

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：82606

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K15087

研究課題名（和文）肺腫瘍間質における弾性線維合成機序の解明

研究課題名（英文）Mechanisms of Elastic Fiber Synthesis in Lung Tumor Stroma

研究代表者

中井 登紀子（NAKAI, TOKIKO）

国立研究開発法人国立がん研究センター・東病院・医員

研究者番号：00619538

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：弾性線維増加を伴う上皮内腺癌/置換型腺癌および微小結節性肺胞上皮過形成には上皮の肺胞上皮置換性増殖とsubepithelial myofibroblast (SEMF) の存在が確認できたが、硬化性肺胞上皮腫では弾性線維増加やSEMFの存在は認められなかったことから肺腺系腫瘍の弾性線維形成において腺系腫瘍細胞の肺胞上皮置換性増殖と腫瘍細胞直下のSEMFの存在が重要であることが推察された。また、EGFR遺伝子変異肺腺癌では、EGFR遺伝子変異の検出されていない肺腺癌に比して肺胞上皮置換性増殖成分の割合が多く、弾性線維量も有意に増加していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺癌に対する治療においては、組織型はもとより遺伝子変異や特異的蛋白発現状況などを様々な検査が施行され、検査結果に則って治療方針が決定する。特に遺伝子変異を標的とした治療は大きく患者の予後に寄与することから、積極的な検査が推奨されているが、検査には更なる時間と検査のための医療費を要することとなる。本研究において、病理学的診断に用いる手術検体のHE(Hematoxylin-Eosin)染色標本や特殊染色標本から得られるEGFR遺伝子変異肺癌の特徴の一つが明らかとなり、EGFR遺伝子変異肺癌の可能性を予測し、診断および治療方針決定をより迅速に行うことができると考える。

研究成果の概要（英文）：Adenocarcinoma in situ(AIS)/lepidic adenocarcinoma with increased elastic fibers and multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia(MMPH) showed the presence of epithelial lepidic growth and subepithelial myofibroblast (SEMF), while no increased elastic fibers or SEMF were observed in sclerosing pneumocytoma. It was inferred that the alveolar epithelial lepidic growth of glandular tumor cells and the presence of SEMF are important in the formation of elastic fibers in lung glandular tumors. In addition, EGFR-mutated lung adenocarcinomas had a greater proportion of lepidic growth components and significantly increased elastic fiber volume compared to EGFR-wild type lung adenocarcinomas.

研究分野：病理学

キーワード：肺腫瘍 癌 EGFR遺伝子

1. 研究開始当初の背景

呼吸機能を支える弾性線維は肺胞壁の重要な構造物であるとともに、炎症や腫瘍による構造変化の評価に有用な要素であることから、改訂第8版肺癌規約でも弾性線維染色が強く推奨されている。弾性線維の増加(elasotosis)は肺の腺系腫瘍において特徴的であり、良性でもみられ、また肺以外の臓器や腺系以外の腫瘍ではみられない点で、同じ細胞外マトリックスでありながら、各種の浸潤がん間質に普遍的にみられる膠原線維増生(desmoplasia)とは異なる。肺腺系腫瘍における弾性線維；肺腺癌においては浸潤癌と判断する指標として中心部で弾性線維の凝集や破壊が挙げられ、上皮内腺癌では既存の弾性線維網は保たれる。野口分類をはじめとして、本邦から報告された小型肺腺癌研究の多くはHE標本とともにEVG染色標本を研究対象としてきたが、弾性線維はあくまでも構造を評価する指標として用いられており、肺病理医にとってあまりにありふれた所見であることから、EVG染色で黒色に強く染色される elastosis が単に既存の肺胞弾性線維網が凝縮したのか、腫瘍と関連して産生されたのかさえ曖昧なままである。Elastosisは肺以外の臓器、また腺癌以外の組織型ではほとんどみられないことから、肺腺系腫瘍に特異な間質反応であると言える。上皮内腺癌 Adenocarcinoma in situ(AIS)においてもEVGで強く染色される elastosis がみられることがしばしばある。また、前浸潤性病変とされる Atypical adenomatous hyperplasia(AAH) と結節性硬化症に合併する多発肺病変 Multifocal micronodular pneumocyte hyperplasia(MMPH)は肺胞上皮様細胞が置換性増殖性する点で形態的に類似しているが、間質の elastosis がAAHでは全くみられないが、MMPHでは顕著であることが重要な鑑別点となる。さらに、良性腫瘍である Pulmonary sclerosing pneumocytoma(PSP)はⅡ型肺胞上皮様および分化不明の2種類の細胞からなり、置換性増殖せず elastosis もみられない。

一方、発生学では肺胞形成における上皮細胞と間質MFのcross-talkによる弾性線維網の形成が解明されつつあり、胎生の最終段階で急速に進行する肺胞形成はⅡ型肺胞上皮に誘導された筋線維芽細胞が弾性線維形成をリードすることが知られている。この発生過程の知見をもとに、「①AISやMMPHでは、増殖する腺系細胞は肺胞形成期のⅡ型肺胞上皮細胞に類似の性質をもつ、②増殖腺上皮からのシグナル伝達により局所の間質細胞がSEMFに誘導される、③SEMFは肺胞形成期の肺胞入口輪に出現するMFと類似の性質をもつ、④SEMFがtropoelastinなどを産生する、これらの過程を経て非浸潤癌でありながら間質(肺胞隔壁)にelastosisを生じる」可能性を考えた。

2. 研究の目的

(1)「肺腫瘍間質の elastosis は普遍的な腫瘍間質ではなく、肺に特徴的な反応であり、その機序は発生に求められる」という仮説を証明することを主題とし、上皮内腺癌、浸潤性腺癌、多発性小結節性肺細胞過形成、硬化性肺胞上皮腫を対象に、弾性線維染色を施行して弾性線維形成を評価する一方、免疫組織化学染色を行って弾性線維形成に関わる subepithelial myofibroblast (SEMF) の発現と局在を評価することで、肺腺系腫瘍固有の弾性線維に富むマトリックス形成機序の検討を目的とした。

(2) (1)の結果を踏まえ、肺腺癌と弾性線維増生について更に検討することとした。

肺癌治療においては、組織型はもとより遺伝子変異や特異的蛋白発現状況などを様々な検査が

施行され、検査結果に則って治療方針が決定する。特に、EGFR、ALK、RAS、MSI などの遺伝子変異を標的とした治療は大きく患者の予後に寄与することから積極的な検査が推奨されており、病理学的診断に用いる手術検体の HE (Hematoxylin-Eosin) 染色標本や特殊染色標本のみを用いて各種遺伝子変異を予測出来れば時間と医療費の削減に貢献出来ると考え、効率の良い検索方法の検討のため、EGFR 遺伝子変異を示す肺腺癌の組織学的特徴を見出すことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 奈良県立医科大学呼吸器外科において外科的切除された肺手術症例から EVG 染色にて高度の elastosis を伴う AIS 6 例および、elastosis を欠く AIS 2 例、浸潤性腺癌 18 例、良性病変として papilloma 2 例、MMPH 6 例、PSP 6 例 のホルマリ固定パラフィンブロック (FFPE) 組織を研究対象とした。

① EVG 染色標本を作製し、オリンパス社製イメージングソフトウェア cellSens Dimension を用いて、弾性線維を評価した。

② 免疫染色①腫瘍細胞の肺胞上皮分化の評価を目的として TTF-1、Napsin A、SP-A、Podoplanin、p40、さらに MF のリガンドである PDGFA の発現および局在を調べた。②MF 前駆細胞および SEMF の評価を目的として PDGFR α 、PDGFR β 、 α SMA の発現および局在を調べた。

(2) 国立がん研究センター東病院呼吸器外科において手術摘出された肺癌症例のうち、EGFR 遺伝子変異検査施行済み症例を研究対象とした。

① 肺胞上皮置換性増殖部分の腫瘍全体に占める割合を算出した。

② 肺胞置換性増殖部分を含まない症例を除外し、弾性線維染色標本で肺胞置換性増殖部分における肺胞隔壁内弾性線維の厚さを測定した。浜松ホトニクススーパーチャルスライドスキャナ (NanoZoomer) を用いて肺胞置換性増殖部位からランダムに 10 か所選択し、弾性線維幅を計測した。

4. 研究成果

(1) 弾性線維増加を伴う上皮内腺癌および置換型腺癌では、殆どすべての症例に subepithelial myofibroblast (SEMF) の存在が確認でき、「SEMF が弾性線維形成に関わる」とするこれまでの報告に合致する結果であった。

弾性線維増加を伴う乳頭型腺癌においては、浸潤癌領域に SEMF の存在は認められず、肺胞上皮を置換する様に増殖を示す領域において SEMF の分布が認められた。

線維化巣内に弾性線維凝集巣が認められる症例では、SEMF の分布が確認されず、弾性線維増生というよりは、既存の血管や肺胞構造内の弾性線維が凝集したものであると考えられる。微小結節性肺胞上皮過形成 (MMPH) は、全例において II 型肺胞上皮様細胞の置換性増殖が認められ、肺胞隔壁内には著明な弾性線維増加と SEMF の存在が確認できた。

硬化性肺胞上皮腫 (PSP) では、II 型肺胞上皮様細胞の存在は認められるものの肺胞上皮置換性の増殖は認められず、弾性線維の増加や SEMF の存在も認められなかった。

今回の検討では、肺腺系腫瘍の弾性線維形成において II 型肺胞上皮類似の性質を有する腺系細胞の置換性増殖と、腫瘍細胞直下に存在する subepithelial myofibroblast (SEMF) の存在が重要であることが確認できたが、本検討では、腫瘍細胞における胎児期 II 型肺胞上皮細胞の性質の有無について、その評価に際して胎生期肺胞形成に関わる分子である PDGF- α , β および PDGFR- α , β についての免疫染色を施行したが、非特異的染色が強く判定困難であった。更なる

検討には、蛍光染色や分子レベルでの検索が必要であると考えたが、当施設においてこれらの検討が困難であったため、研究目的を（研究2）に変更した。

組織型		Elastosisの有無	症例数	Eupeithelial-myofibroblast (+)	II型肺胞上皮マーカー (+)
Adenocarcinoma in situ (AIS)		Elastosis (+)	6	6	5
		Elastosis (-)	2	1 (focal)	2 (いずれもfocal)
Invasive adenocarcinoma	Lepidic type	Elastosis (+)	7	7 (うち1例はごく少数)	7
		Elastosis (-)	1	1	1
	Papillary type	Elastosis (+)	5	5	5
		Elastosis (-)	0	0	0
	Solid type	Elastic fiber 凝集 (+)	4	0	3
		Elastosis (-)	1	0	0
papilloma		Elastic fiber 凝集 (+)	1	0	0
		Elastosis (-)	1	0	1 (focal)
MMPH		Elastosis (+)	6	6	6
PSP		Elastosis (-)	6	6	6

表 1)

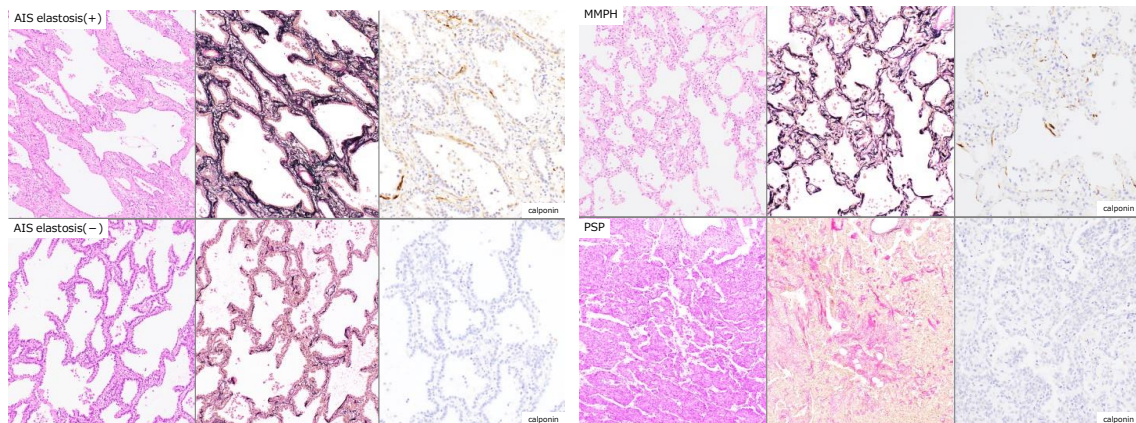


図 1) HE 染色(左), EVG 染色(中), calponin 染色(右)

(2) EGFR 遺伝子変異肺癌では、EGFR 遺伝子変異が検出されていない肺癌に比して、有意に肺胞上皮置換性増殖の割合が多かった ($p < 0.001$) [表 2]。また、中でも、Ex21L858R 変異肺癌では、EGFR 遺伝子変異が検出されていない肺癌に比して、肺胞上皮置換性増殖の割合が有意に多かった ($p < 0.001$) [表 2]。

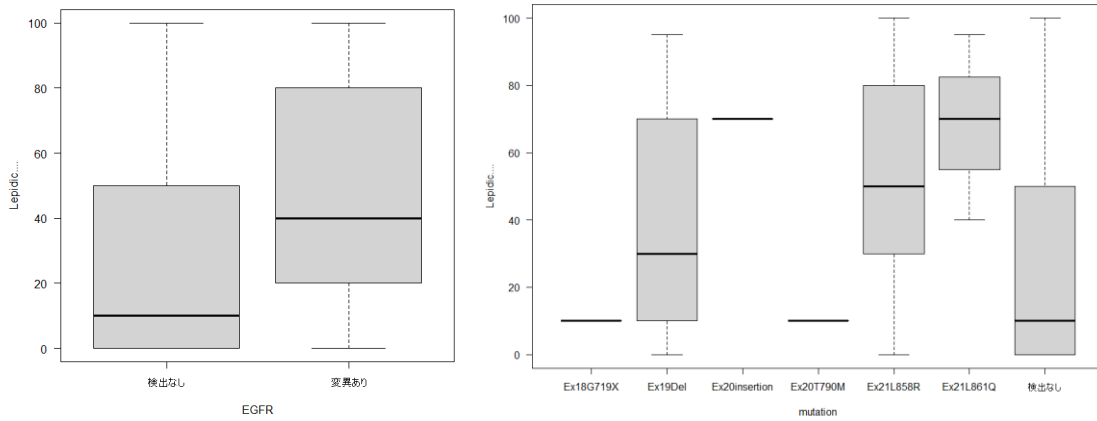


表 2) 肺胞上皮置換性増殖の割合 (%)

また、弾性線維量の比較においては、EGFR 遺伝子変異肺癌では、EGFR 遺伝子変異が検出されていない肺癌に比して、有意に弾性線維幅が厚く、弾性線維量が増加していた(表 3)。更に、EGFR 変異遺伝子によって弾性線維増加の程度は異なっており、EGFR 遺伝子変異肺癌においても、変異遺伝子の違いによって弾性線維増生に差が認められ、Ex21L858R と Ex19Del 間には有意差が認められた(p<0.001)。

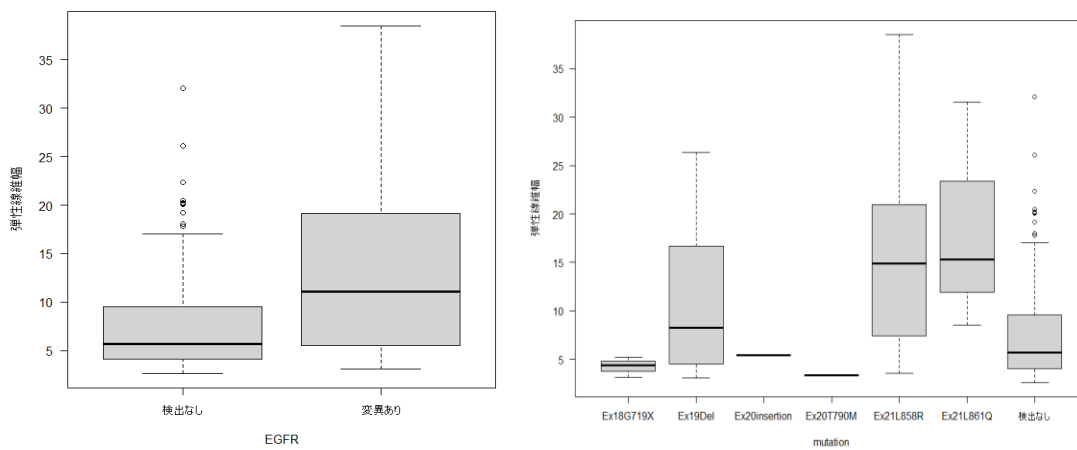


表 3) 肺胞上皮置換性増殖部分における弾性線維幅(μm)

EGFR 遺伝子変異肺腺癌においては、弾性線維増生や肺胞上皮置換性増殖を示すものが多く、本来の肺胞構造を破壊しながら増殖するものが少ないことが示唆された。しかしながら、EGFR 遺伝子変異が検出されていない症例においても、弾性線維増生および肺胞上皮置換性増殖を示す症例が半数程度認められており、理由の一つとしては EGFR 遺伝子変異が検出されていない症例の中に現行で検査されていない EGFR 遺伝子変異を有する症例が含まれている可能性も考えられた。

今後更に EGFR 変異が検出されていない肺癌において変異遺伝子を検索するとともに、その他の各種遺伝子変異陽性肺癌の組織学的特徴の検討も行い、その生物学的特徴を明らかにしたいと考える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中井登紀子
2. 発表標題 肺腫瘍間質における弾性線維合成機序の検討
3. 学会等名 第108回 日本病理学会総会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------