

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：34417

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09184

研究課題名(和文) 肺癌 invasive frontの空間的病理解析による浸潤/免疫抑制機構の解明

研究課題名(英文) Spatial pathology on invasive front and tertiary lymphoid structure in lung adenocarcinoma

研究代表者

齊藤 朋人 (SAITO, Tomohito)

関西医科大学・医学部・講師

研究者番号：10548605

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)：本研究の目的は、肺癌における腫瘍先進部と主病巣の空間的連続性の解明、HEVの解剖学的局在・立体構築の解明、HEV形成阻害機構の解明である。微小乳頭型肺腺癌の3次元解析では主病巣とinvasive frontとの連続性が示唆された。Invasive frontにおけるMECA-79陽性high endothelial venules、 $\alpha$ -smooth muscle actin陽性cancer-associated fibroblastsの出現はIA期肺癌の再発予測因子である可能性が示唆された。また偶発的な所見として、肺腺癌自体のMECA-79発現も再発に關与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

私たちの研究成果は、「肺がんはなぜ再発しやすいのか？」という疑問に迫るものでした。具体的には早期の肺腺がんでは、がんの周りに患者さんの免疫が反応して形成される特殊血管(high-endothelial venules)が再発を促進している可能性が示唆されました。また、肺腺がん細胞がMECA-79という特殊な糖タンパクを発現すると再発しやすくなる可能性も示唆されました。これらを標的としてさらに研究が進むことで肺がん再発のメカニズムの理解が深まり、新たな治療法の開発につながることを期待されます。

研究成果の概要(英文)：Our aim was to reveal the spatial continuity from the primary lesion to the invasive front, to identify the anatomic localization and the three-dimensional structure of high-endothelial venules, and to delineate the mechanism that inhibits the development of high-endothelial venules in the invasive front of lung cancer. Our study using three-dimensional analysis on micropapillary-predominant adenocarcinoma of the lung indicated a spatial continuity between primary lesion and its invasive front. Further, our studies also indicated that MECA-79-positive high-endothelial venules and  $\alpha$ -smooth muscle actin-positive cancer-associated fibroblasts might be risk factor of postoperative recurrence of resected lung cancer. We encountered the results indicating the MECA-79-positive tumor cells might be a risk factor of postoperative recurrence of lung cancer.

研究分野：呼吸器外科学

キーワード：肺癌 再発 MECA-79 high-endothelial venules fibroblast invasive front 3次元解析

## 1. 研究開始当初の背景

肺癌は我が国の癌関連死亡の第1位を占め、非小細胞肺癌の5年生存率は約16%と不良で、完全切除されたIA期肺癌でも約20%が再発する。この背景には肺癌の高度な浸潤・転移能、および肺癌の免疫抑制機構の関与が挙げられる。従って、肺癌の征圧には、肺癌の浸潤・侵襲領域すなわち invasive front における浸潤/免疫抑制機構の解明が必要である。

肺癌の浸潤形式は非肺胞上皮置換性増殖、脈管(血管・リンパ管)侵襲、気腔内進展など多彩だが、その空間的広がり、特に「脈管侵襲や気腔内進展において腫瘍先進部は主病巣と連続しているか?非連続か?」という点は未解明である。これは従来の病理解析が光学顕微鏡で得られる厚さ約4 $\mu$ mの2次元情報に基づく事に起因し、問題の克服には3次元のアプローチ(空間的病理解析)が必要である。

肺癌 invasive front では、一部症例でリンパ節類似の構造(三次リンパ組織)が新生し、予後良好な徴候とされる。高内皮細静脈 high endothelial venule, HEV は本来リンパ節でリンパ球動員に関与する特殊血管だが、三次リンパ組織新生を誘導し、腫瘍破壊を促進し浸潤・転移阻止に寄与する[1]。逆に、予後不良肺癌では三次リンパ組織は乏しく、HEV 形成阻害による免疫抑制が示唆される。興味深い事に、癌のリンパ節転移では転移が成立する前段階で HEV の形態変化が生じ、転移成立後に HEV は消失する事が示されており、この仮説を支持する。HEV の重要性が指摘される一方、「HEV が肺のどの既存血管と連絡するのか?」という解剖学的局在や立体構築、さらに癌による HEV の形成阻害機構は未解明である。そこで報告者らは、肺癌 invasive front の空間的病理解析による浸潤/免疫抑制機構の解明を目的に本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肺癌 invasive front における 腫瘍先進部と主病巣の空間的連続性の解明、HEV の解剖学的局在・立体構築の解明、および HEV 形成阻害機構の解明である。

## 3. 研究の方法

### A. 肺腺癌 invasive front の3次元病理解析

微小乳頭型肺腺癌・切除検体(パラフィン包埋ブロック)を用いて whole section の連続切片を作成し(4 $\mu$ m 厚, 12 $\mu$ m 間隔, 60 枚)、Hematoxylin-Eosin 染色を行った。作成した連続切片をデジタルスライドスキャナー Nanozoomer 2.0-HT (浜松ホトニクス)によりデジタル画像化し、更にパーティクルスライド画像 3D 再構成プログラム TRI/ 3D SRF-VS64 (ラトックシステムエンジニアリング)により、3次元再構成画像を作成し、腫瘍本体と、invasive front(リンパ管侵襲、血管侵襲、気腔侵襲[=spread through air spaces])における腫瘍病変の連続性・非連続性を観察・記録した。

### B. 病理病期 IA 期・肺腺癌 invasive front における HEV と完全切除後再発の関連性の解明

関西医科大学附属病院で肺葉切除によって完全切除した病理病期 IA 期肺腺癌(195 例)を対象に、免疫組織化学染色(MECA-79、BCL-6、DC-LAMP、 $\alpha$ -SMA)によって HEV を含む3次リンパ装置構成成分、および、cancer-associated fibroblast (CAF)を同定し、それらの出現と5年無再発生存との関係性を調査した。なお、HEV は形態によって flat type と cuboidal type に分類して解析

した。

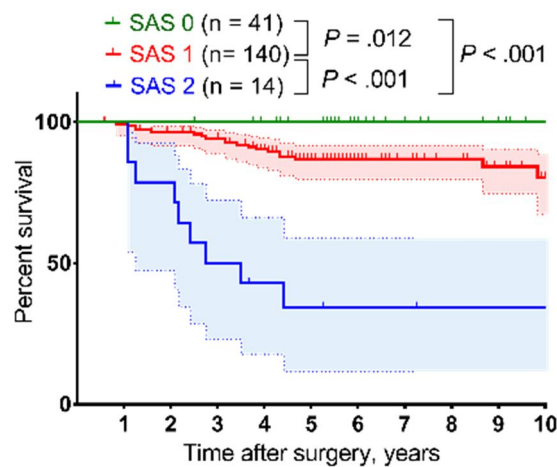
#### 4 . 研究成果

##### A. 肺腺癌 invasive front の 3 次元病理解析

微小乳頭腺癌症例では、腫瘍本体と invasive front(主に気腔侵襲)との間に連続性が認められた。これは他の報告とも矛盾しない所見であった。

##### B. 病理病期 IA 期・肺腺癌 invasive front における HEV と完全切除後再発の関連性の解明

1) CAF の出現、cuboidal HEV の出現は再発と関連していた。Invasive front のがん間質における細胞の活性化(stromal activation)を想定し、stromal activation score (SAS)を以下のように定義すると、病理病期 IA 期の肺腺癌の術後無再発生存を層別化することが出来た(図 1) : SAS0= CAF を認めない ; SAS1=CAF あり/ cuboidal HEV なし ; SAS2= CAF あり/ cuboidal HEV あり。



2) 偶発所見として、肺腺癌において MECA-79 が発現している症例は高率に再発を来すことが示唆された(特許申請中)。

#### < 引用文献 >

1. Ager A. High Endothelial Venules and Other Blood Vessels: Critical Regulators of Lymphoid Organ Development and Function. Front Immunol. 2017 Feb 3;8:45. doi: 10.3389/fimmu.2017.00045. PMID: 28217126; PMCID: PMC5289948.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 2件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>T Saito et al.  |
| 2. 発表標題<br>Immunohistochemical profiling of premetastatic niche in pathological stage IA invasive adenocarcinoma of the lung |
| 3. 学会等名<br>第102回米国胸部外科学会（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2022年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>T Saito et al.  |
| 2. 発表標題<br>Clinical and pathological significance of stromal activation in pathological stage IA lung adenocarcinoma |
| 3. 学会等名<br>第103回米国胸部外科学会（国際学会）   |
| 4. 発表年<br>2023年  |

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

|  |              |                   |
|--|--------------|-------------------|
| 産業財産権の名称<br>肺癌の再発を予防するための組成物、及び再発の可能性が高い肺癌を検出するための方法 | 発明者<br>齊藤朋人  | 権利者<br>学校法人関西医科大学 |
| 産業財産権の種類、番号<br>特許、特願2023-072060                      | 出願年<br>2023年 | 国内・外国の別<br>国内     |

〔取得〕 計0件

〔その他〕

-

6. 研究組織

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)         | 備考 |
|-------|--|-------------------------------|----|
| 研究分担者 | 石田 光明<br>(ISHIDA Mitsuaki)<br>(00464173) | 関西医科大学・医学部・講師<br><br>(34417)  |    |
| 研究分担者 | 赤間 智也<br>(AKAMA Tomoya)<br>(10548788)    | 関西医科大学・医学部・准教授<br><br>(34417) |    |

6. 研究組織（つづき）

|       | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号)                          | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号)                | 備考 |
|-------|--|--------------------------------------|----|
| 研究分担者 | 谷口 洋平<br><br>(TANIGUCHI Yohei)<br><br>(50609592)   | 関西医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(34417) |    |
| 研究分担者 | 林 美樹夫<br><br>(HAYASHI Mikio)<br><br>(10368251)     | 関西医科大学・医学部・講師<br><br><br><br>(34417) |    |
| 研究分担者 | 蔦 幸治<br><br>(TSUTA Koji)<br><br>(00392332)         | 関西医科大学・医学部・教授<br><br><br><br>(34417) |    |
| 研究分担者 | 村川 知弘<br><br>(MURAKAWA Tomohiro)<br><br>(50359626) | 関西医科大学・医学部・教授<br><br><br><br>(34417) |    |

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 |
|---------|---------|
|         |         |