

REVIEW ARTICLE

FISHにて9p21ホモ接合性欠失を示す胸膜悪性中皮腫細胞の形態学的特徴

鍋島一樹¹・松本慎二¹・濱崎 慎¹・
大神明子¹・亀井敏昭²・岩崎昭憲³

Morphological Characteristics of 9p21 Homozygous Deletion-Positive Malignant Pleural Mesothelioma Cells Detected by FISH

Kazuki Nabeshima¹; Shinji Matsumoto¹; Makoto Hamasaki¹;
Akiko Ohgami¹; Toshiaki Kamei²; Akinori Iwasaki³

¹Department of Pathology, Fukuoka University Hospital and School of Medicine, Japan; ²Division of Pathology, Yamaguchi Grand Medical Center, Japan; ³Department of Thoracic Surgery, Fukuoka University Hospital and School of Medicine, Japan.

ABSTRACT — **Background and Objective.** The cytologic diagnosis of malignant pleural mesothelioma (MPM) in effusion smears is important, as most patients first present with pleural effusion. However, the lack of both well-established immunocytochemical markers and definite cytological criteria for MPM makes it difficult to discriminate MPM from reactive mesothelial cells (RMC) in effusion. Moreover, the presence of both MPM cells and RMC in effusion specimens from the same patient makes differentiation more difficult. The homozygous deletion of the *CDKN2A/p16* gene in the 9p21 locus frequently occurs in MPM but has never been reported in RMC. The aim of this study was to define the cytomorphological characteristics of MPM cells in effusion by identifying them on the basis of the presence of *p16* homozygous deletion by means of fluorescence *in situ* hybridization (FISH). **Study Design.** For the above purpose, cells on smear preparations were recorded using a virtual microscope system, and then analyzed by FISH. Thereafter, *p16* homozygous deletion-positive cells were identified in the recorded virtual slides, followed by analysis of their morphological characteristics. **Results.** Compared with *p16* deletion-negative RMC, *p16* homozygous deletion-positive mesothelioma cells exhibited significantly more frequent cell-in-cell engulfment including hump formation, multinucleation (in particular, more than 3 nuclei), and larger multicellular clusters composed of more than 10 cells. **Conclusion.** The above findings were useful in the cytological differentiation of MPM from RMC cells. The combination of virtual microscopy and FISH was also shown to be useful for tumor morphological analysis.

(JLCC. 2012;52:201-208)

KEY WORDS — Pleural mesothelioma, Cytology, Fluorescence *in situ* hybridization (FISH), 9p21 homozygous deletion, *p16*

Reprints: Kazuki Nabeshima, Department of Pathology, Fukuoka University Hospital and School of Medicine, 7-45-1 Nanakuma, Jonan-ku, Fukuoka 814-0180, Japan (e-mail: kaznabes@fukuoka-u.ac.jp).

要旨 — **背景と目的.** 悪性胸膜中皮腫 (MPM) 患者の多くは胸水にて発症するので、胸水細胞診による診断は重要である。しかし、MPMに対する免疫細胞化学的マーカーの欠如と細胞診上の確固たる診断基準が未確立であるため、MPMと反応性中皮細胞 (RMC) の鑑別を困難

にしている。さらに胸水中にMPM細胞もRMCもともに存在することがその鑑別を一層困難にしている。染色体の9p21領域に存在する*CDKN2A/p16*遺伝子のホモ接合性欠失は、MPMにおいて高頻度に認められるが、RMCにおいてはいまだに報告がない。この研究の目的

¹福岡大学医学部病理学講座・福岡大学病院病理部；²山口県立総合医療センター病理科；³福岡大学医学部呼吸器・乳腺・内分泌・小児外科学。

別刷請求先：鍋島一樹，福岡大学医学部病理学講座・福岡大学

病院病理部，〒814-0180 福岡市城南区七隈7丁目45-1 (e-mail: kaznabes@fukuoka-u.ac.jp)。

※第51回日本肺癌学会総会イブニングシンポジウム「中皮腫診断と細胞診」。

は、fluorescence *in situ* hybridization (FISH) を用いて、胸水細胞診標本から、*p16* のホモ接合性欠失を有するMPM細胞を同定し、その形態学的特徴を明確にすることである。研究計画。上記の目的のため、胸水細胞診標本をバーチャルスライド化して、その形態を保存した後、同標本を用いてFISHを行った。FISHにて*p16* 遺伝子のホモ接合性欠失を示す細胞をバーチャルスライド上より同定し、その形態学的特徴を解析した。結果。*p16* 遺伝子のホモ接合性欠失を示すMPM細胞は、*p16* 遺伝子欠失

のないRMCと比較して、有意に多くの細胞相互封入所見(ハンブ形成を含む)、3核以上の多核細胞、10個以上の細胞より成る大型の細胞集塊を認めた。結論。今回の研究より、上記の細胞の特徴がMPM細胞とRMCの鑑別に有用であることが明確となった。また、バーチャルスライドとFISHの組み合わせが腫瘍細胞の形態学的解析にとって有用であることも示された。

索引用語 — 胸膜中皮腫, 細胞診, FISH, 9p21 ホモ接合性欠失, *p16*

はじめに

悪性胸膜中皮腫は生物学的に aggressive な腫瘍で、予後が悪く、診断されてからの平均生存期間は9~17ヶ月と報告されている。¹ 予後の悪さは、少なくとも一部は早期における診断の難しさによっている。54~89%と報告によって幅はあるが、胸膜中皮腫患者の多くは胸水にて発症するので、画像手段は有用でなく、細胞診が最初の診断を担うこととなる。²⁴ 肺癌との鑑別は適切な免疫細胞学的マーカーパネルの選択によって可能であるが、反応性中皮細胞との鑑別は、確固たる形態学的 criteria がいまだに確立されていないことや適切な免疫細胞学的

マーカーがないこともあって困難なことが多い。⁴ さらに細胞診標本上に腫瘍細胞のみならず反応性中皮細胞も存在することも問題を難しくしている。

中皮腫における染色体9p21領域の欠失が1994年に報告されて以来、⁵ 報告によってばらつきはあるが、中皮腫の22~92%に欠失陽性と報告されており、組織や細胞診標本におけるfluorescence *in situ* hybridization (FISH) によるこの欠失の検出が診断に有用だと指摘されている。⁴⁻¹² 9p21領域にはサイクリン依存性キナーゼ阻害因子2A/*p16* 遺伝子 (*CDKN2A/p16*) が含まれている。*p16* はINK4ファミリーの1つで (*p16^{INK4a}*)、Cdk4と結合し、そのキナーゼ活性を阻害するインヒビターと

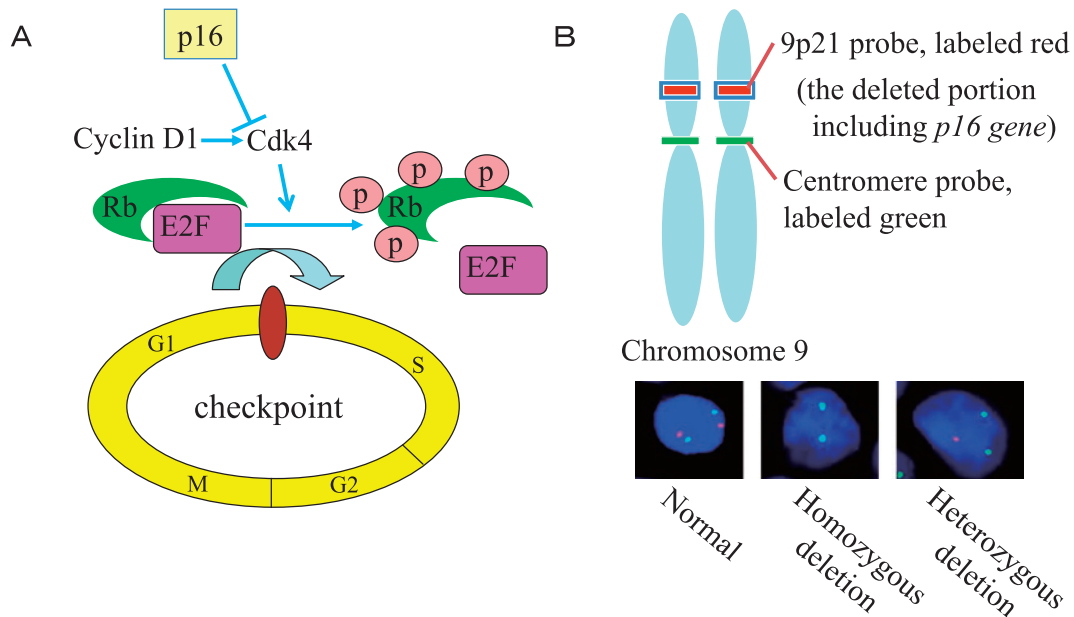


Figure 1. A. Role of the *p16* tumor suppressor gene in cell cycle regulation. *p16* regulates the phosphorylation of the Rb protein through inhibition of cyclin-dependent kinase 4 (Cdk4). B. The outline of *p16* (9p21 locus) on FISH. A normal pattern shows 2 signals in each in a nucleus for the red fluorescence-labeled 9p21 locus probe and the green fluorescence-labeled centromere probe. Homozygous and heterozygous deletion demonstrates loss of both or one of the 9p21 signals (red), respectively.

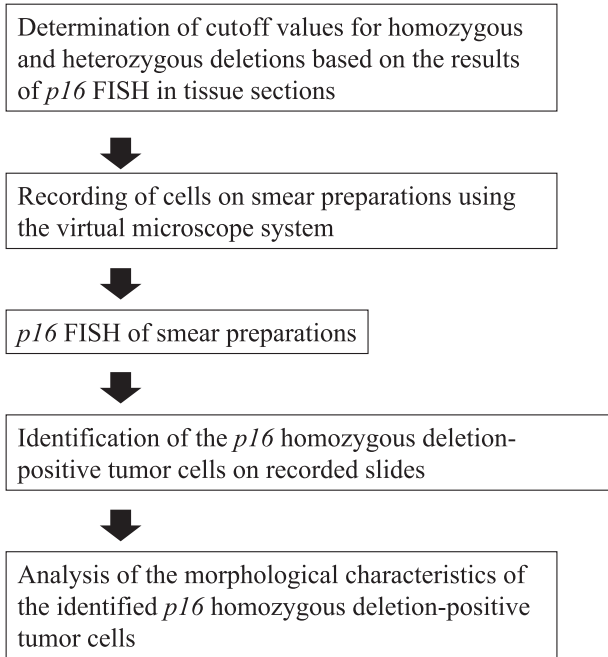


Figure 2. An overview flowchart of the morphological analysis of *p16* homozygous deletion-positive mesothelioma cells.

して同定された (Figure 1A).¹³ FISH では、相同染色体上の 9p21 領域を 2 つとも欠失するホモ欠失と、1 つだけを欠失するヘテロ欠失として認められる (Figure 1B)。この 9p21/*p16* 欠失の重要な点は、組織にしても細胞診にしても、反応性中皮組織/細胞ではいまだに陽性例の報告はないという点である。^{4,6,7,9-12}

この研究の目的は、細胞診標本上に存在する中皮腫細胞と反応性中皮細胞を区別するために、FISH にて 9p21/*p16* 欠失陽性を示す中皮腫細胞のみを選択し、その形態学的特徴を解析して、細胞診による中皮腫診断に役立てようというものである。まず *p16* FISH の方法改良に取り組み、ホモおよびヘテロ接合性欠失のカットオフ値を設定して、細胞診に応用した。細胞診標本ではバーチャルスライドと FISH の組み合わせで欠失陽性細胞の同定を行った。

方法

Figure 2 に示すように悪性中皮腫および反応性中皮過形成組織を用いて *p16* FISH のカットオフ値設定を行い、それに基づいて細胞診標本の検討/判定も行った。中皮腫細胞診標本は、まずパパニコロー標本をバーチャルスライド (NanoZoomer 2.0-HT, 浜松ホトニクス) 化して保存した後、同標本を用いて *p16* FISH を行った。次にホモ接合性欠失を示す細胞を保存したバーチャルスライド上でマークし、その細胞の形態解析を行った。同様に、

反応性中皮細胞を含む標本からは正常パターンを示す細胞をマークして、コントロールとして用いた。

用いた標本は、胸膜中皮腫組織 45 例 (上皮型 33 例、肉腫型 4 例、二相型 5 例、lymphohistiocytoid variant 1 例、desmoplastic variant 1 例、well differentiated papillary variant 1 例)、反応性中皮過形成組織 36 例 (ブラ切除例)、胸膜中皮腫細胞診 10 例 (上皮型 10 例)、反応性中皮細胞診 10 例 (結核性胸膜炎 4 例、肺癌 3 例、乳癌 1 例、循環器疾患 1 例、ブラ 1 例) である。細胞診標本はすべて組織学的に診断の確認された症例を用いた。

FISH プロトコール

Vysis 社の *CDKN2A* (*p16*) probe (LSI *p16*/CEP 9 probe) (Abbott Japan) を用いた。組織標本は脱パラ後、蒸留水に浸漬。細胞診標本は、キシレン、アルコール処理後、蒸留水に浸漬し、カルノア液にて再固定 (室温 15 分) 後、蒸留水に浸漬。これより両標本ともに共通の過程となる。2×SSC 溶液に馴染ませた後、前処置液 (DAKO) にて 95°C 10 分 (組織) 80°C 15 分 (細胞診) の処理を行う。次に Tris-buffered saline (TBS) に馴染ませた後、酵素処理 (ペプシン, DAKO) を行い、10% 中性緩衝ホルマリンにて後固定 (室温 5 分)。2×SSC に浸漬後、TBS で洗浄。アルコール (70%—80%—100%) 浸漬 (各 1 分) 後、乾燥させ、プローブを添加。加熱変性 (85°C 5 分) 後、ハイブリダイゼーションを行う (37°C 48 時間)。2×SSC に浸漬後、Washing I 液 (0.3% Tween 20 加 2×SSC, 72~75°C 2 分) および Washing II 液 (0.1% Tween 20 加 2×SSC, 室温 5 分) にて混和洗浄。2×SSC および蒸留水で洗浄後、冷風にて乾燥し、4,6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) で封入。

各症例とも少なくとも 100 個の細胞の欠失の有無を解析した。

結果

組織標本を用いた *p16* FISH

反応性中皮過形成組織におけるホモまたはヘテロ接合性欠失、正常パターンを示す細胞の割合はそれぞれ 5%、35%、65% で (平均値)、ホモおよびヘテロ接合性欠失に対して平均 +3 SD (標準偏差) でカットオフ値を設定すると、それぞれ 10%、50% となった (Figure 3)。中皮腫症例の 93% (42/45) がホモ接合性欠失を示し、ヘテロ接合性欠失は 24% (11/45) に認められた。ヘテロ接合性欠失陽性症例は 1 例を除いてすべてホモ接合性欠失も陽性であった。つまりホモ接合性欠失陰性症例のうち 1 例はヘテロ接合性欠失陽性であった。従って感度は 95% (43/45)、特異度は 100% である。これまでの報告と比較して問題はなく、この判定に従って細胞診標本の解析も行った。

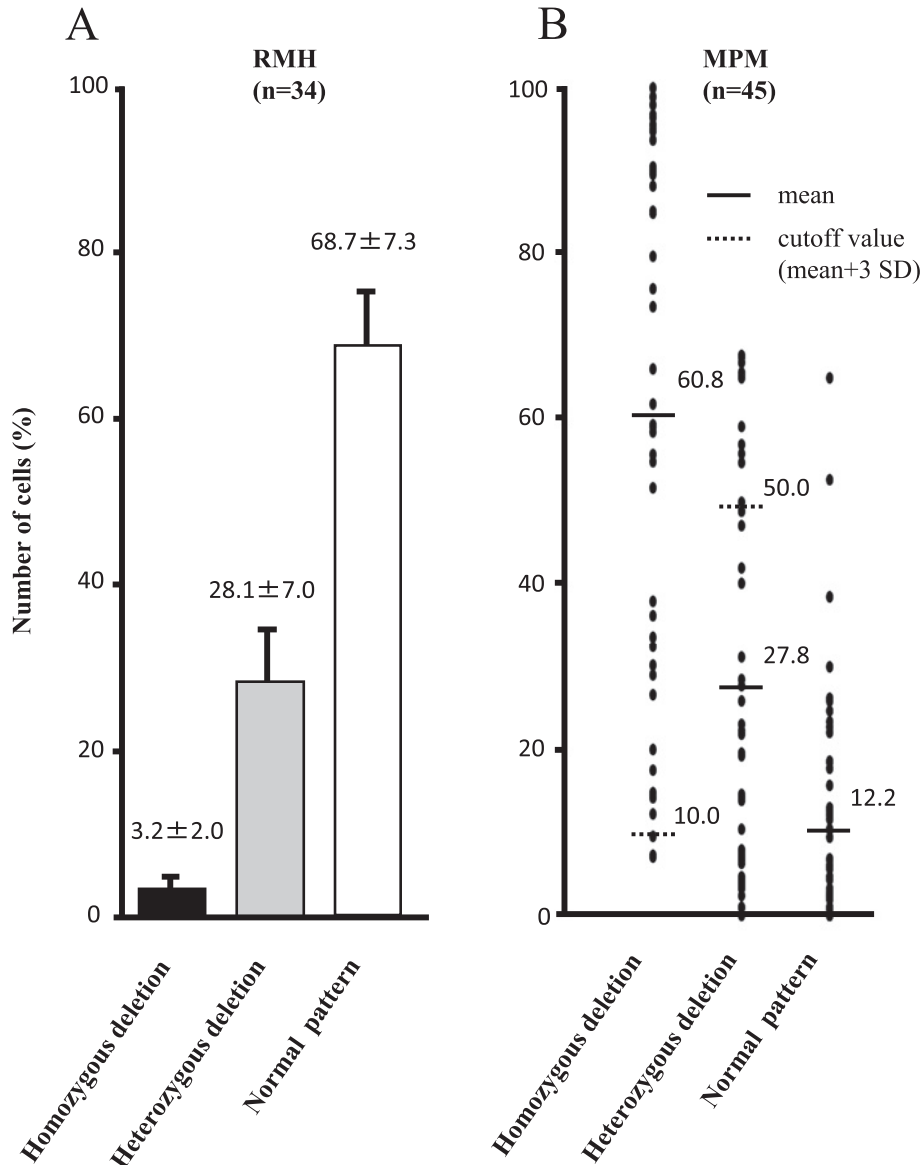


Figure 3. *p16* FISH patterns in tissue sections of reactive mesothelial hyperplasia (RMH) (A) and malignant pleural mesothelioma (MPM) (B). The numbers of cells exhibiting each *p16* FISH pattern are shown (mean \pm standard deviations of the mean). Based on the results shown in A, cutoff values for homozygous and heterozygous deletions were set as 10% and 50%, which are shown as dotted lines in B. In MPM, homozygous or heterozygous deletion-positive tumors were 93% (42/45) and 24% (11/45), respectively.

細胞診標本における *p16* FISH

中皮腫細胞診標本は上記のカットオフ値に従って判定すると、全例ホモ接合性欠失陽性で、ヘテロ接合性陽性症例も2例認めた。反応性中皮細胞症例は全例陰性であった (Figure 4)。

中皮腫細胞診標本上には中皮腫細胞とともに反応性中皮細胞も含まれていると考えられる。そこで、*p16* FISHにてホモ接合性欠失を示す細胞、言い換えれば腫瘍細胞

として矛盾のない細胞のみを、あらかじめ記録しておいたバーチャルスライド上より選択し、その形態学的特徴を正常中皮細胞と比較検討した。対照となる正常 (反応性) 中皮細胞は、反応性中皮細胞診標本上で *p16* FISHにて正常パターンを示した細胞を、これもあらかじめ記録しておいたバーチャルスライド上より選択してその形態を解析した。Figure 5に細胞診 FISHの実例を示す。*p16* ホモ接合性欠失陽性の中皮腫細胞では反応性中皮細

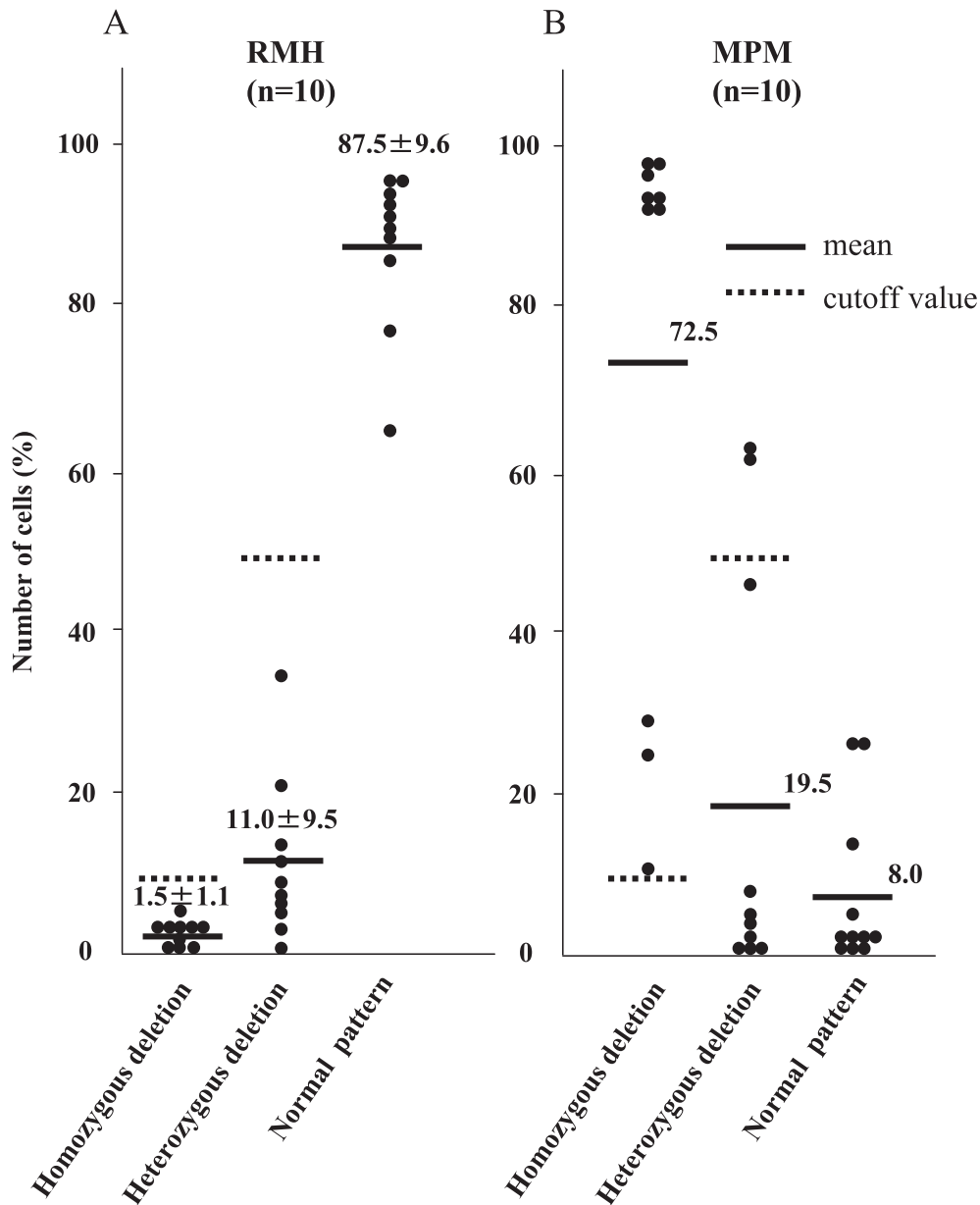


Figure 4. *p16* FISH patterns in cytologic preparations of reactive mesothelial hyperplasia (RMH) (A) and malignant pleural mesothelioma (MPM) (B). According to the cutoff values determined in *p16* FISH in tissue, all MPM cases were homozygous deletion-positive, whereas all RMH cases were negative for both homozygous and heterozygous deletions. Two cases of MPM were also positive for heterozygous deletion.

胞に比べて、ハンプ形成を伴う相互封入所見 (Figure 5A, 5B) を高頻度に認め、この差は統計学的に有意であった (Figure 6A)。同中皮腫細胞には多核細胞 (Figure 5C) も多く認めた。2核までの細胞は反応性中皮細胞にも認め得るが、3核以上の細胞は中皮腫細胞に有意に多く見られた (Figure 6A)。細胞集塊の大きさと数の比較にあたっては、FISHによるホモ接合性欠失は細胞の重なりが少ない辺縁でのみしか確認できない。そこで、90%以

上ホモ接合性欠失細胞より成る症例において (7例)、その大きさと数の検討を行った。10個あるいは100個以上の細胞より成る集塊は有意に中皮腫に多く認められた (Figure 6B)。また、中皮腫の集塊はより3次元的で、球形、乳頭状を成すが、反応性中皮ではより平面的で小さな集塊が多く認められた。

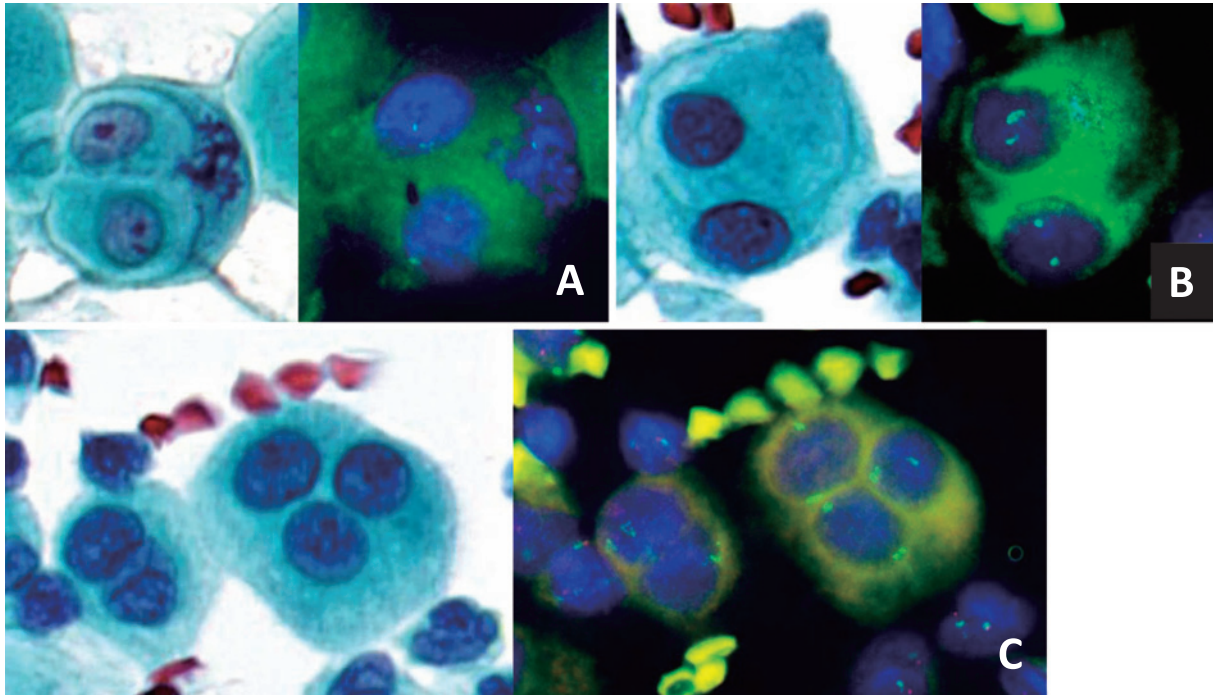


Figure 5. Cytologic features of mesothelioma cells harboring homozygous deletion on *p16* FISH. The right-sided photos are *p16* FISH photos, while the left-sided ones are Papanicolaou-stained smears. The same cells are shown in the right- and left-side photos of A, B and C, respectively. Cell-in-cell engulfment with (B) or without (A) hump formation and bi- or trinucleation (C) are shown.

結 論

この研究によってまず特筆すべきは、これまで亀井らによって指摘され^{14,15} またこの3年間にわたって日本肺癌学会細胞診改定委員会 中皮腫細胞診評価ワーキンググループ (亀井グループ長) の大規模研究 (中皮腫細胞診 200 例の検討) によって中皮腫細胞の特徴だと示されたものが、*p16* FISH にてホモ接合性欠失を示す腫瘍細胞の特徴とほぼ同じであることが確認されたことである。今後 20~30 年間にわたって中皮腫症例の増加が想定される中、臨床医の努力によって早期の段階で発見される症例が増えてきつつあるが、その診断において胸水細胞診の果たす役割は益々大きなものになると考えられる。その診断の基準作りにおいて、ワーキンググループによって示された提案に一定の科学的裏付けを与えることができたと考えている。

これまで *p16* FISH 法の改良に取り組み、現在のプロトコルで組織標本を用いた検討では感度約 95%、特異度 100% である。これまでの報告との比較を Table 1 に示す。^{6,7,9-12} 9p21/*p16* 欠失の最大の特徴はその特異度であり、反応性中皮にはいまだに陽性症例の報告がないことである (0/161)。標本の古さと感度に関しては、我々のプロトコルによってシグナルを得られる率は、パラ

フィン包埋組織標本では 10 年前のものでも約 93% であるが、細胞診標本 (パバニコロー染色標本) では 1~2 年前のもので 25%、3 年以前のものでは全く得られなくなる。プロトコルのさらなる改良とともに、臨床的に中皮腫の想定される症例では、パバニコロー染色標本作製時に *p16* FISH 用にアルコール固定未染標本も作製しておき、パバニコロー染色標本の検鏡にて中皮腫の疑われる際には迅速に FISH にまわすこと、また量的に可能であればセルブロック標本作製し、これを FISH にまわすことが肝要だと考える。セルブロック標本では、複数枚の同じ標本の作製が可能となるので、FISH の際の酵素処理の微調整が可能となり、現在までのところほぼ全例でシグナルが得られている。

近年 *p16* FISH において、ホモ接合性欠失のみならずヘテロ接合性欠失のカットオフ値の設定によって、ヘテロ接合性欠失を有する中皮腫の診断が可能になるとの報告がある。^{7,11} その中には *p16* の methylation の確認されたものもある。我々の検討でも、組織での *p16* FISH 陽性症例の中で、ヘテロ接合性欠失が優位な症例が 16 例 (16/45, 36%) 認められた。そのうち 11 例ではヘテロ接合性欠失は 50% 以上 (陽性) で、ホモ接合性欠失は 40% 未満である。組織標本でのヘテロ接合性欠失カットオフ値は約 50% である一方、細胞診標本では現時点で約 30%

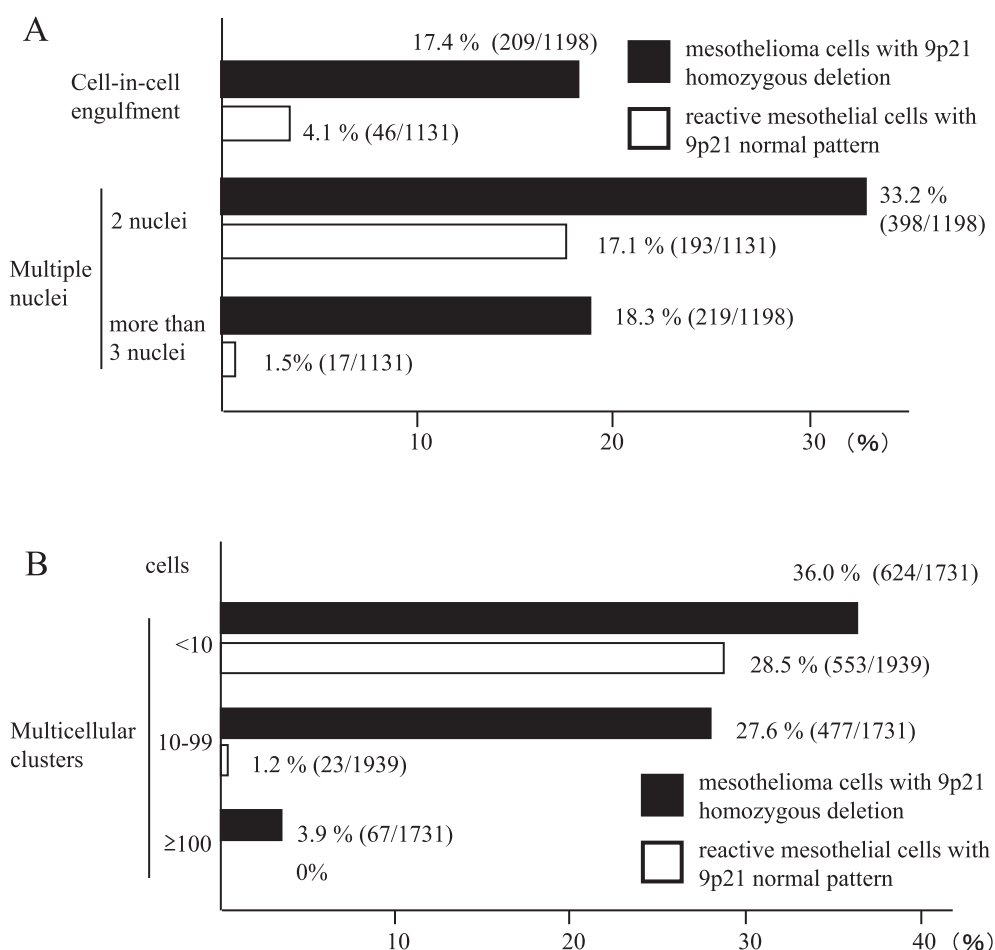


Figure 6. Cytologic features of mesothelioma cells with 9p21 homozygous deletion and reactive mesothelial cells with a normal 9p21 pattern. **A.** The presence of cell-in-cell engulfment with or without hump formation and multinucleated cells was examined in mesothelial cells demonstrated to have 9p21 homozygous deletion on FISH analysis (total, 1198 cells from 10 mesothelioma cases), and reactive mesothelial cells shown to have the normal 9p21 pattern on FISH analysis (total, 1131 cells from 10 reactive pleural effusion cases). For this purpose, cells with 9p21 homozygous deletion or a normal pattern were marked on the photos recorded by the virtual microscope system, and were then subjected to morphological analysis. **B.** The numbers of multicellular clusters were examined according to their sizes in 1731 cells obtained from 9p21 homozygous deletion-predominant mesothelioma cases and 1939 cells from reactive pleural effusion cases with the normal 9p21 pattern.

Table 1. p16 (9p21) Deletion in Mesothelioma - Assessment by FISH

	T/C	Homozygous deletion		Heterozygous deletion
		mesothelioma	RMC	mesothelioma
Chiosea et al. 2008	T	35/52 (67%)	0/40 (0%)	
Dacic et al. 2008	T	21/35 (60%)		
Takeda et al. 2010	T	35/40 (88%)	0/18 (0%)	
Illei et al. 2003	C	12/13 (92%)	0/19 (0%)	
Onofre et al. 2008	C	16/33 (48%)	0/39 (0%)	14/33 (42%)
Chung et al. 2010	T	23/54 (43%)	0/11 (0%)	10/54 (19%)
Our study	T	42/45 (93%)	0/34 (0%)	11/45 (24%)

RMC, reactive mesothelial cells; T, tissue; C, cytology.

であるので（未発表データ）、組織においては約20%程度のアーチファクトの存在も考えられるが、ヘテロ接合性欠失優位の中皮腫がある可能性も現時点では否定できない。特に早期の中皮腫ではその割合が高いかもしれず、今後の検討課題と考えている。

細胞診標本のバーチャルスライド化とp16 FISHの組み合わせによるホモ接合性欠失細胞の形態解析の試みは我々の渉猟し得た限り初めての試みである。新たな方法論として他の腫瘍の形態解析にも応用可能であろう。

本論文内容に関連する著者の利益相反：なし

謝辞：以下の先生方より貴重な標本の提供をいただきました。こころより感謝申し上げます（敬称略，順不同）。松野吉宏（北海道大学病院病理部），廣島健三（東京女子医科大学附属八千代医療センター病理診断科），河原邦光（大阪府立呼吸器・アレルギー医療センター），畠榮（川崎医科大学附属病院病理部），亀井敏昭（山口県立総合医療センター病理科），西山憲一，田口健一（九州がんセンター臨床検査科），辻村亨（兵庫医科大学分子病理学講座）

REFERENCES

1. Tsao AS, Wistuba I, Roth JA, Kindler HL. Malignant pleural mesothelioma. *J Clin Oncol*. 2009;27:2081-2090.
2. Senyigit A, Bayram H, Babayigit C, Topcu F, Nazaroğlu H, Bilici A, et al. Malignant pleural mesothelioma caused by environmental exposure to asbestos in the Southeast of Turkey: CT findings in 117 patients. *Respiration*. 2000;67:615-622.
3. Chapman A, Mulrennan S, Ladd B, Muers MF. Population based epidemiology and prognosis of mesothelioma in Leeds, UK. *Thorax*. 2008;63:435-439.
4. Savic S, Franco N, Grilli B, Barascud Ade V, Herzog M, Bode B, et al. Fluorescence in situ hybridization in the definitive diagnosis of malignant mesothelioma in effusion cytology. *Chest*. 2010;138:137-144.
5. Cheng JQ, Jhanwar SC, Klein WM, Bell DW, Lee WC, Altomare DA, et al. p16 alterations and deletion mapping of 9p21-p22 in malignant mesothelioma. *Cancer Res*. 1994;54:5547-5551.
6. Chiosea S, Krasinskas A, Cagle PT, Mitchell KA, Zander DS, Dacic S. Diagnostic importance of 9p21 homozygous deletion in malignant mesotheliomas. *Mod Pathol*. 2008;21:742-747.
7. Chung CT, Santos Gda C, Hwang DM, Ludkovski O, Pintilie M, Squire JA, et al. FISH assay development for the detection of p16/CDKN2A deletion in malignant pleural mesothelioma. *J Clin Pathol*. 2010;63:630-634.
8. Hirao T, Bueno R, Chen CJ, Gordon GJ, Heilig E, Kelsey KT. Alterations of the p16(INK4) locus in human malignant mesothelial tumors. *Carcinogenesis*. 2002;23:1127-1130.
9. Illei PB, Ladanyi M, Rusch VW, Zakowski MF. The use of CDKN2A deletion as a diagnostic marker for malignant mesothelioma in body cavity effusions. *Cancer*. 2003;99:51-56.
10. Dacic S, Kothmaier H, Land S, Shuai Y, Halbwedl I, Morbini P, et al. Prognostic significance of p16/cdkn2a loss in pleural malignant mesotheliomas. *Virchows Arch*. 2008;453:627-635.
11. Onofre FB, Onofre AS, Pomjanski N, Buckstegge B, Grote HJ, Böcking A. 9p21 Deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma in serous effusions additional to immunocytochemistry, DNA-ICM, and AgNOR analysis. *Cancer*. 2008;114:204-215.
12. Takeda M, Kasai T, Enomoto Y, Takano M, Morita K, Kadota E, et al. 9p21 deletion in the diagnosis of malignant mesothelioma, using fluorescence in situ hybridization analysis. *Pathol Int*. 2010;60:395-399.
13. Serrano M, Hannon GJ, Beach D. A new regulatory motif in cell-cycle control causing specific inhibition of cyclin D/CDK4. *Nature*. 1993;366:704-707.
14. Sakuma N, Kamei T, Shibuta H, Okamura H. Characteristics of reactive mesothelia, pulmonary adenocarcinoma, and malignant mesothelioma in pleural effusion, with special reference to the nucleus number. *J Jpn Soc Clin Cytol*. 2002;41:145-149.
15. Hamakawa S, Mori K, Kashiwazaki Y, Tanabe M, Kondo Y, Sakamaki K, et al. Molded mesothelial cells with hump-like cytoplasmic process in effusion cytology of malignant mesothelioma. *J Jpn Soc Clin Cytol*. 2003;42:10-16.