

腫瘍最前線レポート - 第 56 回

～筆者から一言～

今回は犬の肥満細胞腫に使用される KIT の免疫組織染色と c-kit の遺伝子診断に関してです。肥満細胞腫は外科的切除のみで長期生存が可能なことが多いのですが、予測できないような悪性の性状を示すことがあるため注意が必要です。多くの臨床家は、予測とは異なり悪性度の高い挙動を示す肥満細胞腫症例に遭遇した経験があると思います。組織学的グレードや分裂指数以外に、特に中等度分化型の肥満細胞種の挙動をより正確に予測することのできる方法が必要です。c-kit 遺伝子の変異や KIT の免疫組織染色などは長年、予後との関連が示唆されてきましたが、いまだにこれらの因子が予後とどの程度相関しているのかは明らかにされていません。最近、VCS と ACVP による専門家作業部会である Oncology-pathology working group (OPWG) より、KIT の免疫組織染色と c-kit の遺伝子診断が予後と関連があるのか、またどのような場合に有用であるのか、に関する意見が発表されました。特に新しいことが述べられているわけではないのですが、KIT の免疫組織染色と c-kit の遺伝子診断の過去の報告についての総論でもあるので、いい復習になるかと思い、今回は要旨の日本語訳ではなく、全文の翻訳を載せてみました。

Vet Comp Oncol. 2019 Dec;17(4):451-455. doi: 10.1111/vco.12518.

犬の皮膚肥満細胞腫の KIT タンパク質発現と *c-kit* 遺伝子変異の予後と治療反応における重要性
Prognostic and predictive significance of KIT protein expression and *c-kit* gene mutation in canine cutaneous mast cell tumours: A consensus of the Oncology-Pathology Working Group.

Thamm DH, Avery AC, Berlato D, Bulman-Fleming J, Clifford CA, Hershey AE, Intile JL, Jones PD, Kamstock DA, Liptak JM, Pavuk A, Peauroi J, Powell R, Rissetto K, Valli VEO, Webster JD.

Introduction

肥満細胞腫 (MCT) は、犬において最も頻発する皮膚腫瘍であり、全皮膚腫瘍の 16-21%を占める。ほとんどの犬 MCT は局所治療 (手術+/-放射線治療) で効果的に治療を行うことができるが、一部の MCT は転移のリスクが高く、そのため全生存期間が短い。さらに、局所再発した MCT や、腫瘍細部が大きかったり浸潤性が高い MCT、また広い手術マージンの得られない場所に発生する MCT は、治療が難しい。組織学的所見 (グレードや分裂指数など) は生物学的挙動を予測するための判断材料として主に用いられるが、一部の MCT は組織学的に特筆すべき所見が認められない場合でもアグレッシブな挙動を示す。そのため MCT の生物学的挙動と臨床転帰をより正確に予測し、どの症例が補助的的化学療法之恩恵を受けるかを見極めることのできる検査は有用となる。さらに、近年細胞殺傷性化学療法と低分子チロシンキナーゼ阻害剤 (TKIs) などの犬 MCT に対する内科的治療オプションの拡大により、どの症例がどの治療に反応するかを予測することは、治療判断上有用である。

c-kit 遺伝子の変異は犬の皮膚 MCT の約 15%で認められ、高グレードの MCT では変異率が高く 35%近くにおよぶ。エクソン 11 における遺伝子内縦列重複 (ITD) は MCT における *c-kit* 遺伝子の変異で最も一般的に認められる変異であるが、エクソン 11 の欠失変異やエクソン 8 と 9 の ITD や置換変異も頻度が低いながらも認められる。エクソン 17 にも稀に変異が認められる。今のところ、*in vitro* での研究によると、これらの遺伝子変異はすべて KIT タンパク質のリガンドである幹細胞因子 (SCF) 非依存性の恒常的自動リン酸化をもたらす。さらに、KIT をターゲットとする TKIs は、エクソン 17 以外の遺伝子変異により生じる変異タンパク質によるリン酸化を阻害することが知られている。またいくつかの研究により、犬 MCT の一部で KIT タンパク質が細胞質内に異常に局在することが免疫組織染色 (IHC) により明らかになり、これらの異常な局在が *c-kit* 遺伝子変異および予後と関連することが示唆された。

多くの研究が *c-kit* 遺伝子の異常および KIT タンパク質の異常な局在の、犬 MCT の術後の転帰における重要性について調べてきた。さらに、いくつかの研究ではこれらの予後因子が内科治療、特に TKIs に影響を与えるかどうかについても調べ始めている。このレビューの目的は、犬 MCT において *c-kit* 遺伝子変異と KIT 蛋白局在が予後と治療反応を予測するテストとしての有用性について実存するデータをまとめることにある。

Prognostic value of *c-kit* gene mutation

c-kit 遺伝子変異と予後との相関に関して検討している研究のほとんどが、エクソン 11 の ITD に焦点を置いている。いくつかの研究で高グレードの MCT で ITD や欠損がより頻繁に認められると報告している。ある研究では、(*c-kit* に) ITD 変異が認められた MCT は、そうでない

MCT と比べ、転移を起こす確率が2倍になると結論づけている。これらの結果は、統計学的有意差は認められなかったが、少数の低グレード MCT が含まれていたことが影響しているのかもしれない。さらに、Webster らは ITD 変異をもつ MCT の犬は、全生存期間が有意に短く、MCT 関連により死に至る確率が高く、外科的手術および集学的治療後の再発率が高いと報告している。他の報告では、エクソン 11 の変異と細胞増殖因子（分裂指数、AgNOR の回数、Ki67 インデックス）の間に有意な相関が認められた。測定可能な犬 MCT に対する TKI マシチニブの効果を検討した前向き研究では、プラシーボ群に属する *c-kit* 遺伝子変異をもつ症例は変異を持たない症例と比べ、無病期間と全生存期間は短かった（それぞれ 42 日 vs 98 日と 182 日 vs 中央値未達）が、統計学的な有意さに関しては検討されなかった。しかし、Giantin らの研究によると、*c-kit* 変異をもつ症例で再発および MCT 関連死が認められたのは、5 例中 1 例のみであった。

c-kit 遺伝子の変異の組織学的グレードと分裂指数との間に強い相関が認められることから、*c-kit* 遺伝子変異が単独で予後因子となりうるのか、もしくはより簡単で安易に検査できる組織学的グレードと分裂指数と相関しているから予後と相関しているのかは、明らかではない。しかし変異の有無は、観察者のバイアスが問題となる組織学的グレードや分裂指数と比べより客観的な検査である。

これらのデータによると、*c-kit* 遺伝子変異をもつ症例は再発率が高く生存期間が短い傾向にあることから、癌がよりアグレッシブである可能性が高いと示唆される。しかし、*c-kit* 遺伝子変異は、組織学的グレードや増殖率のように単独の予後因子として確立されたわけではない。最近のある報告では、*c-kit* 遺伝子変異は単変量解析では予後因子となるが多変量解析ではならないとしている。

Prognostic value of KIT protein localization

細胞内の KIT 発現に違いがあることは、犬 MCT 組織の IHC により Reguera らがはじめて明らかにした。この研究では、Patnaik 分類でグレード I の MCT は細胞質および細胞膜に KIT が散在する一方、グレード II および III の MCT では細胞質内の発現が増加するとしている。KIT の局在と予後に関しては、結果が様々である。3つの研究では、細胞質内の KIT 発現が限局もしくは広範である場合は発現が細胞膜上である場合と比べ外科的切除後の予後（再発および生存期間に関して）が悪いとしている。これらの研究で KIT の細胞質内発現が予後と相関したが、陽性的中率（PPV）が低いため、KIT の細胞膜発現は良好な予後を予測するものであるが、細胞質内発現は必ずしも MCT のアグレッシブな動態を予測するものではない。上記の研究とは反対に、Costa Casagrade らは KIT 染色パターンと組織学的グレードおよび予後との相関はないと結論づけている。また Preziosi らは、KIT が核膜上に限局している場合には細胞質に広範に発現しているよりも予後が悪いとしているが、膜に発現が認められた症例の数が少なすぎるため、予後を述べるには不十分であった。IHC の染色方法が KIT 発現の結果を左右するため、各研究における様々な結果が技術的な問題によるものであるかどうかとも考慮しなければならない。特に、MCT において IHC の過剰発色は細胞質の高いバックグラウンドにつながるため、細胞質内での KIT 発現が弱く広範に見える。これは Preziosi の研究で特に顕著であり、細胞質内の広範発現を示す写真では、強い膜上発現が認められ、細胞質内発現は弱い。そのた

め、細胞膜に KIT が限局した MCT のいくつかは細胞質に広範に発現していると誤って解釈されている可能性がある。このような状況に対する対処法の一つは、正常な肥満細胞を含む組織をコントロールとしておくことである。これらの細胞の KIT は細胞膜に限局しており、陽性コントロールとして IHC が正確に行われたことを示す。

上記の *c-kit* 遺伝子変異の場合と同様、KIT タンパク質の局在と他の既知の予後因子（グレード、増殖）との間に相関がある可能性が示唆されるが、KIT タンパク質の局在が単独の予後因子となりうるかどうかは明らかではない。ある比較的大きな回顧的研究では、KIT 局在は単変量解析では予後因子となるが多変量解析ではないとしている。しかし、測定可能な MCT の内科的療法を検討した別の前向き研究では、多変量解析でも KIT 局在は単独の予後因子であると結論づけている。

多くの報告が細胞質内の KIT 発現の増加が再発と生存期間をもとにした予後と相関することを示唆するが、PPV が低く、単独では予後因子として使うべきではない。細胞膜上に KIT が局在した症例の予後を予測するのには役立つだろう。

Value of *c-kit* mutation status and KIT localization in predicting response to therapy

c-kit 変異状況により TKIs であるトセラニブリン酸塩とマシチニブによる治療に対する反応を予測できるかどうかは、これらの薬の2つの臨床試験によりある程度明らかにされた。トセラニブの臨床試験と予備試験によると、*c-kit* 遺伝子に変異があった症例はそうでない症例とくらべ、長期の転帰（無増悪期間と全生存期間）に関しては報告がないものの、客観的奏率が倍程度であった（60% vs 30%）。マシチニブの臨床試験では、治療群とコントロール群の転帰に有意差が認められたのは、*c-kit* 遺伝子に変異をもつ症例のみであった。さらに有意差は認められなかったものの、この試験においてマシチニブ治療群で *c-kit* 遺伝子に変異をもつ症例は、症状が進行するまでの期間が長く（230 日 vs 83 日）、6ヶ月の時点で治療に対する反応率が高かった（20% vs 10%）。TKI であるイマチニブにおいても、症例数は少ないものの同様の傾向が認められ、長期にわたる転帰に関する報告はないものの、*c-kit* のエクソン 11 に ITD が認められた犬はイマチニブによる治療に反応する傾向が認められた。しかし、最近の研究の中には TKI に対する反応と *c-kit* の変異ステータスに関連はないとするものもある。

興味深いことに、トセラニブと低分割放射線治療の併用に関する単一群試験において、症例数が少なかったものの、*c-kit* 変異がある症例はない症例とくらべ有意に無増悪生存期間が短かった。最近の比較的大きな多施設前向き研究においても、*c-kit* 変異ステータスとトセラニブによる治療後の予後に負の相関が認められた。これらの結果は、*c-kit* 変異をもつ症例のトセラニブに対する治療反応率は高いものの、長期の転帰の改善には必ずしも繋がらないことを示唆するため、重要な事実である。

c-kit 変異のない症例群が TKI による治療に反応することが示されたことは、特筆すべきことである。これは変異のない KIT の活性化（eg, autocrine or paracrine signalling, amplifications）によるものかもしれないし、*c-kit* の別の部位に活性化変異があるのかもしれないし、これらの薬は完全に KIT 選択的ではないため、他のチロシンキナーゼ（PDGFR や VEGFR2 など）の阻害によるものかもしれない。

KIT の局在の TKI 治療の転帰への影響は、最近 2 つの研究で報告された。いずれの研究においても、KIT の局在と客観的奏効率との間に相関は認められなかった（一つの報告は比較的症例数が少なく検定力が足りない）が、より大きな前向き試験では、異常な KIT の局在は、トセラニブ治療後の無増悪期間と全生存期間と負の相関が認められた。

Conclusions

要約すると、100%の PPV と NPV をもつ予後因子は存在しない。そのかわり、全ての予後因子はさまざまな角度からリスク分析およびハザード比を提供してくれる。併存疾患、病気の不均質性、複数の遺伝子による影響、副作用に対する忍容性の違い、および治療可能かどうかなどの要因すべてが、各症例の臨床転帰を左右する。したがって、予後を予測するためには複数の予後因子を用いることが重要である。c-kit 遺伝子変異検査と KIT 局在は、組織学的検査で予後が判定しづらい腫瘍に最も有用かもしれない。c-kit 遺伝子変異は、組織学的に低グレードであるがアグレッシブな挙動を示す MCT の識別に最も有用で、KIT の細胞膜局在は予後が良く腫瘍増悪の確率が低い MCT の識別に有用かもしれない。現存する文献の結果は様々だが、c-kit 遺伝子変異検査は、どの MCT 症例が TKI 単独治療により初期反応を示すかを予測するのに役立つかもしれない。これは、外科的切除を目的とした術前内科的治療による腫瘍縮小を行う際に特に有用かもしれないが、長期の臨床的有用性とは必ずしもつながらない。これらの検査により、結果に一貫性が認められないこともあることは特筆すべき点である（例えば高グレードでの KIT 細胞膜局在、低グレードでの c-kit 変異）。このような場合、臨床的判断およびさらなる検査が治療判断に必要となってくる。

Future directions/additional studies

多くの疑問がまだうやむやのままである。c-kit 遺伝子変異および KIT タンパクの異常局在はローリスクの MCT（Patnaik 分類のグレード I および II で分裂指数が低い MCT、2-tier 分類で低グレード）でどの程度の発生率であるのか。そして、これらローリスクの MCT において、c-kit 遺伝子変異および KIT タンパクの異常局在の有無は、予後に影響を及ぼすのだろうか？ c-kit 遺伝子変異および KIT タンパクの異常局在は、組織学的グレードや増殖指数などの既知の予後因子と比べた場合、単独で予後因子となりうるのか？これらの因子は、化学療法や放射線治療を行った症例に対しても、同様に重要な予後因子となりうるのか？

従来の多くの研究がエクソン 11 の変異に焦点を置いているため、c-kit 遺伝子の他のエクソンでの変異が予後と相違があるかどうかに関してはさらなる研究が必要である。

KIT 局在のマシチニブ治療に対する反応予測能に関しては、今後の研究が待たれるところであるが、前向き研究が最も適していると思われる。

さらに、MCT 切除後の予後と組織学的グレード、分裂指数、増殖マーカー、c-kit 遺伝子と KIT 局在の相関に関して、多施設共同の前向き研究が大いに必要である。これらの情報は、術後の予後を予測すると同時に、これらの症例の評価基準を統一することにもつながる。この研究には病理学者、腫瘍専門医、外科医、そして分子生物学者の協力が必要なため、OPWG がこの多施設共同研究を組織するのに適している。