

氏名	よしむら まさよ 吉村 雅代		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第1808号		
学位授与の日付	令和2年3月16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	Highly expressed EZH2 in combination with BAP1 and MTAP loss, as detected by immunohistochemistry, is useful for differentiating malignant pleural mesothelioma from reactive mesothelial hyperplasia （悪性胸膜中皮腫診断における免疫組織化学的 EZH2 高発現：BAP1、MTAP 免染との併用にて中皮腫と反応性中皮過形成との鑑別に有用である）		
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	藤田 昌樹
	福岡大学	教授	白澤 専二
	福岡大学	准教授	山下 眞一

内容の要旨

【目的】

悪性胸膜中皮腫（malignant pleural mesothelioma; MPM）は中皮由来の悪性腫瘍である。平均生存期間中央値は9.2から11.2カ月程で予後が悪い。MPMの診断においては反応性中皮過形成（reactive mesothelial hyperplasia; RMH）との鑑別が重要である。RMHは良性であるが、組織学的、細胞学的にMPMと似た形態をとる。そのため、両者の鑑別にdesmin, EMA, IMP3, GLUT-1, CD146といった免疫組織学的マーカーが用いられてきたが、これらは特異度が低く、個別の症例の診断には有用ではない。

近年、9p21領域に存在する*p16*遺伝子のホモ接合性欠失（ホモ欠失）をfluorescence *in situ* hybridization (FISH; 9p21 FISH)を用いて検出するもの、*BRCA1 associated protein 1 (BAP1)*遺伝子の変異に基づくBAP1蛋白の核からの消失（BAP1 loss）を免疫染色にて検出する方法がMPMとRMHの鑑別において個々の感度は低いものの特異度は100%であり、両者を組み合わせると感度が上がり有用であると報告されている。さらに、我々は9p21 FISHによる*p16*のホモ欠失の代替え法としてのmethylthioadenosine phosphorylase (MTAP) 遺伝子産物の発現消失(MTAP loss)を免染にて検出する方法について既に報告し、広く使われ始めている。

EZH2は、ポリコーム群蛋白質複合体であるPRC-2 (polycomb repressor complex 2)を構成する蛋白質の一つであり、MPMにおいて高発現が報告されている。

本研究ではMPMとRMHの鑑別におけるEZH2の有効性とBAP1、MTAP、EZH2の免染のみの組み合わせの有効性について検討した。

【対象と方法】

MPM 38例、RMH29例に対し、免染によるEZH2、BAP1、MTAPの発現及び9p21 FISHについて調べ、感度、特異度について検討した。免染の陽性コントロールとして、EZH2は乳癌、MTAPは肝臓組織を使用した。BAP1は間質細胞やリンパ球を内在性陽性コントロールとして用いた。すべての症例について高倍率で中皮細胞を500個カウントし、陽性率を求めた。カットオフ値は既報告に従いMTAPとBAP1は50%とした。EZH2は50%以下を低発現、50%以上を高発現とした。また、9p21 FISHのカットオフ値は11%とした。

【結果】

MPM38例中21例が男性で男女比は4.8:1であり、平均年齢は65.3歳であった。MPMは38例中、剖検症例1例、生検材料1例、残りは手術検体であった。組織分類は上皮型27例、二相型6例、肉腫型5例であった。平均フォローアップ期間は995日であった。RMH29例は全例ブラ手術検体で平均年齢は32.5歳であった。

免染の判定は、EZH2とBAP1は核での発現を評価した。コントロールより核の染色が低下した中皮細胞が50%以上であった場合BAP1 lossありと判定した。また、コントロールより細胞質及び核の染色の低下した中皮細胞を50%以上認めたものをMTAP lossありとした。

MPM症例におけるEZH2の陽性率は4.5~93.9%であり、RMH症例ではすべて40%未満であった。EZH2のカットオフ値を50%とするとMPM症例の44.7%が高発現となり、全てのRMH症例が低発現となった (Figure 3)。

EZH2、BAP1、MTAP、9p21 FISHの感度は44.7%、52.6%、47.4%、65.8%であり、特異度は全て100%であった (Table 1)。EZH2、BAP1、9p21 FISHの組み合わせの感度が89.5%と最も高いが、免染のみの組み合わせ (EZH2、BAP1、MTAP) でも86.9%と高感度が得られた。

EZH2と他のマーカー (BAP1、MTAP、9p21 FISH) に相関関係はなかった (Table 2)。しかし、EZH2の高発現と9p21 ホモ欠失は相関傾向を示した ($P=0.053$)。

予後解析は37例のMPM (上皮型27例、二相型5例、肉腫型4例) で行い、EZH2高発現は生存期間と逆相関した (Figure 4)。

【結論】

EZH2免染単独の感度は低いが、他のマーカーと組み合わせると感度が上昇した。BAP1免染と9p21 FISHの組み合わせでは感度は約80%であるが、EZH2を加えると約90%にまで上昇する。しかし、9p21 FISHは技術やコスト面からどの施設でも施行できる検査ではない。どの施設でも簡単に行える免染の組み合わせではEZH2、BAP1、MTAPの組み合わせが

最も高感度が得られ、実臨床では有用である。現在細胞診での応用にも取り組んでいる。

EZH2 高発現は予後が悪く、EZH2 阻害薬が MPM に抗腫瘍効果があるとされている。また、EZH2 阻害薬の第 II 相臨床試験 (ClinicalTrials.gov, NCT02860286) が開始されており、今後治療ターゲットとしても期待される

審査の結果の要旨

本論文は、悪性胸膜中皮腫の診断における免疫組織化学的 EZH2 高発現の有効性について示したものである。現在、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別には、FISH による 9p21 ホモ欠失、または免疫染色による MTAP または BAP1 欠失の有無で判断されている。本研究では、これらの方法に EZH2 免染を加えると良悪性の診断の感度があがることを示した。

1. 斬新さ

現在、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の良悪性の鑑別に、*CDKN2A*、*BAP1* といった遺伝子変異に基づいた判定方法が行われている。本研究で用いる EZH2 はエピジェネティックな異常に基づく検査方法でありながら上記鑑別における特異度 100%を示すという点が新しい着眼点である。さらに免疫染色という簡単な方法で検査可能という点は、すぐにどの施設でも応用できるものとする。

2. 重要性

悪性胸膜中皮腫は、平均生存期間中央値が 10 カ月程度と予後が悪く、今後も患者数は増加すると予想される疾患である。そのため免疫染色というどの施設でも可能な手法でありながら良悪性の鑑別にも有用な手法として EZH2 免染の有効性を示せたことは、今後の早期診断・早期治療につながると期待できる。

3. 研究方法の正確性

9p21 FISH 及び BAP1、MTAP 免疫染色は既に診断に応用されている確立された方法である。EZH2 免染においてもコントロール検体と共に施行されており染色方法に問題はないと考える。反応性中皮過形成 29 例の結果に基づき計算すると、平均値+4SD の値が 46%となった。特異度 100%を担保するカットオフ値として 50%を用いており、既報告でもその値の有効性は証明されており妥当と判断される。

4. 表現の明確さ

本論文は英語論文であり、既に Lung Cancer に掲載された。本雑誌による専門性の高い複数の査読者による厳密な査読を経て、目的、方法、結果、考察が簡潔かつ明瞭に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q1: アスベスト暴露歴のない中皮腫はあるのか。

A1: アスベスト暴露歴のはっきりしない例があり、その原因の一つとして *BAP1* 遺伝子の生殖細胞系列変異が報告されている。

Q2: 予後曲線について、病期や組織型、治療法の影響を考慮した方がよいのではないか。

A2: 今回の症例では病期や治療法による差を調べてはいない。予後に関しては、上皮型が最も症例数が多く、予後解析に影響を与えたのではないかと推測される。病期に関しては影響を考慮して検討したい。

Q3: 上皮型、二層型、肉腫型とあるが、この組織型を規定する因子はあるのか。

A3: 組織型を規定する因子についてはわかっていないが、上皮型には *BAP1* 欠失が多く、肉腫型には 9p21 ホモ欠失が多いとされている。

Q4: Introduction に *BAP1* 遺伝子の生殖細胞系列変異があると予後が良いと書いてあるが、なぜか。

A4: *BAP1* 遺伝子の生殖細胞系列変異のあるものでは臨床的検討から予後が良いと記載されている。明確な理由は明らかになっていないが、*mesothelioma in situ*の時期が長いのかもかもしれない。

Q5: ブラガコントロール症例として使われているが、胸膜プラークでの検討をした方がよいのではないだろうか。

A5: プラーク表面では中皮細胞の増殖がみられないので、良性の中皮細胞を検討するには適さないと考える。

Q6: *BAP1* 抗体は C 末端側を認識する抗体をつかっているのか、反対側の変異を検出できるのはなぜか。

A6: *BAP1* 抗体は C 末端側を認識する。C 末端側に核移行シグナルが存在するが、この核移行シグナルが核に移動するためには反対側 (N 末端側) の脱ユビキチン活性化部位により核移行シグナルが脱ユビキチン化される必要がある。従って抗体認識部位の変異以外にも、この活性化部位の欠失でも *BAP1* の核での発現がみられなくなる。

Q7: 9p21 ホモ欠失のカットオフ値が 11%としているが、時にみられる p16 免染では陽性なのに、9p21 ホモ欠失がみられるのはカットオフ値の影響と考えるのか。

A7: p16 免染の抗体は何種類か市販されているがその特異性に問題があることが知られている。ホモ欠失率の低い場合は、カットオフ値の影響があるかもしれない。

Q8: アスベスト関連中皮腫では p16 のホモ欠失がみられるが、肺癌ではメチル化による p16 の異常といわれている。アスベスト関連肺癌ではどうなると思うか。

A8: アスベスト関連肺癌についてよく知らないが、p16 蛋白質の発現には、遺伝子の欠失

だけでなく、メチル化を含むエピジェネティックな抑制経路が存在する。一般的な肺癌では 30-60%に p16 ホモ欠失が報告されており、メチル化も報告されている。アスベスト関連肺癌ではそれに違いがあるかよくわからない。

Q9: 中皮腫ではがん遺伝子パネル検査はどうなっているのか。

A9: 中皮腫では、NGS 解析による研究が 3 つほど報告されているが、現在のところ腫瘍抑制遺伝子の変異が主で治療の対象となる癌遺伝子のドライバー変異はみつかっていない。また遺伝子変異の少ない腫瘍として考えられている。

Q10: 診断感度をあげても 90%。残りの 10%は臨床的にどう扱うのか。

A10: 頻回に経過をみている。多くの場合胸水貯留があるので再度病理検査を行い確定診断を得て治療を開始する。

Q11: MTAP は ubiquitous に存在するのに細胞質の染色性をみているのはなぜか。

A11: 当教室の研究で、MTAP 免染と 9p21 ホモ欠失の関係を調べている。MTAP 免染では多くの場合、核と細胞質の両方の染色性が欠失するか保持される。しかし、まれに核と細胞質の染色性の結果が解離することがある。原因は分からないが、当教室の研究で 9p21 ホモ欠失と相関するのは細胞質の染色性であることがわかり細胞質の染色性を重視すべきだということを報告している (Histopathology, 2019)。

その他、いくつかのコメントがあったが、発表者はいずれについても的確に応答した。

以上の審査結果により、本論文は斬新さ重要性和適切な質疑応答により学位論文に値すると評価された。