

氏名・(本籍)	中 麻衣子 (秋田県)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1085 号
学位授与の日付	令和 5 年 3 月 23 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Rapid intraoperative Ki-67 immunocytochemistry for lung cancer using non-contact alternating current electric field mixing (肺癌における Ki-67 術中迅速免疫組織化学染色 (電界攪拌法)の可能性について)
論文審査委員	(主査) 後藤 明輝 教授 (副査) 中山 勝敏 教授 柴田 浩行 教授

学位論文内容要旨

論文題目

Rapid intraoperative Ki-67 immunocytochemistry for lung cancer using non-contact alternating current electric field mixing

(論文題目の和訳)

肺癌における Ki-67 術中迅速免疫組織化学染色（電界攪拌法）の可能性について

申請者氏名 中 麻衣子

研究目的

肺癌は heterogeneity な腫瘍の生物学的特性から再発リスクや治療効果を予測する有用なバイオマーカーが少ないとされている。

また、日本呼吸器外科学会の先導で行われた JCOG0802 試験は、2cm 以下の肺野末梢小型非小細胞肺癌に対する区域切除の有用性について検証された、世界初のランダム化第 III 相試験である。この試験において、標準手術・肺葉切除と比較し区域切除術の優れた生存率が証明されたが、高い局所再発率が危惧された。この臨床試験結果の意味するところは、縮小手術の適応となる早期癌でも局所再発を来たす高悪性度腫瘍の可能性があり、つまり画像上のみでは予測できない悪性度が高いがん生物学的特性を術中に診断できれば局所再発を軽減できるのでは、と仮説を立てた。

我々はいくつか他の癌腫でも有用性が報告されている Ki-67 に着目した。Ki-67 は 10 番染色体長腕に存在する遺伝子により発現する蛋白質であり、これは細胞周期に関連する分子の 1 つで、休止期 (G0) を除くすべての細胞核に発現するため、細胞増殖マーカーとして利用されている。

Ki-67 による術中迅速免疫組織化学染色（以下免疫染色）を行うことで、肺癌根治術の術式選択や、再発予防の術後補助化学療法 of 適応決定の一助となる可能性につき検討することを目的とした。

研究方法

第 1 の研究では、当科早期肺癌根治術・術後再発症例において、その腫瘍免疫染色 Ki-67 高値に他の生物学的特性（再発、生存率など）とどのような関連があるのかについて後方視的に解析を行った。2012 年 1 月から 2020 年 12 月の pStage IA 期の当科手術症例 374 例から再発群と無再発群に分けたのちに、年齢、性別、pStage でマッチングを行い、切除標本・免疫染色で各群の Ki-67 陽性率を測定した。

縮小手術が根治手術たるためには、「術中」に凍結切片で腫瘍悪性度を探索する必要がある。我々が開発した医工連携技術・電界攪拌法は、パルス状電界を印加することによって液滴に吸引力が作用、上下方向に振動し、攪拌反応が進展する世界初の革新的な技術である。この技術を利用することで免疫染色工程を最短 13 分まで短縮した。第 2 の研究では先述の技術を利用して迅速免疫染色 (R-IHC 法) を使用し、術中に Ki-67 免疫染色が評価可能かを検討した。2021 年 4 月から 2022 年 1 月の当科肺癌手術症例のうち 40 例を抽出し、凍結切片およびホルマリン固定パラフィン包埋切片 (formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE) の両群において、それぞれ免疫染色従来法と R-IHC 法での腫瘍 Ki-67 陽性率を測定し、その一致率を検討した。

研究成績

第 1 の研究では、病理病期 pStage IA 期肺癌において、腫瘍 FFPE Ki-67 高値群では高い再発リスク、生存率悪化が示された。

第 2 の研究からは、腫瘍凍結切片において免疫染色従来法と R-IHC 法では Ki-67 陽性率の相関がみられ、さらに FFPE/最終病理とも良い相関が認められた。受信者動作特性曲線から術中 R-IHC・7.5% のカットオフ値が算出され、凍結切片での検討で Ki-67 陽性率 7.5% を用いることで、独立して pStage IA3 以上（縮小手術が根治手術となりうる 2cm 以下の小型肺癌との境界）を予測し得た（多変量ロジスティック回帰分析・オッズ比：20.477）。

結論

電界攪拌を応用した R-IHC 法は、迅速かつ正確に、腫瘍増殖能 Ki-67 陽性率を用いて、肺癌病理病期 pStage >IA3 を予測可能とし、高い局所再発を術中予測できる可能性が示唆された。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 後藤 明輝
申請者： 中 麻衣子

論文題名： **Rapid intraoperative Ki-67 immunocytochemistry for lung cancer using non-contact alternating current electric field mixing**

肺癌における Ki-67 術中迅速免疫化学組織染色の可能性について

要旨

肺癌は **heterogeneity** な腫瘍の生物学的特性から再発リスクや治療効果を予測する有用なバイオマーカーが少ないとされている。その中で筆者らは他のいくつかの癌腫で使用されている **Ki-67** に着目し、肺癌の術後再発群では実際に **Ki-67** 陽性率は高値であったのか、さらに前向き研究として凍結切片における **Ki-67** の術中迅速免疫組織化学染色を行い最終病理結果と比較し、それぞれ検討を行った。

また本研究の背景として、**JCOG0802** 試験では肺野末梢小型非小細胞肺癌に対する肺葉切除と縮小手術につき、縮小手術の有用性が証明されたが、縮小手術における局所再発率が標準手術より高いことも同時に明らかとなった。早期肺癌の中でも画像上は予測できない局所再発リスクの高い症例が存在していることを示唆している。本研究の結果、**Rapid-IHC** 法を用いることで **Ki-67** 陽性率を術中に測定することが可能となり、その数値が **7.5%**以上であるとステージ I 期の肺癌であっても転移再発をきたす高悪性度の腫瘍の可能性があると考えられ、早期肺癌の中でも **Rapid-IHC** 法により高悪性度の腫瘍を術中に診断できれば局所再発を軽減できると結論付けた。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

筆者らの教室では、秋田県産業技術センターとの共同研究で開発した電界非接触攪拌技術を用いることで、免疫組織化学染色における抗原抗体反応の促進に成功し、これまでに乳癌の **HER2 DISH** の時間短縮や肺癌 **ALK FISH** の時間短縮への応用にも成功している。本研究の斬新性は、この電界非接触攪拌技術を **Ki-67** の測定に使用することで術中の免疫組織化学染色を可能とし、かつ **FFPE (Formalin-Fixed and Paraffin-Embedded)** 標本における従来法と凍結切片における **Rapid-IHC** 法とが同等の染色結果であることを証明し代用可能と証明できた点にある。また **FFPE** における **Rapid-IHC** 法から算出した **Ki-67** 陽性率 **7.5%**を凍結切片での研究

に当てはめることで早期肺癌における悪性度の指標となる可能性を示した点も斬新である。

2) 重要性

凍結切片での **Ki-67** 陽性率が **7.5%**以上の症例は有意差をもって最終病理診断でのステージが **pStage1A3** 以上、**T** 因子でも **cT1c** 以上となることが証明された。これは **JCOG0802** 試験における縮小手術の適応となる腫瘍径 $\leq 2\text{cm}$ と同様の境界であっただけでなく、**N** 因子や脈管浸潤、臓側胸膜浸潤とも関連しており、凍結切片における **Ki-67** 陽性率 **7.5%**は再発高リスクと考えられる様々な因子と関連している可能性が示された。さらに多変量解析結果では **Ki-67** 陽性率 **7.5%**以上という項目のみが独立して **pStage1A3** 期以上の病期に寄与していた(odds 比:**20.477**)。

本研究で用いた **Rapid-IHC** 法における術中迅速診断は他では類が無く、術中で悪性度を判定することはこれまで困難であったが、筆者らの研究をもとに更なる研究が進んでいけば、縮小手術の適応がより正確になり局所再発を軽減することが可能となり得る。

3) 研究方法の正確性

Ki-67 染色に関しては今後、前向き研究になる可能性も考えて、試薬・プロトコール、評価法ともに秋田大学病理部で使用しているものが用いられている。

結果に関しては、いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

現在の早期肺癌局所再発に対する問題点を背景に研究目的を掲げ、上記内容の研究が行われた。本研究で用いた **Rapid-IHC** 法における **Ki-67** 術中迅速診断の有用性が 2 つの研究を通して明瞭に述べられており、論文中での表現も明瞭である。

以上より、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。