



# Neuroendocrine carcinoma and mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm of the stomach: a clinicopathological and exome sequencing study

Ishida, Sonoko

---

(Degree)

博士 (医学)

(Date of Degree)

2021-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8105号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008105>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(課程博士関係)

## 学 位 論 文 の 内 容 要 旨

Neuroendocrine carcinoma and mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine  
neoplasm of the stomach: a clinicopathological and exome sequencing study

胃の神経内分泌細胞癌と混合型神経内分泌腫瘍における  
臨床病理学的検討およびエクソーム解析

神戸大学大学院医学研究科医科学専攻  
外科学講座 食道胃腸外科学  
(指導教員: 掛地 吉弘 教授)

石田 苑子

### <背景>

神経内分泌新生物は、高分化で緩徐な臨床経過を辿る神経内分泌腫瘍 (NET)、低分化で悪性度の高い神経内分泌癌 (NEC)、神経内分泌成分と非神経内分泌成分の混合型腫瘍 (MiNEN) に分けられます。

神経内分泌分化を有する NET と NEC が単一の病理学的組織に属するのか、発生臓器によって分子学的差異があるのか、これらはいまだ明確になっていません。しかしながら、次世代シーケンシング技術が発展するにつれて解明の糸口が見えてきました。肺と膵臓においては、NEC に NET 関連遺伝子の変異が見られないことから、NEC と NET が生物学的に異なることが示唆されています。さらに、NET における *MEN1* 遺伝子変異の発生率は臓器によって異なり、*ATRX* および *DAXX* の変異は膵臓の NET にほぼ限定されていることから、臓器によって分子学的動態が異なることも示唆されています。

これまでは肺や膵臓で主に研究がなされており、他臓器における遺伝学的研究はまだ十分ではありません。本研究では、全エクソームシーケンシングを用いて胃の NEC と MiNEN の分子病理学的分析を行いました。

### <方法>

神戸大学にて 2000 年から 2017 年の間に外科的切除を受けた胃 NEC (n = 7) と胃 MiNEN (n = 6) の症例を抽出し、これら 13 症例を研究対象としました。

組織スライドの免疫染色 (クロモグラニン A、シナプトフィジン、CD56) にて神経内分泌分化を確認し、Ki-67index および核分裂像 (個/10HPF) も調べました。さらに、p53 と HER2 の免疫染色も追加しました。

マイクロサテライト不安定性 (MSI) 解析を行い、MSI-high の症例においてはミスマッチ修復 (MMR) タンパクの評価のため、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 の免疫染色も行いました。

全エクソームシーケンシングを行うにあたり、MiNEN では神経内分泌成分と非神経内分泌成分を分けることができるものについてはそれぞれより DNA を抽出して行いました。

### <結果>

胃 NEC および MiNEN の臨床的特徴を表 1 に、病理学的特徴は表 2 に要約しました。

NEC では、2 例が小細胞型神経内分泌癌であり、4 例が大細胞型神経内分泌癌でした。症例 1 および 5 では、腺癌成分も認められましたが、腫瘍全体の 10%未満であり、これは MiNEN の診断基準には満たしていないため、NEC と診断しています。

MiNEN 症例では、神経内分泌成分は全ての症例で大細胞型神経内分泌癌であり、腫瘍全体に対する割合は 30%から 50%でした。全ての症例において、NET 成分は含まれていませんでした。非神経内分泌成分は全ての症例で腺癌でした。

NEC と MiNEN それぞれの神経内分泌成分と非神経内分泌成分の占有パターンでは、

症例 9 のみで両細胞が混在する combined pattern を示し、その他の症例では成分同士が衝突しているように隣接し合う collision pattern を示していました。

免疫染色では、p53 の異常発現（陽性あるいは LOSS）が 9 例（69%）で認められ、全ての MiNEN において腺癌成分と神経内分泌成分で共に異常発現が認められました。HER2 は 1 例の腺癌成分でのみ陽性でした。

MSI 解析では、MiNEN の 1 例でのみ MSI-high を示しました。この症例の免疫染色では MSH2 と MSH6 で発現消失しており、MLH1 と PMS2 では発現が維持されていました。

全エクソームシーケンスでは、*TP53* 変異を 8 症例(62%)で認めました。*TP53* 変異は、NEC (2/7 症例、29%) よりも MiNEN (6/6 症例、100%) でより多く見られました (P=0.039)。*TP53* 変異と p53 免疫染色においては、1 例を除き、相関関係が見られました。*APC* 変異は 2 つの症例で認められました。MSI-high MiNEN には 8 つの変異があり、そのうちの 2 つは NET 関連遺伝子 (*MEN1*, *ATRX1*) の変異でした。*RBI* 変異は 1 例で認められました。他の遺伝子変異は、それぞれ 1 つずつの症例で観察され、検出された遺伝子変異は表 3 にまとめています。

#### <考察>

本研究では、胃 NEC / MiNEN において、*TP53* 変異が多いことが示されました。本研究の胃 NEC / MiNEN の *TP53* 変異率（62%）は、肺小細胞癌の頻度（95%以上）や肺大細胞神経内分泌癌の頻度（～80%）よりも低く、膵臓 NEC / MiNEN の頻度（～60%）および大腸 NEC / MiNEN の頻度（～50%）とは同程度でした。*TP53* 変異は NEC よりも MiNEN でより多く認められました。症例 1 においては、全エクソームシーケンスで *TP53* 変異が認められなかったにもかかわらず、免疫染色においては p53 陽性でした。これは、非エキソン部の遺伝子変異によって p53 の正常発現が阻害されていることを示唆しています。

*RBI* 変異の頻度は、肺小細胞癌（95%以上）、肺大細胞神経内分泌癌（～40%）、膵臓 NEC（～40%）で高く、大腸 NEC / MiNEN では少ない変異です。本研究では 1 例でのみ *RBI* 変異を認めました。

*TP53* および *RBI* の変異の頻度に基づくと、胃 NEC / MiNEN は肺または膵臓の NEC / MiNEN よりも、大腸 NEC / MiNEN に類似していると考えられます。

しかし、大腸 NEC / MiNEN では *BRAF* (37%)、*KRAS* (21%)、*APC* (16%) の変異も多く認められていますが、本研究の胃 NEC / MiNEN では少なかったです。この違いが、2 臓器間の NEC / MiNEN における分子学的特徴の可能性がありそうです。

また、*BRAF*、*KRAS*、および *APC* は大腸癌の一般的なドライバー遺伝子ですが、胃腺癌においては *TP53* 以外の遺伝子変異は頻度が低く (<10%)、あまりみられません。

これまで、膵臓や肺では NEC と NET の遺伝子変異を比較し、異なる腫瘍であると考

えられるようになってきました。胃においては、現時点で消化管 NET の遺伝子変異の報告が少なく、本研究においても同様の比較は困難でした。

胃に限定した NET の遺伝子変異の報告は検索しうる範囲では 4 研究のみあり、それらをまとめると *TP53* (3/22 例; 14%)、*RBI* (2/22; 9%)、*SMAD4* (2/22; 9%) と散発的な報告に留まっています。また、膵 NET 関連遺伝子も胃 NET では *MEN1* (1/15; 7%)、*ATRX* (1/15; 7%)、*TSC2* (1/15; 7%)、*PETN* (1/22; 5%) と稀でした。

このように胃 NET に特徴的な遺伝子変異は同定されていない状況ではありますが、本症例の胃 NEC / MiNEN と共通する傾向は見られず、TP53 以外の変異の頻度が低いという点では胃腺癌と似通っています。従って、膵臓や肺と同様に、胃においても NEC / MiNEN は NET よりも腺癌に近い関連があると考えられます。

しかしながら、本研究では、MSI-high MiNEN の 1 例で *MEN1* と *ATRX* の変異が見られました。本研究と同様に NEC / MiNEN に NET 関連遺伝子変異を認めたことから、腺癌が NET 関連遺伝子の変異を獲得して神経内分泌分化をきたした可能性があるとしている報告が今までごく僅かにあります。反対に、NET でも NEC 関連遺伝子変異を認めた例もあり、このように NEC と NET の両方の変異を持ち合わせている腫瘍については、今後さらなる遺伝子学的解析が必要であると考えます。

胃腺癌においては、Epstein-Barr virus (EBV) 陽性タイプ、MSI-high タイプ（21%）、ゲノム安定性タイプ（20%）、および染色体不安定性タイプ（50%）の 4 つの分類が提唱されています。染色体不安定性タイプの胃腺癌においては *TP53* 以外の変異は少ないとされており、本研究の NEC / MiNEN も同様の結果を得ており、ここでも類似が示唆されます。

#### <結論>

本研究は、胃の NEC および MiNEN において *TP53* 変異が高頻度であり、他の遺伝子変異は少ないことを明らかにしました。胃の NEC および MiNEN は分子学的に胃腺癌に類似していると考えられます。NET 関連遺伝子の変異は 1 例で認められ、胃の NEC および MiNEN における NET 関連遺伝子の関与は完全に除外はできませんでした。

論文審査の結果の要旨			
受 付 番 号	甲 第 3081 号	氏 名	石 田 苑 子
論 文 題 目 Title of Dissertation	Neuroendocrine carcinoma and mixed neuroendocrine-non-neuroendocrine neoplasm of the stomach: a clinicopathological and exome sequencing study  胃の神経内分泌細胞癌と混合型神経内分泌腫瘍における 臨床病理学的検討およびエクソーム解析		
審 査 委 員 Examiner	主 査 福 本 巧 Chief Examiner 副 査 見 玉 裕 三 Vice-examiner 副 査 横 崎 宏 Vice-examiner		

(要旨は1, 0 0 0字～2, 0 0 0字程度)

〔背景と目的〕

神経内分泌新生物は、高分化で緩徐な臨床経過を辿る神経内分泌腫瘍（NET）、低分化で悪性度の高い神経内分泌癌（NEC）、神経内分泌成分と非神経内分泌成分の混合型腫瘍（MiNEN）に分けられる。

神経内分泌分化を有する NET と NEC が悪性度の異なる同一腫瘍なのか、それとも発生機序が異なる腫瘍であるか、明確になっていない。しかしながら、次世代シーケンシング技術が発展するにつれ、肺と膵臓においては遺伝子学的に NEC と NET が異なる腫瘍であることが示唆されている。

これまでは NEC と NET の関連性は肺や膵臓で主に研究がなされており、他臓器における遺伝学的研究はまだ十分ではない。本研究では、全エクソームシーケンシングを用いて NEC や MiNEN の遺伝学的特徴を明らかにした。

〔方法〕

神戸大学にて 2000 年から 2017 年の間に外科的切除を受けた胃 NEC（n = 7）と胃 MiNEN（n = 6）の症例を抽出した。これら 13 症例に対し、免疫組織化学染色、マイクロサテライト不安定性（MSI）解析、全エクソームシーケンシングを行った。全エクソームシーケンシングを行うにあたり、MiNEN では神経内分泌成分と非神経内分泌成分を分けることができるものについては、それぞれより DNA を抽出して解析を行った。

〔結果と考察〕

I. 胃 NEC / MiNEN の特徴について

全エクソームシーケンスでは、TP53 変異の頻度が最も高く、8 症例（62%）で認められた。TP53 変異は、NEC（2/7 症例、29%）よりも MiNEN（6/6 症例、100%）でより多く見られた（P = 0.039）。TP53 変異と p53 免疫染色においては、1 例を除き、相関関係が見られた。本研究の胃 NEC / MiNEN の TP53 変異率は、肺における頻度よりも低く、膵臓や大腸の NEC / MiNEN の頻度と同程度であった。

全エクソームシーケンスでは、RBI 変異は 1 例（8%）しか認められなかった。これは、RBI 変異が高頻度で認められる肺や膵臓に比べ、低頻度である大腸 NEC / MiNEN と類似していた。

本研究の胃 NEC / MiNEN を大腸 NEC / MiNEN と比較してみると、BRAF 変異と KRAS 変異において、胃 NEC / MiNEN の方が低頻度であった。

以上より、胃 NEC / MiNEN は大腸 NEC / MiNEN と特徴が似ていたが、完全に同一ではなかった。NEC / MiNEN は臓器によって特徴が異なることが示唆された。

II. 腺癌との比較

胃腺癌においては、TP53 以外の遺伝子変異は頻度が低いと報告されている（<10%）。本研究では、胃 NEC / MiNEN においても TP53 変異以外に特徴的な遺伝子変異は見られなかった。したがって、肺や膵臓と同様に、胃においても NEC / MiNEN は腺癌に類似している可能性がある。

また、本研究の MiNEN において、腺癌成分と NEC 成分を分離して全エクソームシーケンスを行えた例は、症例 10-14 の 4 例であった。全ての症例において、両成分で *TP53* 変異を認めた。*APC* と *ZNF521* では、それぞれ 1 例ずつ、両成分で変異を認めた。*CTNNB1*、*KMT2C*、*PTEN*、*SPEN* では、それぞれ 1 例ずつ、NEC 成分のみで変異を認めた。腺癌成分でのみ認められる変異はなかった。以上より、これら MiNEN の NEC 成分は、腺癌にもともとあった遺伝子変異にさらなる遺伝子変異が加わり、神経内分泌分化を獲得した可能性が示唆される。

### III. 胃 NET との比較

本研究では、MiNEN の 1 例で NET 関連遺伝子である *MEN1*、*ATRX* の変異が見られた。胃 NET の遺伝子変異の報告は少なく、*TP53* (3/22 例; 14%)、*RBI* (2/22; 9%)、*SMAD4* (2/22; 9%) と特徴的な遺伝子変異は見られない。また、膵 NET 関連遺伝子も胃 NET では *MEN1* (1/15; 7%)、*ATRX* (1/15; 7%)、*TSC2* (1/15; 7%)、*PETN* (1/22; 5%) と稀であった。本研究と胃 NET の遺伝子変異を比較するにはまだ症例数が足りないため、今後の更なる症例集積と解析が望まれる。

#### 〔総括〕

胃の NEC 及び MiNEN において、*TP53* 変異が高頻度で認められ、他の遺伝子変異は少ないことが明らかになった。また、胃の NEC および MiNEN は、胃腺癌に類似していることが示唆された。

本研究は、胃 NEC 及び胃 MiNEN の遺伝学的特徴について研究したものであるが、従来ほとんど行われていなかった全エクソームシーケンスを用いて遺伝子変異を解析した報告である。稀な疾患に対してその遺伝学的特徴を明らかにしたことについて重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。

よって、本研究者は、博士（医学）の学位を得る資格があると認める。