

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：32645

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09313

研究課題名(和文) 肺癌術後再発の克服を目指した網羅的遺伝子発現解析と再発予測アルゴリズムの確立

研究課題名(英文) Algorithm to predict lung cancer recurrence by using gene expression analysis

研究代表者

工藤 勇人 (Kudo, Yujin)

東京医科大学・医学部・講師

研究者番号：80623800

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肺癌の術後再発の原因となる微小転移を引き起こすバイオマーカーの探索を目的として、臨床病理学的データを用いた解析、新しい病理組織学的因子の解析、血液検体を用いたドライバー遺伝子解析、遺伝子発現解析を実施した。小型肺癌における術前画像診断因子と予後との関係を解析し、充実成分の体積が予後を予測する因子であることを報告した。さらに、術後再発における免疫療法の効果を予測するための遺伝子発現解析による免疫微小環境の検討では、腫瘍浸潤リンパ球の分布や疲弊T細胞や制御性T細胞の分布が影響していることを報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究によって肺癌術後再発に影響する術前因子を見出し、また再発に関わる術後因子についても報告を行なった。再発なく根治を目指すための手術戦略や術後のフォローアップ検査計画における一助になるものと考えられた。また近年、注目されている免疫チェックポイント阻害薬についての術後再発に対する治療効果を予測しうる免疫微小環境の特徴について報告し、術後再発治療における個別化医療につながるものと考えられた。本研究の成果により、必要な検査や治療を必要な人へのみ行うことが可能となり、身体的負担の軽減や、さらには医療経済への負担軽減に寄与するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this research, we investigated clinicopathological factors related to postoperative recurrence in patients with lung cancer. We utilized driver gene analysis using circulating tumor DNA from their plasma samples, and we performed gene expression analysis to explore micrometastasis biomarkers, which cause postoperative recurrence of lung cancer.

We analyzed preoperative radiological factors in patients with small-sized lung carcinomas to predict recurrence.

Furthermore, the tumor immune microenvironment was associated with the efficacy of immunotherapy for postoperative recurrence. The distribution of exhausted T cells and regulatory T cells were critical predictive factors, as well as that of tumor-infiltrating lymphocytes.

研究分野：呼吸器外科

キーワード：肺癌 術後再発 遺伝子異常

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肺癌に対する外科的切除術は、肺癌を根治する可能性が高い治療法であるが、再発を来し予後不良な経過を辿る症例も少なくない。大腸癌や乳癌において病理病期 期の 5 年生存率はほぼ 100%に近いが、肺癌では病理病期 I 期であっても 5 年生存率は 73-90%程度であり、術後再発は肺癌の予後不良の一因であると考えられている。進行肺癌に対して分子標的治療薬や免疫チェックポイント阻害薬による薬物療法の有効性が多く報告されてきているものの、術後再発の制御を目的とした治療法は、術後病理病期によって決定される殺細胞性抗癌剤による術後補助化学療法である。術後再発に関連する臨床病理学的因子は多々報告があるが、術後再発の正確な予測は困難であり、また術後補助化学療法の恩恵が得られる症例を予測することも難しいのが現状である。そのため、不必要な化学療法の投与が施行され、患者への肉体的負担、医療費増加の一つの要因になっていることも事実である。さらには、術後再発を来した場合、適切な治療によって再発病変を比較的長期に病勢制御できた場合でも、多くは根治に至ることは難しい。再発メカニズムは、術前に存在していた微小転移が増大し、転移巣として認識される、と一般的に考えられている。すなわち、微小転移の同定は再発予測につながり、外科的切除を含めた集学的治療の恩恵を最大限に発揮することで、肺癌の根治をもたらす。肺癌手術例の再発に関するバイオマーカーを明らかにすることは、急務であると考えられている。

2. 研究の目的

肺癌の外科的切除後再発の主な原因とされる微小転移を早期に発見し、外科的切除術後の根治を目指すものである。肺癌原発巣に存在しうる微小転移のポテンシャルを有する細胞が引き起こす臨床病理学的因子や、遺伝子異常に着目し、外科的手術検体を用いて再発予測因子の同定を目指すことを目的とした。さらには、術前の臨床病理学的因子から再発リスク予測を行うことも目的とした。

3. 研究の方法

本研究では、(1)-(4)の項目で外科的切除後の非小細胞肺癌における再発に関する検討を行うこととした。臨床データに基づく解析を始め、血漿検体からの循環腫瘍 DNA をターゲットにしたドライバー遺伝子検査、さらには新たな病理組織学的因子の探索、そして、遺伝子発現解析による再発因子における解析を実施した。

(1) 臨床データにおける術後再発における検討

当院で非小細胞肺癌に対して根治的標準手術を施行した 2220 例を対象として、術後再発時期、初再発形式について、組織型や病理病期を含む臨床病理学的因子について、後方視的に解析した。

当院で非小細胞肺癌に対して根治的標準手術を施行し再発を認め、EGFR 遺伝子変異検査が行われた 465 例を対象に再発後生存に関する臨床病理学的因子に関して後方視的に検討を行なった。

非小細胞肺癌のうち他の組織型に比べて予後不良とされる多形癌を対象に、根治切除例 52 例を対象に、術後再発時期、初再発形式について、臨床病理学的因子について、後方視的に解析した。

2cm 以下の充実成分優位な非小細胞肺癌に対して、肺葉切除もしくは区域切除が行われた 157 例を対象に、術前 CT 画像の 3 次元画像データを人工知能解析によって後方視的に解析し、予後因子の検討を行なった。

(2) 血漿検体を用いた術後再発に関する検討

肺癌の代表的なドライバー遺伝子の一つである EGFR 遺伝子変異について、再発時に血中循環腫瘍 DNA において複数回の検査により検出可能かどうかを検討した。原発巣において EGFR 遺伝子変異陽性を確認した肺腺癌 57 例を対象に、コバス®EGFR 変異検出キット v2.0 を用いて血漿検体の解析を行なった。原発巣検体と血漿検体における EGFR 遺伝子変異解析の比較や、複数回の

血漿検体を用いた EGFR 遺伝子変異解析に関して、さらに組織再生検の実施の有無、について検討を行なった。

(3) 病理組織学的解析を用いた術後再発に関する検討

再発リスク因子の病理組織学的解析に関しては、肺扁平上皮癌根治切除された 254 例を対象に病理組織学的評価を行った。これまでの病理学的予後不良因子である脈管侵襲や胸膜浸潤の他に、Spread through air spaces (STAS)、浸潤増殖様式 (INF)、間質繊維化反応 (DR) についても検討を行なった。

(4) 分子病理学的解析を用いた術後再発に関する検討

非小細胞肺癌に対して根治的肺切除後に再発と診断された 40 例を対象に、無再発例の 8 例を対照として、原発巣から全 RNA を抽出し、mRNA をターゲットとして遺伝子発現解析を実施した。Nanostring 社の PanCancer Progression Panel を用いて解析した。mRNA の定量および定性を行い QC 評価により全ての検体で解析の基準を満たしていることを確認した。

非小細胞肺癌に対して根治的肺切除後に再発と診断され、免疫チェックポイント阻害薬による治療が行われた 48 例を対象に、原発巣から全 RNA を抽出し、mRNA をターゲットとして遺伝子発現解析を実施した。Nanostring 社の PanCancer Immune Profiling Panel を用いて解析した。mRNA の定量および定性を行い QC 評価により全ての検体で解析の基準を満たしていることを確認した。

4 . 研究成果

本研究により、非小細胞肺癌における外科的切除後の再発に関する因子について、以下の (1) - (4) に示す結果を得た。術後再発に関する臨床病理学的因子に加え、血漿由来循環腫瘍 DNA における遺伝子変異解析データ、STAS をはじめとした病理組織学的因子の術後再発との相関、そして、遺伝子発現解析による再発や免疫療法における治療予測因子について検討した結果である。

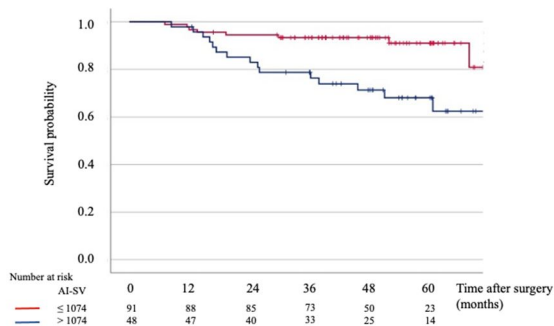
(1)

非小細胞肺癌 2220 例の根治切除例を対象に、病理病期および組織型について、検討を行なった。病理病期 I 期において、腺癌は 5 年無再発生存率が 85.8% である一方、扁平上皮癌、その他組織型では、63.9%、53.8% と予後に有意差を認めていた。一方、各組織型別に、病理病期と再発時期の検討を行った。再発を認めた 486 例を対象に腺癌、扁平上皮癌においては、病理病期 III 期の再発期間中央値は、11.7 ヶ月、9.3 ヶ月であり、病理病期 I - II 期と比べて有意に短い結果であった。

非小細胞肺癌に対して根治的標準手術を施行し再発を認め、EGFR 遺伝子変異検査が行われた 465 例を対象に、EGFR 遺伝子変異の有無で再発後生存に関して検討を行なった。1 年以内の早期再発率は、EGFR 遺伝子変異陽性肺癌再発例の 30.1% であり、一方で EGFR 遺伝子変異野生型肺癌再発例は 46.4% であり、と有意な違いを認めていた。

肺多形癌 52 例の根治切除例について検討を行った。5 年生存率、5 年無再発生存率はそれぞれ、47.3%、38.1% であった。病理病期 I 期と II 期以上において、5 年無再発生存率はそれぞれ 53.3%、31.6% であり、再発までの期間中央値はそれぞれ 10.8 ヶ月、7.6 ヶ月であった。病理病期によらず再発率は高く、再発時期中央値も病理病期に関わらず 1 年未満であった。

2cm の病理病期 I 期非小細胞肺癌に対して根治切除された 157 例を対象に、術前 CT 画像を用いて解析した。病変のすりガラス領域と充実領域を人工知能解析により、自動で 3 次元画像データとして算出することが可能であり、その他の術前画像診断的因子を含めて解析を行った。PET/CT による SUVmax 値や腫瘍マーカーに加えて、3 次元解析された因子である充実成分の体積 (AI-SV) が、有意に相関を認めることが明らかになった。近年、小型肺癌における縮小手術が注目されているが、再発のなく根治を目指すための術式決定においては、これらの因子を考慮することが肝要であることが示唆された。



(2)

肺癌症例の血液検体を用いた血漿 EGFR 遺伝子変異の検出について検討を行った。EGFR 遺伝子変異陽性肺腺癌を対象に、複数回の血漿 EGFR 遺伝子変異検査を実施した症例を解析した。初回血漿検査において原発巣と同一の遺伝子変異を認めたのは 42%であり、複数回の血漿検査では 9 例が追加で同定され、57%で同一の遺伝子変異を認めた。

(3)

肺扁平上皮癌の切除例を対象に、従来から報告のある病理学的予後不良因子である脈管侵襲や胸膜浸潤の他に、STAS、INF、DR について、病理学的に再評価を行い、術後再発との関係について検討を行なった。

STAS は全体の約 60%で認めていた。血管浸潤陽性は 76%、リンパ管侵襲陽性は 61%であり、その他、INF 強陽性 39%、DR 強陽性 46%であった。肺扁平上皮癌において STAS 陰性例でも再発を多く認めており、術後再発に影響しうる因子に関してさらなる検討が必要と考えられた。

(4)

非小細胞肺癌に対して根治的肺切除後に再発と診断された 40 例を対象に、無再発例の 8 例を対照として、mRNA をターゲットとして遺伝子発現解析を実施した。再発に関する発現変動遺伝子の探索を行なったが、全症例、腺癌症例、扁平上皮癌症例において検討を行なったが、特異的な遺伝子を同定し得なかった。再発に関する遺伝子の同定を行うため、さらなる解析を継続していく予定である。

非小細胞肺癌に対して根治的肺切除後に再発と診断され、免疫チェックポイント阻害薬による治療が行われた 48 例を対象に、mRNA をターゲットとして遺伝子発現解析を実施した。PD-L1 発現別および組織型別の免疫細胞の分布について検討し、さらに免疫チェックポイント阻害薬との効果に関して免疫細胞の分布を検討した。PD-L1 陽性肺癌では、TIL が高値であった。さらに、扁平上皮癌と比べ、腺癌では TIL 高値であった。PD-L1 陽性肺癌において、PD-L1 発現の割合が高値の症例は、CD8T 細胞の割合が高かった。免疫チェックポイント阻害薬の奏効例では、CD8T 細胞比で疲弊 T 細胞や Treg の割合が低い結果であった。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Kudo Yujin, Shimada Yoshihisa, Matsubayashi Jun, Kitamura Yoshiro, Makino Yojiro, Maehara Sachio, Hagiwara Masaru, Park Jinho, Yamada Takafumi, Takeuchi Susumu, Kakihana Masatoshi, Nagao Toshitaka, Ohira Tatsuo, Masumoto Jun, Ikeda Norihiko	4. 巻 61
2. 論文標題 Artificial intelligence analysis of three-dimensional imaging data derives factors associated with postoperative recurrence in patients with radiologically solid-predominant small-sized lung cancers	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 European Journal of Cardio-Thoracic Surgery	6. 最初と最後の頁 751 ~ 760
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/ejcts/ezab541	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 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 Immune profiling analysis reveals suppressed tumor immune microenvironment in brain metastases from non-small cell lung cancer
3. 学会等名 第120回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 Recurrence Patterns in surgically resected non-small cell lung cancer
3. 学会等名 第73回日本胸部外科学会定期学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 非小細胞肺癌根治切除術後の再発時期・形式の検討
3. 学会等名 第61回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 Immune profiling analysis reveals suppressed tumor immune microenvironment in NSCLC brain metastases
3. 学会等名 第18回日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 当院におけるEGFR遺伝子変異検査に対するLiquid BiopsyとTissue Biopsyの現状
3. 学会等名 第42回日本呼吸器内視鏡学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 小型肺癌に対する 3 次元画像診断システム人工 知能解析を用いた予後因子の検討
3. 学会等名 第62回日本肺癌学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 工藤 勇人
2. 発表標題 Surgical treatment for postoperative recurrence in patients with non-small cell lung cancer
3. 学会等名 第36回日本呼吸器外科学会学術集会
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
研究分担者	松林 純 (Matsubayashi Jun) (00338790)	東京医科大学・医学部・教授 (32645)	
研究分担者	池田 徳彦 (Ikeda Norihiko) (70246205)	東京医科大学・医学部・主任教授 (32645)	

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
---------	---------