

<特集「医学系研究における画像解析と臨床への応用」>

胸腺上皮性腫瘍の画像解析を用いた トランスレーショナルリサーチ

石原 駿 太*

京都市立医科大学大学院医学研究科呼吸器外科学

Translational Research of the Thymic Epithelial Tumors Using Digital Image Analysis

Shunta Ishihara

Department of Thoracic Surgery,

Kyoto Prefectural University of Medicine Graduate School of Medical Science

抄 録

胸腺上皮性腫瘍は比較的稀な疾患であるがゆえにその治療に関するエビデンスが得られ難く、適応のある薬物療法は数少ない。デジタル・イメージ画像解析の応用は、胸腺上皮性腫瘍で新たながん薬物療法において有用なツールとなる可能性がある。一つはprogrammed death cell-1 (PD-L1) 発現の画像解析である。リンパ球が豊富な胸腺腫は、腫瘍細胞の同定が難しく目視でのPD-L1発現の評価が困難なため、画像解析による客観的評価が望ましい。もう一つは多重免疫染色である。多重免疫染色によるリンパ球解析は、胸腺上皮性腫瘍の腫瘍浸潤リンパ球や自己免疫性疾患発症に關与する腫瘍随伴リンパ球をパラフィン切片によって後方視的に評価する事ができ、免疫チェックポイント分子の発現や自己免疫性疾患発症のメカニズムを解明しうる。これらの知見により、新たな抗がん剤治療、特に免疫療法の適応を決めるエビデンスを構築できる可能性がある。

キーワード：胸腺上皮性腫瘍，画像解析，多重免疫染色。

Abstract

Establishing evidence-based novel anti-tumor drugs for managing thymic epithelial tumor (TET) is difficult due to its relatively rare nature. Because thymomas have abundant lymphocytes, it may be challenging to identify tumor cells and calculate PD-L1 expression. Quantitative assessment using digital image analysis may be utilized to resolve this issue. Multiplex immunohistochemistry enables retrospective evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes in TETs, and the paraffin sections using multiplex immunohistochemistry are used to evaluate the tumor-associated lymphocytes involved in the development of autoimmune diseases,

令和4年10月31日受付 令和4年10月31日受理

*連絡先 石原駿太 〒602-8566 京都市上京区河原町通広小路上路梶井町465番地

ishihara@koto.kpu-m.ac.jp

doi:10.32206/jkpum.131.12.975

and elucidate the expression of the immune checkpoint molecules and the mechanism of autoimmune disease development. The findings from these analyses may be used to determine the indication for new anti-tumor therapies, especially those utilizing immune checkpoint inhibitors.

Key Words: Thymic epithelial tumors, Digital image analyses, Multiplex immunohistochemistry.

はじめに

胸腺上皮性腫瘍は一次免疫組織である胸腺から発生する比較的稀な悪性上皮性腫瘍で、その組織型は低悪性度のType A胸腺腫から高悪性度のType B3胸腺腫や胸腺癌、胸腺内分泌腫瘍まで様々である。Type B胸腺腫では未熟リンパ球を多く含み、胸腺腫の特徴的な合併症として、重症筋無力症などの自己免疫性疾患を発症する。胸腺腫に随伴する未熟リンパ球が自己抗体産生に関与する事が知られているが、詳細な機序については不明な部分が多い。本稿では、臨床的および組織学的にさまざまな様相を呈する胸腺上皮性腫瘍について、当教室と分子病態病理学教室との共同研究で行なっている画像解析を用いた免疫チェックポイント分子の解析や、自己免疫性疾患発症のメカニズム解明の試みについて紹介する。

胸腺上皮性腫瘍における臨床の課題

胸腺上皮性腫瘍は、WHO組織分類で核異形や細胞構造により胸腺腫・胸腺癌・胸腺内分泌腫瘍に分類され、胸腺腫はさらに胸腺上皮性腫瘍の形態とリンパ球の多寡によりType A, AB, B1, B2, B3に分類される¹⁾。組織学的にType A, Type B1などは悪性度が低くType B3は悪性度が高く周囲臓器への浸潤能を有し予後不良とされる。低悪性度の胸腺腫であっても悪性上皮性腫瘍に分類されるため切除可能であれば外科切除の適応となる。自己免疫性疾患の発症に腫瘍周囲の胸腺組織も関与するとされる場合は胸腺腫を含む胸腺全摘出術²⁾、もしくは胸腺部分切除が推奨される^{3,4)}。根治切除不能な腫瘍は薬物療法が主体であり、シスプラチンとアンスラサイクリン系を含むレジメンが推奨されているが、

希少腫瘍のためランダム化比較試験が行なえず、そのエビデンスは第II相試験や後方視的研究による報告のみによる⁵⁻⁸⁾。新たな抗癌剤治療が模索されており、近年多くの癌種で効果が示されている免疫チェックポイント分子阻害薬についても幾つかの臨床試験が実施され^{9,12)}、Choらが行なった抗programmed death cell-1 (PD-1)抗体であるpembrolizumabの第II相試験は一定の抗腫瘍効果を示したが、約70%に自己免疫性疾患を合併し、他の癌種と比較しても高い頻度であったため、臨床に導入されるには課題の残る結果であった¹⁰⁾。

免疫療法のbiomarkerとなるPD-L1発現について、胸腺上皮性腫瘍では複数の論文で高発現を示す事が報告されており¹³⁻¹⁶⁾、報告によって発現にばらつきがあるが、悪性度の高い組織型で高発現を示す傾向にある。我々のグループでも66例の胸腺上皮性腫瘍のPD-L1発現を検索した¹⁴⁾。手術切除されたホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いて、抗PD-L1抗体(clone: SP263)による免疫染色を行い、2名の病理医によりPD-L1陽性腫瘍割合(Tumor proportion score: TPS)を算出し、各組織型におけるPD-L1発現率、および予後との相関を確認した。組織間でPD-L1発現率は大きく異なっており、低悪性度とされるType AやType B1胸腺腫ではTPSは低く、Type B2, B3ではTPSが有意に高い結果となった(Figure 1A)。また興味深いことにType A胸腺腫の中でも浸潤傾向を有し予後不良とされるAtypical Type A胸腺腫¹⁷⁾では高発現を示した(Figure 1B)。PD-L1高発現群・低発現群の予後を比較すると、高発現群で有意に予後不良であった(Figure 1C)。胸腺上皮性腫瘍は悪性度が高く予後不良な症例でPD-L1高発現を示しており、免疫チェックポイント阻害薬が有効な集

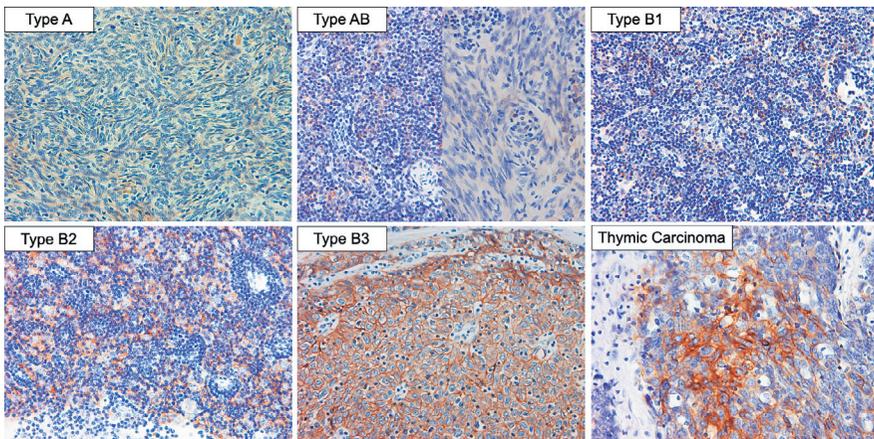


Figure 1A

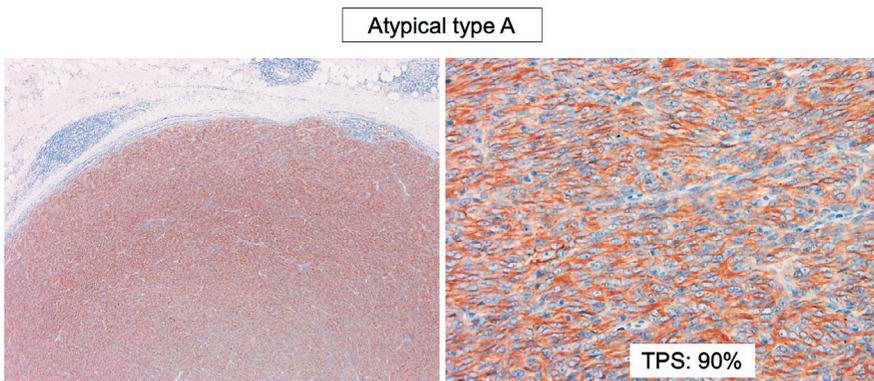


Figure 1B

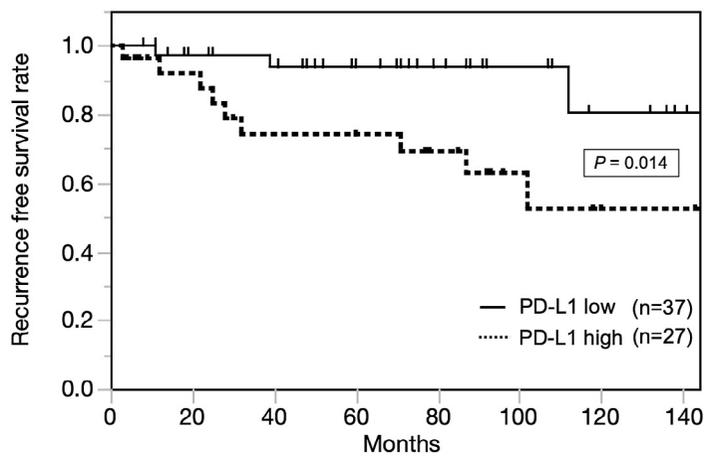


Figure 1C

Figure 1. 胸腺上皮性腫瘍のPD-L1免疫染色. A: 各組織型でのPD-L1免疫染色. B: Atypical type A胸腺腫のPD-L1免疫染色. C: PD-L1発現高値群/低値群を比較したKaplan-Meier曲線. (TPS: tumor proportion score)

団が含まれる可能性がある。

胸腺腫は23-32.8%に重症筋無力症を発症し^{18,20)}、その他にも頻度は低いが赤芽球癆や関節リウマチ、低ガンマグロブリン血症、Sjogren症候群、橋本病などの自己免疫性疾患を発症することがある²⁰⁾。正常胸腺では、外側の皮質構造と内側の髄質構造が存在する。骨髓由来の前駆T細胞が胸腺皮質髄質境界領域の血管から胸腺皮質へ移入し、T細胞受容体遺伝子(TCR)の再構成を受けCD4/CD8陽性T細胞(double positive: DP)に分化する。胸腺皮質上皮細胞に提示された自己ペプチド(MHC複合体)による正の選択(positive selection)を受け、CD4陽性T細胞あるいはCD8陽性T細胞(single positive: SP)に分化する。皮質から髄質に移入し負の選択(negative selection)を受ける。胸腺髄質上皮細胞や樹状細胞に提示された自己ペプチドに高い親和性をもつ細胞は死滅する²¹⁾。胸腺髄質細胞はMHC複合体においてゲノム上の全ての遺伝子を発現しており、AIRE(autoimmune regulator gene)がこれを調整する²²⁾。胸腺腫はT細胞分化誘導をある程度保持するが²³⁾、AIREの欠損などによりnegative selectionが障害され^{24,25)}、自己反応性T細胞が淘汰されずに自己免疫性疾患を発症する機序が報告されている²⁶⁾。まだまだ詳細なメカニズムは不明な部分が多く、programmed death-1/programmed death ligand-1(PD-1/PD-L1)シグナルによる免疫寛容についても、胸腺腫の自己免疫性疾患と関連している可能性があると考えている。

胸腺上皮性腫瘍と画像解析

1. 胸腺腫瘍のPD-L1と画像解析

各免疫チェックポイント阻害薬には治療適応となるTPSのカットオフ値が設定されており、病理医がPD-L1発現腫瘍細胞を目視でカウントし判定する。腫瘍の染色性の不均一や再現性、樹状細胞・マクロファージによる偽陽性により、測定者間でスコアの乖離が生じる事が課題とされる²⁷⁾。特に胸腺上皮性腫瘍のTPS測定は、随伴するリンパ球を多く含むため腫瘍細胞の同定が難しい(Figure 2A)。我々は、客観的で定量

的なPD-L1の評価のため、Whole-Slideのデジタルスライド技術を応用した画像解析によるTPSの算出を試みた。殆どの胸腺上皮性腫瘍で発現するpan-cytokeratinの免疫染色とPD-L1の免疫染色の全病理切片をスライドスキャナNano Zoomer[®]でデジタルデータとして取り込み、染色領域をRegion Of Interest(ROI)として画像解析ソフトFiji[®]で自動解析した。pan-cytokeratin発現領域を分母、PD-L1発現領域を分子とし、画像解析によるTPS(TPS using image analysis; TPS-IA)として算出した(Figure 2B)。各組織におけるTPS-IAは目視で算出したTPS(TPS-V)と良く相関し、TPS-IA高発現群で有意に予後不良であり、予後予測因子としても有用であった。ただし胸腺腫では細胞異型が強くpan-cytokeratinの発現が不均一でTPS-IAとTPS-Vに乖離が見られた。Pan-cytokeratinを用いたPD-L1の画像解析は胸腺腫において有用なツールであった¹⁴⁾。この手法はTPSを面積として測定している点で、PD-L1発現細胞をカウントするTPS-Vと本質的に異なっており、細胞認識ソフト等を応用しさらなる技術の進歩が望まれる。近年免疫チェックポイント阻害薬が使用されるがん領域でのPD-L1発現デジタル解析の研究は飛躍的に進歩している。Whole-Slideのデジタルスライド技術は既に広く臨床病理で用いられている²⁸⁾。さらに自動機械学習やDeep Learningを用いたアルゴリズムを利用した細胞認識で腫瘍細胞を正確に検出する手法が開発されており、非小細胞肺癌での画像解析によるPD-L1発現率は、病理医との高い一致率を報告している²⁹⁾。また機械学習は免疫細胞の除去や組織染色など人為的な偽陽性を少なくする³⁰⁾。今後も免疫療法は様々な腫瘍への適応拡大が予想され、PD-L1発現の画像解析はさらなる発展が期待される。

2. 胸腺上皮性腫瘍の多重免疫染色を用いたリンパ球解析

胸腺上皮性腫瘍に特徴的である自己免疫性疾患発症の機序について調べるには、腫瘍随伴リンパ球の研究が不可欠である。リンパ球解析ではフローサイトメトリーなどシングルセル解析

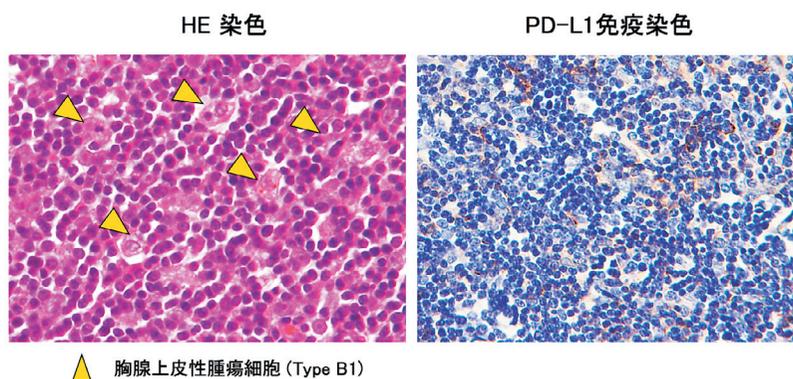


Figure 2A

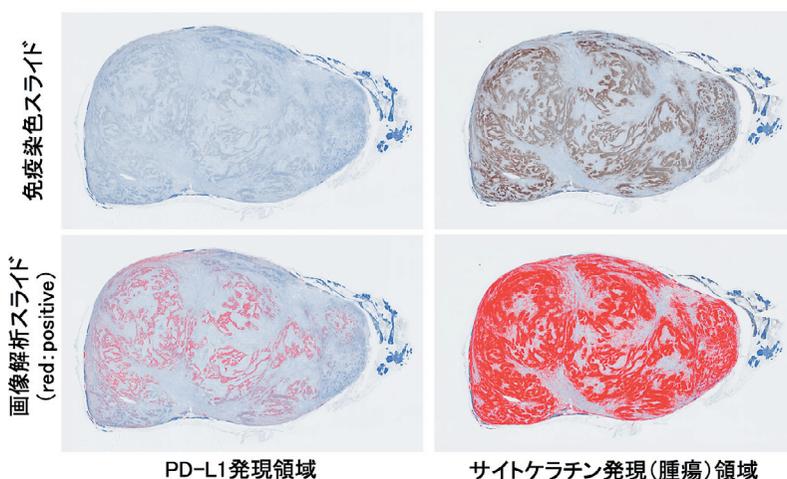


Figure 2B

Figure 2. 胸腺上皮性腫瘍の画像解析. A: 胸腺腫の腫瘍細胞とPD-L1発現. B: PD-L1スコアの画像解析: Tumor proportion score by image analysis (TPS-IA) = 画像解析PD-L1発現領域 (下段左) / 画像解析サイトケラチン発現領域 (下段右).

を用いる事が多いが、新鮮検体が必要であり希少な胸腺腫で多くのサンプルを収集する事は難しい。最近ではNational Institutes of Health/National Human Genome Researchが公開している遺伝子データベース情報とシングルセル解析の結果を繋ぎ合わせ、より多くの情報を拾集し結論を導くような研究も報告されている³¹⁾。我々は、多重免疫染色法による胸腺上皮性腫瘍のリンパ球解析を試みている。多重免疫染色は、

辻川らが開発した研究手法で³²⁾、水溶性の発色剤を用いて免疫染色を行い、スライドを画像データに取り込み、細胞の位置を合わせる事で各細胞における複数の抗体の発現を確認できる。病理標本上でシングルセル解析ができるようになる。この手法を用いれば、病理標本を用いて後方視的にリンパ球解析ができるため、希少な胸腺腫瘍にとって解析サンプル数を増やす事ができる大変有用なツールである。我々は株式会

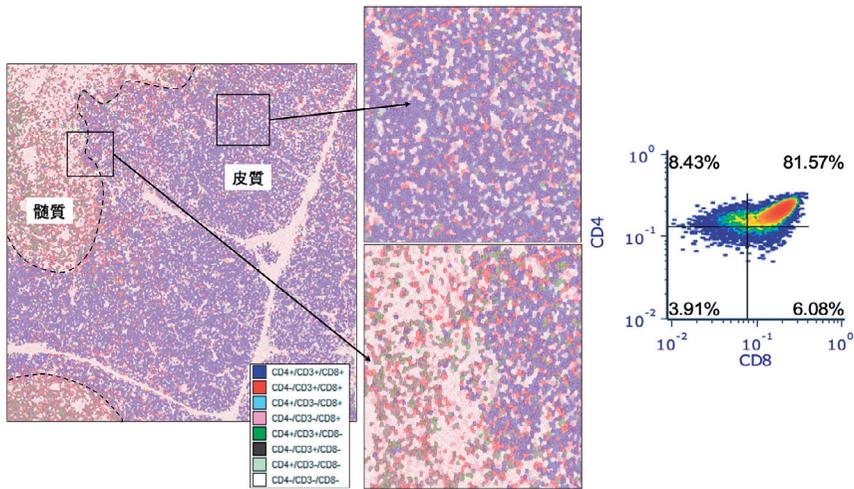


Figure 3. 多重免疫染色による小児胸腺のリンパ球解析. (左図) 各分化段階のリンパ球をプロットしたデジタル統合画像. (右図) CD4/CD8発現のイメージサイトメトリー.

社SCREENとの共同研究で、胸腺上皮性腫瘍の多重免疫染色によるリンパ球解析を行なっている。多重免疫染色の工程で重要な「細胞認識」をDeep Learningによるプログラムを用いる事で、非常に密な胸腺腫随伴リンパ球でも効率よく細胞を識別する事ができる。これまでに小児胸腺内の多重免疫染色によるリンパ球解析を行い、小児胸腺内における各分化段階におけるリンパ球の分布を組織切片上で確認する事ができた (Figure 3)。胸腺上皮性腫瘍はリンパ球の関与が大きく、多重免疫染色による腫瘍浸潤リンパ球や自己免疫性疾患を誘発する腫瘍随伴リンパ球の解析によって、胸腺上皮性腫瘍の腫瘍免疫や自己免疫性疾患の機序が明らかになるかもしれない。

3. 画像解析による免疫チェックポイント阻害薬の新規 biomarker 探索

先に述べたようにPD-L1高発現を示す胸腺上皮性腫瘍において、免疫チェックポイント阻害薬による自己免疫性疾患の合併は新規癌薬物療法を模索する上で重要な課題である。我々は、胸腺腫内の腫瘍随伴リンパ球の多重免疫染色を行い、リンパ球分画を分類し自己免疫性疾患に

関連する遺伝子が発現しているか分析する事で、自己免疫性疾患発症を予測する遺伝子およびリンパ球レパトリを同定する事を目的とした研究を行なっている。また抗腫瘍効果を有する浸潤リンパ球 (Tumor Infiltrating Lymphocyte) についても、多重免疫染色で同時に評価できる。これらの結果から、免疫チェックポイント阻害薬による抗腫瘍効果があり、かつ副作用を最小限に抑えられる biomarker としてのリンパ球が選別できる可能性がある。

おわりに

胸腺上皮性腫瘍の研究では基礎研究が多く、自己免疫性疾患発症の機序についての制御性T細胞やAIRE遺伝子の関与など、重要な因子が多数報告がされているが、臨床に应用されるような研究は少ない。画像解析や多重免疫染色のような、これまでの基礎研究結果を臨床に应用できる研究手法を模索する事が重要であると考える。

謝 辞

本研究にあたり小児胸腺を御提供頂きました小児心臓血管外科・山岸正明先生、前田吉宣先

生, 本宮久之先生, また分子病態病理部・森美幸様, 画像解析では萩寛志先生, PD-L1 発現率を評価していただいた児玉良典先生, 研究を指導して頂いた伊東恭子教授にこの場をお借りし

て深謝申し上げます。

開示すべき潜在的利益相反状態はない。

文 献

- 1) Travis WD, Brambilla E, Burke AP, Marx A, Nicholson AG. Introduction to The 2015 World Health Organization Classification of Tumors of the Lung, Pleura, Thymus, and Heart. *J Thorac Oncol*, 10: 1240-1242, 2015.
- 2) Okumura M, Ohta M, Takeuchi Y, et al. The immunologic role of thymectomy in the treatment of myasthenia gravis: implication of thymus-associated B-lymphocyte subset in reduction of the anti-acetylcholine receptor antibody titer. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 126: 1922-1928, 2003.
- 3) Gu Z, Fu J, Shen Y, et al. Thymectomy versus tumor resection for early-stage thymic malignancies: a Chinese Alliance for Research in Thymomas retrospective database analysis. *J Thorac Dis*, 8: 680-686, 2016.
- 4) Pulle MV, Asaf BB, Puri HV, Bishnoi S, Kumar A. Meta-Analysis of Limited Thymectomy versus Total Thymectomy for Masaoka Stage I and II Thymoma. *J Chest Surg*, 54: 127-136, 2021.
- 5) Giaccone G, Ardizzoni A, Kirkpatrick A, Clerico M, Sahnoud T, van Zandwijk N. Cisplatin and etoposide combination chemotherapy for locally advanced or metastatic thymoma. A phase II study of the European Organization for Research and Treatment of Cancer Lung Cancer Cooperative Group. *J Clin Oncol*, 14: 814-820, 1996.
- 6) Kunitoh H, Tamura T, Shibata T, et al. A phase-II trial of dose-dense chemotherapy in patients with disseminated thymoma: report of a Japan Clinical Oncology Group trial (JCOG 9605). *Br J Cancer*, 101: 1549-1554, 2009.
- 7) Loehrer PJ, Sr., Kim K, Aisner SC, et al. Cisplatin plus doxorubicin plus cyclophosphamide in metastatic or recurrent thymoma: final results of an intergroup trial. The Eastern Cooperative Oncology Group, Southwest Oncology Group, and Southeastern Cancer Study Group. *J Clin Oncol*, 12: 1164-1168, 1994.
- 8) Lemma GL, Lee JW, Aisner SC, et al. Phase II study of carboplatin and paclitaxel in advanced thymoma and thymic carcinoma. *J Clin Oncol*, 29: 2060-2065, 2011.
- 9) Katsuya Y, Horinouchi H, Seto T, et al. Single-arm, multicentre, phase II trial of nivolumab for unresectable or recurrent thymic carcinoma: PRIMER study. *Eur J Cancer*, 113: 78-86, 2019.
- 10) Cho J, Kim HS, Ku BM, et al. Pembrolizumab for Patients With Refractory or Relapsed Thymic Epithelial Tumor: An Open-Label Phase II Trial. *J Clin Oncol*, 37: 2162-2170, 2019.
- 11) Giaccone G, Kim C, Thompson J, et al. Pembrolizumab in patients with thymic carcinoma: a single-arm, single-centre, phase 2 study. *Lancet Oncol*, 19: 347-355, 2018.
- 12) Rajan A, Heery CR, Thomas A, et al. Efficacy and tolerability of anti-programmed death-ligand 1 (PD-L1) antibody (Avelumab) treatment in advanced thymoma. *J Immunother Cancer*, 7: 269, 2019.
- 13) Owen D, Chu B, Lehman AM, et al. Expression Patterns, Prognostic Value, and Intratumoral Heterogeneity of PD-L1 and PD-1 in Thymoma and Thymic Carcinoma. *J Thorac Oncol*, 13: 1204-1212, 2018.
- 14) Ishihara S, Okada S, Ogi H, et al. Programmed death-ligand 1 expression profiling in thymic epithelial cell tumors: Clinicopathological features and quantitative digital image analyses. *Lung Cancer*, 145: 40-47, 2020.
- 15) Rouquette I, Taranchon-Clermont E, Gilhodes J, et al. Immune biomarkers in thymic epithelial tumors: expression patterns, prognostic value and comparison of diagnostic tests for PD-L1. *Biomark Res*, 7: 28, 2019.
- 16) Higuchi R, Goto T, Hirotsu Y, et al. PD-L1 Expression and Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Thymic Epithelial Neoplasms. *J Clin Med*, 8, 2019.
- 17) Green AC, Marx A, Strobel P, et al. Type A and AB thymomas: histological features associated with increased stage. *Histopathology*, 66: 884-891, 2015.
- 18) Kondo K, Monden Y. Therapy for thymic epithelial tumors: a clinical study of 1,320 patients from Japan. *Ann Thorac Surg*, 76: 878-884; discussion 884-875,

- 2003.
- 19) Padda SK, Yao X, Antonicelli A, et al. Paraneoplastic Syndromes and Thymic Malignancies: An Examination of the International Thymic Malignancy Interest Group Retrospective Database. *J Thorac Oncol*, 13: 436-446, 2018.
 - 20) Nakajima J, Okumura M, Yano M, et al. Myasthenia gravis with thymic epithelial tumour: a retrospective analysis of a Japanese database. *Eur J Cardiothorac Surg*, 49: 1510-1515, 2016.
 - 21) Klein L, Kyewski B, Allen PM, Hogquist KA. Positive and negative selection of the T cell repertoire: what thymocytes see (and don't see). *Nat Rev Immunol*, 14: 377-391, 2014.
 - 22) Anderson MS, Venanzi ES, Klein L, et al. Projection of an immunological self shadow within the thymus by the aire protein. *Science*, 298: 1395-1401, 2002.
 - 23) Inoue M, Fujii Y, Okumura M, et al. Neoplastic thymic epithelial cells of human thymoma support T cell development from CD4-CD8- cells to CD4+ CD8+ cells in vitro. *Clin Exp Immunol*, 112: 419-426, 1998.
 - 24) Scarpino S, Di Napoli A, Stoppacciaro A, et al. Expression of autoimmune regulator gene (AIRE) and T regulatory cells in human thymomas. *Clin Exp Immunol*, 149: 504-512, 2007.
 - 25) Marx A, Hohenberger P, Hoffmann H, et al. The autoimmune regulator AIRE in thymoma biology: autoimmunity and beyond. *J Thorac Oncol*, 5: S266-272, 2010.
 - 26) Okumura M, Fujii Y, Shiono H, et al. Immunological function of thymoma and pathogenesis of paraneoplastic myasthenia gravis. *Gen Thorac Cardiovasc Surg*, 56: 143-150, 2008.
 - 27) Ratcliffe MJ, Sharpe A, Midha A, et al. Agreement between Programmed Cell Death Ligand-1 Diagnostic Assays across Multiple Protein Expression Cutoffs in Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res*, 23: 3585-3591, 2017.
 - 28) Kumar N, Gupta R, Gupta S. Whole Slide Imaging (WSI) in Pathology: Current Perspectives and Future Directions. *J Digit Imaging*, 33: 1034-1040, 2020.
 - 29) Wu J, Lin D. A Review of Artificial Intelligence in Precise Assessment of Programmed Cell Death-ligand 1 and Tumor-infiltrating Lymphocytes in Non-Small Cell Lung Cancer. *Adv Anat Pathol*, 28: 439-445, 2021.
 - 30) Paces W, Ergon E, Bueche E, et al. A digital assay for programmed death-ligand 1 (22C3) quantification combined with immune cell recognition algorithms in non-small cell lung cancer. *Sci Rep*, 12: 9745, 2022.
 - 31) Yasumizu Y, Ohkura N, Murata H, et al. Myasthenia gravis-specific aberrant neuromuscular gene expression by medullary thymic epithelial cells in thymoma. *Nat Commun*, 13: 4230, 2022.
 - 32) Tsujikawa T, Kumar S, Borkar RN, et al. Quantitative Multiplex Immunohistochemistry Reveals Myeloid-Inflamed Tumor-Immune Complexity Associated with Poor Prognosis. *Cell Rep*, 19: 203-217, 2017.

著者プロフィール



石原 駿太 Shunta Ishihara

所属・職：京都府立医科大学呼吸器外科学・助教

略歴：2009年3月 川崎医科大学卒業

2009年4月 京都府立医科大学附属病院 研修医

2010年4月 京都第二赤十字病院 研修医

2011年4月 京都府立医科大学附属病院 呼吸器外科入局

2014年2月 綾部市立病院 呼吸器外科 医長

2017年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科 入学

2021年3月 京都府立医科大学大学院医学研究科 修了

2021年4月 京都府立医科大学大学院医学研究科 呼吸器外科学 病院助教

2021年7月～現職

専門分野：肺癌，縦隔腫瘍，気胸

- 主な業績：1. Iwasaki M, Ishihara S, Okada S, Shimegi R, Shimomura M, Inoue M. Prognostic Impact of Using Combined Plasma Fibrinogen Level and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Resectable Non-small Cell Lung Cancer. *Ann Surg Oncol*, 2022; **29**(9): 5699-5707.
2. Okada S, Shimomura M, Ishihara S, Ikebe S, Furuya T, Inoue M. Clinical significance of postoperative pulmonary complications in elderly patients with lung cancer. *Interact Cardiovasc Surg*, 2022; **35**(2): 153.
3. Shimomura M, Ishihara S, Okada S, Inoue M. Robotic subxiphoid-optical thymectomy. *Interact Cardiovasc Surg*. 2022; **35**(2): 104.
4. Iwasaki M, Ishihara S, Shimomura M, Inoue M. Endoscopic Surgery Using Ultrasonic Energy Device for Tracheal Metastatic Tumor. *Ann Thorac Surg*, 2022; **114**(3): 189-191.
5. Shimomura M, Iwasaki M, Ishihara S, Inoue M. Volume-Based Consolidation-to-Tumor Ratio Is a Useful Predictor for Postoperative Upstaging in Stage I and II Lung Adenocarcinomas. *Thorac Cardiovasc Surg*, 2022; **70**(3): 265-272.
6. Takeda-Miyata N, Konishi E, Tanaka T, Shimomura M, Tsunozuka H, Okada S, Ishihara S, Ishikawa N, Inoue M. Prognostic significance of spread through air spaces in pulmonary metastases from colorectal cancer. *Lung Cancer*, 2020; **149**: 61-67.
7. Okada S, Shimomura M, Tsunozuka H, Ishihara S, Ishikawa N, Kameyama K, Kitaoka S, Inoue M. One-stage closure of large bronchopleural fistula with pedicled latissimus dorsi muscle flap after preemptive antibiotics: A case report. *Int J Surg Case Rep*. 2020; **74**: 257-259.
8. Okada S, Shimomura M, Tsunozuka H, Teramukai S, Ishihara S, Shimada J, Inoue M. Prognostic Significance of Perioperative C-Reactive Protein in Resected Non-Small Cell Lung Cancer Semin Thorac Cardiovasc Surg, 2020; **32**(4): 1046-1055.
9. Ishihara S, Okada S, Ogi H, Kodama Y, Shimomura M, Tsunozuka H, Itoh K, Marx A, Inoue M. Programmed death-ligand 1 expression profiling in thymic epithelial cell tumors: clinicopathological features and quantitative digital image analyses. *Lung Cancer*, 2020; **147**: 40-47.
10. Okada S, Shimomura M, Tsunozuka H, Ishihara S, Ikebe S, Furuya T, Shimada J, Teramukai S, Inoue M. High Neutrophil Count as a Negative Prognostic Factor for Relapse in Patients with Thymic Epithelial Tumor. *Ann Surgical Oncol*, 2020; **27**(7): 2438-2447.
11. Shimomura M, Ishihara S, Iwasaki M, Inoue M. Successful thoracoscopic evacuation of an extrapleural hematoma with delayed symptomatic pleural effusion: a case report. *Surg Case Rep*, 2019; **5**(1): 133.
12. Ishihara S, Ito K, Satoru Okada, Shimomura M, Shimada J, Yamaguchi T, Inoue M. Suppressive effects of aspirin for postthoracotomy pleural adhesion in rats. *Int J Med Sci*, 2019, **16**(4), 593-601.
13. Shimomura M, Ishihara S, Iwasaki M. Intractable pneumothorax due to rupture of subpleural rheumatoid nodules: a case report. *Surg Case Rep*, 2018; **4**(1): 89.
14. Okada S, Ito K, Shimada J, Kato D, Shimomura M, Tsunozuka H, Miyata N, Ishihara S, Furuya T, Inoue M. Clinical application of postoperative non-invasive positive pressure ventilation after lung cancer surgery. *Gen Thoracic Cardiovasc Surg*, 2018; **66**(10): 565-572.
15. Okada S, Itoh K, Ishihara S, Shimada J, Kato D, Tsunozuka H, Miyata N, Hirano S, Teramukai S, Inoue M. Significance of PD-L1 expression in pulmonary metastases from head and neck squamous cell carcinoma. *Surg Oncol*, 2018; **27**(2): 259-265.
16. Okada S, Shimada J, Teramukai S, Kato D, Tsunozuka H, Miyata N, Ishihara S, Furuya T, Nakazono C, Ishikawa N, Inoue M. Risk Stratification According to the Prognostic Nutritional Index for Predicting Postoperative Complications After Lung Cancer Surgery. *Ann Surgical Oncol*, 2018; **25**(5): 1254-1261.

