

『肺癌の細胞診； 肺癌治療の最先端とそのための診断』

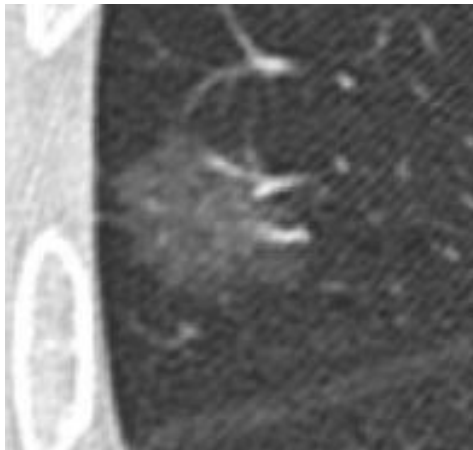
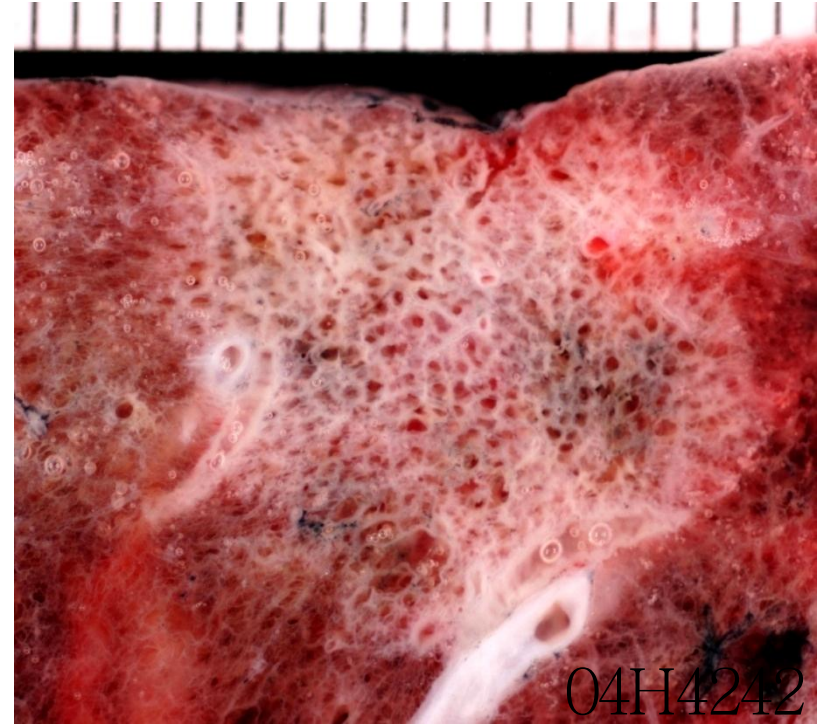
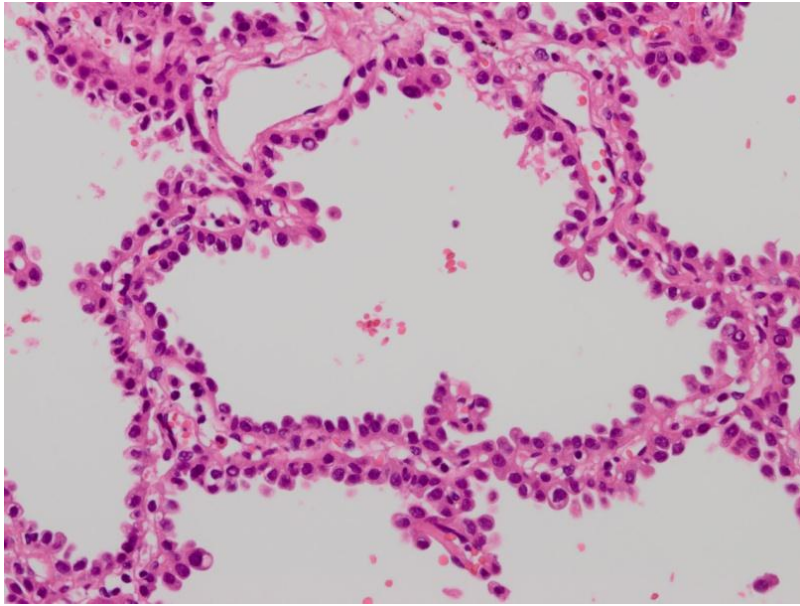
2013.3.3 日本臨床細胞学会北海道支部総会

奈良県立医科大学病理診断学講座
大林千穂



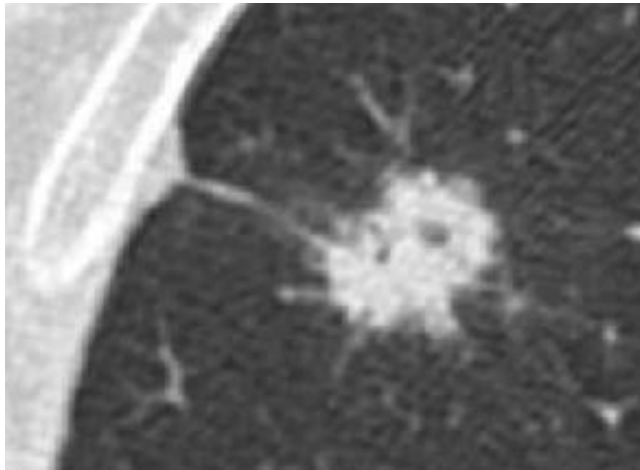
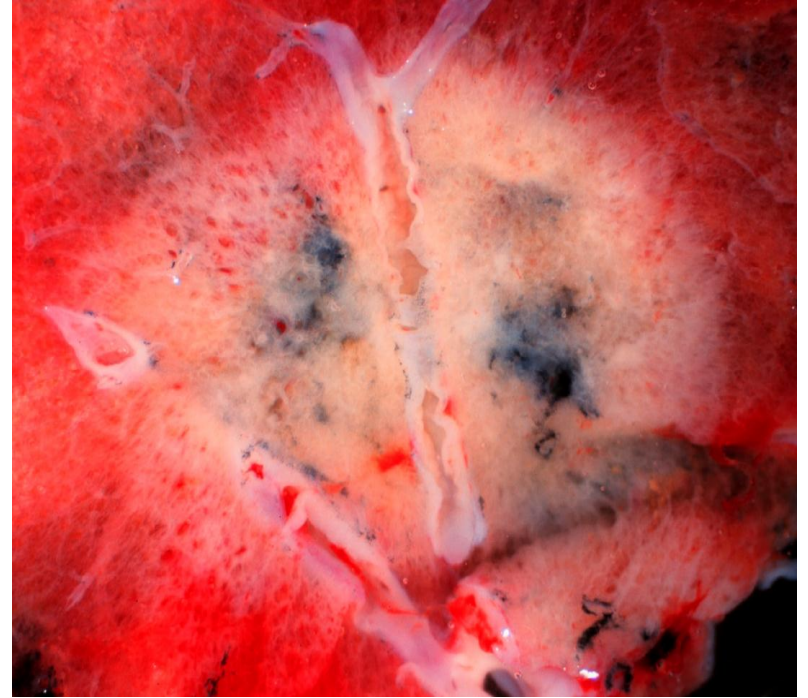
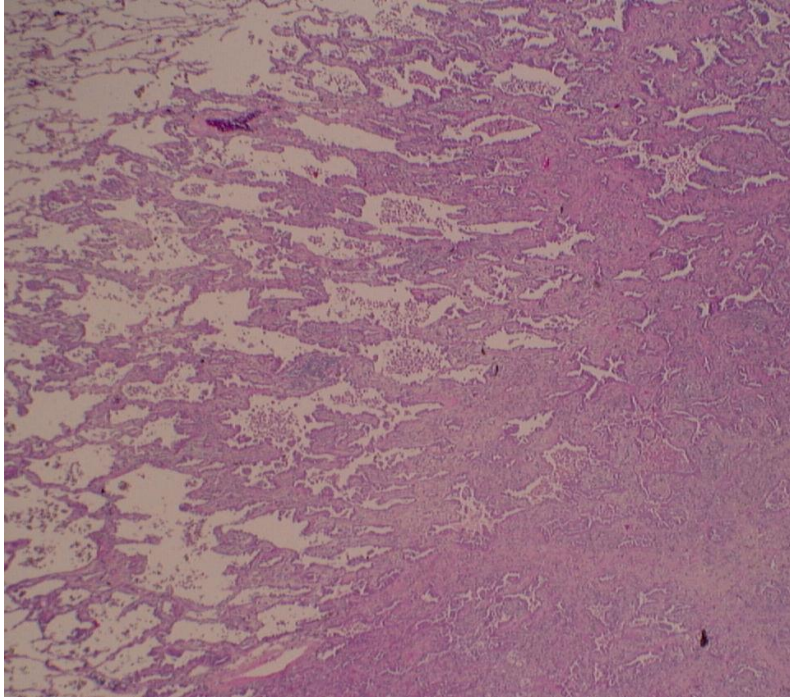
1. 画像＝肉眼的形態＝腫瘍増殖パターン
2. 扁平上皮癌と腺癌の鑑別
3. ALK肺癌

上皮内腺癌 AIS



- = 細気管支肺胞上皮癌 (BAC)、野口A型、B型
- 置換型増殖; 比較的異型の弱い細胞が肺胞壁に沿って1層に増殖する
- 鑑別; AAH、浸潤癌、反応性異型上皮
- 画像上 **すりガラス状陰影 (GGO)**
- 粘液性は充実してみえる。極めて稀 (粘液型BACとされた像は浸潤性粘液腺癌として特殊型浸潤癌に分類)

浸潤性腺癌

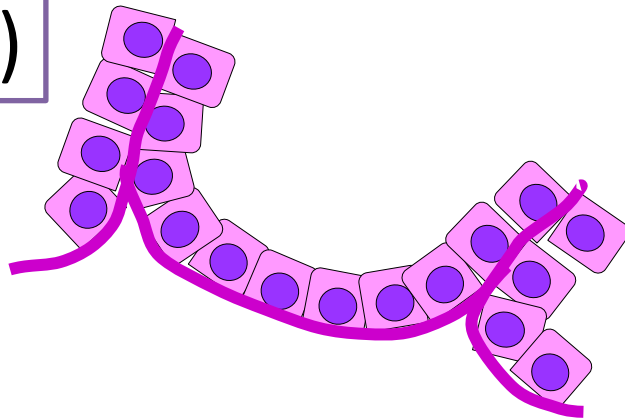


- 肺胞構造の破壊、気腔の消失
- 中心部に線維性瘢痕を形成
- 胸膜陥凹
- 辺縁には種々の程度置換性増殖 (AIS)がみられる
- 画像上、中心が充実性

画像からみた鑑別診断

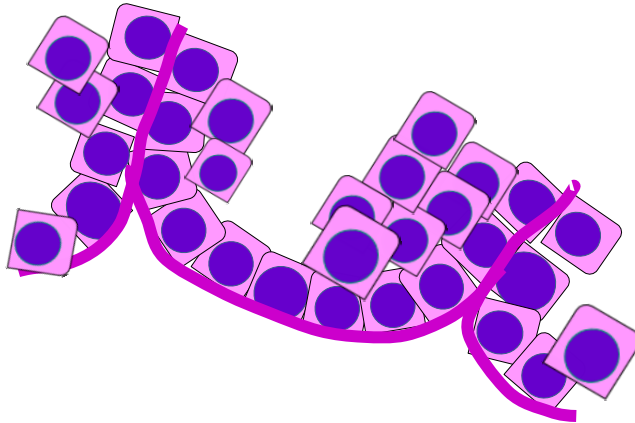
画像所見	鑑別すべき疾患	術式	予後
<p data-bbox="19 311 479 378">すりガラス陰影</p> 	<p data-bbox="525 311 853 682">AAH AIS (BAC) 血管腫 リンパ管腫 間質性炎症</p>	<p data-bbox="1166 311 1561 532">経過観察 悪性でも縮小 手術が可能</p>	<p data-bbox="1607 311 1870 378">予後良好</p>
<p data-bbox="19 875 216 939">充実影</p> 	<p data-bbox="525 875 1116 1396">置換型以外の腺癌 腺癌以外の組織型 転移性腫瘍 結核腫、 クリプトコッカス腫 過誤腫 硬化性血管腫</p>	<p data-bbox="1166 875 1561 1168">確定診断が必要 悪性なら葉切除</p>	<p data-bbox="1607 875 1870 1018">良性から 悪性まで</p>

AIS (BAC)

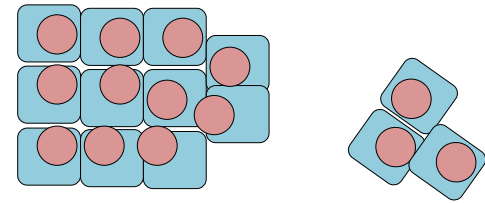
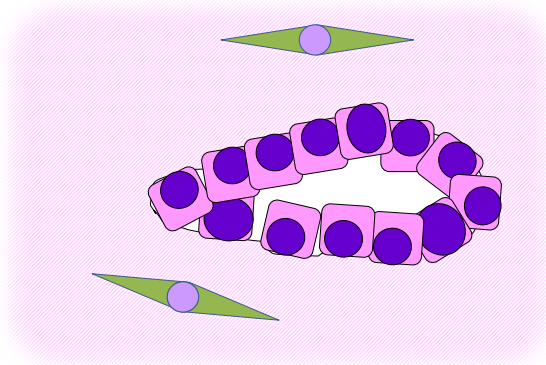


浸潤癌

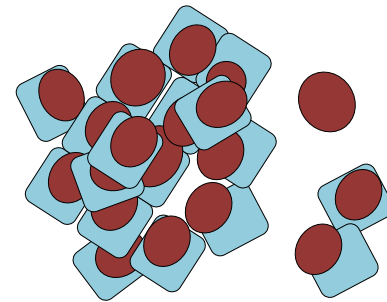
乳頭型



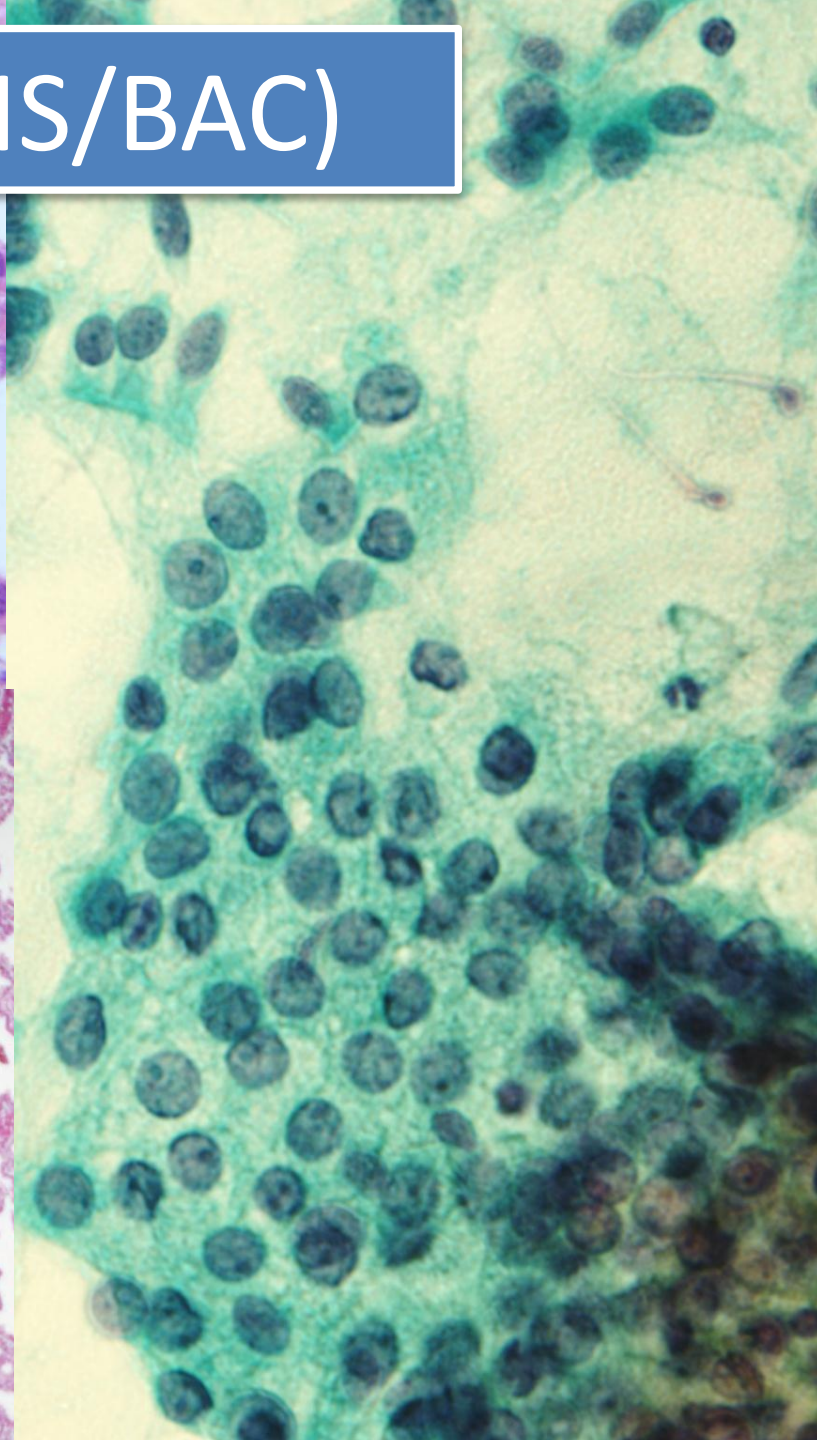
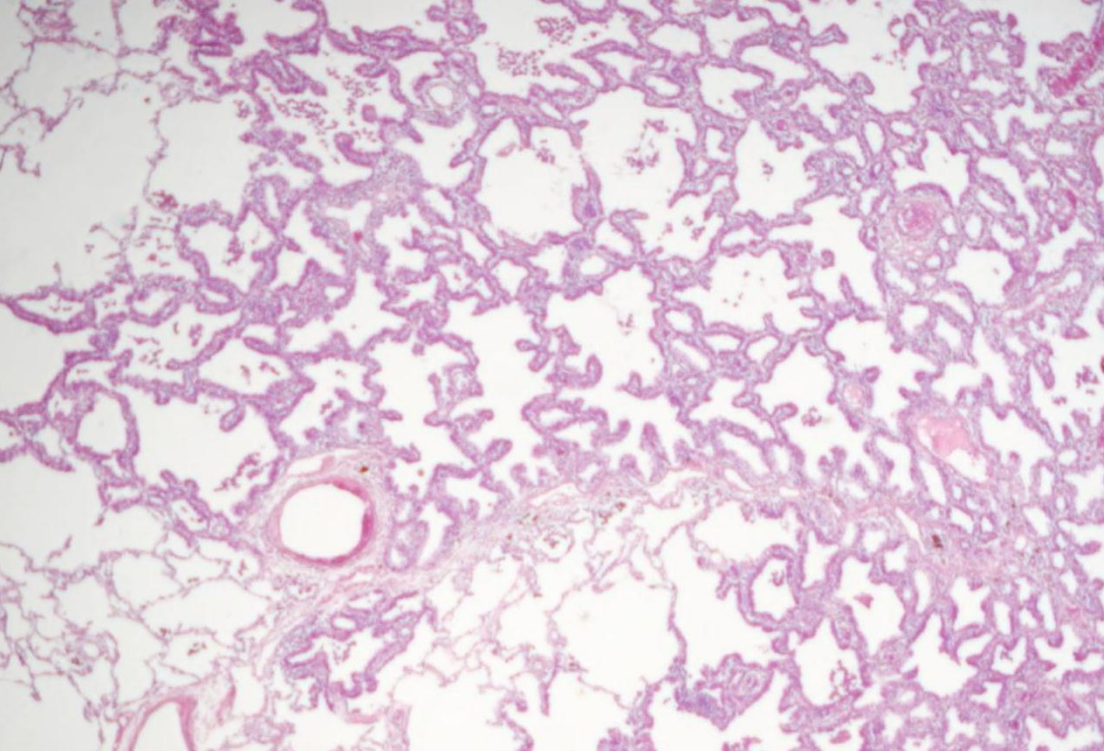
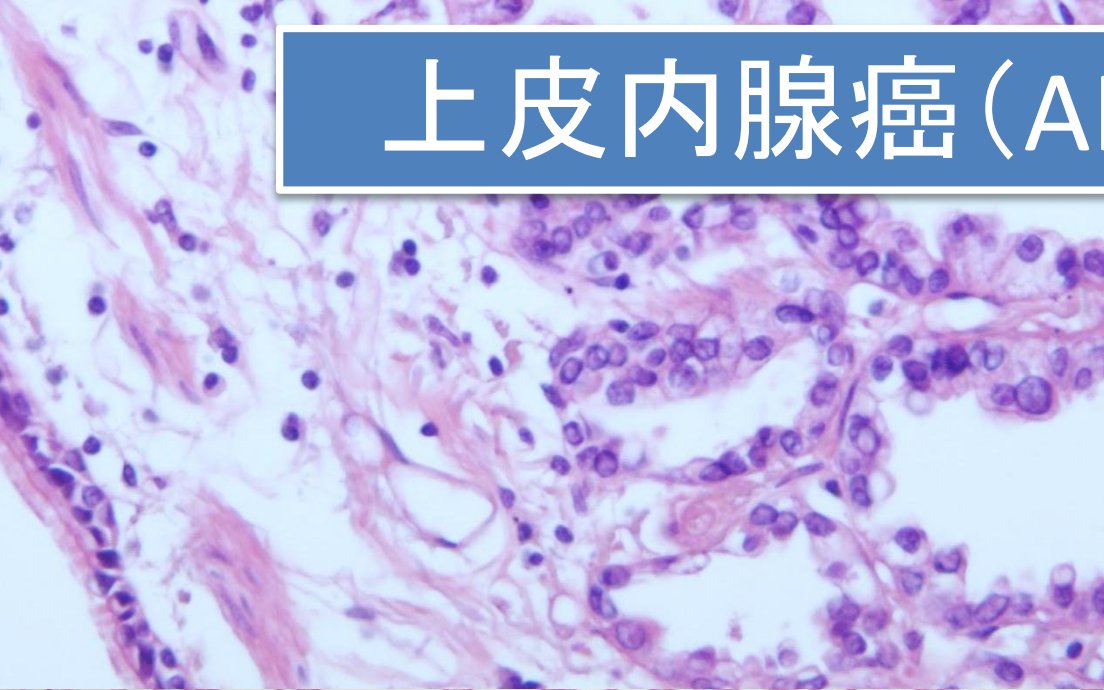
管状型



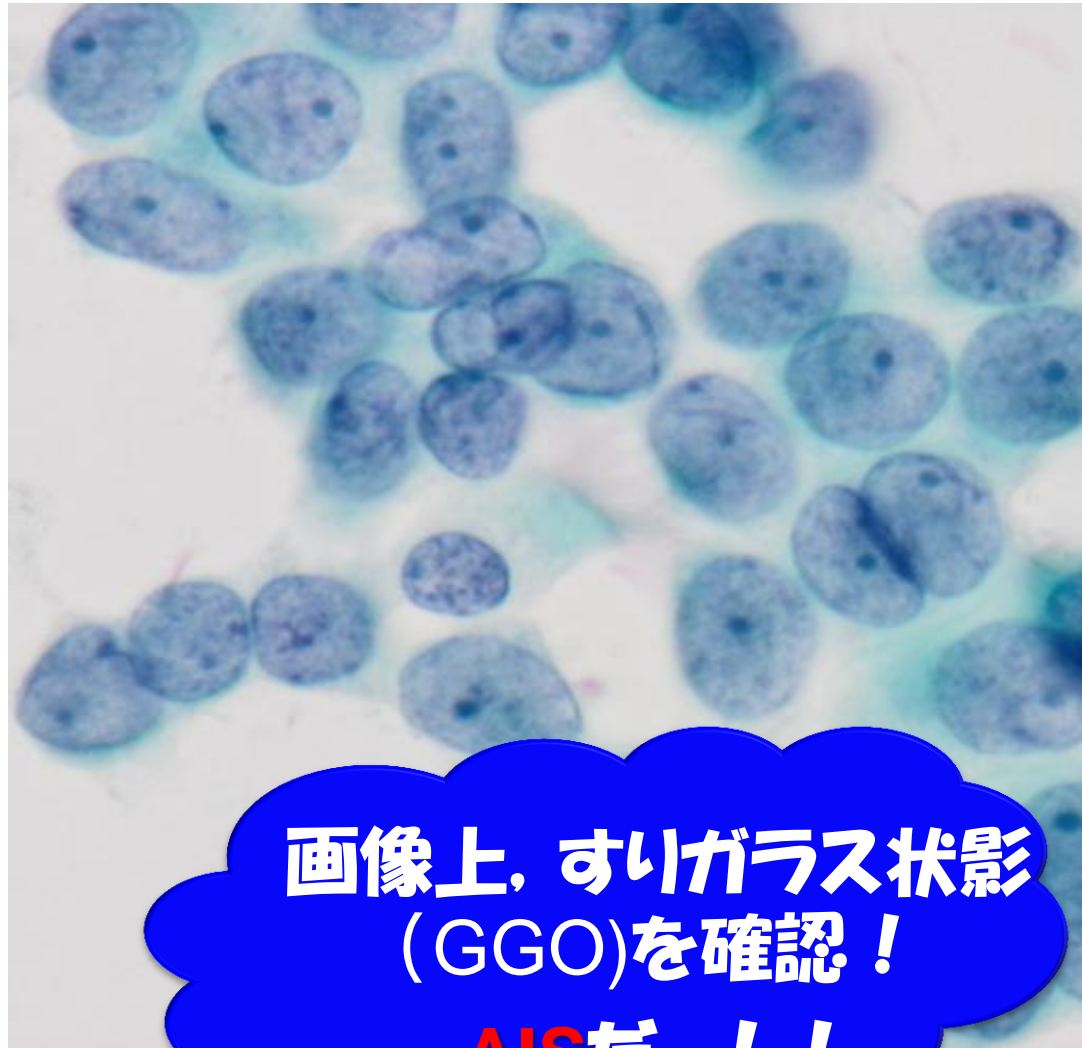
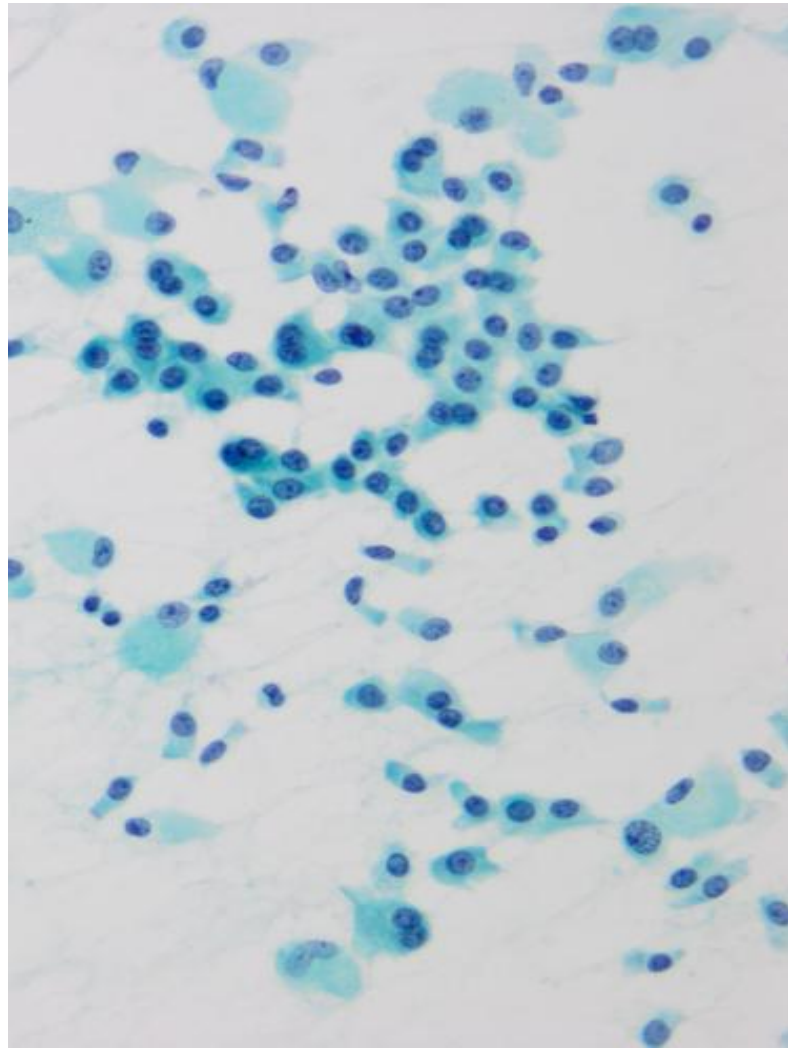
薄い肺胞壁を1層に置換する
= 嚢胞性病変



上皮内腺癌 (AIS/BAC)



異型が弱く、悪性とするかどうかまよったら画像をみる



画像上、すいガラス状影
(GGO)を確認！

AISだっ！！

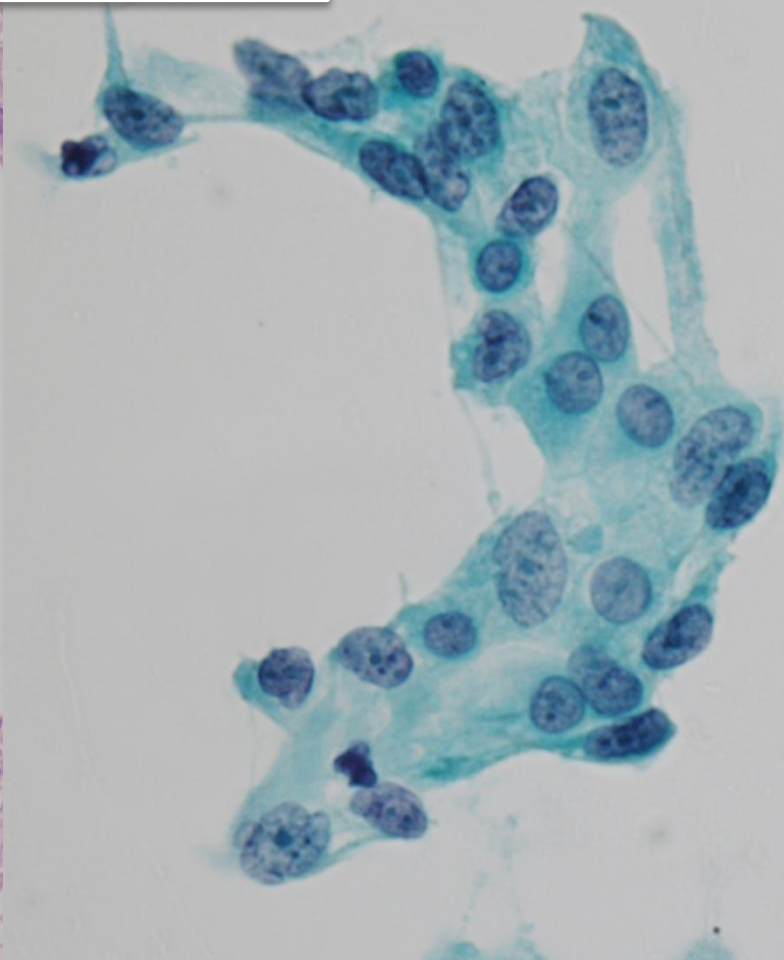
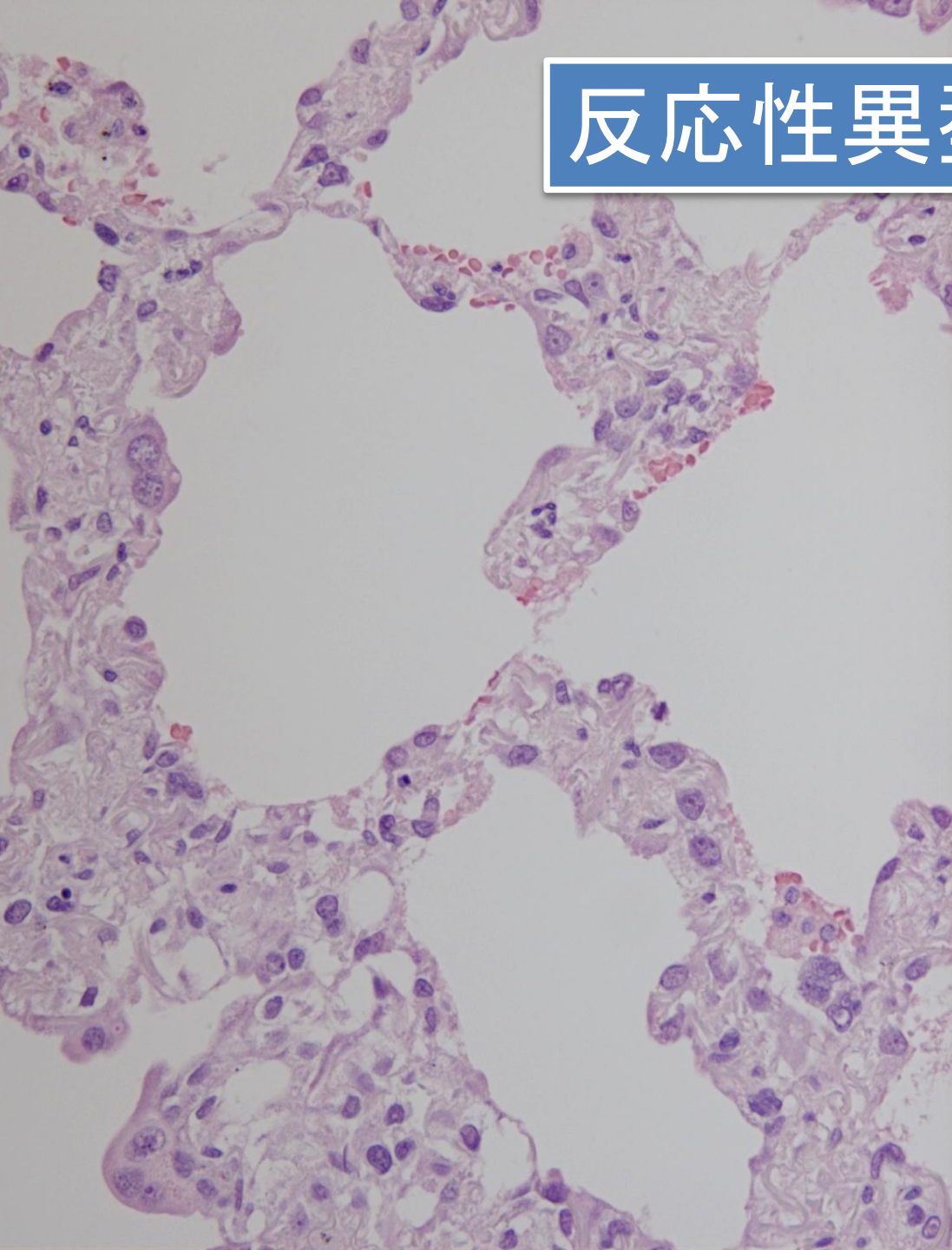
AIS細胞診のポイントは・・・



- 核形不整
- 単調な細胞
- シート

画像で限局したGGOを確認

反応性異型細胞



- 核の立体不整(－)
- 単調な細胞(－)
- シート(＋)

反応性異型細胞

- 核の立体不整(—)
- 単調な細胞(+)
- シート(+)

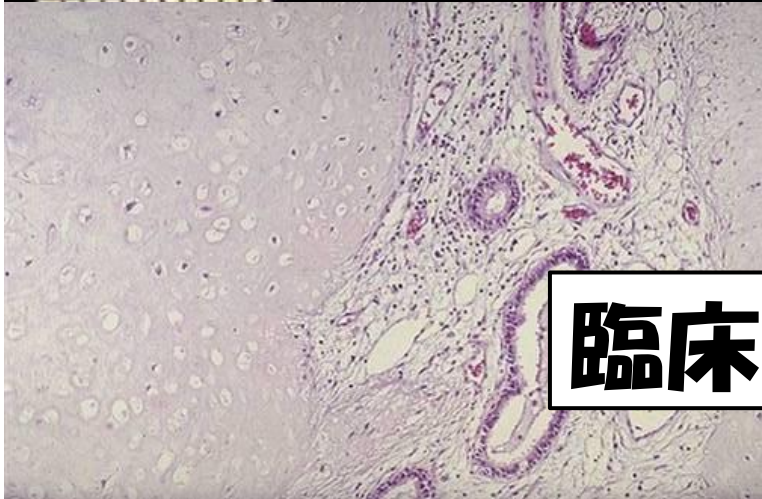
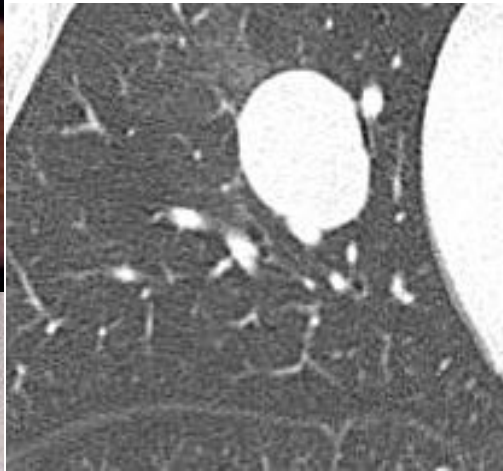
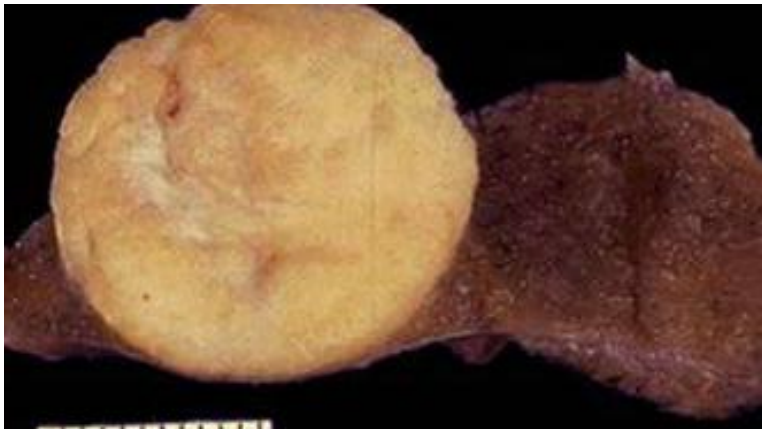


硬化性血管腫

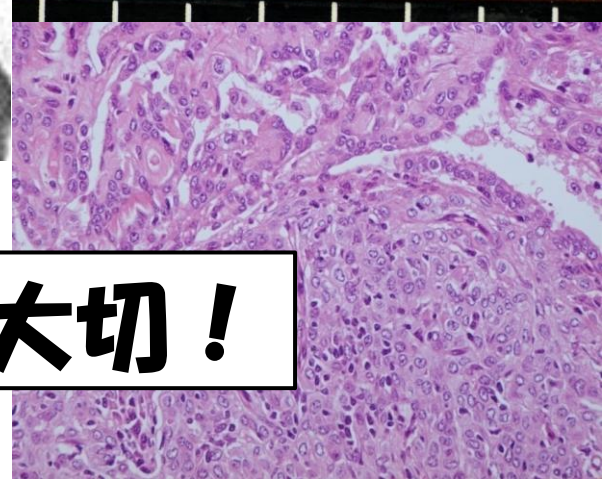


充實優位腺癌

過誤腫
hamartoma



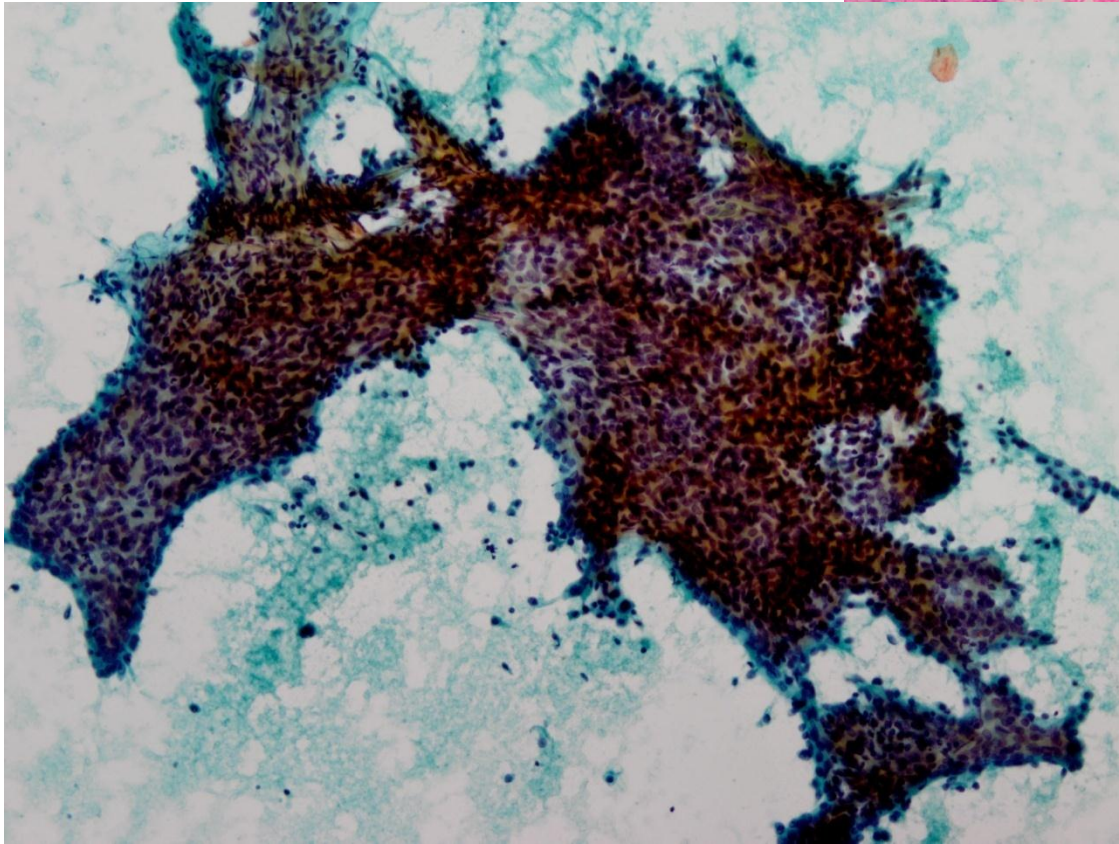
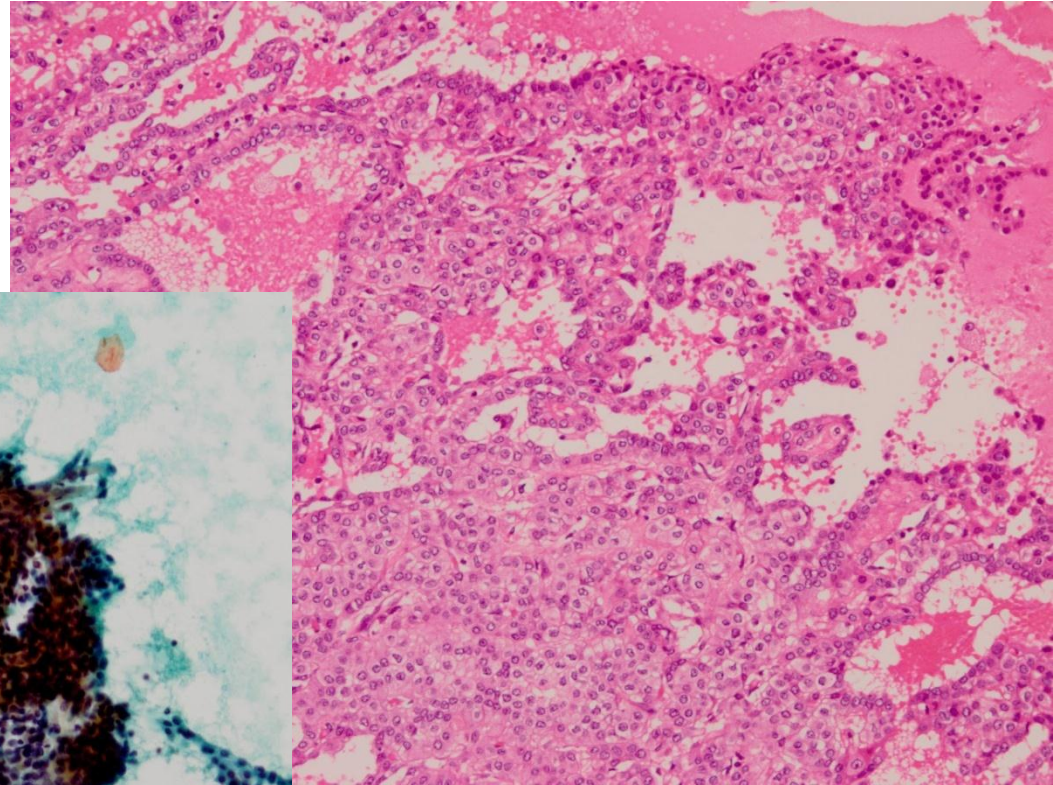
硬化性血管腫
sclerosing
hemangioma

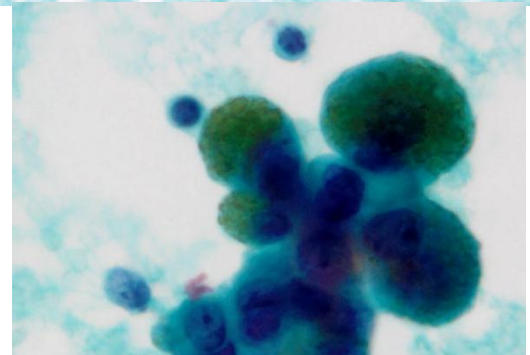
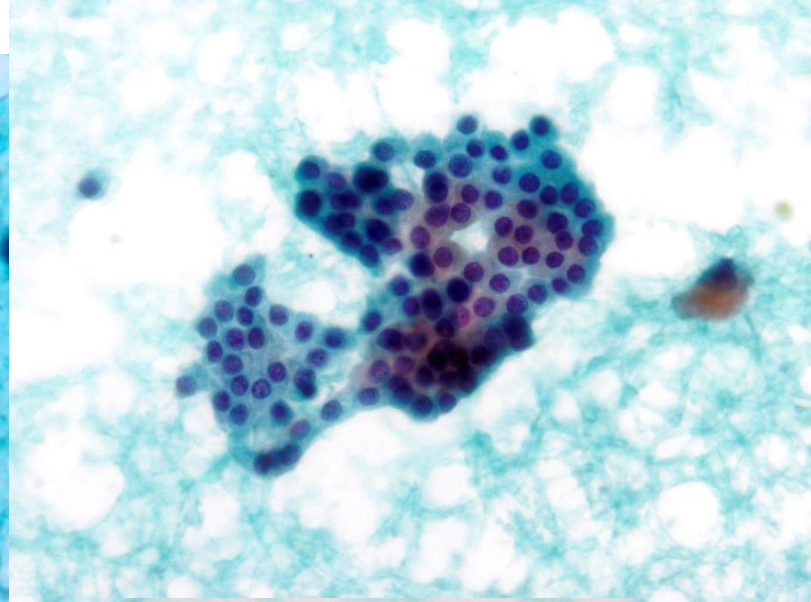
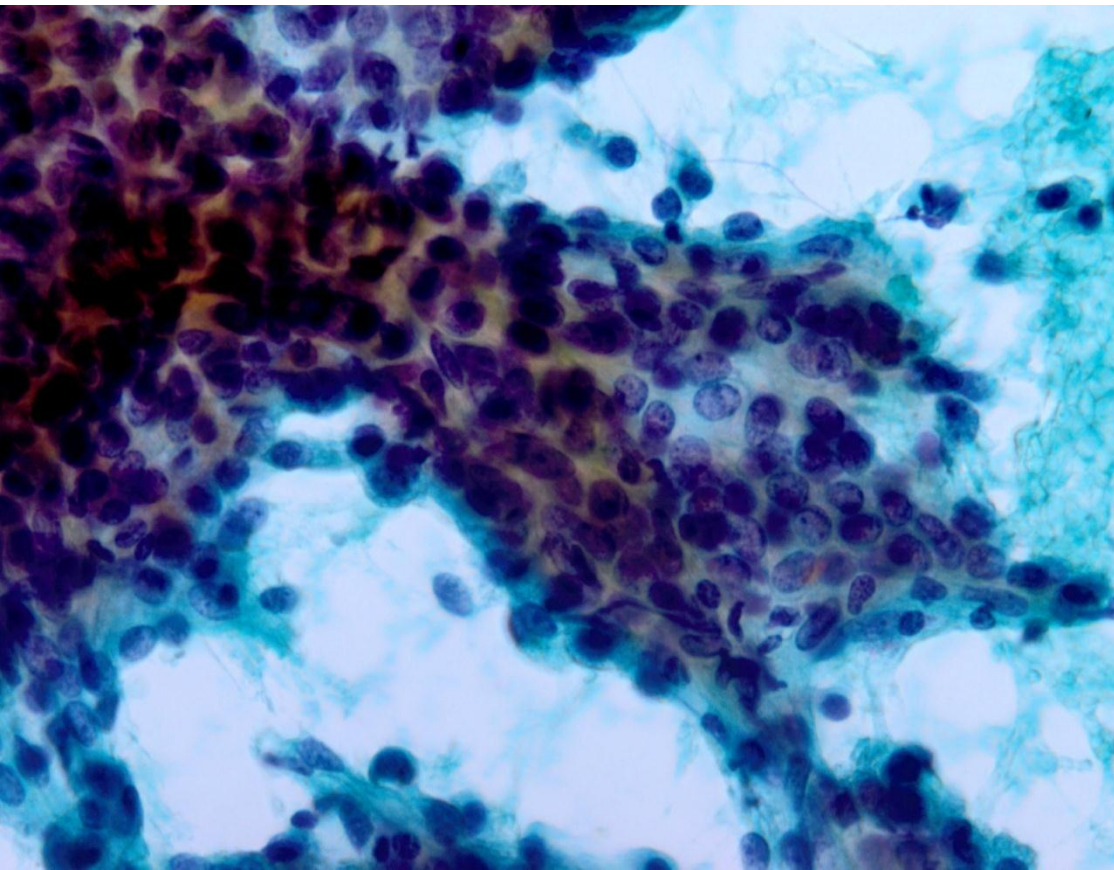


臨床医の意見が大切！

硬化性血管腫

(Sclerosing hemangioma=Pneumocytoma)

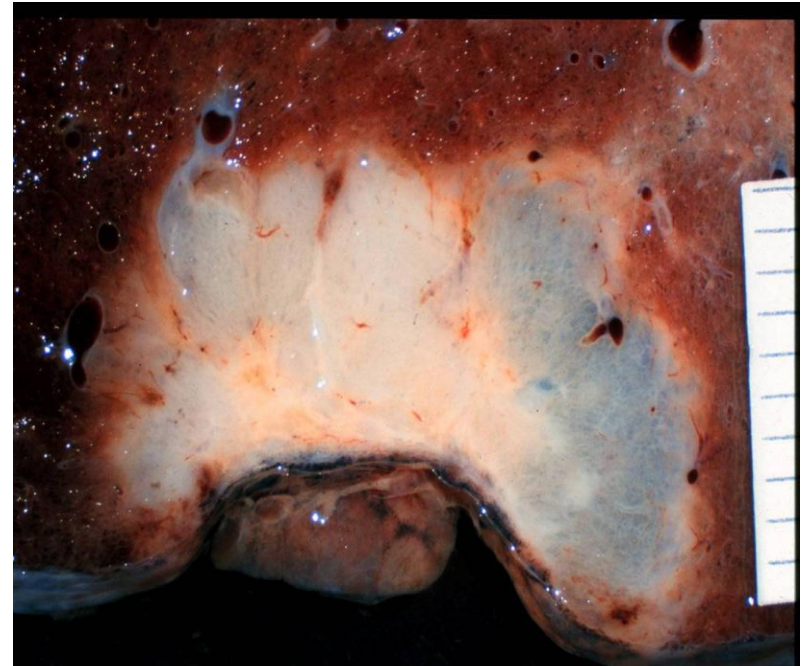
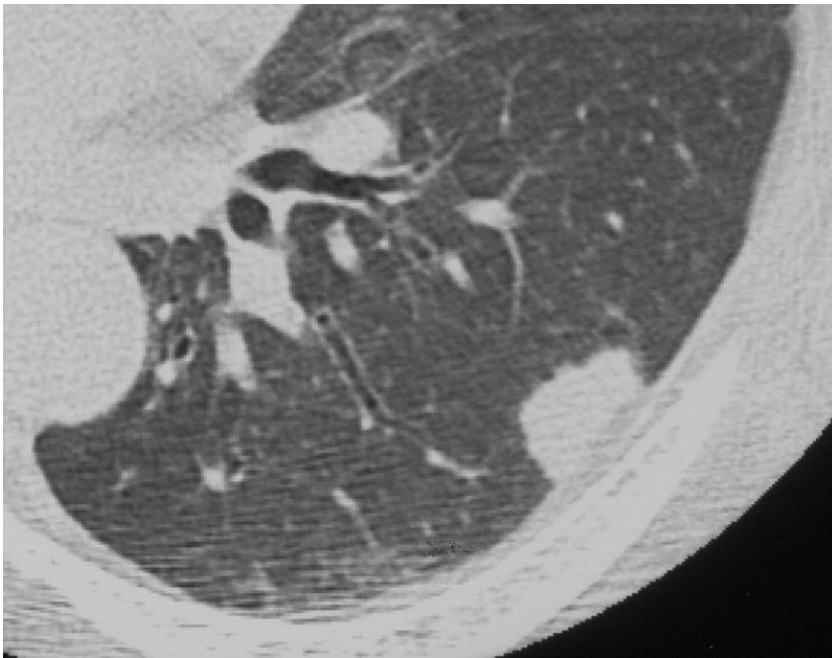
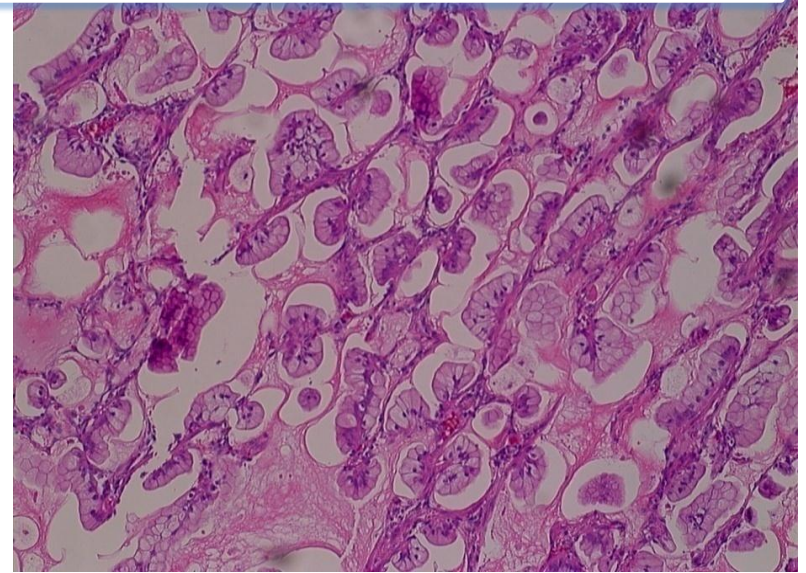
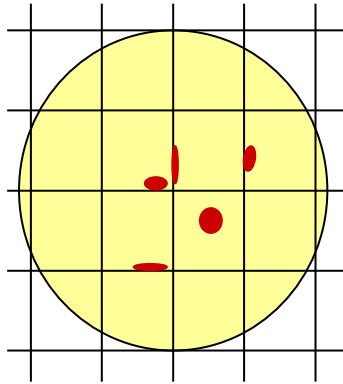




- 結合性のよい乳頭状，重積性あるいは扁平性，**多彩な出現様式**
- 一見すると腺癌だが「**構造のわり**」
- 異型の弱い核，ライトグリーンの小胞
- **ヘモジデリンを貪食したマクロファージ**

画像上，末梢の境界の明瞭な球状の腫瘍を確認！
肺胞細胞腫だっ！！

粘液性腺癌 mucinous adenocarcinoma



肺癌の新しい治療

肺癌の半数以上は生検・細胞診が最終診断です

治療戦略を考えた診断が重要です
小細胞癌 vs. 非小細胞癌

新しい治療薬(ペムトレキセド・ベバシズマブ)が導入されました
扁平上皮癌 vs. 非扁平上皮癌

ベバシズマブ(アバステン)

血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) に対する
モノクローナル抗体

- 再発・進行非小細胞肺癌の分子標的治療薬

ペメトレキセド(アリムタ)

抗がん剤として葉酸代謝阻害剤の一種

- シスプラチンとの併用で、悪性胸膜中皮腫と進行非小細胞肺癌の治療に使われる

Phase II

Bevacizumab/Car/Pac

vs. Car/Pac

J Clin Oncol. 2004

- 組織診
- 6/99症例で重篤な肺出血,
4例は死亡
- 6例すべて中枢で, 大血管
管に近接する
- 5例は空洞や壊死を伴う
- 4例は扁平上皮癌

Phase III

Cis/Pemetrexed

vs. Cis/Gem

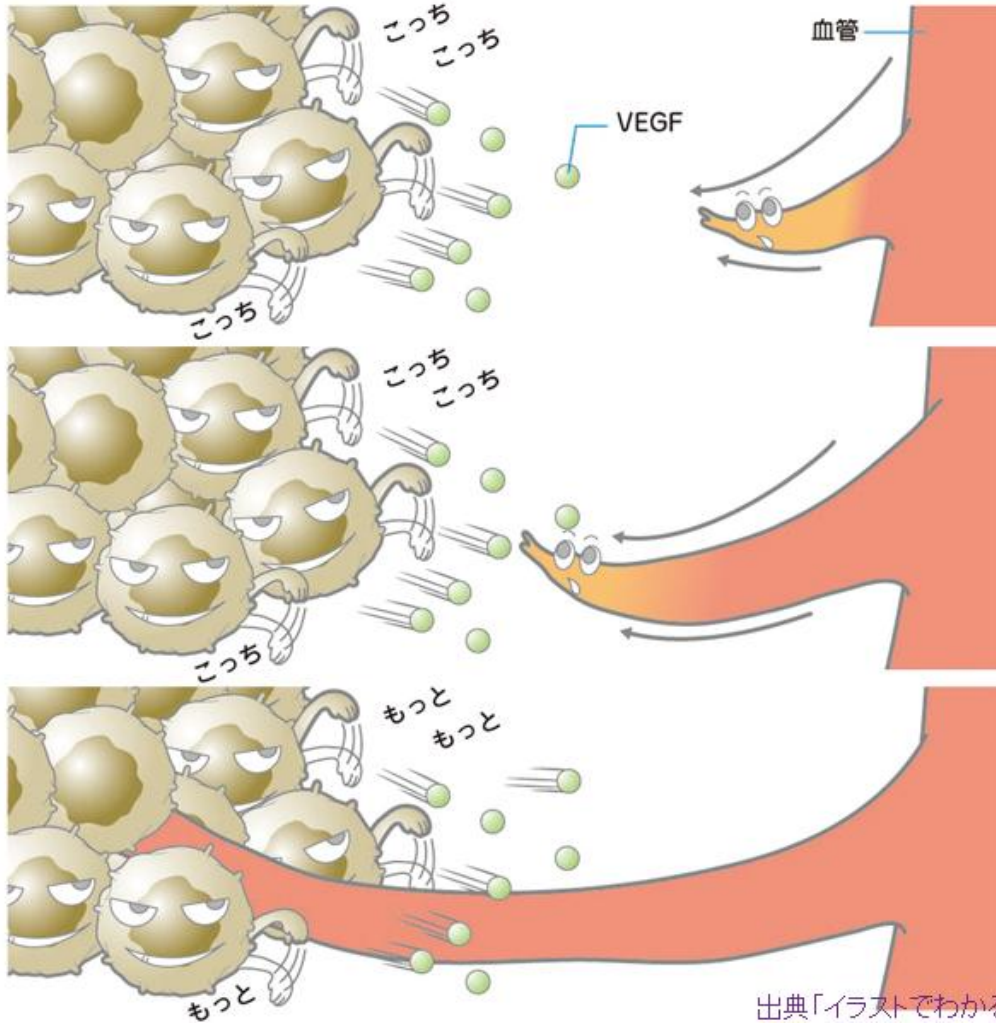
J Clin Oncol. 2008

- 細胞診または組織診
- 腺癌および大細胞癌
ではcis+pem群が優
位に生存期間延長

扁平上皮癌とそれ以外を区別する必要がある!?

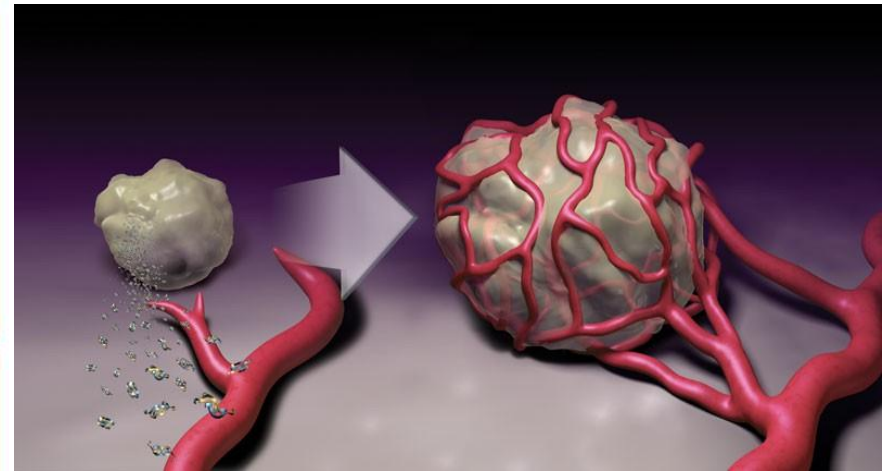
血管を伸ばす「指令」 VEGF

血管内皮細胞増殖因子



2mmまでの腫瘍は血管がなくてもOK
ただし、冬眠状態

腫瘍が大きくなったり
転移能を持つには
血管新生が必要



VEGFは主要な血管新生因子

出典「イラストでわかる

腫瘍血管増生を抑制する分子標的治療薬

ベバシズマブ
大腸癌
非小細胞肺癌
乳癌
脳腫瘍
腎細胞癌
卵巣癌

抗VEGF抗体
ベバシズマブ

VEGF受容体
チロシンキナー
ゼ阻害剤
ソラフェニブ
スニチニブ

ソラフェニブ
腎癌
肝細胞癌
スニチニブ
GIST
腎癌

VEGF

VEGF

情報が伝わる

VEGF受容体

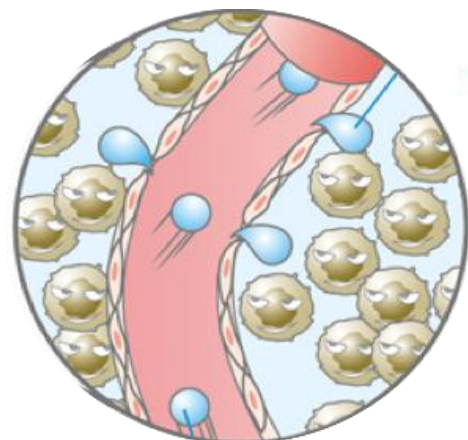
血管が成長する

血管
内皮細胞

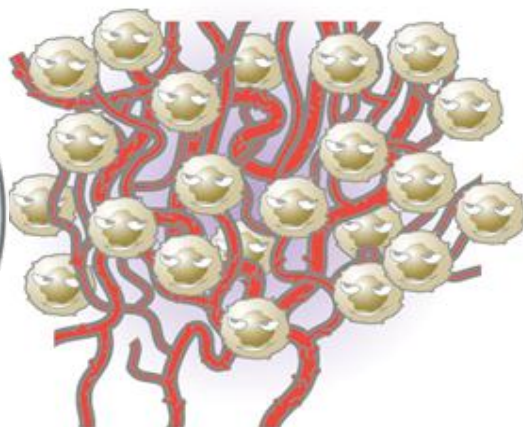
成長しない

成長しない

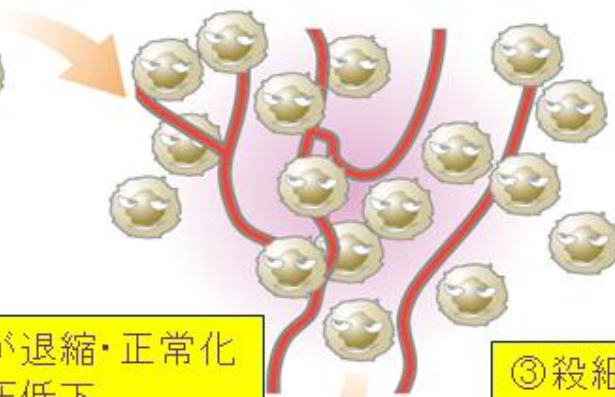
血管新生阻害薬による腫瘍退縮



腫瘍血管は細くてもろく、
血漿タンパクが周囲に
漏れて組織内圧が高い

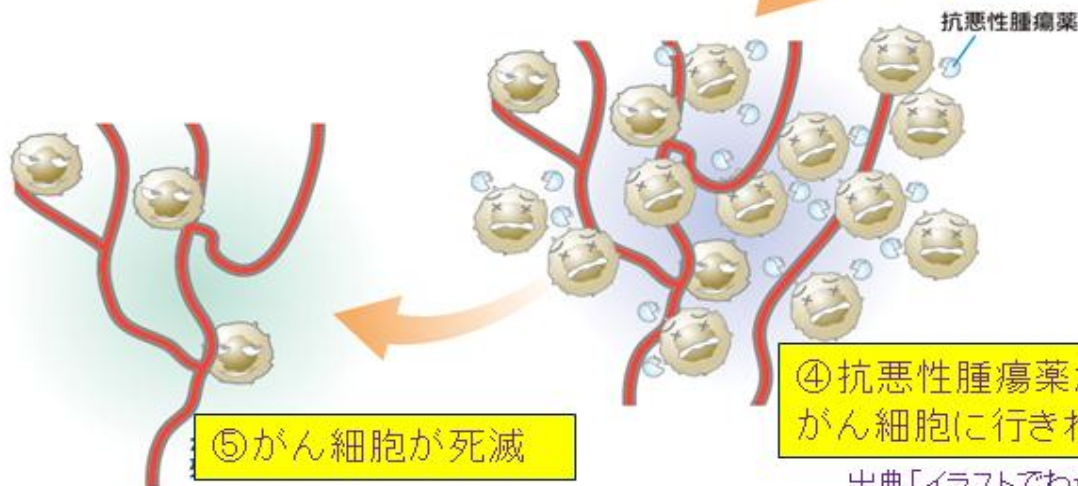


①血管新生を抑える
分子標的治療薬を投与



②血管が退縮・正常化
組織間圧低下

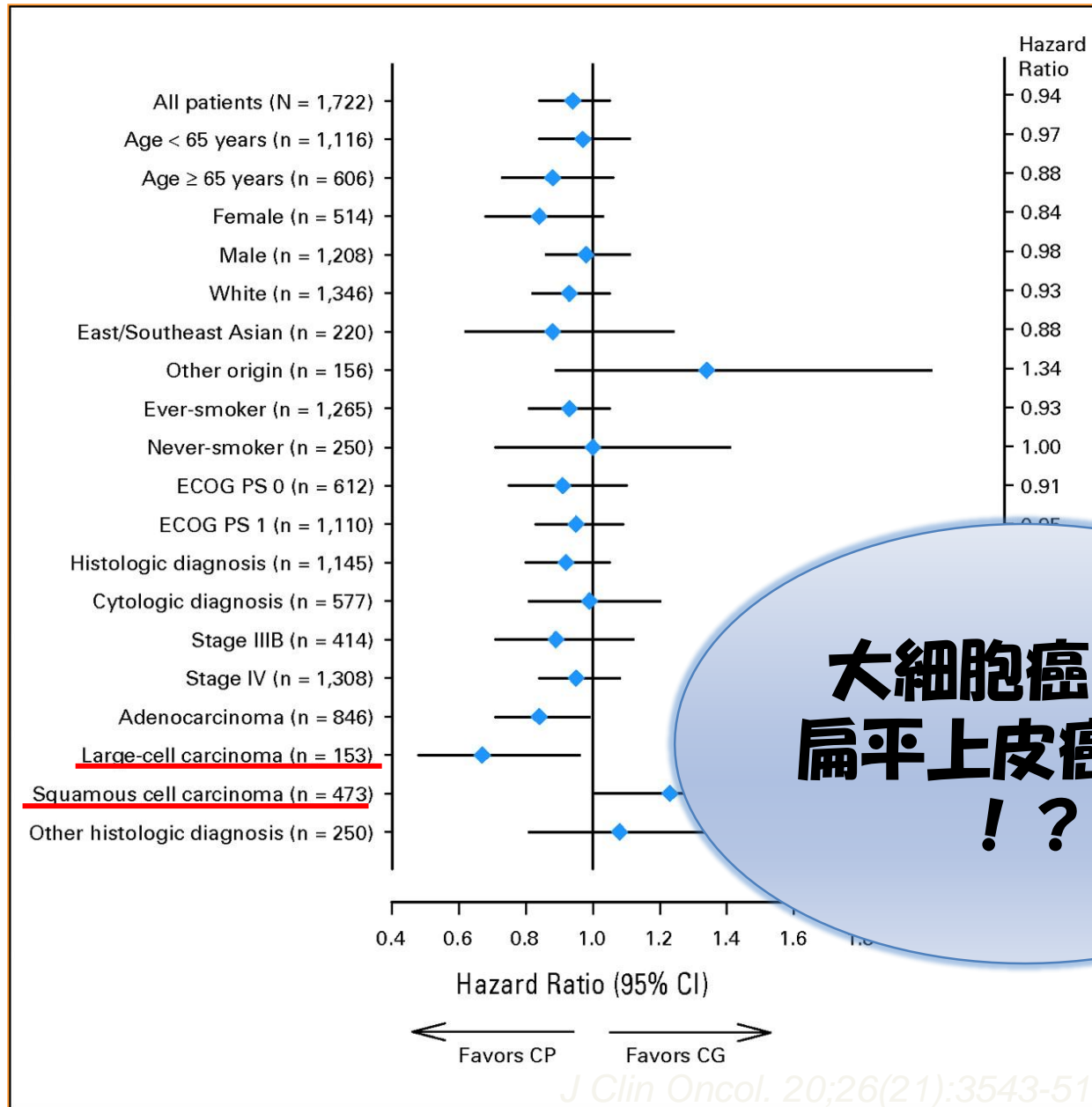
③殺細胞性の抗
悪性腫瘍薬を投与



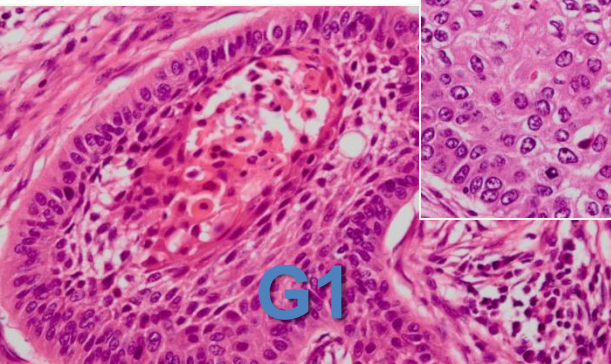
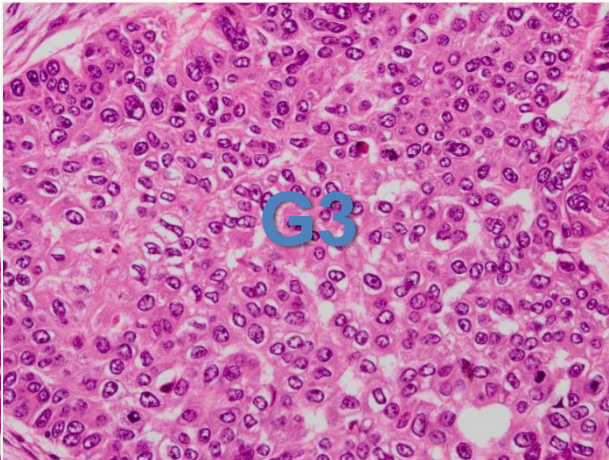
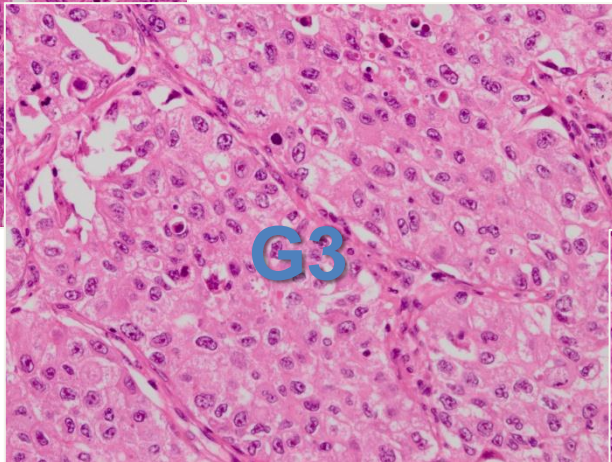
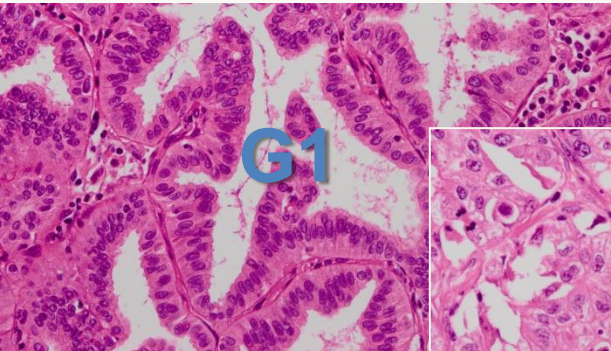
⑤がん細胞が死滅

④抗悪性腫瘍薬が
がん細胞に行きわたる

Survival hazard ratios



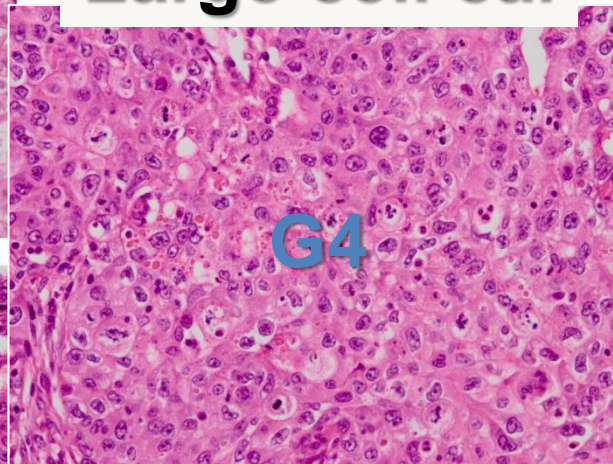
Adenocarcinoma.



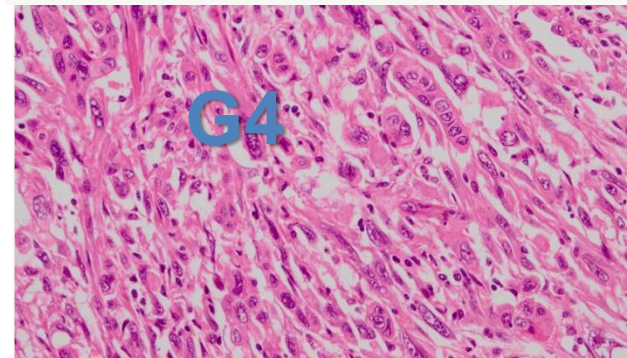
Squamous cell ca.

Non-small cell lung cancer

Large cell ca.



Sarcomatoid ca.



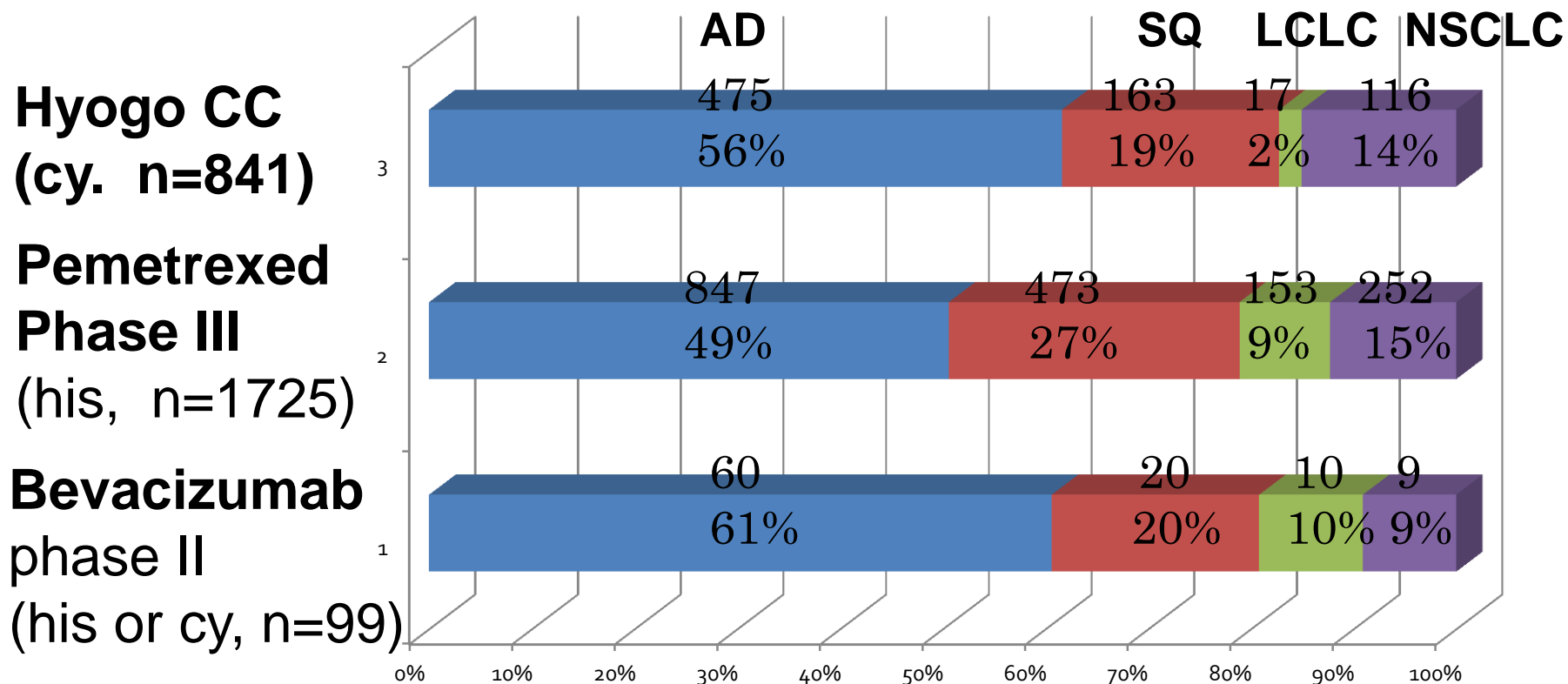
経気管支細胞診陽性症例 (n=841) の推定組織

兵庫県立がんセンターH20-H22連続症例

Adenocarcinoma	475	56.6%
Squamous cell carcinoma	163	19.3%
Small cell carcinoma	56	6.6%
LCNEC	17	2.0%
HGNEC	14	1.6%
Adenosquamous cell carcinoma	3	0.3%
others	10	1.1%
NSCLC*	103	12.2%

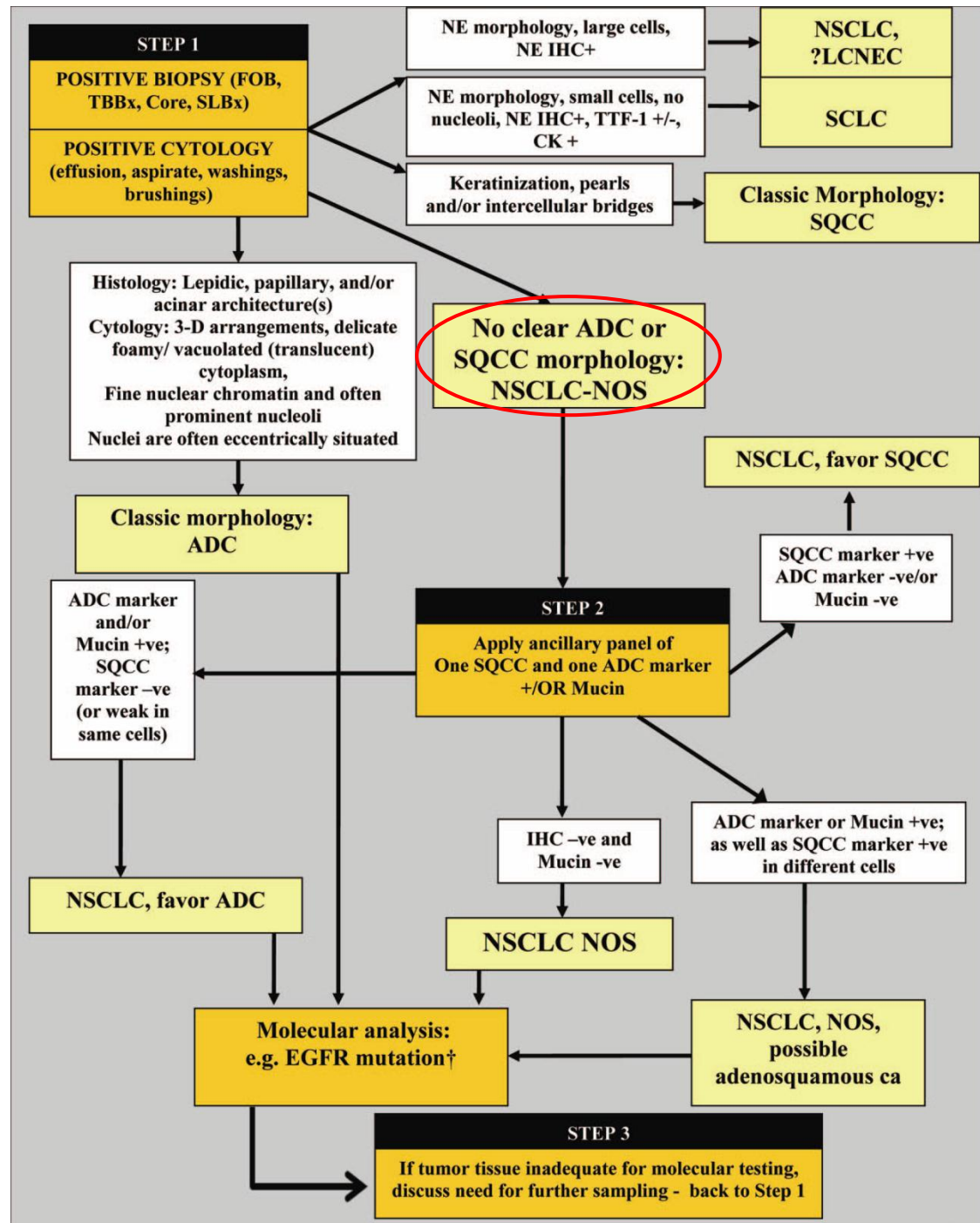
NSCLC* 腺にも扁平上皮への分化が明らかでないもの（低分化な腺癌や扁平上皮癌、大細胞癌、肉腫様癌が含まれる）

術前病理診断の比較



**NSCLCとしているものをLCLCとしている
=LCLCが低分化な扁平上皮癌を含む可能性がある**

生検・細胞診の 診断フローチャート



Immunohistochemistry

NE
markers

- Chromogranin, Synaptophysin, NCAM(CD56)

SQ
Markers

- CK5/6, P63, CK34 β E12, p40
involcrine, desmoglein-3,
desmocollin-3

AD
markers

- TTF-1, Napsin
MOC31

粘液産生性腺癌に有用な
IHCマーカーはない。
PAS-Alb染色

細胞診で見分ける
腺癌 vs. 扁平上皮癌

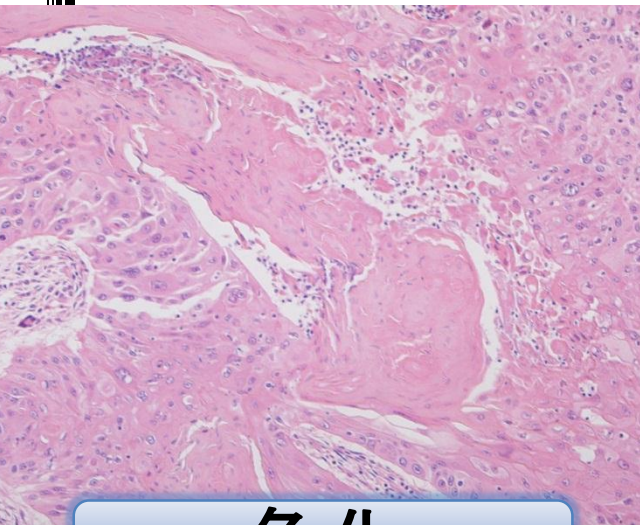
扁平上皮癌の一致例における診断の根拠とした細胞所見

細胞所見					組織の分化度			合計 (n=62)
角化細胞	流れ様配列	核中心	粗クロマチン	細胞質厚	高 (n=17)	中 (n=27)	低 (n=18)	
■					17	23	12	52
			■			1	2	3
		■	■				2	2
	■			■			2	2
		■	■	■		1		1
			■	■		1		1
	■		■	■		1		1
		■					1	1

扁平上皮癌の分化度と角化細胞の出現

組織診断の 分化度 (n=73)	角化細胞/例数		
	一致例 細胞診: 扁平上皮癌	不一致例 細胞診: 腺癌	診断困難例 細胞診: 低分化癌
高 (n=17)	17/17例		
中 (n=28)	23/27例	0/1例	
低 (n=28)	10/18例	0/4例	0/6例

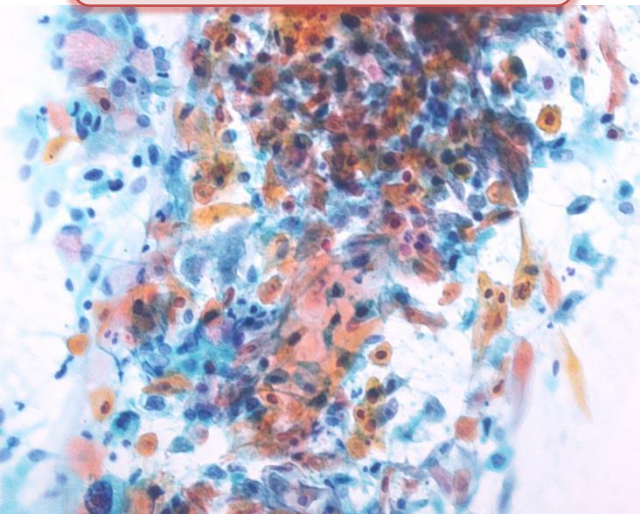
扁平上皮癌の特徴



角化



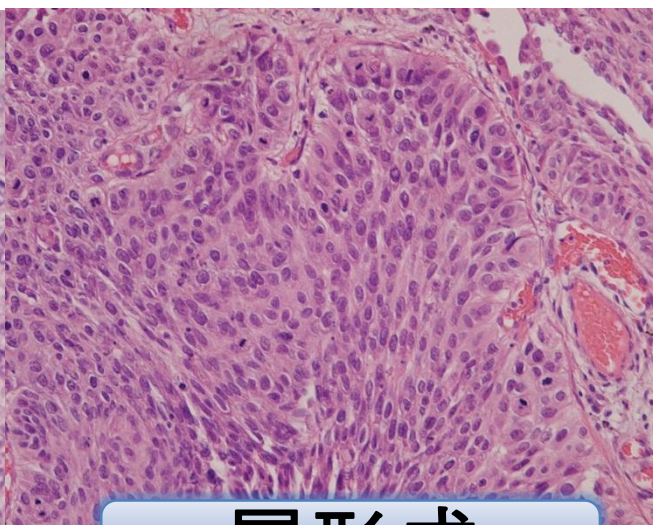
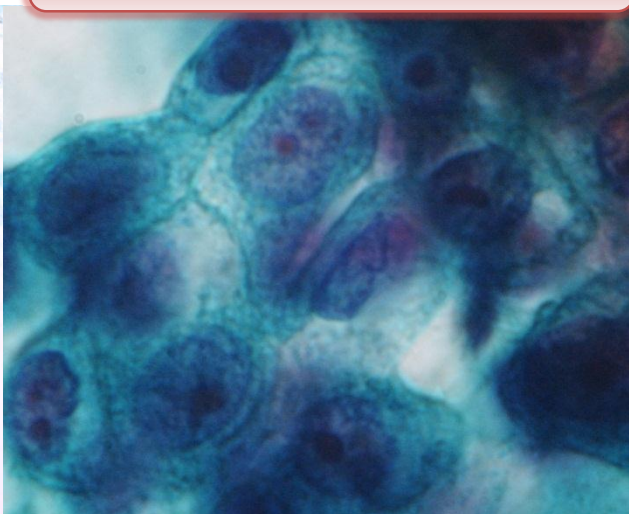
角化細胞



細胞間橋



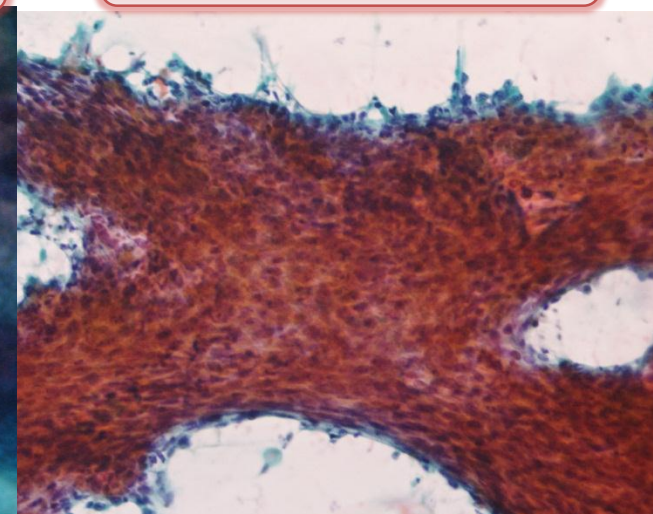
レール状細胞境界

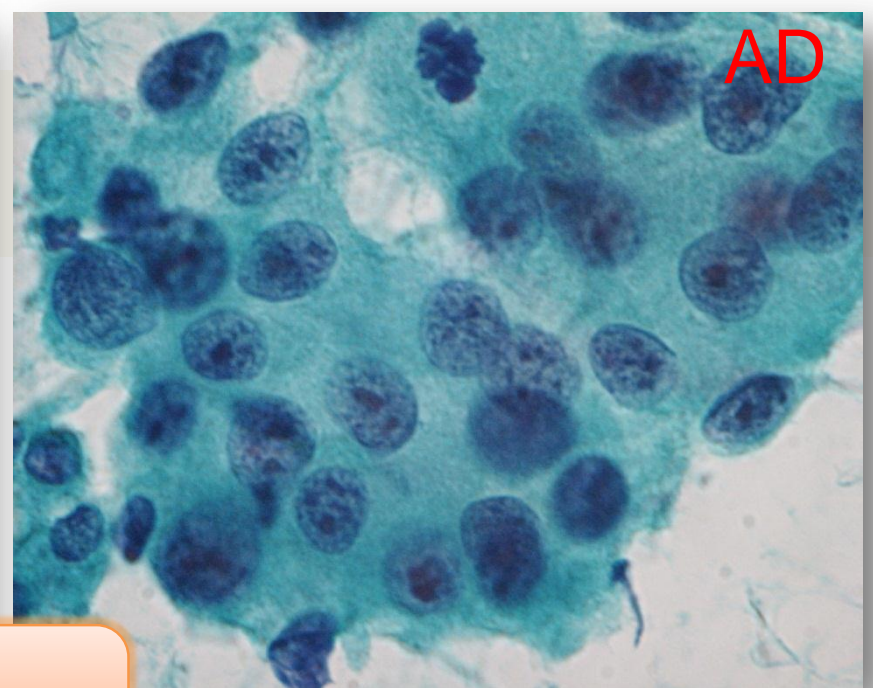
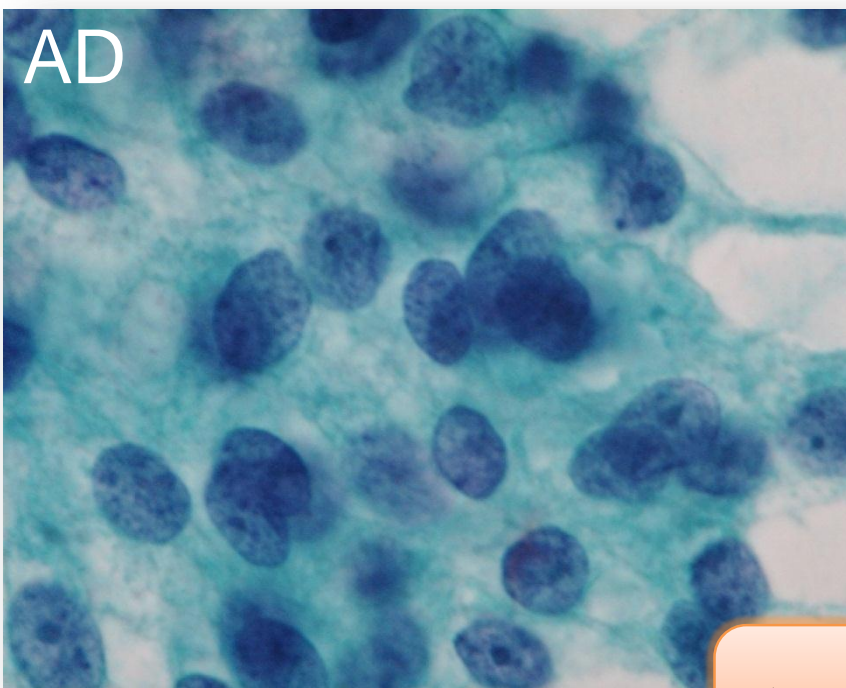


層形成

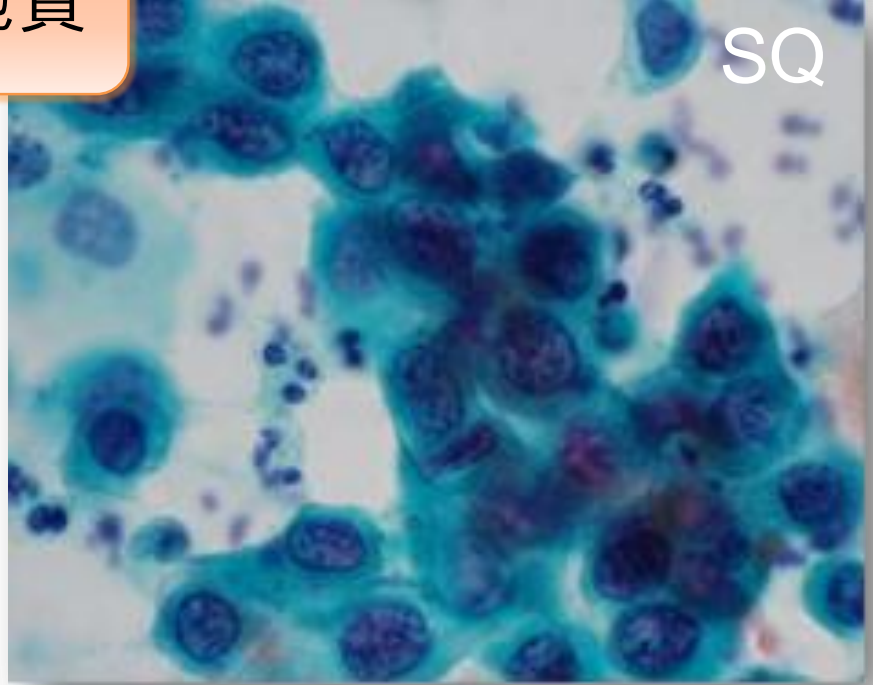
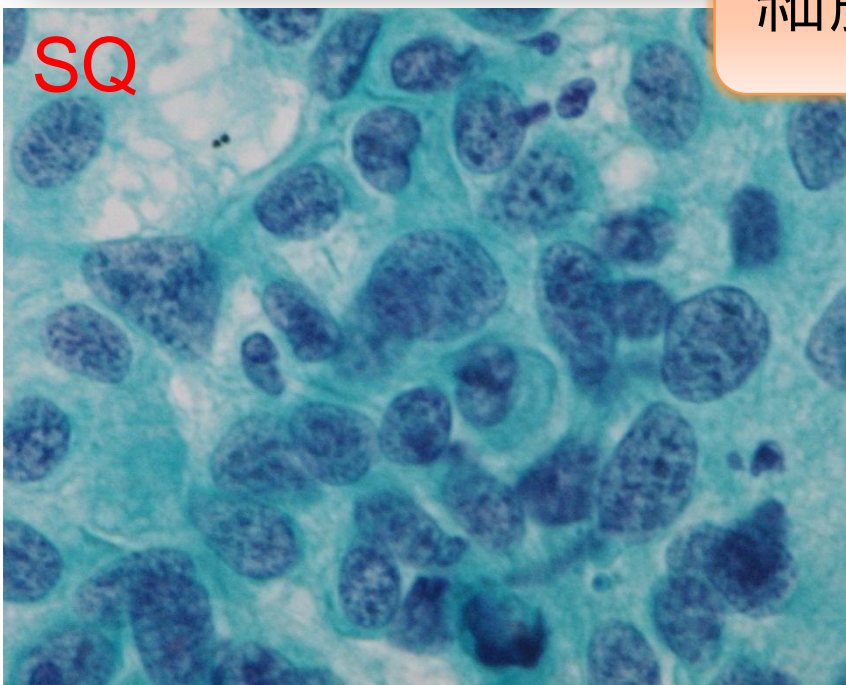


流れ状配列

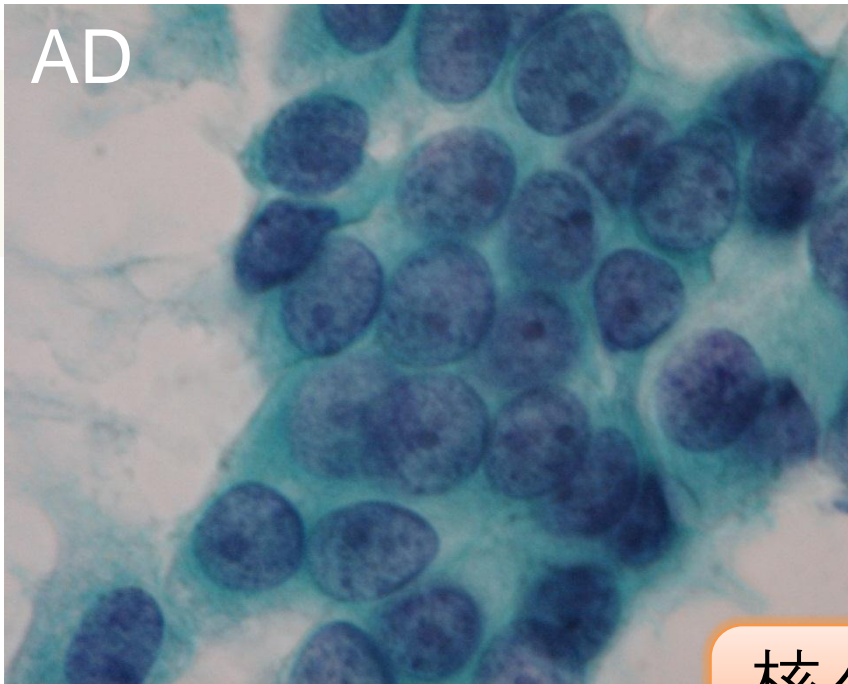




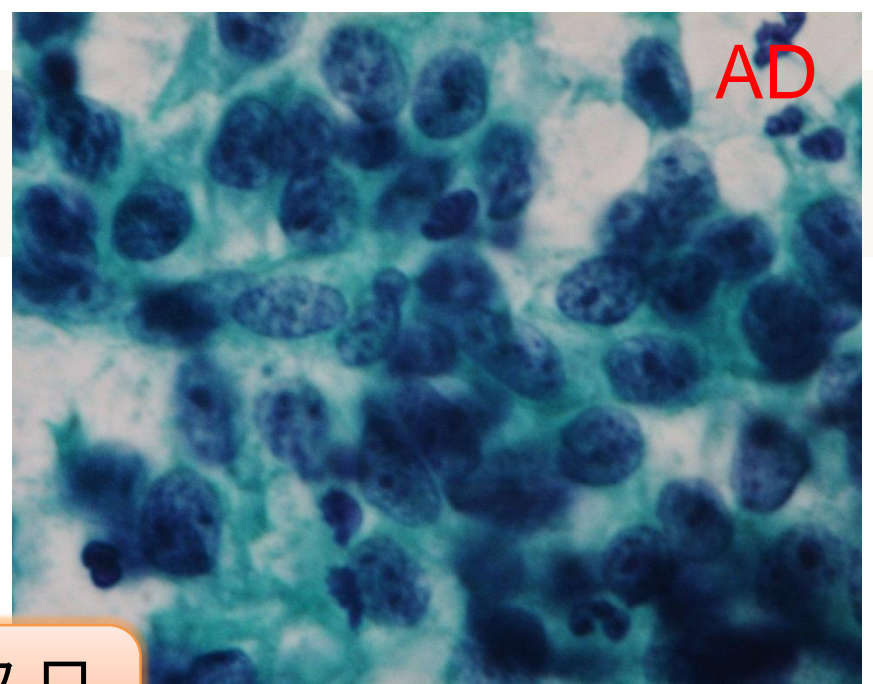
細胞質



AD

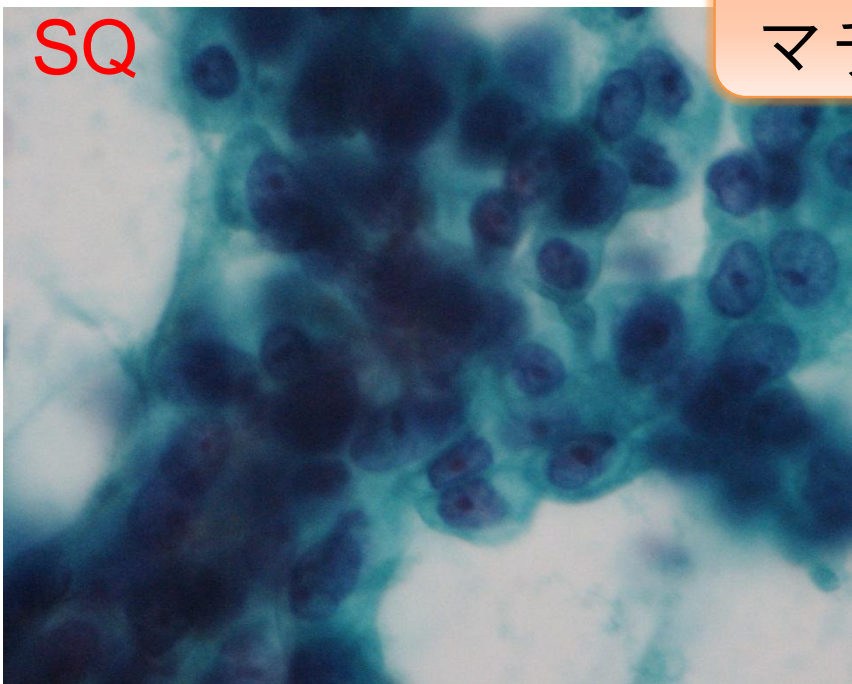


AD

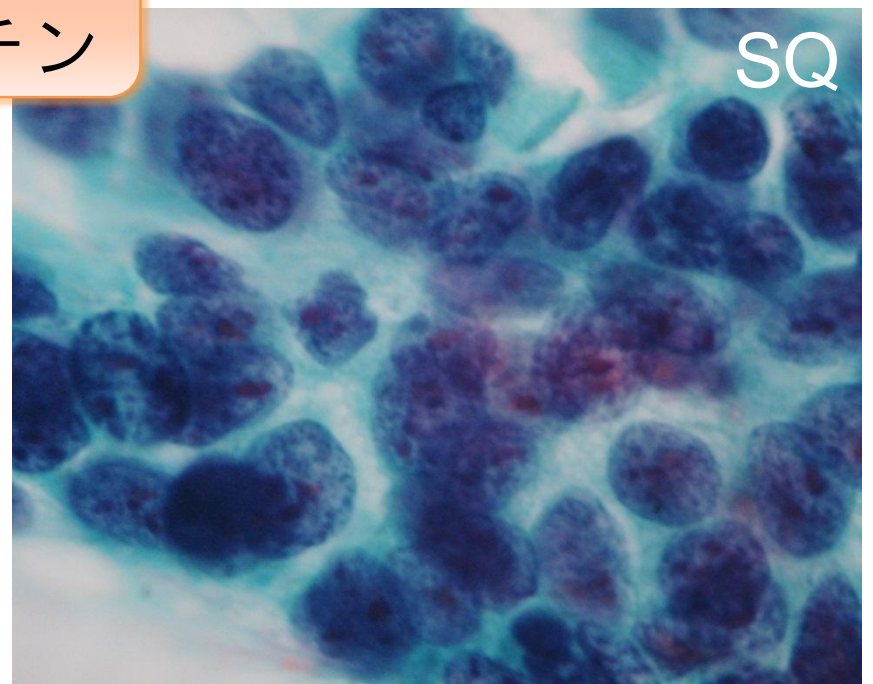


核クロ
マチン

SQ

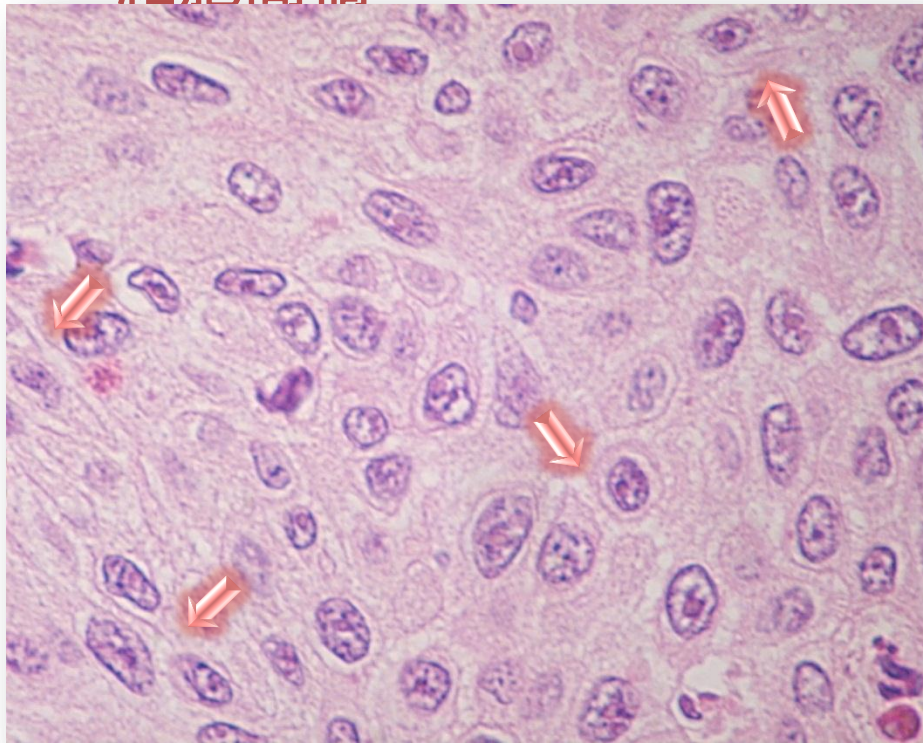


SQ

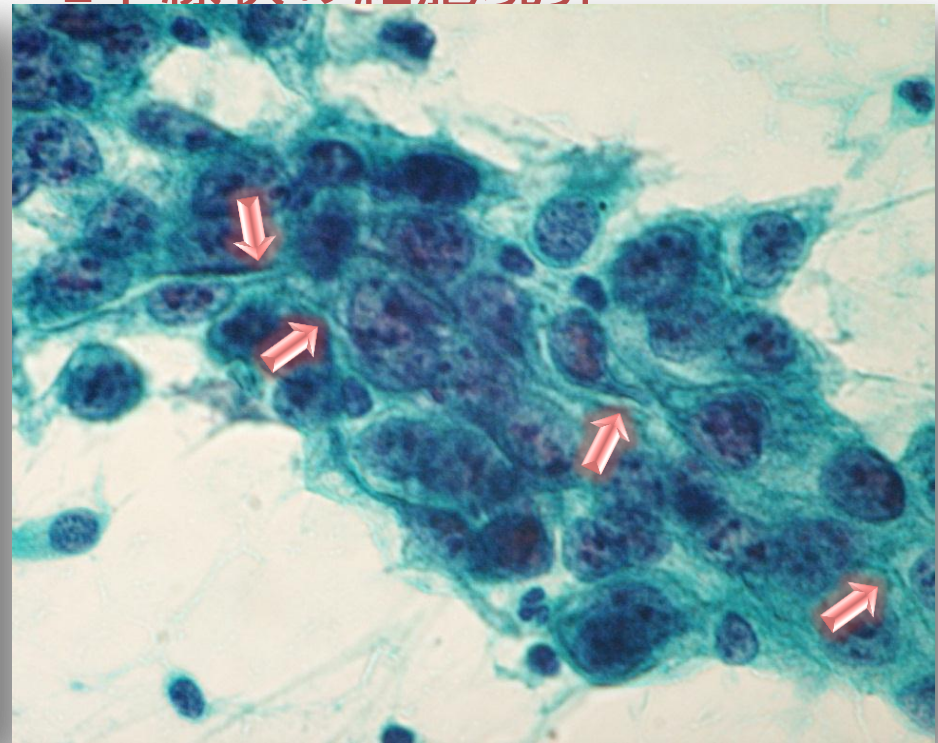


細胞間隙を模倣するような2本線状の細胞境界

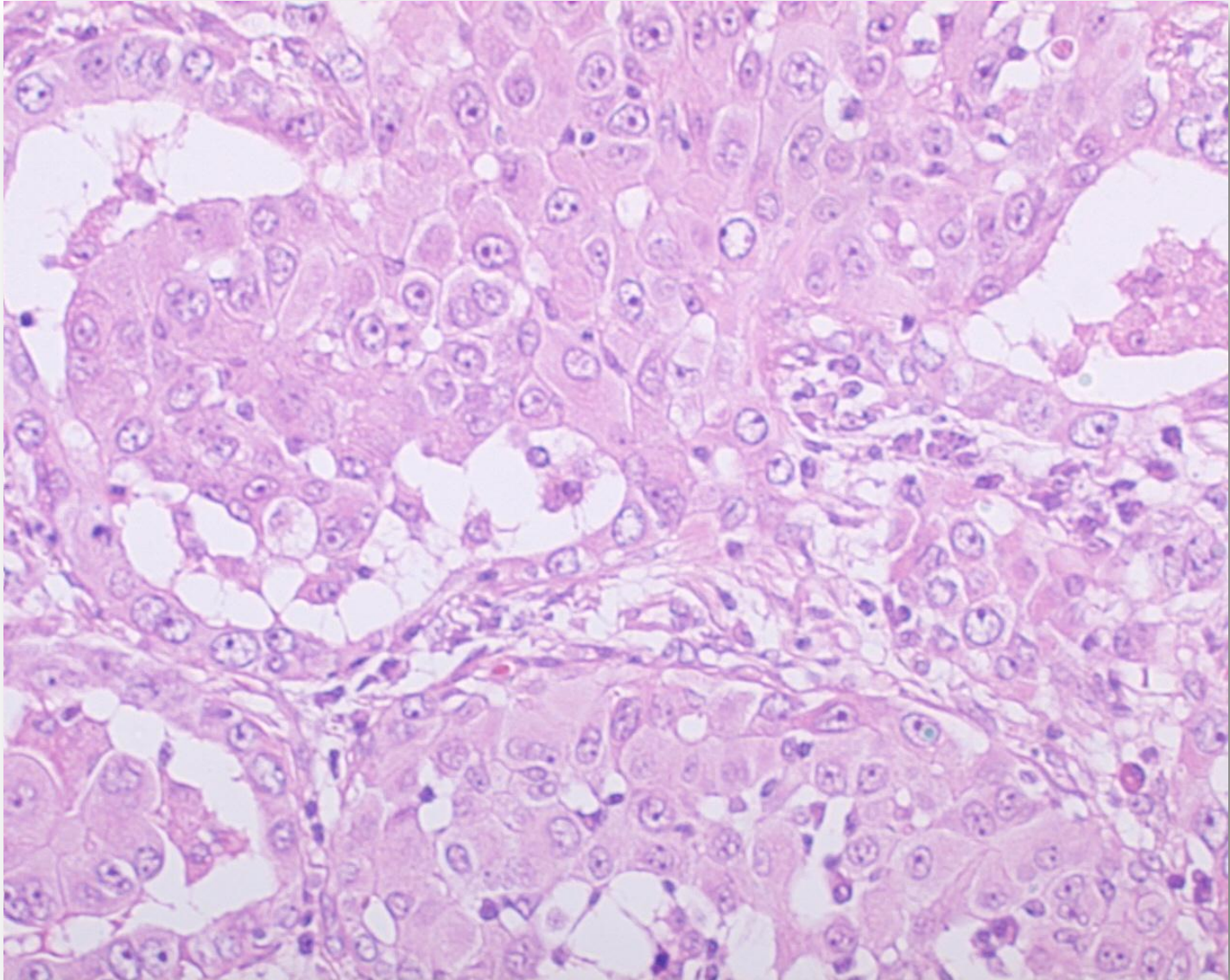
細胞間橋



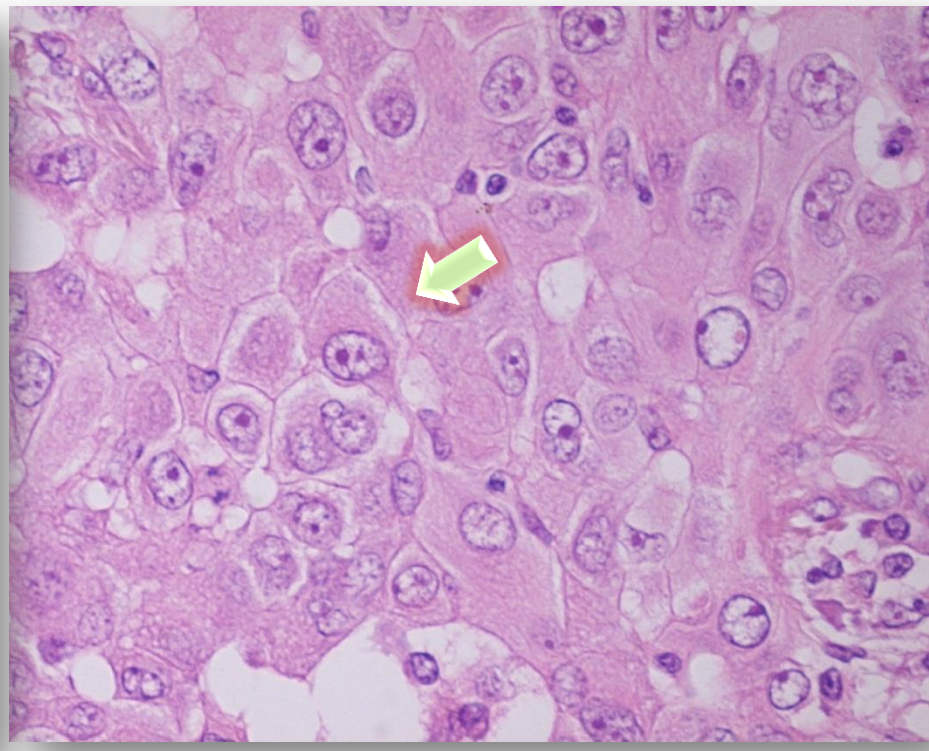
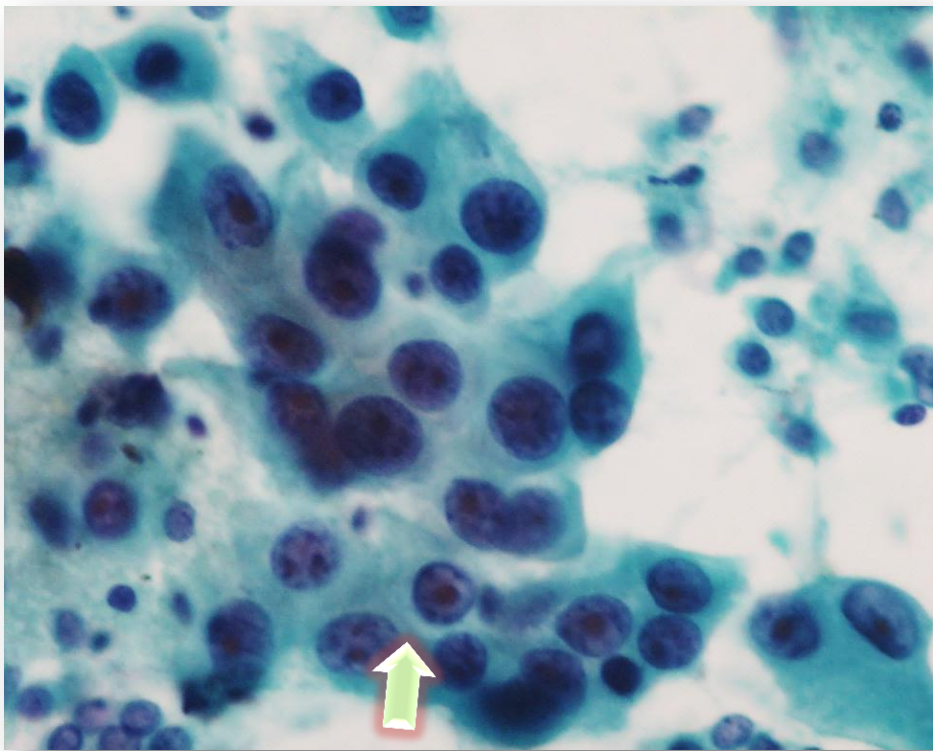
2本線状の細胞境界



低分化な腺癌

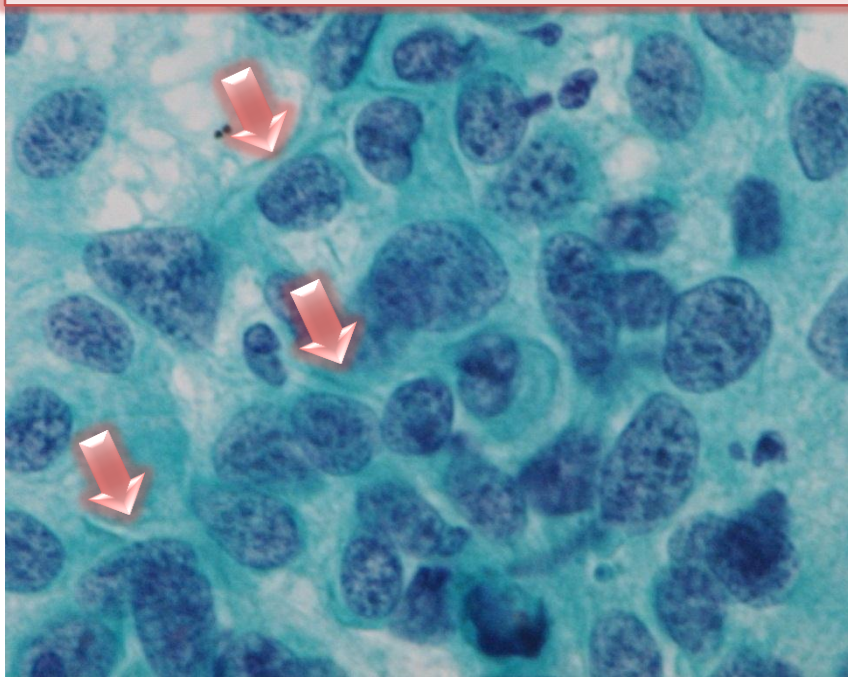


腺癌の細胞境界

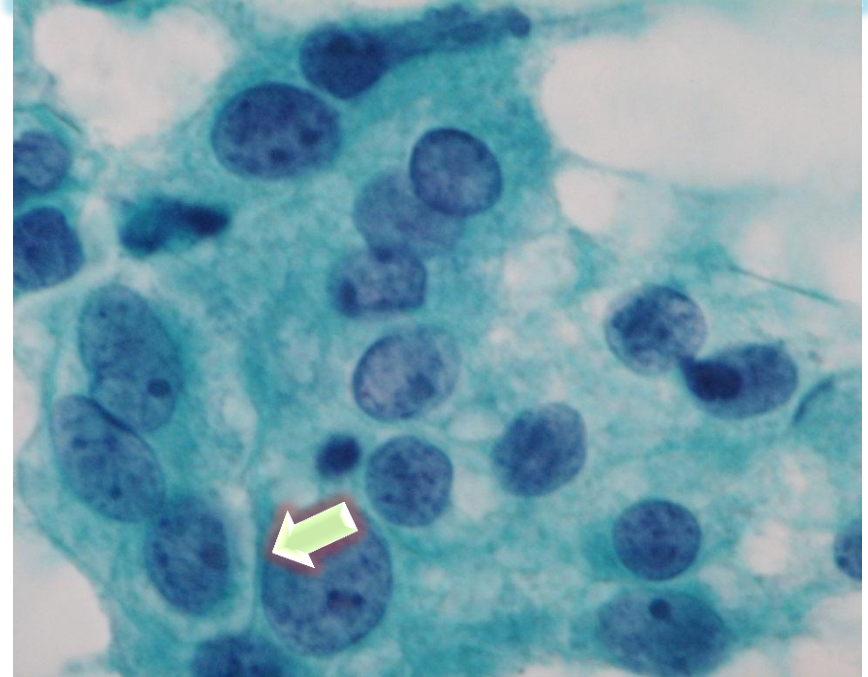


扁平上皮癌と腺癌との比較

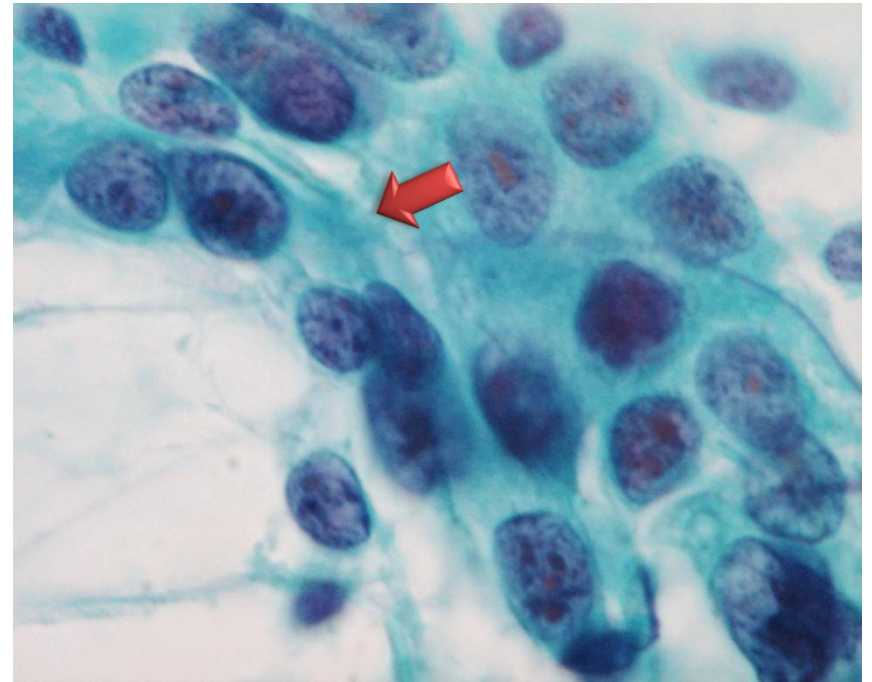
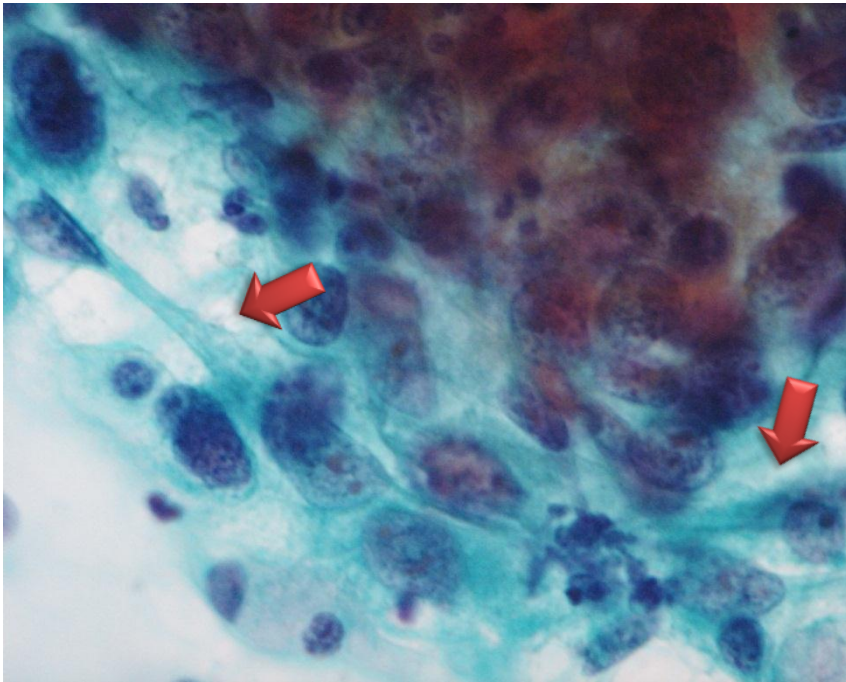
扁平上皮癌(NSCLC)



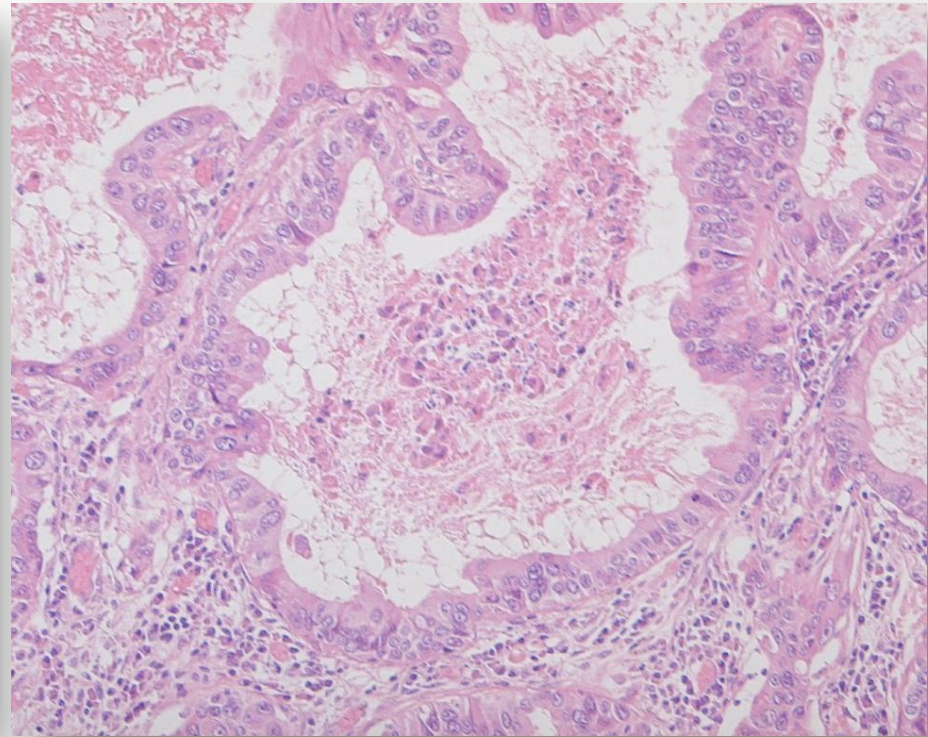
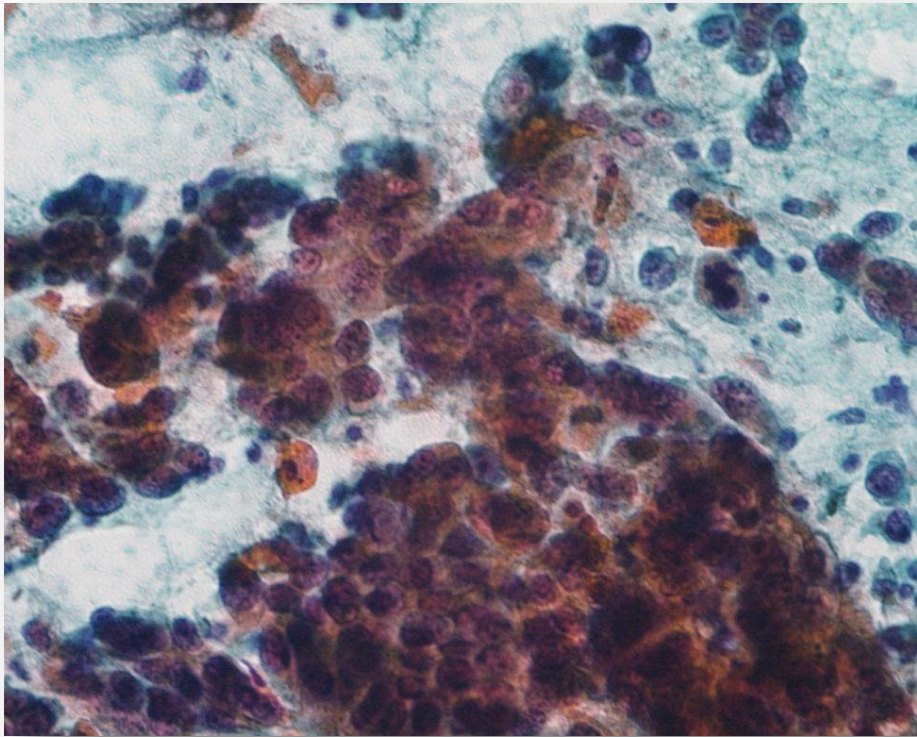
腺癌



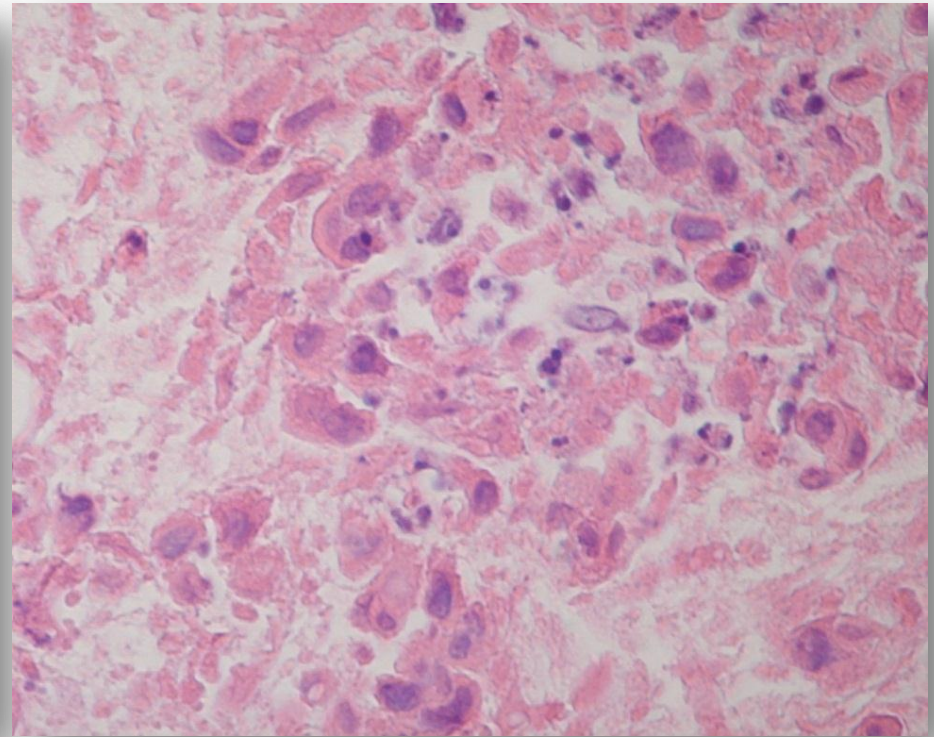
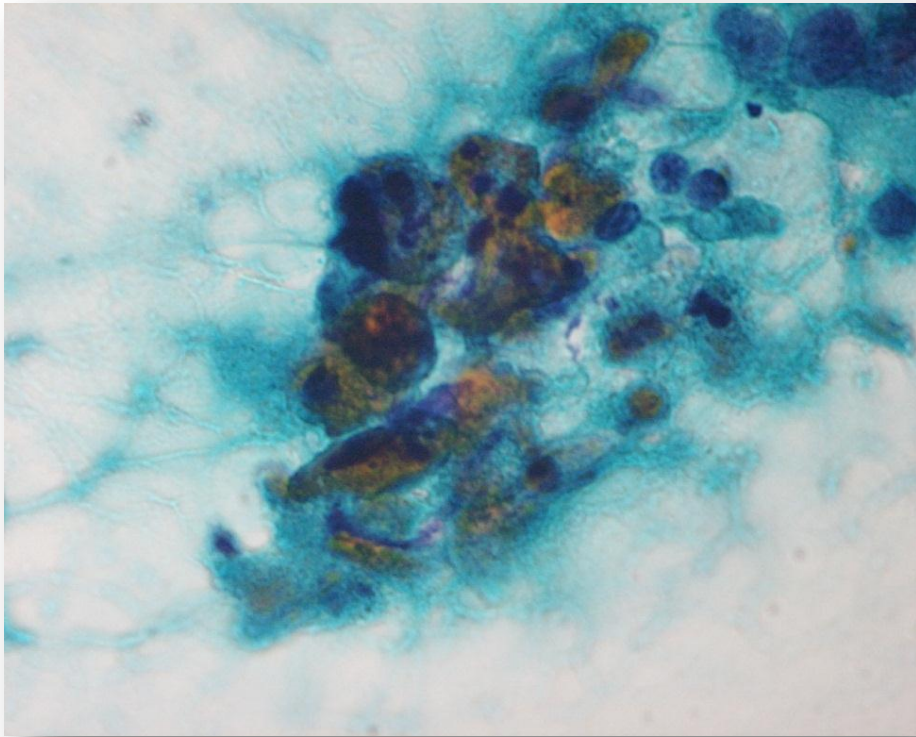
扁平上皮癌細胞質の細線維状の尾



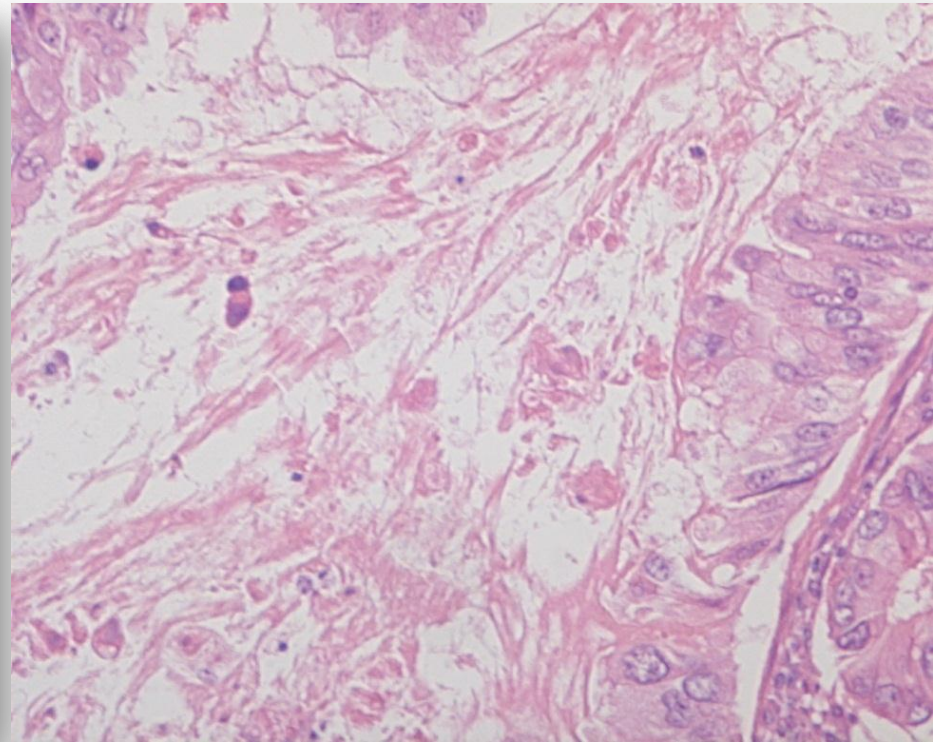
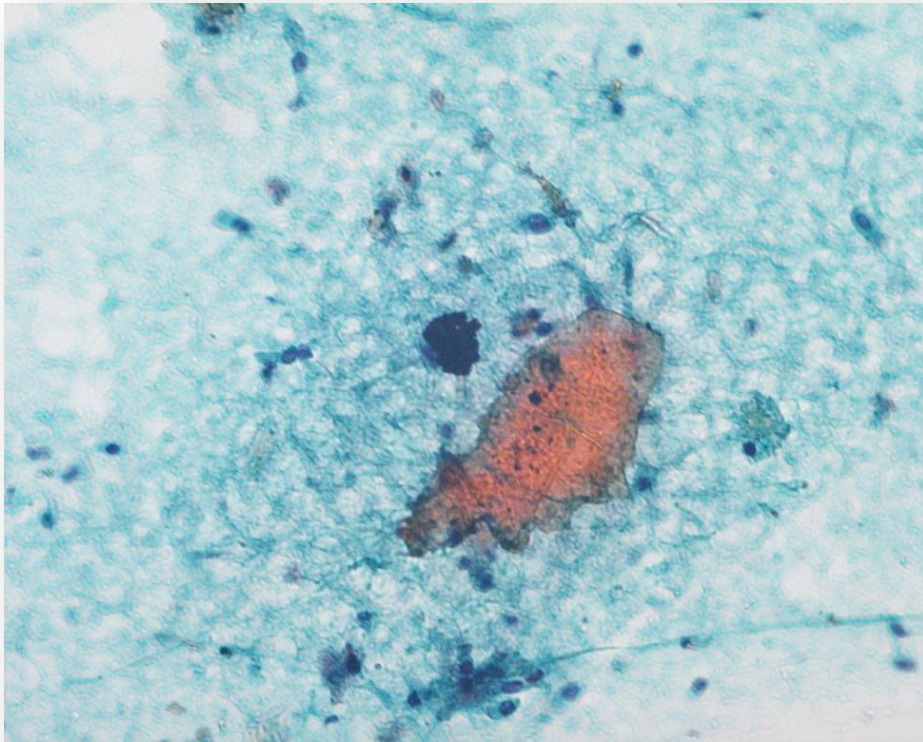
腺癌にオレンジG好性細胞



腺癌にオレンジG好性細胞



腺癌にオレンジ好性物質



腺癌の診断で注意すべき細胞所見

術後組織診断で腺癌と診断された 129件中

- 平面的（シート状）集塊 47件
- 厚い印象を受ける細胞質（顆粒状） 28件
- 多辺形の細胞質 13件
- 粗いクロマチン 31件

扁平上皮癌の特徴的細胞像

1. 角化細胞
2. 流れ様配列
3. レール状の2本線
4. 細線維状の尾
5. 密な粗顆粒状クロマチン

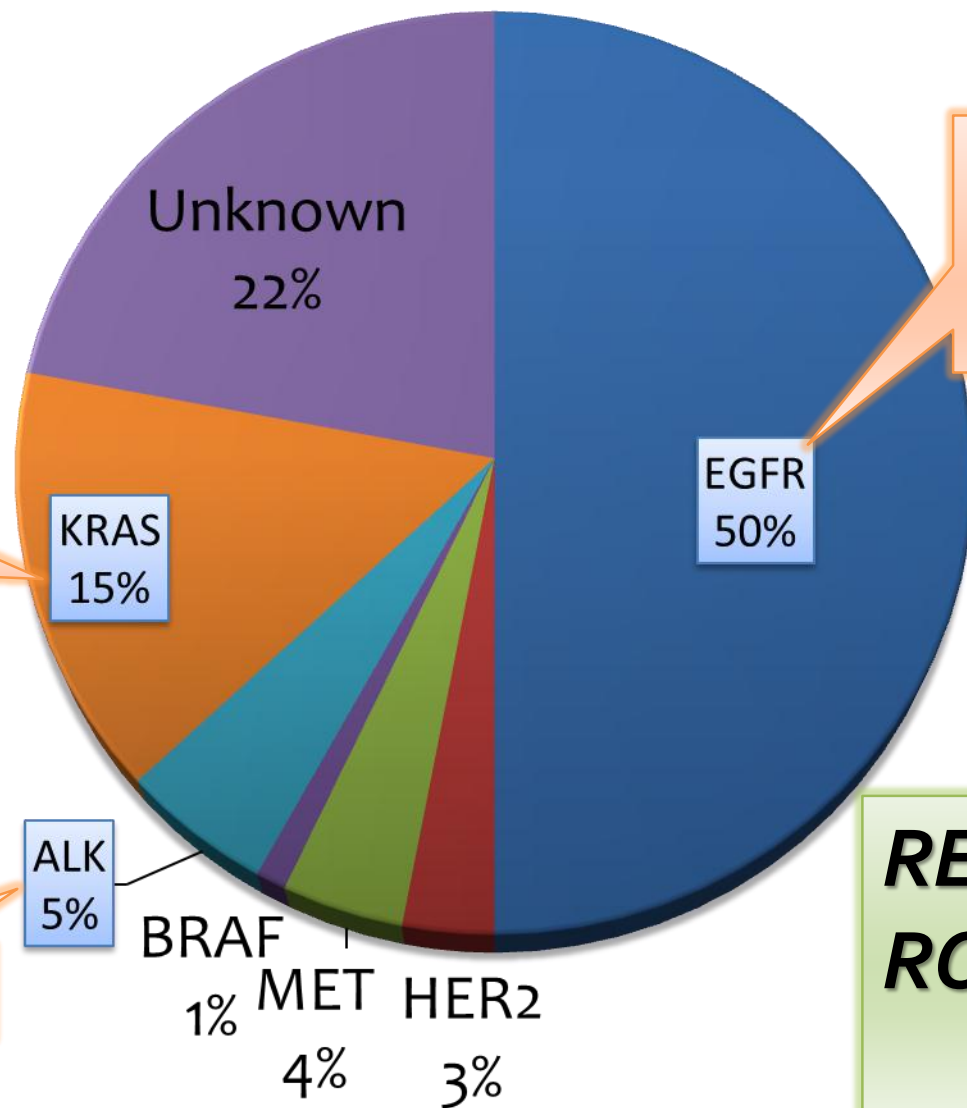
ALK融合遺伝子陽性肺癌

非小細胞肺癌では
分子標的治療が盛り上がっています

EGFR-TK阻害剤	ゲフィニチブ(イレッサ®)
	エルロチニブ(タルセバ®)
ALK-TK阻害剤	クリゾチニブ(XALKORI®)
リガント阻害剤	ベバシズマブ(アバスチン®)

Mutations of the EGFR and related genes in lung adenocarcinomas in Japan

Mitsudomi T. JCO (40) 101-106, 2009



Clara/type II pneumocyte type

mucinous

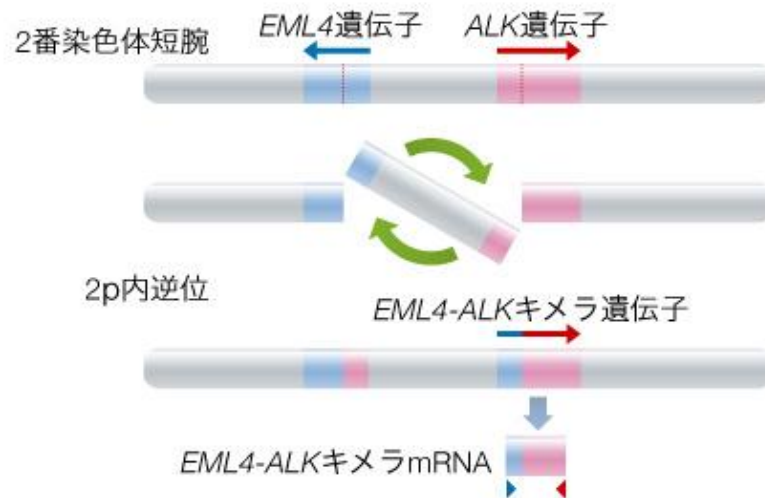
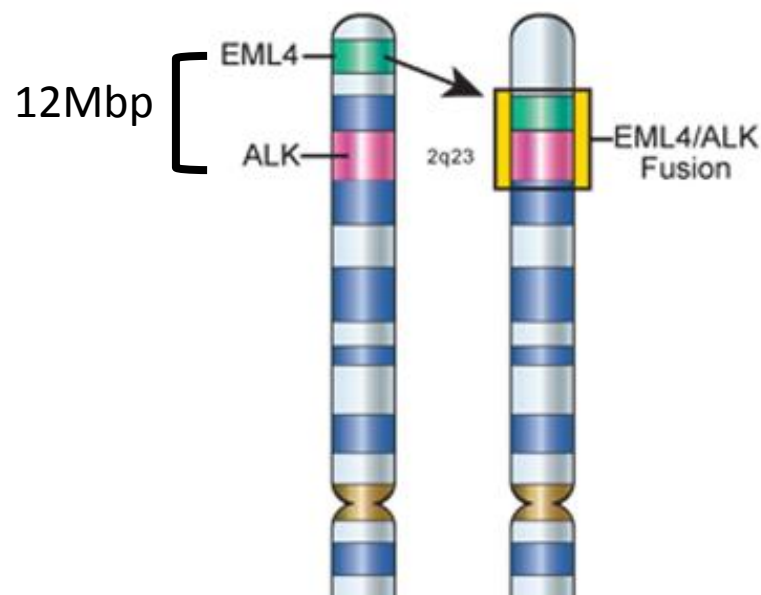
???

RET fusions
ROS-1 fusions

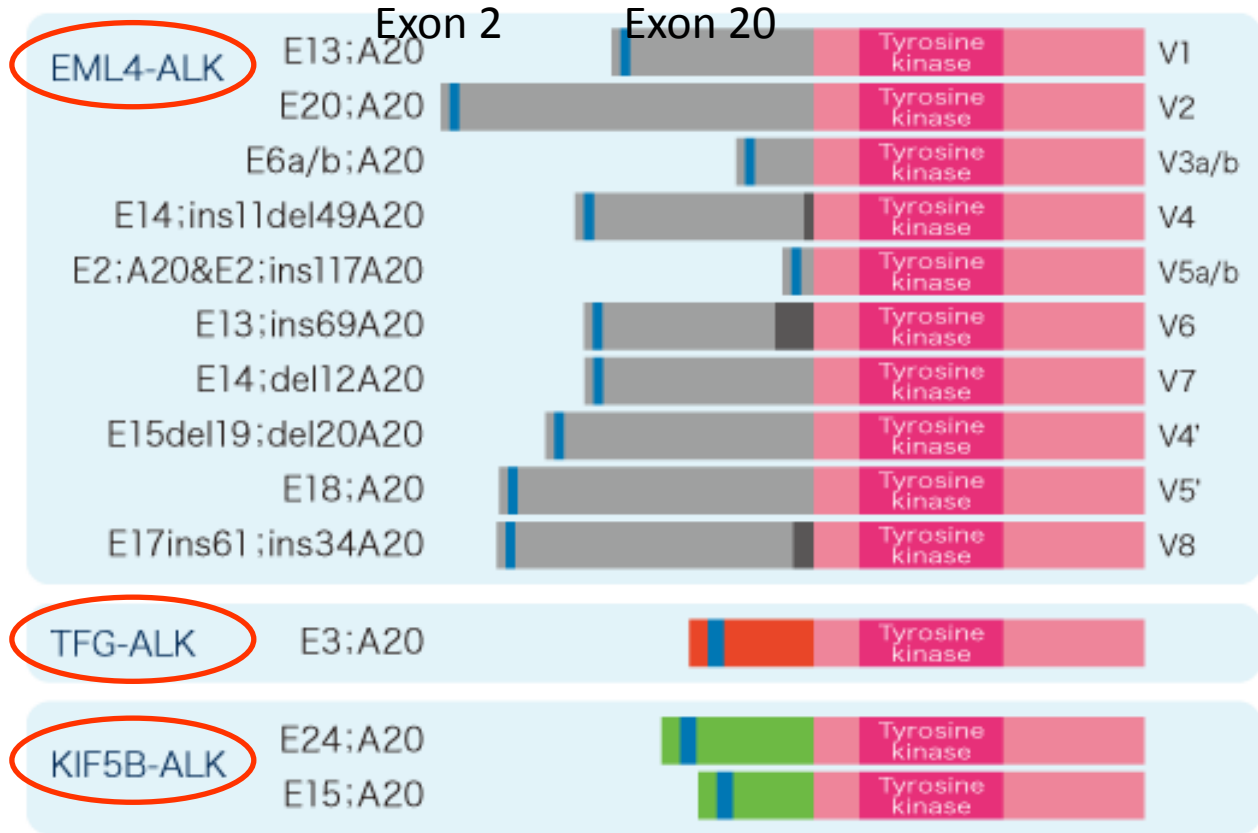
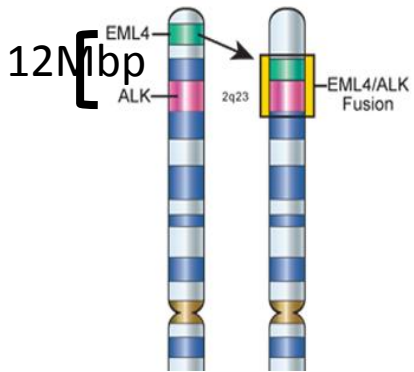
2012.2

EML4-ALK

- ALK (Anaplastic Lymphoma Kinase)は受容体型チロシンキナーゼをコードする遺伝子で、種々のパートナーと融合分子を形成する
- ALK遺伝子とEML4遺伝子は2番染色体短腕の非常に近い部位に反対向きに存在



ALK融合遺伝子



KLC1(kinesin light chein 1)

Togashi Y, et al.

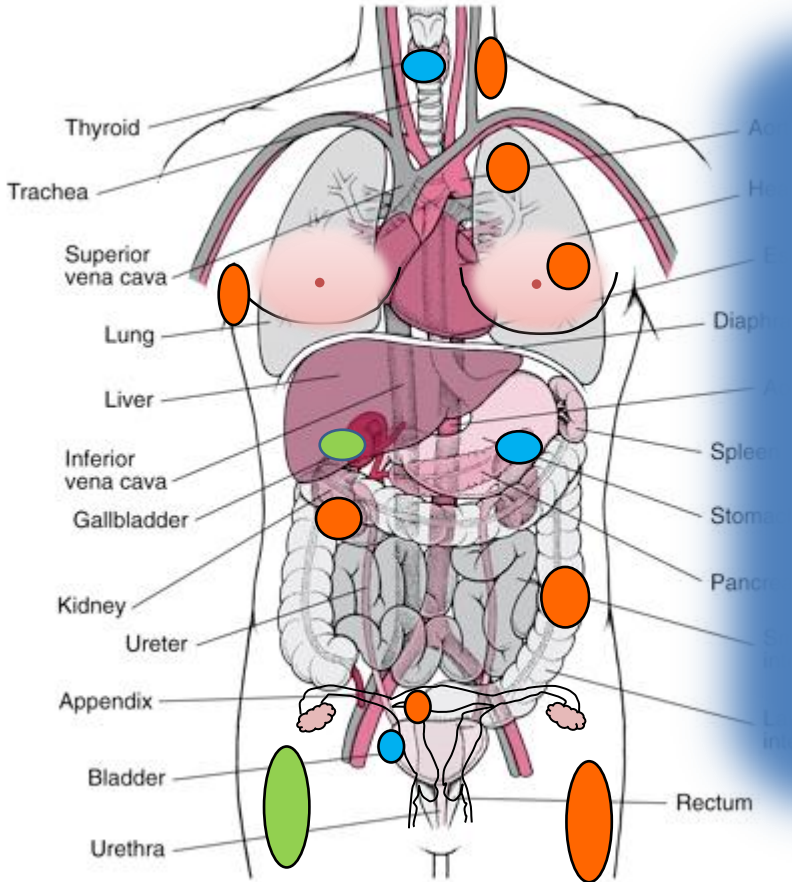
PLoS One. 2012;7(2):e31323. Epub 2012 Feb 8.

A novel EML4-ALK variant: exon 6 of EML4 fused to exon 19 of ALK.

Panze R, et al.

J Thorac Oncol. 2012 Jul;7(7):1198-9.

ALK aberrations



FUSION

- ALK-anaplastic large cell lymphoma
- Inflammatory myofibroblastic tumor

ALKoma

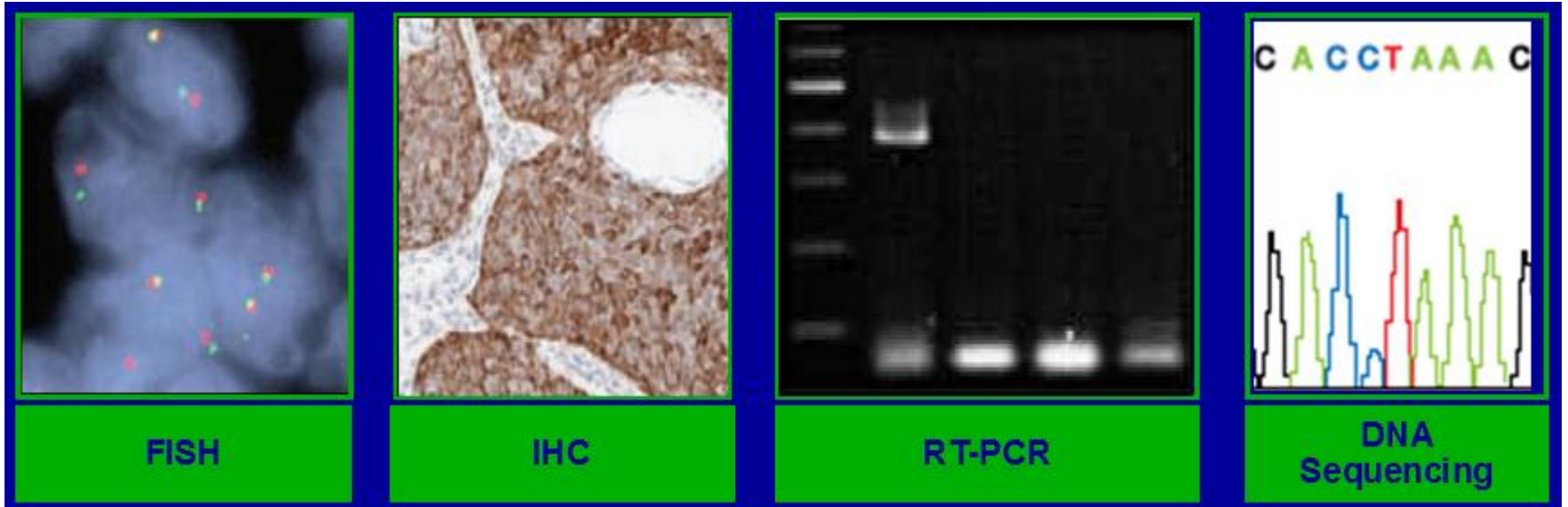
A Cancer Subtype with a Shared Target

Mano H. *Cancer Discov*; 2(6); 1–8. 2012

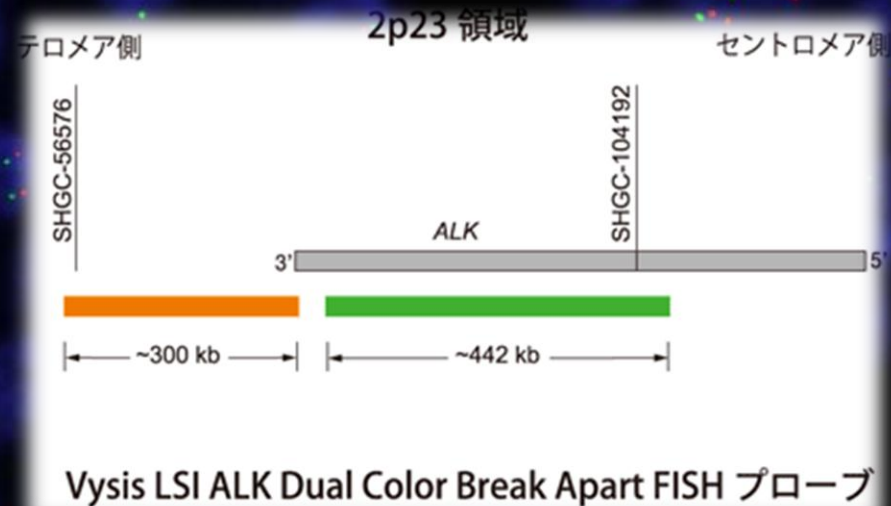
AMPLIFICATION or UPREGULATION

- Alveolar rhabdomyosarcoma
- Neuroblastoma

ALK aberrations detection



FISH



米国でのgold standard

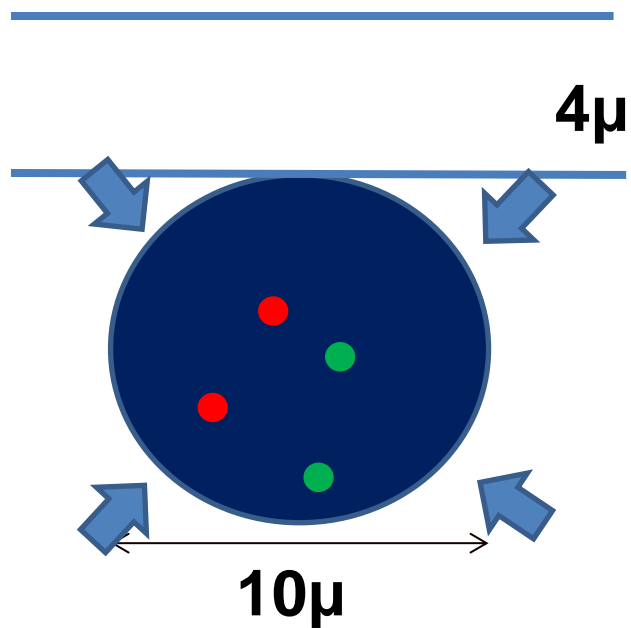
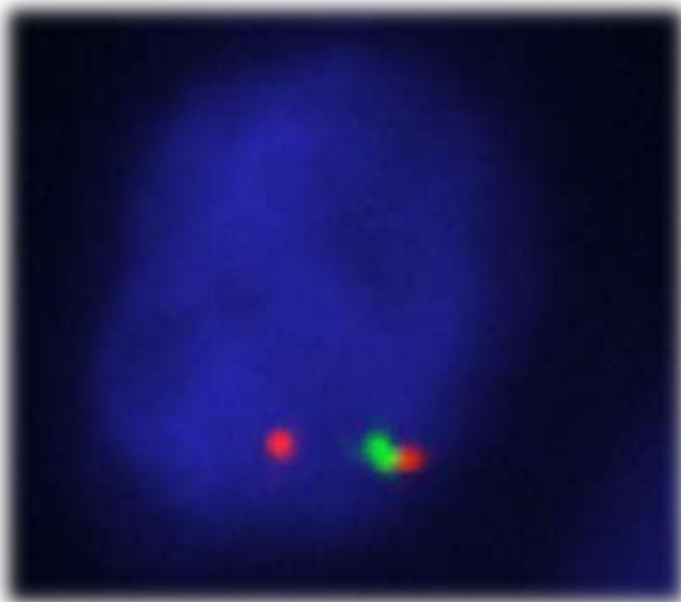
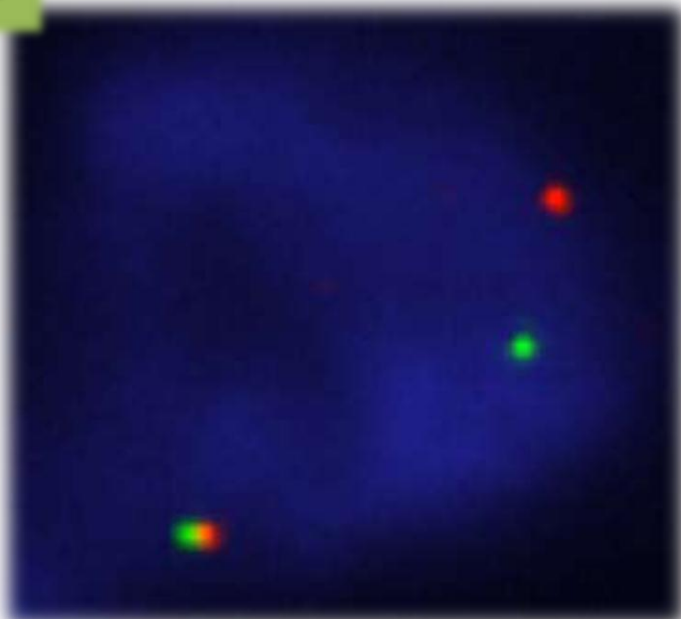
本邦でも

Abott「Vysis[®] ALK Break Apart FISHプローブキット」が体外診断用医薬品製造販売承認取得(6,520点)

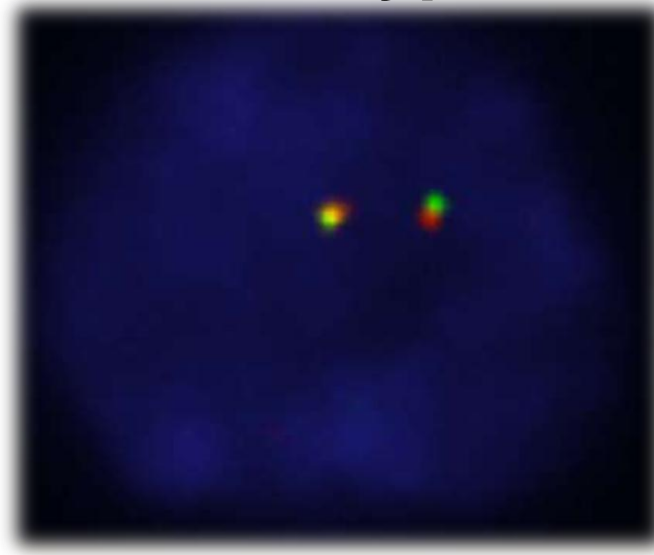
2012.4.2

FISH

ALK rearranged



Wild type



IHC

抗体の選択

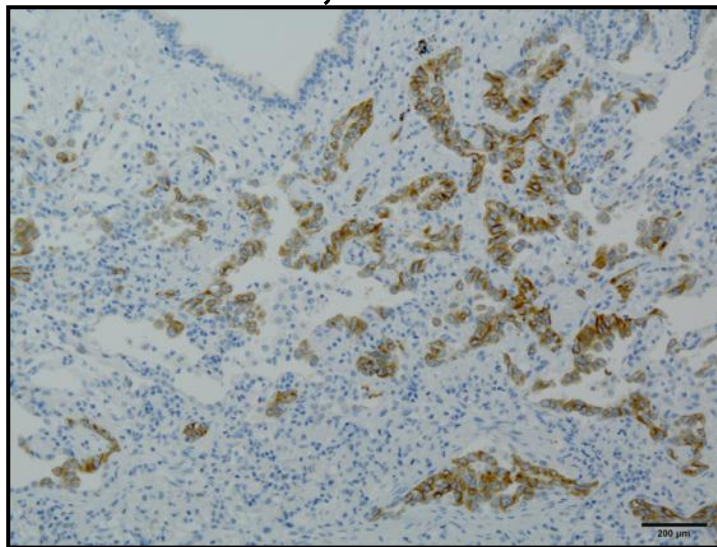
ALK1

SP8

5A4

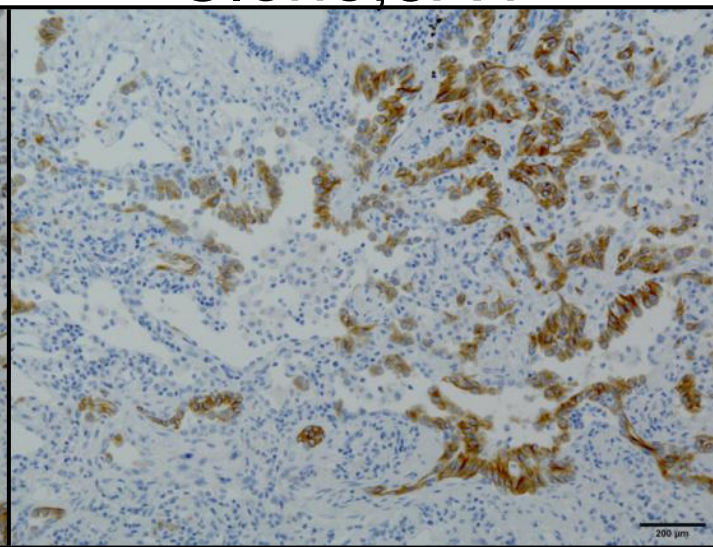
D5F3

Clone;D5F3



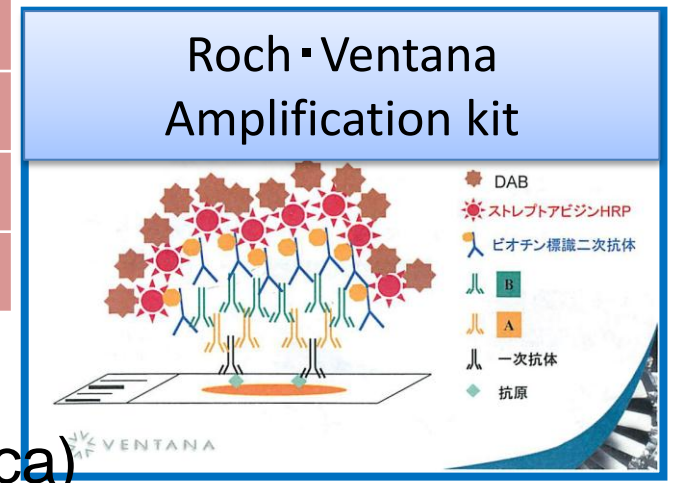
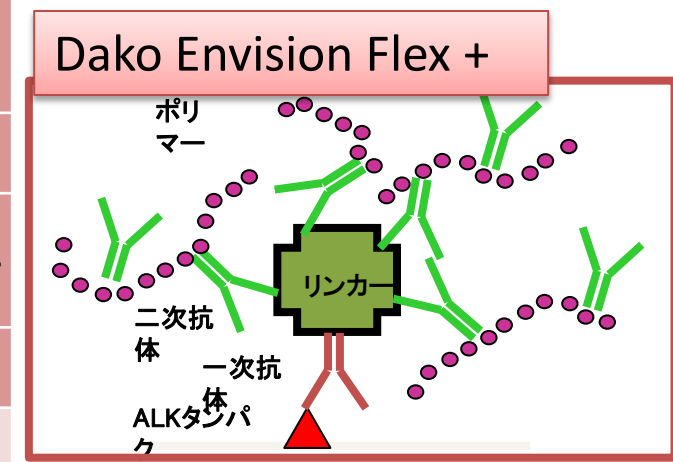
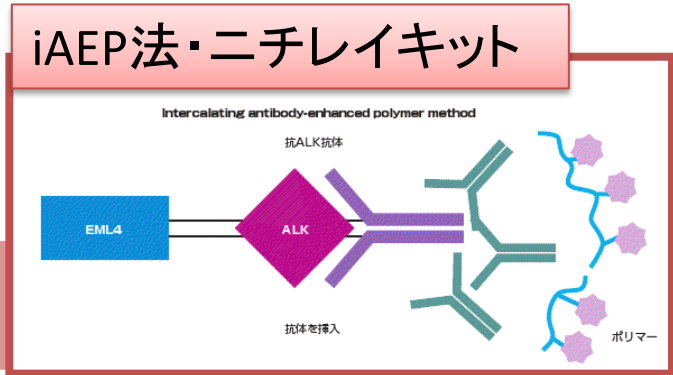
Cell Signaling
Technology

Clone;5A4



Abcam, Gene Tex,
Lab Vision, Novocastra
ニチレイ

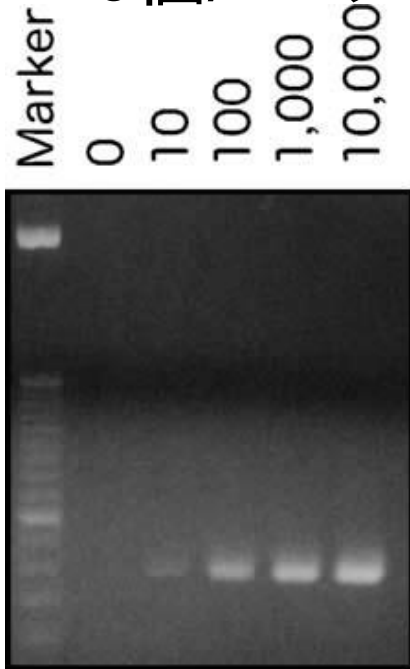
Autostainer	Ventana	Ventana	Dako
clone	ALK1	5A4	5A4
supplier	Dako	Abcam	Abcam
detection	Amplification kit	Amplification kit	Envision FLEX+
autostainer	Ventana	Ventana	Dako
0	9	0	0
1+	0	3	0
2+	0	4	2
3+	0	2	7



i-view detection kit (Ventana)
 Bond Polymer Refine detection kit(Lica)

RT-PCR

10個/mlの喀痰



- 検体としてmRNA を逆転写して合成されるcDNA を用いる
- 融合点を挟むプライマーを設計
- PCR産物が大きい(～1,300bp)ので、質の高いRNAと高い技術が必要
- 通常のFFPE検体では不可能
- 極めて高い特異性
- 液体や微小検体を用いることができる

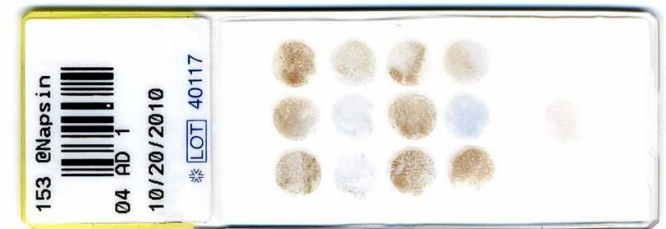
多様な融合パートナーへの対応が必要

切除肺TMAによるALK肺癌の検討

兵庫県立がんセンター症例

外科的切除検体
原発性肺腺癌

894例 Tissue micro array



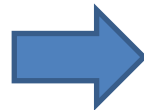
ALK蛋白抗体免疫染色

◆ 1次抗体 clone 5A4 (Abcam)

◆ 検出系 Envision Flex+(DAKO)

ALK肺癌

23例 (2.5%)

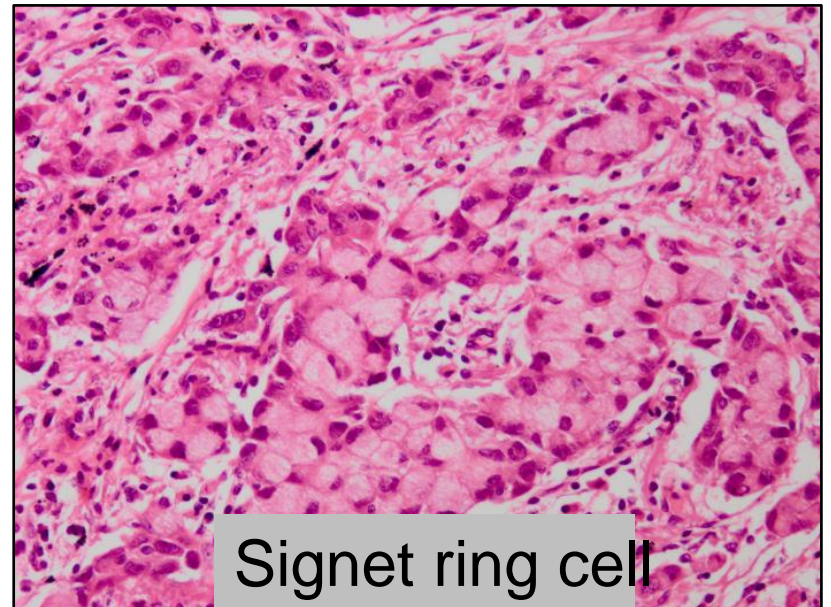
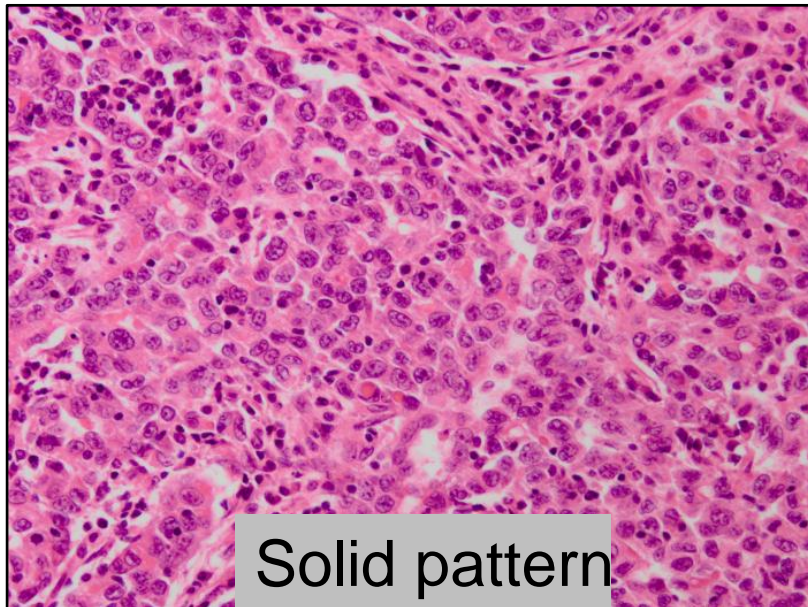
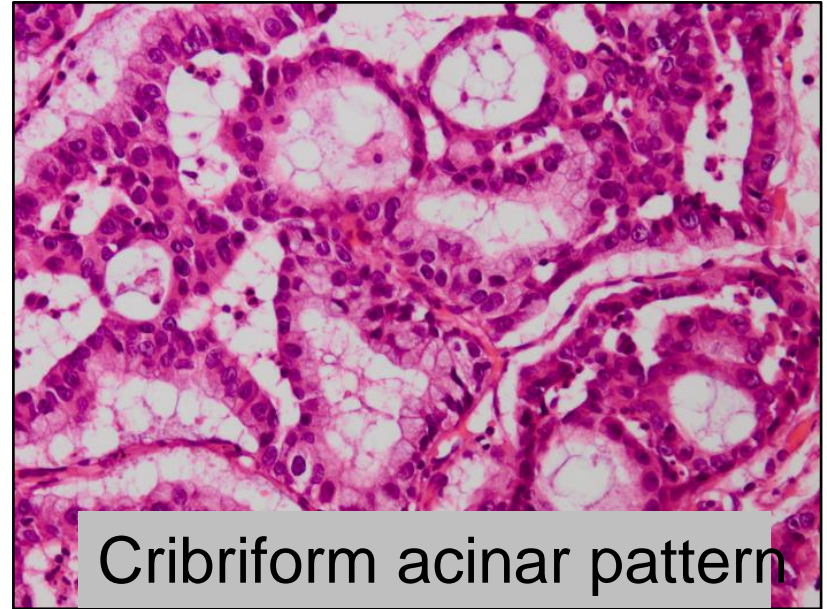


TBB 6例

迅速診断 3例

細胞診 7例

- Cribriform acinar pattern
- Solid pattern
- Intracellular mucin (Signet ring cell)
- Extracellular mucin



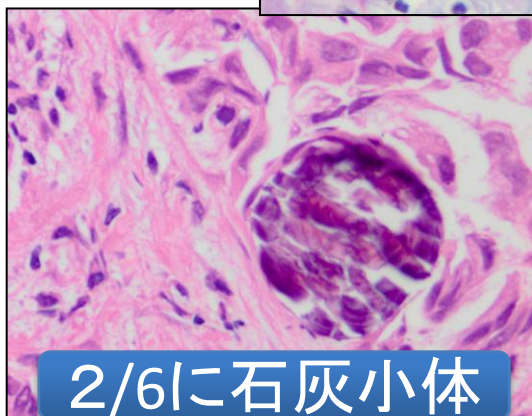
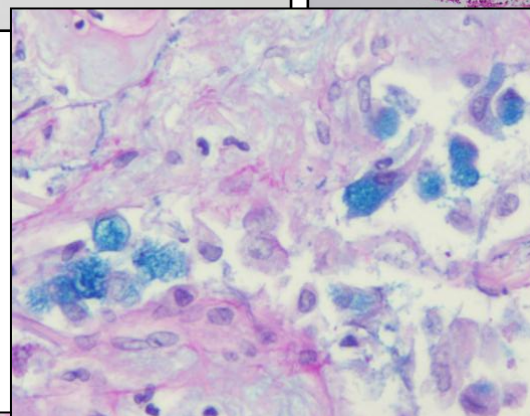
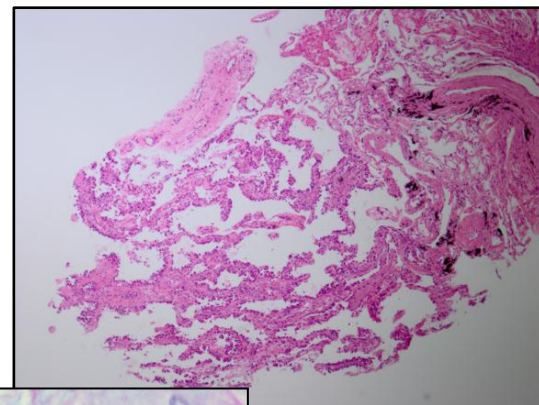
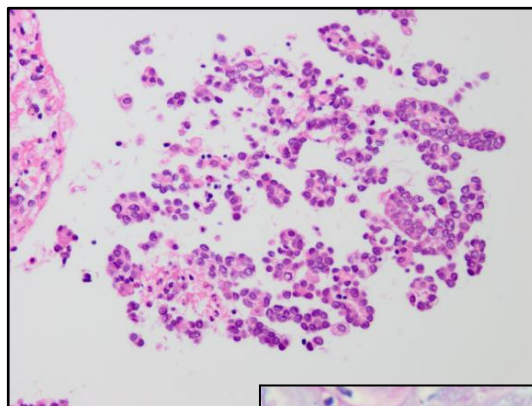
ALK肺癌の生検像

パターン

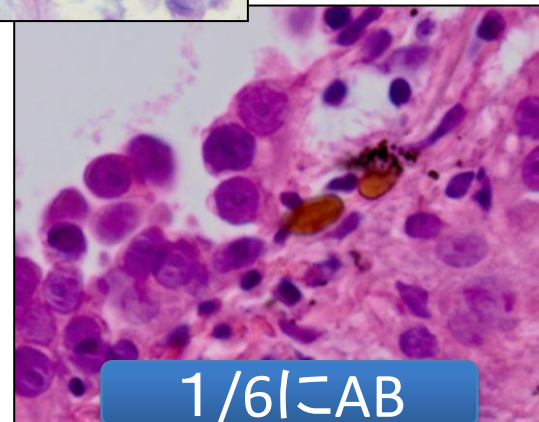
Cribriform/acinar	3
Papillary	1
Micropapillary	1
Lepidic	1

粘液

粘液(+)	4
印環細胞	1
腔内粘液	1
粘液(-)	2

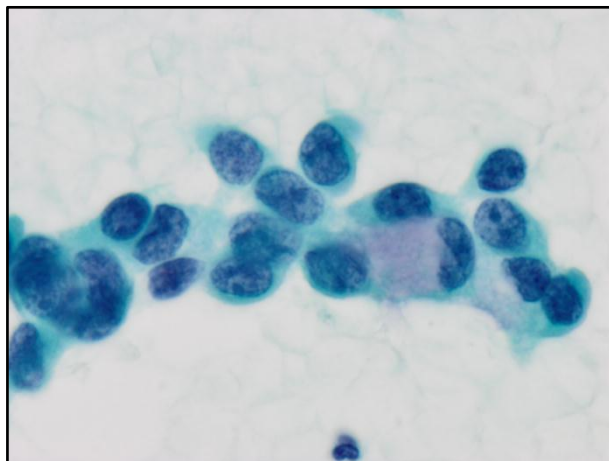


2/6に石灰小体

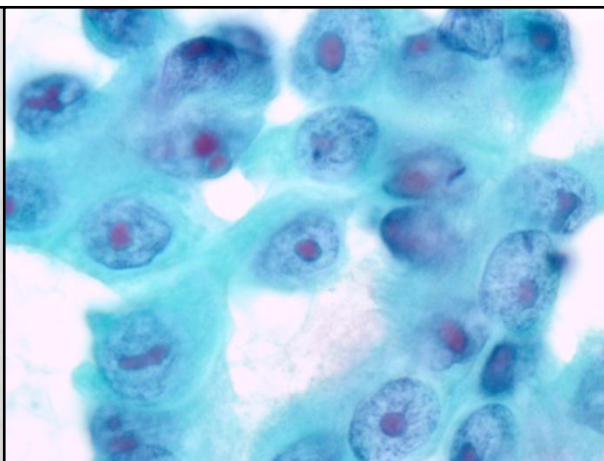


1/6にAB

ALK肺癌の細胞像

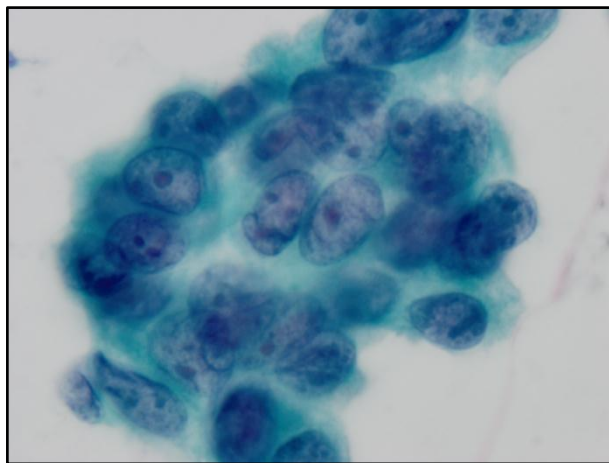


粘液

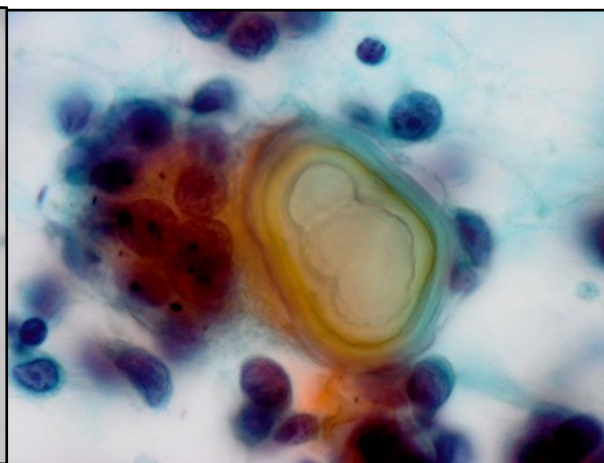


核小体

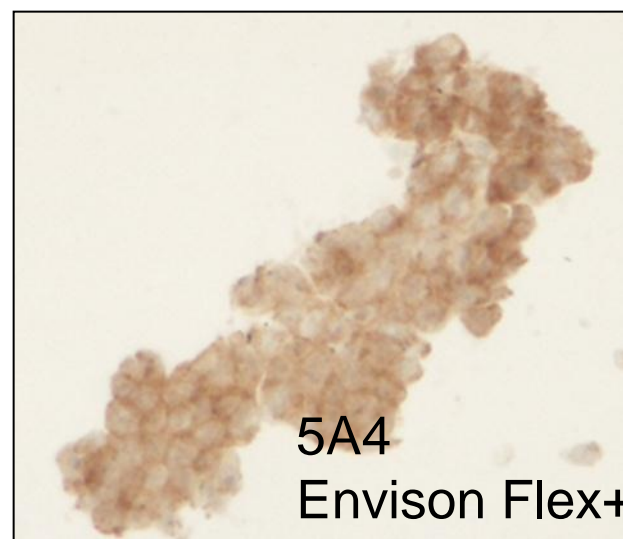
核小体
核の立体不整
細胞質内粘液
石灰小体



核の立体不整



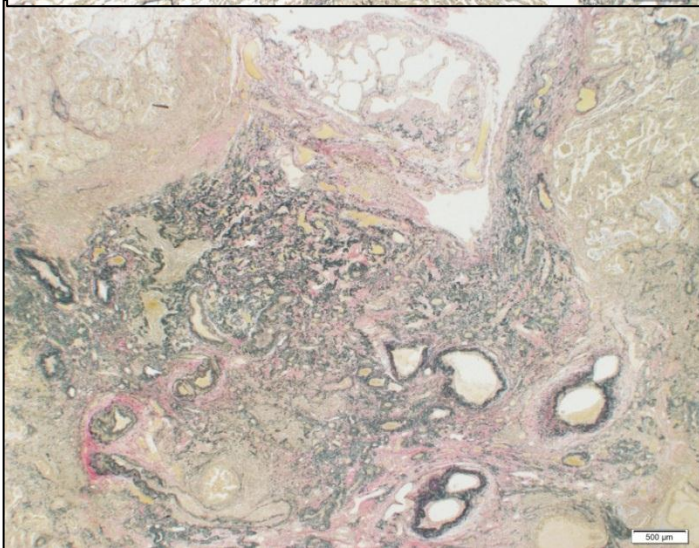
石灰小体



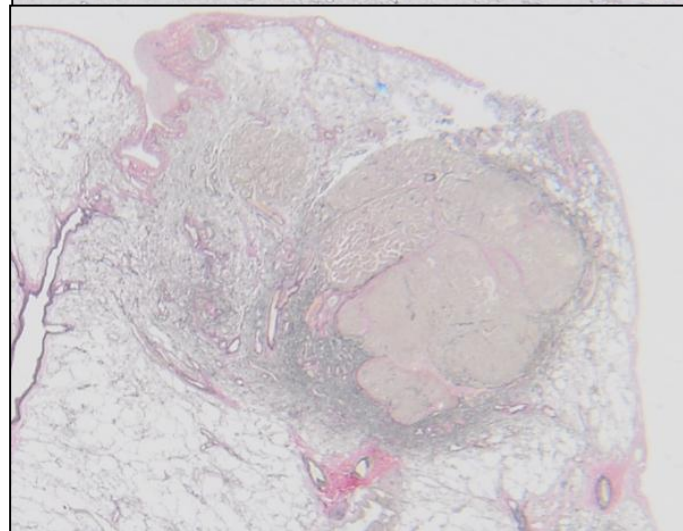
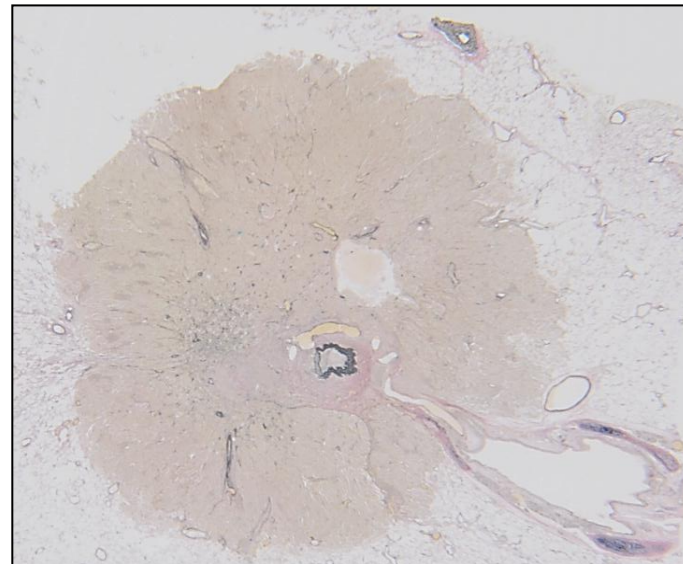
5A4
Envison Flex+

EGFR vs. ALK肺癌のルーペ像

EGFR mutation(+)
Lepidic growth(+)



EML4-ALK fusion(+)
Lepidic growth(-)

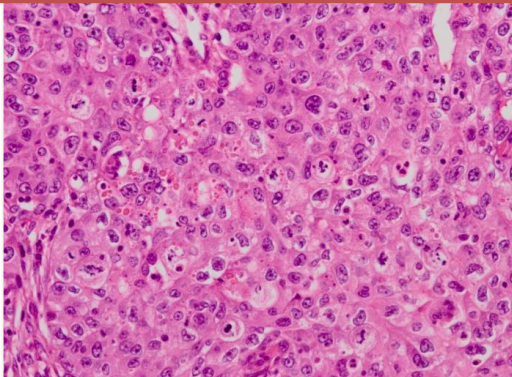


ALK肺癌の腺癌/扁平上皮癌マーカー染色性

IHC	Current study	Yoshida*
TTF-1	95.6%	72%*
P63	56.5%	72%*
p40	0%	

*Am J Sug Pathol 35;1226-1234, 2011

Squamous cell carcinoma



NSCLC-NOS



AD/Sq
marker IHC

Squamous cell carcinoma



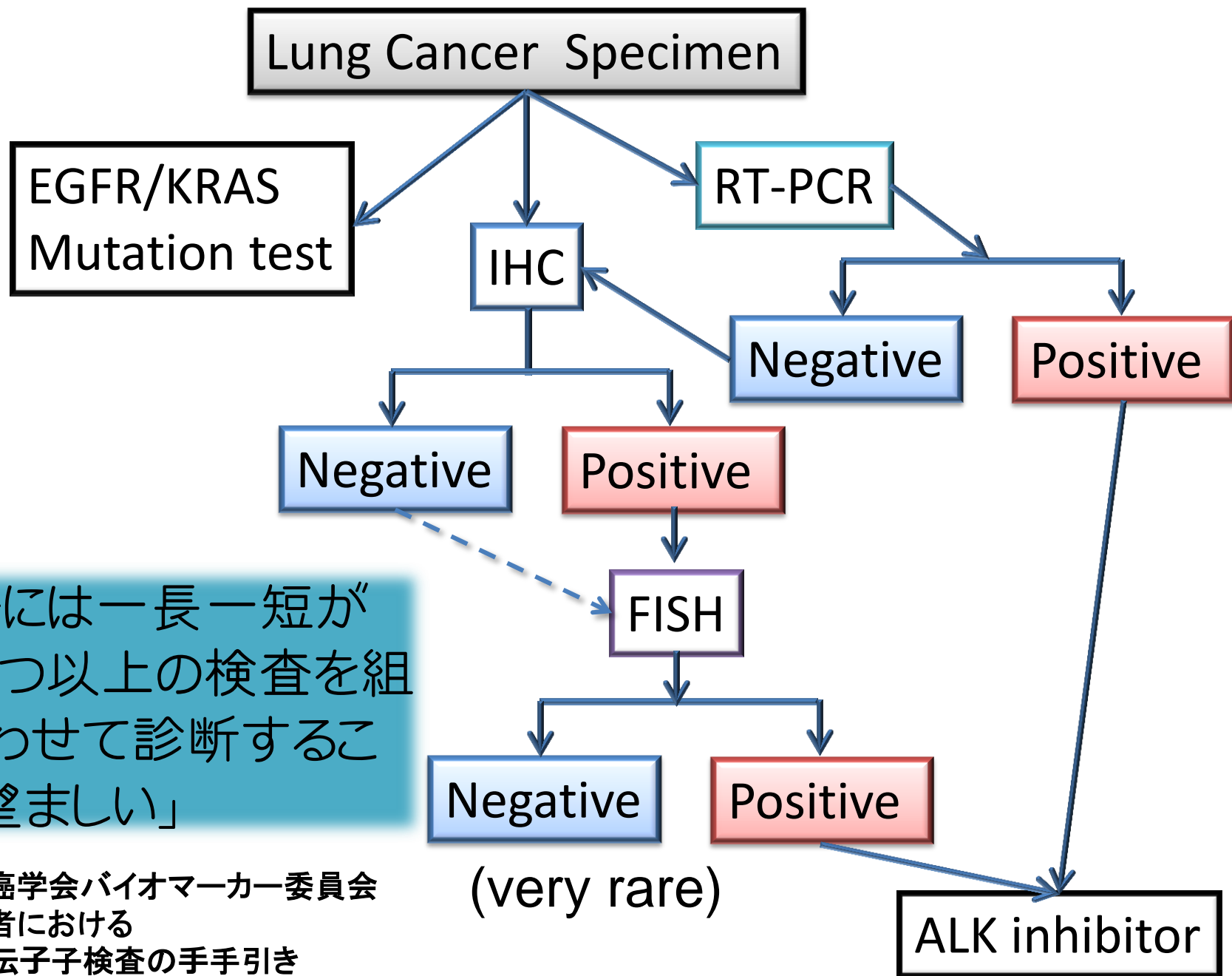
~~ALK-IHC, FISH~~

腺癌以外の組織型

	IHC	RT-PCR IHC	RT-PCR	IHC FISH・RT PCR	IHC FISH・RT PCR
AD	5/185 2.7%	5/149 3.4%	3/63 4.7%	50/2000 2.5%	30/713 4.2%
SQ	1/150 0.7%	0/48	4/48 8.3%		1/52 1.9%
ADSQ			2/2 100%	(3)	
others		0/24	0/4	(2)	
	2009 Baland	2008 Inamura	2009 Martelli	2011 Yoshida	2012 Murakami

ALK検査方法の比較

	RT-PCR	FISH	IHC
対象	RNA(cDNA)	DNA	蛋白
FFPE	△	○	○
感度・特異度	○	△	△
融合パートナー	△	○	○
組織と対比	×	△	○
検査技術	△	△	○
検査時間	○	×	△
再現性	○	△	○



「検査には一長一短があり、2つ以上の検査を組み合わせて診断することが望ましい」

2011.11
 日本肺癌学会バイオマーカー委員会
 肺癌患者における
 ALK 遺伝子検査の手引き

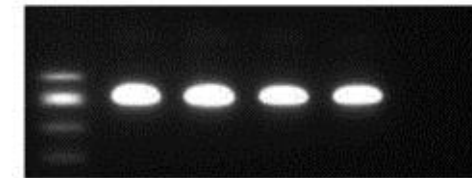
細胞診検体

H2228 : 0 10 100 1000 0 cells
 WBC (1x10⁶cells) : + + + + -

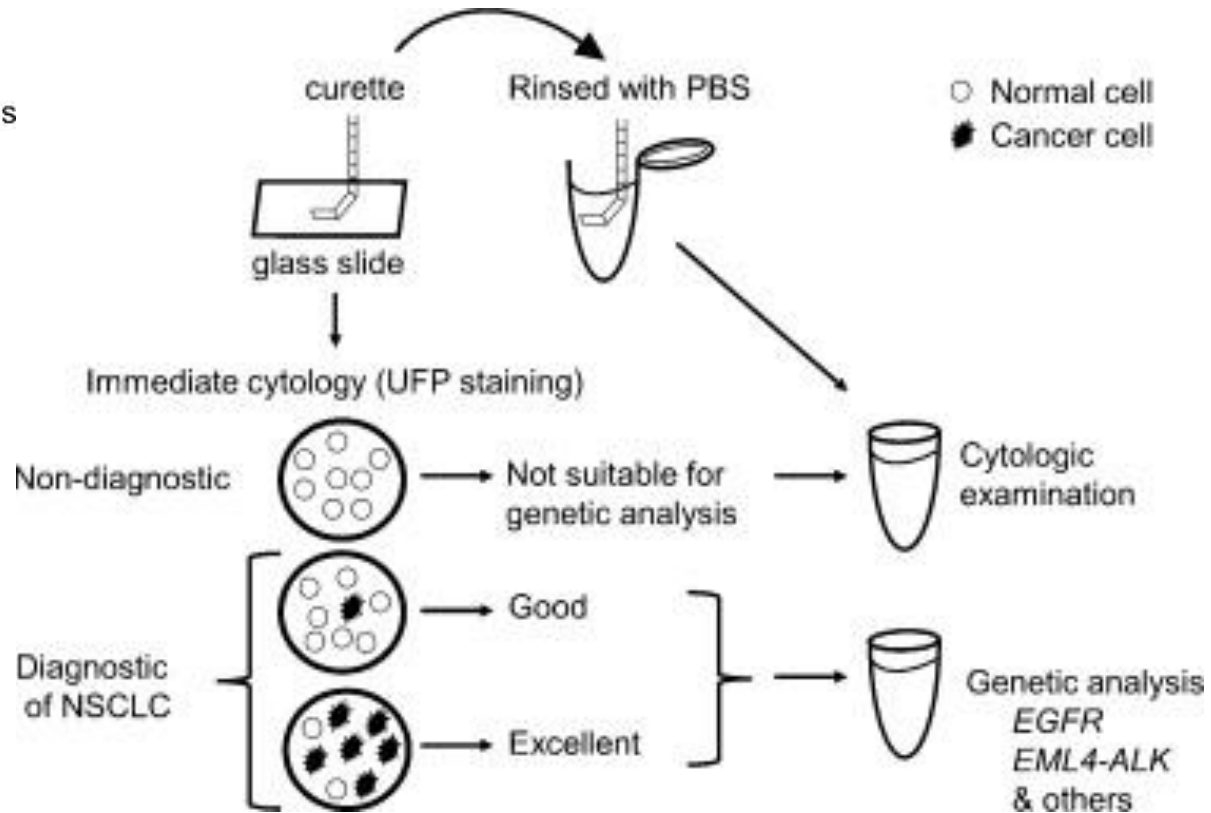
EML4-ALK
variant 3



β-actin



Marker



*Kanaji N.
 Lung Cancer 77,
 293–298, 2012*

- 組織学的に非腺癌を除外してよいか
扁平上皮癌と診断された症例のALK陽性率
0.7－8.3%
- IHC陰性を除外してよいか
FISHを基準 感度100%～85.5%
- FISH陰性を除外してよいか
RT-PCRを基準 感度 100%～58.3%
- EGFR, KRAS陽性を除外してよいか
合併報告あり

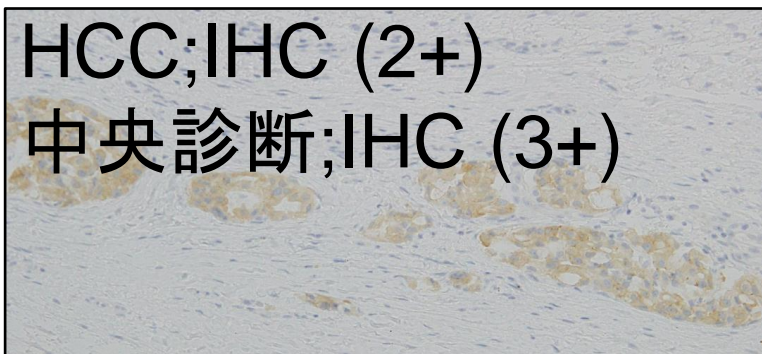
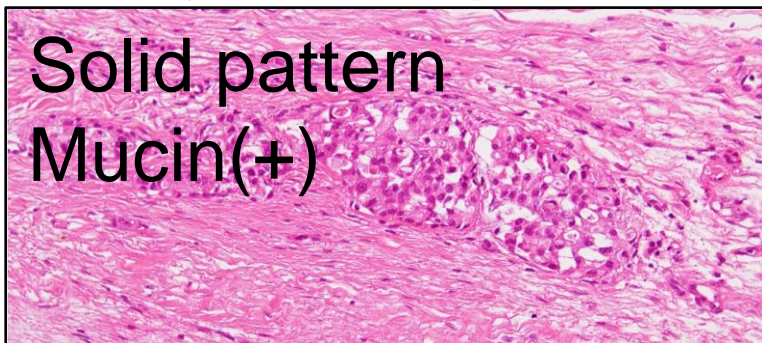
病理医は進行期肺癌で、角化を伴う扁平上皮癌を除くNSCLCに対しALK・IHCを行う

臨床医はIHC and/or FISH陰性であっても疑わしい場合は他の検査方法や異なるラボで再検

病理医・臨床医の選択眼

切除検体handlingの重要性

胸膜開胸生検症例



1005試験で4th line Crizotinib

外科的切除検体は
ホルマリン

1. 迅速に！
(～30min)
2. 長く浸けしない！
(3日以内)
3. 経気道的注入

凍結検体確保



ホルマリンの影響

FFPEでも-omics検索は可能
凍結検体確保も必要だが、まず
ちゃんとホルマリン固定ができているか
確認してください
IHC、FISHの検査結果に
大きな影響があります

KLC1-ALK: a novel fusion in lung cancer identified using a formalin-fixed paraffin-embedded tissue only.

Togashi Y. PloS One. 2012;7(2):e31323. Epub 2012