

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10808

研究課題名(和文) 胸部稀少悪性腫瘍の細胞株樹立と遺伝子異常の解明

研究課題名(英文) Establishment of cell lines from rare thoracic malignancies and its genetic alterations

研究代表者

福井 高幸 (Fukui, Takayuki)

名古屋大学・医学部附属病院呼吸器外科・講師

研究者番号：70463198

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：胸部稀少悪性腫瘍のうち、胸腺腫の細胞株樹立を主に行い、2例で10継代以上の培養に成功した。さらに、胸腺上皮性腫瘍において、手術検体のパラフィンブロックを用いてPD-L1染色を行った。その結果、B2とB3胸腺腫や正岡分類3-4期の進行期胸腺腫や胸腺癌にPD-L1陽性(1%以上染色される)が有意に多いことが判明した。また、FDG-PET検査におけるFDG集積(SUVmax値)とPD-L1発現が有意に相関していた。この結果は国内外の学会にて発表することができた。さらに過去の胸腺上皮性腫瘍切除検体240例を用いて新たにPD-L1の追加染色を行ったが、評価者の異動などがあり、評価に至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胸部に発生するまれな腫瘍のうち、胸腺腫では研究に利用可能な細胞株が国内外でほとんど存在しないため、未熟ながらも初代培養に成功した意義はあると思われる。また、胸腺上皮性腫瘍と腫瘍内のPD-L1タンパク発現の頻度や臨床病理学的因子との関係を明らかにできたことで、現在は有効な薬物治療が他癌腫に比べて限られている進行胸腺腫や胸腺癌患者に対する各種免疫チェックポイント阻害薬の臨床効果が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Among the rare thoracic malignancies, we established cell lines from thymoma since 2017, and succeeded in culturing them for more than 10 passages in 2 cases. Furthermore, in thymic epithelial tumors, PD-L1 staining was performed using paraffin blocks of surgical specimens. As a result, it was revealed that PD-L1 positivity (staining 1% or more) was significantly higher in B2 and B3 thymoma, advanced stage thymoma of Masaoka stage 3 or 4. In addition, FDG accumulation (maxSUV value) and PD-L1 expression in FDG-PET scan were significantly correlated. The results could be presented at academic conferences in Japan and overseas. Furthermore, we performed additional PD-L1 staining using 240 cases of resected thymic epithelial tumor, but the evaluation could not be completed due to changes in the evaluator.

研究分野：医歯薬学

キーワード：胸腺腫 胸腺癌 細胞株

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

悪性胸膜中皮腫および、胸腺腫を主とする胸腺上皮性腫瘍はいずれも比較的稀な胸部悪性腫瘍である。胸腺腫は縦隔腫瘍の中でもっとも頻度の高い疾患ではあるが、その発生頻度は低く(10万人あたり0.6人が罹患)、診療する機会は代表的な胸部悪性腫瘍である原発性肺癌に比べると少ない。胸腺腫の進行は緩徐で、早期症例に対する切除成績は良好であるものの、進行症例、再発例においては致命的にもなりうる腫瘍である。組織学的には胸腺上皮細胞から発生する腫瘍細胞が様々な比率のリンパ球を混じえて増殖する腫瘍で、腫瘍性上皮細胞の形態やリンパ球の含有程度より組織学的に Type A, AB, B1, B2, B3 に分類され(WHO 分類)、これら組織分類は予後も反映するとされている。近年悪性腫瘍の増殖、転移の鍵となる分子を標的とした分子標的治療薬の研究はめざましい進歩を遂げ、各癌細胞の多様性に対応した治療が選択できる時代となっている。しかし、胸腺腫の遺伝子異常の詳細は明らかになっていない。そのため既存の化学療法に治療抵抗性となった場合、新規抗癌剤や分子標的薬の適応とする科学的根拠がないため治療困難な状況となってしまう。一般に悪性腫瘍の遺伝子異常解析、治療標的の探索のための基礎研究に細胞株は必要不可欠で、胸部悪性腫瘍の中では原発性肺癌において分子標的治療薬の臨床応用、薬剤耐性機序解明に細胞株は大きな役割を果たしてきた。胸腺腫では、疾患頻度が低いこと、新鮮な状態での検体入手が難しいこと等の理由でこれまでに細胞株樹立の報告は極めて少なく(typeAB: 2株、typeB1: 1株)、基礎研究、生物学的特性解明への障害となっている。いまだ日本人由来の胸腺腫細胞株は報告されていない。

2. 研究の目的

まれな胸部悪性腫瘍のうち悪性胸膜中皮腫と胸腺腫を主とする胸腺上皮性腫瘍の2つが代表的である。いずれの腫瘍も現在の治療成績は満足のものではなく、特に進行例ではいずれの腫瘍も有効な治療法は確立していない。本研究では、胸腺上皮性腫瘍に由来する細胞株の樹立を試みる。胸腺腫はまれな腫瘍であること、新鮮な状態での検体入手が難しいこと、手技的に培養が困難であることから、樹立された細胞株は極めて少なく、基礎的研究、生物学的特性解明への障害となっている。そして得られた細胞株および、当科にて治療を行った胸腺上皮性腫瘍切除標本を用いて免疫チェックポイントに関わるタンパクの発現解析を行うことにより、胸部稀少悪性腫瘍に対する治療戦略を立てることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胸腺上皮性腫瘍由来細胞株樹立の試み

胸膜播種を有する IVa 期あるいは再発例などの進行胸腺腫や胸腺癌に対しては集学的治療が行われるものの、治療成績は未だ十分とは言えない。上記腫瘍に対する治療戦略確立のために生物学的特性の解明が望まれるが、基礎研究に有用な胸腺腫細胞株は世界でわずかに3細胞株(type AB、type B1、type C 各1株)が報告されているのみである。そこで、当科で手術を施行した胸腺上皮性腫瘍患者から腫瘍組織、胸水を採取し初代培養を開始した。培養液は RPMI または DMEM にウシ胎児血清(FBS) 1-10%と抗生物質を加えたものを用い、37℃、5% CO2 下で静置培養した。培養液は3-4日ごとに更新し、位相差顕微鏡により細胞の状態を毎日観察、60-90%コンフルエントの時点で継代し、以降 75cm2 フラスコ内で継代培養した。

(2) 免疫チェックポイントに関わるタンパクの発現解析

樹立細胞株および切除標本を用いて PD-L1 の発現を免疫染色にて評価し、異常発現している細胞株の頻度、程度を解析する。PD-L1 の発現は PD-L1/CD274 Rabbit IgG monoclonal 抗体(Bioscience)を用いて腫瘍組織を免疫組織染色した。評価基準は染色範囲0%を陰性、1%を陽性とした。

4. 研究成果

(1) 胸腺上皮性腫瘍由来細胞株樹立の試み

20 継代以上および6か月以上の継続培養に2例成功し、原発組織と培養細胞のタンパク発現のパターンを免疫組織学的に評価し同一であることを確認した。(図1)また他の胸部悪性腫瘍(肺癌、悪性中皮腫)由来の細胞株樹立にも成功しており、これらは胸腺腫細胞株樹立に応用できる可能性があると考えられる。

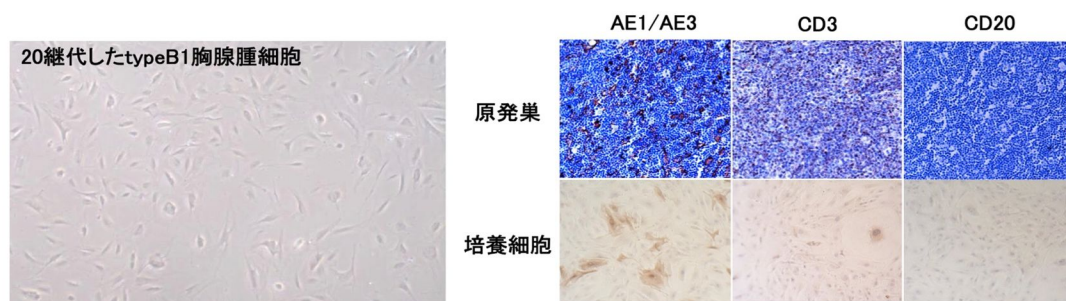


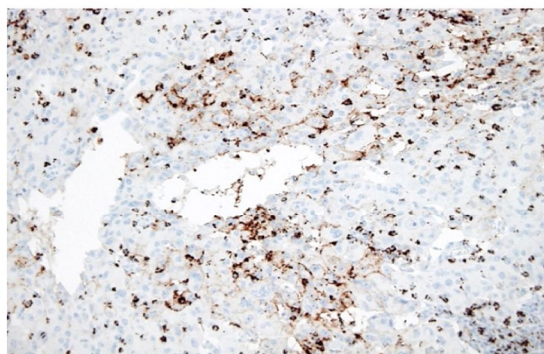
図1

(2) 免疫チェックポイントに関わるタンパクの発現解析

当院で手術が施行され、標本として採取できた胸腺上皮性腫瘍（胸腺腫、胸腺癌）検体のパラフィン包埋ブロック 81 例を薄切して免疫チェックポイントに関わるマーカー蛋白である PD-L1 染色を行った。

PD-L1 発現と臨床病理学的特徴との相関

PD-L1 発現は 22 例（27%）で陽性、59 例（73%）で陰性であった。PD-L1 発現によって層別化された臨床病理学的特徴を図 2 に示す。PD-L の高発現は、A、AB および B1 胸腺腫とは関連が無く、B2 および B3 胸腺腫と有意に関連していた（ $p < 0.001$ ）。PD-L1 陽性群は、PD-L1 陰性群よりも進行した正岡ステージ、つまり III および IV 期の割合が有意に高かった（ $p = 0.048$ ；図 2）。さらに、PD-L1 陽性腫瘍は、PD-L1 陰性群よりも FDG-PET で有意に高い SUVmax を示しました（ $p = 0.026$ ）。PD-L1 陽性グループは、PD-L1 陰性グループよりも若く（ < 70 歳）、男性である傾向があったが、統計学的に有意ではなかった。腫瘍の最大サイズ、MG の有無、切除の完全性または導入化学療法および/または放射線療法との関連に有意差は認められなかった。



免疫組織化学染色 PD-L1陽性例

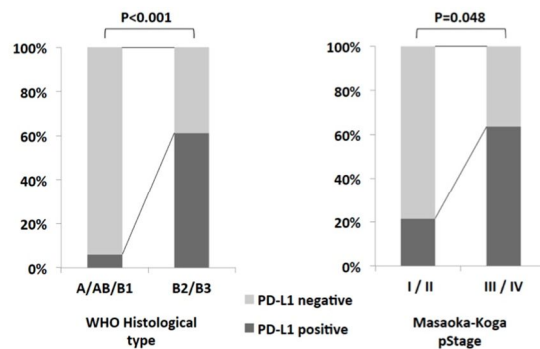


図2

PD-L1 の発現と生存との関連

腫瘍の再発は 8 人の患者で観察された。3 人は PD-L1 陽性胸腺腫で、5 人は PD-L1 陰性胸腺腫であった。PD-L1 陽性群では、5 年と 10 年の生存率はそれぞれ 96% と 78% だったが、PD-L1 陰性群では、これらの値は 80%、62% であった。PD-L1 陽性は陰性よりも短い生存期間と関連していた（ $p = 0.029$ 、図 3）。ただし、無再発生存（DFS）を分析したところ、5 年および 10 年の DFS 率は、PD-L1 陽性グループでそれぞれ 88% および 83%、PD-L1 陰性グループで 88% および 63% で有意差はなかった（ $p = 0.576$ ）。

全生存に関する単変量解析では、PD-L1 陽性と高齢が有意なリスク因子であった。（ハザード比 [HR] = 5.45； $p = 0.04$ 、および HR = 5.98； $p = 0.04$ ）。対照的に、B2/B3 組織型と III/IV の進行した正岡ステージは死亡に影響しなかった（HR = 2.42 と 3.09； $p = 0.32$ と 0.22）。多変量解析では、PD-L1 陽性と高齢は独立した予測因子とならなかった（HR = 5.57 と 4.7、 $p = 0.053$ と 0.06）。DFS の単変量解析では、PD-L1 陽性、B2/B3 組織型、および III/IV の進行期も再発に影響しなかった（HR = 1.48、4.41 および 3.47； $p = 0.59$ 、0.07 および 0.09）。

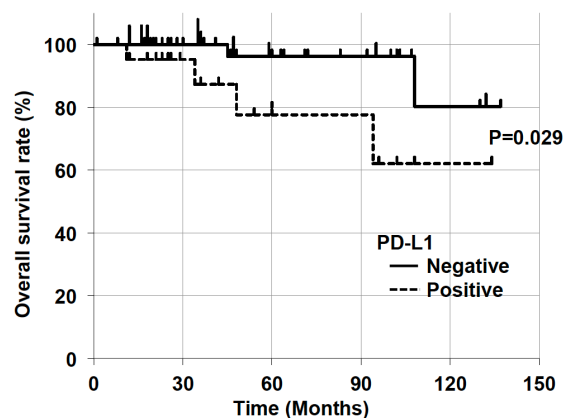


図3

対象検体の拡大

上記 81 検体に加えて当院での過去の胸腺上皮性腫瘍切除検体 240 例を用いて新たに PD-L1 の追加染色を施行した（CD274 Rabbit IgG monoclonal 抗体（Bioscience））。その発現率、組織型別の陽性率と各種臨床的情報、予後（生存率と再発率）との関連を解析する予定であったが、染色のスコアリングを依頼する予定の病理医の異動などがあり、評価を得ることができず、関連の解析をするに至らなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shuheii Hakiri, Takayuki Fukui, Shunsuke Mori, Koji Kawaguchi, Shota Nakamura, Naoki Ozeki, Taketo Kato, Masaki Goto, Yasushi Yatabe, Kohei Yokoi	4. 巻 107
2. 論文標題 Clinicopathological Features of Thymoma with expression of Programmed Death Ligand 1	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Annals of Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 418 ~ 424
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.athoracsur.2018.08.037	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hakiri S, Kawaguchi K, Fukui T, Nakamura S, Ozeki N, Mori S, Goto M, Hashimoto K, Ito T, Yokoi K.	4. 巻 9
2. 論文標題 Verification of the diagnostic strategy for anterior mediastinal tumors.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 4165 ~ 4168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-018-1362-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Fukui Takayuki, Yokoi Kohei	4. 巻 9
2. 論文標題 The new classifications for thymic epithelial tumors: benefits and problems	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Journal of Thoracic Disease	6. 最初と最後の頁 4165 ~ 4168
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21037/jtd.2017.09.119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Shuheii Hakiri, Takayuki Fukui, Shunsuke Mori, Koji Kawaguchi, Shota Nakamura, Naoki Ozeki, Masaki Goto, Yasushi Yatabe, Kohei Yokoi
2. 発表標題 Clinicopathological Features of Thymoma with the Expression of Programmed Death-Ligand 1
3. 学会等名 ESMO 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 羽切周平 福井高幸 岡阪敏樹 川口晃司 福本統一 中村彰太 尾関直樹 加藤毅人 横井香平
2. 発表標題 胸腺上皮性腫瘍におけるPD-L1発現の意義 PD-L1は予後因子となりうるか？
3. 学会等名 第34回日本呼吸器外科学会総会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	羽切 周平 (Hakiri Shuhei) (40647476)	名古屋大学・医学部附属病院・病院助教 (13901)	
研究分担者	川口 晃司 (Kawaguchi Koji) (10402611)	名古屋大学・医学部附属病院・病院准教授 (13901)	
研究分担者	横井 香平 (Yokoi Kohei) (60378007)	名古屋大学・医学系研究科・教授 (13901)	