

# 学位論文審査結果の報告書

氏 名 佐藤 克明

---

生 年 月 日 (昭和)・平成 56年 8月 4日

本 籍 (国籍) 日本

---

学位の種類 博 士 (医 学)

学位記番号 医 第 1166号

学位授与の条件 学位規程第5条該当  
(博士の学位)

論 文 題 目

---

IASLC/ATS/ERS分類に基づいた肺腺癌組織亜型の分子病理学的特徴

---

—既知の予後予測マーカーとの関連—

---

審 査 委 員

(主 査)

光島徹哉



(副主査)

中川和彦



(副主査)

西尾和人



(副 査)



(副 査)



## 論文内容の要旨

### 【目的】

肺腺癌における IASLC/ATS/ERS 分類が 2011 年に発表され、従来の WHO 分類では mixed subtype に分類されてきた組織亜型を優勢組織型で表現することが可能となり、その予後予測因子としての役割や分子病理学的特徴が報告されつつある。肺腺癌においてはこれまでも上皮間葉転換マーカーや癌幹細胞関連マーカーなどが予後予測因子として報告されているが、IASLC/ATS/ERS 分類とこれらの分子マーカーとの関連は不明である。

### 【方法】

2007-2009 年の原発性肺腺癌切除例 161 名を対象とし、IASLC/ATS/ERS 分類を用いて組織型およびその割合を決定した。優勢組織型の判断に関しては、定義に基づき半分に満たなくても最も優勢な組織像を採用した。全 161 症例において組織マイクロアレイを作成した。免疫組織化学染色は TTF-1, Mib-1, vimentin, E-cadherin, P-glycoprotein, ALDH1A1 について行った。

### 【結果】

患者の内訳は男性 74 名 (46%)、年齢中央値 68 歳、喫煙者 78 名 (52%)、CEA 高値 54 名 (34%)、病理病期 I : 111 名 (69%)、II : 25 名 (16%)、III : 23 名 (14%)、IV : 2 名 (1%) であった。病理学的には微小浸潤癌 1 名、浸潤性粘液産生性腺癌 9 名、浸潤腺癌 151 名であった。浸潤腺癌は既報に準じて low grade (lepidic/ papillary/ acinar) 129 名と high grade (micropapillary/ solid) 22 名に分類した。浸潤腺癌と浸潤性粘液産生性腺癌の臨床的背景には有意差を認めなかったが、TTF-1 陽性率は浸潤腺癌 (91%)、浸潤性粘液産生性腺癌 (11%) と有意差を認めた ( $p < 0.0001$ )。また浸潤性粘液産生性腺癌では上皮間葉転換が起きていない事が明らかとなったが、癌幹細胞関連マーカーでは全例が P-glycoprotein ( $p = 0.0031$ ) および ALDH1A1 ( $p = 0.012$ ) 陽性となり浸潤腺癌と有意差を認めた。浸潤腺癌では、high grade の症例で若年 ( $p = 0.0012$ )、喫煙者 (76%,  $p = 0.022$ )、CEA 高値例 (59%,  $p = 0.016$ )、進行例 (trend  $p = 0.0002$ )、Mib-1 index 高値例 (77%,  $p = 0.0022$ )、TTF-1 陰性例 (23%,  $p = 0.025$ )、E-cadherin 発現低下例 (45%,  $p = 0.0084$ )、vimentin 発現例 (68%,  $p = 0.036$ )、P-glycoprotein 発現例 (73%,  $p = 0.036$ ) が有意に多かった。また、high grade 症例の予後は不良な傾向にあった。

### 【考察】

浸潤性粘液産生性腺癌と浸潤腺癌は異なる分子生物学的背景を有することが知られているが、本研究では浸潤性粘液産生性腺癌で癌幹細胞関連マーカーが陽性となることを見出した。浸潤性粘液産生性腺癌は抗がん薬が効きにくい特徴があり、薬剤排出ポンプである P-glycoprotein を含むこれらの癌幹細胞関連マーカーの発現が関与している可能性がある。浸潤腺癌の優勢組織型 Grade 分類では、high grade において上皮間葉転換マーカーと癌幹細胞関連マーカーが有意に高発現しており、grade 分類の生物学的悪性度にこれらの分子異常が関与している可能性が考えられた。

### 【結論】

IASLC/ATS/ERS 分類による組織形態と様々な分子マーカーとの間に関連を認めた。

博士論文の印刷公表	公 表 年 月 日	出版物の種類及び名称
	平成27年 6 月 日 公表予定	出版物名 近畿大学医学雑誌 第40巻 第1,2号
	公 表 内 容	平成27年 6 月 日 掲載予定
	全 文	

## 論文審査結果の要旨

本論文は肺腺癌外科切除例において、IASLC/ATS/ERS分類と既知の予後予測マーカーとの関連を免疫組織学的に検討し、invasive mucinous adenocarcinomaにおける化学療法抵抗性の要因となり得る分子マーカーの発現や、invasive adenocarcinomaの優勢組織型Grade分類におけるhigh grade症例の予後不良な傾向の要因となり得る分子マーカーの発現を同定した。

### 1) 研究の着想について

従来肺腺癌で用いられてきた組織分類は2004年に発表されたWHO分類である。しかしこの分類では、invasive adenocarcinomaにおいて少しでも組織亜型が混在している場合にはmixed typeに分類されてしまい、組織亜型分類としては意味を成さないものになっていた。2011年にIASLC(国際肺癌学会)/ATS(米国胸部学会)/ERS(欧州呼吸器学会)が共同で発表した新分類(IASLC/ATS/ERS分類)では、混在する組織亜型の中で最も優勢な組織像で分類することとした。これによりmixed typeと表記することはなくなり、より肺腺癌組織亜型の実態を反映できると考えられた。実際に2011年にこの新分類が発表されて以降、多数の施設でこの優勢組織型の予後因子としての役割が報告されている。具体的にはlepidic predominantの予後は良く、solid predominantやmicropapillary predominantの予後は不良で、papillary predominantとacinar predominantはその中間であることが示されている。これらの報告の中には、予後不良であるsolid predominantとmicropapillaryの群と、予後が比較的良好な群をそれぞれまとめてGrade分類としているものも多い。しかし、現時点でこれらの優勢組織型分類と、これまで報告されてきた予後予測マーカーとの関連は不明であった。そこで、本論文では既に確立されたと考えられる肺腺癌の予後因子としてTTF-1を、また腫瘍の悪性度の指標として乳癌では臨床でも用いられているMib-1を採用した。また、化学療法抵抗性や遠隔転移などにおいて重要な役割を持つと近年報告されている上皮間葉転換(Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT)のマーカーであるE-cadherin(上皮系細胞のマーカー)とvimentin(間葉系細胞のマーカー)を採用した。そして最後に、化学療法抵抗性や予後不良因子として近年報告されている癌幹細胞(cancer stem cell)関連マーカーであるALDH1A1(アルデヒドデヒドロゲナーゼ、薬物代謝系のCSCマーカー)とP-glycoprotein(薬物排出系のCSCマーカー)を採用した。これらのタンパク発現を免疫組織学的染色を用いて検討し、優勢組織型Grade分類との関連を検証している。

### 2) 研究方法について

本研究は肺腺癌切除例の過去検体において、全ての病理組織を再診断することから始まっている。病理診断は診断医の主観によって異なる部分もあることが考えられるため、本研究では病理医1名と病理医からトレーニングを受けた外科医1名が、それぞれ個別に形態学的な再診断を行い、結果が合わない症例においては両者の協議によって診断を確定させている。優勢組織型の判定においては、定義通りに半分に満たなくても最も優勢な組織型を優勢組織型とした。

また本研究は免疫組織化学的手法を用いて各タンパクの発現解析を行っている。免疫組織化学染色による検討は研究者によって使用する抗体の違いや判定基準が異なることから一般的に客観的評価は難しいとされている。本研究では、組織マイクロアレイを作成したことによって全ての標本を一度に染色することが可能であり、染色条件による染色のブレを無くし、また各標本につき2箇所ずつ組織マイクロアレイ化したことによって標本毎のheterogeneityにも配慮している。また肺腺癌におけるMib-1の臨床的応用はされておらず、既報に準じてMib-1 index $\geq$ 10%というカットオフ値を、他の抗体に関してはこれも既報に準じて5%以上・未満で陽性・陰性を判定した。組織の再診断と免疫組織化学染色の判定を行った研究者は同一であるが、免疫組織化学染色の判定を行う時には組織の診断名を隠して行うなど、研究者バイアスの排除にも考慮した形で評価が可能であったと考えられる。

### 3) 研究結果、結論について





再診断により得られた肺腺癌の組織亜型の頻度は、おおむね既報に準じた割合であり、本研究で用いたコホートは標準的な肺腺癌コホートであると考えられた。Invasive mucinous adenocarcinomaは分子生物学的にinvasive adenocarcinomaとは異なっている事が知られており、特に大きな特徴がTTF-1が陰性になることである。これも9例中8例でTTF-1陰性が確認され、再診断の正確性が確認された。また癌幹細胞関連マーカーであるP-glycoproteinとALDH1A1が全例で陽性であり、これらのタンパク発現が化学療法が効きにくい肺癌として知られるinvasive mucinous adenocarcinomaの化学療法抵抗性の一因になっている可能性が考えられた。

Invasive adenocarcinomaにおいては、優勢組織型Grade分類を用いて、low grade (lepidic/ papillary/ acinar) とhigh grade (solid/ micropapillary) を比較した結果、high grade症例はlow grade症例と比較して、若年・喫煙者・進行例・CEA高値例が多く、またTTF-1陰性例・Mib-1高値例・EMT関連マーカー発現例・P-glycoprotein陽性例が有意に多い結果となった。これらの結果から、high grade症例の予後不良な傾向は、これら既知の予後不良因子との関連が考えられると結論された。

肺腺癌の新分類であるIASLC/ATS/ERS分類は、2015年に発表される予定の新たなWHO分類にそのまま採用される予定であり、今後の肺腺癌分類のスタンダードとなるものである。その中でも予後不良であるsolid predominantやmicropapillary predominantと、既知の予後不良因子との関連を明らかにすることは、これらの予後不良な肺腺癌の予後を改善し得る新たな治療法の探索につながるものと考えられる。以上から、本論文は学位論文として十分な内容を有していると考えられる。

## 博士學位論文最終試験結果の報告書

平成 27 年 2 月 12 日

審査委員	主査	光島 徹哉	
	副主査	甲川 和彦	
	副主査	西尾 和人	
	副査		
学位申請者氏名	佐藤 克明		
論文題目	IASLC/ATS/ERS分類に基づいた肺腺癌組織亜型の分子病理学的特徴—既知の予後予測マーカーとの関連—		

## 要旨

申請者は、肺腺癌外科切除例を免疫組織学的に検討し、IASLC/ATS/ERS分類に基づく肺腺癌組織亜型と既知の予後予測マーカーとの関連を解析した。

具体的には、①IASLC/ATS/ERS分類におけるinvasive mucinous adenocarcinomaにおいて癌幹細胞関連マーカーであるP-glycoproteinとALDH1A1が全例に発現していたこと、②優勢組織型Grade分類を用いた検討で、high gradeに分類されるsolid / micropapillary predominantは、若年・喫煙者・進行例・CEA高値例が多いこと、③high grade症例では、TTF-1陰性例・Mib-1 index高値例の割合が多く、また上皮間葉転換マーカーであるE-cadherinの減弱・vimentinの発現が高率に見られ、癌幹細胞関連マーカーであるP-glycoproteinが高率に発現していたことを同定した。

本結果は、化学療法抵抗性であるinvasive mucinous adenocarcinomaや悪性度が高いとされるhigh grade症例の背景としてこれらの分子発現が関わっている可能性を示すものである。

公聴会では、(1)invasive mucinous adenocarcinomaとALK融合遺伝子の関連、(2)high grade症例においてslow growingである癌幹細胞の関連マーカーの発現と、増殖速度が早い事を示すMib-1高値症例が多かった事の整合性、(3)研究をするにあたって苦勞した部分、(4)優勢組織型Grade分類の意義について、(5)優勢組織型Grade分類の予後因子としての確かさ、(6)invasive mucinous adenocarcinomaの組織型について、(7)invasive mucinous adenocarcinomaの予後について、(8)予後因子における形態学的な側面と分子マーカーとの組み合わせに関する将来構想、(9)組織マイクロアレイを採用した意義、(10)カットオフ値についてなどの質疑があり、学位申請者は適切な回答を行っており最終試験に合格と判断した。