarcinoma: modification of the 2004 WHO mixed subtype to include the major histologic subtype suggests correlations between papillary and micropapillary adenocarcinoma subtypes, EGFR mutations and gene expression analysis. Am J Surg Pathol. 2008 Jun;32(6):810-27.
4. Berger AH, Niki M, Morotti A, Taylor BS, Socci ND, Motoi N, et al. (14人中9番目) Identification of DOK genes as lung tumor suppressors. Nat Genet. 2010 Mar;42(3):216-23.
5. Chitale D, Gong Y, Taylor BS, Broderick S, Brennan C, Motoi N, et al. (17人中9番目) An integrated genomic analysis of lung cancer reveals loss of DUSP4 in EGFR-mutant tumors. Oncogene. 2009 Jun 15;28:2773-83.
6. Shedden K, Taylor JM, Enkemann SA, Tsao MS, Yeatman TJ, Motoi N, et al. (39人中30番目) Gene expression-based survival prediction in lung adenocarcinoma: a multi-site, blinded validation study. Nat Med. 2008 Aug;14(8):822-7.

[学会発表] (計 65件)

1. Motoi N, Hamanaka W, Nagano H, Nomura K, Oba H, Inamura K, et al. Genetic and immunohistochemical profile of pulmonary neuroendocrine tumor. 13th World Conference on Lung Cancer; July31- August 4, 2009; San Francisco, CA, USA: Journal of Thoracic Oncology, 4 (9) Suppl.1; 2009. p. S484.
2. Hamanaka W, Motoi N, Okumura S, Nakagawa K, Nishio M, Horai T, et al. A subset of small cell lung cancer with low expression of neuroendocrine markers links to a good prognosis: a so far unrecognized subtype. 13th World Conference on Lung Cancer; July31- August 4, 2009; San Francisco, CA, USA: Journal of Thoracic Oncology, 4 (9)

Suppl.1; 2009. p. S466.

3. 元井紀子, 濱中和嘉子, 長野裕子, 野村起美恵, 大場岳彦, 稲村健太郎, et al. Neuroendocrine markers and ASCL1

expressions in various histologic types of systemic neuroendocrine tumors. 第69回日本癌学会総会. 2010年9月22-24日. 大阪国際会議場

4. 元井紀子, 長野裕子, 濱中和嘉子, 大場岳彦, 小野宏, 齋藤雄一, et al. 神経内分泌腫瘍の幹細胞性と細胞分化マーカーの発現 (WS5 肺神経内分泌癌の基礎と臨床). 第51回日本肺癌学会. 2010年11月3、4日 広島国際会議場

5. 元井紀子. 神経内分泌腫瘍-特に非神経内分泌臓器における神経内分泌腫瘍-の系統的理解を目的として 肺の神経内分泌腫瘍. 第99回日本病理学会総会. 2010年4月27-29日. 東京、京王プラザホテル

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元井 紀子 (MOTOI NORIKO)

財団法人癌研究会・癌研究所病理部・研究員

研究者番号：70292878

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

石川 雄一 (ISHIKAWA YUICHI)

財団法人癌研究会・癌研究所病理部・部長

研究者番号：80222975

松浦 正明 (MATSUURA MASAOKI)

財団法人癌研究会・がんゲノム研究部・部長

研究者番号：40173794

中川 健 (NAKAGAWA KEN)

財団法人癌研究会・癌研究所・研究員

研究者番号：60085595

西尾 誠人 (NISHIO MAKOTO)

財団法人癌研究会・癌研究所・研究員

研究者番号：00281593

下地 尚 (SHIMOJI TAKASHI)

財団法人癌研究会・ゲノムセンター・研究員

研究者番号：40370150