

令和元年6月4日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10699

研究課題名(和文) 難治組織肺癌である肺多形癌の病態解明・治療開発を目指した分子病理学的研究

研究課題名(英文) Pathological and molecular study of lung pleomorphic carcinomas to clarify the pathogenesis and develop novel treatment strategy

研究代表者

菱田 智之(Hishida, Tomoyuki)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・准教授

研究者番号：40544664

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,600,000円

研究成果の概要(和文)：肺癌の中でも特に高悪性度である、多形癌を含む「肉腫様成分を含む肺癌」を対象とし、新規治療開発を目指した臨床病理学的解析を行なった。

23例の検討では、5年無再発生存割合は56%。再発は8例(35%)に認められたが、7例は術後1年以内の再発で、再発後生存期間中央値は3ヶ月であった。一方、5年無再発生存を6例(26%)に認めた。「肉腫様成分」を含む肺癌は、過去の報告同様、早期再発を来し再発後予後も不良である一方で、長期無再発生存例も存在することが示唆された。対象症例はDNA断片化が著明であったため、対象を近年の症例から再抽出し、遺伝子異常、DNAメチル化異常のprofilingを行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多形癌に代表される「肉腫様成分を含む肺癌」は、原発性肺癌の中でも増殖が速く、他臓器やリンパ節に転移しやすい悪性度が高い腫瘍である。完全切除されても、術後再発は高頻度であり、また、現状の化学療法や放射線療法には抵抗性で、肺腺癌におけるEGFR遺伝子変異やALK融合遺伝子などの有効な治療標的も同定されていない。本研究は、難治癌である「肉腫様成分を含む肺癌」の新規治療開発の足がかりとなる基盤を構築するものであり学術的かつ社会的意義は非常に大きい。

研究成果の概要(英文)：We performed clinicopathological and molecular study to clarify pathogenesis of lung cancer with sarcomatous component (LCSC) including pleomorphic carcinoma, which has high-grade malignancy. We reviewed our medical record and identified 23 patients who underwent resection for LCSC from 1996 to 2011. The 5-year recurrence-free survival was 56%, and 8 (35%) patients developed recurrence. Among them, 7 had recurrence within 1 year after surgery, and median post-recurrence survival was only 3 months. On the other hand, 5-year recurrence-free survivors were found in 6 (26%) patients, which suggested that LCSC might have 2 groups in terms of biological behavior; the poor outcome group as shown in previous studies and the favorable outcome group. Next, we conducted molecular analysis to clarify biological signatures in sarcomatous component, a characteristic component associating with malignant behavior of LCSC, comparing with non-sarcomatous component and non-cancerous area of each case.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：呼吸器外科学 病理学

1. 研究開始当初の背景

「肉腫様成分」を含む肺癌は、WHO 分類では、多形癌、紡錘細胞癌、巨細胞癌、癌肉腫、肺芽腫から構成され、原発性肺癌の中でも増殖が速く、他臓器やリンパ節に転移しやすい悪性度が高い腫瘍である。手術により完全切除が成されても、術後再発は高頻度であるが、現状の化学療法や放射線療法には抵抗性であり、肺腺癌における EGFR 遺伝子変異や ALK 融合遺伝子などの有効な治療標的も同定されていない。

多形癌に代表される「肉腫様成分」を含む肺癌の頻度は、肺癌全体の約 0.3-1.3%と極めて稀であるが、近年、病理医間でこの組織群の認知度が高まっており、今後、「肉腫様成分」を含む肺癌と診断される症例が増加することが予想されるが、新規治療開発につながる病態の解明は全くと言ってよいほど進んでいない。同癌の予後の改善には、従来の作用機序とは異なる新たな治療法の開発が極めて重要である。

2. 研究の目的

本研究は、肺癌の中でも特に高悪性度である、「肉腫様成分」を含む肺癌を対象とし、標的遺伝子群の解析を行い、新しい治療法を確立することを目的とする。通常の原因性肺癌にはみられない、「肉腫様成分」の出現が高い悪性度の元凶と考えられるが、紡錘形細胞の出現に関与する因子を明らかにすることで、「肉腫様成分」を含む肺癌の新規治療開発への道筋をつけることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 症例の抽出、研究用データベースの作成

対象の病理標本を集積し、WHO 分類の「肉腫様成分」を含む肺癌（多形癌、紡錘細胞癌、巨細胞癌、癌肉腫、肺芽腫）の診断基準を満たしているかどうかを確認する。確認後、年齢、性別、喫煙指数、病理病期、再発の有無、予後などの臨床因子を確認し、本研究用のデータベースを作成する。

(2) 組織マイクロアレイの作成およびゲノム DNA の抽出

免疫染色および遺伝子解析に耐え得る十分な組織量を持つことを確認した後、ホルマリン固定パラフィン包埋病理組織標本 (FFPE) より腫瘍部および非癌部の組織塊を Tissue microarray (TMA) 作成時に棒状に打ち抜く。次いで、FFPE からのゲノム抽出に最適な DNA 抽出キットを用いて、腫瘍部および非癌部からゲノム DNA を抽出する。なお、「肉腫様成分」に加えて、通常の非小細胞癌成分が存在する腫瘍（多形癌など）では、腫瘍部は「肉腫様成分」および非小細胞癌成分それぞれからゲノム DNA を抽出する。

(3) ゲノム DNA の遺伝子解析

カスタムパネルを用いたターゲットシーケンスにより、がん関連遺伝子のシーケンスを行う。用いるカスタムパネルは、抽出できたゲノム DNA 量や状態によって最適なものを選択するが、遺伝子変異に加えて、増幅や融合も検出可能なパネルを使用する計画である。また、メチル化アレイによる DNA メチル化異常のスクリーニングも実施する。本学において最適なカスタムパネル、メチル化アレイの使用が困難であることが判明した場合は、他機関（国立がん研究センターなど）への依頼も検討するが、その場合には、改めて研究計画の変更を申請する。検出された変異、異常については適宜サンガー法、増幅については FISH 等による確認を行う。多形癌など、一つの腫瘍の中に「肉腫様成分」と通常の非小細胞癌成分が混在している腫瘍では、「肉腫様成分」と非小細胞癌成分で異なる遺伝子変異、増幅、融合ならび DNA メチル化異常を明らかにし、悪性度を規定する「肉腫様成分」出現に関与する因子を同定する。また、ゲノムデータベースに広く一般公開されている肺腺癌、同扁平上皮癌の遺伝子異常、DNA メチル化異常と今回の結果を比較する。

(4) 臨床病理学的特徴の確認と免疫染色

上記対象患者の、臨床病理学的特徴を調査する。また、ゲノム DNA 抽出時に作成した TMA を用いて、近年治療標的の可能性が指摘されている免疫チェックポイント関連および幹細胞関連マーカーの免疫染色を行い、臨床病理学的特徴と免疫染色および遺伝子異常、DNA メチル化異常の結果との関連を明らかにする。免疫染色の評価は半定量的スコアリングを行う。

(5) 機能解析

上記で検出された遺伝子群について、症例間での重複、遺伝子産物の機能等を加味した二次集計による特徴づけを行う。遺伝子変異（標的遺伝子のエクソン解析）、遺伝子増幅が見られた遺伝子を統合的に収集し、既知の細胞内シグナル経路へのマッピングや、遺伝子産物のもつ機能ドメインによる分類を行い、「肉腫様成分」を含む肺癌で重複して異常が検出される遺伝子群の同定を行う。この中から細胞増殖（疾患の発生）に関与すると考えられる遺伝子変異を中心に、治療標的となり得る新しい遺伝子変異候補の同定を行う。

4. 研究成果

当院において1996年から2011年までに切除された肉腫様成分を含む肺癌手術例24例のうちデータ不備の1例を除いた23例(多形癌20例、巨細胞癌3例)を対象とし、まず、臨床像と予後の検討を行った(第58回日本肺癌学会総会)。観察期間の中央値は122ヶ月(範囲:1-249)で、5年無再発生存割合は56%。再発は8例(35%)認め、7例は術後1年以内の再発(胸膜播種4例、多臓器転移2例、脳転移1例)で、再発後生存期間中央値は3ヶ月(範囲:1-14)であった。一方、5年無再発生存を6例(26%)に認め、4例は病理病期IIA期以上であった。肉腫様成分を含む肺癌は、過去の報告同様、術後早期再発を来し再発後予後も不良な集団がある一方で、進行した病理病期であっても長期無再発生存例が存在することが示唆された。次いで、各症例からDNA抽出のため、ホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)切片を確認し肉腫様成分(sarcomatoid [S]成分)、非肉腫様成分(non-sarcomatoid [NS]成分)、非腫瘍部(normal [N]成分)から、Carl Zeiss PALM Micro Beam IVを用いてlaser micro dissectionを行った。その後、QIAGEN GeneRead DNA FFPE Kitを用いてdissection検体からDNAを抽出し、Qubit dsDNA HS AssayにてDNAの定量を行った。しかしながら、laser micro dissectionは、時間を要したにも関わらずDNA回収効率が非常に悪く、特にNS成分から十分量のDNAを抽出することが出来ないことが判明した。そのため、肉腫様成分の悪性度を規定する成分であるS成分のみ、macro dissectionによってDNA抽出を行う方針に変更した。しかしながら、DNA抽出後のquality checkにて、DNA断片化が著しく、十分なqualityを担保したシーケンスは困難であった(2010年までの症例(22例が該当)が、20%ホルマリンで固定されていたことが要因と考えられた)。そこで、10%ホルマリンでの固定に変更された2011年以降の症例から、新たに対象を抽出し直し、13例(2011-2018)を同定した。病理診断名は、多形癌8例、低分化腺癌(腺癌成分に加え、<10%の肉腫様成分を伴う)5例であった。これら13例から当初の計画通り、各成分のmicro dissectionでDNAを抽出し、現在、NS、N成分をコントロールとしたS成分の遺伝子異常のならびにメチル化アレイを用いたDNAメチル化異常のprofilingを行っている。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計11件)

1. Suzuki M, Hishida T, Asakura K, Asamura H. WT1 peptide-based immunotherapy for refractory thymic epithelial malignancies. *Mediastinum*. 2019;3:12. doi: 10.21037/med.2019.04.01. (査読有)
2. Hishida T. Survival comparison between thymic carcinoma and thymic carcinoid: does it matter in clinical practice? *Mediastinum*. 2019;3:2. doi: 10.21037/med.2019.01.01. (査読有)
3. Nakagomi T, Goto T, Hirotsu Y, Shikata D, Yokoyama Y, Higuchi R, Otake S, Amemiya K, Oyama T, Mochizuki H, Omata M. Genomic Characteristics of Invasive Mucinous Adenocarcinomas of the Lung and Potential Therapeutic Targets of B7-H3. *Cancer (Basel)*. 2018;10. doi: 10.3390/cancers10120478. (査読有)
4. Nakagomi T, Goto T, Hirotsu Y, Shikata D, Yokoyama Y, Higuchi R, Amemiya K, Okimoto K, Oyama T, Mochizuki H, Omata M. New therapeutic targets for pulmonary sarcomatoid carcinomas based on their genomic and phylogenetic profiles. *Oncotarget*. 2018;9:10635-10649. doi: 10.18632/oncotarget.24365. (査読有)
5. Hishida T, Saji H, Watanabe SI, Asamura H, Aokage K, Mizutani T, Wakabayashi M, Shibata T, Okada M; Lung Cancer Surgical Study Group of the Japan Clinical Oncology Group (JCOG-LCSSG). A randomized Phase III trial of lobe-specific vs. systematic nodal dissection for clinical Stage I-II non-small cell lung cancer (JCOG1413). *Jpn J Clin Oncol*. 2018;48:190-194. doi: 10.1093/jjco/hyx170. (査読有)
6. Sekihara K, Aokage K, Oki T, Omori T, Katsumata S, Ueda T, Miyoshi T, Goto M, Nakasone S, Ichikawa T, Hishida T, Yoshida J, Hisakane K, Goto K, Tsuboi M. Long-term survival after complete resection of non-small-cell lung cancer in patients with interstitial lung disease. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*. 2018;26(4):638-643. doi: 10.1093/icvts/ivx400. (査読有)
7. Hishida T. Video-assisted thoracoscopic lung cancer lobectomy for patients with incomplete interlobar fissure: is it a safe and reasonable procedure? *J Thorac Dis*. 2018 Sep;10(Suppl 26):S3056-S3057. doi: 10.21037/jtd.2018.07.132. (査読有)
8. Hishida T. Relationship between thymic epithelial tumors and autoimmune disorders.

Shanghai Chest. 2018;2:74. doi: 10.21037/shc.2018.09.04. (査読有)

9. Oki T, Hishida T, Yoshida J, Goto M, Sekihara K, Miyoshi T, Aokage K, Ishii G, Tsuboi M. Survival and prognostic factors after pulmonary metastasectomy of head and neck cancer: what are the clinically informative prognostic indicators? Eur J Cardiothorac Surg. 2018;Nov 23. doi: 10.1093/ejcts/ezy384. (査読有)
10. Hishida T, Aokage K, Yoshida J, Miyoshi T, Tsuboi M. Extended bronchoplasty for locally advanced left lower lobe lung cancer: surgical technique and outcomes. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2018;27:602-605. doi: 10.1093/icvts/ivy081. (査読有)
11. Yotsukura M, Yasuda H, Shigenobu T, Kaseda K, Masai K, Hayashi Y, Hishida T, Ohtsuka T, Naoki K, Soejima K, Betsuyaku T, Asamura H. Clinical and pathological characteristics of EGFR mutation in operable early-stage lung adenocarcinoma. Lung Cancer. 2017;109:45-51. doi: 10.1016/j.lungcan.2017.04.014. (査読有)

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 栗山 翔司, 菱田 智之, 鈴木 陽太, 坂巻 寛之, 志満 敏行, 政井 恭兵, 加勢田 馨, 大塚 崇, 林 雄一郎, 浅村 尚生. 当院における肺肉腫様癌切除例の予後. 第 58 回日本肺癌学会学術集会. 2017 年
2. 菱田 智之. 原発性肺癌に対する至適なリンパ節郭清とは - 臨床試験とその先 - . 第 79 回日本臨床外科学会総会. 2017 年
3. Hishida T, Aokage K, Yoshida J, Miyoshi T, Tsuboi M. "TYPE C" extended bronchoplasty for locally-advanced lung cancer. 25th European Society of Thoracic Surgeons (ESTS) meeting (国際学会). 2017 年
4. Hishida T, Tsuboi M, Yoh K, Takamochi K, Sakurai H, Goto Y, Shukuya T, Ohashi Y, Kunitoh H. Multicenter observational study of patients with resected early-staged NSCLC, who were excluded from an adjuvant chemotherapy trial. IASLC 17th World Conference on Lung Cancer (国際学会). 2016 年
5. 菱田 智之, 吉田 純司, 青景 圭樹, 坪井 正博. 分子標的治療を受けた進行肺癌の残存/増悪原発巣に対する salvage surgery. 第 33 回日本呼吸器外科学会総会, パネルディスカッション. 2016 年

〔図書〕(計 2 件)

1. 菱田 智之, 大塚 崇, 浅村 尚生. 医学書院. 【呼吸器ジャーナル 肺癌 最新の治療戦略と失敗しないための秘訣】 I. 総論 肺癌の新 TNM 分類(第 8 版)について. 2017 年. 6 ページ(550-555)
2. 菱田 智之, 永井 完治. 南江堂. 【呼吸器外科テキスト~外科専門医・呼吸器外科専門医をめざす人のために~】 日本呼吸器外科学会/呼吸器外科専門医合同委員会編 第 VI 章 肺の腫瘍性疾患 1. 原発性肺癌 肺癌の症状. 2016 年. 4 ページ(220-223)

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名: 栗山 翔司

ローマ字氏名: KURIYAMA, Shoji

研究協力者氏名: 中込 貴博

ローマ字氏名: NAKAGOMI, Takahiro