

肺小細胞癌・大細胞性神経内分泌癌における予後因子の検討

—接着分子の発現の意義について—

伊 禮 功

肺小細胞癌 (SMCC) および大細胞性神経内分泌癌 (LCNEC) は神経内分泌由来の癌であると考えられる傾向がある。今回我々は SMCC, LCNEC 41例において, E-カドヘリン, α -カテニンの発現性を調べるとともに, 予後との相関について分析した。E-カドヘリンおよび α -カテニンは LCNEC ではそれぞれ83%, 67%に, 小細胞癌では40%, 29%に発現がみられた。特に SMCC では大型細胞を混じる部分で, 発現が顕著であった。生存分析からは, 双方発現群は非発現群, 片方発現群に比して, 予後良好で ($P < 0.05$), LCNEC (67%), SMCC (Mixed small and large cell type, 50%) では両接着分子の発現を認めた。この事実は SMCC で大細胞癌成分を含んでいるものは, 小細胞癌成分のみからなるものとは本質的に異なり, 前者は LCNEC に生物学的に類似しているのではないかと推測された。

(平成11年3月9日受理)

Prognostic Factors in Small Cell Carcinomas and Large Cell Neuroendocrine Carcinomas—Especially in Reference to E-cadherin and α -Catenin Expression

Isao IREI

We analyzed the prognostic factors in 41 of small cell carcinoma (SNCC) and large cell neuroendocrine carcinoma (LCNEC) of the lung cases. In the present study, special attention was paid to the expression of E-cadherin and α -catenin. The positive expressions of E-cadherin and α -catenin was 83% and 67%, respectively, in LCNEC case, while it was 40% and 29% in the SMCC case. The large cell component of SMCC showed strong expression of these adhesion molecules. Analysis of the survival of these patients revealed a better prognosis in cases with strong expression of such adhesion molecules than in those without expression. Immunological analysis for both adhesion molecules of the LCNEC and SMCC (mixed small and large cell type) showed positive reaction of 67% and 50%, respectively. SMCC with large cell component seems to differ the properties of the SMCC composed with only small cell carcinoma cells. The biological behavior of the former SMCC resembled that of LCNEC. (Accepted on March 9, 1999) *Kawasaki Igakkaishi 25(1): 11-17, 1999*

Key Words ① Small cell lung carcinoma
 ② Large cell neuroendocrine carcinoma ③ Prognostic factors
 ④ E-cadherin ⑤ α -catenin

はじめに

単に小型の癌細胞からなる未分化癌として考えられていた肺小細胞癌(以下SMCC)も、最近では、超微細構造上そして免疫組織化学的に神経内分泌性格を示すものが存在することから、その多くは、実際には高悪性度の神経内分泌癌であろうと考えられるようになってきた。しかし、この癌は未だに組織学的には多彩で、純粋に小型細胞から成るものと大型の細胞を混じるもの、(混合型)扁平上皮癌や腺癌の成分を有するもの(併存型)等がある。一方、最近大型の細胞からなる神経内分泌性格を有する癌の存在も認められ、Travisらにより large cell neuroendocrine carcinoma (以下LCNEC) と称されている¹⁾。一体、これらの腫瘍は形態像は異なるものの、その由来や生物学的態度において、同一のものなのであろうか。最近、LCNEC および SMCC などの高悪性度の神経内分泌癌においても、機能的側面を加味することにより、その生物学的悪性度、臨床的振る舞いに差があり、それに応じた分類を試みようとする試案や p 53, Rb 癌抑制遺伝子などの発現異常との関係を調べた報告が少数表れている^{2), 3)}。しかし、予後を含めこれらの点に関しては未だ明らかにされていないのが現状である。

組織学的に LCNEC では胞巣状、索状構造やロゼットの形成がみられやすく、これをもって神経内分泌細胞への分化ありとするのが Travis らの考えである¹⁾。しかし SMCC, LCNEC の両方において、免疫組織化学的、電子顕微鏡学的な検索での神経内分泌性格の存在と形態学的な特徴の有無の間には明瞭な相関性は必ずしもない。それは腫瘍の分化度にもよろう。従って、現在の所、SMCC と LCNEC の概念に入る癌はすべて神経内分泌癌の可能性のあるものとして取り扱っておく必要がある。そしてその中に、何か互いに異なる因子があり、そのために予後に差が生じると考えられるようなものを見つけ出していかなければならない。

E-カドヘリン、 α -カテニンなどの接着分子が上皮細胞間の接着や極性の維持に重要な役割を果たしていることはよく知られている。癌化した場合、それらの分子の発現の低下が、転移を引き起こしやすくする理由の一つと考えられ、肝癌、乳癌、頭頸部癌、子宮癌などでは既に予後を決定する因子として注目を集めている^{4)~6)}。しかし、SMCC および LCNEC において、それらの接着分子の発現について論じた論文はほとんどない。今回、我々はこの点に注目し、SMCC, LCNEC を含め神経内分泌癌として集めた症例の中で、E-カドヘリン、 α -カテニンの発現はどの程度あるのか、そしてその発現度と形態像、予後とに相関があるのかを調べることにした。

対象と方法

1986年から1997年までに川崎医科大学附属病院病院病理部、その関連施設にて取り扱った肺の SMCC, ならびに LCNEC 41例を検討対象にした。対象年齢は38歳~85歳、平均65歳で、観察期間は2ヶ月~62ヶ月であった。性差は男女比39:2であった。

診断され、保存されたHE染色標本を取り出し、組織診断を再確認した。まず神経内分泌形態を有するもの(以下神経内分泌型と称す)と、それがはっきりしないもの(以下非神経内分泌型)に大別し、各々において小型細胞 (small cell)、大型細胞 (large cell) もしくはその混合型 (mixed small and large cell) など、細胞の大きさとこれらの細胞の混在状態によって細分類した。充実性、索状の細胞配列を示したり、細胞胞巣辺縁部の索状配列やロゼットの形成を示すものを神経内分泌形態とした。細胞の大きさは日本肺癌学会⁷⁾や WHO⁸⁾規定に従い、リンパ球の核の3倍までの大きさのものを小型、それ以上のものを大型とした。なお、混合型については IASLC (International Association for the Study of Lung Cancer, 1988) 分類を参考にした。本論文では oat cell, intermediate type を含む SMCC

で、併存型および混合型を除いたものを classical type と表現した。また大型で、水泡状の核、明瞭な核小体、豊富な胞体を有する神経内分泌癌の一群は Travis らの分類に従い¹⁾、LCNEC として取り扱った。接着分子に対する免疫組織化学的な検索には保存されていたホルマリン固定、パラフィン包埋材料を使用した。4~5 ミクロンの厚さの切片を作成し、ABC 法にて免疫染色を施行した。すなわち、キシレンにより脱パラフィン後、0.1% Tween を含んだ 0.1% クエン酸緩衝液 (PH 6.0) 中で、マイクロウエーブ処理を15分間行った⁹⁾。ついで 3% 過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼをブロックした。そして30分間正常ウマ血清による非特異的抗原抗体反応の阻止を行い、1.0% fetal bovine serum (FBS) にて500倍、400倍希釈した抗 E-カドヘリンマウス抗体 (Takara Japan 社)、抗 α -カテニンマウス抗体 (Transduction laboratory 社) と室温下で、1時間反応させた。その後ビオチン化抗マウス IgG 抗体 (Vectastain, ABC Kit) と30分間反応させた。洗浄後、ABC reagent と30分間反応させ、最後に DAB (3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) にて発色させた。核染色はカラチのヘマトキシリンにて行った⁷⁾。褐色の反応産物の存在をもって陽性とした。結果の判定は、陽性細胞のカウントの際に、まず標本の全視野を偏りのないよう観察して、比較的密に腫瘍細胞が増殖する部分を選択、20の強拡大視野 HPF ($\times 400$) を検鏡し、5%以上の腫瘍細胞が染色されている場合を“発現あり”と判定した。尚、5%未満か、もしくは全く染色されないものは“非発現”として判定した。5%の cut off 値を採用したのは、陽性として判定される腫瘍細胞が 5-20%の分布を示す症例が多くを占めると同時に、5%を境に、1-4%の分布を示す症例数が極端に少なくなったためである。

症例の検討は、剖検例と外科手術材料に分けて行った。剖検例においては双方発現例、片方発現例、非発現例の3群に分け、それぞれにつき Kaplan-Meier 法を用いた生存曲線を作成し

た。また3群間においては log-rank test による有意差の検定を行った。また病理病期⁷⁾と接着分子の発現状態との相関性をみるとともに、双方発現例と片方発現例および非発現例の2群間で、組織型別の中間生存期間を比較検討し、 X^2 検定により有意差の検定を行った。

結 果

各組織型間における両接着分子の発現状態を (Table 1, 2) に示した。SMCC ではそれぞれ40%, 29%の腫瘍細胞で E-カドヘリン、 α -カテニンの発現がみられ (Fig. 1)、一方 LCNEC (Fig. 2) では83%, 67%の腫瘍細胞に同接着分子の発現が観察された (Fig. 3)。SMCC のなかでは、両接着分子が大細胞癌の成分に強く染色される傾向がみられ、混合型の SMCC では E-カドヘリン、 α -カテニンともに6例中4例 (67%) に発現がみられた。しかし、oat cell type (Fig. 4) として診断された群では、かろうじて1例に腫瘍細胞の5%以下の発現が

Table 1. Expression of E-cadherin in small cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma

Histological type	Positive case No. / Total case (%)
Neuroendocrine morphology	15/28 (52%)
Small cell carcinoma	10/22 (45%)
Oat cell	0/4 (0%)
Intermediate	5/10 (50%)
Combined	1/2 (50%)
Mixed small and large cell	4/6 (67%)
Large cell neuroendocrine carcinoma	5/6 (83%)
Non-neuroendocrine morphology	4/13 (31%)
Small cell	4/11 (36%)
Mixed small and large cell	0/2 (0%)

Table 2. Expression of α -catenin in small cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma

Histological type	Positive case No./ Total case (%)
Neuroendocrine morphology	11/28 (40%)
Small cell carcinoma	7/22 (32%)
Oat cell	0/4 (0%)
Intermediate	3/10 (30%)
Combined	0/2 (0%)
Mixed small and large	4/6 (67%)
Large cell neuroendocrine carcinoma	4/6 (67%)
Non-neuroendocrine morphology	3/13 (23%)
Small cell	3/11 (27%)
Mixed small and large	0/2 (0%)

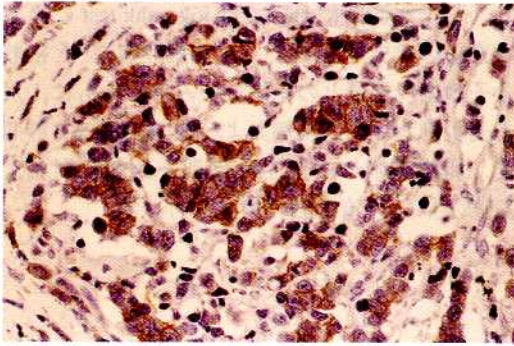


Fig. 1. α -catenin immunostain in a small cell carcinoma of intermediate cell type (Immunohistochemistry $\times 400$)

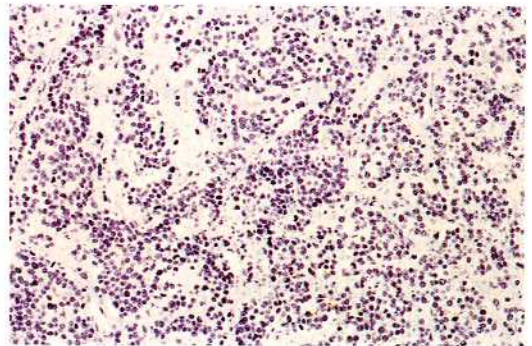


Fig. 4. Small cell carcinoma, oat cell type (Immunohistochemistry for E-cadherin $\times 400$)
Note that E-cadherin is negative in this case

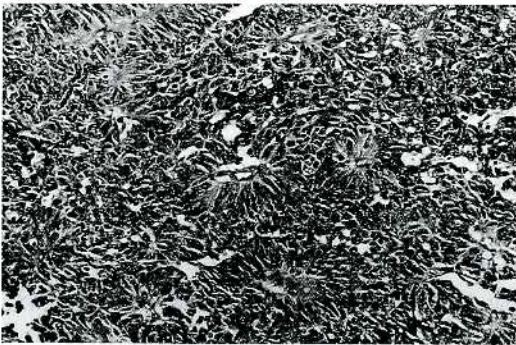


Fig. 2. Large cell neuroendocrine carcinoma (HE $\times 100$)

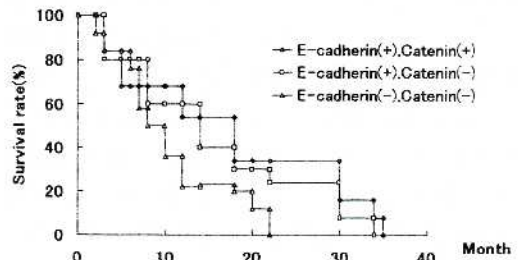


Fig. 5. Survival curves of small cell carcinoma and large cell neuroendocrine carcinoma

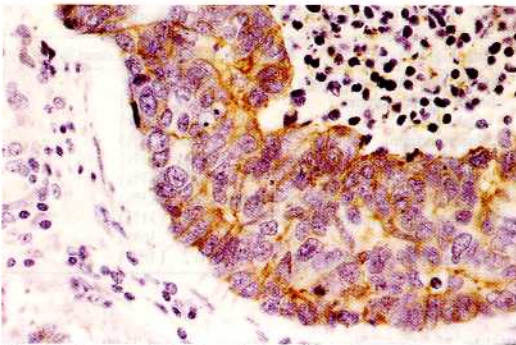


Fig. 3. Immunohistochemical stain for E-cadherin in large cell neuroendocrine carcinoma ($\times 400$)

Table 3. Relationship between pathological stage and expression of adhesion molecules

組織型	接着因子の発現状態 (+/+---)	病理病期*				
		I	II	III a	IV b	V
Small cell carcinoma (classical) N = 7	++ 1 +-, - 6	-	1	-	-	-
Mixed small and Large cell N = 4	++ 2 +-, - 2	1	-	1	1	-
large cell neuroendocrine carcinoma N = 5	++ 3 +-, - 2	2	1	-	-	-

++ : Both expression of adhesion molecules
+ - : Expression of E-cadherin or Catenin
- : None expression of both adhesion molecules
* : 日本肺癌学会編：肺癌取り扱い規約第4版⁷⁾による。

認められるに過ぎなかった。剖検例における生存曲線を見ると (Fig. 5), 双方発現群, 片方発現群では有意差はみられていないが, 双方発現群と非発現群との間には有意差がみられた ($p < 0.05$)。なお, 病期と接着分子の発現性には, 双方発現例ですべて stage I または II に限

られていた以外に明らかな相関性はみられなかった (Table 3)。生存分析の結果からは双方発現群では非発現群と片方発現群に比して, 予後が良好で, その傾向はとくに混合型の SMCC (38.0 vs 15.2 months) と LCNEC (27.2 vs 16.0 months) でははっきりしていた (Table 4)。また組織型別に双方発現群の頻度をみると, LCNEC で 6 例中 4 例 (67%), 混合型の SMCC で 8 例中 4 例 (50%) であった。

Table 4. Survival according to the status of expressions of both adhesion molecules among histological subtypes

組織型	接着因子の発現 (++/+-, -)	中間生存期間 (月)		
		剖検	外科手術	全体
Small cell carcinoma (classical) (N = 25)	++	5	12.0	23.0
	+-, -	20	11.0	12.5
Mixed small and large cell (N = 8)	++	4	30.0	44.0
	+-, -	4	13.3	18.0
Large cell neuroendocrine carcinoma (N = 6)	++	4	29.0	26.6
	+-, -	2	-	16.0

++ : Both expression of adhesion molecules

+- : Expression of E-cadherin or Catenin

- : None expression of both adhesion molecules Small cell carcinoma

考 察

予後を判定する場合、どういった因子をもとに判定していけばよいかを考える必要がある。本研究では生存（羅病）期間に注目して検討を行ったわけだが、治療法により、生存期間が左右されるのは無論のことで、治療法の違いによりグループ分けする必要もある。しかし今回の検討では症例数が少なく、また治療法も限られていたため、うまく比較検討できる群へと分けることができなかった。そこで、本研究では外科手術材料と剖検材料にあえて分けて、各々について生存期間を調べた次第である。いずれにしても、さらに症例を加えて調べる必要があると考えているが、しかし本研究からでもある程度の結論が導き出されるのも事実である。

先に各接着分子の発現状態に注目すると、LCNECではE-カドヘリンおよび α -カテニン発現がそれぞれ83%と67%の頻度でみられたが、SMCC全体での発現は40%と29%で、LCNECに比して明らかに低頻度であり、特に α -カテニンの発現性においてはその傾向が顕著であった。さらにSMCCにおける接着分子の発現頻度をみていくと、まず神経内分泌型と非神経内分泌型に分けて考えるに、E-カドヘリンは前者で45%に、後者では31%に発現がみられ、有意差はなかったが神経内分泌型で発現がやや高かった。一方、 α -カテニンでもそれらが32%、23%とわずかに神経内分泌型に頻度が高いものの有意差はなかった。しかし、神経内分泌型に分類される混合型のSMCCにおいては、両接

着分子の発現が高く、ともに67%に認められた。一方 oat cell type に分類される群ではほとんど発現はみられなかった。生存分析においては神経内分泌形態を呈していてもほとんど発現はみられなかった。従って、神経内分泌形態を呈すか否かはE-カドヘリン、 α -カテニンなどの接着分子の発現とはあまり関係がなさそうである。

生存分析を調べてみると、外科手術材料においては、いずれの組織型においても双方発現群が他の群、つまり非発現群もしくは片方発現群に比して、中間生存期間が長く、予後の良い群として捉えられ、特にLCNEC、混合型のSMCCでは両群の差が明らかであった。また、双方発現群にはLCNECの67%、混合型のSMCCの半数が含まれ、両群の頻度が高い。しかし、classical typeのSMCCではそれらに比して双方発現が20%と低頻度であった。つまり、大細胞癌の成分を有する割合が高い腫瘍ほど、双方発現を示す割合が高い傾向を示し、それはあたかも混合型のSMCCが接着分子発現という機能の面からみるとLCNECと純粋に小型の腫瘍細胞からなるSMCCとの中間的な性格を有しているかの様であった。しかし、中間生存期間を見る限りでは、これらの腫瘍群はclassical typeのSMCCよりはむしろLCNECに近い印象を受けた。また剖検材料において、生存分析の結果からは双方発現群が非発現群に比して有意に予後の良い結果を示しているが、双方発現群と片方発現群の間では有意差を認めなかった。差がみられなかった理由については、双方発現群の占める割合が外科材料で38%、剖検材料で24%とその割合が低いため、剖検材料では固定時間、死後変化などの諸条件により α -カテニンの染色性が低下していた可能性が挙げられる。さらに、今回の検討では、E-カドヘリンに比して α -カテニンの発現頻度が全体的にやや劣り、SMCC全体で、29%にしか認められていない。とくに小型の腫瘍細胞からなる腫瘍群が剖検材料ではほとんどを占め、接着分子の発現傾向のはっきりしたLCNECの症例が少ない。つまり材料による組織型の偏りに起因して

いる可能性も考えられると思われた。

これまでに、肺の非小細胞癌を用いて、E-カドヘリンの発現性を観察し、その発現の低下が脱分化そしてリンパ節転移と相関するという報告が少数あるが^{10), 11)}、SMCCに関する文献では吉田ら¹²⁾の肺小細胞癌株におけるフローサイトメトリーでの発現性をみた報告があるに過ぎず、 α -カテニンに至っては著者の知る限りではまだ報告がない。そのE-カドヘリン、 α -カテニンの構造と予後との関係がSMCCを含めた神経内分泌癌にまで広がって説明されていくことを望まずにはいられない。

いずれにしても、これまで述べてきた結果は形態と機能的性格との間にはある程度相関があり、また機能的性格は予後を反映していることを推測させるものであった。つまりSMCCで神経内分泌形態がはっきりし、かつ大細胞癌成分を有するものは純粋に小細胞からなるものに比して、LCNECに形態上はもちろん、機能的性格までもが類似し、若干予後が良い傾向があるようである。要するにこれらの腫瘍群は純粋に小型の細胞からなるSMCCとは本質的に異なり、むしろLCNECに近い性格を有する腫瘍ではないかと思われた。しかし、これまではLCNECおよび混合型のSMCCの位置付けは研究者によりやや異なり、混合型ではclassical typeのSMCCに比して、化学療法に抵抗性で、臨床的な振る舞いが悪く、予後が悪いとする報告があった^{13), 14)}。この点は本研究の結果とは異なっている。一方、LCNECの方がSMCCよ

り若干予後が良いとの報告があるが¹⁵⁾、同腫瘍はいまだに症例が少ないためか、その統一した見解は見い出されていない。今後さらに症例を重ね、予後、治療成績治療等の検討の必要性があると思われた。

ま と め

SMCCおよびLCNECを含む神経内分泌癌について、E-カドヘリンおよび α -カテニンの発現性に着目し、その発現性と形態像および予後との相関について検討した。神経内分泌性格のはっきりした混合型のSMCCでは、LCNECと同様に両接着因子の発現がみられやすく、かつその発現のみられる症例では予後の良い傾向がみられた。このことは純粋に小型の細胞のみからなるSMCCとは本質的に異なり、混合型のSMCCはむしろLCNECに類似していることが推測された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご指導と校閲を賜りました川崎医科大学病理学教室真鍋俊明教授に深謝いたすと共に、終始有益な御助言と協力を頂いた川崎医科大学内科学(呼吸器)教室中島正光講師に感謝いたします。また同病理学教室の諸先生方ならびに同病院病理部の臨床検査技師各位に感謝いたします。

本研究は厚生省がん研究助成金(向井班)、川崎医科大学プロジェクト研究費(9-305)から援助を受けた。

文 献

- 1) Travis WD, Linnoila RI, Tsokos MG, Hitchcock CL, Cutler GB Jr, Nieman L, Chrousos G, Pass H, Doppman J: Neuroendocrine tumors of the lung with proposed criteria for large cell neuroendocrine carcinoma. An ultrastructural, immunohistochemical, and flow cytometric study of 35 cases. *Am J Surg Pathol* 15: 529-553, 1991
- 2) Steven MS, Valentina RS, Stephen GM: Immunohistochemical evaluation of E-cadherin and Epidermal growth factor receptor in non-small cell lung cancer. *Mod Pathol* 8: 450-455, 1995
- 3) Valerie WR, David SK, Ennapadam SV: Molecular markers help characterize neuroendocrine lung tumors. *Ann Thoracic Surg* 62: 798-810, 1996

- 4) 塩崎 均, 井上雅智, 田村茂行, 土岐祐一郎, 高山卓也, 内田守人: 特集カドヘリン/カテニンと癌転移. 外科 58: 527-532, 1996
- 5) 平山兼三, 仁瓶善郎, 長内孝之, 市川 度, 吉永圭吾, 沢井敏男, 三島好男: 乳癌における E-カドヘリンの発現と予後. 日本臨床 53: 57-56, 1995
- 6) 野村英司, 桜木範明, 藤本征一郎: 子宮体癌 - E-カドヘリン発現の異常と浸潤・転移 -. 日本臨床 51: 51-55, 1995
- 7) 日本肺癌学会編: 肺癌取り扱い規約. 第 4 版. 東京, 金原出版. 1995, pp 231-280
- 8) World Health Organization: Histological typing of lung tumors. Geneva, World Health Organization. 1981, pp 23-25
- 9) Tadaoka Y: Antigen retrieval of E-cadherin with citrate buffer and tween from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue by microwave oven heating. Kawasaki Med J 22: 197-204, 1996
- 10) Bohn M, Totzeck B, Wieland I: Differences of E-cadherin expression levels and patterns in human lung cancer. Ann Hematol 68: 81-83, 1994
- 11) Warren WH, Faber LP, Gould VE: Neuroendocrine neoplasm of the lung. a clinicopathologic. update. J Thoracic Cardiovasc Surg 98: 321-33, 1996
- 12) 吉田浩幸 小林俊介 岡田信一郎: ヒト肺小細胞癌培養細胞における接着因子の発現の検討. 日胸疾会誌 34: 1677-1083, 1996
- 13) Fushimi H, Kikuchi M, Morino H: Detection of large component in small cell lung carcinoma and by combined cytological histologic examination and its clinical implication. Cancer 70: 599-605, 1992
- 14) Radice RA, Matthews MJ, Aisner S: Clinical behavior of mixed small cell/large cell lung cancer, compared to pure small cell carcinoma subtype. Cancer 50: 2894-2902, 1982
- 15) Golby TV, Kosa MN, Travis WD: Tumor of the lower respiratory tract. Atlas of tumor pathology, 3rd series Fasc 13, Washington DC, AFIP, 1995: pp 248-255