

令和 5 年 5 月 24 日現在

機関番号：15201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07392

研究課題名（和文）腫瘍浸潤リンパ球と腫瘍関連マクロファージに着目した肺癌細胞の進展メカニズムの解明

研究課題名（英文）A study on mechanism of lung cancer cell spread focused on tumor-infiltrating lymphocyte and tumor-associated macrophage

研究代表者

門田 球一（Kadota, Kyuichi）

島根大学・学術研究院医学・看護学系・教授

研究者番号：70448356

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）：肺癌細胞が腫瘍辺縁を超える肺胸腔に進展する所見をTumor spread through air spaces (STAS) として提唱した。STAS発生機構の解明に繋がる研究成果も報告した。まず、上皮間葉転換誘導で癌細胞が非上皮型を示す場合にSTASの頻度が上昇することを明らかにした。次に、腫瘍関連マクロファージがSTAS頻度と正の相関関係を示し、単球/マクロファージ系の免疫応答がSTASを促進する可能性を報告した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肺実質は肺胞内に含気腔が存在し、消化器系のように層構造が存在しないため、基底膜の破壊や深達度に基づく浸潤性の評価が困難である。よって、肺癌細胞の浸潤増殖パターンにより悪性度を評価することが重要である。我々は肺癌細胞が腫瘍辺縁を超える肺胸腔に進展する所見をTumor spread through air spaces (STAS) として提唱し、STASはWHO分類第4版で肺癌細胞の進展形式の1つとして記載された。STAS発生機構の解明に繋がる研究成果として、上皮間葉転換誘導や腫瘍関連マクロファージがSTASの発生に関連する可能性を報告し、癌細胞の進展を制御する研究への糸口となった。

研究成果の概要（英文）：Lung cancer can spread in numerous ways, one of which has been suggested to be spread through air spaces (STAS). The tumor immune microenvironment appears to play a significant role in this spread. We demonstrated that a high density of CD68 + TAMs is an independent predictor of an increased STAS rate. Additionally, STAS is correlated with aggressive tumor behavior characteristics. We have demonstrated that in patients with resected lung carcinoma, STAS was less frequent in tumors with an epithelial phenotype than in those with non-epithelial phenotype.

研究分野：肺癌病理学

キーワード：肺癌 病理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Tumor spread through air spaces (STAS) は肺癌細胞の新たな進展形式として申請者が提唱した。STAS は予後不良因子となるが、STAS 発生の生物学的メカニズムは解明されていない。癌細胞の増殖や浸潤は、腫瘍免疫微小環境を介しても制御され、申請者らは制御性 T リンパ球浸潤や腫瘍関連マクロファージの増加が、癌細胞の悪性度と相関することを解明した。さらに、STAS の発生が腫瘍免疫微小環境により制御されている可能性に着目している。

本研究では肺癌を対象に免疫組織化学を用いて、腫瘍浸潤リンパ球と腫瘍関連マクロファージを定量的に評価し、STAS 発生の生物学的メカニズムを腫瘍免疫微小環境の観点から明らかにする。さらに、腫瘍免疫微小環境や STAS の存在が、がん免疫療法の治療効果に与える影響を解明する。将来的にはがん免疫療法による STAS 発生の制御を解明する研究への発展を目指すことで、STAS を伴う悪性度の高い肺癌に対する特異的な治療法の開発が期待される。

2. 研究の目的

Tumor spread through air spaces (STAS) は肺癌細胞の肺胞腔内への高悪性度な進展形式として申請者が提唱した (Kadota et al. J Thorac Oncol 2015)。STAS を伴う肺癌は再発率が高く、予後因子としての重要性は多くの施設で確認され (Kadota et al. Am J Surg Pathol 2017, Am J Surg Pathol 2019) WHO 分類に記載された。しかし、STAS 発生の生物学的メカニズムに関しては解明されていない。

近年、進行期非小細胞肺癌ではがん免疫療法が発展し、特に抗 PD-1 抗体薬の有効性が示されている。PD-1 と CD8 陽性の T リンパ球浸潤は、抗 PD-1 抗体薬の効果を高めることが示されており (Thommen et al. Nat Med 2018)、バイオマーカーとして期待される。申請者らは、腫瘍の進展が腫瘍免疫により制御されていることを明らかにしてきた。FoxP3 陽性制御性 T リンパ球の増加や腫瘍の IL-7R 発現が、腫瘍促進性の免疫微小環境を形成し (Kadota et al. Oncoimmunology 2013, Chest 2015, Suzuki, Kadota et al. J Clin Oncol 2013) CD163 陽性腫瘍関連マクロファージ / CD8 陽性 T リンパ球比の増加が腫瘍の悪性度を高めることを解明した (Ujii, Kadota et al. Oncoimmunology. 2015)。

本研究課題では“STAS の発生を促進する因子は何か”、“STAS 発生の抑制には何か必要か”が学術的問いである。本研究では STAS の発生機構の解明のため、腫瘍免疫微小環境に着目し、さらに STAS の存在が抗 PD-1 抗体薬の治療効果に与える影響を検討することを考えた。

3. 研究の方法

(1) 肺癌切除症例の臨床・病理データファイルの確立

香川大学医学部附属病院で 1999 年～2015 年の間に切除された約 1200 例の非小細胞肺癌症例を集め、患者転帰 (生存、癌再発の有無、再発部位) を確認し、データの更新を行う。TNM 病期は最新版の AJCC Cancer Staging Manual (8th ed. 2016) に基づき再分類を行う。

(2) 病理組織学的評価

癌組織のパラフィンブロックや病理標本を収集し、STAS や脈管浸潤の有無、腫瘍の浸潤度、組織型や亜型分類を判定する。

(3) 組織マイクロアレイの作成

癌組織の代表的な部位をマーキングする。組織マイクロアレイヤー (Tissue microprocessor KIN-2, Azumaya) を用いて、癌組織から 3mm のコアを抜き、別のパラフィンブロックに整列させる (20 コア/1 ブロック)。組織マイクロアレイから 4 μm の薄切標本作製する。

(4) 免疫細胞マーカーの免疫組織化学的染色

自動免疫染色装置 (Ventana Benchmark System, USA) を用いて、汎 T リンパ球 (CD3, CD5) 細胞傷害性 T リンパ球 (CD8) ヘルパー T リンパ球 (CD4) 制御性 T リンパ球 (CD25, FoxP3) 汎 B リンパ球 (CD20, CD79a) 前駆/ 胚中心 B リンパ球 (CD10) 汎マクロファージ (CD68) M2 マクロファージ (CD163, CD206) 免疫チェックポイント分子 (PD-L1, PD-1) サイトカイン受容体 (IL-7R) の各マーカーを染色する。

後述の統計解析で有意な 2 つのマーカーの組み合わせに関しては、二重染色を行う。

(5) デジタル画像解析システムによる評価

染色標本で各症例の癌組織から、免疫細胞の浸潤が目立つ 3 視野 (200 倍視野、接眼レンズの視

野数 22mm) を選択し、顕微鏡用デジタルカメラ (Olympus) で組織写真を撮影する。画像解析システム (Pathoscope, Mitani Corporation) を用い、腫瘍内に浸潤した免疫細胞数を計測し、3 視野での平均値を各症例の計測値とする。

(6) 統計解析

医療用統計ソフト (SPSS Statistics Ver23, IBM) を用いて解析を行う。統計解析法としては、Fisher exact test, Mann-Whitney U test, Kaplan-Meier method, Cox proportional hazards regression model などを用いる。

免疫細胞の計測数を中間値で 2 群に分けて、腫瘍の悪性度(患者の予後、腫瘍の大きさ、浸潤度、脈管浸潤、リンパ節転移)との関連性を統計学的に解明する

統計学的に有意なマーカーに関しては、他のマーカーとの比率を求めるとともに、二重染色の結果から腫瘍免疫微小環境において特異性の高い免疫細胞の分布が、腫瘍の悪性度に与える影響を明らかにする。

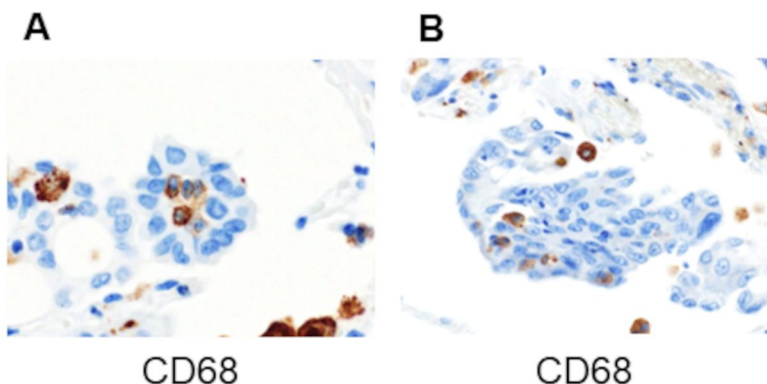
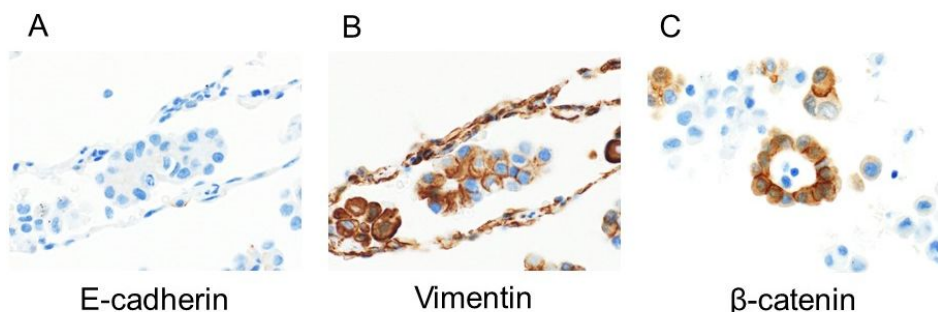
次に、症例を STAS 有無で 2 群に分け、2 群間での免疫細胞の計測数の差異を統計学的に解析し、腫瘍免疫微小環境と STAS の関連性を明らかにする。

(7) 再発症例の臨床・病理データファイルの確立、統計解析

香川大学医学部附属病院で 1999 年～2015 年の間に切除され、2019 年までに再発が確認された症例を収集し、再発後の治療法 (抗 PD-1 抗体薬、細胞障害性抗がん剤、分子標的薬など) やその治療効果および予後に関して、データの更新を行う。再発症例を抗 PD-1 抗体薬療法の有無により 2 群に分けて、腫瘍免疫微小環境 (腫瘍浸潤リンパ球や腫瘍関連マクロファージ) と STAS の存在が、抗 PD-1 抗体薬の治療効果と再発後の予後に与える影響を単変量および多変量解析を用いて統計学的に明らかにする。

4. 研究成果

上皮間葉転換誘導で肺癌細胞が Non-epithelial phenotype を示す場合には、STAS の頻度が上昇することを明らかにした 8。次に、腫瘍組織内での腫瘍関連マクロファージ (特に M2 型) や血液中の単球の増加が STAS の頻度と正の相関関係を示し、単球/マクロファージ系の免疫応答が STAS を促進する可能性を報告した。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Chihiro Yoshida 1, Kyuichi Kadota 2, Toshihiro Ikeda 1, Emi Ibuki 3, Tetsuhiko Go 1, Reiji Haba 3, Hiroyasu Yokomise 1	4. 巻 158
2. 論文標題 Tumor-associated macrophage infiltration is associated with a higher rate of tumor spread through air spaces in resected lung adenocarcinomas	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 91-96
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2021.06.009. Epub 2021 Jun 10.	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 Ikeda Toshihiro, Kadota Kyuichi, Yoshida Chihiro, Ishikawa Ryou, Go Tetsuhiko, Haba Reiji, Yokomise Hiroyasu	4. 巻 153
2. 論文標題 The epithelial-mesenchymal transition phenotype is associated with the frequency of tumor spread through air spaces (STAS) and a High risk of recurrence after resection of lung carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Lung Cancer	6. 最初と最後の頁 49 ~ 55
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.lungcan.2021.01.004	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0件

〔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
---------	---------