

氏名	きのした よしあき 木下 義晃		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1811 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	Hemizygous loss of <i>NF2</i> detected by fluorescence <i>in situ</i> hybridization is useful for the diagnosis of malignant pleural mesothelioma (Fluorescence <i>in situ</i> hybridization 法で捉える <i>NF2</i> 遺伝子のヘミ欠失は悪性胸膜中皮腫の診断に有用である)		
論文審査委員	(主 査) 福岡大学	教授	高松 泰
	(副 査) 福岡大学	教授	向坂 彰太郎
	福岡大学	准教授	角田 俊之

## 内 容 の 要 旨

### 【目的】

悪性胸膜中皮腫は胸膜原発悪性腫瘍の中で最も多く、アスベスト暴露と密接に関連する予後不良な疾患である。悪性胸膜中皮腫の組織診断は時として容易ではなく、特に反応性中皮過形成との鑑別は形態的な観察のみでは困難である。

近年、中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別において fluorescence *in situ* hybridization (FISH) 法による 9p21 領域のホモ欠失、immunohistochemistry (IHC) 法による BAP1 蛋白の核内発現欠失や MTAP 蛋白の細胞質での発現欠失の証明が、特異度 100%と有用であることが報告されている。

*Neurofibromatosis type 2 (NF2)* 遺伝子は 22 番染色体長腕 12.2 領域に存在する癌抑制遺伝子である。*NF2* 遺伝子の異常は中皮腫では比較的高頻度に認められる。しかし FISH 法で捉える *NF2* 遺伝子 (*NF2* FISH) の欠失が、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別に有用であるかは検証されていない。

本研究では、*NF2* FISH 単独あるいは上記診断アッセイ (9p21 FISH、MTAP IHC、BAP1 IHC) との組み合わせが、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別に有用であるかを検討した。

### 【対象と方法】

本研究では、2001 年から 2017 年に当院で診断された悪性胸膜中皮腫 47 例、反応性中

皮過形成 27 例の組織切片を用いた。*NF2* FISH、9p21 FISH、MTAP IHC、BAP1 IHC を施行し、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別における、各々の診断アッセイの感度・特異度を算出した。

*NF2* FISH 法では、*NF2*/CEN 22q probe (Abnova, Walnut, CA, USA) を使用した。まず各症例を代表する組織切片において、100 個以上の中皮細胞を評価し、各々のパターン（ヘテロ欠失、モノソミー、ホモ欠失）を呈する中皮細胞の割合を算出した。*NF2* FISH のカットオフ値の設定に関しては、反応性中皮過形成群における欠失パターンの割合の平均値+3x 標準偏差を算出し設定した。今回の研究では、モノソミーもしくはヘテロ欠失をヘミ欠失と定義した。

更に悪性胸膜中皮腫群において、*NF2* FISH の欠失パターンが、患者背景（年齢、性別）や組織型（上皮型、二相型、肉腫型）、その他の診断アッセイ（9p21 FISH、MTAP IHC、BAP1 IHC）の status、生命予後と関連するかを統計学的に解析した。

## 【結果】

悪性胸膜中皮腫群の平均年齢は 67.3 歳（range: 45-86 歳）であり、組織型は上皮型が 32 人（68%）、二相型が 10 人（21%）、肉腫型が 5 人（11%）であった。

*NF2* FISH 法では、正常細胞の核内に赤色シグナル（*NF2* probe）2 個、緑色シグナル（chromosome 22 centromeric probe）2 個のパターンが認められる。*NF2* FISH の各欠失パターンのカットオフ値はヘテロ欠失（1 red/2 green signal）が 18.2%、モノソミー（1 red/1 green signal）が 48.4%、ホモ欠失（0 red/2 green signal）が 5.5%と算出された。その結果、悪性胸膜中皮腫群の 23/47 例（48.9%）がモノソミーと判定され、2/47 例（4.3%）がヘテロ欠失と判定された。しかし、両群においてホモ欠失は 1 例も認められなかった。ヘミ欠失は悪性胸膜中皮腫群の 25/47 例（感度 53.2%）で認められ、反応性中皮過形成群では認められなかった（特異度 100%）。

悪性胸膜中皮腫群では、9p21 ホモ欠失は 37/47 例（78.7%）に、BAP1 欠失は 27/47 例（57.4%）に、MTAP 欠失は 33/47（70.2%）に認められ、反応性中皮過形成群では何れも認められなかった（特異度 100%）。悪性胸膜中皮腫を反応性中皮過形成と区別する上での感度は、9p21 FISH と BAP1 IHC の組み合わせで 93.6%であったが、9p21 FISH、BAP1 IHC に *NF2* FISH を組み合わせると 100%に達した。

また悪性胸膜中皮腫群において、*NF2* FISH のヘミ欠失は患者背景や組織型、その他の診断アッセイの status、生命予後と有意な関連は見られなかった。

## 【結論】

悪性胸膜中皮腫の核型解析では、22 番染色体の異常が 39-65%と比較的高頻度に認められることが知られている。また腹膜中皮腫では、*NF2* のヘミ欠失が腹膜中皮腫の 35%に見られることも報告されている。しかし、*NF2* FISH を悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別に応用した研究はこれまで行われていない。

本研究では、悪性胸膜中皮腫における *NF2* の欠失のパターンはヘミ欠失が特徴であり、その大半がモノソミーであった。*NF2* のヘミ欠失は悪性胸膜中皮腫群の 53.2% で認められた。また *NF2* のヘミ欠失は反応性中皮過形成では認められず、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別における特異度は 100% であった。そのため *NF2* FISH は単独でも悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別における有用な診断アッセイと言える。

さらに、*NF2* のヘミ欠失はその他の診断アッセイの status との有意な関連は認められず、その他の診断アッセイと組み合わせることで感度が向上した。実際、本研究コホートでは、悪性胸膜中皮腫群の全症例が何れかの診断アッセイで検出可能であり、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別における感度は 100% に上昇した。

本研究の限界としては、単施設の後方視的研究であり、悪性胸膜中皮腫が稀な疾患であることから症例数が比較的少数であった点である。今後、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別における *NF2* FISH の有用性を示すため、多施設での検証が必要である。

悪性胸膜中皮腫における FISH 法で捉える *NF2* 遺伝子の異常は、ヘミ欠失が特徴である。FISH 法による *NF2* のヘミ欠失の検出は悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別に有用である。

## 審査の結果の要旨

本論文は、悪性胸膜中皮腫の診断の精度を高めることを目的とした研究である。悪性胸膜中皮腫の組織診断は時として容易ではなく、特に反応性中皮過形成との鑑別は形態的な観察のみでは困難である。現在、悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別には FISH 法による 9p21 ホモ欠失、免疫染色による MTAP および BAP1 蛋白発現の欠失が利用されている。本研究では *Neurofibromatosis type 2 (NF2)* 遺伝子変異に着目し、従来 of 検査に加えて FISH 法で *NF2* ヘミ欠失の解析を行うと、特異度 100% を維持しながら良悪性の診断の感度が上昇することを示した。

### 1. 斬新さ

現在行われている 9p21 FISH、MTAP および BAP1 の免疫染色を用いた診断法では、感度が不十分で悪性中皮腫と確定診断できない症例がある。本研究は中皮腫の患者で高頻度に認められる *NF2* 遺伝子変異の有無を診断に用いたことが新しい着眼点である。FISH 法による *NF2* ヘミ欠失の解析結果は、従来 of 9p21 FISH、MTAP および BAP1 の免疫染色の結果と相関せず、両者を組み合わせると診断感度が上昇することを示した点が斬新な特徴である。

### 2. 重要性

悪性胸膜中皮腫は胸膜原発悪性腫瘍の中で最も多く、予後不良な疾患である。しかし I 期で治療を開始すると生存期間は延長し、早期診断が重要である。現在行われている診断法では、特異度は 100%だが、感度は 80-90%に留まる。本研究で *NF2* FISH の解析結果を組み入れると感度がほぼ 100%に上昇することが示され、悪性中皮腫の適正診断にきわめて重要と考えられた。

### 3. 研究方法の正確性

福岡大学病院病理部で診断が確定し予後も判明している悪性中皮腫および反応性中皮過形成の検体を用いて *NF2* FISH 検査が診断におよぼす影響を解析しており、研究方法は正確と考えられる。*NF2*、9p21 の FISH 検査、BAP1、MTAP の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。今回の研究では、*NF2* FISH に関しては、各欠失パターンのカットオフ値として、反応性中皮過形成群における欠失パターンの割合の平均値+3x 標準偏差という客観的解析から導き出された数値を採用している。本研究は正確な方法で実施されたと判断される。

### 4. 表現の明確さ

本論文は目的、方法、結果、考察が簡潔かつ明瞭に記載されており、Modern Pathology (IF 6.36) に掲載されている。発表は理路整然とした話し方で、この研究結果に基づく新しい悪性中皮腫の診断アルゴリズムの提唱、さらにその正当性を検証するための今後の研究計画についても言及した。学位論文、発表ともその内容は極めて明確であった。

### 5. 主な質疑応答

Q1: 9p21 領域には *MTAP*、*p16*、*p15*、*p14*、*ANRIL* がコードされているが、今後 *ANRIL* (antisense non-coding RNA in the *INK4* locus) などが病理診断に応用される可能性はあるか。

A1: 病理検体でも non-coding RNA や miRNA は抽出できる。そのため、病理組織検体において non-coding RNA や miRNA は検討可能である。現在中皮腫における *ANRIL* と *p16* の関係に関しては検討を始めている。

Q2: 今回 *NF2* FISH のカットオフ値は比較的高く (48.4%) 設定されているが、反応性中皮過形成群では *NF2* FISH のヘミ欠失を示す細胞は存在しないと言えるのか。反応性中皮過形成の症例でも *NF2* のヘミ欠失を認める細胞はあってもいいように思える。

A2: 今回の検討では悪性胸膜中皮腫と反応性中皮過形成の鑑別における *NF2* FISH の有効性を検討している。鑑別において偽陽性が生じないよう安全域を設けたため (反応性中皮過形成群における欠失パターンの割合の平均値+3x 標準偏差) カットオフ値が高くなっている。

今回の研究では、標本作成でのアーチファクトが存在するため、反応性中皮過形成で *NF2* 欠失を持つ中皮細胞が存在するか否かは定かではない。厚めに組織を薄切し、Z 軸をすべ

で解析することで本当のヘミ欠失であるかアーチファクトであるかを見分けることは可能であるかもしれない。

今回の研究からは、少なくとも反応性中皮過形成で *NF2* ヘミ欠失が優勢となることはないということと言える。

Q3: *NF2* を今後治療に応用できる可能性はあるのか？

A3: 現在 *NF2* を治療ターゲットとした治療は行われていない。Hippo signal の下流に位置する転写因子 YAP、TEAD に関しては治療ターゲットとして有望視されている (Anticancer Research 2013;33:1-11)。

Q4: *NF2* が機能喪失した症例に Merlin を補充することで Contact inhibition が改善する可能性はあるのか？ *NF2* 機能喪失とアポトーシスとの関係はどうか？

A4: 実際 *NF2* の機能が喪失した例に *NF2* を再導入することで、Cell cycle が正常化することが報告されている (Anticancer Research 2013;33:1-11)。

*NF2* 機能喪失とアポトーシスとの関係に関しては、*NF2* が機能喪失するとアポトーシスが誘導されなくなるという研究が報告されている (Cell Death Dis. 2016; 7: e2107.)。そのため Hippo signal 伝達系は中皮腫の治療ターゲットになりうる可能性がある。

Q5: 今回の研究では片側の *NF2* 遺伝子の欠失を見ているが、対側の *NF2* mutation を検出することは可能か？

A5: 今回の研究では *NF2* 遺伝子のみ異常を持つ (BAP1 retained, 9p21 wild-type) 中皮腫 3 例に関して、mutation の検索を行った。*NF2* は mutation の Hot spot がないことが知られている。*NF2* は 17 個の exon を持つが、そのすべてを検討することは現実的ではなく、5 つの exon に関して PCR 法による mutation の検索を行った。その結果、いずれの症例でも mutation は検出されなかった。しかし、今後 NGS などを用いて網羅的に解析することで mutation を検出することは可能であるかもしれない。

Q6: *NF2* FISH を免疫染色で代替できる方法は検討されているか？

A6: *NF2* FISH を免疫染色で代替できる方法は確立されていない。過去に中皮腫において *NF2* の免疫染色が検討されたが、診断感度が極めて低い (4%) ことや、*NF2* 遺伝子の機能喪失と免疫染色の結果が一致しないため、有用ではないと報告された (Arch Pathol Lab Med. 2016;140:391.)。この問題は免疫染色の抗体の種類に起因する可能性があり、我々も新たに三種類の Merlin 抗体を用いて検討を行ったが、やはり *NF2* 遺伝子の機能喪失と免疫染色の結果は一致しなかった。

Q7: 悪性胸膜中皮腫はがん抑制遺伝子の変異が多いと報告されているが、多段階的に発生するのか？

A7: 中皮腫が大腸がんで知られているように多段階的に発生するかどうかは明確にはされていない。中皮腫においても単独のがん抑制遺伝子の異常では癌化しないが、複数のがん抑制遺伝子に異常が生じることで癌化することが報告されている (Cancer Res. 2019; 79, 4113-4123.)。そのため中皮腫でも多段階的に腫瘍が発生する可能性が示唆されている。

Q8: 反応性中皮過形成は診断が非常に難しいことが伺えるが、実臨床では反応性中皮過形成と中皮腫の鑑別で、誤った診断が下されている症例は多いのではないだろうか？また診断 assay に異常がない場合、中皮腫でないと診断することは可能なのか？

A8: このような遺伝子変異に基づいた診断ができる施設は限られており、誤った診断が下される症例は相当数あると考えられる。今回の *NF2* FISH を含めた診断 assay に関する知識が普及することで、誤診例が少なくなることを期待している。

また、診断 assay が陽性であれば中皮腫と診断できるが、診断 assay に異常がない場合でも中皮腫でないと結論づけることはできない。

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。