

氏名・(本籍)	渡邊 伸之助 (東京都)
専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	医博甲第 1037 号
学位授与の日付	令和 3 年 3 月 22 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
研究科・専攻	医学系研究科医学専攻
学位論文題名	Rapid HER2 cytologic fluorescence in situ hybridization for breast cancer using noncontact alternating current electric field mixing (電界非接触攪拌技術を用いた乳癌 HER2 における迅速細胞診 Fluorescence In Situ Hybridization (Rapid CytoFISH))
論文審査委員	(主査) 後藤 明輝 教授 (副査) 寺田 幸弘 教授 大森 泰文 教授

学 位 論 文 内 容 要 旨

Rapid HER2 cytologic fluorescence in situ hybridization for breast cancer using noncontact alternating current electric field mixing

電界非接触攪拌技術を用いた乳癌 HER2 における迅速細胞診
Fluorescence In Situ Hybridization (Rapid CytoFISH)

申請者氏名 渡邊 伸之助

研 究 目 的

乳癌診療において、Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)遺伝子増幅の有無はトラスツズマブ感受性や予後因子として重要であり、HER2 スコアのより正確な評価が重要である。HER2 遺伝子増幅の評価は病理組織の免疫組織化学染色 (Immunohistochemistry, 免疫染色) および遺伝子プローブ法 (in situ hybridization ; ISH) で判定されるが、特に ISH は DNA プローブの反応に長時間を要し、ほぼ全ての病院で外注検査に頼っているため、進行癌患者の治療導入の遅れに繋がる可能性がある。当科では電界非接触攪拌技術を用い、通常は診断まで数時間を要する免疫染色を約 20 分まで短縮を可能にした迅速免疫染色装置を開発し、この装置を応用して乳癌 HER2 や肺癌 anaplastic lymphoma kinase (ALK) 融合遺伝子における ISH の DNA プローブ反応時間短縮に成功した。本研究では、従来、組織検体で評価されていた ISH を細胞診検体に応用し、より簡便・迅速に乳癌 HER2 を評価可能なプロトコールの開発および臨床的有用性を検討することを目的とした。

研 究 方 法

本研究では、現在本邦で体外診断用医薬品として認められている Histra-HER2 fluorescence ISH (FISH) kit (In Vitro Diagnostics, HOKOH, Shizuoka, Japan) を使用し、熱処理、プロテアーゼ処理、DNA 変性、ハイブリダイゼーション、洗浄処理、の工程は従来法通りに遵守してプロトコール作成を検討した。細胞診検体では、従来の FISH プロトコールでは良好なシグナルを得られず、熱処理の前にカルノア液と 10%ホルマリン液で再固定することにより良好なシグナルを得ることができた。さらに、従来 14~18 時間要した DNA プローブのハイブリダイゼーション時間を、電界非接触攪拌技術を用いて 3 時間まで短縮させることで迅速細胞診 FISH のプロトコールを完成させた。

2018 年 10 月から 2020 年 3 月まで、秋田大学医学部附属病院、秋田厚生医療センター、市立秋田総合病院、秋田赤十字病院で施行された乳癌針生検検体 93

例、手術検体 50 例(計 143 例)を対象とした。針生検検体は BD CytoRich systems Red (BD Franklin Lakes, NJ, USA) に洗浄液状細胞診として保存し、手術検体は 95%エタノールに捺印もしくは塗抹細胞診としてスライドガラスに保存した。なお、全ホルマリン固定パラフィン包埋 (FFPE) 組織で免疫染色および ISH (Dual color ISH, FFPE-tissue DISH) が施行されており、HER2 0/1+, 2+, 3+ のいずれかの判定を得ている。全細胞診検体について、従来通りにハイブリダイゼーション時間を確保した方法 (Cyto FISH)、電界非接触攪拌技術を用いてハイブリダイゼーション時間を短縮した方法 (Rapid-Cyto FISH) の両方で FISH を施行し、ASCO (American Society of Clinical Oncology) / CAP (College of American Pathologists) HER2 検査ガイドラインに準拠した判定基準に従って HER2/centromeric probe for chromosome (CEP) 17 シグナル比を求めた。結果は JMP IN V.14.2.0 を用いて、ダネット多重比較検定で統計学的に比較し、コーエンの κ 係数を用いて従来法との一致率を評価した。

研 究 成 績

143 検体の HER2 免疫染色強度スコアの内訳は、(0) 49 例、(1+) 49 例、(2+) 31 例、(3+) 14 例だった。Cyto FISH および Rapid-Cyto FISH において、適正にシグナルが検出された検体は両者とも 139/143 (97.2%) であり、HER2 判定は全て一致していた。FFPE-tissue DISH と比較し、全検体の HER2 判定の一致率は 95.1% (κ 係数=0.771, 95% Confidence Interval (CI) 0.614-0.927) であり、中等度から良好な一致を示した。なお、手術検体における HER2 ISH 判定の一致率は 92.0% (κ 係数=0.633, 95% CI 0.312-0.955) で、針生検検体における HER2 ISH 判定の一致率は 96.8% (κ 係数=0.847, 95% CI 0.687-1.000) であった。また、HER2/CEP17 シグナル比においても、FFPE-tissue DISH と比較し、Cyto FISH および Rapid-Cyto FISH 両方において良好な一致が見られた ($p > 0.05$)。

結 論

乳癌において、細胞診を使用した Cyto FISH は HER2 遺伝子増幅の評価に有用な方法である。電界非接触攪拌技術を用いることで、患者が受診し検体採取を行った当日に病理組織学診断とともに HER2 ステータスを得ることが可能で、治療方針が決まらず心配な乳癌患者の不安を取り除くことができる。

学位（博士一甲）論文審査結果の要旨

主 査： 後藤 明輝
申請者： 渡邊 伸之助

論文題名： Rapid HER2 cytologic fluorescence in situ hybridization for breast cancer using noncontact alternating current electric field mixing

電界非接触攪拌技術を用いた乳癌 HER2 における迅速細胞診
Fluorescence In Situ Hybridization (Rapid CytoFISH)

要旨

筆者の研究は、乳癌における Human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) 発現を判定する手法の一つである Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) における検討である。ISH 法は DNA プローブの反応に長時間を要し、ほぼ全ての病院で外注検査に頼っているため、進行癌患者の治療導入の遅れに繋がる可能性があった。従来、組織検体にて評価されていたものを細胞診検体に簡便化させ、さらに電界非接触攪拌技術を用いることで、その全工程時間を 4 時間以内に短縮させ、その臨床的有用性を検討したものである。

本論文の斬新さ、重要性、実験方法の正確性、表現の明瞭さは以下の通りである。

1) 斬新さ

乳癌 HER2 発現の判定には、本邦では免疫組織化学染色で定性的な評価を行い、そのうち(2+) 境界域と判定されたものが、ISH による定量的な判定に回っている。筆者らの教室では、秋田県産業技術センターとの共同研究で開発した電界非接触攪拌技術を用いることで、免疫組織化学染色における抗原抗体反応の促進に成功し、これまでに乳癌の HER2 DISH の時間短縮や肺癌 ALK FISH の時間短縮への応用も成功している。本研究の斬新性は、乳癌 HER2 FISH の評価を初めて細胞診検体に応用した点にある。

2) 重要性

細胞診検体と電界非接触攪拌技術を用いることで、乳癌 HER2 FISH の全工程を 4 時間以内に短縮することができ、進行癌患者の治療導入の遅れに繋がる ISH 法の問題点を解決する可能性がある研究であった。また、本研究により、細胞診検体における ISH 法の有用性が示され、乳癌 HER2 においては、FISH だけでなく、Dual color In Situ Hybridization(DISH)や Silver In Situ Hybridization(SISH)など、他の ISH 法への応用も可能と考えられ、さらに研究の幅を広げるものであ

た。また、胸水、腹水、髄液など、組織として検体を採取できない場合、細胞診検体が非常に有用であり、この後の実臨床においても重要な研究と考えられる。

3) 研究方法の正確性

Hybridization 工程における電界非接触攪拌の条件については、既に筆者らの教室において開発し、報告したプロトコールに則り行われている。乳癌 FISH の評価に関しては、プロトコールにおいても病理専門医による評価を行い、体外診断薬の結果判定と同レベルでの評価を行っている。結果に関しては、いずれも統計学的検討を加えており、客観的な評価法で正確性があると考えられる。

4) 表現の明瞭さ

従来の ISH 法の問題点を背景に研究目的を掲げ、HER2 Rapid CytoFISH プロトコール作成に関する方法論が明確に記載され、体外診断薬で行われた HER2 DISH 結果との比較検討結果、考察が簡潔・明瞭に述べられていると考える。

以上より、本論文は学位を授与するに十分値する研究と判定された。