

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08372

研究課題名(和文) 肺線維症から肺腺癌の発生機序の解明、特にmiRNAの役割について

研究課題名(英文) Pathogenesis of lung adenocarcinoma based on lung fibrosis

研究代表者

松原 修 (Matsubara, Osamu)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・研究員

研究者番号：40107248

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)：間質性肺炎/肺線維症から細気管支上皮増生、異型腺腫様過形成(AAH)、上皮内腺癌(AIS)、微小浸潤性腺癌(MIA)、置換型腺癌の腺癌へと進展するのではないかとの仮説のもとに、肺線維症を基盤に発生する肺腺癌と合併しないものを手術材料で比較した。間質性肺炎/肺線維症などの間質性病変が20.6%、AAHなどの肺胞上皮の増殖病変が23.6%、多発癌の症例が13.2%、肺胞の細気管支化の病変が23.5%の頻度で認められた。AAHと細気管支化病変が、肺線維症を基盤に発生する肺腺癌症例の方で優位に多かった。肺の線維化機序と肺胞の細気管支化の病変が深く関係していることを示唆した。

研究成果の概要(英文)：We consider that progressive steps of lung adenocarcinoma may start from proliferation of bronchiolar epitheli, to atypical adenomatous hyperplasia (AAH), adenocarcinoma in situ (AIS), to minimally invasive adenocarcinoma, finally to lepidic pattern adenocarcinoma, and examined and compared the clinic-pathological features of resected operation materials of lung adenocarcinoma with lung fibrosis/interstitial pneumonia and without lung fibrosis/interstitial pneumonia. Of over all the materials of lung adenocarcinoma, lung fibrosis/interstitial pneumonia was found in 20.6%, AAH in 23.6%, multiple cancers in 13.2%, and bronchiolization of alveoli in 23.5%. AAH and bronchiolization of alveoli were significantly more observed in lung adenocarcinoma with lung fibrosis/interstitial pneumonia. This finding suggest lung fibrosis and bronchiolization of alveoli may have an important role.

研究分野：人体病理学

キーワード：肺腺癌 異型腺腫様過形成 上皮内腺癌 微小浸潤性腺癌 置換型腺癌 肺線維症 間質性肺炎 肺胞の細気管支化

1. 研究開始当初の背景

肺腺癌の病理発生について、様々な研究がなされているがいまだ不明な点が多い。手術材料の病理学的検索を行うと、間質性肺炎、肺線維症、細気管支上皮の増生、異型腺腫様過形成(AAH)、上皮内腺癌(AIS)、微小浸潤性腺癌(MIA)などの様々な病変が見られる。この病変に関連があるのではと考え、「間質性肺炎/肺線維症から置換型腺癌 lepidic growth pattern の腺癌へと進展する」のではないかと仮説を立てた。分子病理学的検索も併せ行いたい。

2. 研究の目的

「間質性肺炎/肺線維症 肺胞の細気管支化 2 型肺胞上皮、細気管支上皮の増生 atypical adenomatous hyperplasia (AAH) adenocarcinoma in situ (AIS) lepidic growth pattern を示す腺癌」と進展するとの仮説のもとに、肺線維症を基盤に発生する肺腺癌と肺線維症を合併しないものを比較して、初期の肺腺癌の発生機序の解明、特に miRNA の役割について明らかにしたいと考える。間質性肺炎/肺線維症から lepidic growth pattern を示す腺癌に至る一連の病変における miRNA の役割の相違を調べ、また、SNP アッセイとプロテオーム解析も行い、肺線維症から肺腺癌へのものと、肺線維症を伴わないものを比較し、腺癌へ進展の可能性がある重要な miRNA、SNP、タンパクの特定をしたいと考える。「間質性肺炎/肺線維症から細気管支上皮の増生、AAH、AIS、MIA、置換型腺癌の腺癌へと進展するのではないかと仮説のもとに、肺線維症を基盤に発生する肺腺癌と合併しないものを臨床病理学的に比較もする。また、PD1-PD-L1 の関わりについても検索する。

3. 研究の方法

肺線維症を基盤に発生する肺腺癌と合併しないもの手術材料を検討し、AAH 病変、肺胞の細気管支化 (bronchiolization, bronchial metaplasia) の病変について違いを検討した。肺腺癌部位、または線維化部分との位置関係も検討した。また、(1) 肺線維症を基盤に発生する肺腺癌 (30 例) と肺線維症を合併しないもの (30 例) の手術材料の組織を検討し、組織型、浸潤の有無、大きさ、臨床病理学的検討を行う。(2) 得られる早期の肺腺癌の手術材料を 20 例程度から凍結材料を採取した。(3) 手術材料中の

腺癌組織、atypical adenomatous hyperplasia (AAH) 病変、2 型肺胞上皮、細気管支上皮の増生像、また肺胞の細気管支化の病変について、免疫組織学的検索を含めた病変の性格、分布、頻度の違いを検討した。(4) 凍結材料を用いた miRNA の解析、SNP 解析と発現タンパクのプロテオーム解析の予備実験を始めた。(5) 平成 27 年度に、腺癌組織、atypical adenomatous hyperplasia (AAH) 病変、2 型肺胞上皮、細気管支上皮の増生像、また肺胞の細気管支化の病変の miRNA の解析、SNP 解析を行う準備を始めた。miRNA の解析は miRNA Oligo chip (高性能 DNA チップ基板 3D-Gene) を用いて行う。SNP 解析では、Affymetrix (Affymetrix & reg; Genome-Wide Human SNP Array 6.0) および Axiom の SNP アレイを用いる。(6) 凍結保存していた腫瘍肺組織からマイクロトームを使用して作製した 10 μm の凍結切片 20 枚より、レーザーマイクロダイゼクション法にて腫瘍部を切り出し、DNA を抽出する準備を始めた。その後、制限酵素で消化し、共通のアダプターを付加したのち、単一のプライマーによる PCR 増幅をおこない、制限酵素断片のみを選択的に増幅する。増幅断片を DNase で断片化し、ビオチンにて標識したものを、CNV プローブを搭載したアレイ上でハイブリダイゼーションし、画像をスキャナーでとりこむ。(7) SNP 解析では、肺組織からマイクロトームを使用して 10 μm の凍結切片を作製し、染色鏡頭後、腫瘍部と非腫瘍部をわけ、そこから DN easy Tissue Kit (Qiagen, Valencia, USA) を用いて DNA を抽出、Microcon (Millipore) で超純化して用いる。Affymetrix & reg; Genome-Wide Human SNP 6.0 Nsp/Sty Assay (Genome-Wide SNP 6.0 Assay) を用いて SNP アッセイを行った。Digestion と ligation の Pre-PCR 操作、PCR と PCR 産物 purification と quantitation、fragmentation と labeling を行い、hybridization, fluidics そして scanning を行った。腺癌組織、atypical adenomatous hyperplasia (AAH) 病変、2 型肺胞上皮、細気管支上皮の増生像、また肺胞の細気管支化の病変部とそれのないところでシグナル強度比の差のあるアレルを抽出し、標的となるものを Applied Biosystems Prism 7700 Sequence Detection Systems を用いて TaqMan PCR 法にてタイピングを行う準備を始めた。(8) 平成 27, 28 年度、発現タンパクの違いがあるかどうかプロテオーム解析を行う。プロテオーム解析は、蛍光標識

二次元ディファレンシャルゲル電気泳動法を用いる。凍結保存していた肺組織からマイクロトームで10µmの凍結切片より、レーザーマイクロダイセクション法にて病変部を切り出し、タンパク抽出する。すべての症例のタンパクを等量ずつ混ぜたものをコントロールのプロテインライゼートとし、抽出したタンパクとのタンパク発現の差を比較するために異なる蛍光色素でラベルする。pH3-10のストリップゲルにローディングし、一次元目の等電点電気泳動を行い、さらにSDS-PAGEゲルを用いて二次元目の電気泳動を行う。画像をスキャナーで取り込み、ソフトウェアDeCyder2Dを用いて病変を含む材料と含まない材料と発現の差を検出する。(9)スポット内のタンパクについて、In gel digestion法にてトリプシン消化を行い、ペプチド断片を生成する。MALDI-TOF-MSをもちいて解析し、得られたピークをペプチドマスマスフィンガープリンティング法による Mascot 解析にて解析し、タンパクを同定する。プロテオーム解析にて発現の差のあるタンパクとして同定されたものについて免疫組織化学にてタンパク発現を確認し、形態学的にタンパクの局在が細気管支化の病変にあることを確認する。(10) 肺胞の細気管支化や Lambertosis といった病変の病理発生について線維化との関係、肺腺癌への進展の可能性のある重要な miRNA、SNP、タンパクの特定をしたいと考えた。

4. 研究成果

肺腺癌手術例の全症例でみると、間質性肺炎/肺線維症などの間質性病変が20.6%、AAHなどの肺胞上皮の増殖病変が23.6%、多発癌の症例が13.2%ほど見られた。肺胞の細気管支化の病変が23.5%もの高い頻度で認められた。AAHと肺胞の細気管支化病変が、優位に肺線維症を基盤に発生する肺腺癌症例の方で多かった。また Tumor infiltrating lymphocytes に PD-1、腫瘍細胞に PD-L1 がしばしば染色された。この頻度は間質性肺病変の合併の有無とは関係がなかった。結論として、AAHと肺胞の細気管支化病変が、優位に肺線維症を基盤に発生する肺腺癌症例の方で多かった。また Tumor infiltrating lymphocytes に PD-1、腫瘍細胞に PD-L1 がし

しばしば染色された。肺の線維化機序と肺胞の細気管支化の病変が深く関係していることを示唆した。また腫瘍細胞の PD-L1 の陽性の割合が腫瘍の大きさと関連し、AIS, MIA から浸潤がんへの進展にも関連しているのではないかと示唆された。肺胞の細気管支化や Lambertosis といった病変の病理発生について線維化との関係、肺腺癌への進展の可能性のある重要な miRNA、SNP、タンパクの特定については、研究進行中である。ポジティブな結果を予想している。

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3件)

Miyamoto A, Sharma A, Nishino M, Mino-Kenudson M, Matsubara O, Mark E, Expanded acceptance of acute exacerbation of nonspecific interstitial pneumonia, including 7 additional cases with detailed clinical pathologic correlation, J Pathol Int [Epub ahead of print] 2018 年 査読有、123, DOI 10.1111/pin.12676

Uemura K, Namura K, Umemoto S, Matsubara O, Udagawa K, [A Case of Squamous Cell Carcinoma in Bladder Diverticulum Producing Granulocyte Colony Stimulating Factor] in Japanese Hinyokika Kyo, 査読有、63(5), 2017, 211-215, DOI 10.14989/ActaUrolJap_63_5_211

Miller R, Allen TC, Barrios RJ, Beasley MB, Burke L, Cagle PT, Capelozzi VL, Ge Y, Hariri LP, Kerr KM, Khour A, Larsen BT, Mark EJ, Matsubara O, Mehrad M, Mino-Kenudson M, Raparia K, Roden AC, Russell P, Schneider F, Sholl LM, Smith ML, Hypersensitivity Pneumonitis A Perspective From Members of the Pulmonary Pathology Society, Arch Pathol Lab Med 査読有 142(1), 2018, 120-126, DOI

10.5858/arpa.2017-0138-SA

〔学会発表〕(計8件)

Matsubara O, Jin Y, Mark EJ、Cancer Stem Cells of the Lung Adenocarcinoma, Emphasizing the Level during the Progression from Atypical Adenomatous Hyperplasia to Invasive Adenocarcinoma、The 107th Annual Meeting of USCAP(国際学会)、2018 March 17-23

Jin Y, Imase R, Matsubara O、Expression of Intratumoral Programmed Cell Death-ligand 1 (PD-L1) and Intratumoral CD8+ T Cell and FOXP3+ T Cell in Lung Cancer
The 107th Annual Meeting of USCAP(国際学会)、2018 March 17-23

Jin Y, Matsubara O、Intratumoral Programmed Cell Death-Ligand 1 (PD-L1) and Intratumoral CD8+ T Cell Expression in Lung Cancer、The 106th Annual Meeting of USCAP(国際学会)、2017 March 4-10, 2017

松原 修、神 靖人、山仲一輝、石川雄一、肺癌における Tumor-Associated Vasculopathy の意義、第 105 回日本病理学会総会 2016 年 05 月 12 日、仙台

松原 修、神 靖人、石川雄一、肺癌における tumor-associated vasculopathy
第 106 回日本病理学会総会、2017 年 04 月 27 日、東京

Matsubara O、Bronchiolization of Alveoli in the Progress to Lung Cancer.
The XXXI International Congress of the International Academy of Pathology (招待講演)(国際学会)、2016 年 09 月 25 日 ~ 2016 年 09 月 29 日、ドイツ、コロン

Matsubara O、Pulmonary Massive Necrotic Nodule, Case Presentation、The 6th Taiwan-Japan Conjoint Slide

Conference (招待講演)(国際学会)、2016 年 10 月 14 日 ~ 2016 年 10 月 15 日、名古屋

Matsubara O、Update in Pulmonary Vascular Disease、The 11th Annual Meeting of the Asia Pacific Society for Molecular Immunohistology and the 3rd Annual Conference of the Asia-Australasia Pulmonary Pathology Society (招待講演)(国際学会)、2016 年 12 月 11 日、台湾、台北

〔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〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

松原 修 (Matsubara, Osamu)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・研究員

研究者番号：40107248

(2) 研究分担者

石川 雄一 (ISHIKAWA, Yuichi)

公益財団法人がん研究会・がん研究所 病理部・部長

研究者番号：80222975

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

なし