

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K08782

研究課題名(和文) 肺大細胞神経内分泌癌の抗癌剤感受性における神経内分泌因子の役割

研究課題名(英文) Role of Neuroendocrine Factors in chemo-sensitivity for large cell neuroendocrine Carcinoma

研究代表者

田中 雄悟 (TANAKA, YUGO)

神戸大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20403256

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：肺大細胞神経内分泌癌(LCNEC)について当院で解剖学的肺切除を行った3cm以下の35症例を対象とし検討を行い「神経内分泌因子が高いほど小細胞肺癌に近いLCNECの可能性が高い」との結論が得られた。上記神経内分泌因子以外で最近注目されているInsulinoma-associated protein 1(INSM1)について当院での肺外科切除検体75例を使用し予後との関連性について検討を行った。INSM1が腫瘍細胞内に認める症例においては認めない症例と比較し生存期間、無再発期間ともに有意に短いことが確認された。また、多変量解析にてINSM1は有意な予後不良な因子となることが確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高悪性度神経内分泌肺癌は非常に予後不良な組織型である。小細胞癌、大細胞神経内分泌肺癌が含まれているが、治療後の予後に関しては神経内分泌肺癌の有無により差があることが報告されている。今回、Insulinoma-associated protein 1(INSM1)について予後との関連性を検討したところ、これまでの因子以上にその有無により予後に大きな差が認められた。今後、同因子をターゲットにした治療方法を検討していくことが個別化医療につながると確信している。

研究成果の概要(英文)：We examined 35 cases of large cell neuroendocrine lung carcinoma (LCNEC) under 3 cm or less who underwent anatomical lung resection at our institution. We concluded that "the higher the neuroendocrine factor, the higher the likelihood of LCNEC being closer to small cell lung cancer."

Insulinoma-associated protein 1 (INSM1), which has known as new neuroendocrine factor, was examined for its relevance to prognosis using 75 lung surgically resected specimens at our institution. We concluded that the overall survival and recurrence-free survival were significantly shorter in INSM1 positive patients than INSM1 negative patients. In addition, multivariate analysis confirmed that INSM1 was a significant factor with a poor prognosis.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 高悪性度神経内分泌癌 小細胞肺癌 外科治療 大細胞神経内分泌肺癌

## 1. 研究開始当初の背景

大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) は 1991 年に Travis らにより提唱され、1999 年の WHO による肺癌組織分類改訂に際して大細胞癌の組織亜型として導入された。小細胞肺癌、非定型カルチノイド、定型カルチノイドと同様に神経内分泌癌の特徴を有するが、その悪性度はカルチノイドと比較し特に高く、非小細胞肺癌にあるにも関わらず原発性肺癌の中で最も悪性度が高いとされる小細胞癌と類似しているため、近年では小細胞癌と共に高悪性度神経内分泌癌とされている。LCNEC は肺悪性腫瘍の 2~3%と比較的稀な組織型であり、組織型として分類されてからの期間も短いためまとまった症例数の報告および分子生物学的な報告は少ない。

### ・LCNEC の術後補助化学療法について

LCNEC は悪性度の高い組織型であるため、他の非小細胞癌と比較しても外科的切除のみでは良好な成績が得られていない。病理学的病期が I 期であっても予後が不良なことが多く、早期肺癌であっても積極的に術後補助化学療法が行われる傾向にある。LCNEC については早期癌、進行癌に関わらず術後補助化学療法が予後改善に貢献していることはすでいくつかの施設より報告されており、当施設でも LCNEC に対し外科的治療を行った 63 症例を集積し検討を行ったが、同様に術後補助化学療法が予後改善に大きく貢献していたことが示唆された (Tanaka Y et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 145(3):839-46)。さらに、いずれの報告においても LCNEC 切除症例では術後補助化学療法を行うことにより、これまでの非小細胞肺癌に対する成績と比べ、予後が大幅に改善していた。我々はこれらの結果より抗癌剤感受性に関する因子が LCNEC に存在する可能性を考慮し様々な因子について検討を行った。

### ・これまでの研究成果とそれを踏まえた着想

我々は当施設で切除を行った LCNEC 63 症例について臨床学的および腫瘍学的特徴について様々な因子の検討を行った結果、LCNEC の診断に必須である 3 つの神経内分泌マーカー (シナプトフィジン、クロモグラニン A、NCAM) と術後補助化学療法の奏功が関連することを確認した。(Tanaka Y et al. J Thorac Cardiovasc Surg. 2013; 145(3):839-46) 具体的には LCNEC の細胞内に上記 3 種類の神経内分泌マーカーが全て免疫染色にて陽性になる患者群 (Triple positive 群; TP 群) とそれ以外の患者群 (Non triple positive 群; NTP 群) を比較したところ、NTP 群では TP 群と比較し術後補助化学療法後の予後が有意に良好であった。今回、我々は神経内分泌成分を有するこれらのタンパクが高悪性度神経内分泌癌に対する抗癌剤感受性に影響を与えていると考えた。

## 2. 研究の目的

我々は分子生物学的なアプローチにより LCNEC の浸潤・転移・再発メカニズムの解明を行うことにより、化学療法の奏効率および予後に関わる因子を明らかにする。また、同じ高悪性度神経内分泌癌である小細胞癌への結果の応用も目的とした。

## 3. 研究の方法

樹立した大細胞神経内分泌肺癌 (LCNEC) cell line 内の 3 つの神経内分泌マーカー (シナプトフィジン、クロモグラニン A、NCAM) について全てが陽性である TP (Triple positive) 細胞をベースに siRNA にて Double positive; NTP (Non-triple positive) cell (シナプトフィジン陰性) (クロモグラニン A 陰性) (NCAM 陰性) の作製を行う。作成された細胞の増殖能、浸潤能を比較する。さらに抗癌剤投与後の細胞の運動についても比較する。

臨床的側面から検討を行った LCNEC の TP 細胞と NTP 細胞の違いについて、当院で解剖学的肺切除を行った 3cm 以下の LCNEC の 35 症例を対象とし予後と治療効果について検討を行う。

3 つの神経内分泌マーカー (シナプトフィジン、クロモグラニン A、NCAM) 以外に神経内分泌腫瘍の予後マーカーとして最近注目されている Insulinoma-associated protein 1 (INSM1) について当院での肺外科切除検体 75 例を使用し予後との関連性について検討を行う。

## 4. 研究成果

については細胞内のノックダウンが安定せず確実な NTP 細胞の作製に難渋した。引き続き、cell line での細胞学的アプローチを試みたが NTP 細胞の安定した作成はできなかった。細胞の運動についても両者に大きな変化を認めなかったため、抗癌剤投与下での評価は行わなかった。

2001 年 1 月から 2017 年 12 月までに LCNEC もしくは SCLC かつ病理学的腫瘍サイズが 30 mm 以下 (小型腫瘍と定義) であり、リンパ節郭清を伴う完全切除を受けた患者を対象とした。LCNEC (sLCNEC) は、3 つの神経内分泌マーカー (クロモグラニン A、シナプトフィジン、および NCAM) による免疫染色パターンに基づいて、2 つのサブグループ (sTP, sNTP) に分けられ、SCLC (sSCLC) と比較された。合計 48 人の sLCNEC 患者と 39 人の sSCLC 患者に分類され、sLCNEC の 48 人のうち、21 人は小型のトリプルポジティブグループ (sTP) として分類され、その患者は 3 つの神経内分泌マーカー陽性であった。また、27 人の患者は、3 つすべての神経内分泌マーカーに対して

全てが陽性ではなかった小型の非トリプル陽性グループ (sNTP) として分類された (図 1)。リンパ節転移の割合は、sTP と sSCLC よりも sNTP の方が有意に低かった。全生存期間に有意差は認めなかったが、無再発生存率 (RFS) および腫瘍特異的生存率 (TSS) は sNTP と比較し sTP と sSCLC で有意に低かった (図 2)。多変量解析にて、sTP と sSCLC は sNTP に対し RFS および TSS では有意な予後不良因子であることが確認された。今回は LCNEC と SCLC という非常に予後不良な組織型を対象としたため外科切除可能な 3cm 以下の病変に限定し解析を行った。結果的に 3cm 以下の初期段階の腫瘍においてもリンパ節転移や再発率に有意な差を認めており、LCNEC 内でも SCLC に類似するものと異なるものの群があること、また神経内分泌マーカーの発現度合いによりその分類が可能であることを示した。またこの結果より切除後の補助化学療法の選択の助けとなることが示唆された。結果については英文誌に結果を報告した。(Neuroendocrine marker staining pattern categorization of small-sized pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma. Minami K, Tanaka Y, Ogawa H, Jimbo N, Nishio W, Yoshimura M, Itoh T, Maniwa Y. Thorac Cancer. 2019 Nov;10(11):2152-2160.)

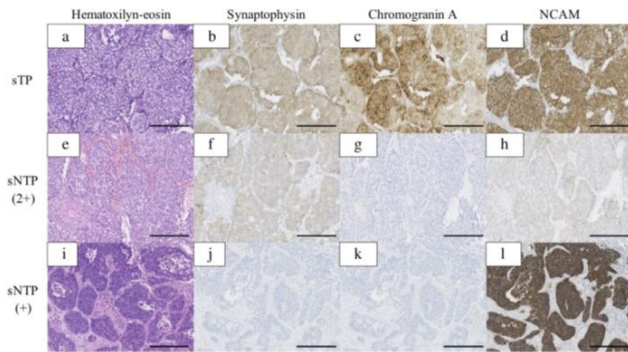


図1

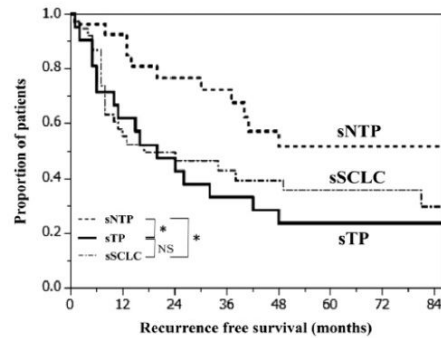


図2

2000年1月から2018年12月に外科的完全切除を受けた高悪性度神経内分泌肺癌 (HGNEC) の75人の症例 (LCNEC42人、SCLC33人) を対象とした。これらを次の2群に分類した: INSM1陽性群 (n = 59) および INSM1陰性群 (n = 16)。臨床病理学的特徴、全生存期間 (OS)、無再発生存期間 (RFS) を各群で比較、さらに単変量解析と多変量解析を用い術後生存に関連する予後因子について検討を行った。INSM1について陽性群と陰性群では腫瘍径および血管浸潤の有無について有意な差が認められた。OS および RFS は、INSM1陰性群よりも INSM1陽性群で有意に不良であった。また、単変量および多変量解析において INSM1の発現が OS および RFSの予後不良の最も強力な予測因子であることが明らかとなった (HR:6.520 95%CI:1.394 39.63 p=.015)。上記よりこれまでの神経内分泌マーカーと比較し新たなマーカーである INSM1の発現は、HGNEC患者の予後に最大の影響を及ぼし、これらの患者の新たな予後バイオマーカーとなる可能性が示唆された。結果については英文誌に報告した。(Insulinoma-associated protein 1 is a prognostic biomarker in pulmonary high-grade neuroendocrine carcinoma. Minami K, Jimbo N, Tanaka Y, Ogawa H, Hokka D, Nishio W, Yoshimura M, Itoh T, Maniwa Y. J Surg Oncol. 2020 Aug;122(2):243-253.)

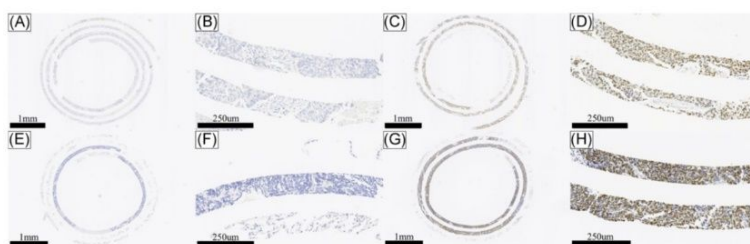


図1

スパイラルアレイを用いた INSM1 免疫染色

(A-D:LCNEC, E-H:SCLC)  
(A,B,E,F: INSM1 陰性)  
(C,D,G,H: INSM1 陽性)

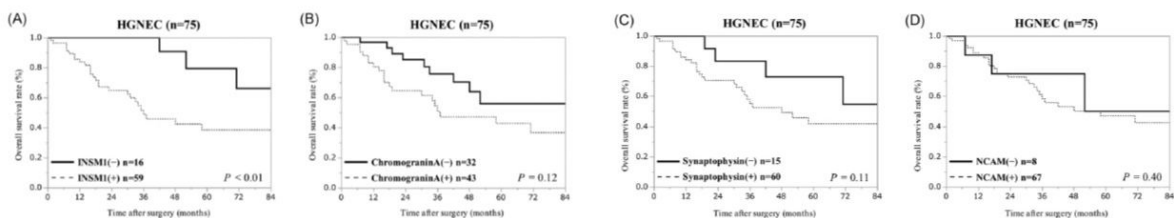


図2

(全生存期間 (OS) 生存曲線)

A: INSM1, B: クロモグラニン A, C: シナプトフィジン, D: NCAM の陽性と陰性での比較  
これまでの神経内分泌マーカーと比較し INSM1 で最も生存率に差 ( $p < 0.01$ ) が認められた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 1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<br>Minami Kazuhiro, Tanaka Yugo, Ogawa Hiroyuki, Jimbo Naoe, Nishio Wataru, Yoshimura Masahiro, Itoh Tomoo, Maniwa Yoshimasa | 4. 巻<br>10                |
| 2. 論文標題<br>Neuroendocrine marker staining pattern categorization of small sized pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma       | 5. 発行年<br>2019年           |
| 3. 雑誌名<br>Thoracic Cancer   | 6. 最初と最後の頁<br>2152 ~ 2160 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1111/1759-7714.13202  | 査読の有無<br>有                |
| オープンアクセス<br>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<br>-                 |

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Minami Kazuhiro, Jimbo Naoe, Tanaka Yugo, Ogawa Hiroyuki, Hokka Daisuke, Nishio Wataru, Yoshimura Masahiro, Itoh Tomoo, Maniwa Yoshimasa | 4. 巻<br>122             |
| 2. 論文標題<br>Insulinoma associated protein 1 is a prognostic biomarker in pulmonary high grade neuroendocrine carcinoma                              | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Journal of Surgical Oncology   | 6. 最初と最後の頁<br>243 ~ 253 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1002/jso.25960   | 査読の有無<br>無              |
| オープンアクセス<br>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<br>-               |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>Kazuhiro Minami, Yugo Tanaka, Takeshi Okamoto, Nahoko Shimizu, Takefumi Doi, Hiroyuki Ogawa, Daisuke Hokka, Naoe Jimbo, Wataru Nishio, Masahiro Yoshimura, Tomoo Itoh, Yoshimasa Maniwa |
| 2. 発表標題<br>Neuroendocrine marker staining pattern categorization of small-sized pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma  |
| 3. 学会等名<br>World Conference on Lung Cancer（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>南 和宏, 田中 雄悟, 岡本 武士, 清水 奈保子, 土井 健史, 法華 大助, 眞庭 謙昌 |
| 2. 発表標題<br>肺高悪性度神経内分泌癌の予後バイオマーカーとしての インスリノーマ関連タンパク質1の検     |
| 3. 学会等名<br>第73回日本胸部外科学会定期学術集会                              |
| 4. 発表年<br>2020年  |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

|               | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                         | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|---------------|---|--------------------------------------|----|
| 研究<br>分担<br>者 | 眞庭 謙昌<br><br>(Maniwa Yoshimasa)<br><br>(50362778) | 神戸大学・医学研究科・教授<br><br><br><br>(14501) |    |

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 |
|---------|---------|
|---------|---------|