

氏 名 みやはら そう  
宮原 聡

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1582 号

学位授与の日付 平成 27 年 9 月 13 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Clinicopathological analysis of pleomorphic carcinoma of the lung:  
Diffuse ZEB1 expression predicts poor survival  
（肺多形癌の臨床病理学的検討－ZEB1 のびまん性発現は予後不良  
因子－）

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	岩崎 昭憲
（副査）	福岡大学	教授	田村 和夫
	福岡大学	教授	渡辺 憲太郎
	福岡大学	准教授	藤田 昌樹

## [背景]

肺多形癌は紡錘形細胞あるいは巨細胞を 10%以上含む低分化の非小細胞肺癌、もしくは紡錘形細胞と巨細胞のみからなるものと定義され、全肺癌の 0.8-2.1%と非常に稀な肺上皮性悪性腫瘍である。その臨床病理学的特徴や予後因子に関しては未知の部分が多い。

近年、他の癌腫で上皮間葉移行に関与している転写因子が腫瘍の増殖や転移を引き起こし、その強発現は予後を悪化させることが報告されている。ZEB familyはこの転写因子の一つで、正常組織においては原腸形成や神経堤形成、筋および骨格形成に関わっており、子宮癌や乳癌、膵癌組織での強発現は予後不良因子である。肺多形癌で ZEB family 発現を検討した報告はない。本研究では肺多形癌の臨床病理学的特徴を明らかにすると共に、ZEB family の一つである ZEB1 の発現と予後との関連を解析した。

## [対象と方法]

1988年1月から2011年10月に福岡大学病院呼吸器乳腺内分泌小児外科で行った2328例の肺癌手術症例のうち、62例の肺多形癌の臨床病理学的事項を後方視的に解析した。ZEB1の発現は免疫染色を行い、腫瘍の紡錘形細胞あるいは巨細胞の領域 (pleomorphic component) で75%以上染色されている症例を diffuse 群、75%未満を focal 群として解析を行った。予後解析は根治手術を受けていない症例、手術関連死亡および他病死症例を除外した42症例で行った。統計ソフトは StatMate IV を使い、2群間比較は Chi-square test および Fisher's exact test、生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、log-rank test で検定した。多変量解析は Cox proportional-hazard model を使い、P値は0.05以下で有意な

差と判定した。

## [結果]

62 症例の患者背景は男性が 51 人、女性が 11 人で、平均年齢は 65.5 歳 (31-81 歳)であった。肺葉切除術が 55 例 (88.7%)に行われ、6 例 (9.7%)に対しては肺全摘術が施行された。また、二葉切除術と区域切除術、および部分切除術はそれぞれ 1 例ずつであった。リンパ節郭清は 55 例に施行され、うち 15 例にリンパ節転移がみられた (pN1/N2/N3: 2/12/1)。TNM 分類は Stage IA/IB/IIA/IIB/IIIA/IIB/IV 期がそれぞれ 7(11.3%)/ 11(17.7%)/ 3(4.8%)/ 21(33.8%)/ 15(24.2%)/ 2(3.2%)/ 3 (4.8%)であった。Pleomorphic component のみからなる多形癌が 15 例 (24.2%)存在し、それ以外では coexisting carcinoma component として腺癌が 34 例 (54.8%), 扁平上皮癌が 7 例 (11.3%), 腺扁平上皮癌が 4 例 (6.5%), 大細胞癌が 2 例 (3.2%)であった。また pleomorphic component として紡錘形細胞のみの症例が 18 例 (29.0%), 巨細胞のみが 7 例 (11.3%)あり、37 症例 (59.7%)は両者が混在していた。pT1a size (腫瘍径 20mm 未満)の 7 例では、3 例が coexisting carcinoma component を有しており 1 例は腺癌で、2 例は扁平上皮癌であった。対側転移を来した 1 例以外の 6 例は生存しており、その 5 年疾患特異的生存率は 83%であった。免疫染色における ZEB1 の発現は coexisting carcinoma component ではみられず、pleomorphic component の紡錘形細胞と巨細胞の核にのみ認められ、12 症例 (19.4%)が diffuse に発現していた。

疾患特異的 5 年生存率は Stage I で 84.6%、Stage II で 70.5%、Stage III で 45.4%であり Stage I と Stage III ではその生存率に有意差を認めた (p=0.015)。また無再発生存率

は Stage I/II/III でそれぞれ 76.9%/ 52.9%/ 41.6%で Stage I と Stage III では有意差を認めた ( $p=0.021$ )。また ZEB1 diffuse 群は focal 群と比較して単変量解析で両生存率とも有意に低かった ( $p=0.031$ ,  $p=0.034$ )。臨床病理学的因子を含んだ多変量解析でも ZEB1 の diffuse な発現は、無再発生存率および疾患特異的生存率に関して独立した予後不良因子であった。リンパ節転移陽性群では無再発生存率および疾患特異的生存率ともに低く、胸膜浸潤群では疾患特異的生存率が低かった。

#### [結論]

本研究は肺多形癌の手術検体を用いて ZEB1 の発現をみた初めての報告である。ZEB1 の diffuse な発現が肺多形癌の独立した予後不良因子であることが明らかとなった。ZEB1 の発現が予後に影響するメカニズムは本研究では明らかにすることは出来なかったが、細胞周期や細胞死に ZEB1 が関与し、ZEB1 発現の抑制が抗癌剤や分子標的治療の感受性上昇につながることを報告されており、肺多形癌の生物学的特性や治療感受性に影響を与えている可能性がある。症例数を増やした解析が必要である。

## 学位審査の結果の要旨

本論文は肺多形癌の臨床病理学的背景を明らかにし、転写因子である Zinc finger E-box-binding homeobox 1 (ZEB1)の発現を手術組織検体で確認し、予後との相関を解析することを目的とした。過去 30 年の 2328 例の手術検体より最新の WHO 診断基準に従い選定した肺多形癌を対象とし、免疫染色を行い確認した ZEB1 の発現は予後と相関することを明らかにした研究である。

### 1. 斬新さ

肺多形癌の臨床病理に関してはこれまでにいくつかの報告がなされているが、本研究では過去に報告のない小型 (2cm 以下)の肺多形癌を抽出し、その予後が非小細胞肺癌 (NSCLC)と有意な差がないことから早期発見と治療の重要性を説いている。小型の肺多形癌を解析したことで、今まで言われている上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition/ EMT)以外の発生を起源とする肺多形癌が存在する可能性を示した。また、coexisting carcinoma component (上皮成分)と pleomorphic component (肉腫成分)で転写調節因子である ZEB1 の発現に差があることを示し、pleomorphic component の生物学的特徴を解明する糸口となりうる報告である。

### 2. 重要性

肺多形癌は NSCLC に比較して集学的治療を行っても予後不良であることが一般的に言われているが、頻度が稀なため臨床病理学的予後因子に関しては不明な点が多い。肺多形癌の臨床病理を明らかにすることは治療方針の決定にも重要である。また、ZEB1 を直接あるいは間接的に抑制することで予後改善が得られる可能性を示した。

### 3. 研究方法の正確性

解析は 1988 年 1 月から 2011 年 10 月の約 30 年にわたり福岡大学病院で保管されている手術資料、病理組織資料、カルテ情報をもとに行われている。病理診断に関しては 2 名の病理専門医が WHO 分類に基づき診断し直した 62 例を研究対象とした。免疫染色の発現評価についても同様に、複数名の判定に基づき 2 群に分類した。

### 4. 表現の明確性

まず肺多形癌の臨床病理学的背景を示した。本研究で転写調節因子である ZEB1 に注目した理由を自験症例の HE 標本を示しながら説明した。coexisting carcinoma component から pleomorphic component への形質の転換（上皮間葉転換/ EMT）が起こっている可能性をあげ、EMT を制御しているといわれている ZEB1 の pleomorphic component での発現を示した。また ZEB1 と同様に EMT 関連転写調節因子である Snail と Twist の発現も検討し解析に加え、それぞれの発現が 75%以上の腫瘍細胞で認められる場合を diffuse expression 群と定義し、発現と予後の解析結果を示した。Pleomorphic carcinoma の無病再発期間および疾患特異的生存率に影響を与える因子を多変量解析し、ZEB1 のびまん性発現がリンパ節転移、胸膜浸潤と並んで予後不良因子であることを明らかにした。

## 5. 主な質疑応答

Q: Pleomorphic carcinoma の診断において pleomorphic component が 10%以上との診断基準があるがその根拠はなにか？

A: 「10%」という数字に関しては過去の報告でも記載がなく、pleomorphic component の割合で予後に影響するといった論文はない。肺癌においては 10%を診断基準にしているものが多く、それを踏襲した結果と推察される。

Q: Pleomorphic component には spindle と giant の成分があるが、spindle をもつ症例が giant よりも多く存在していることをどのように考えているか。

A: Giant cell は分化の悪い上皮癌との鑑別が難しく、その定義がない。一方で spindle cell は形態的にも上皮癌との鑑別が比較的容易である。後方視的な検討であるので、過去に低分化癌と診断されている giant cell carcinoma を見落としている可能性は否定できない。

Q: 2cm 以下の 7 症例の検討 (Table 2)で、coexisting carcinoma component のない症例で ZEB1 の発現がどうだったか。

A: Coexisting carcinoma component がない症例は 4 例あり、そのうち 1 例では ZEB1 は高発現していた。しかし本症例は生存しており、小型の肺多形癌では ZEB1 の発現は予後に影響しない結果であった。

Q: 甲状腺癌で分化型癌が形態移行して spindle になるといった報告をしたことがあるが、coexisting carcinoma component と pleomorphic component は同じクローンと考えているのか。形態がなぜ変わるのか。

A: 小型の 7 症例から推測すると同じクローンからの分化とは違う肺多形癌が存在している可能性がある。両 component で遺伝子解析をした報告が過去に一例あるが、共通した変異を有さない結果であった。つまり共通の癌幹細胞からの分化や多クローン性の発生である可能性がある。形態の変化については EMT の結果をみているのかもしれない。

Q: ZEB1 の正常組織での機能は何か。またノックアウトするとどうなるのか。

A: 正常組織においては造血、軟骨、骨および筋形成に EMT を介して関わっているとされている。ZEB1 をノックアウトすることで、細胞接着が生じ細胞の遊走や浸潤が抑えられることがわかっている。

Q: ZEB1 の高発現が TKI の感受性が高くなるとの報告もあるが、今回の群で TKI を導入した症例はあるのか。

A: 今回の症例で EGFR 変異を有する症例は存在しているが、TKI の導入は行われていない。

Q: ZEB1 の発現とリンパ球浸潤との関係はどうであったか。

A: 本研究ではそこまでの検討は行っていない。今後の検討課題とする。

Q: Necrosis が多いとの結果であるが、pleomorphic component と coexisting carcinoma component のどちらに多いのか。

A: 腫瘍径が大きくなるほど中心部の壊死が存在している。壊死部分での細胞形態の評価は難しく、component での偏りがあるという印象はない。急速な増殖・増大に伴う結果と考えている。

Q: 症例集積の期間が長いですが、概念が変わってきていることから過去の症例を見返した際にどの程度の割合で現在の肺多形癌の診断に変わったか。

A: 正確な数は現時点で回答できないが、過去に大細胞癌と診断されていたり、低分化の腺癌あるいは扁平上皮癌と診断されていたものは混在していた。抽出の段階で、これらの診断名がついているものはすべて見返し、現行の定義に従って診断し直した。

Q: Carcinosarcoma との鑑別はどのように行ったのか。

A: 免疫染色で上皮および間葉系のマーカーの両方が染色されるものを肺多形癌と診断した。正確な診断基準については回答できなかった。

→癌肉腫の定義は、癌腫と悪性の軟骨、骨、骨格筋のような異所性成分を含む肉腫との混在からなる悪性腫瘍である。異所性成分のない腫瘍は多形癌に分類される。

Q: ZEB1 の染色比率を 75% で分けた理由はなにか。

A: ZEB の染色程度は多くは 50%未満と 75%以上で分かれ、50%~74%の症例は数として少ない。60%の染色割合というのは観察者によっては 50%程度ととらえることもでき、「びまん性」ということに客観性を持たせるためにあえて 75%で区切った。

Q: 小型の症例で pleomorphic component の割合が高いという報告であるが、size が大きくなるとその割合はどうなっていくのか。

A: 腫瘍全体に占める pleomorphic component の割合は、ある一定の大きさまでは腫瘍径

が増すごとに少なくなる結果であった。

**Q:** Pleomorphic carcinoma の診断について 10%という値をどう考えているか。

**A:** 過去の報告、本研究でも pleomorphic component の大きさによる予後への影響はみられていないためである。しかし、癌腫においては形態的に spindle cell carcinoma との鑑別が難しい線維芽細胞が混在していることはしばしば経験することで、癌腫と紡錘形細胞が混在している HE 標本上でこれらを見分けることは難しい。そういった点から診断に客観性を持たせるには 10%という数字は妥当であると考えます。

**Q:** 今回の研究結果をどのように臨床に結び付けるのか。今後の展望を。

**A:** ZEB1 自体を直接ブロックするような創薬は現実としては難しい。正常組織での分化や創傷治癒にも関与していることから副作用とのバランスを取ることは現実的ではない。しかしながら、ZEB1 は microRNA による制御もしくは microRNA を制御していることがわかっており、近年 microRNA を導入あるいは阻害する創薬が行われていることは事実であり、間接的に ZEB1 を阻害する創薬が期待できる。また、本研究で予後不良因子としてあげられたことから術後の観察を密にすることで早期発見による予後改善が期待できる。

**Q:** ZEB1 は EMT とは異なる機序で予後に関連していると考えてよいのか。

**A:** 本研究の結果は、EMT の関連を否定するものではない。細胞増殖や細胞死、幹細胞性の再獲得や維持などの non-EMT function が大きく関与している可能性はあるが、今回はそこまでの検討には至っていない。今後の課題である。

**Q:** ZEB1 の発現を原発巣でみているが、転移リンパ節では確認しているのか。また転移した成分はどちらの component なのか。

**A:** ZEB1 の発現は、転移リンパ節では評価していない。

リンパ節転移は 15 例に認められ、10 例は coexisting carcinoma component であり、5 例が pleomorphic component であった。成分の違いで予後に差は認められなかった。

本論文は、肺多形癌の手術検体を用いて転写因子である ZEB1 の発現を検討し、pleomorphic component でのびまん性発現が予後不良因子であることを明らかにした世界で初めての報告であり、既に Impact Factor 3.958 の Lung Cancer [87 (2015) 39-44]に掲載されており学位論文に値すると評価された。