これからの肺がん診断
細胞診と分子生物学的解析

加藤　治文

新座志木中央総合病院

国際医療福祉大学大学院

東京医科大学

肺がん細胞診の流れ

1953年　東京都職員に対する肺がん検診
1955年　わが国最初の肺がんに関する系統的調査
1960年　日本肺癌研究会の創立と学会への発展
1963年　肺がん細胞診の取り組み
1965年　気管支ファイバースコープの開発
1966年　経皮的生検針の開発
1974年　扁平上皮がん発がん過程のKarolinskaとの共同研究
　　Magnus Nasiell、H.Kato
1974年　国際肺癌学会創立
1974年　喀痰細胞診キットの開発
1975年　厚生省研究班「早期肺門部肺癌の診断体系の確立」
　　服部正次、高橋正宣、沢田勤也、坂井英一、纐纈博、松田実、宝来威、柴田偉雄、加藤
1978年　内視鏡的TBAC針の開発
1978年　肺癌取扱い規約

肺がん組織型（WHO）

学会分類	WHO 分類	旧学会分類
1．前浸潤性病変 1）扁平上皮異形成，上皮内（扁平上皮）癌 2）異型腺腫様過形成 3）びまん性特発性肺神経内分泌細胞過形成	1.2 Preinvasive lesions 1.2.1 Squamous dysplasia, carcinoma in situ 1.2.2 Atypical adenomatous hyperplasia 1.2.3 Diffuse idiopathic pulmonary neuroendocrine cell hyperplasia	
悪性疾患 2．扁平上皮癌 [特殊型] 1）乳頭型 2）淡明細胞型 3）小細胞型 4）類基底細胞型	1.3 Malignant 1.3.1 Squamous cell carcinoma [Variants] 1.3.1.1 Papillary 1.3.1.2 Clear cell 1.3.1.3 Small cell 1.3.1.4 Basaloid	1．扁平上皮癌 高分化 中分化 低分化
3．小細胞癌 [特殊型] 1）混合型小細胞癌	1.3.2 Small cell carcinoma 1.3.2.1 [Variant] Combined small cell carcinoma	2．小細胞癌 燕麦細胞型 中間細胞型
4．腺癌 1）腺房型 2）乳頭型 3）細気管支肺胞上皮癌 a）粘液非産生性 b）粘液産生性 c）混合型，不確定型 4）粘液産生充実型腺癌 5）混合型腺癌 [特殊型] 1）高分化胎児型腺癌 2）膠様（コロイド）腺癌 3）粘液嚢胞腺癌 4）印環細胞癌 5）淡明細胞腺癌	1.3.3 Adenocarcinoma 1.3.3.1 Acinar 1.3.3.2 Papillary 1.3.3.3 Bronchioloalveolar carcinoma 1.3.3.3.1 Non-mucinous 1.3.3.3.2 Mucinous 1.3.3.3.3 Mixed mucinous & non-mucinous or indeterminate cell type 1.3.3.4 Solid adenocarcinoma with mucin 1.3.3.5 Adenocarcinoma with mixed subtypes [Variants] 1.3.3.6.1 Well-differentiated fetal adenocarcinoma 1.3.3.6.2 Mucinous (colloid) adenocarcinoma 1.3.3.6.3 Mucinous cystadenocarcinoma 1.3.3.6.4 Signet-ring adenocarcinoma 1.3.3.6.5 Clear cell adenocarcinoma	3．腺癌 高分化 中分化 低分化 腺管型 乳頭型 細気管支肺胞型 粘液結節型 粘液細胞型
5．大細胞癌 [特殊型] 1）大細胞神経内分泌癌 a）混合型大細胞神経内分泌癌 2）類基底細胞癌 3）リンパ上皮腫様癌 4）淡明細胞癌 5）ラブドイド形質を伴う大細胞癌	1.3.4 Large cell carcinoma [Variants] 1.3.4.1 Large cell neuroendocrine carcinoma 1.3.4.1.1 Combined LCNEC 1.3.4.2 Basaloid carcinoma 1.3.4.3 Lymphoepithelioma-like carcinoma 1.3.4.4 Clear cell carcinoma 1.3.4.5 Large cell carcinoma with rhabdoid phenotype	4．大細胞癌 粘液形成型 粘液非形成型 巨細胞型
6．腺扁平上皮癌	1.3.5 Adenosquamous carcinoma	5．腺扁平上皮癌
7．多形，肉腫様あるいは肉腫成分を含む癌 1）紡錘細胞あるいは巨細胞を含む癌 a）多形癌 b）紡錘細胞癌 c）巨細胞癌 2）癌肉腫 3）肺芽腫 4）その他	1.3.6 Carcinoma with pleomorphic, sarcomatoid or sarcomatous elements 1.3.6.1 Carcinoma with spindle and/or giant cells 1.3.6.1.1 Pleomorphic carcinoma 1.3.6.1.2 Spindle cell carcinoma 1.3.6.1.3 Giant cell carcinoma 1.3.6.2 Carcinosarcoma 1.3.6.3 Pulmonary blastoma 1.3.6.4 others	9．癌肉腫
8．カルチノイド腫瘍 1）定型的 2）非定型的	1.3.7 Carcinoid tumors 1.3.7.1 Typical carcinoid 1.3.7.2 Atypical carcinoid	6．カルチノイド (定型的) 非定型的
9．唾液腺型癌 1）粘表皮癌 2）腺様嚢胞癌 3）その他	1.3.8 Carcinomas of salivary-gland type 1.3.8.1 Mucoepidermoid carcinoma 1.3.8.2 Adenoid cystic carcinoma 1.3.8.3 Others	7．粘表皮癌 8．腺様嚢胞癌 10．その他の癌
10．分類不能癌	1.3.9 Unclassified carcinoma	11．分類不能癌

難しいことはこの本で勉強してください

肺がんの撲滅

１. 肺がん予防
　　禁煙（第1次喫煙、第2次喫煙、第3次喫煙）
　　アスベスト
　　大気汚染（PM2.5 etc）
２. 肺がん発癌過程の研究
３. 早期発見・早期診断
４. 早期治療

早期扁平上皮がん

東京医大最初の Carcinoma in situ

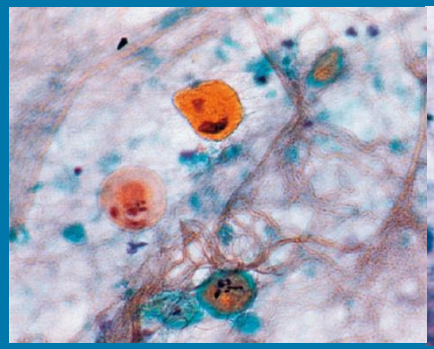
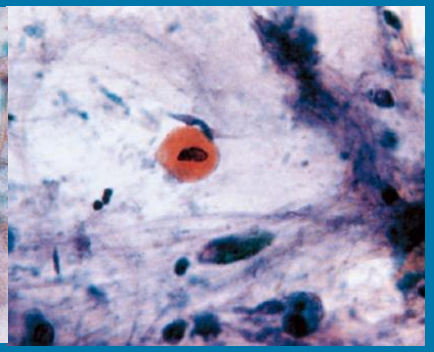
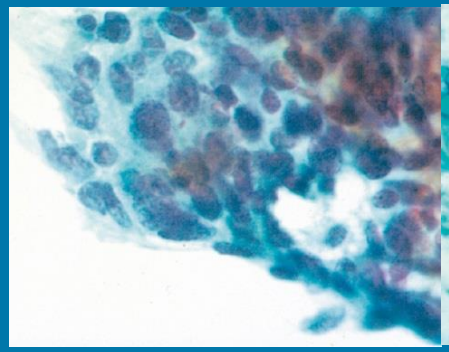
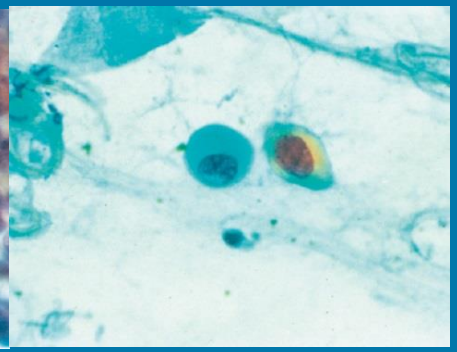
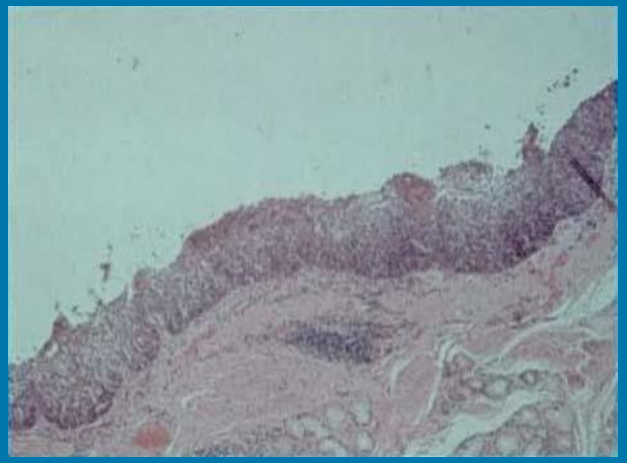
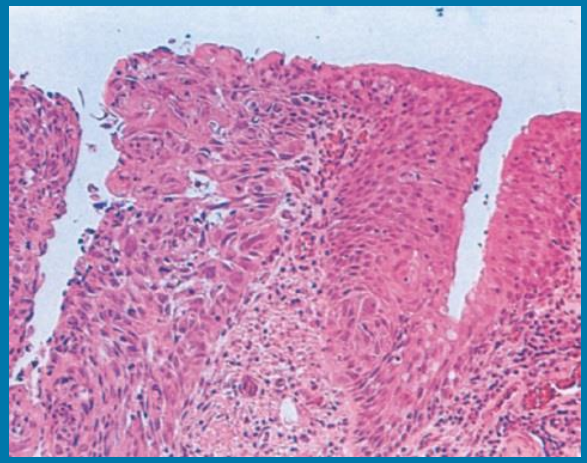
1977

右中葉支と下葉支の分岐部

WHO, UICC & IASLC Staging: Stage 0, Tis

早期扁平上皮がん

WHO, UICC & IASLC Staging: Stage 0, Tis

早期発見

・1988年 老人保健法
肺がん健診
40歳以上の男女、年一回の胸部X線検査
50歳以上の高度喫煙者に対する喀痰細胞診

・定期的人間ドック

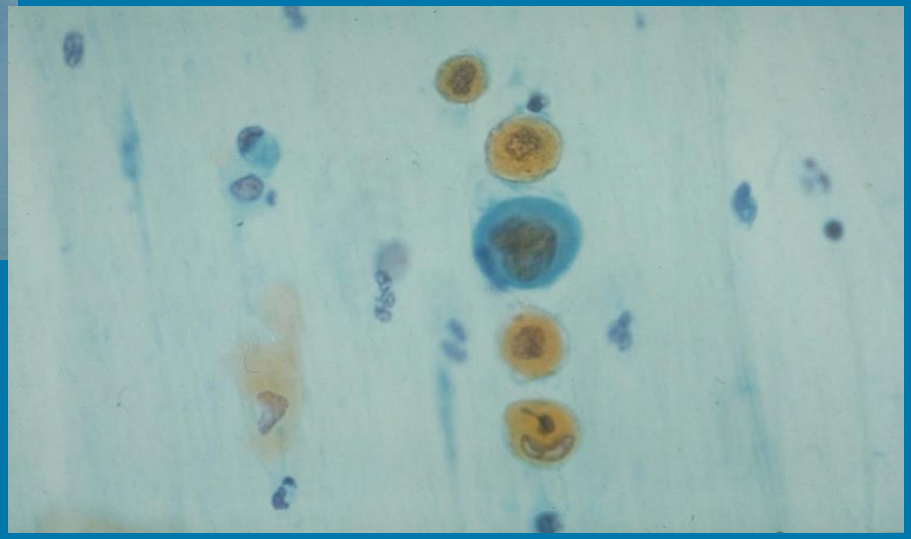
発見方法
中心型肺がん（症状あり）
喀痰細胞診
喀痰、血痰
気管支鏡検査
咳、血痰

末梢型肺がん（症状なし）
CT

早期中心型肺がん

喀痰採取容器　　*Since 1974*

早期肺がん細胞　*Cis*



NSCGH, TMU & IUHW

近年のトピック　早期肺腺がん

CT　Screening

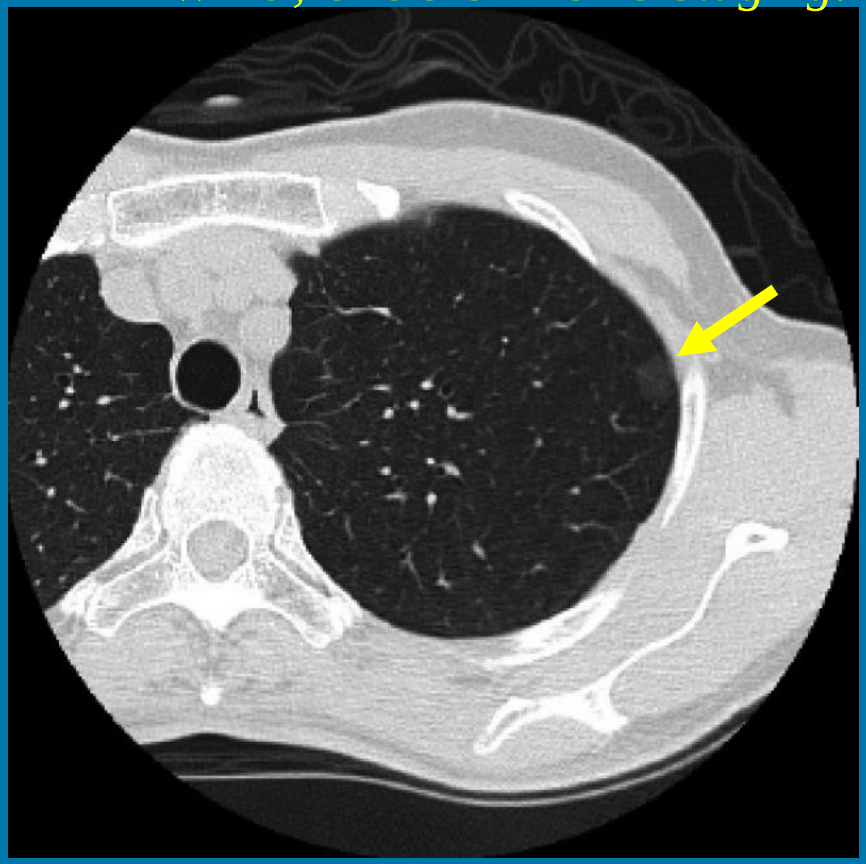
早期末梢型早期肺がん（GGO）が
容易に見つかるようになった。
手術により死亡率の減少が証明された。

課題

確定診断
細胞型の鑑別

早期末梢型肺がん

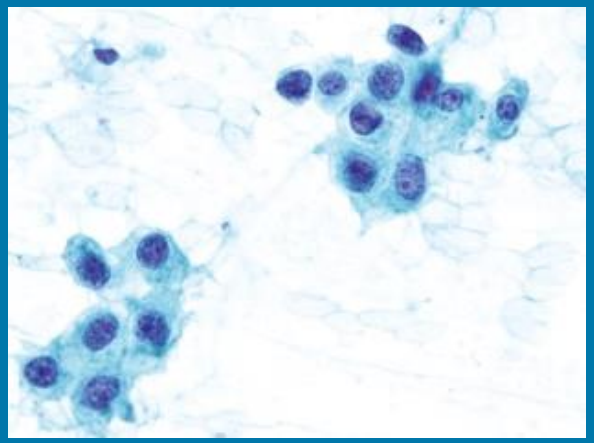
WHO, UICC & IASLC Staging: AAH, AIS(Tis), MIA

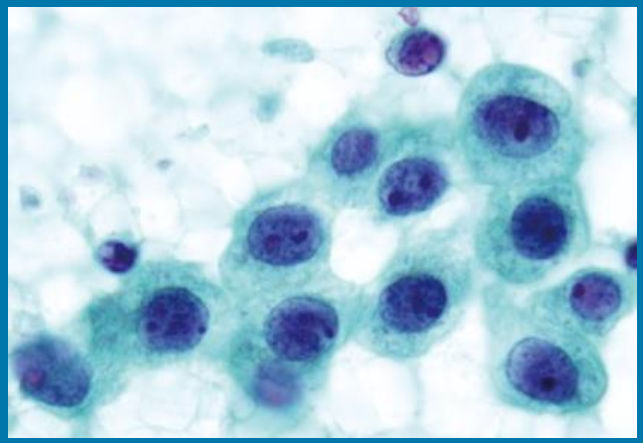


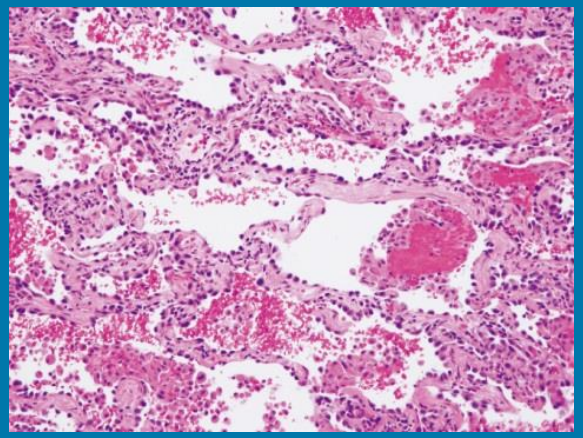
NSCGH, TMU & IUHW

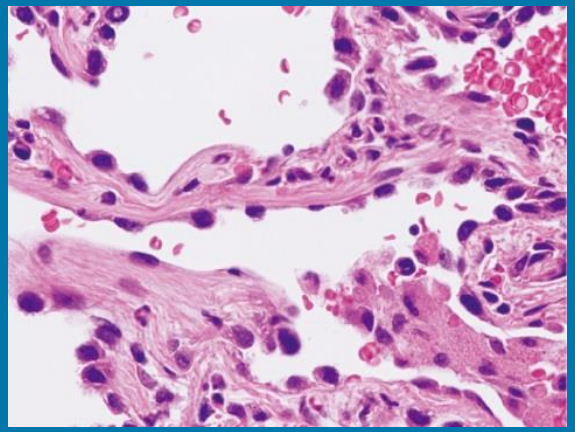
早期末梢型肺がん

WHO, UICC & IASLC Staging: AAH, AIS(Tis), MIA





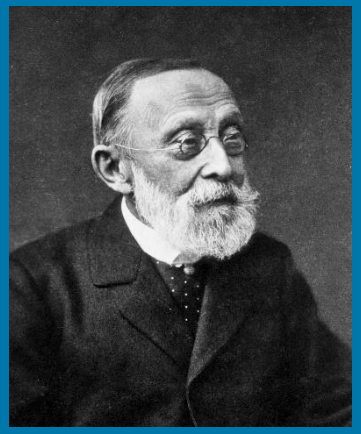




早期末梢型肺がんの今後の診断戦略

最近の病理診断学の変貌

Rudolf Ludwig Karl Virchow　(1981年 - 1902年)
ベルリン大学病理学教授
ベルリンで「病理学の法王」として君臨した。



免疫染色（蛋白異常)の出現

分子生物学的解析
　遺伝子解析
　蛋白解析（機能）
　　Liquid Biopsy

CTC (Circulating Tumor Cells)、cfDNA (cell free DNA)、
ctDNA (circulating tumor DNA)
血中に分泌されるわずかながん遺伝子（遊離DNA）を検出する。
採取細胞や組織と違って精度に課題が残るが、患者にとって血液採取で検査が可能で負担も少なく、大きな利点となる。

形態学は基本であることには変わりない。そして分子生物学的解析が加味されより適切な病態診断が可能になろう。

肺がん関連腫瘍蛋白質（免疫染色）

細胞増殖能関連蛋白質

細胞増殖能関連蛋白質	
Ki-67（MIB-1）	増殖細胞の核小体や核分裂期の染色体上に発現する機能不明の分子．細胞周期 G1 後期～ M 期まで発現し，細胞周期に入っていることを示す．
PCNA	細胞周期の G1 後期～ S 期初期（一部 G0 期）に発現する DNA 複製に関連する非ヒストン酸性核蛋白質. 固定条件に影響されやすく，再現性が乏しい．
Topoisomerase	細胞周期の S 期後半～ G2/M 期に発現する DNA 複製に関連した核内酵素． Ⅰ，Ⅱα，Ⅱβ，Ⅲα，Ⅲβの 5 つの isoform が知られ，肺癌ではⅡαの発現が確認されている．
	細胞周期の G1 初期～ S 期に発現する DNA 複製に直接関与する核蛋白質．
Cyclin D Cyclin E	G1 期から S 期への移行（G1 チェックポイント）の制御に関わる蛋白質．
Cyclin B	G2 期から M 期への移行（G2/M チェックポイント）の制御に関わる蛋白質．

組織分化関連抗原による肺がん組織型推定

A　原発性 / 転移性肺癌の鑑別	CK7，CK20 の組み合わせによる原発巣の推定 原発性と転移性肺腺癌の鑑別：Napsin A，TTF-1，SpA 肺扁平上皮癌と胸腺扁平上皮癌との鑑別：CD5
B　神経内分泌性格	Chromogranin A CD56（N-cell adhesion molecule） Synaptophysin
C　扁平上皮細胞への分化	Desmoglein 3（DSG3） Desmocollin 2（DSC2） Claudin 1 Involucrin p40，p63
D　II 型肺胞上皮，clara 細胞への分化	Napsin A Thyroid transcription factor 1（TTF-1） Surfactant apoprotein A（SpA）

CK7とCK20による原発巣の推定

	CK7	CK20
肺腺癌	(+)	(−)
肺大細胞癌	(+)	(−)
肺小細胞癌	(−)	(−)
扁平上皮癌	(−)	(−)
中皮腫	(+)	(−)
胸腺腫	(+)	(−)
肝細胞癌	(−)	(−)
膵腺癌	(+)	(+)
大腸癌	(−)	(+)
腎細胞癌	(−)	(−)
前立腺癌	(−)	(−)
移行上皮癌	(+)	(+)
子宮内膜癌	(+)	(−)
卵巣癌（粘液型）	(+)	(+)
卵巣癌（非粘液型）	(+)	(−)
乳管癌	(+)	(−)

粘液非産生性原発性低分化肺腺がんと中皮腫の鑑別

	Mesothelioma (11cases)	Non-mucinous-type of poorly differentiated adenocarcinoma (32cases)
Calretinin	54.50%	9.40%
Mesothelin	54.50%	31.30%
Cytokeratin 5/6	90.90%	25.00%
Napsin A	0%	90.60%
TTF-1	9.10%	87.50%
SpA0	0 %	71.90%

原発性肺腺がんと中皮腫の鑑別

	Napsin A TTF-1 Surfactant aporotein A CEA	Calretinin D2-40, WT1 Thrombomodulin Mesothelin
肺腺癌	陽性	陰性
中皮腫（上皮型）	陰性	陽性

神経内分泌性関連蛋白質

Chromogranin A	神経内分泌顆粒の構成蛋白質
N-CAM （Neural Cell Adhesion Molecule）	神経組織における細胞間接着因子 膜貫通糖蛋白質
Synaptophysin	神経細胞のシナプト小胞の構成蛋白質

扁平上皮細胞関連蛋白質

Desmoglein 3（DSG3）	細胞間橋を形成する細胞間接着分子である Desmosome を構成するカルシウムと結合した膜貫通糖蛋白質
Desmocollin 2（DSC2）	Desmosome の腫瘍構成蛋白質
Claudin 1	細胞間接着装置 Tight Junction の構成蛋白質
Involucrin	細胞膜裏打ち蛋白質 角化層，基底層では陰性，表皮有棘層上部に限局して発現
p63	基底細胞，筋上皮細胞および重層扁平上皮に発現

肺腺がん関連蛋白質

Napsin A	肺のII型肺細胞におけるプロ SP-B (Surfactant protein B) のプロセシングに関与するアスパラギン酸プロテアーゼ
TTF-1 (Thyroid transcription factor 1)	甲状腺濾胞細胞の核内でTSH受容体，Thyroglobulin（TG），Thyroperoxidase（TPO）の発現を誘導する転写因子として発見された肺でのSurfactant proteinやClara cell secretory proteinの発現に関係する“Pulmonary cell selective transcription protein” でもある
SpA (Surfactant apoprotein A)	II型肺胞上皮細胞とクララ細胞が産生するサーファクタントの主成分はリン脂質に特異的なアポ蛋白（surfactant apoprotein あるいは surfactant protein：SP）が結合した複合体

NapsinAとTTF-1の発現比較

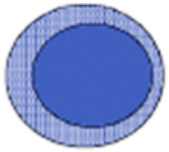
	Napsin A	TTF-1 (Thyroid transcription factor 1)
原発性肺腺癌の陽性率	80 ～ 90%	80 ～ 90%
原発性肺癌の他の組織型との反応性	陰性	神経内分泌癌（小細胞肺癌・大細胞性神経内分泌癌・カルチオイド）で陽性
他臓器腺癌での反応性	腎臓癌で陽性*	甲状腺癌で陽性

国際的に推奨される早期腺がんの新分類

WHO, UICC & IASLC

preinvasive lesions	
	atypical adenomatous hyperplasia（AAH）
	adenocarcinoma in situ（AIS）
minimally invasive adenocarcinoma（MIA）	
invasive adenocarcinoma	
	lepidic pattern predominant
	acinar pattern predominant
	papillary pattern predominant
	solid pattern predominant
	micropapillary predominant
variants	

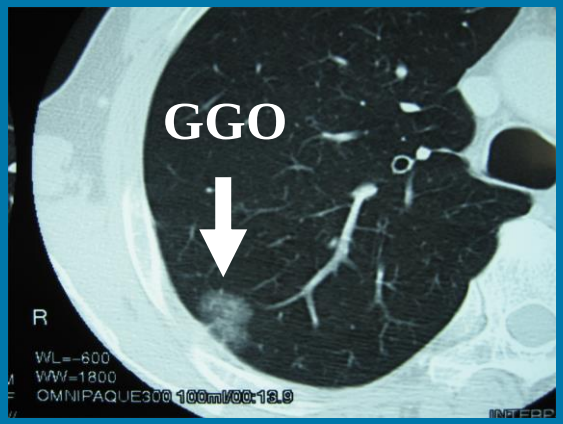
国際肺癌学会が提唱する早期腺がんの新分類

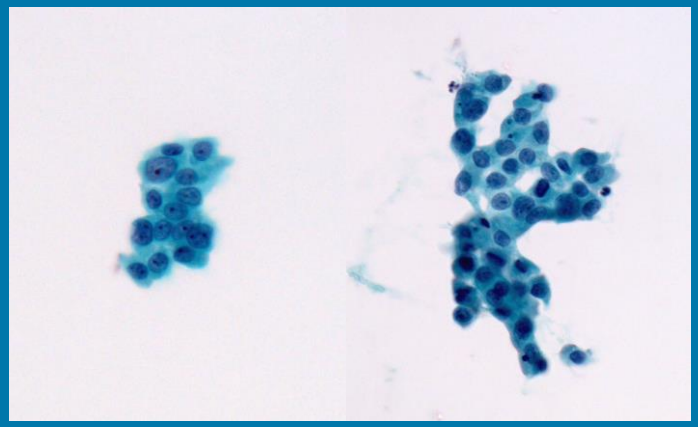
cT	CT image on HRCT						
	Solid part	0cm	0cm	≤0.5cm†	0.6–1.0cm†	1.1–2.0cm†	2.1–3.0cm†
	Total tumor size including GG	≤0.5cm	0.6–3.0cm‡‡	≤3.0cm‡‡	0.6–3.0cm‖	1.1–3.0cm‖	2.1–3.0cm‖
	Pathologic Differential Diagnosis	AAH‡ , AIS , MIA	AIS , MIA , LPA	MIA , LPA , AIS	LPA , Invasive AD , MIA	LPA , Invasive , AD	Invasive , AD
	Clinical stage		cTis‡‡	cT1mi‡‡	cT1a	cT1b	cT1c
pT	Invasive part	0cm	0cm	≤0.5cm‡‡	0.6–1.0cm†	1.1–2.0cm†	2.1–3.0cm†
	Total tumor size including lepidic growth part	Usually ≤0.5cm‡	≤3.0cm‡‡	≤3.0cm‡‡	0.6–3.0cm‖	1.1–3.0cm‖	2.1–3.0cm‖
	Pathology	AAH	AIS	MIA	Lepidic predominant AD or Inasive AD with lepidic component	Invasive AD with a lepidic componemt or lepidic predominant AD	Invasive AD with lepidic component
	Pathologic stage		pTis‡‡	pT1mi‡‡	pT1a	pT1b	pT1c

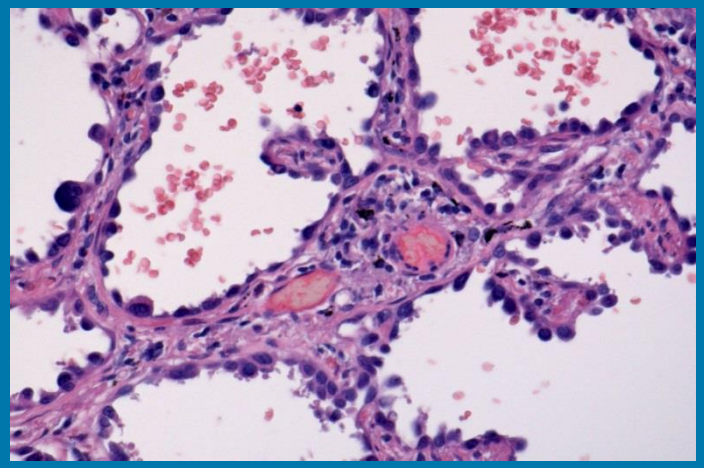
Travis WD, et al Journal of Thoracic Oncology Vol. 11 No. 8: 1204-1223, 2016

Adenocarcinoma in situ (AIS)

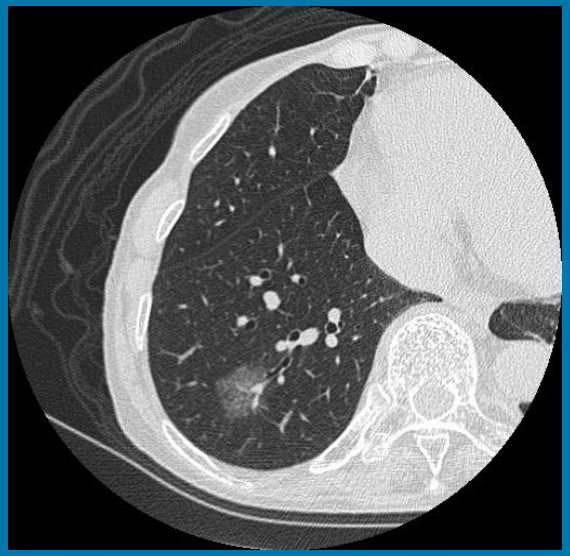
pT1N0M0
StageIA

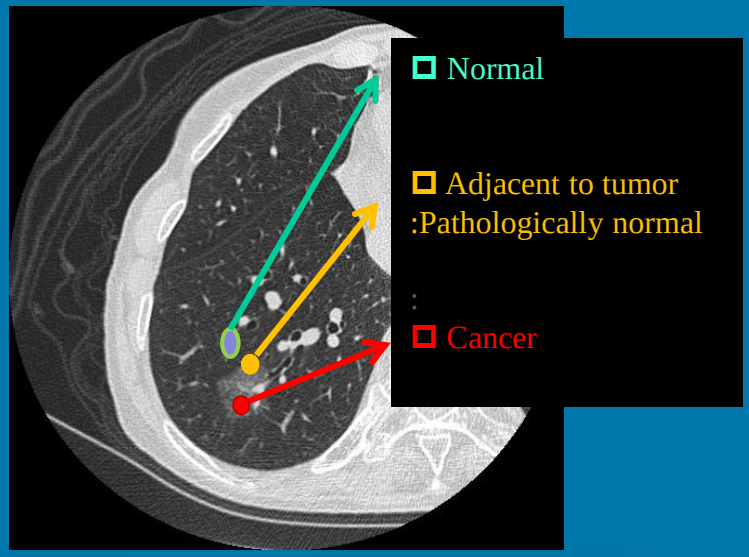


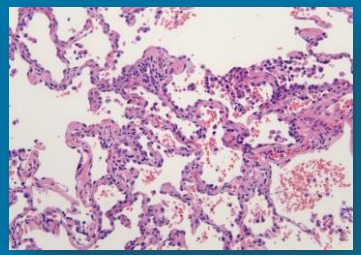




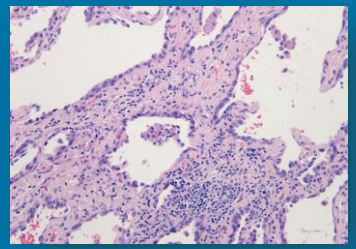
早期肺がんのProteomics解析



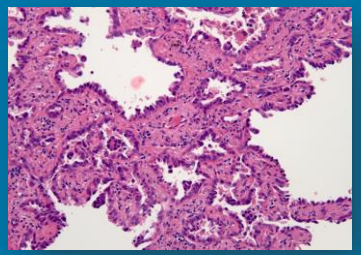




Adenocarcinoma in situ (AIS)



Minimally invasive adenocarcinoma (MIA)



Lepidic predominant adenocarcinoma (LPA)

Kato Y, et al: A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-type. Clinical and Translational Medicine 4:24:1-13,2015

NSCGH, TMU & IUHW

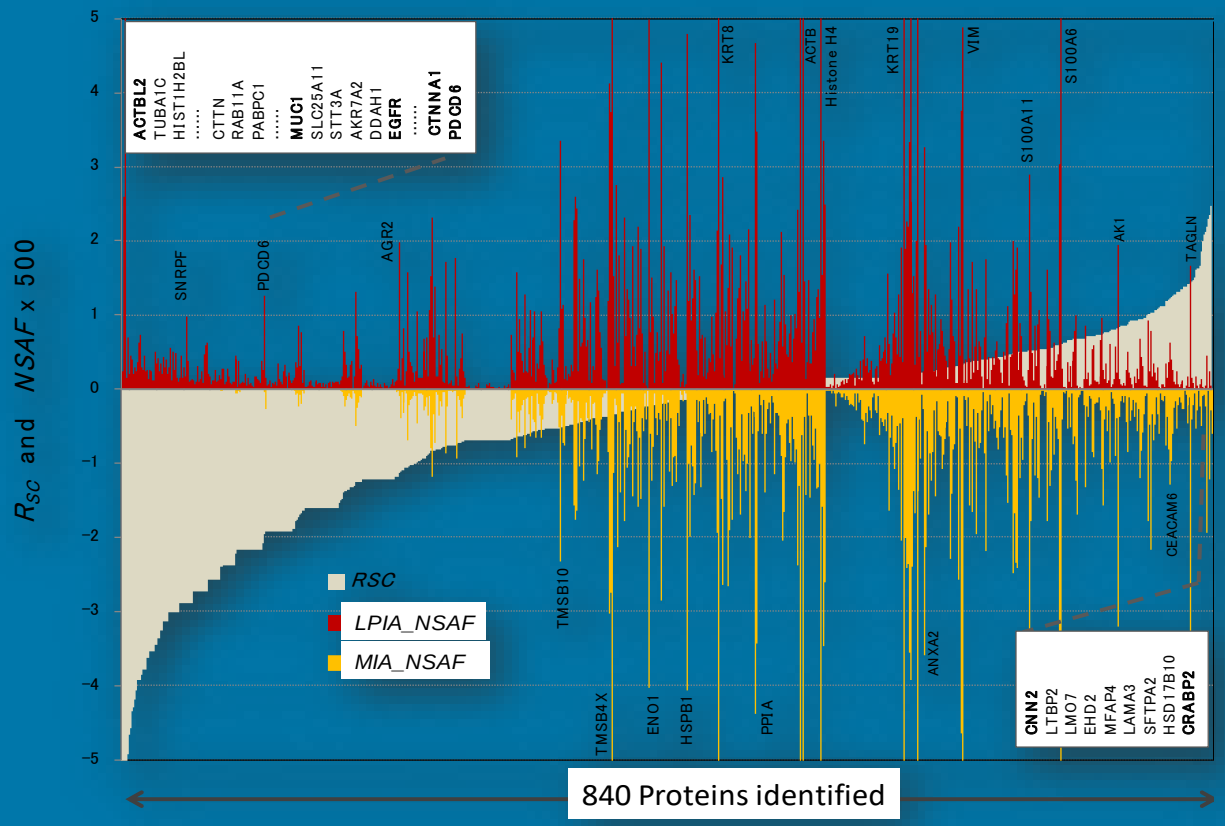
LPAとMIAの出現蛋白の相違

■ **LPA vs MIA**

LPA: Lepidic predominant adenocarcinoma

MIA: Minimally invasive adenocarcinoma

➢ **Statistical significance was evaluated by χ^2 or G- test.**

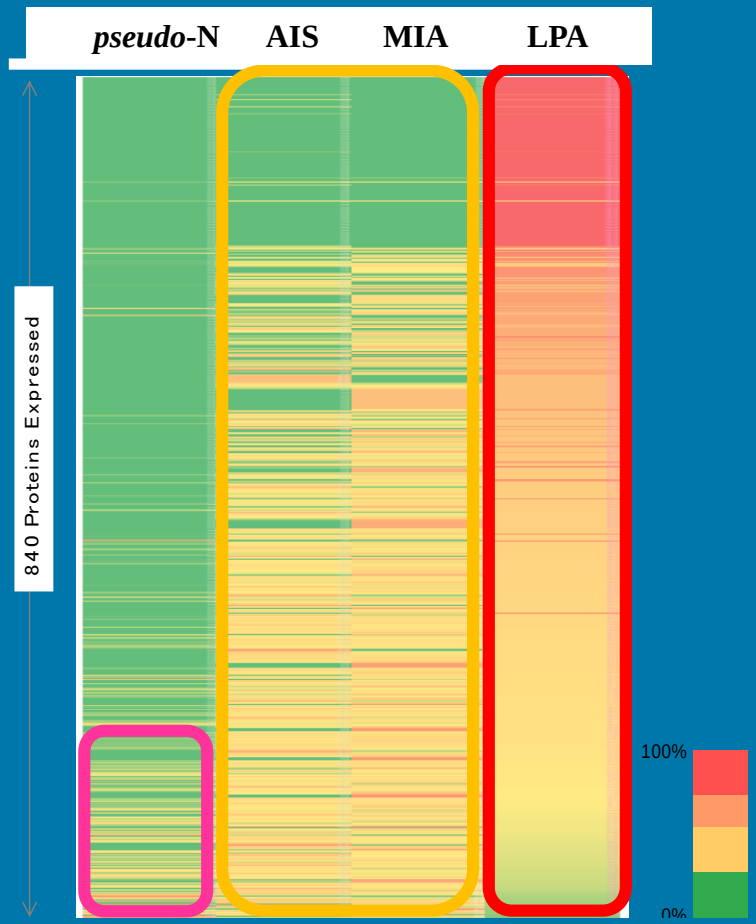


Kato Y, et al: A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-type. Clinical and Translational Medicine 4:24, 2015

早期腺がんの進行度による蛋白の出現の相違

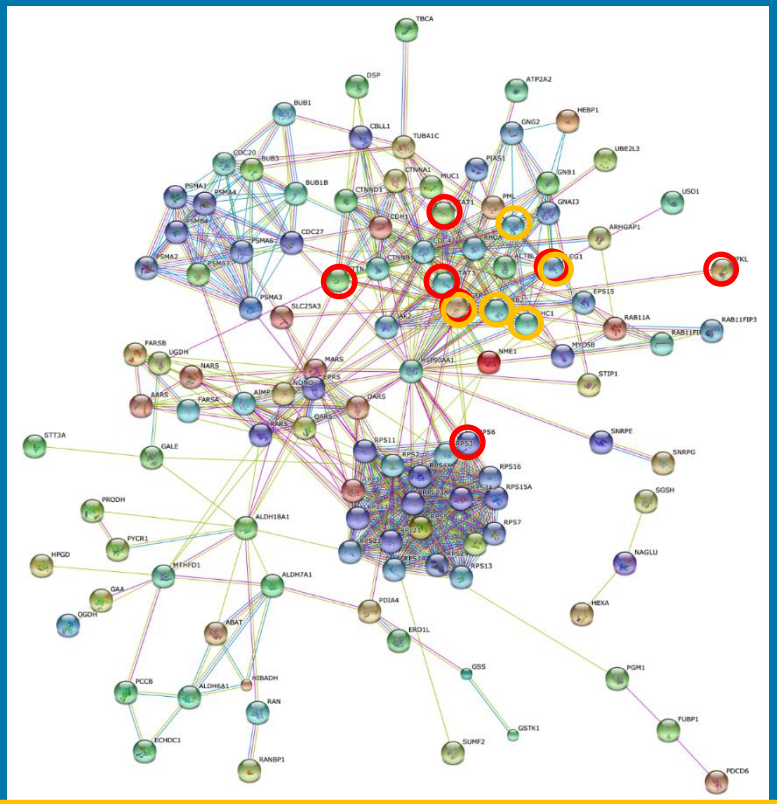
- **GGO Lung Cancer: Expression variations of 840 proteins identified**
- AIS : *n*=3
- MIA: *n*=3
- LPA: *n*=3
- Pseudo-Normal: n=3

➢ **1. There seems to be a similarity between AIS and MIA but**
➢ **2. LPA demonstrated a quite different protein expression pattern.**



Kato Y, et al: A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-type. Clinical and Translational Medicine 4:24, 2015

PPI Networks of LPA



- HIF－1
- ErBb

- **STRING PPI Networks extracted using significant 70 node proteins in LPA.**
- **Numerous advanced cancer related pathways were already activated, which include ErBb (Yellow circles) and HIF-1 (Red circles) Cancer Pathways.**

Kato Y, et al: A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-type. Clinical and Translational Medicine 4:24, 2015

早期肺腺がんのプロテオーム分析の結果

- **AIS**では、白血球の血管外遊走や組織間質における接着因子の活性化による局所の細胞接着が進行する所見を得た。
- **MIA**では、**proteoglycans**や **PI3K-Akt**が発現し、がんの増殖に関連が示唆される。
- **LPA**では、すでに**ErbB, Ras, Rap1**や**HIF-1**が発現し、多くのがん増殖pathways の関与が示唆された。
- ***特記すべきこと***
- がん病巣近傍の正常組織内にがん化への準備状況（ECM-receptor interaction）が始まっていることが示唆されていることである（ECM: extra cellular matrix）

- このように臨床的なCT画像、臨床所見、病理組織像の明らかな病態のプロテオーム解析によって新たな知見が生まれた。

Kato Y, et al: A proteomic profiling of laser-microdissected lung adenocarcinoma cells of early lepidic-type. Clinical and Translational Medicine 4:24, 2015

細胞形態学＋細胞分子生物学

Clinical Sequence

遺伝子解析

蛋白解析

→**ProteoGenomics**

検体

細胞

組織

血液（Liquid Biopsy）

細胞形態学＋細胞分子生物学

Liquid Biopsy

・血中に分泌されるわずかながん遺伝子（遊離DNA）を検出する。
・CTC (Circulating Tumor Cells)：CTCの測定は治療効果の判定や予後予測因子として有用性が認められている。
・cfDNA (cell free DNA=ctDNA (circulating tumor DNA))：血液中循環腫瘍細胞のDNAで、がん患者には、健常人よりも多い。
・昨年12月ロッシュから申請されていたリキッドバイオプシー検出キットが認められた。

しかし、効率よく、高い精度での検出技術の開発が、今後の課題である。
患者にとって負担も少なく、大きな利点がある。

肺がん治療方針の世界の動向

・Clinical sequenceの解析によって治療方針が決められる方向に進んでいる。

・がん治療に関し薬剤の選択は従来一個の遺伝子解析が認められてきたが本年4月FDAは30個のDNAパネルを承認した。この流れを受けてわが国でもLC SCRUM-Japanが検討を始めた。

・しかし遺伝子解析だけではまだ課題が多く、そこで遺伝子の解析に加えて機能を有する蛋白の解析が進められつつある。

・がんの組織、細胞から抽出される蛋白はProtein Protein Interlaction,がん関連Passwayに関与し、病態解析に欠かせないものであるが、膨大な数が分析されなければならず、大変な作業である。現在カロリンスカ研究所には120万に及ぶデータベースがあり、これを基に蛋白と遺伝子変異の関連が検証されつつある。

・ProteoGenomicsの時代

これからの肺がん医療

適切で無駄のない医療を目指して

細胞形態学

＋

ProteoGenomics

遺伝子解析＋蛋白解析

検体：細胞、組織、血液（Liquid biopsy）

おしまい

ご清聴ありがとうございました。