

## Expression Analyses of Genes and Neuroendocrine Markers Recognize Long Survival Subtype of Small Cell Lung Carcinoma.

Wakako HAMANAKA<sup>1)</sup>, Yuichi ISHIKAWA<sup>2)</sup>, Akinori IWASAKI<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> Department of Thoracic Surgery, Faculty of Medicine, Fukuoka University

<sup>2)</sup> Department of Pathology, The Cancer Institute Hospital, Japanese Foundation for Cancer Research

### Abstract:

**Purpose:** Although small-cell lung carcinoma (SCLC) has high chemo-sensitivity, but recurrence by distant metastasis causes unfavorable prognoses. We previously reported that gene expression profiling could identify a good-prognosis subtype of SCLC. Here, we evaluated the subtype using immunohistochemistry to obtain appropriate biomarkers.

**Methods and Results:** Surgical specimens of 30 SCLCs were employed for the comprehensive gene expression analysis using an Affymetrix HG U133 plus 2.0 chips. This analysis successfully duplicated the subtype with significantly good prognosis. We subsequently evaluated the protein expression of neuroendocrine (NE) and basal cell (BA) markers with cases of 39 SCLCs. NE negative patients (n=7) had better survival than NE positive patients ( $p=0.026$ ), whereas there was no survival difference by BA marker expression.

**Conclusion:** The gene expression analysis of SCLC revealed that surgical SCLC had a subset of cases with good prognosis, and this subtype was identified by low NE marker expression.

**Key words:** SCLC, gene expression profiling, protein expression, prognosis

## 網羅的遺伝子発現解析およびタンパク発現解析による 小細胞肺癌の予後因子についての検討

濱中 和嘉子<sup>1)</sup>, 石川 雄一<sup>2)</sup>, 岩崎 昭憲<sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> 福岡大学医学部 呼吸器・乳腺内分泌・小児外科

<sup>2)</sup> がん研究会がん研究所 病理部

要旨：小細胞肺癌は形態学的に小型腫瘍細胞より構成され、機能的には神経内分泌性を持つ肺の悪性腫瘍であり、特に予後不良な組織型として知られている。しかし集学的治療により長期生存する症例や、一般に有効とされる化学・放射線療法に治療抵抗性を示す症例などもあり、多様性に富んでいる。以前、我々は網羅的遺伝子発現解析により小細胞肺癌の予後良好群の抽出が可能であることを示した。今回は別の手法による網羅的遺伝子発現解析を行い、予後良好群では神経内分泌関連の遺伝子発現が弱い事を確認した ( $p=0.0014$ )。さらに3種の神経内分泌マーカーと2種の基底細胞マーカーを用いて、蛋白発現と予後および臨床病理学的特徴との関連について検討を行った。基底細胞癌は形態的に小細胞癌に類似しているが、性質は異なる腫瘍である。その結果、予後良好群では神経内分泌分化に関する遺伝子群の発現および神経内分泌マーカーの発現が低下しており、神経内分泌マーカーが予後因子となることが判明した ( $p=0.026$ )。一方、基底細胞性の有無では予後は不変であった。

キーワード：小細胞肺癌，遺伝子発現解析，マーカータンパク発現，予後因子

はじめに

小細胞肺癌（SCLC）は形態学的に小型腫瘍細胞より構成され、機能的には神経内分泌性をもつ肺の悪性腫瘍であり、全肺癌の15%を占めている。一般的に放射線療法や化学療法への感受性は高いが、再発率は約70%であり、<sup>1,7)</sup> 外科切除の対象となりうる臨床病期I期の症例についても5年生存率が42-66%と予後不良な組織型である。<sup>8) 9)</sup> しかし集学的治療により長期生存する症例や、化学・放射線療法に治療抵抗性を示す症例などもあり、SCLCの多様性を表していると考えられる。

2004年改訂WHO分類では、SCLCの診断には細胞径、核所見など形態学を基にした診断基準が適用され、神経内分泌分化の証明は必須ではない。<sup>10)</sup> しかし実際には低分化扁平上皮癌や基底細胞癌など、形態学のみでSCLCと鑑別するのが困難な症例もある。<sup>11) 12)</sup> 以前、我々は網羅的遺伝子発現解析によりSCLCの予後良好群の抽出が可能であることを示した。<sup>13)</sup> 今回は別の手法をもちいて網羅的遺伝子発現解析を行い、予後因子となりうるタンパクマーカーの抽出と臨床病理学的特徴との関連について検討を行った。

対象と方法

1990年から2004年の間に、がん研究会附属がん研有

明病院（CIH, JFCR）で外科切除されたSCLC 56例のうち、癌細胞のRNA抽出が可能であった30例で遺伝子発現解析を行い、ホルマリン固定パラフィン包埋材料による組織アレイ（tissue array; TA）が作成可能であった39例で蛋白発現を検討した。臨床背景因子は病歴録から情報を抽出し、臨床および病理病期はTNM分類（5版, UICC）と肺癌取り扱い規約（7版）に、<sup>14) 15)</sup> 病理組織診断はWHO分類（2004年度版）に基づき判定した。<sup>10)</sup> すべての検体および患者情報の収集についてはJFCRの倫理委員会で承認を得ておこなった。

1. RNAの抽出と遺伝子発現解析

腫瘍組織は切除後20分以内に病理医が凍結切片で腫瘍細胞を確認し、腫瘍細胞のみを採取して液体窒素で凍結保存した。保存された腫瘍細胞からRNeasy Mini kit（Qiagen）でtotal RNAを抽出し、T7-Oligo（dT）primerを用いてds-cDNAを作成した。このcDNAはGeneChip 3'IVT Express Kit（Affymetrix）でビオチン標識されたcRNAに転写され、断片化したのちにAffymetrix HG U133 plus 2.0 chipへハイブリダイゼーションを行った。データ出力にはGeneChip Scanner 3000とGene Chip Operating Softwareを使用した。データ解析のためにRMA法で正規化を行い、遺伝子発現シグナルが安定していた15,530probe setsを用いて、R ver 2.9.2で階層的クラスター分析を行った。クラスター間で発現差のある

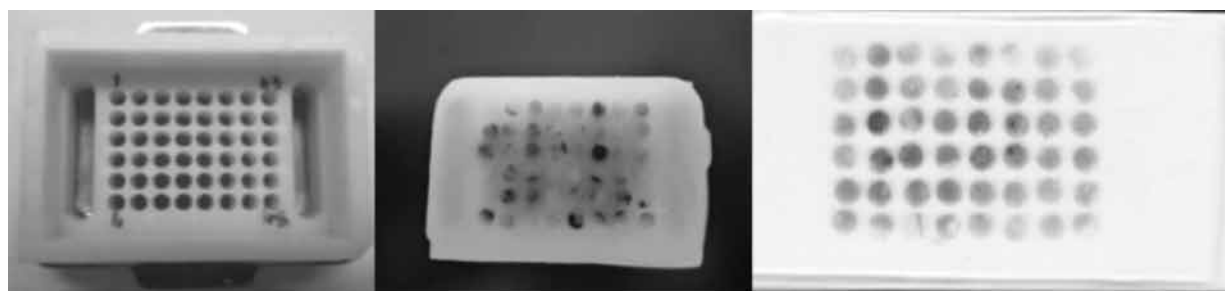


図1 組織アレイの作成。1つのプレパラート上で48個の検体を観察できる。

表1 Antibodies used in this study.

| Antigens       | Company        | Clone code   | Dilution | Ag Retrieval |
|----------------|----------------|--------------|----------|--------------|
| Synaptophysin  | DAKO A0010     | (polyclonal) | × 20     | pH 6         |
| Chromogranin A | DAKO A0430     | (polyclonal) | × 1000   | pH 9         |
| CD56           | NOVO NCL-CD56  | 1B6          | × 50     | pH 9         |
| p63 protein    | LVG MS-1081-P1 | 4A4          | × 100    | pH 6         |
| CK-HMW         | Enzo C34903    | 34βE12       | × 20     | pH 6         |
| Ki67           | DAKO M7240     | MIB-1        | × 50     | pH 6         |

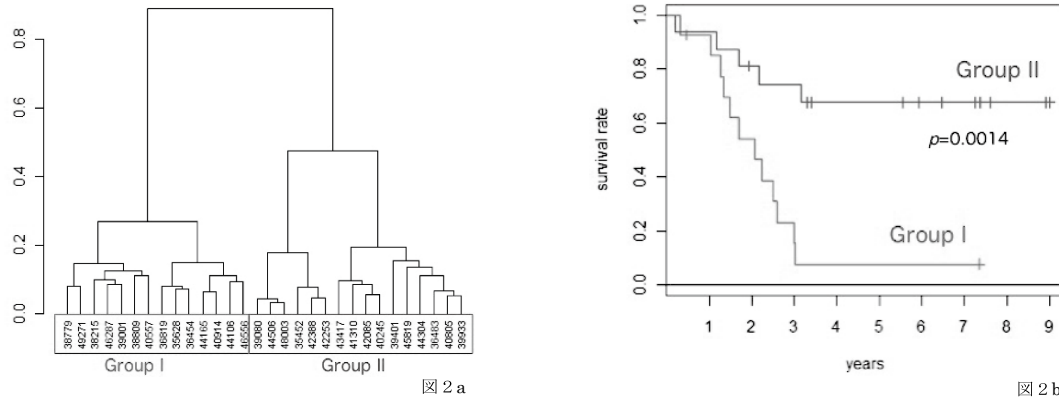


図2 a: Unsupervised hierarchical clustering analysis. SCLC は2群に分かれた。  
b: 両群での生存解析。Group II は明らかに予後良好であった ( $p=0.0014$ )。

表2 Result of gene expression analysis.

| Downregulated in Group II vs Group I |        |          |                  |  |
|--------------------------------------|--------|----------|------------------|--|
| UniGene.ID                           | log2FC | p-value  | Gene.Symbol      | Gene.Title   |
| Hs.704281                            | 7.949  | 2.30E-12 | ASCL1            | achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)   |
| Hs.704281                            | 7.187  | 1.65E-13 | ASCL1            | achaete-scute complex homolog 1 (Drosophila)   |
| Hs.153444                            | 6.347  | 8.54E-9  | GRP              | gastrin-releasing peptide  |
| Hs.89584                             | 6.204  | 1.39E-9  | INSM1            | insulinoma-associated 1  |
| Hs.78977                             | 5.912  | 2.04E-13 | PCSK1            | proprotein convertase subtilisin/kexin type 1  |
| Hs.655499                            | 5.408  | 8.94E-13 | ST18             | suppression of tumorigenicity 18 (breast carcinoma) (zinc finger protein)  |
| Hs.505                               | 5.362  | 3.77E-7  | ISL1             | ISL LIM homeobox 1   |
| Hs.533717                            | 5.169  | 2.73E-6  | DLK1             | delta-like 1 homolog (Drosophila)  |
| Hs.435274                            | 5.061  | 8.12E-7  | SCN3A            | sodium channel, voltage-gated, type III, alpha subunit   |
| Hs.653700                            | 5.042  | 4.47E-8  | ZIC2             | Zic family member 2 (odd-paired homolog, Drosophila)   |
| Hs.334370                            | 4.988  | 2.26E-7  | BEX1             | brain expressed, X-linked 1  |
| Hs.213050                            | 4.900  | 8.94E-13 | ELAVL4           | ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 4 (Hu antigen D)   |
| Hs.695962                            | 4.755  | 9.50E-6  | FOXP1            | forkhead box G1  |
| Hs.1701                              | 4.689  | 6.86E-13 | ELAVL3           | ELAV (embryonic lethal, abnormal vision, Drosophila)-like 3 (Hu antigen C)   |
| Hs.514795                            | 4.683  | 2.98E-8  | NOL4             | nucleolar protein 4  |
| Hs.232618                            | 4.486  | 3.23E-15 | SCG3             | secretogranin III  |
| Hs.8059                              | 4.482  | 5.60E-6  | SYT4             | synaptotagmin IV   |
| Hs.637685                            | 4.480  | 8.05E-9  | NRXN1            | neurexin 1   |
| Hs.703788                            | 4.444  | 4.50E-6  | ---              | ---  |
| Hs.715611                            | 4.417  | 8.54E-11 | SH3GL2           | SH3-domain GRB2-like 2   |
| Hs.167317                            | 4.416  | 2.22E-12 | SNAP25           | synaptosomal-associated protein, 25kDa   |
| Hs.501632                            | 4.403  | 1.63E-8  | CACNA1A          | calcium channel, voltage-dependent, P/Q type, alpha 1A subunit   |
| Hs.503878                            | 4.388  | 3.80E-11 | NCAM1            | neural cell adhesion molecule 1  |
| Upregulated in Group II vs Group I   |        |          |                  |  |
| UniGene.ID                           | log2FC | p-value  | Gene.Symbol      | Gene.Title   |
| Hs.715560                            | -2.324 | 1.19E-5  | GPR126           | G protein-coupled receptor 126   |
| Hs.370515                            | -2.327 | 2.20E-8  | TRIM5            | tripartite motif-containing 5  |
| Hs.374774                            | -2.335 | 0.000    | ANKRD29          | ankyrin repeat domain 29   |
| Hs.2490                              | -2.342 | 3.47E-7  | CASP1            | caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)  |
| Hs.655172                            | -2.342 | 2.07E-5  | ---              | ---  |
| Hs.718429                            | -2.343 | 2.61E-5  | DCN              | decorin  |
| Hs.714337                            | -2.344 | 4.79E-6  | IFIT3            | interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3  |
| Hs.643590                            | -2.349 | 9.95E-7  | AIM1             | absent in melanoma 1   |
| Hs.478275                            | -2.349 | 1.70E-5  | TNFSF10          | tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10  |
| Hs.363396                            | -2.390 | 1.97E-5  | CFH              | complement factor H  |
| Hs.715499                            | -2.392 | 3.92E-5  | TM4SF1           | transmembrane 4 L six family member 1  |
| Hs.104879                            | -2.393 | 3.70E-8  | SERPINB9         | serpin peptidase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9  |
| Hs.558865                            | -2.393 | 0.001    | CES1             | carboxylesterase 1 (monocyte/macrophage serine esterase 1)   |
| Hs.2490                              | -2.419 | 5.46E-8  | CARD16 /// CASP1 | caspase recruitment domain family, member 16 /// caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase) |
| Hs.2962                              | -2.424 | 0.001    | S100P            | S100 calcium binding protein P   |
| Hs.517070                            | -2.425 | 0.002    | SLPI             | secretory leukocyte peptidase inhibitor  |
| Hs.74615                             | -2.426 | 2.68E-5  | PDGFRA           | platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide   |
| Hs.382202                            | -2.428 | 2.23E-5  | CHI3L1           | chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)   |
| Hs.523852                            | -2.431 | 9.10E-6  | CCND1            | cyclin D1  |
| Hs.647071                            | -2.448 | 4.86E-6  | GIMAP2           | GTPase, IMAP family member 2   |
| Hs.173233                            | -2.463 | 0.002    | TMEM100          | transmembrane protein 100  |
| Hs.715499                            | -2.464 | 3.80E-6  | TM4SF1           | transmembrane 4 L six family member 1  |
| Hs.131933                            | -2.466 | 1.94E-9  | PLBD1            | phospholipase B domain containing 1  |

表3 Patients characteristics of resected specimens

| Cases | Diagnosis           | Age<br>(year) | Sex | S.I. | cT | cN | cM | Pre-operative<br>diagnosis | Induction Chemotherapy<br>(Reduction Rate) | Operation         | pT | pN |
|-------|---------------------|---------------|-----|------|----|----|----|----------------------------|--|-------------------|----|----|
| 1     | SCLC                | 76            | M   | 1500 | 2  | 2  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 84%                                | Lobectomy         | 4  | 2  |
| 2     | SCLC                | 57            | M   | 1050 | 4  | 2  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 70%                                | Lobectomy         | 4  | 2  |
| 3     | SCLC                | 67            | M   | 940  | 3  | 2  | 0  | SCLC or LCC                | None                                       | Lobectomy         | 4  | 2  |
| 4     | SCLC                | 59            | M   | 1435 | 2  | 1  | 0  | SCLC                       | Yes CR: scar+                              | Lobectomy         | 2  | 2  |
| 5     | SCLC                | 64            | M   | 400  | 1  | 0  | 0  | poor-diff. ca              | None                                       | Lobectomy         | 1  | 2  |
| 6     | SCLC                | 68            | M   | 1000 | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | None                                       | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 7     | SCLC                | 72            | M   | 680  | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | None                                       | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 8     | SCLC                | 84            | M   | 1200 | 1  | 0  | 0  | Unconfirmed                | None                                       | Partial resection | 1  | 1  |
| 9     | SCLC                | 46            | M   | 940  | 1  | 0  | 0  | SCLC or SQ                 | None                                       | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 10    | Combined Sm+Ad      | 59            | M   | 1480 | 1  | 1  | 0  | AD or LCC                  | None                                       | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 11    | SCLC                | 73            | M   | 960  | 1  | 0  | 0  | SQ                         | None                                       | Lobectomy         | 1  | 0  |
| 12    | SCLC                | 54            | M   | 680  | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 74%                                | Lobectomy         | 1  | 0  |
| 13    | Combined Sm+Ad      | 59            | F   | 0    | 2  | 0  | 0  | AD                         | None                                       | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 14    | SCLC                | 73            | M   | 800  | 1  | 2  | 0  | AD or SCLC                 | Yes PR: 77%                                | Lobectomy         | 1  | 0  |
| 15    | SCLC                | 61            | M   | 375  | 1  | 2  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 79%                                | Lobectomy         | 4  | 2  |
| 16    | SCLC                | 66            | M   | 300  | 1  | 1  | 0  | SCLC                       | Yes SD: 24%                                | Lobectomy         | 1  | 1  |
| 17    | Combined Sm+Spindle | 64            | M   | 1470 | 3  | 0  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 67%                                | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 18    | SCLC                | 67            | M   | 920  | 2  | 2  | 0  | SCLC                       | Yes CR: regrowth+                          | Lobectomy         | 1  | 2  |
| 19    | SCLC                | 57            | M   | 1110 | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | Yes SD: 26%                                | Lobectomy         | 1  | 1  |
| 20    | SCLC                | 79            | M   | 1180 | 2  | 0  | 0  | SCLC                       | None                                       | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 21    | Combined Sm+Ad      | 59            | M   | 675  | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | None                                       | Lobectomy         | 1  | 0  |
| 22    | SCLC                | 76            | M   | 600  | 1  | 0  | 0  | AD or SCLC                 | None                                       | Segmentectomy     | 1  | 0  |
| 23    | SCLC*               | 67            | M   | 2000 | 1  | 2  | 0  | Unconfirmed                | None                                       | Partial resection | 1  | 0  |
| 24    | SCLC                | 53            | M   | 1050 | 2  | 1  | 0  | SCLC                       | None                                       | Pneumectomy       | 4  | 2  |
| 25    | Combined Sm+AS      | 74            | F   | 0    | 2  | 1  | 0  | NSCLC                      | None                                       | Lobectomy         | 2  | 2  |
| 26    | SCLC                | 68            | M   | 1440 | 2  | 0  | 0  | poor-diff. ca              | None                                       | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 27    | SCLC                | 68            | F   | 380  | 2  | 0  | 0  | AD or SCLC                 | None                                       | Lobectomy         | 4  | 1  |
| 28    | SCLC                | 65            | M   | 2400 | 2  | 1  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 51.3%                              | Lobectomy         | 4  | 1  |
| 29    | SCLC                | 64            | F   | 700  | 1  | 0  | 0  | carcinoma                  | None                                       | Lobectomy         | 1  | 0  |
| 30    | SCLC                | 71            | M   | 1060 | 1  | 0  | 0  | SCLC or p/d ca             | None                                       | Lobectomy         | 1  | 1  |
| 31    | Combined Sm+LCNEC   | 63            | F   | 1880 | 3  | 0  | 0  | SQ or SCLC                 | None                                       | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 32    | SCLC                | 74            | M   | 200  | 2  | 1  | 0  | NET                        | None                                       | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 33    | SCLC                | 62            | M   | 1175 | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 69.5%                              | Lobectomy         | 1  | 1  |
| 34    | Combined Sm+LCC     | 70            | M   | 1000 | 1  | 0  | 0  | SCLC or LCC                | None                                       | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 35    | Combined Sm+LCC     | 63            | M   | 3760 | 2  | 0  | 0  | SCLC                       | None                                       | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 36    | SCLC                | 70            | F   | 1000 | 2  | 0  | 0  | SCLC                       | Yes SD: 25.2%                              | Lobectomy         | 2  | 0  |
| 37    | SCLC                | 68            | F   | 160  | 2  | 0  | 0  | SCLC                       | Yes PR: 73%                                | Lobectomy         | 4  | 0  |
| 38    | Combined Sm+Ad      | 80            | M   | 840  | 2  | 0  | 0  | AD                         | None                                       | Lobectomy         | 2  | 2  |
| 39    | SCLC                | 70            | M   | 1000 | 1  | 0  | 0  | SCLC                       | None                                       | Lobectomy         | 1  | 0  |

\* Double synchronous primary carcinoma, SQ and SCLC.

\*\* Invasion of visceral pleura was graded according by Satoh's report15; p1-3 implies that a tumor extends to connective tissues between visceral and parietal pleural membranes.

\*\*\*Unkown means that the patient had treatment at another hospital. † & ‡ Patients had best supportive care because of † poor performance status or ‡ on his own decision.

Abbreviation; SCLC: small cell lung carcinoma, AD; Adenocarcinoma, SQ: squamous cell carcinoma, AS: Adenosquamous cellcarcinoma, LCC: Large cell carcinoma, NSCLC: Non-small cell carcinoma, NET: Neuroendocrine carcinoma, p/d: poorly-differentiated, SI: Smoking Index (No. of tobacco per day × years), CTx: chemotherapy, RTx: radiotherapy, CRTx: chemo-radiotherapy, Ind-CTx: Induction chemotherapy, Adj-CTx: Adjuvant chemotherapy, SD: stable disease, PR: partial response, CR: complete resopnse. RS: Response status, p: pleural invasion, pm: intrapulmonary metastasis, v: vascular invasion, ly: lymphatic involvemnet.

遺伝子を抽出する基準として、Welch's *t* 検定で  $p < 0.01$  かつ log fold-change の絶対値が 2.0 以内とした。

## 2. 組織アレイの作成

外科的に切除された肺組織は 20%ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋した状態で保存した。まず病変主要部を含むパラフィンブロックからプレパラートを作成し、ヘマトキシリン&エオジン (HE) 染色にて病理組織診断を確認した。つづいて腫瘍 1 病変から代表的組織像を呈する 2 カ所を選び、2mm 径で筒状にくり抜き組織アレイを作成した (Azumaya 社, 図 1)。非小細胞肺癌と SCLC の混合症例に関しては、形態学的に SCLC

と診断された組織のみを採取した。

## 3. 免疫染色法による蛋白発現の評価

前述の組織アレイのブロックから 4µm の薄切切片を作り、pH9.0 の EDTA 緩衝液または pH6.0 のクエン酸緩衝液に 40 分間 97°C で加熱し抗原の賦活化を行った。染色には EnVision+DAB 自動染色機 (DAKO 社) を用いた。神経内分泌分化 (NE) の指標として Synaptophysin (SYP), Chromograninn A (CGA), CD56 の抗体を、基底細胞分化 (BA) の指標として p63, 高分子量ケラチン (CK-HMW, clone 34βE12) の抗体を、細胞増殖能の指標として Ki67 (MIB-1) の抗体を使用した (表

| pM | p-stage | Size (mm) | p            | pm | v | ly | Adj-CTx | Reccurrence | Treatent for reccurrence (Regimen) | (RS) | Prognosis | Cause of death      | Group |
|----|---------|-----------|--------------|----|---|----|---------|-------------|------------------------------------|------|-----------|---------------------|-------|
| 0  | IIIB    | 22        | 1            | 1  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | CTx                                | PR   | Dead      | pneumonia           | N+B-  |
| 1  | IV      | 50        | 0            | 2  | 1 | 0  | Yes     | Yes         | CRTx                               | SD   | Dead      | lung cancer         | N+B+  |
| 0  | IIIB    | 70        | 3            | 0  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | CTx                                | SD   | Dead      | lung cancer         | N+B+  |
| 0  | IIIA    | 32        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | CRTx                               | CR   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIA    | 16        | 0            | 0  | 0 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Dead      | unknown             | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 18        | 0            | 1  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N-B-  |
| 0  | IB      | 33        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | Yes         | Unknown***                         |      | Dead      | lung cancer         | N+B+  |
| 0  | IIA     | 20        | 2            | 0  | 1 | 1  | None    | Yes         | Unknown***                         |      | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IB      | 33        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 26        | 0            | 1  | 1 | 1  | None    | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B-  |
| 0  | IA      | 24        | 0            | 0  | 1 | 0  | None    | None        |                                    |      | Dead      | mesentric embolism  | N+B+  |
| 0  | IA      | 22        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | Yes         | CRTx+Op                            | PD   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IB      | 45        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Dead      | unknown             | N+B-  |
| 0  | IA      | 20        | 1            | 0  | 1 | 0  | None    | None        |                                    |      | Dead      | pneumonia           | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 13        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B+  |
| 0  | IIA     | 16        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | CTx                                | PD   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 42        | 3            | 0  | 1 | 0  | Yes     | Yes         | Unknown***                         |      | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIA    | 25        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | CTx                                | PD   | Dead      | lung cancer         | N+B+  |
| 0  | IIA     | 22        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | Yes         | RTx                                | PR   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 40        | 1-3**        | 1  | 1 | 1  | None    | Yes         | RTx                                | CR   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IA      | 20        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B-  |
| 0  | IA      | 19        | 0            | 0  | 1 | 0  | None    | Yes         | CTx                                | SD   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IA      | 15        | 0            | 0  | 0 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N-B-  |
| 0  | IIIB    | 58        | 3(interlob.) | 0  | 1 | 1  | None    | Yes         | None †                             |      | Dead      | lung cancer         | N-B-  |
| 0  | IIIA    | 54        | 0            | 0  | 1 | 1  | None    | Yes         | RTx                                | PD   | Dead      | lung cancer         | N+B+  |
| 0  | IB      | 49        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N-B-  |
| 0  | IIIB    | 48        | 1            | 1  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | RTx                                | CR   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 11        | 0            | 1  | 1 | 1  | None    | None        |                                    |      | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IA      | 30        | 0            | 0  | 0 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Dead      | respiratory failure | N-B-  |
| 0  | IIA     | 20        | 0            | 0  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N-B-  |
| 0  | IIIB    | 80        | 3            | 0  | 1 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N-B-  |
| 0  | IB      | 80        | 1            | 0  | 1 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B-  |
| 0  | IIA     | 15        | 2            | 0  | 1 | 1  | Yes     | Yes         | CRTx                               | PR   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIB     | 23        | 2            | 0  | 1 | 0  | None    | Yes         | None ‡                             |      | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 21        | 0            | 1  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B+  |
| 0  | IB      | 32        | 1-3**        | 0  | 1 | 1  | Yes     | None        |                                    |      | Dead      | unknown             | N+B-  |
| 0  | IIIB    | 53        | 3            | 0  | 1 | 1  | None    | Yes         | CRTx                               | PR   | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IIIA    | 31        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | Yes         | Unknown***                         |      | Dead      | lung cancer         | N+B-  |
| 0  | IA      | 22        | 0            | 0  | 1 | 0  | Yes     | None        |                                    |      | Alive     |                     | N+B-  |

1). 全腫瘍細胞の10%以上で抗体に反応がある場合に蛋白発現ありと判定した。その判定結果を基に SYP, CGA, CD56 のいずれか1つ以上が陽性で NE+ 群とし, 34βE12, p63 のいずれかが陽性で BA+ 群とし, 全症例を N+B-, N+B+, N-B+, N-B- の4群に分類した。各群と臨床病理学的背景および予後の関連について, 各々χ<sup>2</sup>平方検定と Kaplan-Meier 法を用いた log-rank 検定で解析を行った (GraphPad PRISM software, version 5.0b for Machintosh)。生存解析には疾患特異的生存率を使用し, 両側検定の統計的有意水準として  $p < 0.05$  を用いた。

結 果

1. 遺伝子発現解析

網羅的遺伝子解析を行った30例の臨床病理背景は, 男:女 = 21:9例, 年齢(平均値)67歳, 喫煙率90%, 病理病期I期13例(43%)であり, SCLCの一般的な臨床像であった。遺伝子発現シグナルをもとに無作為階層的クラスター解析をおこなったところ, 全症例は

2群(Group I, II:図2a)に分けられ, 両群で生存曲線を比較すると Group IIは明らかに予後良好であった ( $p=0.0014$ , 図2b)。予後因子を検索するため, この2群でとくに発現差のあった遺伝子を抽出したところ, 細胞増殖に関連する遺伝子(G protein-coupled receptor, cyclin D1, Mycなど)が多かったが, 興味あることにNE分化に関連する遺伝子(ASCL1, GRP, NCAM, CHGAなど)の多くが下方抑制されていた(表2)。

2. 神経内分泌分化と予後

遺伝子発現解析の結果をもとに, NE分化の指標となる蛋白の発現を免疫染色法で評価し, 予後因子となるか検討した。対象となった39例には前述の遺伝子発現解析を行った28例が含まれた。臨床背景としては, 男:女 = 32:7例, 年齢(中央値)67歳, 喫煙率95%(37例)であった。術前にSCLCと診断された20例のうち13例(65%)で術前化学療法が行われ, 奏率は低い症例でも25%であった。残り7例はI期症例であり術前化学療法は行われなかった。手術術式は肺葉切除および2群リ

ンパ節廓清を標準的に行ったが、区域切除 1 例 (IA 期)、肺全摘術 1 例 (IIB 期)、部分切除 2 例 (低肺機能 1 例、同時多発肺癌 1 例) も含まれていた。臨床病期は I 期: 23 例、II-III 期: 16 例 (非小細胞肺癌と診断された 6 例、術前化学療法が奏功した 9 例、その他 1 例) であった。病理病期は I 期: 14 例、II-IV 期 25 例であり、9 例が臨床病期より進行度が高い結果であった。組織型としては pure SCLC が 30 例、combined SCLC with other subtypes が 9 例であった (表 3)。

免疫染色法で蛋白発現の評価を行うにあたり、組織アレイおよび自動染色機を用いることで染色条件を一定に保った。また WHO 分類における小細胞肺癌の診断基準は、あくまでも HE 染色のみによる形態学的診断であるため、類似した形態を呈する可能性のある基底細胞癌や低分化扁平上皮癌、カルチノイド腫瘍を鑑別するために、BA 分化および細胞増殖能の程度も併せて検討した。各抗体の陽性率は、SYP 77%、CGA 59%、CD56 74%、34βE12 15%、p63 10% であった (表 4)、全ての NE マーカー陰性例が 7 例 (18%)、1 つ以上の BA マーカー陽性例は 8 例 (20%) 存在したが、N+B- 24 例、N+B+ 8 例、N-B+ 0 例、N-B- 7 例であり、懸念された他の組織型ではなく小細胞肺癌の亜型と考えられた。BA マーカーの発現による背景因子の偏りはなかったが (表 5)、NE マーカー陰性の症例は有意に予後良好であった ( $p=0.026$ , 図 3)。

### 考 察

我々の得た SCLC の遺伝子および蛋白発現解析の結果では、SCLC の予後と神経内分泌分化のマーカー発現には明らかな相関を認めた。すなわち神経内分泌分化のマーカーは SCLC の予後予測因子である可能性が示唆された。今までも Drivsholm らによる CGA 血清レベルと予後の関連<sup>16)</sup>、Lantuejoul らの CD56 の発現と転移の関連<sup>17)</sup>、また Sundaresan らの非小細胞肺癌における神経内分泌蛋白発現とリンパ節転移・進行病期の関連などが報告されているが<sup>18)</sup>、一定の見解がないのが実情である。これまでの報告は単独のマーカーについて論じられているが、本研究のように複数の神経内分泌分化のマーカーを用いて、総合的に SCLC の予後予測が可能か検討した研究はほとんどなかった。

SCLC の約 10% で非典型的な治療経過や予後をとる症例があるといわれている。これらの症例の一部が今回の検討で明らかとなった神経内分泌分化マーカーの発現が低い一群である可能性がある。図 4 に NE+ および NE- 群の代表的な組織像を示すが、いずれも典型的な SCLC の組織像であり、WHO 分類における形態学診断のみでの鑑別は困難である。このことから SCLC においてマーカーを用いて性状診断を行う意義は高いと考えられ

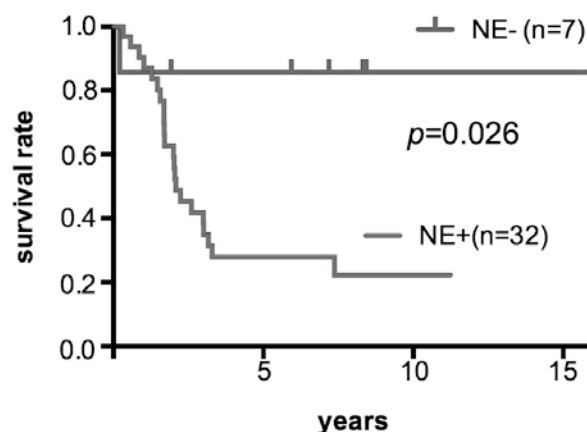


図 3 SCLC と神経内分泌分化の関係。SCLC の癌細胞において神経内分泌マーカー (蛋白) の発現が低い症例は、予後良好である傾向がみられた ( $p=0.026$ )。

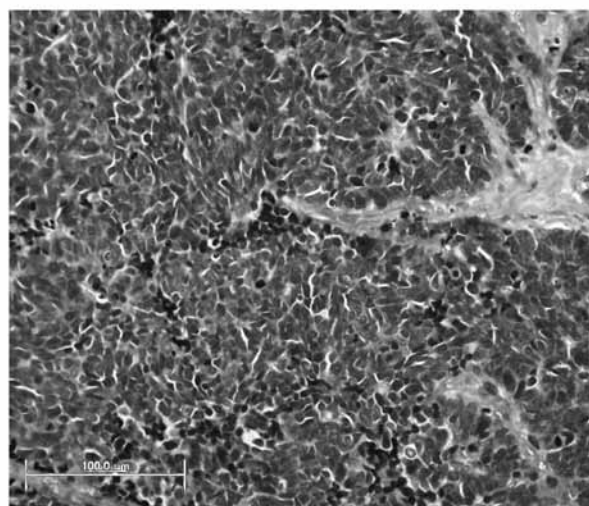


図 4 a

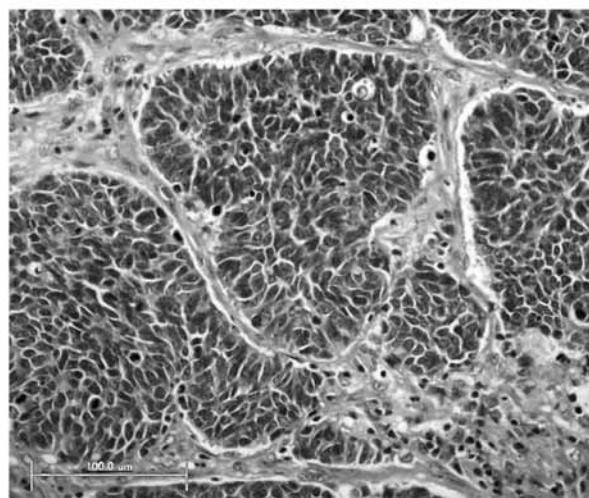


図 4 b

図 4 代表的な組織像。形態学的にはいずれも典型的な SCLC の像であり区別できない。

- a: 神経内分泌マーカーの発現が高い症例 (NE+)
- b: 神経内分泌マーカーの発現が低い症例 (NE-)

表 4 Immunoreactivity score and serum markers

| Cases                  | Ref. No | Immunoreactivity score |     |     |      |    |     |      |         | Serum markers |     |       |      |        | Group |
|------------------------|---------|------------------------|-----|-----|------|----|-----|------|---------|---------------|-----|-------|------|--------|-------|
|                        |         | NE                     | Syn | CGA | NCAM | BA | p63 | K903 | Ki67(%) | CEA           | SCC | CYFRA | NSE  | ProGRP |       |
| 1                      | 29635   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 0    | 20      | 3.9           | 1.1 | --    | --   | --     | N+B-  |
| 2                      | 30017   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 1  | 3   | 0    | 50      | 6.4           | 0.5 | --    | --   | --     | N+B+  |
| 3                      | 30156   | 1                      | 3   | 1   | 1    | 1  | 3   | 1    | 55      | 4             | 1.1 | --    | --   | --     | N+B+  |
| 4                      | 30323   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 0    | 40      | 3.1           | 0.3 | --    | 9.6  | --     | N+B-  |
| 5                      | 30865   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 0    | 15      | 2.3           | --  | --    | --   | --     | N+B-  |
| 6                      | 31160   | 0                      | 1   | 0   | 1    | 0  | 0   | 1    | 50      | 7.1           | 0.5 | --    | 6.7  | --     | N-B-  |
| 7                      | 31401   | 1                      | 3   | 0   | 3    | 1  | 1   | 2    | 55      | 4.2           | 0.7 | --    | 4    | --     | N+B+  |
| 8                      | 32658   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 1    | 35      | 3.9           | 2.1 | --    | --   | --     | N+B-  |
| 9                      | 33130   | 1                      | 3   | 1   | 3    | 0  | 0   | 0    | 50      | 11.2          | --  | --    | --   | --     | N+B-  |
| 10                     | 33587   | 1                      | 3   | 0   | 3    | 0  | 1   | 0    | 45      | 23.9          | --  | --    | --   | --     | N+B-  |
| 11                     | 34802   | 1                      | 3   | 1   | 3    | 1  | 3   | 3    | 35      | 4.1           | 0.9 | --    | --   | --     | N+B+  |
| 12                     | 34947   | 1                      | 3   | 2   | 3    | 0  | 1   | 0    | 60      | 0.8           | 0.7 | --    | 8.8  | --     | N+B-  |
| 13                     | 35452   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 1    | 40      | 5.5           | --  | --    | 4.6  | --     | N+B-  |
| 14                     | 35628   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 1    | 40      | 1.3           | 4   | --    | 3.2  | --     | N+B-  |
| 15                     | 35996   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 1  | 2   | 0    | 70      | 1.1           | --  | --    | 1.9  | --     | N+B+  |
| 16                     | 36454   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 0    | 40      | 3.2           | 1.2 | --    | 7.2  | --     | N+B-  |
| 17                     | 36483   | 1                      | 0   | 1   | 3    | 0  | 1   | 0    | 50      | 3.2           | 1.4 | --    | 5.1  | --     | N+B-  |
| 18                     | 36819   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 1  | 2   | 0    | 60      | 5.4           | 0.2 | --    | 14.3 | --     | N+B+  |
| 19                     | 38779   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 1    | 15      | 2.1           | 0.2 | --    | 7.6  | 70     | N+B-  |
| 20                     | 38809   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 0    | 60      | 6.7           | 0.4 | --    | 8.6  | --     | N+B-  |
| 21                     | 39001   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 1    | 65      | 2.3           | --  | 1.3   | 6.4  | 29.9   | N+B-  |
| 22                     | 39080   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 1    | 45      | 8.4           | --  | --    | --   | --     | N+B-  |
| 23                     | 39401   | 0                      | 0   | 1   | 1    | 0  | 0   | 1    | 30      | 3.6           | 2   | --    | --   | --     | N-B-  |
| 24                     | 39933   | 0                      | 0   | 0   | 1    | 0  | 0   | 1    | 40      | 5.7           | 0.4 | 4.5   | 6.7  | 17.2   | N-B-  |
| 25                     | 40557   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 1  | 3   | 3    | 25      | 2.1           | 0.4 | 3.5   | 7.5  | 20.5   | N+B+  |
| 26                     | 40805   | 0                      | 0   | 0   | 1    | 0  | 0   | 0    | 60      | 3.5           | 0.7 | 1.8   | 6.5  | 25.5   | N-B-  |
| 27                     | 40914   | 1                      | 3   | 1   | 3    | 0  | 1   | 0    | 55      | 15.1          | 0.7 | 2.4   | 6.6  | 72.5   | N+B-  |
| 28                     | 41179   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 1    | 45      | 3.1           | 1   | --    | 3.8  | 151    | N+B-  |
| 29                     | 41310   | 0                      | 0   | 1   | 1    | 0  | 1   | 0    | 40      | 6.3           | 0.3 | 1.8   | 4.9  | 35.3   | N-B-  |
| 30                     | 42085   | 0                      | 1   | 0   | 0    | 0  | 1   | 1    | 50      | 3             | 0.6 | 1.3   | 2.1  | 20.8   | N-B-  |
| 31                     | 42253   | 0                      | 0   | 1   | 0    | 0  | 0   | 0    | 50      | 5.2           | 0.4 | 4.7   | 13   | 26.4   | N-B-  |
| 32                     | 43417   | 1                      | 3   | 0   | 1    | 0  | 0   | 1    | 55      | 1.7           | --  | 2.3   | 10   | 26.6   | N+B-  |
| 33                     | 44106   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 0    | 35      | 2.3           | 0.7 | --    | --   | 78.3   | N+B-  |
| 34                     | 44165   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 1    | 40      | 5.4           | 1   | --    | --   | --     | N+B-  |
| 35                     | 44304   | 1                      | 0   | 1   | 2    | 1  | 0   | 3    | 35      | 3             | 0.4 | --    | --   | 18.6   | N+B+  |
| 36                     | 45819   | 1                      | 3   | 2   | 1    | 0  | 1   | 1    | 75      | 3.9           | --  | --    | --   | 49.6   | N+B-  |
| 37                     | 46287   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 0    | 40      | 5.3           | --  | --    | 23   | 638    | N+B-  |
| 38                     | 49271   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 1   | 1    | 45      | 18.8          | 0.7 | --    | 6.9  | 56.2   | N+B-  |
| 39                     | 50455   | 1                      | 3   | 3   | 3    | 0  | 0   | 0    | 50      | 2.6           | 0.6 | --    | --   | 32.4   | N+B-  |
| Positive ratio (%)     |         | 82                     | 77  | 59  | 74   | 21 | 15  | 10   | 15~75   | 39            | 10  | 33    | 17   | 41     |       |
| N+: positive ratio (%) |         | 100                    | 93  | 71  | 91   | 25 | 19  | 13   | 45.2    | 34            | 9   | 25    | 17   | 58     |       |
| N-: positive ratio (%) |         | 0                      | 0   | 0   | 0    | 0  | 0   | 0    | 45.7    | 57            | 14  | 40    | 17   | 0      |       |

Reference value; CEA: 5.0 ng/ml, SCC: 1.5 ng/ml, CYFRA: 3.5 ng/ml, NSE: 10 ng/ml, ProGRP: 45.9 pg/ml.  
 --: Not evaluated

る。ただし本検討ではNE+群の判定基準を厳しく設定(癌細胞の10%以上で陽性)していること、NSEなどの汎用性のある抗体を使用していないこと、腫瘍全断面で免疫染色をおこなっていないことから、NE-群に関して神経内分泌分化が全くないと結論づけたわけではない。組織学的に核分裂像も多く細胞増殖能が高いこと、かつ神経内分泌腫瘍に特徴的な形態を示していることから、やはりNE-群もSCLCの1亜型と考えている。

今回我々は小細胞肺癌の亜型として、神経内分泌分化のマーカーが低発現である一群が存在することを明らかにし、これらマーカーが予後予測因子となりうることを報告した。SCLCで外科的切除となる症例が少ないため、今後は生検材料などを用いたさらなる検討が必要である。

表5 Comparison of clinicopathologic features in SCLC according to immunoreactivity.

| Variable              | No. of cases<br>n=39 | NE markers     |                 | p     | BA markers      |                | p     |
|-----------------------|----------------------|----------------|-----------------|-------|-----------------|----------------|-------|
|                       |                      | Negative (n=7) | Positive (n=32) |       | Negative (n=31) | Positive (n=8) |       |
| Age (years)           |                      |                |                 | 0.909 |                 |                | 0.745 |
| <60                   | 9                    | 1              | 8               |       | 8               | 1              |       |
| >61                   | 30                   | 6              | 24              |       | 23              | 7              |       |
| Gender                |                      |                |                 | 0.791 |                 |                | 0.947 |
| Male                  | 32                   | 5              | 27              |       | 25              | 7              |       |
| Female                | 7                    | 2              | 5               |       | 6               | 1              |       |
| Smoking status        |                      |                |                 | 0.790 |                 |                | 0.872 |
| Never                 | 2                    | 0              | 2               |       | 1               | 1              |       |
| Smoker                | 37                   | 7              | 30              |       | 30              | 7              |       |
| Tumor size (mm)       |                      |                |                 | 0.706 |                 |                | 0.992 |
| ≤ 30                  | 22                   | 4              | 18              |       | 18              | 4              |       |
| > 30                  | 17                   | 3              | 14              |       | 13              | 4              |       |
| Lymph node metastasis |                      |                |                 | 0.643 |                 |                | 0.461 |
| Negative              | 22                   | 5              | 17              |       | 18              | 3              |       |
| Positive              | 17                   | 2              | 15              |       | 12              | 5              |       |
| N/A                   | 0                    | 0              | 0               |       | 1               | 0              |       |
| Pathological stage    |                      |                |                 | 0.991 |                 |                | 0.759 |
| I                     | 14                   | 3              | 11              |       | 12              | 2              |       |
| II-IV                 | 25                   | 4              | 21              |       | 19              | 6              |       |
| Combined subtypes     | 9                    | 1              | 8               |       | 7               | 2              |       |
| AD                    | 4                    | 0              | 4               |       | 4               | 0              |       |
| SQ                    | 0                    | 0              | 0               |       | 0               | 0              |       |
| AS                    | 1                    | 0              | 1               |       | 0               | 1              |       |
| Spindle               | 1                    | 0              | 1               |       | 1               | 0              |       |
| LCC                   | 2                    | 0              | 2               |       | 1               | 1              |       |
| LCNEC                 | 1                    | 1              | 0               |       | 1               | 0              |       |
| Induction CTx         |                      |                |                 | 0.060 |                 |                | 0.730 |
| Negative              | 24                   | 7              | 17              |       | 19              | 5              |       |
| Positive              | 15                   | 0              | 15              |       | 12              | 3              |       |
| Adjuvant CTx          |                      |                |                 | 0.66  |                 |                | 0.830 |
| Negative              | 11                   | 1              | 10              |       | 9               | 2              |       |
| Positive              | 28                   | 6              | 22              |       | 22              | 6              |       |

BA, basaloid; NE, neuroendocrine;

All were analysed by Chi-square test with Yate's correction.

謝 辞

がん研究所ゲノムセンター, がん研究所病理部の諸先生および技師の方々へ謝意を表します。

文 献

- 1) Karnofsky DA, Abelmann WH, Craver LF, Burchenal JH: The use of the nitrogen mustards in the palliative treatment of carcinoma. *Cancer*: 634-656, 1948.
- 2) Miller AB, Fox W, Tall R: Five-year follow-up of the medical research council comparative trial of surgery and radiotherapy for the primary treatment of small-celled or oat-celled carcinoma of the bronchus. *the Lancet* Sep: 501-505, 1969.
- 3) Green RA, Humphrey E, Close H, Patno ME: Alkylating agents in bronchogenic carcinoma. *Am J Med* 46: 516-525, 1969.
- 4) Pujol JL, Carestia L, Daures JP: Is there a case for cisplatin in the treatment of small-cell lung cancer? A meta-analysis of randomized trials of a cisplatin-containing regimen versus a regimen without this alkylating agent. *Br J Cancer* 83: 8-15, 2000.
- 5) Pignon JP, Arriagada R, Ihde DC, Johnson DH, Perry MC, Souhami RL, Brodin O, Joss RA, Kies MS, Lebeau B, et al.: A meta-analysis of thoracic radiotherapy for small-cell lung cancer. *N Engl J Med* 327: 1618-1624, 1992.
- 6) Elias AD: Small cell lung cancer: state-of-the-art therapy in 1996. *Chest* 112: 251S-258S, 1997.
- 7) Nicholson SA, Beasley MB, Brambilla E, Hasleton PS, Colby TV, Sheppard MN, Falk R,



- Travis WD: Small cell lung carcinoma (SCLC): a clinicopathologic study of 100 cases with surgical specimens. *Am J Surg Pathol* 26: 1184-1197, 2002.
- 8) Tsuchiya R, Suzuki K, Ichinose Y, Watanabe Y, Yasumitsu T, Ishizuka N, Kato H: Phase II trial of postoperative adjuvant cisplatin and etoposide in patients with completely resected stage I-IIIa small cell lung cancer: the Japan Clinical Oncology Lung Cancer Study Group Trial (JCOG9101). *J Thorac Cardiovasc Surg* 129: 977-983, 2005.
- 9) Asamura H, Kameya T, Matsuno Y, Noguchi M, Tada H, Ishikawa Y, Yokose T, Jiang SX, Inoue T, Nakagawa K, et al.: Neuroendocrine neoplasms of the lung: a prognostic spectrum. *J Clin Oncol* 24: 70-76, 2006.
- 10) Travis WD, Brambilla E, Muller-Hermelink HK, Harris CC (eds.): *Pathology and Genetics of Tumours of the Lung, Pleura, Thymus and Heart (World Health Organization Classification of Tumours)*. Lyon, IACR Press, 2004.
- 11) Viberti L, Bongiovanni M, Croce S, Bussolati G: 34betaE12 Cytokeratin Immunodetection in the Differential Diagnosis of Small Cell Tumors of Lung. *Int J Surg Pathol* 8: 317-322, 2000.
- 12) Sturm N, Lantuejoul S, Laverriere MH, Papotti M, Brichon PY, Brambilla C, Brambilla E: Thyroid transcription factor 1 and cytokeratins 1, 5, 10, 14 (34betaE12) expression in basaloid and large-cell neuroendocrine carcinomas of the lung. *Hum Pathol* 32: 918-925, 2001.
- 13) Jones MH, Virtanen C, Honjoh D, Miyoshi T, Satoh Y, Okumura S, Nakagawa K, Nomura H, Ishikawa Y: Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles. *Lancet* 363: 775-781, 2004.
- 14) UICC: *TNM classification of malignant tumours*, 5th eds. Geneva: UICC, 1997.
- 15) Society TJLC: *General Rule for Clinical and Pathological Record of Lung Cancer (The 6th Edition)*. Tokyo: Kanehara, 2003.
- 16) Drivsholm L, Paloheimo LI, Osterlind K: Chromogranin A, a significant prognostic factor in small cell lung cancer. *Br J Cancer* 81 (4): 667-671, 1991.
- 17) Lantuejoul S, Moro D, Michalides RJ, Brambilla C, Brambilla E: Neural cell adhesion molecules (NCAM) and NCAM-PSA expression in neuroendocrine lung tumors. *Am J Surg Pathol* 22: 1267-1276, 1998.
- 18) Sundaresan V, Reeve JG, Stenning S, Stewart S, Bleehen NM: Neuroendocrine differentiation and clinical behaviour in non-small cell lung tumours. *Br J Cancer* 64 (2): 333-338, 1991.

(平成 25. 7. 25 受付. 平成 25. 10. 10 受理)

