

15 - 15 神経内分泌学的特性を有する肺がんの病態の把握及び治療法に関する研究

主任研究者 国立がんセンター東病院 永井 完治

研究成果の要旨

肺の神経内分泌がん切除例の病理標本を集積し、病理中央診断を行い、臨床病理像の解析を行った。5生率は TC 96.2%, ATC 77.8%, SCLC 36.9%, LCNEC 41.3%であった。TC, ATC, LCNEC, SCLC を cDNA microarray を用いた網羅的発現解析により検討した結果、高悪性度 NE 腫瘍には2種類あり、それは SCLC と LCNEC という区別ではなかった。2種類の予後は異なっていた。TC, ATC は高悪性度 NE 腫瘍と別に cluster された。肺の大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) の放射線感受性および化学療法の効果をアンケートにより調査した。放射線治療の奏効率は57%、化学療法の奏効率は64%であった。臨床的治療効果が認められなかった PD 症例はすべて早期に死亡した。LCNEC に対する化学療法の有効性および安全性を検討するために prospective study を計画した。対象は術後再発症例あるいは生検で LCNEC と診断された手術不能例とした。化学療法は CDDP、イリノテカンを4コースとした。倫理審査委員会の承認を得て protocol をスタートした。肺小細胞がんに対する術後化学療法の第 Ⅲ 相試験 (JCOG9101) に登録された SCLC 切除例の病理標本を6人の病理医が見直し、新しい組織分類に従って病理診断を行った。その結果、SCLC と診断された症例は61%、LCNEC に変更された症例が27%であった。6人の完全一致率は29%、6人中4人以上の多数一致率は90%であった。

研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
永井 完治	国立がんセンター東病院 医長	神経内分泌学的特性をもった肺がんの手術適応と化学療法
渡辺 俊一	国立がんセンター中央病院 医員	神経内分泌学的特性を持った非小細胞肺がんの手術成績と予後の特徴
亀谷 徹	静岡県立静岡がんセンター 病理診断部長	大細胞神経内分泌がんの病理診断
中川 健	癌研究会附属病院 副院長	神経内分泌学的特性をもった肺がんの臨床病理学的な特性
多田 弘人	大阪市立総合医療センター 呼吸器外科部長	神経内分泌学的な特性を持つ肺がんの外科的治療と補助療法
野田 和正	神奈川県立がんセンター 呼吸器内科部長	神経内分泌学的特性を持った肺がんの化学療法
畝川 芳彦	独立行政法人国立病院機構四国がんセンター 呼吸器科医長	神経内分泌学的特性を有する肺がんの治療効果の関連性に関する研究
中原 理恵	栃木県立がんセンター 呼吸器外科医長	神経内分泌学的特性を有する肺腫瘍の臨床病理学的特性に関する研究
岡田 守人	兵庫県立成人病センター 呼吸器外科医長	神経内分泌学的特性を持つ大細胞肺がんに対する外科的治療の適応とその予後

総括研究報告

1 研究目的

本研究の目的は、肺の神経内分泌学的特性を持った肺癌の病態を明かにし、正確な診断方法および指針を作成し、より有効な治療方法を開発し、標準的治療法を設定することである。

2 研究成果

当班においては肺の神経内分泌腫瘍を集積し、その病理中央診断を行った。本研究班の対象は、班研究に参加している各施設において肺原発の神経内分泌腫瘍と診断され外科切除が行なわれた症例 383 例であった。383 例中 16 例が病理中央診断によって対象外症例と診断され、1 例が登録不適例（剖検例）とされた。残った 366 例の病理中央診断の内訳は、定型カルチノイド腫瘍（55 例、15%）、非定型カルチノイド腫瘍（9 例、2.5%）、小細胞癌（104 例、28.4%）、大細胞神経内分泌癌（138 例、37.7%）、高悪性度神経内分泌癌（14 例、3.8%）、大細胞癌（33 例、9%）、その他（13 例、3.6%）であった。神経内分泌腫瘍のスペクトラムに含まれたのは 320 例で、61.6%の症例が各施設においても同じ診断を得ていた。診断の異なった 38.4%のうち 21%が小細胞癌、17.4%がその他の組織型であった。また大細胞神経内分泌癌、小細胞癌のいずれとも診断し得ない症例が 14 例認められ、高悪性度神経内分泌癌と診断した。肺の神経内分泌がんの組織型別の切除後 5 年生存率は、全病期では、定型カルチノイド（96.2%）、非定型カルチノイド（77.8%）、小細胞癌（36.9%）、大細胞神経内分泌癌（41.3%）、高悪性度神経内分泌癌（21.4%）であり、神経内分泌腫瘍のスペクトラムの中での悪性度が明らかとなった。

肺がん切除病理組織標本を新 WHO 分類に基づき再検討し、新たに LCNEC と診断された 26 例を対象として、その thin-section CT (TS-CT) 所見を検討した。対象 26 例の内訳は、男性 23 例・女性 3 例で、年齢中央値は 66 歳（48-88 歳）であった。CT 画像所見は類円型 20 例・多角形 6 例で、内部構造は全例が充実性を呈し、air-bronchogram ありが 10 例、低吸収域ありが 10 例であった。TS-CT では腫瘍辺縁の所見を見ると notch 18 例、気腫性変化 15 例、胸膜陥入 9 例、spiculation 4 例、すりガラス様陰影 (GGO) 3 例、胸膜肥厚あり 3 例、二次性変化 3 例であった。

肺の大細胞神経内分泌がん (LCNEC) の放射線および化学療法に対する感受性を明らかにするために、LCNEC の診断の得られた切除症例の術後再発症例に対する治療の

アンケート調査を行った。症例数は 22 例で、男 19、女 3、年齢中央値 66 であった。病理病期は IA 5、IB 3、A 4、B 3、A 4、B 3 であった。術後再発は 82%が 1 年以内に認められた。再発臓器は脳がもっとも多く、縦隔リンパ節、肺、肝、骨、頸部リンパ節等であった。化学療法は CDDP または CBDCA を用いた 2 剤併用療法が多く、化学療法全体の奏効率は 64%であった。CDDP または CBDCA を用いない化学療法は効果がなかった。放射線治療の奏効率は 57%であった。臨床的治療効果が PD であった症例はすべて早期に死亡した。

SCLC と LCNEC の細胞分化の特徴と差異を HASH 1 (human achaete-scute homologue 1) と HES 1 (hairy enhancer of split-homologue 1) の分子の発現について検討した。SCLC 培養細胞 14 株、LCNEC 培養細胞 1 株の細胞ブロック切片、手術症例 SCLC 14 例、LCNEC 19 例の組織標本切片を用いて、mRNA を標的とした tyramide を用いた高感度 in situ hybridization (ISH) 法により、HASH 1、HES 1 の発現バランスを検討した。SCLC と LCNEC とでは HASH 1 と HES 1 の発現状況に大きな差のあることを確認し、両者は神経内分泌方向への分化の程度が異なっていることが示唆された。

遺伝子発現パターンにより神経内分泌性腫瘍の分類を行い、予後との相関を検討した。肺の神経内分泌 (NE) 腫瘍には、定型カルチノイド (TC)、異型カルチノイド (AC)、大細胞性神経内分泌癌 (LCNEC)、小細胞癌 (SCLC) というスペクトルがある。今回、38 例の NE 腫瘍 (TC 12、AC 1、LCNEC 8、SCLC 17)、13 例の大細胞癌 (LCC) 組織、12 例の腺癌組織、30 例の正常肺組織、11 種の SCLC 細胞株に対し、4 万個のクローンからなる cDNA を用い、腫瘍組織と細胞株の混合物をレファレンスとしてマイクロアレイ解析を行った。発現の変化している遺伝子群を用いた階層 clustering により、腺癌、LCC、正常肺組織、TC/AC の 4 群と、高悪性度 NE 腫瘍の 3 群 (HGNT 1-3 群) を得た。LCNEC は LCC とは別に cluster された。高悪性度群を HGNT 1+3 群 (n=12) と HGNT 2 群 (n=12) の 2 群にまとめると、前者では有意に p-stage の進んだ症例が多く、5 生率はそれぞれ 12%、83%であった。しかし、LCNEC と SCLC との生存率に有意差はなかった。さらに、手術で得られた臨床材料と SCLC 細胞株とを併せて clustering を行った。SCLC 細胞株は臨床材料の細胞より進行した、悪性度の高いものと考えられるが、今回検討した 11 種の中では予後良好な HGNT 2 群と cluster されたものは 1 つもなく、すべて HGNT 1 群と cluster された。以上より (1) 高悪性度 NE 腫瘍 (SCC+LCNEC) のうち予後良好/不良群を、

腫瘍組織と細胞株の MA 解析のみから注出できる。(2) LCNEC は LCC の亜型ではない。(3)遺伝子発現パターン、予後から SCLC と LCNEC とを区別することは難しい、などが判明した。

高悪性度 NE 腫瘍 (LCNEC+SCLC) のゲノム量と臨床病理事項との関係と非 SCLC における神経内分泌性が腫瘍の生物学的性質に及ぼす影響を検討した。用いた組織は、小細胞癌組織 1 例、および肺癌細胞株 2 例 (H 1395, H 2122) であった。ゲノム量解析には、Affymetrix 社製の Genotyping Array (10K, 100K) を用いて genome imbalance map (GIM) を作製し、小細胞癌に応用した。SCLC 細胞株 H 1395 では、8 番染色体短腕における欠失による LOH を明瞭に検出したほか、ROH (retention of heterozygosity) には、正常状態の 2 copy/cell 以外にも、3 copy/cell、4 copy/cell など、様々な種類のあること、c-myc の増幅のほか、8 番染色体長腕に新たな遺伝子増幅を検出した。一方、SCLC 組織を用いた検索では、アレル量は階段状になっており、LOH として検出されていても、実は完全な欠失ではなく、欠失のあと残ったアレルが 2 倍化して、アレル量としては減っていない部分の多いことが判明した。神経内分泌性腫瘍のゲノム量解析では、SCLC では全ゲノムにわたり LOH が多いが、その多くではゲノム量は減少せず、一方のアレルが 2 倍化していることが判明した。また、ROH の状態のものでも、アレル量の増加が頻繁に見られた。

LCNEC および小細胞肺がん (SCLC) の免疫組織学的特性、組織学的鑑別のためにサイトケラチン、 β カテニン、E カドヘリン等の細胞接着因子、CD 15、CD 30 について免疫染色を行った。CK 7 は LCNEC で強陽性で、染色性で SCLC と明らかに異なっていた。LCNEC 39 例、SCLC 11 例に免疫染色を行った結果、CK 7、CK 18、 β カテニン、E カドヘリンの 4 つで、2 つの組織型の間に明らかな染色性の相違 (LCNEC>SCLC) が認められた。

111 例の肺神経内分泌腫瘍 [定型的カルチノイド (TC) 13、非定型的カルチノイド (AC) 5、LCNEC 44、SCLC 49] について、細胞回転関連たんぱく cyclin B1 の過剰発現と Rb/p16/cyclin D1 経路の破綻の存在の有無をしらべた結果、これらと腫瘍の増殖能 (Ki67-MIBI 標識率によって評価) 及び患者予後との間に相関が得られた。cyclin B1 の高度の過剰発現を LCNEC、SCLC それぞれの 84% に認めた。Rb/p16/cyclin D1 経路の破綻を LCNEC の 78%、SCLC の 93% に認めた。SCLC 細胞株 N 231 と LCNEC 細胞株 LC-N 1 をアガロース 2 次電気泳動及び質量分析法 (LC-MS/MS) を用いて、両細胞株において発現の相違がみられる

たんぱく中、cytokeratin 7, 8, 18, 19 について比較すると、いずれも LCNEC 細胞株で高発現をみた。これらの cytokeratin に対する抗体を用いて、SCLC 27 例、LCNEC 30 例の切除標本を免疫染色したところ、4 つの cytokeratin とも LCNEC の方が SCLC よりも発現スコアが高かった。

外科的切除を行った末梢発生小細胞癌 15 例、ならびに肺門型小細胞癌 15 例のホルマリン固定パラフィン切片を用いて、p 53、bcl-2 ならびに ssDNA (アポトーシスを示す細胞に発現する 1 本鎖 DNA に対する抗体) の免疫組織学的検討を行った。また増殖周期にある細胞核を認識する Ki-67 (MIB-1) の陽性率についても比較検討した。p 53、bcl-2 の発現率については、末梢型小細胞癌と肺門型小細胞癌との間で有意差は認めなかったが、ssDNA については、末梢型小細胞癌では肺門型小細胞癌に比較して有意に陽性が多かった。Ki-67 の陽性率については、末梢型小細胞癌ではその平均値は 28.7 ± 12.3 であるのに対して、肺門型では 80.3 ± 13.2 を示し、有意差を認めた。

LCNEC に対する化学療法の有効性および安全性を検討するために prospective study を計画した。対象は術後再発症例あるいは生検で LCNEC と診断された手術不能例とした。化学療法に使用した薬剤は CDDP (60mg/m², day1)、イリノテカン (60mg/m², day1, 8, 15) を 2 コース以上最大 4 コースまでとした。倫理審査委員会の承認を得て protocol をスタートした。

肺小細胞がんに対する術後化学療法の第 Ⅲ 相試験 (JCOG9101) に登録された SCLC 切除例の病理標本を 6 人の病理医が見直し、新しい組織分類に従って病理診断を行った。その結果、SCLC と診断された症例は 61%、LCNEC に変更された症例が 27%、非神経内分泌がん 10%、High Grade Neuroendocrine Carcinoma 2% であった。6 人の完全一致率は 29% であったが、6 人中 4 人以上の多数一致率は 90% であった (表-1)。このように過去の小細胞がん症例にはかなりの LCNEC およびその他の組織型が含まれていると考えられた。

3 倫理面への配慮

本研究は主に過去の症例を用いて、診断法、治療法、病理所見、予後などをレトロスペクティブに検討するものである。このような検討において個々の患者情報が厳重に守秘されるように最大限の努力を払うこととした。今後、本研究に関係する研究者はヘルシンキ宣言に従って研究を行うこととした。