

氏 名 　　いとう ともひろ
伊東 智宏

学位の種類 　　博士（医学）

報告番号 　　甲第 1578 号

学位授与の日付 　　平成 27 年 9 月 13 日

学位授与の要件 　　学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

p16/CDKN2A FISH in Differentiation of Diffuse Malignant Peritoneal
Mesothelioma from Mesothelial Hyperplasia and Epithelial Ovarian
Cancer

（びまん性悪性腹膜中皮腫と反応性中皮過形成および上皮性卵巣癌と
の鑑別診断における p16/FISH の有用性の検討）

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	鍋島 一樹
（副査）	福岡大学	教授	白澤 専二
	福岡大学	教授	高松 泰
	福岡大学	准教授	久野 敏

【背景】

悪性中皮腫は中皮組織から発生する悪性度の高い、極めて予後不良の疾患である。腹膜は、胸膜に続いて2番目に発生頻度が高い。特に女性においては、びまん性腹膜悪性中皮腫は多量の腹水貯留や腹膜播種をきたす卵巣癌と臨床症状、画像所見および形態学的所見が類似しており、鑑別はしばしば困難な場合がある。びまん性腹膜悪性中皮腫は組織学的形態が多様であり、しばしば原発性卵巣癌・転移性卵巣癌の形態を模倣することがある。また、びまん性腹膜悪性中皮腫は、反応性中皮過形成とも組織学的に類似することがあり、鑑別に苦慮する場合がある。これらの鑑別診断に、免疫組織化学を用いた診断が推奨されているが、再現性の確立は十分なものとは言えない。最近の研究では、びまん性腹膜悪性中皮腫を正確に診断、早期発見し治療を開始できれば治療反応性も良好であり、予後の改善につながるとの報告がある。これらの正確な鑑別診断は非常に重要である。悪性胸膜中皮腫の中で最も一般的な遺伝子変化の一つに、癌抑制遺伝子である *p16* 遺伝子のホモ接合性欠失があり、中皮腫発症の原因の一つと考えられている。悪性胸膜中皮腫における *p16* fluorescence in situ hybridization (FISH) では、*p16* のホモ接合性欠失は中皮腫では43-92%認められ、反応性中皮組織ではすべて陰性であり、その鑑別において特異度は100%である。びまん性腹膜悪性中皮腫における *p16* FISH の研究は少なく、ホモ接合性欠失は

25-51%と報告されているが、十分ではない。

【目的】

本研究では、びまん性悪性腹膜中皮腫と卵巣癌および反応性中皮過形成との鑑別における *p16* FISH の有用性と注意点について検討した。

【対象と方法】

1993年8月から2012年1月に福岡大学病院病理部（他施設からのコンサルテーション症例を含む）で診断された、びまん性腹膜悪性中皮腫28例、2006年7月から2011年6月に福岡大学病院産婦人科で外科的切除術を施行された卵巣癌40例（漿液性腺癌、粘液性腺癌、類内膜腺癌、明細胞腺癌各10例）、反応性中皮過形成30例について、臨床病理学的検討およびFISH法を用いた *p16* 遺伝子のホモ／ヘテロ接合性欠失の検討を行った。9p21 シグナルが1つ消失しているものをヘテロ接合性欠失、2つとも消失しているものをホモ接合性欠失と定義した。ホモ接合性欠失、ヘテロ接合性欠失のカットオフ値は反応性中皮過形成の結果に基づいて、 $\text{mean}+3\text{SD}$ として算出し、ホモ接合性欠失では10%以上、ヘテロ接合性欠失では41%以上と設定した。

【結果】

1. びまん性腹膜悪性中皮腫では、*p16*FISH のシグナルの検出できた成功例は28例中19例（67.9%）であった。そのうちの手術標本での成功例は19例中16

例（82.4%）であった。シグナルの検出できなかった症例は3例（18.6%）あり、標本の古い症例であった。9例の剖検例では3例（33.3%）で成功、6例（66.7%）ではシグナルが得られなかった。19例の成功例の性別は、男性7例（36.8%）、女性12例（63.2%）であった。

2. 反応性中皮過形成30例では、正常パターンが $80.3\pm 8.9\%$ であったのに対して、ホモ接合性欠失が $1.7\pm 2.1\%$ 、ヘテロ接合性欠失が $17.6\pm 7.7\%$ であった。
3. 腹膜中皮腫では28例中9例でホモ接合性欠失が陽性（FISH成功例では19例中9例（47.4%））、3例がヘテロ接合性欠失が陽性であったのに対して、反応性中皮過形成では*p16*の欠失はすべて陰性であった（0%）。
4. 卵巣癌では、*p16* FISHはほとんどの症例で正常パターンを示した。卵巣癌のホモ接合性欠失およびヘテロ接合性欠失の平均値は、それぞれ7.9%、15.4%であった。卵巣癌では、前述のカットオフ値に従うと、全例ヘテロ接合性欠失、ホモ接合性欠失ともに陰性であった。

【考察】

1. 我々の知る限り、本研究はびまん性腹膜悪性中皮腫と反応性中皮過形成および卵巣癌との鑑別における*p16* FISH法の有用性についての最初の報告である。
2. ホモ接合性欠失が陽性の場合、*p16* FISHはびまん性腹膜悪性中皮腫と反応性中皮過形成あるいは卵巣癌との鑑別に有用である。*p16* FISHのホモ接合性欠

失の感度は47%であったが、その特異度は100%であり、*p16* FISHは有用な鑑別の補助的な手段といえる。

3. *p16*が検出されなかった症例には剖検例が多く含まれ、固定までに時間がかかってしまったことが原因と考えられた。

4. 卵巣癌のホモ接合性欠失の評価には限界と注意すべき点がある。

本研究での卵巣癌は、全例で*p16*の欠失が10%のカットオフ値を下回ったため、陰性と判定された。しかし、将来的に卵巣癌の症例数が増えてくると、ホモ接合性欠失が10%を超える症例もでてくる可能性がある。したがって、より多くの症例でのさらなる研究が必要である。

また、膵管癌や胆管癌では、*p16* FISHによるホモ接合性欠失の割合は50%と報告されている。びまん性腹膜中皮腫の陽性率と近似していて、*P16* FISHは鑑別に有用ではない。*P16* FISHの有用性と限界を知っておく必要がある。

審査の結果の要旨

本研究は、悪性腹膜中皮腫における p16 FISH (fluorescence in situ hybridization) のホモ接合性欠失に着目し、悪性腹膜中皮腫と反応性中皮過形成、悪性腹膜中皮腫と上皮性卵巣癌との鑑別における p16 FISH の有用性と注意点について明らかにした。適切に設定されたカットオフ値に基づいて、ホモ接合性欠失は、腹膜中皮腫ではシグナルの得られた 19 例中 9 例 (47.4%) で陽性であったのに対して、反応性中皮過形成 30 例および上皮性卵巣癌 40 例ではすべて陰性であった (0%)。従って、これらの鑑別診断において、p16 FISH によるホモ接合性欠失の検出は特異度 100%であり、感度は低いが、一旦陽性であれば診断を確定する有用な補助手段であることを示した。一方で、腹膜中皮腫とほぼ同率の陽性度を示す膵癌や胆管癌では鑑別手段として無効であることを指摘し、腹膜中皮腫の日常診断において重要な貢献をする論文となった。

1. 斬新さ

悪性腹膜中皮腫の病理診断において、反応性中皮過形成のみならず、上皮性卵巣癌との鑑別においても p16 FISH によるホモ接合性欠失の検出が有用であることを示した初めての報告である。

2. 重要性

悪性腹膜中皮腫と反応性過形成、卵巣癌とはその治療法、予後において大きな違いがあり、その鑑別は臨床上極めて重要である。しかし、現時点では絶対的な免疫組織化学的マーカーは存在せず、複数の抗体によるパネルを利用して、診断を推定しているに過ぎない。その意味で、感度は低いものの、特異度 100%という p16 FISH の応用は臨床的に有用である。さらに反応性過形成のみならず、卵巣癌との鑑別にも適応を広げたことは重要な意義を持つ。

3. 実験方法の正確性

p16 FISH は、胸膜中皮腫約 150 例、反応性中皮過形成約 75 例での施行・改良を通して得られた方法に基づいて、2 個のセントロメアプローブ・シグナルが得られた細胞のみで判定を行うという厳しい条件下で施行しており、その結果の信

頼性は高い。また、ホモ接合性欠失の判定も適切なカットオフ値の設定に基づいて、60~100個の細胞での検索・集計の結果であり、正確である。

4. 表現の明確さ

本論文はすでに *American Journal of Clinical Pathology* に掲載されているが、掲載号の論文中でも米国病理医の日常診療にとってより有用で教育的な論文として選択され、読者の到達度を測る問題作成も追加されている。表現の明確さを担保するものと考えられる。

5. 主な質疑応答

必ずしも発表の席上すべての質疑に答えることはできなかったが、後日の検討も加えて、回答した。

質問1：p16 遺伝子の分子機序として、CDK4/6, Rb 蛋白への作用を挙げていたが、p16 遺伝子座にはそれ以外にも腫瘍抑制遺伝子として重要な機序がある。それは何か？

答え：9p21 領域には、p16 と 2つのエクソンを共有する p14^{ARF} が存在する。p14^{ARF} は MDM2 を介した p53 タンパクの分解を阻害する。従って、9p21 のホモ接合性欠失の際には、Rb 系と p53 系という 2つの腫瘍抑制遺伝子の機能を失うことになる。

質問2：p16 遺伝子に遺伝的な（家族性の）異常があればどのようなことがおきるか？

答え：母斑、膀胱癌などが生じやすくなる。p16 遺伝子の変異を遺伝的に受け継ぐと、家族性異型多発母斑黒色腫症候群として知られる家族性の黒色腫/膀胱がん症候群を引き起こす。

質問3：ホモ接合性欠失の生じるメカニズムはどのように考えるか。

答え：p16 の欠失はこれまでに主として2つのタイプが報告されている。1つは、DNA 2本鎖の切断とそれに引き続く nonhomologous end-joining メカニズムによるものであり、頭頸部の扁平上皮癌などで報告されている。他の1つは、RAG (recombination activating genes) recombinase の異常な働きにより生じた recombination (組み換え) によるもので、T細胞性急性リンパ球性白血病細胞に認められる。

質問4：ホモ接合性欠失と比較してヘテロ接合性欠失ではどのようなことが起

きているか。ヘテロ接合性欠失例では対立遺伝子にメチル化などの変化がおきているのか？

答え：一般的には、p16 のヘテロ接合性欠失の際に、欠失の無いもう一方のアレルに、メチル化が生じて機能を喪失している例が報告されている。しかし、中皮腫（胸膜中皮腫）においては、メチル化は少ないとの報告がある。当研究室においても、ヘテロ接合性欠失がホモ接合性欠失よりも多く認められた症例において、メチル化の有無を検討したが、メチル化は認められなかった。

質問5：中皮腫 vs 卵巣癌の鑑別における desmin の免疫染色の有用性は？

答え：正常中皮において desmin の発現はある程度認められるが、悪性化に伴って減少し、中皮腫での免疫組織化学的陽性率は 10%ほどと報告されている。デスミンは筋原性マーカーであるため、卵巣癌では発現が見られないが、中皮腫での発現が低いため、両者の鑑別における desmin の免疫染色の有用性は低いと考えられる。

質問6：ヘテロ接合性欠失のカットオフ値 41%は高いと感じるが、その理由は何か。その理由として、反応性中皮過形成と診断した病変から中皮腫に移行するといった前駆病変が混在している可能性は考えられないか？中皮腫が予後が悪いのは、進行してから発見されることが原因なのではないのか？

答え：反応性中皮過形成でのヘテロ接合性欠失の数値は確かに高いが、これには標本作製上のアーチファクトによるものが含まれており、例えば正常パターンを示す細胞が、薄切の過程で 1 個のシグナルを失い、ヘテロとなっている可能性がある。事実、細胞診標本での p16 FISH では、このヘテロの値はずっと低くなっている。プローブの大きさによるアーチファクトの可能性もある。9p21 領域のサイズは 35 kb であるが、FISH に使用されるプローブは 190 kb で標識された断片より成る。そのために、35 kb 以外の部位にプローブ断片がハイブリダイズして赤色シグナルを得ている可能性がある。より短い 110 kb や 58 kb プローブを用いると、ヘテロが減り、ホモが多くなることを確認している。

ご指摘の通り、中皮腫の予後が悪いのは、ある時点からの病変の進行が速く、進行した状態で発見されることが多いからだと考えられる。

質問7：反応性中皮過形成は炎症などで起こることのことだが、本論文の Materials & Methods には、卵巣癌の播種を疑った症例の大綱から採取したと記

載されている。これはサンプルとして適切であるのか。反応性中皮過形成とするのは適切なのか？

答え：実際、卵巣癌症例の播種の確認のために切除された大網に生じていた中皮過形成を用いている。中皮過形成は、通常何等かの刺激の加わった中皮に生じる。その原因は、炎症であったり、癌の転移あるいは腹膜透析であったりする。中皮細胞増殖は認められるが、腫瘍性ではなく、その刺激に反応したもので、病理学的には反応性中皮過形成として問題はない。

質問 8：FISH の検出率が中皮腫だけ低い理由は？ホルマリン固定までの時間が影響していると、本論文に記載があったが、当院での症例なので、ほぼ条件は同じと考えられるのではないか？

答え：中皮腫症例は 1993 年など、20 年以上前の症例や、他施設の症例も含まれており、その際の固定までに要した時間の詳細は不明である。一定の条件とは断定できず、検出率の低値には、症例の保存状態やホルマリン固定までの時間（手術時間が長かった可能性、例えば腹腔内に広く播種した症例では腫瘍減量手術の際に全摘出までに時間がかかり、固定までの時間が長くなったなど）が関与していると考ええる。免疫染色では 48 時間を超えるホルマリンの過固定が発現率の低下の原因と考えられているが、FISH では（HER2 FISH での報告だが）ホルマリン固定までの時間が 1 時間を超えると、シグナルの検出率が著しく低下すると報告されている。

質問 9：p16 FISH は特異度が高いが、感度は低い。中皮腫において、p16 のホモ接合性欠失陽性例、陰性例で予後に違いがあるのか。p16 FISH のホモ接合性欠失陽性例と陰性例で免疫染色の結果に相違はあるか？

答え：胸膜中皮腫も、腹膜中皮腫も、p16 のホモ接合性欠失陽性例の方が予後悪い。p16 FISH のホモ接合性欠失の有無と免疫染色での結果に相関はないと報告されているし、当教室における約 150 症例の結果でも、明らかな相関は得られていない。

質問 10：p16 の検出率の低さから、中皮腫の発生機序が本質ではないかと思われる。それ以外の遺伝子異常は何があるのか？

答え：NF2 の変異や BAP1 の変異が関与しているといわれている。BAP1 は最近では、悪性中皮腫において欧米でも日本でも約 65%ほどで変異が見られると報告されており、p16 とならび最も変異の多い遺伝子と考えられる。

BAP1 の免疫染色（の欠失）が中皮腫において有用であると報告されており、今後 BAP1 の免疫染色と p16 FISH の併用が有用かもしれない。

質問 1 1 : 腹膜中皮腫の p16 遺伝子のホモ接合性欠失は全例にみられているわけではない。症例を増やして卵巣癌で p16 陽性例が出てくると、マーカーとして使えなくなるのではないか？

答え：その可能性は完全には否定できない。しかし、今回の卵巣癌 40 症例の検討で 1 例も陽性が無く、また文献的にも卵巣癌の sequence 解析による p16 の変異は mutation が主で、ホモ接合性欠失が主ではないので、今回の結果と大きく異なることは無いと考えられる。

質問 1 2 : p16 を除外した症例は何が work していなくて FISH 解析から除外したのか。除外したのは、セントロメアがみえなかったからなのか？中皮腫は染色体の微小欠失を起こしやすいのではないか？その一部として、p16 の欠失を捉えているのではないか？

答え：セントロメアのグリーンシグナルが 2 つとも検出できた細胞のみを FISH の判定に用いた。それ以外のは測定から省いた。

中皮腫において、染色体の微小欠失を起こしやすい可能性は否定できない。

質問 1 3 : 腹水細胞診で FISH をすると、ホルマリン固定の時間に関係なく検出できるのではないか？

答え：実際、腹水細胞診での p16 FISH は大変有用な診断手段であり、当教室でも行っている。細胞診ではアルコール固定が主となる。固定までの時間と結果との相関はまだ検討されていないが、組織と同様に重要な因子であると考えている。

以上の発表及び討議の結果を踏まえ、主査・副査で協議した結果、本論文は学位論文に値すると評価された。