

## 学力確認の結果の要旨

報告番号	総論第 45 号	学位申請者	赤羽 俊章
審査委員	主査	上野 真一	学位 博士 (医学)
	副査	岸田 昭世	副査 大塚 隆生
	副査	古川 龍彦	副査 榎田 英樹

主査および副査の5名は、令和4年3月31日、学位申請者 赤羽 俊章 君に面接し、学位申請論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) 全血由来のDNAをシーケンスする理由が、腫瘍由来の変異を調べる際のリファレンスのためであるならば、患者の遺伝性背景を調べないと、リンチ症候群など重要な疾患を見落とし過小評価する可能性があると思うがどうか。

(回答) 全血DNAをシーケンスすることで個人SNPを消し、pathogenic変異、VUS (Variant of Uncertain Significance) 変異問わず、腫瘍側だけで発生している変異を拾うアルゴリズムである。また germline 変異が pathogenic 変異としてデータベースに登録されている場合、別のアルゴリズムで germline pathogenic 変異を検出することは可能である。よってデータベースに登録されていない新規変異の場合は病原性変異を見落とす可能性がある。

質問2) 検出された変異が、ヘテロなのかホモなのかは、どのように判定するのか。

(回答) 病理医が判定した腫瘍割合と比較する。例えば腫瘍割合60%でTP53の変異が60%で検出されれば両 allele、30%で検出されれば片側 allele と判定する。

質問3) CytoRich Red 固定液はどのような組成か。

(回答) 詳細な組成は公開されていないが、メタノールとイソプロパノールが主成分であり、除タンパクのためにホルムアルデヒドが0.5% (v/v) の濃度で添加されている。

質問4) LBC 検体の場合、抽出キットによって、核酸抽出量になぜ差が出るのか。

(回答) カラム法ではなくビーズを使った抽出方法が原因と考えられる。また通常のプロトコルにはない90℃で加温する工程を加えることで収量があがることから、加温も重要な因子であると推察される。

質問5) POLE 遺伝子の変異は特定の変異を検出しているのか。

(回答) 高頻度の変異としては、エキソヌクレアーゼドメインのP286RとV411L変異の2種類が知られているがVUS変異が多いので、本パネルではコード領域の全長をカバーしている。

質問6) TP53 も同じように全変異を拾っているのか。

(回答) TP53 全長をシーケンスし、さらに免疫染色を行い、タンパク質の発現状態も確認している。今回の検討では、免疫染色と遺伝子異常の結果に乖離は認めなかった。

質問7) マイクロサテライト不安定性を調べる際に、組織ではMMRタンパク質の欠失を確認しているが、パネル検査ではMSIだけを調べているのか。

(回答) このパネル検査ではMSIと合わせてMMR遺伝子異常も調べている。

質問8) パネル検査の方がMMR変異とMSI(%)の両方をみるので高感度なのか。

(回答) 子宮体癌のMMR-d typeの半数は遺伝子異常が検出されずにMSI-highであることが報告されている。MMR

## 学力確認の結果の要旨

が機能しない原因が遺伝子の欠失なのか mRNA レベルでの発現抑制なのかはわからないため、必ずしもパネル検査の方が高感度とは言えない。

質問 9) では病理組織学的な判断のほうが正しいのか。

(回答) その通りである。免疫染色によって MMR タンパク質の発現欠失を確認する方法は有用性が高い。

質問 10) 腫瘍によってこの検査の適正があるのか。

(回答) それぞれの腫瘍の特性を理解したうえで、細胞診パネル検査をおこなうことには利点はあるが、癌腫によって向き不向きを理解したうえでおこなう必要がある。

質問 11) 機械で正常細胞と腫瘍細胞をカウントしているのか。

(回答) 肉眼で 1 視野毎にカウントしている。

質問 12) LBC 検体の安定性はどのくらい期間保たれるのか。

(回答) 糜液の LBC 検体で検討したところ、5 年保管のものでも安定しており、長期の保管も可能である。

質問 13) 細胞診検体でパネル検査をおこなわなくとも、組織検体でパネル検査やればよいのではないのか。

(回答) ご指摘のとおりであるが、組織検体でしかできない検査もあるので、組織検体を使用しなくて済むのであれば、細胞診検体を利用することで研究・検査の材料として組織検体の有効活用が可能になる。

質問 14) 解析が失敗した症例において、腫瘍細胞量が少なかった原因は何か。

(回答) 子宮体癌の病期が早期である場合、採取できる細胞量が少なくなる可能性がある。しかし、今回の解析は腫瘍細胞量割合が 20% 以上を想定した解析であり、シーケンス深度を上げれば、腫瘍細胞が少ない検体であっても変異を検出することは可能である。

質問 15) 化学療法や放射線治療の途中で、細胞診でのパネル検査をおこなうことについてどう思うか。

(回答) 非常に適切な方法と考えられる。

質問 16) 出血や粘液など腫瘍細胞以外の混人物の除去はしているのか。

(回答) CytoRich Red 固定液は、除タンパクや溶血作用があるため、基本的にはおこなっていない。

質問 17) カスタムパネル遺伝子数を減らす、またはアレイ解析をすることで、コストを下げることはできないのか。

(回答) ご指摘のとおりであるが、標的遺伝子数を少なくすると、Copy 数や TMB などの判定が正確でなくなる。50 遺伝子前後というのはパネル検査のひとつの区切りであると考えられる。

質問 18) MMR 遺伝子に変異がないものも、MSI-high ならば MMR-d type としてよいのか。

(回答) その通りである。ゲノム 4 分類に入らない、MSI-high + POLE や POLEm + TP53m といった、グループも知られている。

質問 19) ゲノム分類は同じだが、検出されている遺伝子変異が異なる症例があるがこれはどういうことか。

(回答) 細胞診検体がどの部分を採取しているかによって変異の内容が変わる。ただし、ごく初期に入るような遺伝子異常は共通であり、ゲノム分類が変わるような遺伝子異常の違いは認めていない。

質問 20) このようなパネル検査をおこなっても、治療時にはコンパニオン検査に提出しなければ治療はできない。結果の相違がある場合もあると思うが、そのようなときはどのようにすればよいか。

(回答) コンパニオンの MSI 検査と比較してもパネル検査の MSI の方が高感度であり、結果に相違がでる場合もある。保険収載のパネル検査を行うことが望ましい。

以上の結果から、5 名の審査委員は申請者が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め、博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。