95　特発性肺線維症合併肺癌の新規治療法の開発	吉野　一郎

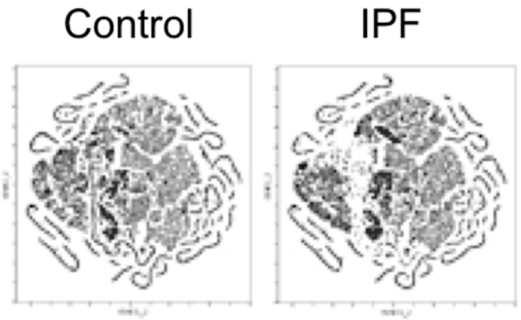
【目的】わが国の肺癌症例における間質性肺炎の合併率は約 4〜15%と報告されており、術後 5 年生存率は IA 期で 59%と、間質性肺炎非合併肺癌 IA 期の 86.8%と比べて著しく不良である。間質性肺炎の進行による予後への影響や二次癌発生の影響などの他、初回手術後の急性増悪や、再発時の治療制限などが予後不良の原因と考えられている。また上皮間葉転換機構による形質を多く有し、浸潤・転移能が高いことも一因と考えられている。

近年、ピルフェニドンなど肺の線維化や炎症を抑制して急性増悪の頻度を減少させ、特発性肺線維症（Idiopathic pulmonary fibrosis：IPF）の進行を遅らせる薬剤が開発されたが、IPF 合併肺癌の治療における急性増悪の予防や長期予後の改善効果は定かではない。我々は第Ⅱ相試験（WJOG6711L）で外科治療の対象となる IPF 合併肺癌患者に対する周術期ピルフェニドン療法に関して安全性および効果を報告した。本研究ではその術後急性増悪抑制効果と 2 年無再発生存を IPF 無増悪期間の対照群との比較により第Ⅲ相試験として検討することを主な目的としている。併せて、両群の切除検体を用いた次世代シーケンサによる mRNA シーケンスや CyTOF により、IPF における肺発がん過程における特異的なシグナルや、ピルフェニドンによる抗線維化や抗 EMT シグナルの変化の検出を試み、新たな治療標的の探索を行う。

【方法】1. IPF 合併非小細胞肺癌に対する周術期ピルフェニドン療法の術後急性増悪に関する第Ⅲ相試験（NEJ034 試験）: IPF を合併する臨床第Ⅰ〜Ⅱ期非小細胞肺癌の 20 歳以上の患者を対象とし、登録後にピルフェニドン投与群または対照群にランダム化割り付けを行い手術を行った。主要評価項目として術後無増悪期間、副次的評価項目として術後 1 か月以内の IPF 増悪割合、安全性、術後 3 年間の生存割合、肺癌無再発生存割合、IPF の無増悪生存割合とした。目標登録件数は 230 件（約 5 年間の症例集積期間）とし、その後の Secondary endpoint までの 3 年の観察期間をおいた。2. IPF 肺における肺発がん機序および抗線維化薬によるシグナル修飾の解析：これまで手術を行った患者の肺の検体を単細胞へと調整し、抽出した RNA を用い、次世代シーケンサによる mRNA シーケンスを行った。解析結果の比較より、線維化および抗線維化に関する因子を抽出し、線維化に直接関わるシグナル伝達経路を特定すした。また 30 種程度の金属標識された抗体を用いてラベリングし、どの細胞で線維化の変化が起きているか、そしてどの細胞が抗線維化の働きをしているのかを CyTOF にて解析した。

【結果】1. 臨床試験は NEJ034 として 2017 年 10 月より全国で開始され、2019 年 4 月時点で 64 例が登録され、試験は継続中である。この間、ブーストアップ会議を年 1〜2 回開催し、参加施設間の情報共有および IPF に関する治療に関する討議を行ってきた。2. これまでに 6 症例を蓄積し、次世代シーケンサによる解析を進めてきた。単細胞に分離を行い、表面マーカーでソーティングすることで細胞特異的な RNA 発現解析を行うことができた。また、CyTOF による肺由来上皮細胞のサブセット解析は、30 種類の金属マーカーを用いて今後解析を進める予定である（図）。

肺胞上皮細胞のサブセット解析



95. 特発性肺線維症合併肺癌の新規治療法の開発

吉野　一郎

*千葉大学 医学部 呼吸器病態外科学

Key words：間質性肺炎，特発性肺線維症，肺癌，抗線維化薬

緒　言

難治性肺疾患である特発性間質性肺炎の医療受給者交付率は 10 万人あたり 3.3 人であるが、早期病変の有病者数はその 10 倍以上の可能性が指摘され、将来的にも増加すると推察されている。中でも特発性肺線維症（Idiopathic pulmonary fibrosis：IPF）は患者数が最も多い疾患であり、しかも平均生存期間は 3〜5 年と短く、最も予後の不良な間質性肺炎である。IPF 慢性経過中、急速な進行による呼吸不全が見られることがあり「急性増悪」と呼ばれる。急性増悪は IPF の死亡原因の約 40%と最も多く、感染や薬剤、気胸や気管支鏡、外科的侵襲などが契機となることが知られているが、その原因、対処法は確立していない。また、IPF は肺癌発生の危険因子としても知られ、非 IPF 患者と比べ肺癌の発生リスクが 7〜14 倍であり、累積肺癌発生率は 1 年で 3.3%、5 年で 15.4%、10 年で 54.7%である。肺癌は IPF 患者の死亡原因の 11%を占めている。逆にわが国の肺癌症例における間質性肺炎の合併率は約 4〜15%と報告されており、比較的少数の疾患群ではあるが、英国では 1991 年から 2003 年の間に IPF の患者数が 2 倍以上に増加したという報告もあり、日本でも IPF 合併肺癌の頻度は今後さらに増加する可能性がある。日本呼吸器外科学会が行った大規模調査では IPF を含む間質性肺炎合併肺癌の術後 5 年生存率は IA 期で 59%と、肺癌合同登録委員会データ（IA 期 86.8%）と比べて著しく不良であった。合併する IPF の進行による予後への影響や二次癌発生の影響などの他、初回手術後の急性増悪や、再発時の治療制限などが考えられている。また IPF 合併肺癌は上皮間葉転換機構（epithelial-to-mesenchymal transition: EMT）による形質を多く有し、浸潤・転移能が高いことが示されている。我々の網羅的遺伝子メチル化の研究においても、IPF 合併肺癌と非合併肺癌ではプロファイルの明らかな違いが検出されている。

IPF 合併肺癌の最大の問題点は標準治療が確立されていないことである。抗腫瘍治療後に致死的な IPF の致死的急性増悪が生じ得ることから、治療選択肢が限定されているのである。治療後の急性増悪が放射線単独療法で 25〜33%、放射線化学療法後で 40%（Grade3 以上）、体幹部定位放射線治療でも 1 年以内の肺臓炎（Grade4 以上）発生率が 57%とする報告や、発生率自体は 19%（Grade2 以上）だが有意に広範囲の肺臓炎が生じるという報告等がある。化学療法は薬剤によっては比較的安全に投与できるものの、多くのレジメンが禁忌または慎重投与とされており、最近の研究では間質性肺炎（特に IPF）合併肺癌における化学療法後急性増悪の頻度は 30〜40%程度とされている。近年注目のドライバー変異に対する分子標的薬や免疫チェックポイント阻害療法も致死的急性増悪のため禁忌である。このため機能的かつ腫瘍学的に切除可能例には手術が選択されることが多い。しかしながら、手術療法でも術後の IPF 急性増悪が 10〜20%程度の割合で生じ、急性増悪例の 40%以上が死の転機をとる。日本胸部外科学会の全国調査では間質性肺炎急性増悪は我が国の肺癌手術全体における術後 30 日以内死亡原因の第 1 位となっており、その予防法確立は肺癌手術療法の安全性向上のためには喫緊の課題であるといえる。

近年、ピルフェニドンなど肺の線維化や炎症を抑制して急性増悪の頻度を減少させ、IPF の進行を遅らせる薬剤が開発された。これらは、動物実験では抗 EMT 作用が示されているものの、臨床的 IPF 合併肺癌の治療における急性増悪の予防や長期予後を改善するか否かは定かではない。これまで、我々は第Ⅱ相試験（WJOG6711L）で外科治療の対象となる IPF 合併肺癌患者に対する周術期ピルフェニドン療法に関して安全性および効果を報告した［1］。本研究ではその術後急性増悪抑制効果と 2 年無再発生存を IPF 無増悪期間の対照群との比較により第Ⅲ相試験として検討することを主な目的としている。併せて、両群の切除検体を用いた次世代シーケンサによる mRNA シーケンス［2，3］や CyTOF により、IPF における肺発がん過程における特異的なシグナルや、ピルフェニドンによる抗線維化や抗 EMT

*現在の所属：千葉大学 大学院医学研究院 呼吸器病態外科学

シグナルの変化の検出を試み、新たな治療標的の探索を行う。

方法および結果

1. 多施設共同第Ⅲ相試験：NEJ034 試験

NEJSG（North East Japan Study Group、北東日本研究機構）の協力のもと、千葉大学大学院呼吸器病態外科学を事務局として「特発性肺線維症（IPF）合併非小細胞肺癌に対する周術期ピルフェニドン療法の術後急性悪抑制効果に関する第Ⅲ相試験」を開始した。症例登録は EDC システムを利用して、オンライン上で匿名化して割付し、周術期ピルフェニドン療法 A 群（試験治療）、または施設ごとの術後急性増悪予防を目的とする治療 B 群に自動的に割り当てた。A 群では 2 週間おきに内服用量を増量し、投与開始後 4～6 週のタイミングで手術を行った。B 群では A 群に相当する期間内（登録後 49 日まで）に手術を行った。手術日を起点として、術後 30 日までの周術期にピルフェニドンを使用することで急性増悪を予防できるかどうかを主要評価項目し、試験を開始した。副次評価項目として、術後 90 日までの IPF 無増悪期間や、術後 2 年生存とする。

以上のような登録から経過報告までの一連の処理は、すべてオンライン上の EDC で行うシステムを構築している。定期的に事務局で EDC の入力をチェックし、適宜担当施設に連絡をとり入力を促している。その経過や蓄積した有害事象報告は、定期的に参加施設に周知できるようブーストアップミーティングを行っている。2017 年 10 月に肺癌学会総会の施行期間中に行ったキックオフミーティングののち、2018 年 5 月 17 日に千葉で行われた呼吸器外科学会総会期間中や、2018 年 12 月 1 日に東京で行われた肺癌学会総会の期間中に情報共有の場を設定している。2019 年 5 月にも、大阪で行われる呼吸器外科学会総会期間中にブーストアップミーティングの開催が予定されている。

試験開始後、症例数は着実に伸びている（図 1）。現在参加施設として全国 77 施設より参加表明の申し出を受けており、60 施設より倫理審査を通過したと報告を受けている。症例登録は現在も継続して行っており、症例の集積を継続している。

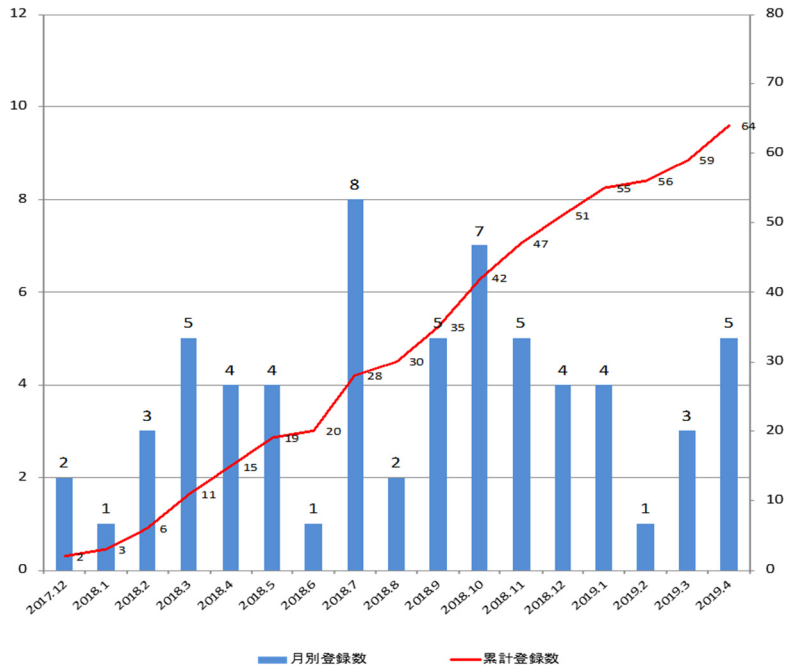


図 1. NEJ034 試験の登録状況

青い棒グラフで月別登録数（左軸）、赤い折れ線グラフで累計登録数（右軸）が示されている。

これまでに月平均 3.7±2.0 例の登録がなされ、2019 年 4 月までに合計 64 例が登録された。

予定登録症例数は 230 例であり、現在 27.8%の症例集積が終わっている。

2. RNA シーケンスによる発現解析

同意の得られた患者より、術後の切離肺から新鮮肺検体を採取した。採取した肺はただちに化学的に分解し、単離細胞として回収した。CD45 および DAPI を用いたフローソーティングにより、混在している血球細胞と死細胞を除去して生きた肺細胞のみを採取した。さらに、上皮マーカーを用いて肺の上皮のみを選別し、その他の間質細胞などとは分けて検体を採取している。癌部についても、同様に化学的に単離を行い生きた細胞のみを回収した。得られた細胞より RNA を抽出し、3'UTR シーケンシングの技術を応用して、細胞の単離やソーティングを経て劣化のみられた RNA からも効率的にライブラリを作成し次世代シーケンサによる RNA 発現解析を行った。IPF1 症例を含めた合計 6 症例より、癌 5 検体を含む 23 検体からのソーティングを試み、RIN スコア 2～8.9 と幅広い質の RNA が採取された。これらの RNA から平均 4,973,664.609±1,092,999.99 リードを得ることができた。得られた結果をもとにクラスター化してみると、癌から得られた生細胞は肺細胞とは異なる集団を形成していた（図 2、赤枠）。一方で、同じ集団に上皮のみ選択した細胞（図 2、赤矢印）が認められており、癌に近い発現プロファイルが確認された。未だ少数例での検討であるが、データの蓄積とともに細胞分画特異的な変化の抽出を目指していく。

細胞表面マーカーおよび、細胞内マーカー、核内マーカーを 30 種組み合わせた CyTOF 用の抗体セットをデザインした。これらの抗体で一括して対象細胞を反応させることで、一つの細胞に対して 30 個の蛋白発現を同時に解析することができる。この方法では、従来広く行われてきたフローサイトメトリーとは異なり、蛍光物質の代わりに希少金属を用いている。そのため、従来同時に反応させたときに問題となってきた蛍光色素の漏れ込みのない解析が可能となった［4］。その一方で、CyTOF では細胞を蒸発させて抗体の発現量を測定するという性質上、生きた細胞の選別を行うことができない。我々は従来の蛍光を用いた細胞のソーティングを行ったうえで、標的細胞を絞り込んでから CyTOF を行うことで効率的に標的細胞の解析を行うことができるプロトコルを設定した。これまで血球細胞を対象とした CyTOF の解析は多く行われ報告されてきた。近年、肺でも癌の免疫細胞に対して CyTOF が用いられることがある［5］が肺実質を対象とした研究はない。その一つの原因として、肺では血液の混在が高度にみられるため、細胞解析において純粋な肺の解析が難しいことが挙げられる。現在、抗体の最適化と必要検体量の調整を行っている。

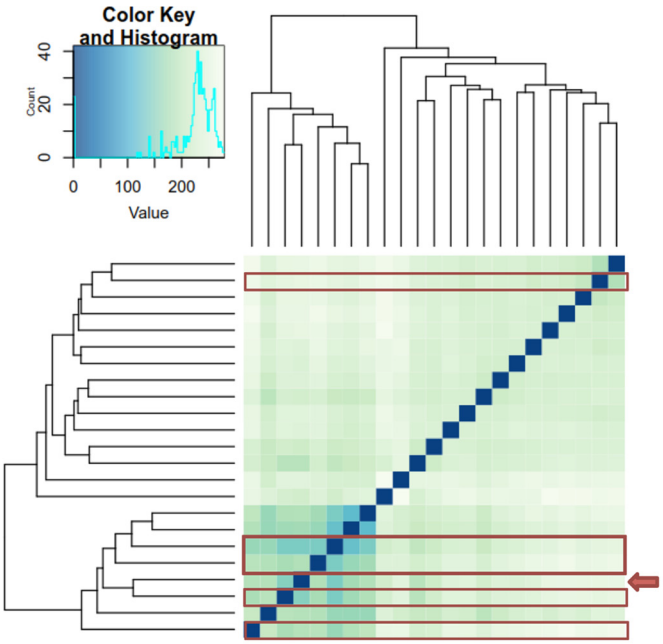


図 2. 肺細胞の RNA シーケンス

切除検体より得られた肺細胞・癌細胞の発現に基づきクラスタリングした。赤枠で囲まれた部分は癌のシーケンスであるが、健常肺から得られた上皮細胞分画の細胞（赤矢印）からも非常に近しいシーケンス結果が得られており、発がんへの形質変化の所見の可能性がある。

考　察

IPF 合併肺癌は比較的稀な疾患であり、単施設での症例集積には限界がある。本試験では多施設共同で症例集積を行うことで試験の実現可能性を上げている。毎月一定の症例が期待できるわけではなく、月により登録症例数にばらつきがみられるものの毎月着実に症例集積を進めることができている。かつ定期的なブーストアップミーティングを行うことでIPF 合併肺癌に関する知見の共有・試験状況の定期報告を行い、試験の完遂をめざした体制を整えてきた。

また、基礎的な解析に関して現時点では、登録症例の一部から肺検体を採取し基礎データの収集にあたっている。今後は正常肺・IPF肺の両方について症例数を増やし、まずRNAの解析を進める予定である。その後、得られた肺細胞をもとにCyTOFによる蛋白の解析をすすめIPF治療に結びつく新しいバイオマーカーを検索していく予定である。

また、本研究における肺の単離された細胞における基礎的な知見は、IPFのみならず他の慢性肺疾患に応用できる可能性が高い。IPFだけでなく、COPDを含めた慢性肺疾患全体への疾患スペクトルに対する新しい病因解析の可能性があり、今後の基礎研究ならびに臨床応用への発展性が期待される。

共同研究者・謝辞

本研究の共同研究者は、千葉大学大学院医学研究院呼吸器病態外科学の坂入祐一である。

文　献

1） Iwata T, Yoshino I, Yoshida S, et al. A phase II trial evaluating the efficacy and safety of perioperative pirfenidone for prevention of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis in lung cancer patients undergoing pulmonary resection: West Japan Oncology Group 6711 L (PEOPLE Study). Respir Res. 2016 Jul 22;17(1):90. doi: 10.1186/s12931-016-0398-4.

2） Pamela M, Michael A, Alexander S, Torsten R. QuantSeq 3' mRNA sequencing for RNA quantification. Nat Meth 2014 11;972

3） Ma F, Fuqua BK, Hasin Y, Yukhtman C, Vulpe CD, Lusis AJ, Pellegrini M. A comparison between whole transcript and 3' RNA sequencing methods using Kapa and Lexogen library preparation methods. BMC Genomics. 2019 Jan 7;20(1):9. doi: 10.1186/s12864-018-5393-3.

4） Bendall SC, Simonds EF, Qiu P, Amir EAD, Krutzik PO, Finck R, et al. Single-Cell Mass Cytometry of Differential Immune and Drug Responses Across a Human Hematopoietic Continuum. Science 2011;332:687–96. doi:10.1126/science.1198704.

5） Lavin Y, Kobayashi S, Leader A, et al. Innate Immune Landscape in Early Lung Adenocarcinoma by Paired Single-Cell Analyses. Cell. 2017 May 4;169(4):750-765.e17. doi: 10.1016/j.cell.2017.04.014.