

令和6年度 TR 事業研究奨励助成金  
研究成果報告書

2026年5月11日提出

公益財団法人 がん研究振興財団  
理事長 堀田 知光 殿

報告者氏名：吉川 良平

研究課題：高悪性度肺神経内分泌腫瘍のサブグループ化と ATR 阻害剤を用いた新規治療法の開発

研究期間： 自 令和6年7月30日  
至 令和8年3月31日

研究指導者：氏名 大瀧 容一

公益財団法人 がん研究振興財団

## (1) 期間中の研究について

### 1) 要旨

高悪性度肺神経内分泌腫瘍(HGNEC)は高い増殖能・転移能を有する極めて予後不良の肺癌であり、治療は過去約40年間大きな進歩がない。多くの症例でTP53およびRB1の欠失を認め、DNA損傷応答における脆弱性が示唆されている。本研究では、転写因子発現に基づくサブグループ分類に着目し、DNA損傷応答を標的とした新規治療の可能性を検討した。臨床切除検体を用いた免疫組織化学染色の結果、ASCL1およびNEUROD1発現例が多数を占め、主要サブグループであることが明らかとなった。これらに着目した解析では、ASCL1/NEUROD1二重陽性例が無病生存期間および全生存期間の有意な予後不良因子であった。次にATR阻害剤に対する感受性を検討したところ、HGNEC細胞株はいずれも非小細胞肺癌と比較して高感受性を示し、特に神経内分泌系の特徴を有するASCL1およびNEUROD1サブグループで顕著であった。さらにin vivoにおいても同サブグループで有意な抗腫瘍効果を確認した。RNA-seqによる網羅的解析では明確な感受性規定因子の同定には至らなかったが、神経内分泌分化に関与する分子Xに着目した解析により、ATR阻害剤投与により特に非神経内分泌系の特徴を有するPOU2F3サブグループで分子X発現が上昇することが明らかとなった。以上より、ATR阻害剤は主要サブグループに対して単剤でも有効である可能性が示されるとともに、非神経内分泌系サブグループでは分子Xを標的とした治療との併用による新規治療戦略の可能性が示唆された。

### 2) 序

原発性肺癌は日本におけるがん死亡の第一位を占める疾患であり、その中で、小細胞肺癌と大細胞神経内分泌腫瘍を含むHGNECは全体の約15-20%を占める。発見時にすでに進行例が多く、早期に転移や再発を起し、化学療法や放射線療法などを用いても短期間で耐性を獲得する。その結果、5年生存率は10%未満と極めて予後不良であり、20年以上にわたり治療内容の大きな進歩がない(J Thorac Oncol. 2023;18:31-46、J Thorac Oncol. 2012;7:866-72)。非小細胞肺癌(NSCLC)では分子標的薬や免疫療法による治療成績向上がみられるのに対し、HGNECは「最も治療開発が遅れているがん種」の一つである。近年のマルチオミクス解析により、多くの症例で腫瘍抑制遺伝子TP53およびRB1が欠失しており(Nature. 2015;524:47-53)、細胞周期制御を失った腫瘍細胞はDNA損傷応答(DDR)、特にATR経路に依存して生存していることが明らかとなった(Mol Cell. 2015;60:547-60)。さらに、ASCL1・NEUROD1・POU2F3・YAP1といった転写因子の発現に基づくサブグループ分類が提唱され、腫瘍生物学的差異との関連が示唆されている(Nat Rev Cancer. 2019;19(5):289-297)。しかし、実臨床検体に基づいたサブグループの頻度・臨床病理学的背景・予後の解析は乏しく、またサブグループごとの治療戦略は未だ確立されていない。特に、転写因子は腫瘍の性質を規定する中核分子である一方で、薬剤による直接的な標的化が困難であることが大きな障壁となっている。このため、分子サブグループ分類を真に臨床応用へと結びつけるためには、転写因子を介した腫瘍の脆弱性を捉え、新規治療標的を見出す研究戦略が強く求められている。

上記を踏まえ、本研究では、①臨床検体にもとづき、各サブグループの臨床病理学的特徴と予後を明らかにし、②DNA損傷応答に対する脆弱性を標的とするATR阻害薬に対する感受性の評価、および感受性を規定する因子を包括的に明らかにし、その成果を新たな治療戦略の開発へと展開することで、難治性肺癌に対する有効な治療法の確立を目指すことを目的とした。

### 3) 実験方法

#### ・臨床切除検体

群馬県内4施設よりHGNEC切除パラフィン包埋検体177例を収集した。4 $\mu$ mに薄切した後、転写因子であるASCL1、NEUROD1、POU2F3、YAP1の各々について免疫組織化学染色を行った。評価は発現強度と陽性細胞の割合を組み合わせるH-scoreを用いて、H-score  $\geq$  50を陽性と定義した。なお、転写因子の発現は相互排他的ではなく共発現する症例も認められたため、重複を許してカウントを行った。さらにサブグループ化を行った上で、患者背景や予後因子について解析を行った。

・ In vitro ①

4つのサブグループの小細胞肺癌細胞株 (NCI-H446, NCI-H618, NCI-H526, H2227) および対照として非小細胞肺癌細胞株 (A549) を用いて、ATR 阻害剤を用いて感受性について解析を行った。CCK-8 assay を用いて、ATR 阻害剤の投与濃度を割り振り、IC50 が算出できるように条件設定を行った。その上で、サブグループ毎および非小細胞肺癌細胞株と間での IC50 の比較を行い感受性について評価した。

・ In vivo

BALB/cSlc-nu/nu mice を用いた Xenograft model を作成した。細胞株は、NCI-H446, NCI-H618, NCI-H1836, NCI-H1694, NCI-H526, A549 を用いた。腫瘍接種後 day14 に腫瘍形成を確認し同日より 5 日間連続で ATR 阻害剤および Vehicle を経口投与した。腫瘍径の測定は、2-3 日毎に実施して、腫瘍体積による抗腫瘍効果について評価した。

・ RNA-seq

In vivo における薬剤治療後の腫瘍より RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。

・ In vitro ②

ATR 阻害剤への感受性に違いのある小細胞肺癌細胞株 (NCI-H446, NCI-H526) および非小細胞肺癌細胞株 (A549) を用いて、ATR 阻害剤投与後の神経分化の指標となる分子 X の発現について RT-PCR および Western Blotting (WB) によって評価を行った。

#### 4) 結果

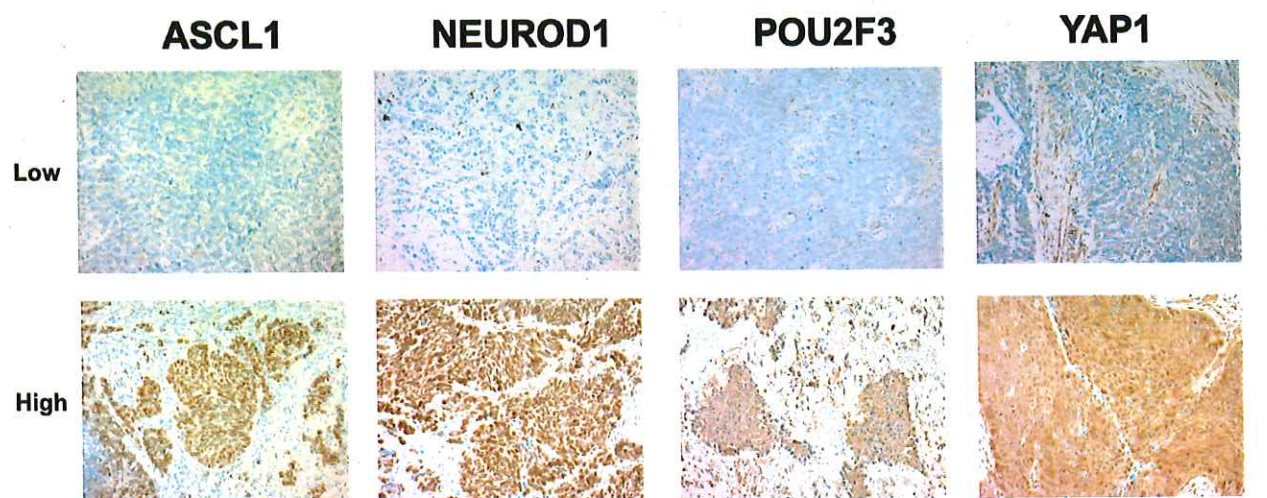
・ 臨床切除検体

切除した HGNEC 検体 177 例における患者背景は以下の通りであった (表 1-A)。また、代表的な転写因子の免疫組織化学染色の結果を図 1-A に示す。H-score  $\geq 50$  に基づき、各々の症例のサブグループについて分類を行ったところ、HGNEC 全体として、ASCL1 および NEUROD1 が主要なサブグループであることが明らかとなった (表 1-B)。この腫瘍なサブグループに着目して、患者背景 (年齢・性別・喫煙歴) および腫瘍学的因子 (病理病期・リンパ管侵襲・脈管浸潤) について比較検討を行ったが、これら背景については有意な差を認めなかった (表 1-C)。一方で、予後因子について解析を行ったところ、全生存期間、無病生存期間ともに ASCL1+/NEUROD1+ (double positive) 症例は有意な予後不良因子であった (図 1-B)。

表 1-A

Characteristics of Surgery		
		Surgery (n=177)
Median age (range), y		71 (36-88)
Sex, n (%)		
	Male	152 (85.9)
	Female	25 (14.1)
Smoking history		
	Never	163 (92.1)
	Current / Former	6 (3.4)
	N/A	8 (4.5)
pStage or cStage at biopsy, n (%)		
	I	104 (58.8)
	II	44 (24.9)
	III	28 (15.8)
	IV	0 (0)
Adjuvant		70 (39.5)

図 1-A



Original magnification, ×200

Evaluated by H-score; calculated by multiplying intensity (0: negative, 1: weak, 2: intermediate, 3: strong) by area (%) and defined High as H-score ≥ 50

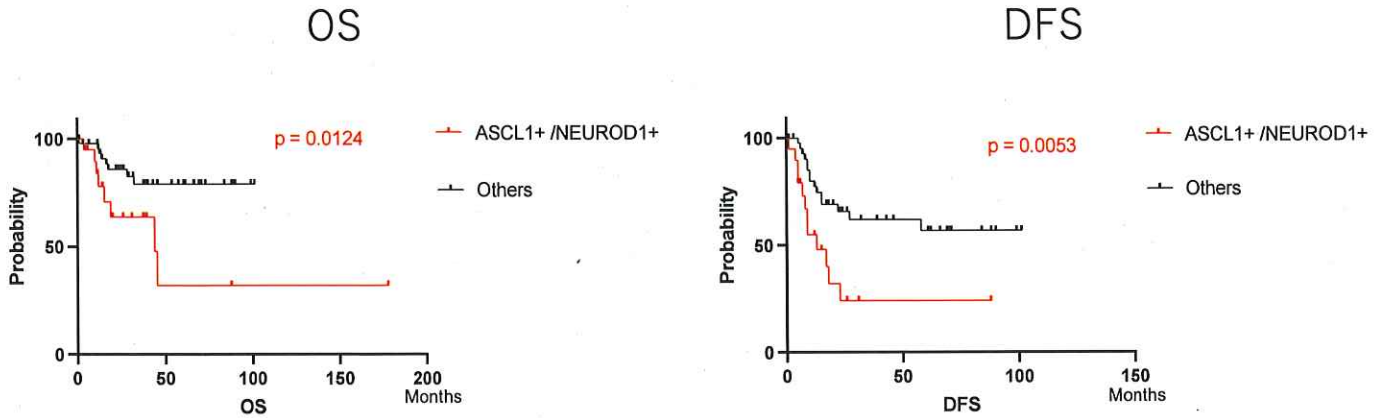
表 1-B

Expression of transcriptional factors in surgery			
	SCLC	LCNEC	All
	n=94 (%)	n=83 (%)	n=177 (%)
ASCL1	66 (70.2)	33 (39.8)	99 (55.9)
NEUROD1	72 (76.6)	52 (62.7)	124 (70.1)
POU2F3	7 (7.4)	4 (4.8)	11 (6.2)
YAP1	22 (23.4)	36 (43.4)	58 (32.7)

表 1-C

Clinicopathology and Major subgroup in Surgery					
	ASCL1+ / NEUROD1- n=38	ASCL1+ / NEUROD1+ n=41	ASCL1- / NEUROD1+ n=41	ASCL1- / NEUROD1- n=57	p-value
Age	68 (46 - 87)	72 (44 - 85)	72 (46 - 86)	71 (36 - 88)	NS (p=0.52)
Sex					NS (p=0.07)
male	29	37	33	53	
female	9	4	8	4	
Smoking Index					NS (p=0.82)
≤400	3	4	2	3	
>400	32	36	35	49	
pStage					NS (p=0.69)
I	20	24	27	33	
II-IV	18	17	14	24	
Ly					NS (p=0.94)
+	28	27	27	40	
-	9	11	12	16	
NA	1	3	2	1	
V					NS (p=0.16)
+	25	30	32	16	
-	12	7	7	10	
NA	1	3	2	1	

図 1-B



・ In vitro ①

細胞株 (NCI-H446, NCI-H618, NCI-H526, H2227, A549) において、CCK-8 アッセイを用いて細胞生存率を評価した。各濃度の ATR 阻害剤 (Berzosertib, VE-822) を処理し、用量反応曲線を作成して  $IC_{50}$  を算出した (図 2-A)。さらにサブグループ毎の  $IC_{50}$  を比較し、感受性について評価した (図 2-B)。その結果、主要なサブグループで神経内分泌系の特徴を有する ASCL1 および NEUROD1 において他のサブグループと比較して有意に低い  $IC_{50}$  を示した。一方で、非神経内分泌系である POU2F3 や YAP1 は非小細胞肺癌との比較では有意に低い  $IC_{50}$  を示したものの、神経内分泌系の特徴を有する ASCL1 や NEUROD1 のサブグループよりは高い  $IC_{50}$  であった。

図 2-A

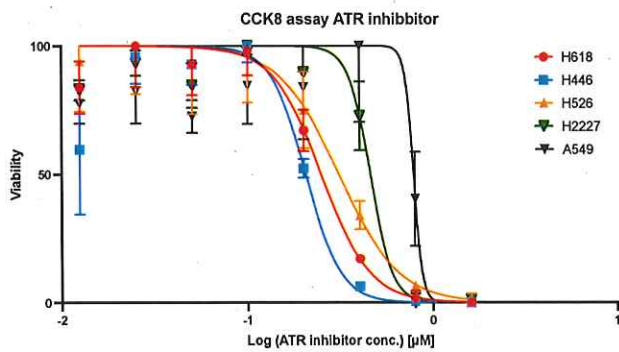
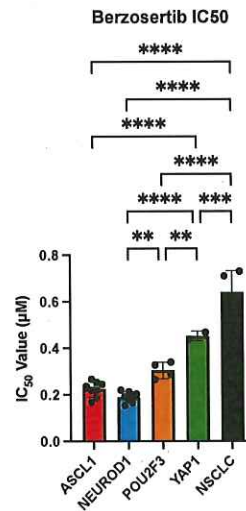


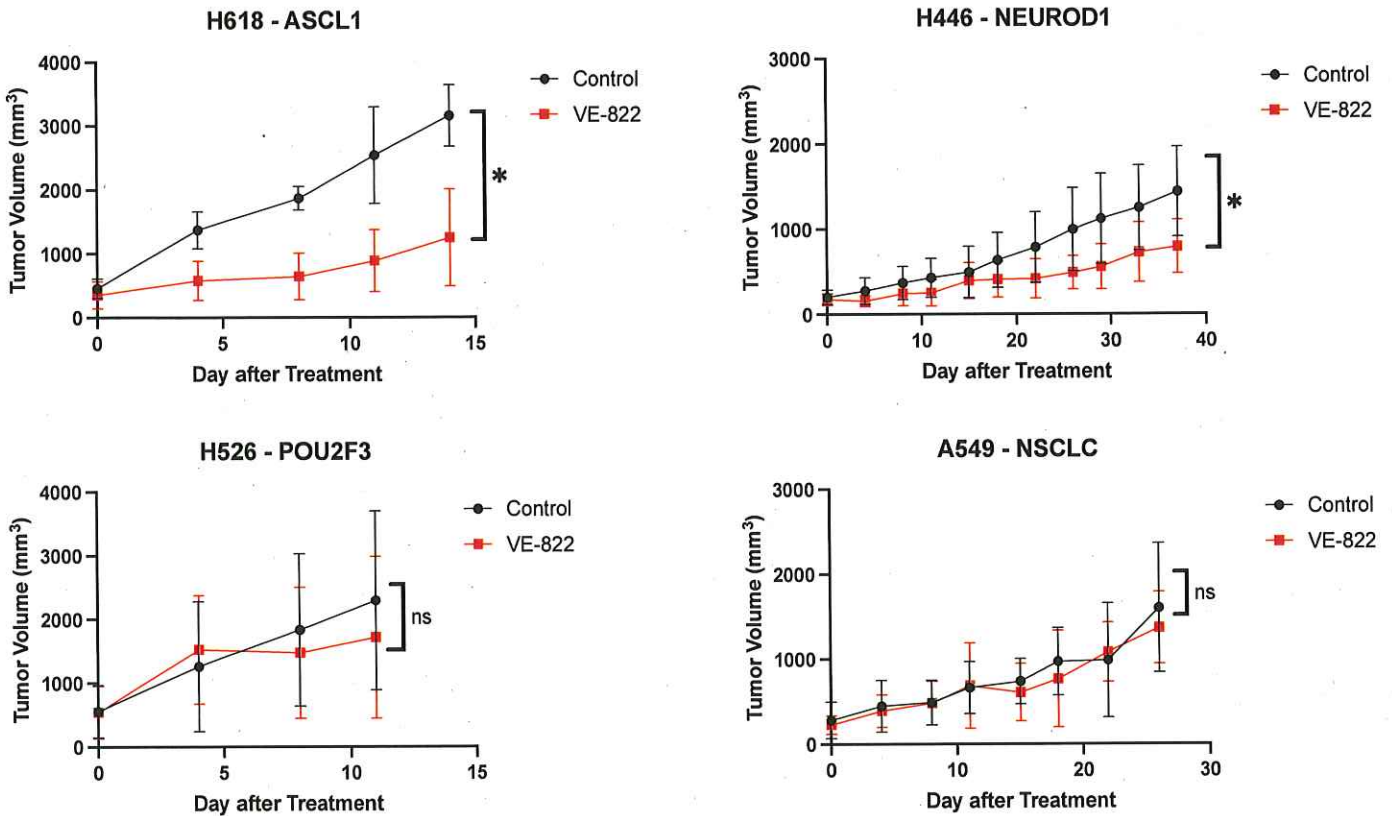
図 2-B



・ In vivo

Xenograft model で腫瘍形成を確認した後に、Vehicle と ATR 阻害剤を投与して腫瘍体積を経時的に測定した (図 3-A)。In vitro で低い IC<sub>50</sub> であった H618 および H446 において有意な抗腫瘍効果を認めただ一方で、POU2F3 および NSCLC では有意な抗腫瘍効果を認めなかった。

図 3-A



・ RNA-seq

Xenograft mouse model で得られた腫瘍組織を用いて RNA-seq 解析を行った。RNA-seq による網羅的発現解析 (log<sub>2</sub> fold change に基づく差次的発現解析、Pathway 解析、GO 解析) を実施したが、ATR 阻害剤感受性を説明し得る明確な候補因子は同定されなかった。この結果を踏まえ、転写因子に基づくサブグループ特異的な生物学的背景に着目した追加解析を行った。

・ In vitro ②

ATR 阻害剤を投与した際の分子 X の発現変化について、RT-PCR および WB により評価を行った。RNA (図 4-A) および蛋白 (図 4-B) のいずれにおいても ATR 阻害剤を投与することで、特に非神経内分泌系の特徴を有するサブグループである POU2F3 の細胞株 (H526) において分子 X の発現の増加を認めた。

図 4-A

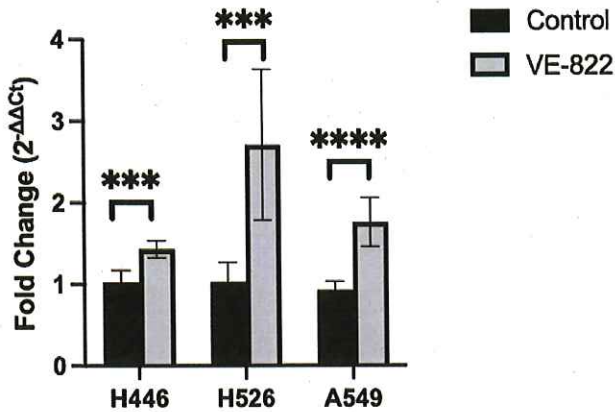
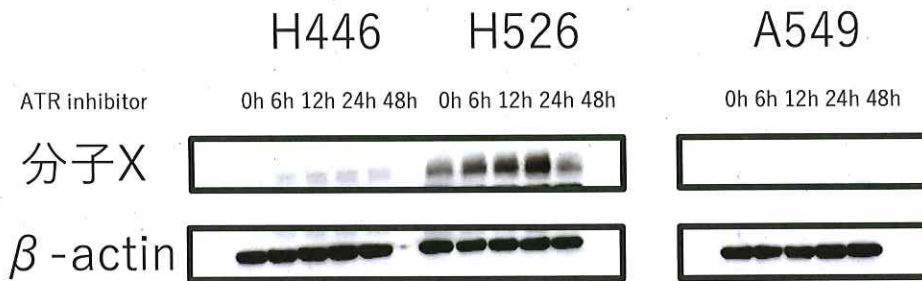


図 4-B



5) 考察

転写因子発現に基づくサブグループ解析の結果、神経内分泌系 (ASCL1、NEUROD1) は ATR 阻害剤に高感受性を示したのに対し、非神経内分泌系 (POU2F3、YAP1) では感受性の低下が認められた。さらに、神経内分泌分化に関与する分子 X は ATR 阻害剤投与により発現が誘導された。これらの所見は、神経内分泌分化関連因子が薬剤感受性を規定する可能性を示すとともに、分子 X を介した新たな治療戦略の可能性を示唆する。

(2) 今回の研究成果を、今後の研究にどのように役立てたいと考えているか

本研究により、ATR 阻害剤は HGNEC に対する有望な治療選択肢となり得ること、ならびに分子 X を標的とした新規治療戦略の可能性が示唆された。しかし、DNA damage response と神経内分泌分化に関与する分子 X との詳細な機序は未解明である。今後その解明を進めることで、サブグループ間の関係性や治療脆弱性の理解が深化し、サブグループ別の個別化医療への展開が期待される。

このたびの貴重な研究助成に深く感謝申し上げますとともに、今後がん治療の発展に資するトランスレーショナル研究に一層尽力してまいります。