

平成 29 年 4 月 28 日

平成 28 年度独立行政法人日本学術振興会
藤田記念医学研究振興基金研究助成事業研究概要報告書

独立行政法人日本学術振興会理事長殿

研究者所属・職 神戸大学医学部附属病院 呼吸器外科 特命准教授
氏 名 田中 雄悟

本助成事業による研究について、次のとおり報告します。

1. 研究課題名	肺大細胞神経内分泌癌における神経内分泌マーカーと抗癌剤感受性に関する研究
(英文名)	A possible association between staining patterns with neuroendocrine markers and tumor response to chemotherapy for pulmonary large cell neuroendocrine carcinoma
2. 研究実施期間	平成 28 年 4 月 1 日～平成 29 年 3 月 31 日
3. 助成金額	1,000,000 円
4. 研究の目的	<p>肺大細胞神経内分泌癌 (LCNEC) について</p> <p>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し、その悪性度は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。</p> <p>LCNEC の術後補助化学療法について</p> <p>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。そのため、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に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。また、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)</p> <p>これまでの研究成果とそれを踏まえた着想</p> <p>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。上記着想より、まず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い、その上で抗癌剤感受性および予後に関わる因子を明らかにすることを今回の研究の目的とした。また、その結果を基に同じ高悪性度神経内分泌癌である小細胞癌への新たな抗癌剤の開発、治療方針への応用が可能と考えている。</p>

5. 研究概要報告

① TP LCNEC cell の作成

これまでの結果より LCNEC が 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）全てに免疫染色される群（Triple positive ; TP 群）と比較しそれ以外の群（Non triple positive ; NTP 群）は術後抗癌剤に対する効果が有意に良好であったため、まず TP を有する LCNEC の cell line（TP 細胞）を作成した。

具体的には、(1)これまで報告されている cell line の使用 (2)LCNEC 切除検体よりの cell line 樹立の 2 通りの方法にて作成を試みたが、NTP 細胞と比較し、TP 細胞を見出し、確認することに難渋した。結果、これまでに報告されている LCNEC cell line のうちで 1 種類のみ TP 細胞であることを確認できたため、その細胞を TP 細胞とし使用することとした。

②NTP LCNEC cell の作成

上記で作成された TP 細胞を用い、NTP の特徴を有する細胞（NTP 細胞）を作成する。具体的には、培養された TP 細胞に siRNA を用い 3 つの神経内分泌タンパク（シナプトフィジン、クロモグラニン A、NCAM）のいずれかの発現を抑制する。

こちらに関しては、まず TP 細胞より 1 種類ずつのタンパク発現について siRNA を用いタンパク発現を抑制できることが確認できた。

③癌細胞の増殖能および浸潤能の検討

上記で確立された TP 細胞と NTP 細胞を用い、癌細胞の増殖および浸潤について評価することとした。具体的には、2 層化コラーゲン半球（Double-layered Collagen Gel Hemisphere ; DL-CGH）に癌細胞を封入することにより、癌浸潤における「癌浸潤における癌幹細胞-宿主由来細胞相互作用」をシミュレートし、細胞運動・接着との関係を観察する。（Tane S, et al. Exp Mol Pathol. 2013 94:330-5）。こちらに関しては、他の肺癌 cell line と比較するため、大細胞癌 cell line、腺癌 cell line を用いることとした。尚、こちらに関して TP 細胞でないこと確認している。現在、得られた細胞を用い、研究を行っているところであるため、結果については現時点では得られていない。

④抗癌剤感受性試験

TP 細胞および NTP 細胞の両群を培養し、CD-DST 法を用い抗癌剤感受性試験を行う。LCNEC はプラチナ製剤にトポイソメラーゼ阻害薬（イリノテカン、エトポシド）の併用が有効とされているため、特にその 2 剤に関して TP 細胞と NTP 細胞の効果を検討する。また、同じ植物アルカロイドである微小管阻害薬（ナベルピン、パクリタキセル、ドセタキセル）についても検討しその効果の違いについても検討することとし、薬剤準備および研究モデルはこれまでに確立した。現在上記同様に cell line を用い、研究中であるため現時点で詳細な結果は得られていない。

⑤当初の研究計画について

当初の計画と比較し、TP 細胞の確認にかなりの期間を要した。LCNEC は比較的稀な腫瘍であり、得られた cell line のほとんどが NTP 細胞であったためである。しかし、現在 TP 細胞は当施設で常時培養可能な状況になっているため、その後の研究は比較的スムーズに進んでいる。他の cell line と TP 細胞、NTP 細胞を比較した増殖能、浸潤能試験および抗癌剤感受性試験を早急に終了させ、得られたデータを解析する予定である。

6. 研究成果の発表について

独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業の英文称：
「JSPS Fujita Memorial Fund for Medical Research」

研究者所属・職 神戸大学医学部附属病院 呼吸器外科 特命准教授
氏 名 田中 雄悟

○論文発表 発表者名、テーマ名、発表誌名・巻号、発刊年月を記入してください。
また、別刷り2部を必ず添付してください。

上記報告の通り、研究計画が予定より遅れている。しかし、現時点では順調に進んでいるため、結果が得られ次第、米誌に投稿予定である。

○口頭発表 発表者名、テーマ名、会合名、発表年月日を記入してください。

2017年第70回日本胸部外科学会学術集会に抄録を投稿中である。

○著 書 著者名、出版社名、刊行年月日、共著または単著の別を明記してください

注：

- (1) 研究成果を学会誌等で発表する場合には、独立行政法人日本学術振興会藤田記念医学研究振興基金研究助成事業による助成を受けた旨を必ず明記して下さい。
また、その別刷り2部を「研究概要報告書」と共に必ず提出して下さい。
- (2) 本基金の助成に係る代表的な論文、口頭発表及び著書にはタイトルの前に○を付けて下さい。