

令和元年6月20日現在

機関番号：32610

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10690

研究課題名(和文) 微量検体からの肺癌コンパニオン診断を可能にする基盤研究

研究課題名(英文) The establishment of molecular testing using cytological materials for lung cancer treatments

研究代表者

田中 良太 (Tanaka, Ryota)

杏林大学・医学部・准教授

研究者番号：40415063

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：気管支鏡下肺腫瘍生検の際に用いた生検鉗子の先端を洗浄し、採取した細胞材料を液状化細胞診Liquid Based Cytology (LBC) で固定した。その後細胞浮遊液ゼリー化試薬(iPGell)を用いて包埋し、セルブロックを作成してから本研究の実験材料とした。このセルブロックは微量検体での免疫染色や核酸抽出を可能とし、治療の効果予測因子となる組織型の鑑別、および上皮成長因子受容体(EGFR)の変異解析、ROS1融合遺伝子解析が実行可能で最適な材料であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

非小細胞肺癌の薬物療法は分子標的治療や、免疫療法がめざましい発展を遂げてきた。気管支鏡下生検による確定診断は重要であり、薬剤耐性後の再生検も更に必要なことがある。本研究において微量検体を用いた免疫組織学的な組織型推定、更に分子標的治療薬などの効果予測となる遺伝子解析を高感度に実行した。そして細胞浮遊液ゼリー化試薬(iPGell)を用いた方法の検証実験を行い、本法が簡便かつ効率的な方法であることを証明した。

研究成果の概要(英文)：We studied patients with lung cancer undergoing bronchoscopic biopsy to assist us with making treatment plans. After getting cytological samples using instrument washings, the specimen was fixed by BD CytoRich Red Preservative, making a cellblock with iPGell. The cellblocks with iPGell were used for cytomorphological subtyping, molecular testing and immunocytochemical analysis for validation of feasibility in this study. The cellblock with iPGell was suitable for use in these kinds of examinations, and it might be an optimal preparation for analyzing gene aberrations before developing treatment plans in our clinical practices.

研究分野：呼吸器外科学、病理・細胞診断学

キーワード：肺癌 コンパニオン診断 気管支鏡 液状化検体細胞診 EGFR KRAS ROS-1 ALK

## 1. 研究開始当初の背景

近年癌治療におけるさまざまな、新しい臨床試験・治験の結果が、次々と報告されてきている。遡れば肺癌において2002年ゲフィチニブ、その後2007年エルロチニブが承認されてから、標的とする上皮成長因子受容体(EGFR)の変異解析、更に耐性化に伴う耐性遺伝子の検出などが必要とされている。そのような時代的背景の中で、手術以外の治療戦略においては、確定診断や治療への感受性などの、評価ができる検査が大変重要である。我々は気管支鏡検査において、患者への負担の軽減、および診断率の向上を目指して、迅速細胞診を併用している(胸部外科 60:745-51,2007)。またそのような取り組みの中で、我々は通常の組織スライドの標本作製と同様の手順で、効率よく細胞検体からパラフィン包埋標本作製する、新しい検体処理の方法と技術を考え提案したい。具体的には細胞固定ののち細胞浮遊液ゼリー化試薬(iPGell)を用いて包埋(Biomaterials 51:278-289,2015)。それから更に通常の工程でパラフィン包埋標本作製する。この方法によるメリットはまず核酸の保存状態が良好であること、好条件で高感度な免疫組織化学染色や、FISH(fluorescence in situ hybridization)などが施行できることで、更に微小で微量な細胞検体を用いて、遺伝子解析が可能であると考えている。

## 2. 研究の目的

現在、非小細胞肺癌の薬物療法において、分子標的治療が非常に盛んになった。そして更に近年、免疫療法がめざましい発展を遂げている。このような背景により、気管支鏡下生検による確定診断や、薬剤耐性後の再生検(rebiopsy)の必要性が、更に高まることが予想される。今回、我々は本研究において細胞微小検体を用いて、肺癌の組織型推定はさることながら、更に抗がん剤や分子標的治療薬などの、効果予測因子となる分子マーカーの免疫組織学的な解析、および遺伝子解析の効率的、かつ簡便で有効な検体処理法、更に高感度な解析法を開発することを目的とする。

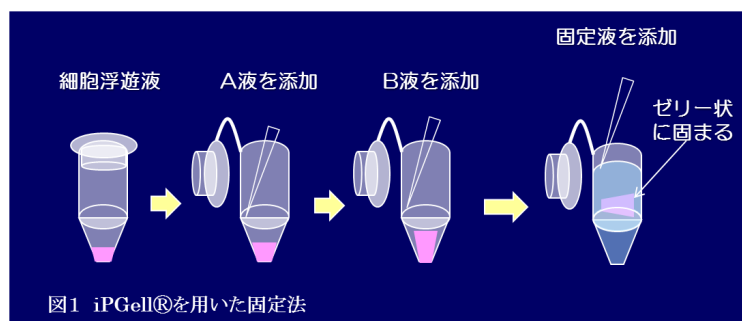
## 3. 研究の方法

### (1) 擦過細胞材料を用いた予備実験

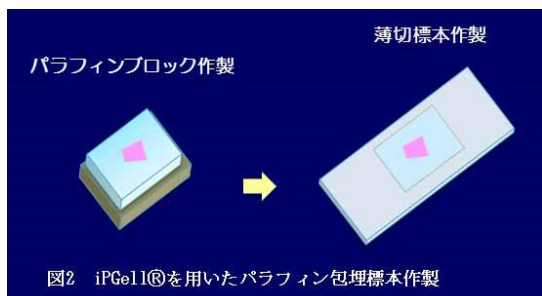
気管支鏡の際に採取した鉗子先端の、器具洗浄液内の腫瘍細胞数は、極めて少ないことが予想される。本研究の予備実験としてまずは、十分な細胞数が確保された条件化がよいと考え、手術で摘出した切除標本の腫瘍部を切開し、腫瘍断面の擦過によって採取した、細胞材料を用いて実験を開始した。腫瘍断面をセルスクレーパーで3回こすり、それをBD シュアパスレッド保存液入りの15ml 遠心管内で洗って固定する。気管支鏡検査の際に各種遺伝子解析や免疫組織学的な解析を視野に入れて、まずは切除検体で腺癌と組織学的に診断された症例を解析の対象とした。固定後のサンプルは細胞浮遊液ゼリー化試薬(iPGell)で、ゲル状にした後にセルブロックとして保管した。EntroGen社が販売しているEGFR Mutation Analysis Kitを用いて、高感度リアルタイムPCR法による解析を行った。EGFR変異陰性例を対象として同じくEntroGen社のキットを用いて、高感度のリアルタイムPCR法によりKRAS遺伝子変異解析を行った。EGFR・KRAS変異陰性例を対象として、EML4-ALK融合遺伝子解析のため、免疫染色(ヒストファイン ALK iAEP®キット)とFISH(SureFISH ALKプローブ)を施行した。EGFR・KRAS・ALK変異陰性例に対しては、抗ROS1(D4D6)抗体による免疫染色とRNA抽出ののち、OncoGuide AmoyDx ROS1融合遺伝子検出キットによるROS1融合遺伝子の解析を行った。また組織型の鑑別における免疫組織学的な解析では、腺癌に限定せず各組織型を数例ずつ用意して、鑑別に関連する腺癌系マーカーのTTF-1とnapsin A、扁平上皮癌系マーカーのCK5/6とP40を用いて検証を行った。

### (2) 微量細胞検体を用いた実験

肺野末梢の病変に対して確定診断を目的として、気管支鏡下に採取する際に用いた生検鉗子の先端を、生食入りの15ml 遠心管内で出し入れして洗浄し、遠心分離機にかけてから上清をすてBD シュアパスレッド保存液で固定する。その後2~3週間以内に再度遠心分離機にかけてから上清をすて、細胞浮遊液ゼリー化試薬(iPGell)で固形状にしたのち(図1)、通常のパラフィン包埋によるセルブロックを作成した。気管支鏡検査を開始する直前には、EDTA-2K入り採血管で血液を採取し、後に血漿を分離して研究室で保存した。細胞検体での解析結果と血漿を用いたリキッドバイオプシーの結果を、比較して検討に用いることを目的とした。まず組織型鑑別のためにすべての対象症例のセルブロックを使用して、厚さ5μmで薄切して未染プレパラートを準備した(図2)。



TTF-1、napsin A、CK5/6、P40 の免疫染色を施行し、それぞれの染色性を評価した結果が、免疫組織学的に腺癌疑い、つまり TTF-1 と napsin A のいずれも陽性、あるいはいずれかが陽性、またはいずれも陰性だが扁平上皮癌の確証が得られない NOS (not otherwise specified) を対象に、



対象に、コンパニオン診断薬であるコバス® EGFR 変異検出キット v2.0 (ロシュ・ダイアグノスティックス) で解析した。DNA の抽出はセルブブロックから 10  $\mu$ m を 10 枚薄切して、一切片あたりの腫瘍細胞数と解析時の DNA 量 (トータル収量) を記録して、EGFR 変異の検出結果とそれぞれの数値を比較して検討した。また同時に対象症例の肺癌組織検体と気管支鏡検査時に採取した血漿を用いて、それぞれを同様にコバス® EGFR 変異検出キット v2.0 により解析した。

## 4. 研究成果

### (1) 手術切除検体を用いた検討

LBC (Liquid-based cytology) 固定液から DNA を抽出した 55 検体のうち、組織学的に腺癌と診断された 40 検体を対象として、EGFR 遺伝子変異を解析し 20 検体 (50%) が陽性であった。EGFR 遺伝子変異が陰性の残る 20 検体を対象として、KRAS 遺伝子変異を解析し 4 検体 (10%) が陽性であった。EGFR・KRAS 変異陰性例を対象とし、EML4-ALK 融合遺伝子を免疫染色と FISH により解析し 1 検体 (2.5%) が陽性であった。また更に EGFR・KRAS 変異および EML4-ALK 陰性例を対象に、ROS1 融合遺伝子解析を施行し 1 検体 (2.5%) が陽性であった。過去の文献的な報告での遺伝子異常の内訳と頻度と比較し、アジア人・腺癌の特徴とほぼ同様の頻度と内容であった。LBC 固定検体やその固定後のセルブブロックを用いて、各種コンパニオン診断薬の使用が可能で良好な結果がえられた。また組織型の鑑別に関連する免疫組織学的解析を施行し、iPGe11 に埋め作成したセルブブロックでも良好な染色性を示し、形態学的および免疫組織化学的な評価が可能であった。

### (2) 気管支鏡 (組織型鑑別)

34 検体中 3 検体は細胞診断で腫瘍細胞がなく陰性、1 検体は甲状腺癌の肺転移で解析から除外し、計 30 検体を本研究の対象として解析した。形態学的に組織型同定が可能であった腺癌 17 検体、扁平上皮癌 8 検体では、セルブブロックを用いた免疫組織学的解析でも、それを裏付ける染色性と結果を示した。形態学的に組織型の同定が困難であった残る 5 検体では、TTF-1 および NapsinA がいずれも陽性であった 2 検体を腺癌と診断し、CK5/6 および/あるいは P40 が陽性であった 3 検体を扁平上皮癌と診断した。LBC 固定後に作成したセルブブロック標本を用いた免疫組織化学染色では、組織型鑑別が可能で形態学的に鑑別が困難な症例に対して、今後は本手法を用いた検体処理や標本作成法は簡便でかつ有用であると考えられる。

### (3) EGFR 変異解析 (組織検体と器具洗浄液の比較、表 1 参照)

腺癌計 20 検体を用いたコバス EGFR 変異検出キット v2.0 による EGFR 変異解析を行った。気管支鏡の際の組織生検材料の FFPE 検体と生検鉗子の器具洗浄液から本手法により作成したセルブブロックを用いて、それぞれ 10  $\mu$ m で 10 枚ずつの薄切切片から DNA を抽出し解析を行った。組織検体では 20 検体中 7 検体 (35%) が陽性で、器具洗浄液の細胞検体では 20 検体中 8 検体 (40%) が陽性で、むしろ細胞検体の検出率の方が高い結果となった。しかしながら、器具洗浄液の細胞検体において 20 検体中 1 検体では、内部コントロールの増幅がかからず、原因は不明であるが不適切な検体であったと考える (No. 43)。変異箇所は L858R が 5 検体と exon19Del. が 1 検体で、両検体ともに変異箇所が完全に一致していた。細胞検体のみで検出された 1 検体は L861Q のマイナー変異であった。LBC 固定後に作成したセルブブロックによる、細胞検体の EGFR 変異の解析は良好な結果を示し、組織の FFPE 材料を用いた結果とほぼ同等であった。

### (4) EGFR 変異解析 (器具洗浄液と血漿検体の比較、表 1 参照)

気管支鏡検査時に採取した血液材料から血漿を抽出し、コバス EGFR 変異検出キット v2.0 による EGFR 変異解析を行った。血漿 20 検体中 4 検体 (20%) において変異が検出され、変異の箇所はすべての検体において L858R 陽性で、組織検体と器具洗浄液の結果と一致していた。EGFR 変異が細胞検体と血漿検体の、いずれも陽性であった 4 症例では、全例が非喫煙者の女性であった。そしていずれの病変も充実性陰影 (solid) で、うち 2 症例は臨床病期 IV 期の進行癌であった。

### (5) 細胞数および DNA 濃度における検討 (表 1 参照)

セルブブロックの一切片あたりの腫瘍細胞数は、平均して 3.5 個であり極めて少数であった。セルブブロック 10  $\mu$ m で 10 枚の DNA 抽出量の平均は 8.888ng/ $\mu$ l で、血漿解析に用いた際の DNA 抽出量の平均は 8.936 ng/ $\mu$ l で同程度の回収量であった。DNA 抽出量が EGFR 変異解析の結果



に影響することはなく、それぞれに相関がみられなかった。不適正検体と判断した 43 番には、切片中に腫瘍細胞を認めなかった。計 4 回にわたり再薄切して DNA を抽出し、繰り返し再解析をしたが同様な結果で、不適切な検体であったと考える。

表 1 各症例別の EGFR 解析結果と腫瘍細胞数および DNA 濃度の内訳

番号	組織生検材料	器具洗浄液(細胞検体)	腫瘍細胞数/1切片	細胞DNA(ng/μl)	血漿材料	血漿DNA(ng/μl)
1	陰性	陰性	14	17.429	陰性	未測定
3	陰性	陰性	3	26.35	陰性	未測定
4	陰性	陰性	5	8.848	陰性	9.016
6	陰性	L861Q	2	6.941	陰性	25.602
8	陰性	陰性	3	6.839	陰性	12.707
15	L858R	L858R	2	11.528	陰性	6.634
19	L859R	L858R	3	3.1	L858R	0.800
20	陰性	陰性	2	14.207	陰性	9.732
24	L858R	L858R	3	7.741	陰性	2.000
33	陰性	陰性	3	4.16	陰性	8.309
43	陰性	Invalid	0	11.394	陰性	5.070
75	陰性	陰性	2	4.772	陰性	6.910
144	陰性	陰性	3	8.699	陰性	5.399
156	陰性	陰性	3	12.351	陰性	8.177
165	陰性	陰性	4	4.141	陰性	7.944
168	L858R	L858R	1	2.907	L858R	16.718
172	陰性	陰性	3	7.266	陰性	9.089
179	exon 19 del	exon 19 del	3	2.723	陰性	7.790
183	L858R	L858R	3	8.848	L858R	7.233
201	L858R	L858R	2	7.516	L858R	11.718
平均			3.2	8.888		8.936

今回我々は本研究によって微量な細胞材料を用いて、最善で効率的な細胞回収と検体処理法を提示することができた。本研究による成果は肺癌コンパニオン診断の機会と、遺伝子検査の精度を高めていく一助になることを期待する。

## 5. 主な発表論文等

### [雑誌論文](計3件)

Tanaka R, Sakamoto N, Suzuki H, Tachibana K, Ohtsuka K, Kishimoto K, Fujiwara M, Kamma H, Shibahara J, Kondo H: Genotyping and Cytomorphological Subtyping of Lung Adenocarcinoma based on Liquid-based Cytology. Diagn Cytopathol 47:564-570, 2019. doi: 10.1002/dc.24154 査読有

Tanaka R, Tachibana K, Suda K, Kondo H, Noguchi M: A severe combined immunodeficiency disease mouse model of human adenocarcinoma with lepidic-predominant growth. Pathol Res Pract 214:2000-2003, 2018. DOI: 10.1016/j.prp.2018.09.021 査読有

Tanaka R, Sakamoto N, Suzuki H, Tachibana K, Takei H, Kishimoto K, Fujiwara M, Kamma H, Shibahara J, Kondo H: The Cytomorphological Characteristics of Non-small Cell Lung Cancer are Associated with Its Radiological Features. J Cytol Histol 8:482, 2017. DOI: 10.4172/2157-7099.1000482 査読有

### [学会発表](計5件)

田中良太、坂本憲彦、鈴木 瞳、新井信晃、橘 啓盛、岸本浩次、藤原正親、柴原純二、菅間 博、近藤晴彦: 呼吸器細胞診における細胞採取と検体処理法, 第 57 回日本臨床細胞学会秋期大会, 横浜, シンポジウム, 2018 年 11 月 18 日.

Tanaka R, Sakamoto N, Suzuki H, Tachibana K, Takei H, Kishimoto K, Fujiwara M, Kamma H, Shibahara J, Kondo H: Comparison between Cytomorphological Characteristics and Radiological Features in Non-small Cell Lung Cancer, The 17th Korea-Japan Joint Meeting for Diagnostic Cytopathology, Busan, September 10th, 2018.

田中良太、坂本憲彦、鈴木 瞳、中里陽子、橘 啓盛、武井秀史、大塚弘毅、岸本浩次、藤原正親、柴原純二、菅間 博、近藤晴彦: 肺癌診療領域における LBC を用いた遺伝子プロファイリング, 第 56 回日本臨床細胞学会秋期大会, 福岡, 地域推薦演題, 2017 年 11 月 19 日.

Tanaka R, Fujiwara M, Tachibana K, Miura J, Shimizu R, Nagashima Y, Miya T, Takei H, Shibahara J, Kamma H, Kondo H: Differentiating of Cytomorphological Characteristics in Non-small Cell Lung Cancer Predicts Value of Radiologic Features, IASLC WCLC 2017, Yokohama, October 16th, 2017.

田中良太、坂本憲彦、鈴木 瞳、橘 啓盛、中里陽子、武井秀史、藤原正親、柴原純二、菅間 博、近藤晴彦: 肺癌の細胞診と画像診断 細胞形態と画像所見との対比, 第 58 回日本臨床細胞学会総会(春期大会), 大阪, ワークショップ, 2017 年 5 月 27 日.

## 6 . 研究組織

### (1)研究協力者

研究協力者氏名：橋 啓盛  
ローマ字氏名：Tachibana Keisei

研究協力者氏名：菅間 博  
ローマ字氏名：Kamma Hiroshi

研究協力者氏名：藤原 正親  
ローマ字氏名：Fujiwara Masachika

研究協力者氏名：近藤 晴彦  
ローマ字氏名：Kondo Haruhiko

研究協力者氏名：大塚 弘毅  
ローマ字氏名：Ohtsuka Kouki

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。