

平成 30 年 6 月 15 日現在

機関番号：82606

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08373

研究課題名(和文) 融合遺伝子肺癌の腫瘍内多様性獲得がコンパニオン病理診断に及ぼす影響

研究課題名(英文) Intratumoral heterogeneity of lung cancer and its influence on the companion diagnostics

研究代表者

元井 紀子 (Motoi, Noriko)

国立研究開発法人国立がん研究センター・中央病院・医長

研究者番号：70292878

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌は新規治療法が多数開発されているが、精密医療の推進には適切なコンパニオン病理診断(CD)の確立が急務である。本研究では、CD結果の不一致の原因として腫瘍内多様性を想定し、その影響と機序を解析した。結果、ALK、EGFR肺癌ではドライバー変異は多様性獲得の過程でも維持されるが、mRNA、遺伝子発現の変化や形態変化は多様であり耐性獲得の一因と考えられた。また、MET肺癌ではタンパク発現は不均一でありCDとしてIHCの有効性は低かった。PD-L1 IHCは発現が多様であり、精度管理と技術革新による再現性の担保が今後の課題である。

研究成果の概要(英文)：It is one of the urgent issue to establish an appropriate companion diagnostic system to proceed precision medicine in oncology, especially lung cancer in which many targetable genomic and immunological alteration have been explored. The aim of this study is to explore the mechanism of discordancy and inappropriate results in pathological companion diagnostics of lung cancer, especially focusing on its intratumoral heterogeneity. Our results indicated that the morphological heterogeneity was the sum of genomic and epigenomic alterations, and the fundamental driver oncogenic mutation (such as ALK) was retained through progression, then modified by the additional alterations. Of lung cancer with MET exon 14 skipping mutation, morphology and/or IHC based system had low power for screening. Our study suggested the importance of quality control of PD-L1 IHC as a biomarker of ICI therapy and needs for further technical innovation to reproducibility.

研究分野：Pathology

キーワード：Lung Cancer Biomarker Tumor heterogeneity Companion diagnostic PD-L1 ALK MET

1. 研究開始当初の背景

肺癌は代表的な難治癌であるが、遺伝子再構成(融合遺伝子)などにより driver oncogene が活性化している一群が存在する。一般にその頻度は低く、代表的な ALK 融合遺伝子肺癌で 3 - 7%、その他の融合遺伝子関連全体で 10%程度と推定されており、正確かつ効率的な診断が求められている。融合遺伝子癌は、治療標的となるため個別化医療の観点から世界的に精力的に探索されている。次世代シーケンス技術などの進歩で今後も多数の融合遺伝子が同定されることと予測されるが、臨床医療では先進的技術から汎用技術への翻訳が必要である。特に融合遺伝子肺癌は免疫染色、ISH による検出が容易と想定されるため、コンパニオン病理診断として、判定基準の設定、判定に影響を与える因子と機序の解明が待たれている。

個別化医療に対応するコンパニオン病理診断に関して、大きく 3 つの課題がある。

課題 1. コンパニオン病理診断の検索手法による結果不一致例が問題となっている。

課題 2. 肺癌の腫瘍内多様性はコンパニオン病理診断の結果に影響するか?

課題 3. 微小検体を用いるコンパニオン診断の需要増加と問題点

これらの課題への対応を探索し、指摘なコンパニオン診断システム構築への貢献を目指す。

2. 研究の目的

本研究は、肺癌の病理学的特性と遺伝子異常との関連性を解明し、遺伝子異常を標的とした個別化医療への橋渡し研究を推進するものである。病理組織学的診断は現在最も普及した癌の診断方法だが、近年の技術革新に伴い次々と新規標的遺伝子異常が発

見られるため、適切なコンパニオン病理診断(CD)が求められている。

ALK 融合遺伝子肺癌では、CD 結果の不一致例があり問題となっている。本研究では、不一致の原因として想定される腫瘍内不均一性 = 多様性 (intratumoral heterogeneity) が ALK, RET, ROS 融合遺伝子肺癌の CD 結果および免疫チェックポイント阻害剤の CD である PD-L1 IHC 評価に与える影響と機序を検討することを目的とする。特に微小検体を用いたコンパニオン病理診断の適切な診断基準の確立を目指す。

1. 肺癌切除検体を用いて、形態学的に異なる領域で driver oncogene mutation を含みゲノム変異・発現状態を比較検討する
2. 切除検体と対応する生検、細胞診などの微小検体で、腫瘍内多様性がコンパニオン病理診断結果へ与える影響を評価する
3. コンパニオン病理診断結果が不一致となる要因、機序を解析する

3. 研究の方法

1 組織学的に違いのある領域で、標的遺伝子産物のタンパク発現レベルを免疫染色で、遺伝子構造異常の状態を FISH で検索する。この結果から、標的遺伝子変異状態に腫瘍内多様性が存在するかどうかを解明する。

2 切除検体と微小生検検体の、組織像の対応、免疫染色、FISH の結果を比較検討する。この結果から、微小検体を用いる CD の問題点を解明する。

3 コンパニオン診断に影響する因子として、検体固定条件および染色条件の比較検討を行い、結果に影響する因子の探索を行う。

4. 研究成果

(1) ALK 肺癌、(2) 免疫チェックポイント阻害剤のバイオマーカー PD-L1 IHC、(3) 肺癌の形態変化と遺伝子変異・タンパク発現の変化、(4) PD-L1 IHC 評価に影響する因子の検討、さらに(5) 新たな分子標的として MET ex14 skipping (MET14skp) 変異陽性肺癌の臨床病理学的特徴と IHC による CD の可能性について検索した。

(1) ALK 肺癌の組織像の多彩を評価し、腺癌から多形癌成分を含む症例について組織像が異なる領域での免疫染色、FISH、mRNA 遺伝子発現解析の相違を検索した。その結果、タンパク発現および染色体構造変化、ALK 融合遺伝子型は領域による変化に乏しいが、mRNA 発現で差がある遺伝子群があった。ドライバー遺伝子である ALK 融合遺伝子は保存され、付加的遺伝子異常が表現型として形態像の変化と関連することを示した。

(2) PD-L1 発現は組織内分布に差があり、不均一で多様性があることが示された。また、PD-L1 免疫染色に関して前処理、免疫染色実施、評価の各段階で結果が変動する要因を解析している。

(3) 組織亜型に類似性のある腺癌の中で、間質性肺炎合併する肺癌として独特の遺伝子変異を持つサブグループを抽出し、臨床病理学的意義を検索した。

(4) PD-L1 IHC の結果には、固定液、固定時間、抗体クローン、染色条件が影響すること、体外診断薬と LDT の結果は異なる場合があることを明らかにした。PD-L1 IHC の標準化には、結果判定方法に加え、検体処理、染色過程を含めた適切な病理検査の精度管理の必要性が示された。また、セルブロック、細胞診検体では、検体作成

過程の標準化、細胞診断の精度管理の重要性が示された。

(5) MET14skp 肺癌 7 例を収集し検討した。肺腺癌の 1.2% と稀で、比較的多形癌が多く、淡明細胞の出現は特徴的だが、多彩であることを報告した。IHC での c-MET の発現は症例により異なり、形態所見との関連はあるが、発現が部分的で弱い症例もあることが判明した。pMET は全例陰性であった。本研究の条件では、IHC によるスクリーニングは困難であった。

ALK、EGFR 肺癌ではドライバー変異は多様性獲得の過程でも維持されるが、mRNA、遺伝子発現の変化や形態変化は多様であり耐性獲得の一因と考えられた。肺癌の形態学的多様性は、遺伝子発現の変化と対応していることを示した。ドライバーとなる遺伝子に加え、付加的遺伝子異常の解析により癌の進展機序への関与が解明できる可能性があり、今後は、多形癌など形態学的多様性のある組織型や、臨床的特徴のある腫瘍での解析を進めたい。また、MET 肺癌ではタンパク発現は不均一であり CD として IHC の有効性は低かった。PD-L1 IHC は発現が多様であり、精度管理と技術革新による再現性の担保が今後の課題である。

(付記：本稿では、バイオマーカー病理診断の意味で CD を用いている)

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 26 件)

1. Yoshimoto T, Motoi, N, Yamamoto N, Nagano H, Ushijima M, Matsuura M, et al. Pulmonary carcinoids and low-grade gastrointestinal neuroendocrine tumors show common microRNA expression profiles, different from adenocarcinomas and small

- cell carcinomas. *Neuroendocrinology*. 2017;doi: 10.1159/000461582.
2. Yoshida A, Kobayashi E, Kubo T, Kodaira M, Motoi T, Motoi, N, et al. Clinicopathological and molecular characterization of SMARCA4-deficient thoracic sarcomas with comparison to potentially related entities. *Mod Pathol*. 2017;30(6):797-809.
 3. Thunnissen E, Borczuk AC, Flieder DB, Witte B, Beasley MB, Chung JH, et al. The use of Immunohistochemistry Improves the Diagnosis of Small Cell Lung Cancer and its Differential Diagnosis. An international reproducibility study in a demanding set of cases. *J Thorac Oncol*. 2017;12(2):334-46.
 4. Suzuki S, Sakurai H, Masai K, Asakura K, Nakagawa K, Motoi, N, et al. A Proposal for Definition of Minimally Invasive Adenocarcinoma of the Lung Regardless of Tumor Size. *Ann Thorac Surg*. 2017;104(3):1027-32.
 5. Shiraishi H, Fujiwara Y, Kakuya T, Tsuta K, Motoi, N, Miura N, et al. Actinin-4 protein overexpression as a predictive biomarker in adjuvant chemotherapy for resected lung adenocarcinoma. *Biomark Med*. 2017.
 6. Sakakibara R, Inamura K, Tambo Y, Ninomiya H, Kitazono S, Yanagitani N, et al. EBUS-TBNA as a Promising Method for the Evaluation of Tumor PD-L1 Expression in Lung Cancer. *Clinical Lung Cancer*. 2017;18(5):527-34.e1.
 7. Okubo Y, Matsumoto Y, Nakai T, Tsuchida T, Asakura K, Motoi, N, et al. The new transbronchial diagnostic approach for the metastatic lung tumor from renal cell carcinoma-a case report. *J Thorac Dis*. 2017;9(9):E762-E6.
 8. Mori S, Uehara H, Motoi, N, Okumura S. Pulmonary artery sarcoma presenting as an isolated lung mass. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*. 2017;65(3):171-4.
 9. Mori S, Motoi, N, Ninomiya H, Matsuura Y, Nakao M, Mun M, et al. High expression of programmed cell death 1 ligand 1 in lung adenocarcinoma is a poor prognostic factor particularly in smokers and wild-type epidermal growth-factor receptor cases. *Pathology International*. 2017;67(1):37-44.
 10. Masai K, Sakurai H, Sakeda A, Suzuki S, Asakura K, Nakagawa K, et al. Prognostic Impact of Margin Distance and Tumor Spread Through Air Spaces in Limited Resection for Primary Lung Cancer. *Journal of Thoracic Oncology*. 2017:(In press).
 11. Büttner R, Gosney JR, Skov BG, Adam J, Motoi, N, Bloom KJ, et al. Programmed Death-Ligand 1 Immunohistochemistry Testing: A Review of Analytical Assays and Clinical Implementation in Non-Small-Cell Lung Cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2017;35(34):3867-76.
 12. Shigenobu T, Motoi, N, Asamura H, Watanabe SI, Hiraoka N, Yoshida A. Giant lamellar bodies associated with adenocarcinoma of the lung. *Histopathology*. 2016;69(6):1090-2.
 13. Saito Y, Nagae G, Motoi, N, Miyauchi E, Ninomiya H, Uehara H, et al. Prognostic significance of CpG island methylator phenotype in surgically resected small cell lung carcinoma. *Cancer Sci*. 2016;107(3):320-5.
 14. Masai K, Tsuta K, Motoi, N, Shiraishi K, Furuta K, Suzuki S, et al.

- Clinicopathological, Immunohistochemical, and Genetic Features of Primary Lung Adenocarcinoma Occurring in the Setting of Usual Interstitial Pneumonia Pattern. *J Thorac Oncol*. 2016;11(12):2141-9.
15. Kuroda H, Sakao Y, Mun M, Motoi, N, Ishikawa Y, Nakagawa K, et al. Therapeutic value of lymph node dissection for right middle lobe non-small-cell lung cancer. *J Thorac Dis*. 2016;8(5):795-802.
 16. Katayama R, Sakashita T, Yanagitani N, Ninomiya H, Horiike A, Friboulet L, et al. P-glycoprotein Mediates Ceritinib Resistance in Anaplastic Lymphoma Kinase-rearranged Non-small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine*. 2016;3:54-66.
 17. Horiike A, Takeuchi K, Uenami T, Kawano Y, Tanimoto A, Kaburaki K, et al. Sorafenib treatment for patients with RET fusion-positive non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2016;93:43-6.
 18. Sato S, Motoi, N, Hiramatsu M, Miyauchi E, Ono H, Saito Y, et al. Pulmonary Adenocarcinoma In Situ: Analyses of a Large Series With Reference to Smoking, Driver Mutations, and Receptor Tyrosine Kinase Pathway Activation. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(7):912-21.
 19. Samejima J, Nakao M, Matsuura Y, Uehara H, Mun M, Nakagawa K, et al. Prognostic impact of bulky swollen lymph nodes in cN1 non-small cell lung cancer patients. *Jpn J Clin Oncol*. 2015;45(11):1050-4.
 20. 橋本大輝, 元井紀子. 肺癌の病理コンパニオン診断 update. *肺癌*. 2018;58(2):77-82.
 21. 元井紀子. 肺癌 I 腺癌亜型の診断法: micropapillary and STAS. *病理と臨床*. 2016;34(3):273-9.
 22. 石川雄一, 元井紀子. 神経内分泌癌(2)大細胞神経内分泌癌および特殊型(混合型大細胞神経内分泌癌). In: 深山正久, 野口雅之, 松野吉宏, editors. *腫瘍病理鑑別診断アトラス 肺癌*: 文光堂; 2015. p. 61-3.
 23. 石川雄一, 元井紀子. 神経内分泌癌(1)小細胞癌とその特殊型(混合型小細胞癌). In: 深山正久, 野口雅之, 松野吉宏, editors. *腫瘍病理鑑別診断アトラス 肺癌*: 文光堂; 2015. p. 56-60.
 24. 元井紀子, 石川雄一. カルチノイド腫瘍. In: 深山正久, 野口雅之, 松野吉宏, editors. *腫瘍病理鑑別診断アトラス 肺癌*: 文光堂; 2015. p. 119-32.
 25. 元井紀子. 【病理診断クイックリファレンス】(第3章)肺・胸膜・縦隔(腫瘍)カルチノイド腫瘍. *病理と臨床*. 2015;33(臨増):26.
 26. 元井紀子. 【病理診断クイックリファレンス】(第3章)肺・胸膜・縦隔(腫瘍)小細胞癌. *病理と臨床*. 2015;33(臨増):27.
- 〔学会発表〕(計 45 件)
1. Motoi, N, Sunami K, Ohe Y, Watanabe S-i, Kohno T. Lung adenocarcinoma with MET exon 14 skipping mutation; clinicopathological characteristics and immunohistochemical MET expression. 107th Annual Meeting of USCAP; 2018/3/19; Vancouver, Canada2018.
 2. Watanabe S, Goto Y, Motoi, N, Kohno T, Sato J, Morita R, et al. EGFR Amplification Mediates Resistance to TAS121, A Third-Generation EGFR-TKI, in EGFR T790M-Positive Non-Small Cell Lung Cancer. the 18th World Conference on Lung Cancer; Yokohama2017.
 3. Sugiyama M, Hashimoto T, Yoshida K, Shibuki Y, Watanabe S, Motoi, N. PD-L1

IHC Test on Cytological Cell Block Specimen; Potential Utility and Practical Issues. The 18th World Conference on Lung Cancer of the International Association for the Study of Lung Cancer (IASLC); 2017/10/17; Yokohama, Japan2017.

4. Motoi, N, Yotsukura M, Sukeda A, Watanabe S-i, editors. Neoplastic Architectural Remodeling as an Aggressive Histological Indicator of Early Stage Lung Adenocarcinoma. 2017 USCAP Annual Meeting 2017 2017/3/6; San Antonio, TX, USA.

5. Sakakibara R, Motoi, N, Ninomiya H, Inamura K, Nishio M, Ishikawa Y. Usefulness and Limitation of Endobronchial Ultrasound Transbronchial Needle Aspiration (EBUS) Specimen for PD-L1 Companion Diagnosis in Lung Cancer. 2016 Annual Meeting of USCAP; 2016/3/16; Seattle, WA, USA2016.

6. Motoi, N, Matsuura Y, Ninomiya H, Nagano H, Kakita T, Okumura S, et al., editors. Diagnostic Value of Immunohistochemical ROS1 Expression in ROS1-Lung Cancer. 2015 USCAP Annual Meeting 2015; Boston, MA, USA.

7. 元井 紀子. ALK 肺癌の病理診断: 科学的視点と実臨床の狭間(ランチョンセミナー). 第 63 回日本病理学会 秋期特別総会; 日本教育会館 (東京都千代田区一ツ橋) 2017.

8. 元井 紀子, 林 雄, 蔦 幸, 石井 源. 非小細胞肺癌における PD-L1 検査の現状と将来展望. 日本病理学会会誌. 2017;106(1):563.

9. 元井 紀子. 肺癌の病理診断と PD-L1 免疫染色. 日本病理学会会誌. 2017;106(1):552.

10. 元井 紀子. PD-L1 発現に影響する免疫染色条件の比較検討. 肺癌.

2017;57(5):452.

11. 吉田和広, 澁木康雄, 時田和也, 杉山迪子, 橋本大輝, 元井 紀子. 呼吸器細胞診における免疫染色の肺癌組織型推定診断への応用について. 第 56 回 日本臨床細胞学会秋期大会; 2017; 福岡. 他

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ:

<http://www.jfcr.or.jp/laboratory/department/pathology/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

元井 紀子 (MOTOI, Noriko)

国立がん研究センター中央病院・病理・臨床検査科・医長(2015年10月より)

がん研究会がん研究所・病理部・主任研究員(2015年9月まで)

研究者番号: 70292878

(2) 研究分担者 なし

(3) 連携研究者

石川雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)

がん研究会がん研究所・病理部・部長

研究者番号: 80222975

奥村 栄 (OKUMURA, Sakae)

がん研究会がん研有明病院・呼吸器外科・部長

研究者番号: 40465935

西尾誠人 (NISHIO, Makoto)

がん研究会がん研有明病院・呼吸器内科・部長

研究者番号: 00281593

(4) 研究協力者

なし