

尿細胞診LBC検体を用いた 次世代シーケエンシング解析の有用性

松崎生笛、村田晋一

和歌山県立医科大学 人体病理学教室

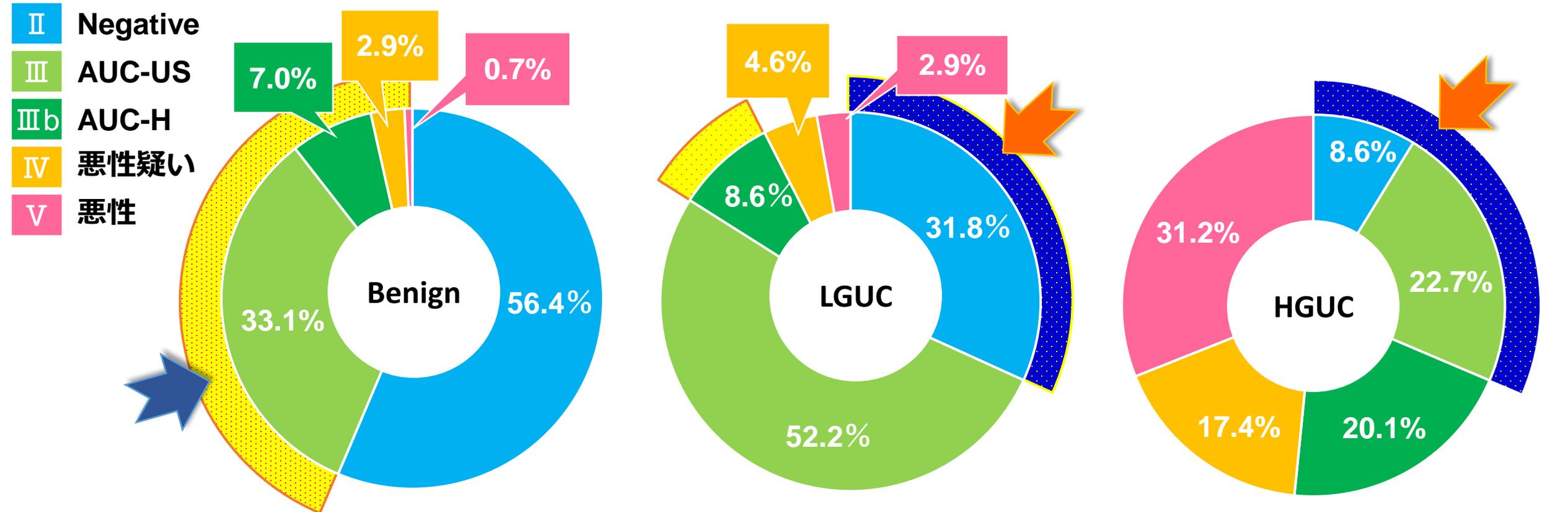
第 46 回日本臨床細胞学会近畿連合会学術集会 COI 開示

筆頭演者名：松崎 生笛

今回の演題に関して開示すべき COI はありません

和歌山県立医科大学附属病院での尿細胞診の現状

和歌山県立医科大学附属病院では、異型細胞を意義不明あるいは低異型度尿路上皮癌を疑うAUC-USと高異型度尿路上皮癌を否定できないAUC-Hに亜分類している。



(2015年4月~2021年4月)

尿路上皮癌（他の症例が併存していないと診断された症例）について、組織診が施行される6か月以内の尿細胞診（同一患者で複数提出ありも含む）

- Benign: 非腫瘍性病変
- LG: 低異型度尿路上皮癌
- HG: 高異型度尿路上皮癌

NGSについて

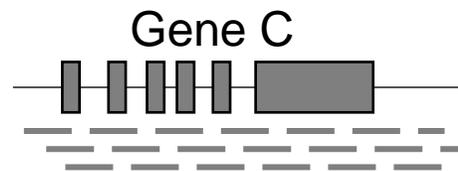
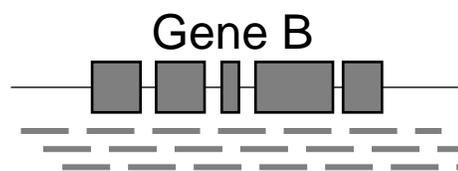
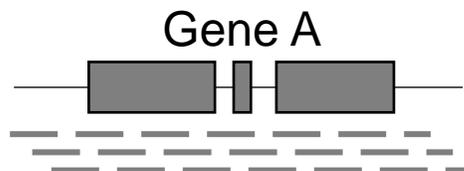
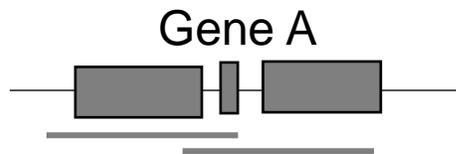
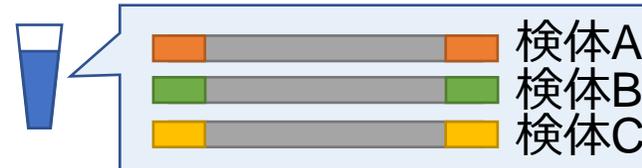
PCR
Sanger sequencing

Next generation sequencing

3rd generation sequencing

- 1検体ごとに反応
- ある遺伝子の一部を解析

- 複数検体をまとめて反応
- 複数の遺伝子を網羅的に解析



NCC オンコパネル

FoundationOne® CDx

iSeq100

MiniSeq

MiSeq

NextSeq 550 HiSeq 4000 NovaSeq 6000

illumina



Thermo Fisher



Ion PGM

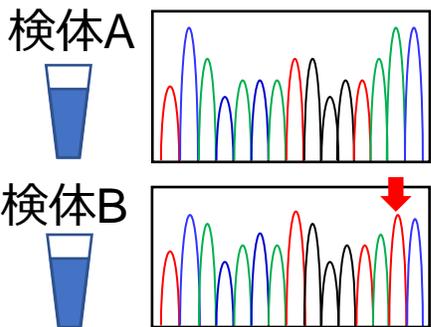


Ion S5 /S5XL



Ion Proton

オンコマイン DxTT



TERT (C228T, C250T)		NGS	
		WT	MT
Sanger	Wild	6	3
	Mutation	0	10

処理能力

対象と方法

• NGSの流れ

Thinprep保存液 72検体
(PreservCyt, Hologic)

- 自然尿 23検体
- 膀胱洗浄尿 42検体
- その他 7検体
(腎盂・尿管カテーテル尿など)



DNA抽出
Maxwell RSC
(Promega)

1時間

ライブラリー
調整

6~7時間

NGSシーケンス反応
iSeq100
(Illumina)

15時間

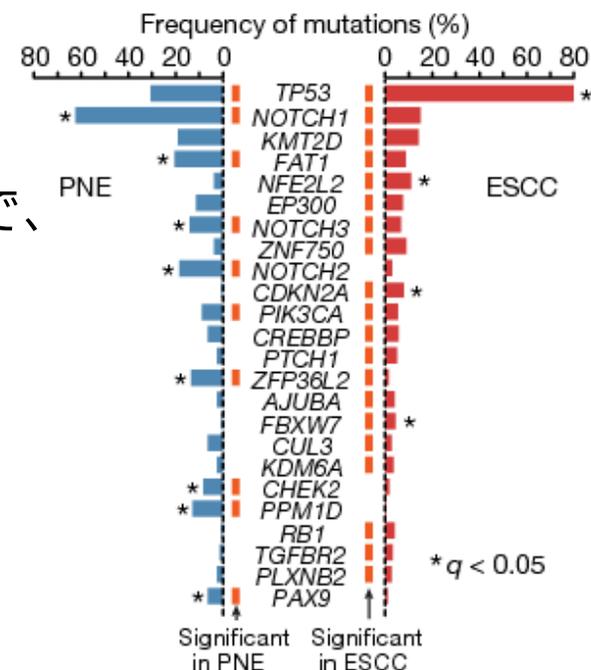
解析

• 検出遺伝子 (以下の17遺伝子の一部もしくは全領域) : 対象はDNA

- ① 尿路上皮癌の発癌に寄与すると報告されている遺伝子
- ② 食道扁平上皮の網羅的遺伝子解析で報告されている遺伝子群 (右図) の中で、尿路上皮癌でも変異がみられる遺伝子

- | | | | |
|-----------------|-----------------------|-----------------|----------------|
| • ARID1A | • p16 (CDKN2A) | • CREBBP | • EGFR |
| • EP300 | • HER2 (ErbB2) | • ERBB3 | • ERCC2 |
| • FGFR3 | • KRAS | • HRAS | • NRAS |
| • KDM6A | • PIK3CA | • RB1 | • TERT |
| • TP53 | | | |

※主に点変異を検出、染色体の増幅や欠失などは検出対象外

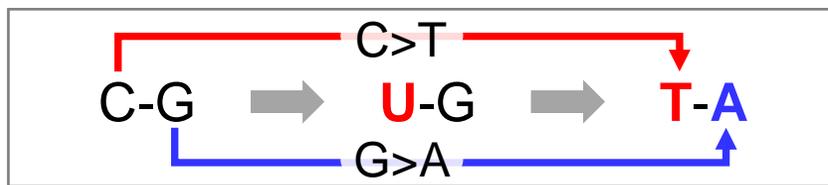


(Nature. 2019 :312-317)



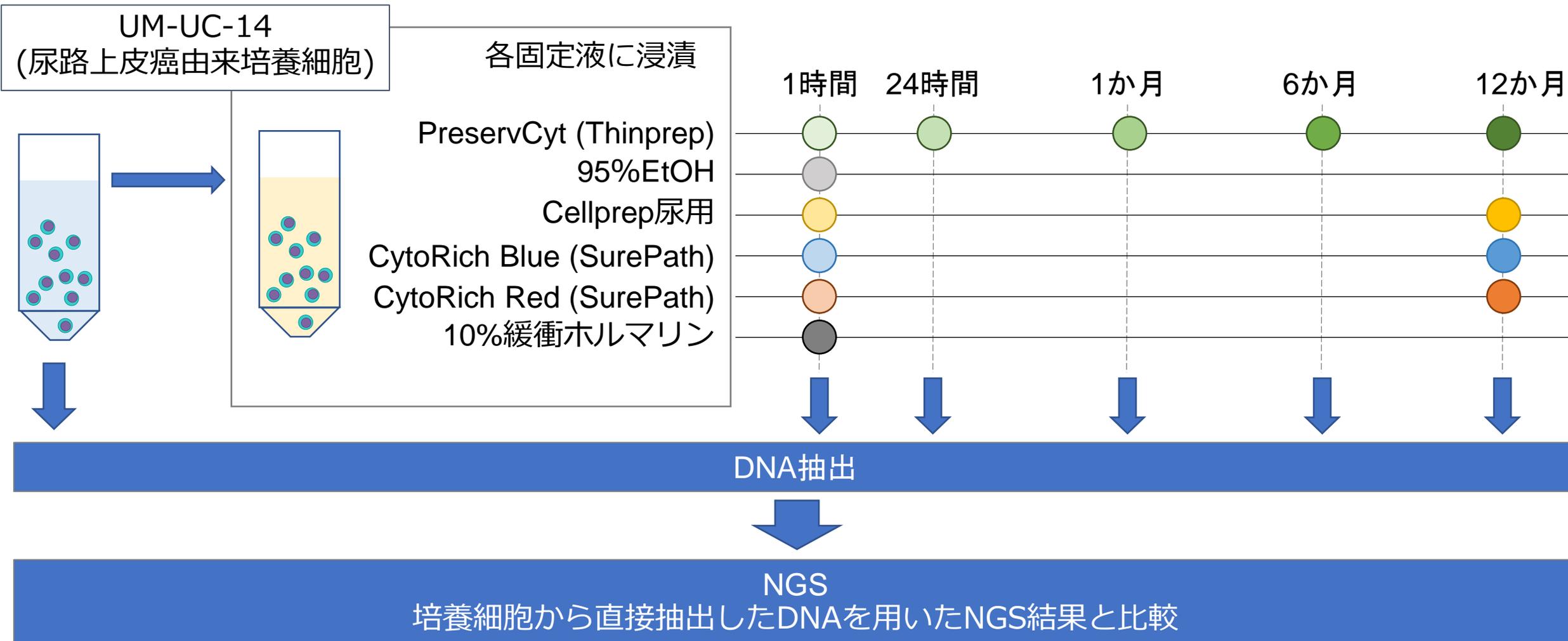
結果

結果① 固定液による塩基置換の差



FFPEサンプルでは、DNAのシトシンが脱アミノ化され、シトシンはウラシルへと変換されることがある

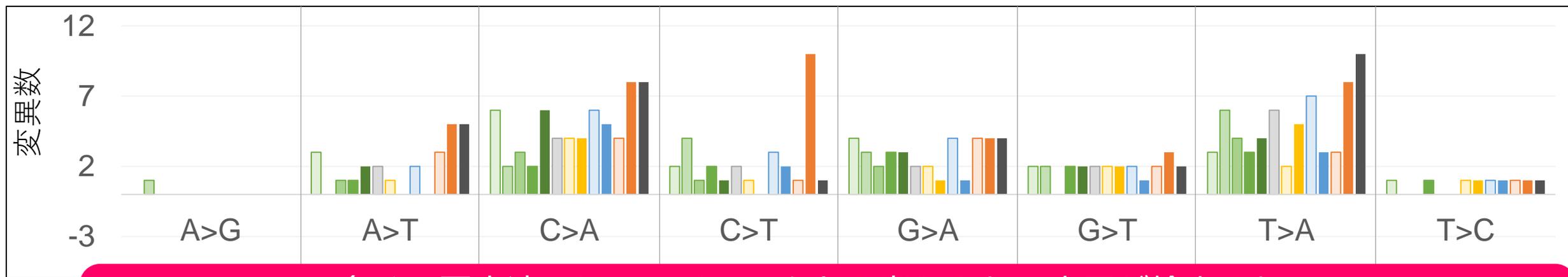
- ▶ 変換したウラシルは、シーケンスによってC>T 又は G>A の変異として検出される（偽陽性の原因）
- ▶ LBCの固定液ではどうか？



結果① 固定液による塩基置換の差

	固定時間					固定液主成分	ホルマリン
	1時間	24時間	1か月	6か月	12か月		
PreservCyt	1時間				12か月	メタノール	
95%EtOH	1時間					エタノール	
Cellprep尿用	1時間				12か月		
CytoRich Blue	1時間				12か月		
CytoRich Red	1時間				12か月	イソプロパノール	+
10%NBF	1時間					ホルマリン	+

培養細胞から直接抽出したDNAを用いたNGS結果と比較（変異頻度5%以下の塩基置換数）

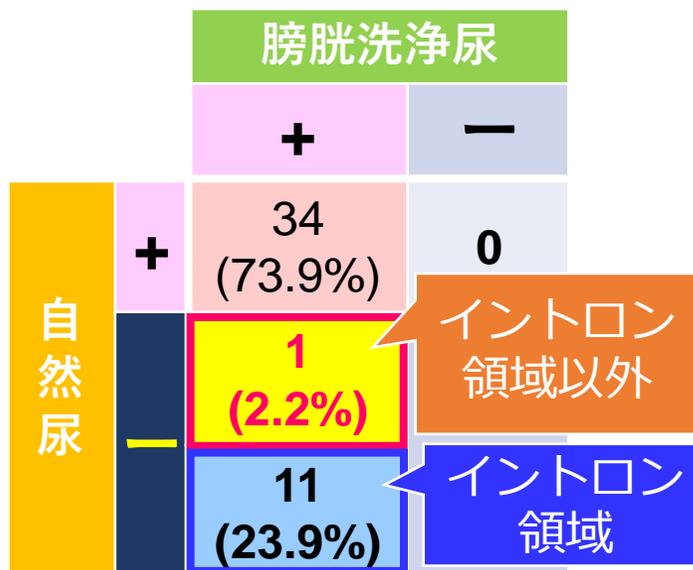


多くの固定液ではアーチファクトと考えられる変異が検出される
→解析をするときには注意が必要

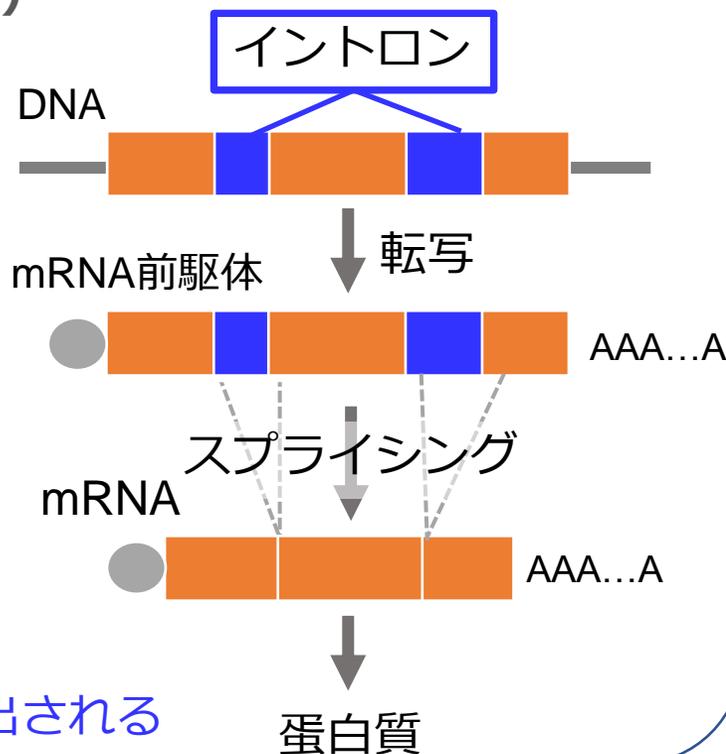
結果② 材料の違いによる検出変異量の差

- PreservCyt保存期間：平均558.69日 (116-1203日)
- PreservCytからのDNA抽出使用量：平均7ml (2-10 ml)

同時提出の自然尿と膀胱洗浄尿の変異遺伝子数の一致率 (4患者)



一致率は73.9%
膀胱洗浄尿の方が変異が検出される

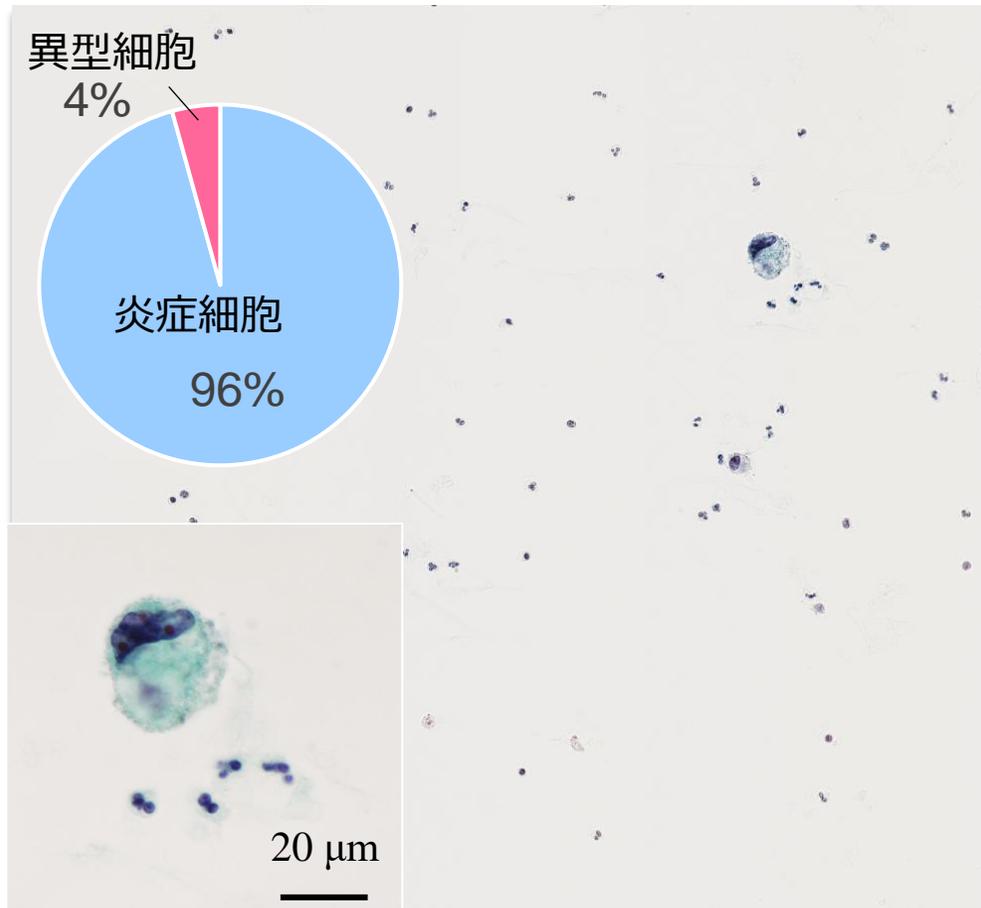


変異が検出されなかった症例

自然尿; Class IIIb, 組織; pT2G3>2

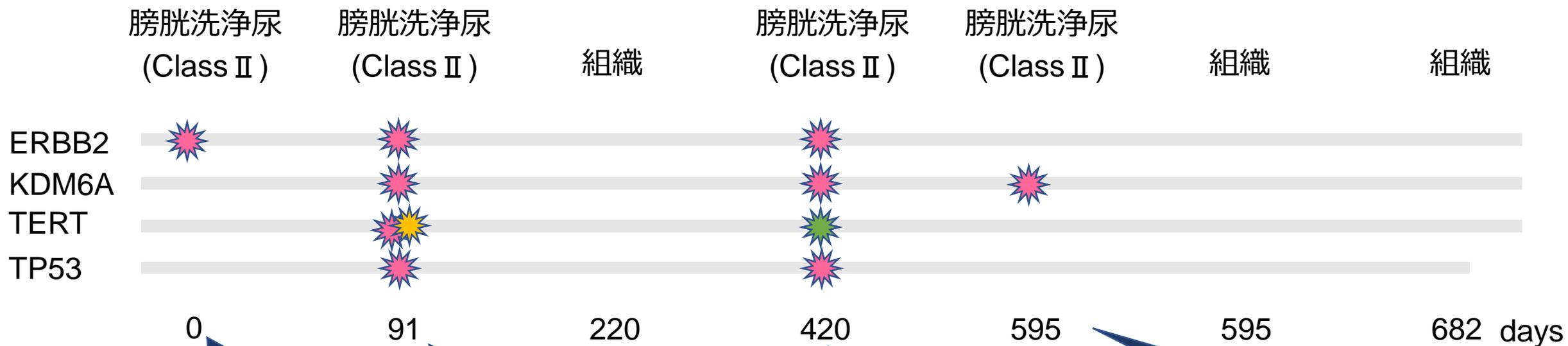
異型細胞
4%

炎症細胞
96%

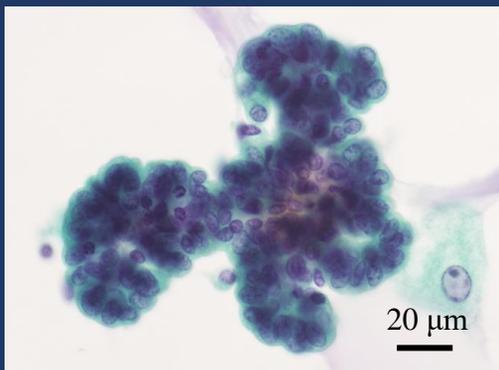


異型細胞の出現が少なく、炎症細胞が多い
NGSの結果の解釈には要注意

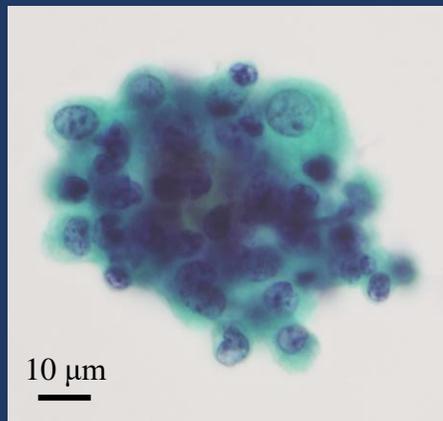
結果③ 同一症例間の時間経過比較



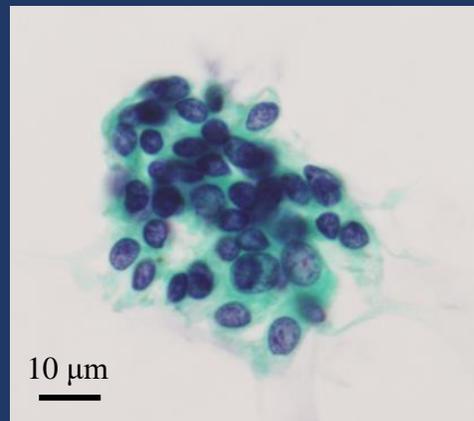
細胞診断は悪性と言いきれない



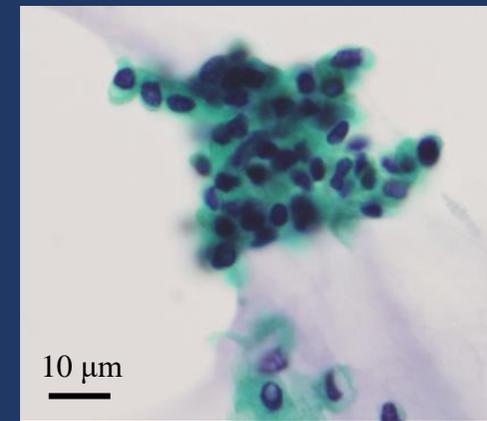
細胞診断は悪性と言いきれない



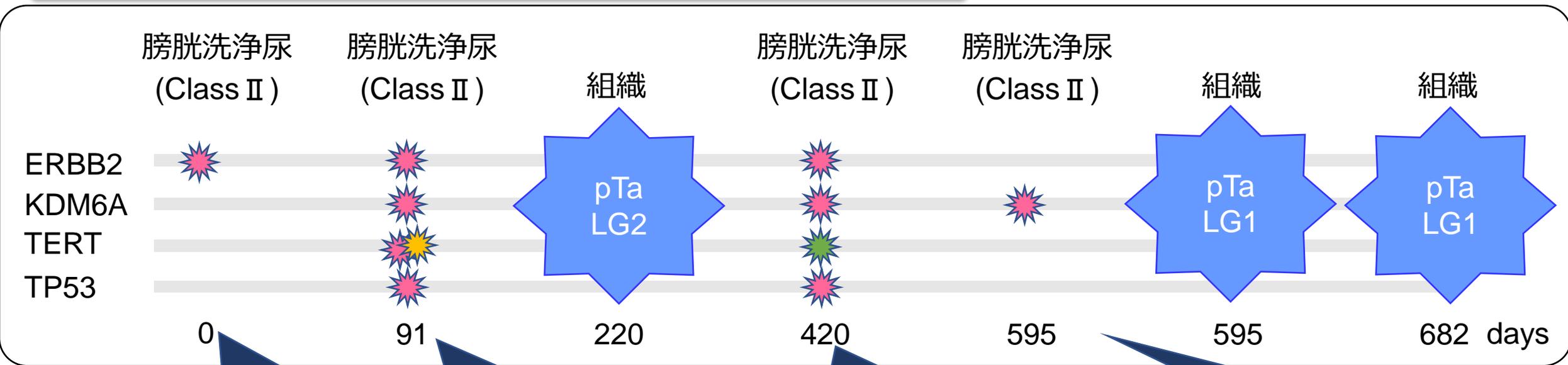
細胞診断は悪性と言いきれない



細胞診断では悪性と言いきれない



結果③ 同一症例間の時間経過比較



細胞診断は悪性と言いきれない
6か月以上前から変異+

細胞診断は悪性と言いきれない

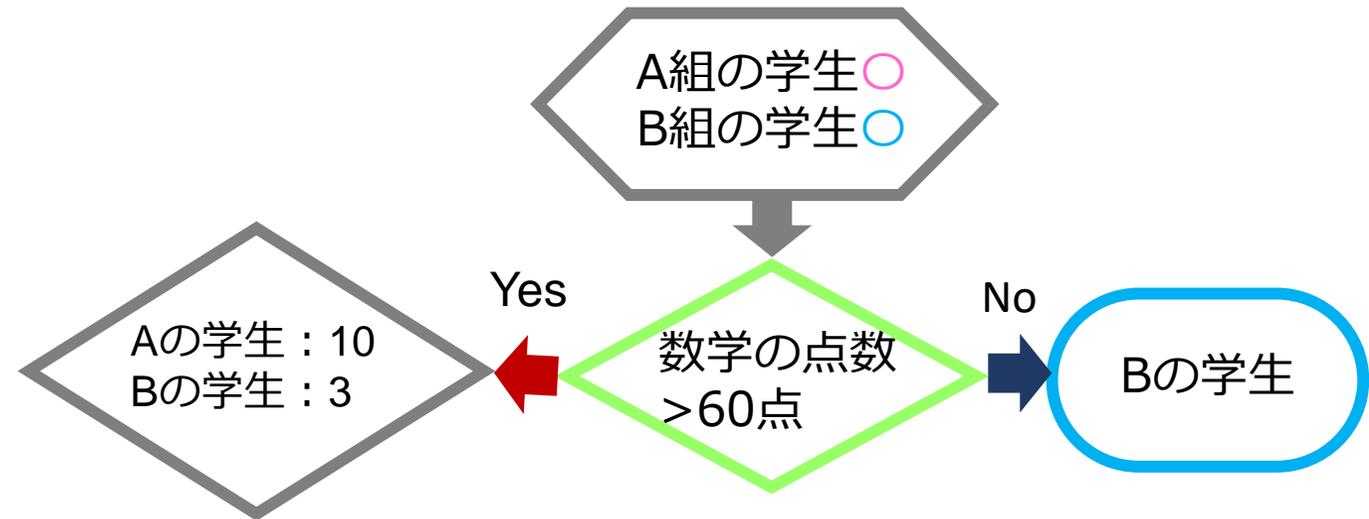
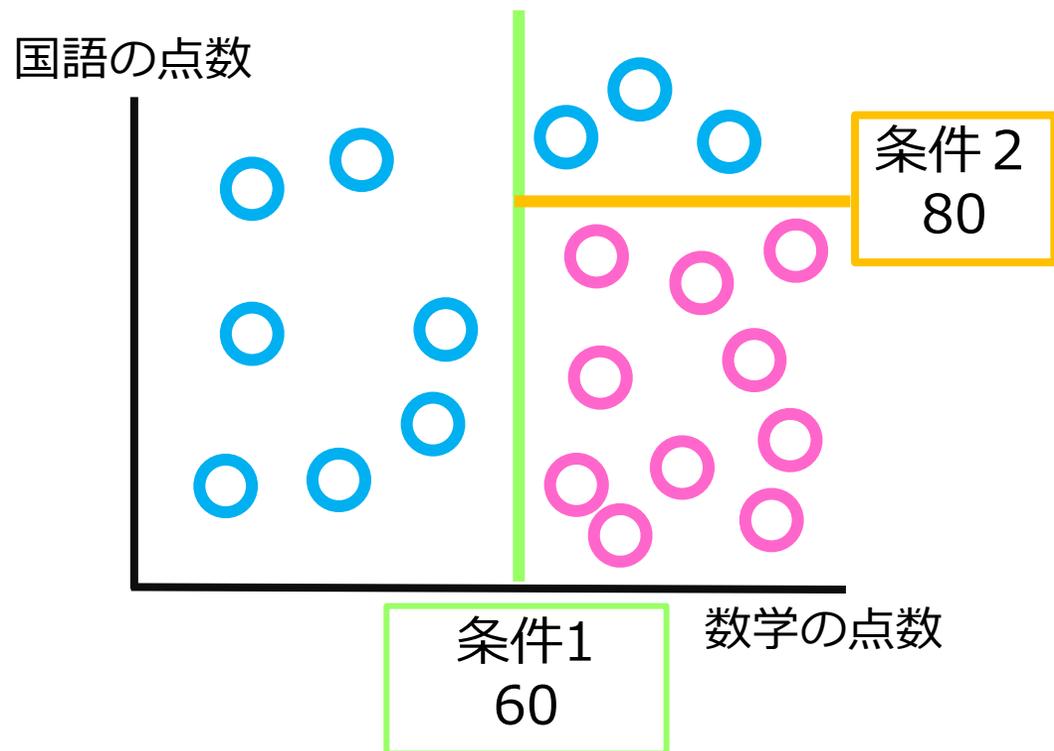
細胞診断は悪性と言いきれない

細胞診断では悪性と言いきれない

- 形態学的には悪性と言いきれない症例からでも変異が検出される
- 以前とは異なる変異が検出されることがある

決定木分析

- 樹形構造によって判断の流れが視覚的に理解できるように考えられた判別・予測手法
- 個体を表す種々の変量の値からその個体がどのグループに属するかを予測するためのルールを生成する
- CAHID、C4.5/C5.0/See5、CARTなどのアルゴリズムがある



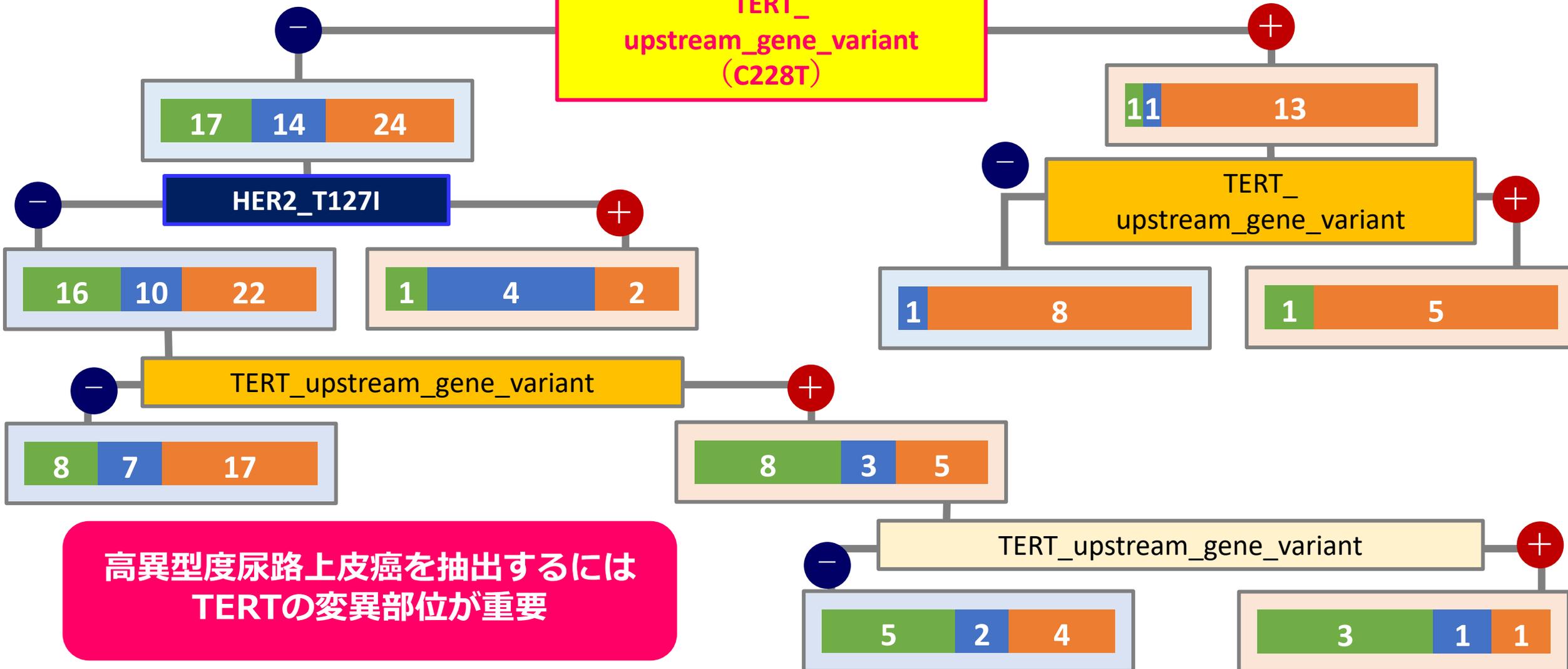
結果⑤ 決定木分析による解析

組織学的・臨床的診断結果

- BN: 非腫瘍性病変
- LG: 低異型度尿路上皮癌
- HG: 高異型度尿路上皮癌

BN	LG	HG
18	15	37

TERT_upstream_gene_variant (C228T)



高異型度尿路上皮癌を抽出するには TERTの変異部位が重要

結果と考察

✓ Thinprep保存検体を用いたNGSについて

- 1年以上保存されている検体からでもNGSは可能だったが、アーチファクトによる変異の可能性を加味して、解析・解釈する必要がある
- 自然尿よりも膀胱洗浄尿を用いた方が変異が検出された
- 少量から抽出した検体からでも変異は検出されたが、異型細胞と炎症細胞の割合を加味し、NGSを実施する必要がある

➡ 細胞診標本上の出現細胞を観察し、NGSに適した検体を選別する必要がある

✓ 非腫瘍性病変からも、少数の遺伝子に変異が検出された

✓ 細胞形態学的に、悪性と言い切れない細胞からも遺伝子変異が検出された

➡ 背景or非腫瘍性尿路上皮細胞にも遺伝子変異が生じている可能性がある

✓ 高異型度尿路上皮癌は非腫瘍性病変や低異型度尿路上皮癌症例に比べて、変異を有する遺伝子および変異の数は増える傾向にあった

✓ TERTの変異は、変異箇所注目することで高異型度尿路上皮癌を抽出する傾向にあった

➡ 細胞診断に遺伝子変異を加味することで、異型度の推定が可能になる可能性があり、尿路上皮癌の診断の精度の向上が見込まれる

謝辞

今回、このような発表の機会をくださいました
第 46 回日本臨床細胞学会近畿連合会学術集会

◆会長 大林 千穂 先生

◆座長

藤井 智美 先生

佐々木 伸也 先生

◆運営スタッフの皆様

深く感謝申し上げます

