

(特集：ワークショップ (第30回年次学術集会より))

## 病理検査分野の遺伝子検査

郡司 昌治

### Genetic testing in the field of pathology

Masaharu Gunji

**Summary** The quality of fixation, tumor volume, and tumor heterogeneity are important factors that control the accuracy of molecular biological analysis in pathology. Formalin fixation uses 10% neutral-buffered formalin, and specimens with low tumor volumes, fixed for 6–48 hours, are false-negative. Different types of histological approaches result in the detection of different genetic abnormalities. The advantage of using tissue samples is that they can be contrasted with morphology and genetic abnormalities. Another advantage is that there is no need for resampling. Tumors are associated with specific genes. Genetic analysis of tissue samples can provide important information for cancer diagnosis, treatment, and prognosis.

**Key words:** pathology, FFPE, PCR, FISH

#### I. はじめに

病理分野への分子生物学的解析の臨床応用は、2000年に乳癌の分子標的薬剤(Trastuzumab)が本邦に導入されたのを機に、*HER2/neu*-FISH解析が体外診断薬として初めて認可された。現在は胃癌にも適応範囲が広がり、薬剤投与の判断に重要な検査となっている。現在では分子標的薬剤の感受性評価は肺癌の*EGFR*、*ALK*、*BRAF*、*ROS1*、大腸癌の*RAS*、慢性骨髄性白血病、急性リンパ性白血病の*BCR/ABL*など様々な腫瘍に用いられている。2019年から遺伝子情報に基づくがんの個別化治療のゲノム医療が始まり、次世代シーケンサー(next generation sequencer; NGS)を用いたがん遺伝子パネル検査が保険適用された。

病理診断の鑑別補助的診断は、免疫組織化学染色法を用いているが、軟部腫瘍、中皮腫、脳腫瘍、悪性リンパ腫などの腫瘍によって関連遺伝子が特定され遺伝子染色体解析を用いて診断、治療や予後の推測に重要な情報が得られる。

造血器系腫瘍は、WHO分類による特定遺伝子の細分化が行われている。造血器腫瘍の遺伝子検査材料は、血液や骨髄液を用いることが多い、我々施設では、クロット組織標本を積極的に用いている。メリットは、①形態と遺伝子異常との関連性の把握ができる ②再採取の必要がない ③Retrospective studyが可能であることが挙げられる。

病理分野の分子生物学的解析の精度管理は、固定の質、腫瘍量、腫瘍の不均一性の管理が重要となる。検査材料は、ホルマリン固定したパ

名古屋第一赤十字病院  
細胞診分子病理診断部  
〒483-8511 愛知県名古屋市中村区道下町3-35  
Tel: +81-52-481-5111  
E-mail: gm0406@ybb.ne.jp

Japanese Red Cross Nagoya Daiichi Hospital  
Department of Cytology and molecular pathology  
3-35 Michishita-cho, Nakamura-ku, Nagoya, Aichi  
483-8511, Japan

ラフィン切片標本が主流に用いられ、アルコール、メタノール固定した細胞診スミア標本を用いることもある。

## II. 検体の精度管理

### 1. 固定の質

ホルマリン固定方法は、ホルマリン固定パラフィン包埋 (formalin-fixed, paraffin-embedded; FFPE) 検体の適切な作製・保管方法について示したゲノム診療用病理組織検体取扱い規程 (日本病理学会 ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程策定ワーキンググループ) を基に述べる<sup>1)</sup>。FFPE 検体を用いた分子診断のプレアナリシス段階における主な影響因子は、固定前、固定、固定後プロセスの3段階の管理が重要となる。

1) 固定前プロセス：組織摘出後は速やかに冷蔵庫など4℃で保管し、1時間以内、遅くとも3時間以内に固定することが望ましい<sup>2)</sup>。摘出後30分以上室温で保持することは避ける。採取後は、速やかに (採取から3時間以内) 固定する。手術材料など大型の組織は出血、壊死、変性した箇所からのサンプリングは避け、viableな組織から採取する必要がある。生検組織は、速やかに固定液に浸漬し固定を行う。ホルマリンは時速約1 mmの速度で組織に浸透するため、組織の厚さが重要である<sup>3)</sup>。組織の摘出後から固定までの時間 (冷虚血時間; cold ischemic time) は、生体分子の不可逆的変化を最小化するうえで極めて重要である。

2) 固定プロセス：固定は、非緩衝 (酸性ホルマリン溶液) ではなく、10%中性緩衝ホルマリンを使用し、固定時間は6 - 48時間が推奨されている。気管支腔内超音波断層法 (EBUS) 等を用いて生検採取される微小な組織検体は、より短い固定時間で処理が完了するため、6 ~ 24時間に努めることが望ましい<sup>4)</sup>。ホルマリン固定に使用する固定液の容量は、組織量に対し10倍量の固定液を用いることが望ましい。ホルマリン固定による核酸品質への影響は、核酸の断片化のほか、核酸塩基の化学修飾が知られている。特にシトシンの加水分解に伴う脱アミノ化

によりウラシルに置換し、その後のPCR増幅反応によってチミンが生成 (C>T置換) することが知られている<sup>5)</sup>。固定時間の延長により増加し、72時間から顕著となることから、48時間以内の固定が望ましい。しかし週末、金曜日の材料は、月曜日までの固定時間が48時間を超え、固定対策が必要である。対策を行っている施設は、休日にホルマリン固定からエタノール置換や包埋ブロック作成を行う対策を実施している。長時間の固定はDNAの質の低下が進み、遺伝子変異検査には適さないことがあるため対策が急務である。

3) 固定後プロセス：脱灰処理が必要な時は、酸脱灰を回避しEDTA脱灰を行う。組織プロセッサの使用は問題ないが、使用薬剤の交換頻度などの管理の影響については不明である。また迅速型では、いまだ十分なデータは得られていないのが現状である。FFPEブロックの保管は、室温でよいが、多湿を避け冷暗所が望ましい。未染色FFPE標本の形態で保管する場合は、低温保管やパラフィンコーティングなどの核酸品質劣化を防止する対応を行うことが望ましい。原則薄切後時間が経過した未染色FFPE標本のゲノム診断への使用は避け、可能な限りFFPEブロックから再薄切をすることが望ましい。

### 2. 腫瘍の比率

腫瘍細胞と正常細胞の割合が重要である。コンパニオン診断検査薬のコバスEGFR変異検出キットv2.0は、検査するDNAの5%以上に遺伝子変異が含まれる場合に陽性と判定される診断薬であり、性能には限界があると記載されている。腫瘍の割合が10%未満の場合は、マクロダイセクションを行い、腫瘍の割合を高めた後DNA抽出を行う必要がある。また、アポトーシスや壊死を起こしている部分はDNAが分解しているため、検査材料としては不適と考える。腫瘍細胞が少なく、正常細胞や炎症性細胞などが非常に多く認められた場合に問題となる。1個の腫瘍細胞から1個のDNAが採取される。しかし好中球、リンパ球、正常上皮細胞は1個のDNAが採取される。腫瘍細胞以外の細胞が多く存在すると腫瘍細胞のDNA濃度が低下し、検出感

度が低下する問題が生じる。PCR解析は機器の性能、プライマー、プローブに注目されるが、解析に用いる病理細胞診材料の適否の判断が重要である。非常に腫瘍細胞の比率が少ない場合は材料として適さないことを理解する必要である。また不適材料で検査した場合は誤判定となる場合があるので注意が要する。

マクロダイセクションが有用であった症例を紹介する。Gefitinib (*EGFR L858R*) 投与後、PET (Positron Emission Tomography) で原発巣に集積亢進したため気管支鏡による再生検が行われた。5材の肺生検が採取され、1、3、4、5番に腫瘍細胞が認められた (Fig. 1)。採取された5材からDNAを抽出し*EGFR*遺伝子検査を行った。結果は*EGFR*変異を認めなかった。Gefitinib投与時は*EGFR L858R*を検出しており、誤陰性の可能性が示唆された。腫瘍細胞量の多い4番 (腫瘍比率10%) の生検材料 (Fig. 1) を用いて再検査を行った。その結果、*EGFR L858R*と*T790M*変異が検出された。結果の不一致の原因は4番の生検は腫瘍細胞を10%認め、1、3、5番の生検は2~3%の腫瘍比率であった、5材全体の総腫瘍比率は5%未満であり、検出感度以下となり、誤陰性となったと考える。本事例は、初回検査で*EGFR L858R*変異が判明しているため、再検査ができた。しかし、初回検査であった場合は、*EGFR*変異なしとの報告をした可能性は否定できない。誤った検査結果から薬剤投与のチャンスを失う危険性がある。腫瘍比率を

把握して検査することが重要である。

### 3. 腫瘍のHeterogeneity

組織形態の違いや複数箇所から腫瘍を認める場合は、遺伝子変異が異なることもあり、サンプリングが重要となる。我々は、同一肺葉内に2か所認められた肺癌を経験した。肺胞上皮置換性に立方状の腺癌 (Lepidic adenocarcinoma) と粘液産生を認める腺癌 (Invasive mucinous adenocarcinoma) が認められた症例を経験した (Fig. 2)。両者をそれぞれ検査した結果、lepidicタイプは*EGFR L858R*変異、Mucinousタイプは*BRAF V600E*変異が検出された。組織所見が異なる場合は遺伝子異常も異なる可能性があり、個々に検査する方法が望ましいと考える。また我々は、3つの生検にlepidicパターンの腫瘍形態を認めた症例を経験し、それぞれ解析を行った結果、そのうちの1つのみにexon 19 deletionを認めた (Fig. 3)。類似した組織形態でも腫瘍の箇所が異なると遺伝子変異も異なることがあり注意を要する必要がある、大腸癌においても同様な症例を経験した。生検で大腸癌の異なる2か所の箇所から生検採取した (Fig. 4)。高分化腺癌と中分化腺癌の異なる所見が得られた。各々箇所から遺伝子解析を行った結果、高分化腺癌は*RAS*変異なし、中分化腺癌は*KRAS*変異を検出した。組織所見が異なる場合は遺伝子異常も異なる可能性があり、個々に検査する方法が望ましいと考える。

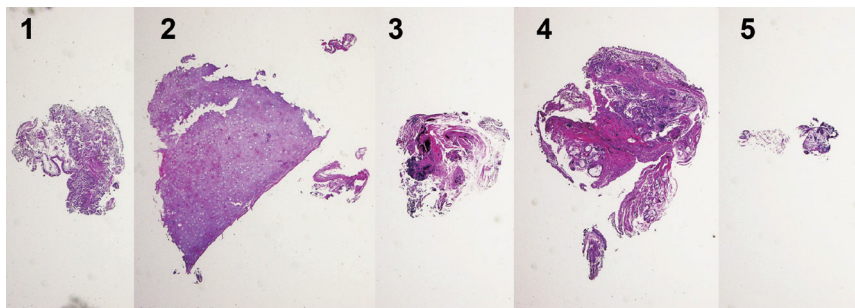


Fig. 1 *EGFR*解析 (肺癌)

5材の肺生検が採取され、1、3、4、5番に腫瘍細胞が認められた。腫瘍比率は、1番から1%、0%、3%、10%、2%である。腫瘍細胞を認めたすべての材料で*EGFR*変異は認められなかったが、再検査によって4番で*L858R*および*T790M*変異を検出した。



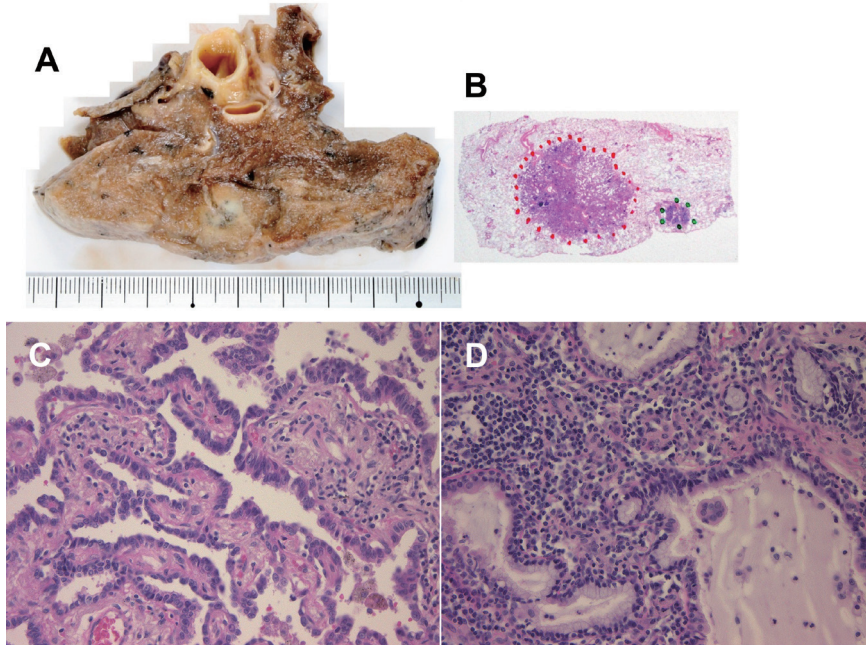


Fig. 2 腫瘍の Heterogeneity (肺癌)  
 A, B) 同一肺葉内に腫瘍を2か所認めた。C) 肺胞上皮置換性に立方状の腺癌 (Lepidic adenocarcinoma) を認め、*EGFR L858R*変異を検出した。D) 粘液産生を認める腺癌 (Invasive mucinous adenocarcinoma) を認め、*BRAF V600E*変異を検出した。

### Ⅲ. 臨床への応用

近年、腫瘍関連遺伝子が特定され分子生物学的解析が応用されている。脂肪肉腫は*MDM2*、*FUS*、滑膜肉腫*SS18*、ユーイング肉腫/PNET *EWSR1*、中皮腫*CDKN2A*、星細胞系腫瘍 *IDH1/2*、乏突起膠腫 第1染色体、第19染色体などの腫瘍関連遺伝子が知られており、特に軟部腫瘍の解析が進んでいる (Fig. 5)。造血管系腫瘍はWHO分類による特定遺伝子の細分化が行われている。Follicular lymphomaは*IGH/BCL2*、Burkitt's lymphoma (BL)、*IGH/MYC*、MALT lymphoma、*BIRC3/MALT1*などの解析を行うことで診断に重要な情報が得られる。悪性リンパ腫の診断はG-banding染色体解析では結果が得られにくく、リンパ節生検や穿刺による遺伝子染色体解析が有用である。Diffuse large B-cell lymphoma (DLBCL) は*BCL2*、*BCL6*、*MYC*再構成を有することがある。特に*MYC*再構成症例は、R-CHOPなどのDLBCL標準治療に対する反応が不良である。R-CHOP療法以外のBLに準

じた強力な高用量化学療法が選択される。*BCL2*、*MYC*再構成の両者の異常を有する Double hit lymphoma (DHL) がある。DHLはBLタイプの化学療法を行ったとしても生存期間中央値は2.4～18カ月と極めて予後不良と報告されている<sup>6)</sup>。

2016年の星細胞系腫瘍のWHO分類で*IDH1/2*遺伝子変異、乏突起膠細胞系腫瘍は*IDH1/2*遺伝子変異、第1染色体と第19染色体の欠失の遺伝子分類が必要となった。我々は髄膜腫にて乏突起膠細胞系腫瘍で用いる第1染色体の欠失解析を行い、髄膜腫のWHO grade分類の補助診断に利用している。髄膜腫grade1とgrade2、3では再発率が異なり、grade1と2の鑑別は重要と考える。grade分類には細胞異型、壊死、核分裂像、Ki-67 (MIB-1) 陽性率など総合的にgrade分類が行われている。grade1は第1染色体の欠失は認めず、grade2では第1染色体の欠失が20%以上認めた<sup>7)</sup>。再発率が異なるgrade1と2の鑑別に第1染色体の欠失解析は有用な方法と考える。

細胞診の応用は、穿刺、スタンプや尿、体腔

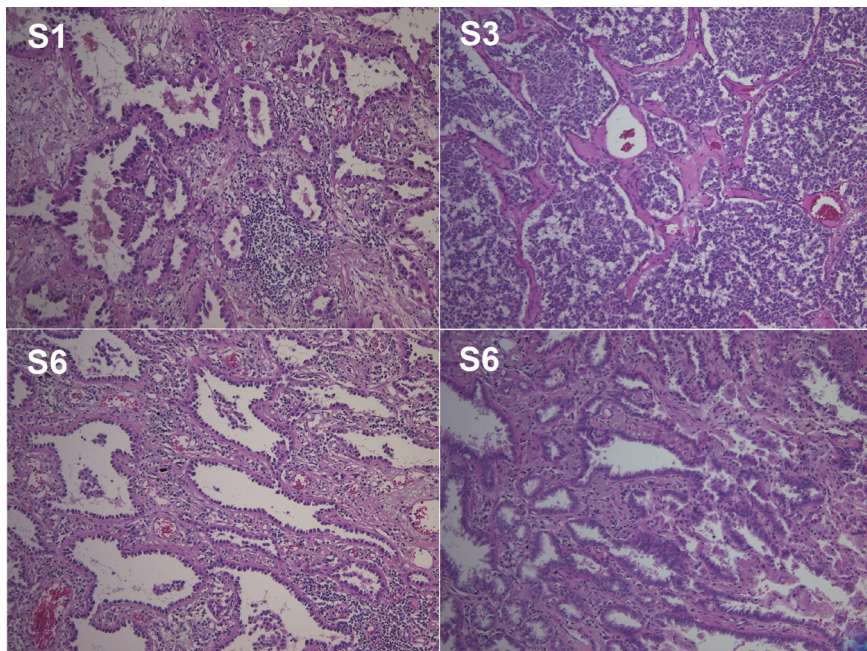


Fig. 3 腫瘍のHeterogeneity (肺癌)  
 S1、6、8にlepidicパターンの腺癌、S3はカルチノイドの腫瘍形態を認めた。それぞれ解析を行った結果、S1、3、8はEGFR変異なし、S6のみにexon 19 deletionを認めた。腫瘍の箇所が異なると遺伝子変異も異なることがある。

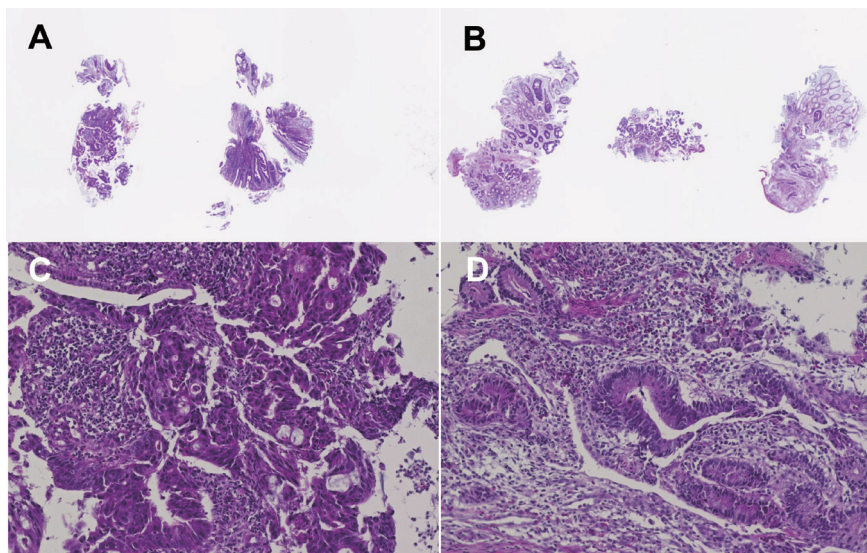


Fig. 4 腫瘍の Heterogeneity (大腸癌)  
 A, B) 大腸生検を示す。異なる2か所の箇所から採取され、Aは高分化腺癌、Bは中分化腺癌の所見を認めた。Cの高分化腺癌は、RAS変異なし、Dの中分化腺癌はKRAS変異を検出した。



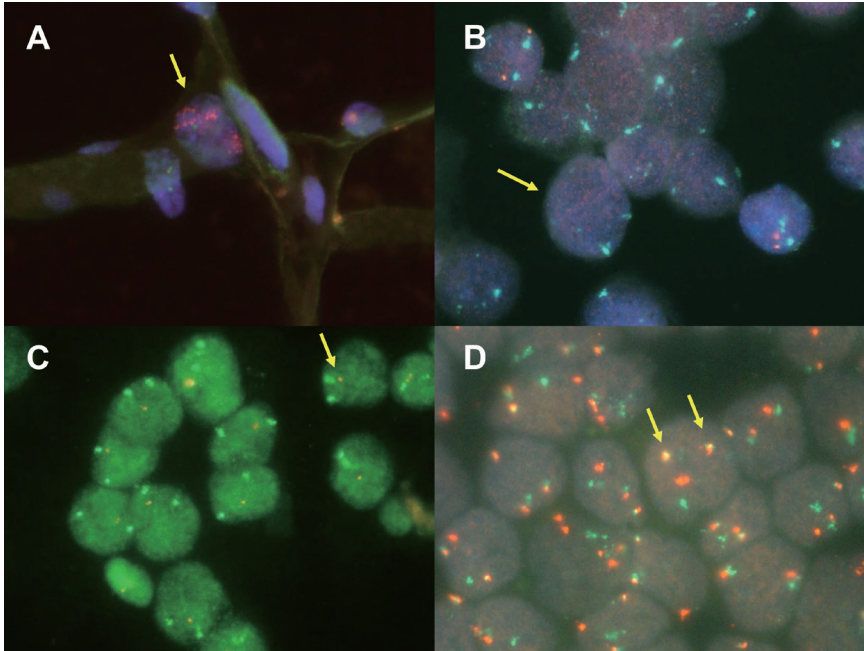


Fig. 5 腫瘍関連のFISHシグナル  
 A) 脂肪肉腫MDM2のAmplificationシグナル。赤シグナルが多数認められる。B) 悪性中皮腫CDKN2AのHomozygous deletionシグナル。赤シグナルが認めず、欠失している。C) 髄膜腫1p36 deletionシグナル。通常赤シグナルは2個であるが、シグナルが1個で欠失している。D) 濾胞性リンパ腫IGH/BCL2転座シグナル。IGH/BCL2の黄色の転座融合シグナルが認められる。

液などのスメア、LBC標本を使用して解析している。甲状腺は血流が豊富でCore Needle Biopsyなどの生検は後出血への懸念などから広く行われている検査とは言い難く、穿刺吸引細胞診が重要となる。甲状腺穿刺は腺腫様甲状腺腫と乳頭癌との鑑別が苦慮することがある。乳頭癌はBRAF変異、RET、NTRK遺伝子再構成を認める。頻度はBRAF変異が29～69%、RET遺伝子再構成は13～43%、NTRKは5～13%の出現率と報告している<sup>9)</sup>。我々の検討では腺腫様甲状腺腫と鑑別が要した乳頭癌の検討で、乳頭癌にBRAF変異を80%認めた、Fig. 6の症例は超音波検査では境界明瞭な腫瘍で嚢胞所見、石灰化を認め、血流は内部、周囲に認め乳頭癌が疑われた。甲状腺穿刺吸引細胞診所見は泡沫細胞を多数認める嚢胞性所見が認められた。濾胞上皮はシート状集塊を形成して出現していた。核内封入体はごく少量で、核内封入体は核内を1/2以上占める大型の封入体所見は認めなかった。ま

た隔壁性細胞質内空砲は標本中2か所のみであった。乳頭癌を疑ったが、腺腫様甲状腺腫は否定できなかった。細胞診標本からDNAを抽出しBRAF変異解析を行った結果、BRAF V600E変異を検出した。腫瘍摘出術が行われ、乳頭癌と診断された。穿刺吸引細胞診にて鑑別困難症例を遺伝子検索することにより、診断精度の向上が期待できる。

#### IV. 最後に

病理分野の遺伝子染色体解析は簡便、精度の高い検査になり、積極的に応用されている。遺伝子染色体解析の検出感度は、検体選択が重要な要素である。正確な解析が分子標的薬の選択的診断、病理細胞診断、悪性度、予後など付加価値的な診断が可能となる。分子標的薬の進歩および腫瘍関連遺伝子の解明により今後、分子生物学的解析への応用が期待できる。

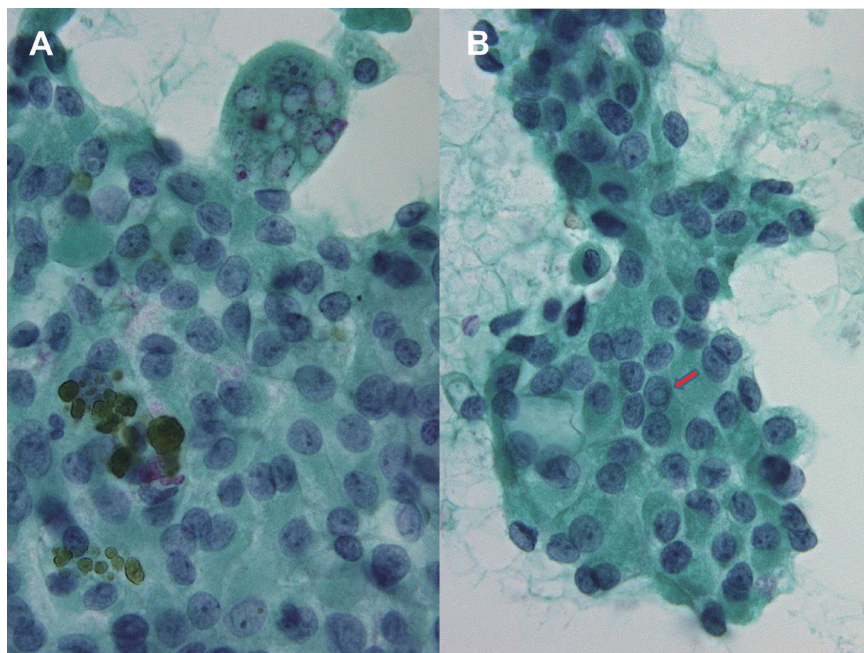


Fig. 6 乳頭癌の細胞像 (Papanicolaou染色)  
 泡沫細胞を認める嚢胞性所見がみられる。濾胞上皮細胞はシート状集塊を形成し出現している。隔壁性細胞質内空胞 (A) と小型の核内封入体 (B: 矢印) を認めた。

本論文内容に関する著者の利益相反：なし

#### 文献

- 1) 小田 義直; 畑中 豊 他: ゲノム診療用病理組織検体取扱い規程. 一般社団法人日本病理学会: 1-44, 2018.
- 2) M. Elizabeth H. Hammond, Daniel F. Hayes, Mitch Dowsett, D. Craig Allred, Karen L. Hagerty, Sunil Badve, Patrick L. Fitzgibbons, Glenn Francis, Neil S. Goldstein, Malcolm Hayes, David G. Hicks, Susan Lester, Richard Love, Pamela B. Mangu, Lisa McShane, Keith Miller, C. Kent Osborne, Soonmyung Paik, Jane Perlmutter, Anthony Rhodes, Hironobu Sasano, Jared N. Schwartz, Fred C.G. Sweep, Sheila Taube, Emina Emilia Torlakovic, Paul Valenstein, Giuseppe Viale, Daniel Visscher, Thomas Wheeler, R. Bruce Williams, James L. Wittliff, and Antonio C. Wolff: College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol*, 28: 2784-95, 2010.
- 3) Srinivasan M, Sedmak D, Jewell S: Effect of fixatives and tissue processing on the content and integrity of nucleic acids. *Am J Pathol*, 161: 1961-1971, 2002.
- 4) Neal I Lindeman, Philip T Cagle, Mary Beth Beasley, Dhananjay Arun Chitale, Sanja Dacic, Giuseppe Giaccone, Robert Brian Jenkins, David J Kwiatkowski, Juan-Sebastian Saldivar, Jeremy Squire, Erik Thunnissen, Marc Ladanyi: Molecular testing guideline for selection of lung cancer patients for EGFR and ALK tyrosine kinase inhibitors: guideline from the College of American Pathologists, International Association for the Study of Lung Cancer, and Association for Molecular Pathology. *J Thorac Oncol.*, 8: 823-859, 2013.
- 5) Do H, Dobrovic A: Sequence artifacts in DNA from formalin-fixed tissues: causes and strategies for minimization. *Clin Chem*, 61: 64-71, 2015.
- 6) Nathalie A Johnson, Kerry J Savage, Olga Ludkovski, Susana Ben-Neriah, Ryan Woods, Christian Steidl, Martin J S Dyer, Reiner Siebert, John Kuruvilla, Richard Klasa, Joseph M Connors, Randy D Gascoyne, Douglas E Horsman: Lymphomas with concurrent BCL2 and MYC translocations : the critical factors associated with survival. *Blood*, 114(11): 2273-9, 2009.

- 7) Toru Nagasaka, Masaharu Gunji, Noboru Hosokai, Kumiko Hayashi, Hiroshi Ikeda, Masafumi Ito, Sugu-ru Inao: Fluorescent In Situ Hybridization 1p/19q Deletion/Imbalance Analysis of Low-Grade and Atypical Meningiomas. *Neurol Med Chir*, 50(1): 27-32, 2010.
- 8) 近藤哲夫, 望月邦夫, 中澤匡男. 甲状腺癌の分子メカニズム: 最近の知見. *病理と臨床*, 31(1): 50-56, 2013.