

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 25 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23591131

研究課題名(和文) 気管支鏡検体を用いたmicroRNAによる非小細胞肺癌の組織型診断

研究課題名(英文) Diagnosing histologic subtype of lung cancer by microRNA analysis from bronchoscopic samples

研究代表者

品川 尚文 (SHINAGAWA, NAOFUMI)

北海道大学・大学病院・講師

研究者番号：20431372

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：2003年から2011年に当院で気管支腔内超音波断層法(EBUS-GS法)を用いた気管支鏡検査にて肺癌と診断された203例を対象としてデータの解析を行った。EBUS-GSで扁平上皮癌(Sq)と診断された40例のうち、37例(93%)が手術でSqと診断された。一方、EBUS-GSでnon-Sq(SqとSmを除いたもの)と診断された159例中、術後Non-Sqであったのが151例(95%)、Sq6例、Sm2例であった。免疫染色は全部で48例に行われ、頻度としては、TTF-1が最も多く37例(18%)に施行された。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study was to evaluate the concordance of histologic types of lung cancer diagnosed with bronchial biopsy or cytology specimens by endobronchial ultrasonography with a guide sheath (EBUS-GS) and the final diagnosis of the resected specimen. From July 2003 to December 2011, 203 patients with primary lung cancer diagnosed by EBUS-GS subsequently underwent curative pulmonary resection. These 203 cases were retrospectively analyzed. Of the 40 cases diagnosed as Sq by EBUS-GS, 37 cases were diagnosed as Sq, and three cases were diagnosed as non-Sq following surgical resection. Of the 159 cases diagnosed as non-Sq by EBUS-GS, non-Sq was diagnosed in 151 cases, Sq was diagnosed in six cases, and small cell carcinoma (Sm) was diagnosed in two cases following surgical resection. In 48 cases (23.6%), immunohistochemical staining of EBUS-GS-TBB specimens was performed. TTF-1 staining was the most frequently performed (n=37, 18%).

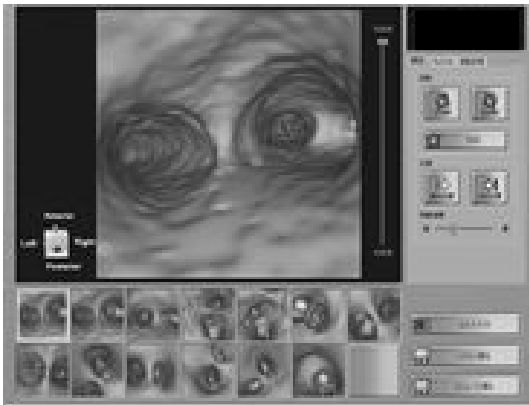
研究分野：呼吸器内科学

キーワード：気管支鏡 肺癌

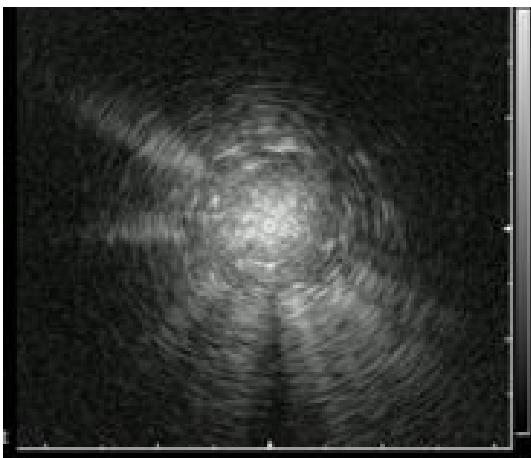
1. 研究開始当初の背景

近年、非小細胞肺癌 (NSCLC) の化学療法において、組織型によって効果が異なる薬剤の報告がなされ、組織型が治療方針の決定に重要な意味をもつようになると考えられている。化学療法の適応となる進行期肺癌においては、気管支鏡検体などの微小検体で組織型を推定しなければならないが、その診断精度に関しての検討は少ない。新しい肺癌の治療薬である Pemetrexed の治療成績を解析したところ、扁平上皮癌 (Sq) に対しては奏効率が低い傾向がみられ、ガイドラインでも Sq に対しては用いないように勧めている。また Bevacizumab は、Sq に対して使用したところ喀血のリスクが高かったことから、現在は使用対象から外されている。このように、肺癌の組織型を診断する上で、Sq かそれ以外の NSCLS (non-Sq) かを判断することは大変重要である。

しかし、一方で気管支鏡を用いて肺野病変から適切に組織の採取を行うことは容易ではない。特に対象の病変が 2cm 以下になると期待される診断率は 34%程度と言われている。



我々は 2001 年から末梢小型病変の診断に様々な新しい技術を導入し、報告してきた。極細径気管支鏡を用いた CT 透視下経気管支生検やバーチャル気管支鏡を用いたナビゲーションシステム (VBN) (上図)、ガイドシース併用気管支腔内超音波断層法併用生検 (EBUS-GS) (下図) などである。



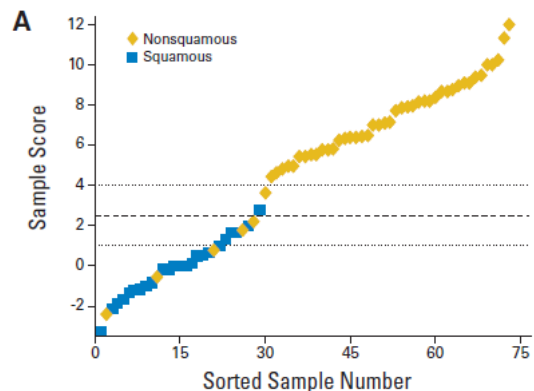
特に VBN は当科を含む多施設共同で行った試験では、3cm 以下の肺末梢病変を対象として EBUS-GS を用いて生検を行う際に VBN を併用する群としない群に無作為化した。診断率は VBN 併用群において、81%となし群の 67%を有意に上回る結果を示した (表 1)。

[表1]

	ナビゲーション群 (n = 99)	コントロール群 (n = 95)	p value
病変径(mm) (range)	18.0 (9.5- 30)	18.0 (7- 30)	0.11
診断率 (no./total)	80.8% (80/99)	67.4% (64/95)	0.032

Ishida T et al. Thorax 2011;66:1072-1077

そこで気管支鏡検体による組織型診断の妥当性を評価する目的で、同一腫瘍の外科的切除検体による組織型診断を評価基準とし、両者の一致割合を検討することを計画した。更に、新たな扁平上皮癌マーカーとして腫瘍細胞の microRNA の発現を検索し、気管支鏡検査の有用性を前向きに検討したいと考えた。



microRNA の hsa-miR-205 は過去の報告で NSCLC の検体で測定され (上図) 感度 96%、特異度 90%で Sq の診断が可能であったという報告があり (J Clin Oncol 2009, Lebanomy D) Sq と Non-Sq を区別するための有望なマーカーと考えられる。

2. 研究の目的

上記の背景を踏まえ、気管支鏡検体を用いた肺癌の組織型診断が最終的な組織型診断との程度一致するものかを示し、更に気管支鏡検体を用いて更に高い精度で組織型診断を得るために、microRNA を用いた測定法を確立することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 後ろ向きな検討として、気管支鏡下生検検体により NSCLC と診断された症例のうち、その後手術を行い組織型が最終的に確定した症例を対象に、両者の診断の一致率を求める。

(2) Sq のマーカーである、p63、CK1/10、CK5/14 などのマーカー、TTF-1、Napsin-A などの腺癌のマーカーを気管支鏡検体、手術検体の両者に対して行い、各マーカーの陽性率、鑑別のための必要な組み合わせなどについて検討する。

(3) EBUS-GS、極細径気管支鏡検体による検体が十分な免疫染色に耐えるか、またそれぞれの手技で採取した細胞診検体がどの程度生検のみの診断に上乗せ効果がでるか検討する。

(4) 更に、新たな Sq のマーカーとして腫瘍細胞の microRNA として hsa-miR-205、hsa-miR-21 の発現を検索する。

(5) 細胞診検体を用いて、気管支鏡検査の有用性を前向きに検討する。

4. 研究成果

(1) 2006年から2010年にかけて当院で気管支鏡検体により NSCLC の診断がなされ、切除術が施行された 135 例について手術検体との一致率を検討した。135 例中、125 例で経気管支生検、117 例で気管支擦過細胞診、5 例で経気管支針生検による診断が行われた。気管支鏡検体にて扁平上皮癌 (Sq) と診断された 37 例のうち、術後 Sq と診断されたものが 34 例、Sq 以外の NSCLC が 2 例、小細胞癌 (Sm) が 1 例であった。一方、気管支鏡で Sq とは診断されなかった NSCLC (non-Sq) 122 例のうち、術後 Sq 以外の NSCLC であったものが 112 例、Sq 9 例、Sm 1 例であった。Non-Sq の肺癌が、気管支鏡で Sq と診断されない感度 (Sq と診断されることの特異度) は 97.4% であった。また Sq が気管支鏡で Sq と診断される感度 (Sq と診断されないことの特異度) は 79.1% であった (表 2)。

[表 2]		外科的切除		
		Sq	Non-sq	Sm
気管支鏡	Sq	34	2	1
	Non-sq	9	112	1

以上のデータをまとめて報告する予定であったが、通常径の気管支鏡を用いた生検が 105 件、極細径気管支鏡を用いた生検が 23 件、経気管支針生検による検体が 5 件、細胞診のみ行った症例が 2 例と異なる気管支鏡手技が混在していることで、どの程度の大きさの検体をどのように採取すれば、こういった結果

になるのかということは明らかにはできないと考えられた。そこで気管支鏡手技を気管支腔内超音波断層法 (EBUS-GS) に絞り、新たにデータの抽出を行った。また非小細胞肺癌と気管支鏡検体により診断されて、手術となった症例の中に最終的に小細胞肺癌と診断された症例が存在するために、対象を原発性肺癌とすることとした。

新たな対象は 2003 年 7 月から 2011 年 12 月までに当科にて EBUS-GS を用いた検体採取を行い、原発性肺癌と診断された症例のうち、手術を行った 203 例。

[表 3]		外科的手術			
		Sq	Non-sq	Sm	計
EBUS-GS	Sq	37	3	0	40
	Non-sq	6	151	2	159
	Sm	0	0	4	4

気管支鏡検体にて Sq と診断された 40 例のうち、術後 Sq と診断されたものが 37 例、Sq 以外の NSCLC が 2 例、Sm が 1 例であった。一方、気管支鏡で non-Sq と診断された 159 例のうち、術後 non-Sq と確認された症例が 151 例であったが、Sq と診断されたのが 6 例、Sm と診断されたのが 2 例であった。Non-Sq の肺癌が、気管支鏡で Sq と診断されない感度 (Sq と診断されることの特異度) は 95% であった。また Sq が気管支鏡で Sq と診断される感度 (Sq と診断されないことの特異度) は 93% であった。EBUS-GS と手術による組織型の一致率は 95% (K=0.85) と良好な結果を得た。

(2、3) 免疫染色の検討

(1) の対象 203 例において、48 例 (23.6%) で免疫染色を施行していた。そのうち、TTF-1 の染色が 37 例 (18.2%) に施行されており、最も多かった。その他、CK7 (8 例)、CK20 (8 例)、SP-A (6 例)、napsin A (3 例)、p63 (12 例)、CK5/6 (1 例)、synaptophysin (6 例)、chromogranin (5 例)、and CD56 (4 例) が行われていた。

EBUS-GS の検体は生検鉗子が直径 1.4mm と通常の気管支鏡用の生検鉗子 (直径 2.0mm) よりも小さいが、免疫染色は十分行うことができると判断された。

(3) 細胞診検体による組織型診断

(1) の対象 203 例において、ブラシあるいはキュレットを用いた細胞診による検体は全例に施行されたが、組織型診断が得られたのは 162 例であった。診断がつかなかった 41 例のうち、23 例はがん疑い、12 例が検体不良、6 例が atypical cells という診断であった。気管支鏡検体にて Sq と診断された 24 例

のうち、術後 Sq と診断されたものが 22 例 (92%)、Sq 以外の NSCLC が 2 例であった。一方、気管支鏡で non-Sq と診断された 135 例のうち、術後 non-Sq と確認された症例が 121 例(89%)であったが、Sq と診断されたのが 13 例、Sm と診断されたのが 1 例であった(表 4)。

[表 4]		外科的手術			
		Sq	Non-sq	Sm	計
EBUS-GS	Sq	22	2	0	24
	Non-sq	13	121	1	135
	Sm	1	0	2	3

EBUS-GS を用いた細胞診で組織型診断ができた場合、手術検体による組織型との一致率は 90% (K = 0.69; p < 0.01)であった。

(4、5)microRNA の測定系を確立するために、これまでの組織で診断が確定したものをを用いた検討を行った。しかし、ホルマリン固定された検体からの RNA の採取が困難で検討に値する結果を得ることは難しかった。気管支鏡検体は微小な検体が多く、腫瘍組織が採取された検体の一部にしかない場合もあり、新たな切り出しを行うと、腫瘍細胞自体が十分な量を確保できないという問題もあった。そこで新たに採取した気管支鏡検体からの RNA の抽出を行うことを計画した。しかし、RNA の抽出を行うためには検体採取後速やかに RNA 分解酵素から守るために検体の処理をする必要があり、実際には気管支鏡検査中に検体を処理しなくてはならない。この点が測定系の確立を難しくしている大きなポイントであり、今後の課題である。最終的に細胞診検体から RNA の抽出を行うことを目標としていたが、こちら検体処理方法の確立や、測定系が安定せず思うような結果が得られなかった。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

品川 尚文 (NAOFUMI SHINAGAWA)
北海道大学・北海道大学病院・講師
研究者番号：20431372

(2)研究分担者

石田 卓 (TAKASHI ISHIDA)