

においても感染疾患は半数であったという報告があり、急性のびまん性陰影の場合、非感染性疾患

も十分に考慮するべきである。詳細は各論にゆずる。

## フォーカス

### 特発性間質性肺炎 (IIPs) の診断における気管支鏡検査の役割

特発性間質性肺炎 (idiopathic interstitial pneumonias: IIPs) は70余におよぶ鑑別を要する「びまん性肺疾患」の中で現在なお原因不明の間質性肺炎の総称である (表4)<sup>1)</sup>。病理診断学的には7病型に分類されている。2002年、American Thoracic Society (ATS) および European Respiratory Society (ERS) から共同でIIPsの分類についての国際合意声明が発表されている。すなわちIIPsは臨床病理学的疾患単位として、特発性肺線維症 (idiopathic pulmonary fibrosis: IPF)、非特異性間質性肺炎 (nonspecific interstitial pneumonia: NSIP)、特発性器質化肺炎 (cryptogenic organizing pneumonia: COP = idiopathic bron-

chiolitis obliterans organizing pneumonia: 特発性BOOP)、急性間質性肺炎 (acute interstitial pneumonia: AIP)、呼吸細気管支炎-間質性肺炎 (respiratory bronchiolitis-associated interstitial lung disease: RB-ILD)、剥離性間質性肺炎 (desquamative interstitial pneumonia: DIP)、リンパ球性間質性肺炎 (lymphoid interstitial pneumonia: LIP) の7つに分類されており、最も多いIPFを筆頭に表5<sup>2, 3)</sup>のような発症頻度が報告されている。

診断の手順は「診断と治療の手引き」<sup>1)</sup>に掲載されているため詳細は省略するが、IPFを中心に据えて的確な診断をすることを目標に詳細な問診

表4 びまん性肺疾患

原因不明の間質性肺炎 (IIPs) 特発性肺線維症 (IPF) 非特異性間質性肺炎 (NSIP) 特発性器質化肺炎 (COP/BOOP) 急性間質性肺炎 (AIP) 呼吸細気管支炎を伴う間質性肺炎 (RBILD) 剥離性間質性肺炎 (DIP) リンパ球性間質性肺炎 (LIP)	肉芽腫性肺疾患 サルコイドーシス 過敏性肺炎 塵肺および関連性疾患 珪肺 石棉肺 シデローシス アルミニウム肺 超硬合金肺 (GIP)	薬剤誘起性肺疾患 抗生物質、抗菌薬 ニトロフラントイン 抗不整脈薬 消炎薬 金製剤 ペニシラミン インターフェロン 小紫胡湯 抗腫瘍薬 放射線 パラコート 腫瘍性肺疾患 細気管支肺上皮癌 痛性リンパ管症 造血性肺転移 悪性リンパ腫 リンパ腫様肉芽腫症 カボジ肉腫	感染性肺疾患 細菌性肺炎 ウイルス性肺炎 ニューモシスチス肺炎 クラミジア肺炎 マイコプラズマ肺炎 粟粒結核 真菌性肺炎 気道系が関与する肺疾患 びまん性汎細気管支炎 (DPB) Immotile cilia 症候群 嚢胞性線維症 その他のびまん性肺疾患 高地肺水腫 HIV合併びまん性肺病変 HTLV-1 感染合併肺病変
その他の原因不明肺疾患 慢性好酸球性肺炎 急性好酸球性肺炎 肺リンパ脈管筋腫症 (LAM) 肺胞蛋白症 Hermansky-Pudlak 症候群 ランゲルハンス細胞組織球症 ヘモジデローシス 肺胞微石症	膠原病および関連性疾患 関節リウマチ 皮膚筋炎/多発性筋炎 全身性エリテマトーデス 強皮症 (全身性硬化症) 混合性結合組織病 シェーグレン症候群 ベーチェット病 Wegener 肉芽腫症 結節性多発動脈炎 顕微鏡的多発血管炎 Churg-Strauss 症候群		

(特発性間質性肺炎-診断と治療の手引き-, p3, 南江堂, 2011より改変)

表5 IIPsにおける各疾患の頻度 (外科的肺生検例)

病理組織所見	欧米での頻度 (n = 102)	わが国での頻度 (n = 606)	病理組織所見	欧米での頻度 (n = 102)	わが国での頻度 (n = 606)
IPF/UIP	63 (62%)	313 (52.6%)	DIP/RBILD	10 (10%)	29 (4.8%)
NSIP	14 (14%)	107 (17.2%)	LIP	-	14 (2.5%)
COP/BOOP	4 (4%)	57 (9.4%)	Others	9 (8%)	72 (12.2%)
AIP	2 (2%)	9 (1.5%)			

(特発性間質性肺炎-診断と治療の手引き-, p3, 南江堂, 2011より改変)

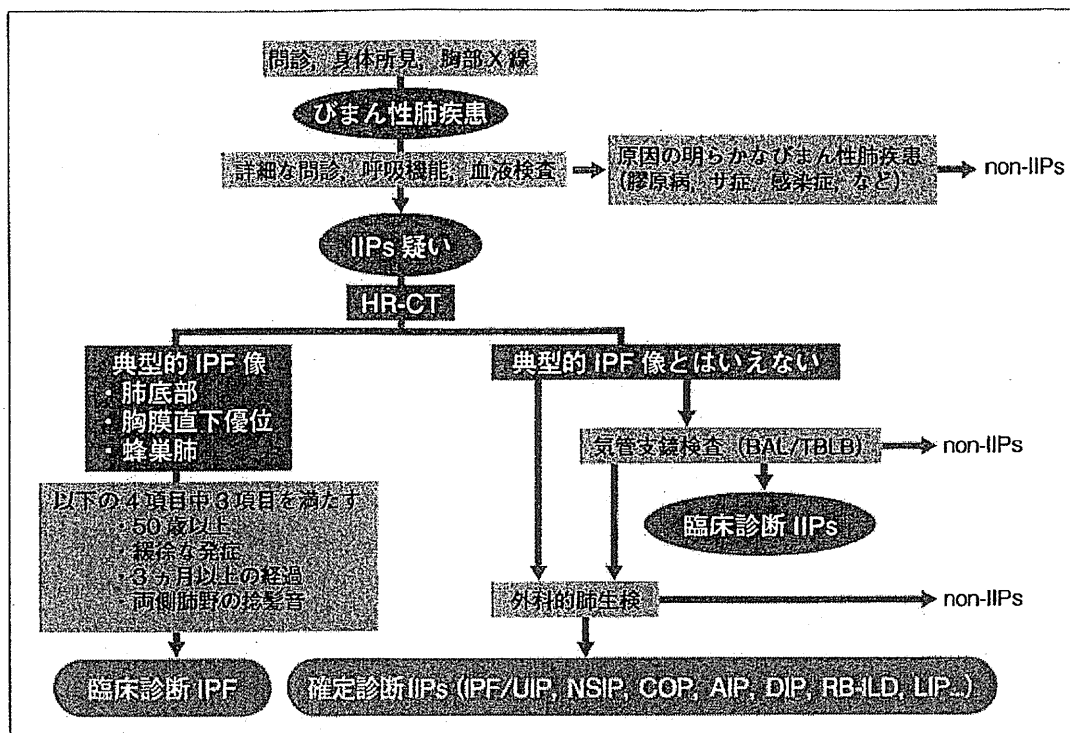


図1 びまん性肺疾患に対するアプローチ

典型的な蜂巣肺を有するIPFは外科的肺生検を施行せずにIPFの診断が可能とした。

(特発性間質性肺炎-診断と治療の手引き-, p7, 南江堂, 2011より改変)

を行い、身体所見（環境曝露や職業歴、膠原病を示唆する症状・理学所見の有無、服薬歴、感染症状）を確認し、呼吸機能検査、血液検査などにより、原因の明らかなびまん性肺疾患の可能性を除外する。続いて高分解能CT（HR-CT）所見でIIPsに特徴的な所見を確認する。すなわち、IPFについては両肺底部・胸膜直下優位に明らかな蜂巣肺所見を伴う網状影を認め、1) 年齢50歳を上回る、2) 緩徐な発症、3) 3ヵ月以上の経過、4) 両側肺野の捻髪音、の4項目中3項目を満たせば臨床的にIPFと診断して的中する可能性が高い。IPFに典

型的といえない所見がみられた場合には、気管支肺胞洗浄（BAL）や経気管支鏡の肺生検（TBLB）を行い、それでも診断確定に至らなければ外科的肺生検（SLB）の適応を検討する（図1）<sup>1)</sup>。

なお、IIPsの確定診断は、臨床的・画像的・病理的に検討された結果を総合して評価し導き出す。一度確定診断がついても、経過中の再評価により原因疾患・診断の変更が必要となる場合もある。総じて気管支鏡手技はIIPs診断の補助的役割に限定されていることを承知しておく必要がある。

## 気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage : BAL)

### BALの意義と適応

びまん性肺疾患の病態解析のため、研究的手法として導入されたBALは、1980年代には臨床診断に応用され、悪性腫瘍や各種感染症の診断手法として、特に免疫不全患者で日和見感染が疑われ（HIV患者のニューモシスチス肺炎の診断など）、血液培養や喀痰誘発法による侵襲性の低い検査法で診断に至らない場合には欠くことのできない検査法として発展した検査手法である。

気管支ファイバースコープを気管支の垂～垂々区域に楔入し、側管から生理食塩水を注入した後、注入した生理食塩水を回収する。回収した洗浄液の、細胞・液性成分の解析を行う技法である。

間質性肺疾患においてBALは肺胞蛋白症やランゲルハンス細胞組織球症などの診断には有用な場合があるが、IIPsの診断を積極的に支持するBAL所見の有用性には限界がある。むしろIIPsの鑑別診断の補助として、その活動性の評価にお

いて、回収総細胞数、細胞分画、CD4/CD8比の組み合わせが有用であるとの報告もあるが、補助診断の意義にとどまると理解される。

### ● 検査方法と安全性

通常びまん性肺疾患では、仰臥位で最も回収率が期待できるため右中葉または左舌区でBALを施行する。COPやその鑑別を要する感染症や悪性疾患などでは、陰影の存在する部位で施行する必要がある。気管支ファイバースコープの先端を気管支に楔入し、37℃の生理食塩水を20～50 mLずつ（計100～200 mL）手動的に注入した後、その都度通常は注射器を用いて陰圧をかけて回収する（例：50 mLシリンジ×3回など）。

回収率は60%程度以上が適正であり、回収率が著しく低下する場合は、肺病変を評価するうえで信頼性に欠ける。回収されたBAL液（BAL fluid：BALF）は一部検鏡用にとり、遠沈後の沈渣よりグラム染色、抗酸菌染色、グロコット染色あるいは蛍光抗体などの免疫染色にて起炎病原体の有無を確認し、一部は一般細菌、レジオネラ、抗酸菌、真菌などの培養に用いる。BALF定量培養では一般細菌では $10^4$  cfu/mL以上であれば肺炎の起炎菌とされる。また、抗酸菌やレジオネラ、ウイルスなどではPCRによる診断も可能である。細胞分画の評価には得られた細胞浮遊液を比重遠沈し、May-Giemsa染色を行う。BALF細胞の処理は、4℃で迅速に行うことが重要である（活性化された細胞は壊れやすいため注意を要す）。

BALの安全性に関して、米国NIHからの報告では有害事象が発熱2.5%、肺炎0.4%、出血

0.7%、気管支攣縮0.7%であり、すべて軽微な合併症であった。重篤な不整脈や最近5週間以内の急性心筋梗塞、出血傾向や循環動態不安定例などはBALの相対的禁忌とされているが、絶対的禁忌とはされていない。成人呼吸急迫症候群（ARDS）のような急性呼吸不全患者の5%程度に、一過性の低酸素血症、低血圧、不整脈などを認めたが、全例安全にBALを施行できたと報告されている。しかしながら呼吸不全症例に対してはBALの有用性とリスクを考慮したうえで酸素投与を行い、十分な呼吸・循環動態の観察において、迅速に施行されなければならない。

なお、IPFではBALを契機に急性増悪をきたした症例が報告されているので、施行後も細心の注意が必要である。気管内挿管・人工呼吸管理中の患者では十分な換気保持のため8 mm以上の内径を有する挿管チューブが推奨される。

### ● BALによるびまん性肺疾患の診断

各種のびまん性肺疾患の診断や管理上、BALの意義について表5に示す。非感染性疾患においては肺胞蛋白症、悪性腫瘍、ランゲルハンス細胞組織球症などはBALにより確定診断ができる疾患であり、肺胞出血や好酸球性肺炎でも診断的価値が高い。しかしながらIIPsの診断上、BALの有用性は補助的であり、治療管理においても経時変化を見るには適さない。感染性疾患の診断におけるBALの意義についてはp.13を参照のこと。

喫煙はBALの評価に影響を与え、細胞数や細胞比率が変化するため注意が必要である。一般的に、喫煙により、回収細胞数の増加、マクロ

表5 びまん性肺疾患におけるBALの意義

感染性疾患	非感染性疾患
BALからの病原体検出により診断が確定する疾患 ニューモシチス（PCP） レジオネラ 結核菌 マイコプラズマ インフルエンザウイルス RSウイルス	BALにより診断が確定する疾患 肺胞蛋白症 悪性腫瘍（癌性リンパ管症、白血病や悪性リンパ腫） ランゲルハンス細胞組織球症
BALによる病原体検出が診断や管理に有用な疾患 サイトメガロウイルス 単純ヘルペスウイルス 一般細菌 非定型抗酸菌 アスペルギルス カンジダ クリプトコッカス	BALが診断に有用な疾患 肺胞出血 好酸球性肺炎 ペリリウム肺 過敏性肺炎 石綿肺 矽肺 サルコイドーシス
	BALが管理に有用な可能性のある疾患 特異性間質性肺炎（IPF、NSIP、COP、AIPなど） 膠原病に伴う間質性肺炎

（特異性間質性肺炎－診断と治療の手引き－，p15，南江堂，2011より改変）

表6 BALの細胞分画の比率によるびまん性肺疾患の鑑別診断

リンパ球増加なし	リンパ球増多あり
マクロファージ優位 特発性肺線維症 (UIP/IPF) 石綿肺  好中球優位 細菌性肺炎 慢性気管支炎 びまん性汎細気管支炎 (DPB) 気管支拡張症 急性間質性肺炎 (AIP) 急性呼吸促進症候群 (ARDS)  好酸球優位 寄生虫症 化学物質吸引 薬剤性肺炎 アレルギー性気管支肺アスペルギルス症 全身性血管炎 好酸球性肺炎 (特発性) 気管支喘息	CD4+T細胞優位 サルコイドーシス 慢性ペリリウム肺 農夫肺 薬剤性肺炎 (金製剤) ウイルス性肺炎の一部 マイコプラズマ肺炎 肺結核 リンパ増殖性肺疾患および悪性リンパ腫の一部  CD8+T細胞優位 過敏性肺炎 薬剤性肺炎 膠原病に伴う間質性肺炎 (急性～亜急性発症) 非特異性間質性肺炎 (NSIP) 特異性器質化肺炎 (COP) 粟粒結核 リンパ増殖性肺疾患の一部 ウイルス性肺炎の一部

(特発性間質性肺炎-診断と治療の手引き-, p16, 南江堂, 2011より改変)

ファージ比率の増加, リンパ球比率の低下, CD4/CD8比の低下などが認められると報告されている。びまん性肺疾患の鑑別診断に特徴的かつ

優位なBALF細胞パターンを示す(表6)。これらも臨床, 病病情報を支持する参考資料に用いる。

## 経気管支肺生検(trans-bronchial lung biopsy: TBLB)

経気管支肺生検(TBLB)により得られる検体は, 試料サイズが小さいため(2~5mm), 線維化や炎症の程度(病理組織パターン)の評価に使用すべきではないとされる。したがってTBLBでIIPsの各病型の鑑別, もしくは確定診断の根拠とすることは避けるべきである。特にUIPの診断はTBLBでできないことを明記しておく。

しかしながら, 以下の病型には積極的な診断根拠となりうる場合がある。すなわち典型的な臨床像と画像所見があり, TBLBで器質化肺炎(OP)パターンやびまん性肺胞傷害(DAD)パターンが認められれば, それぞれCOP, AIPの診断が可能な場合がある。また, TBLBは悪性疾患(痛性リンパ管症, 肺胞上皮癌, 悪性リンパ腫など), 感染症(抗酸菌症, 真菌症など), 原因不明の肉芽腫性疾患(サルコイドーシス, ランゲルハンス

細胞組織球症など), 過敏性肺炎, 好酸球性肺炎, 肺胞蛋白症, アミロイドーシス, 薬剤性肺炎などでIIPsとの鑑別が問題となる場合に有用性を發揮する。

びまん性肺疾患の病変の主座は末梢の細気管支から肺胞レベルにあるため, TBLBの検査に際しては, 胸膜直下をねらって生検を行い, 同レベル組織を採取することが重要である。

具体的には, 患者に呼吸運動を静止させ, レントゲン透視下に胸腔の最外側まで生検鉗子が進む体位をとらせ, そのやや内側で生検を行う。この手法により, 肺胞領域の検体を確実に得ることができ, かつ気胸の頻度を低下させることができる。極度の咳嗽, 低酸素血症のために呼吸運動の静止ができない場合は, TBLBを施行することは困難である。TBLBの診断意義を表7に示す。

表7 びまん性肺疾患におけるTBLBの診断的意義

TBLB所見で診断が確定する疾患	TBLB所見と臨床所見で診断可能な疾患	TBLB所見では病理学的に診断確定ができない疾患 (SLBが必要)
悪性腫瘍, 特に癌 肺感染症 クリプトコッカス症 アスペルギルス症 ノカルジア症 ニューモシスチス肺炎 肺結核症 サイトメガロウイルス肺炎など リンパ脈管筋腫症 肺胞蛋白症 肺胞微石症	サルコイドーシス 慢性ペリリウム肺 過敏性肺炎 塵肺症 石綿肺 珪肺 肺血鉄症 (二次性がほとんど) 好酸球性肺炎 (感染症の除外要) AIP* COP*	IIPs (IPF, NSIP, RBILD, DIPなど) 膠原病に伴う間質性肺炎 閉塞性細気管支炎群の疾患 びまん性汎細気管支炎 Wegener肉芽腫症 リンパ増殖性肺疾患

\*: 従来は診断にはSLBが必要とされてきたが, AIPで硝子膜が確認された場合, COPでは器質化肺炎所見を認めた場合で, 臨床, 画像上も診断に矛盾しない場合に診断が可能とされる。

(特発性間質性肺炎-診断と治療の手引き-, p17, 南江堂, 2011より改変)

## 外科的肺生検(surgical lung biopsy : SLB)

SLBは, TBLBやBALにより診断が確定し得ないびまん性肺疾患で, 手術の禁忌ではない患者に推奨される。外科的肺生検で採取される組織のサイズは数cm単位であり, TBLBの数10倍の大きさとなる。したがってTBLBとは異なり, 病変の分布や広がり(斑状, びまん性あるいは小葉構造の位置関係など), 程度, 気道との関連, 構造の破壊・改築などをパターン認識することが可能である。広がりを持った病理組織診断はIIPsの各病理組織パターン(UIP, NSIP, COP, DAD, DIP, RB-ILDなど)の鑑別に不可欠である。病理検体のスケールの違いを提示する(図2)。TBLBによる病理検体は採取部位によって所見が異なる可能性があり, 所見の診断には限界のあることが理解できる。

臨床所見や画像所見上, 典型的なIPF症例(臨床診断基準を満たし, HR-CT上典型的な蜂巢肺所見を呈するもの)では, 組織診断の結果がUIPである可能性が高いと推測されていて, 外科的肺生検を行わずとも臨床診断IPF/UIPとしてよいとされている。しかしながら画像上の蜂巢肺が不明瞭で, しかもIPFである可能性は残されている場合, すなわち臨床所見や画像所見が非典型的ではあるが, IPFの可能性が否定できない場合は外科的肺生検の適応を考慮する。この場合, UIP以外の組織病理学的パターンがみられる場合も多く, IPFと異なる生命予後や治療管理が必要であるため, 外科的肺生検による確定診断が治療方針を決定するためにも必要である。またIIPsと鑑別が必要な, 腫瘍性疾患(悪性リンパ腫, リンパ増殖

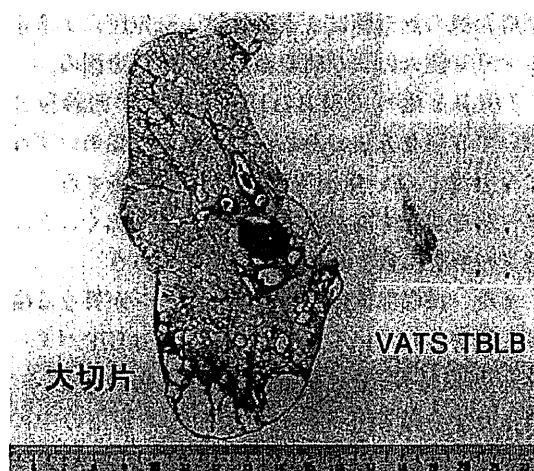


図2 生検方法の相違によるスケールの違いを理解する

TBLB標本は診断のための疾患の代表性の観点では, びまん性肺疾患の病態を忠実に表現するとは言い難く, 少なくともVATS生検を必要とする。

(天理よろづ相談所病院 病理 小橋陽一郎先生, 呼吸器内科 田口善夫先生提供)

性疾患など), 感染性疾患(非定型抗酸菌症など), 肉芽腫性疾患(サルコイドーシス, ランゲルハンス細胞組織球症など), 血管炎(Wegener肉芽腫症, 顕微鏡的多発血管炎, Goodpasture症候群など), その他好酸球性肺炎, 過敏性肺炎, 塵肺症などの確定診断が的確に得られる。なお, 診断精度は疾患の終末期やステロイドの既治療により修飾され, 低下する。したがって治療を開始する前の肺生検が望ましい。しかしながら時として急速進行性のIIPの場合には治療を先行させ, 後の生検もやむを得ない場合がある。この場合, 硝子膜の消失や, 気腔内の肉芽形成の減少など, DAD,

BOOP, NSIP間の鑑別が必ずしも容易ではない。

外科的肺生検は複数の肺葉から採取することが望まれる。生検時に肉眼所見で蜂巢肺を伴う高度の線維化を示す場合、完成した蜂巢肺部分だけでなく、周辺を含む生検部位を決定する必要がある。しかしながらUIPの重要な病理所見の1つが、「蜂巢肺を伴う基本構造の改築を生じうる高度の線維化」であるため、IPFを疑う患者では的確な診断のために、蜂巢肺と周辺組織を含む生検部位を決定する必要がある。

HR-CTは生検部位の決定に有用である。すなわち、病変の最も強い部分、最も病変の乏しい部分、またその中間部分をHR-CTにより特定し、それぞれ母指頭大の大きさで生検するのが望ましい。また、中葉あるいは舌区では非特異的な炎症所見を伴いやすいので、単独生検は避けるべきである。採取組織の無気肺による変化は、一定圧によるホルマリン注入により肺組織構築の回復を図る。

TBLBと比べてSLBはIIPsの病理学的診断において有用な方法であるが、現在の分類のいずれにも合致しない症例も依然として存在する。パターンを並記するか分類不能と捉えておくことが将来の解析に資するために賢明であろう。

また、採取部位により病理パターンが異なる症例も報告されている。例えば、下葉はUIPパターン、上葉はNSIPパターンを示す場合である。FlahertyらはUIPパターンが複数の肺葉の中の一つでも認められれば、他の肺葉でNSIPパターンが認められた場合でも、臨床経過はIPFに準じていたと報告している<sup>5)</sup>。また頻度は少ないが、

当初の診断が、その後の臨床経過と食い違う症例や、線維化を生じうる原因の確認、治療による反応性などから修正される症例も報告されている。その場合、臨床経過の再検討だけでなく、肺生検病理組織や画像所見の再検討が必要となる。

UIP/IPFに対する治療反応性については、肺胞中隔の炎症の程度が強ければステロイド反応性があり、線維化の程度が強ければステロイド反応性は乏しい、との報告がある。しかしながら報告当時UIP/IPFと診断された対象症例に、現在の定義によるDIP, RBILDまたはNSIPの症例が含まれていたかどうかははっきりしていない。

SLBには潜在的なリスクと経費が伴うので(保険適応外)、臨床診断の精度、治療可能なタイプのびまん性肺疾患を同定する可能性、および治療効果とのバランスを検討する必要がある。外科的合併症を高めるリスクファクター(年齢>70歳、極端な肥満、心疾患の合併、呼吸機能の著しい障害など)が存在する場合は、SLBによるリスクに十分注意して実行する。

また、SLBの方法としては、胸腔鏡下肺生検(VATS)と開胸肺生検(OLB)の2法がある。VATSはOLBに比べて合併症が少なく、ドレーナージ期間が短い、入院期間が短いなどの利点から、推奨される手技である。ただし、VATSは、胸膜癒着が存在する場合、高度の肥満の場合や、呼吸不全が高度の症例では施行困難であり、OLBが選択されることがある。

BAL, TBLB, SLBの長所・短所比較を表8に示す。

表8 気管支肺胞洗浄(BAL), 経気管支肺生検(TBLB)および外科的肺生検(SLB)の比較

項目	BAL	TBLB	SLB	
			VATS	OLB
侵襲	軽度	軽度(～中等度)	中等度	高度
麻酔	局所麻酔	局所麻酔	全身麻酔	全身麻酔
手術時間	短	短	短	やや長
採取部位の同定	可能	可能	可能	容易
病変の直接観察	困難	困難	可能	可能
診断回数	再検可能	再検可能	原則1回	原則1回
採取組織片	なし	きわめてわずか	十分量	十分量
合併症	時に発生(約2.5～5%)	時に発生(10%)	時に発生(10%)	時に発生(約2.5～7%)

# 呼吸器感染症における診断のアプローチと検体採取

感染症の診断・治療において、①患者(宿主)の状態の把握、②原因となる病原微生物の検索、③適切な抗菌薬の使用と④効果判定、という4つの要素を検討することが非常に重要である(図3、表9)。特に患者状態の把握(どの臓器に感染症が存在するか、重症度の判定など)と原因となる病原体の検索は重要で、これらを正確に理解することにより、適切な治療の選択が可能となる。

呼吸器感染症における原因病原体検索のための検体採取法は多岐にわたる(表10)。培養による検査は最も重要な検査のひとつであるが、培養検査を有効に活用し、適切な診断・治療を行うため

には、①どのような検体を採取するか、②培養検査以外の診断方法(抗原検査、血清抗体検査、遺伝子学的検査など)を用いて、どのように総合的に判断するか、ということとともに、③検体の質を保つため、いつ、どのように検体を採取し、処理、輸送、保存を行うべきかが非常に重要である。

気管支鏡検査は、喀痰培養などの非侵襲的に得られた材料による微生物学的検査より診断的検査値が高いと判断されたときに行うべき検査であり、主に人工呼吸器関連肺炎(VAP)をはじめとする院内肺炎や、ニューモシスチス肺炎など免疫不全患者における肺炎で適応となる。

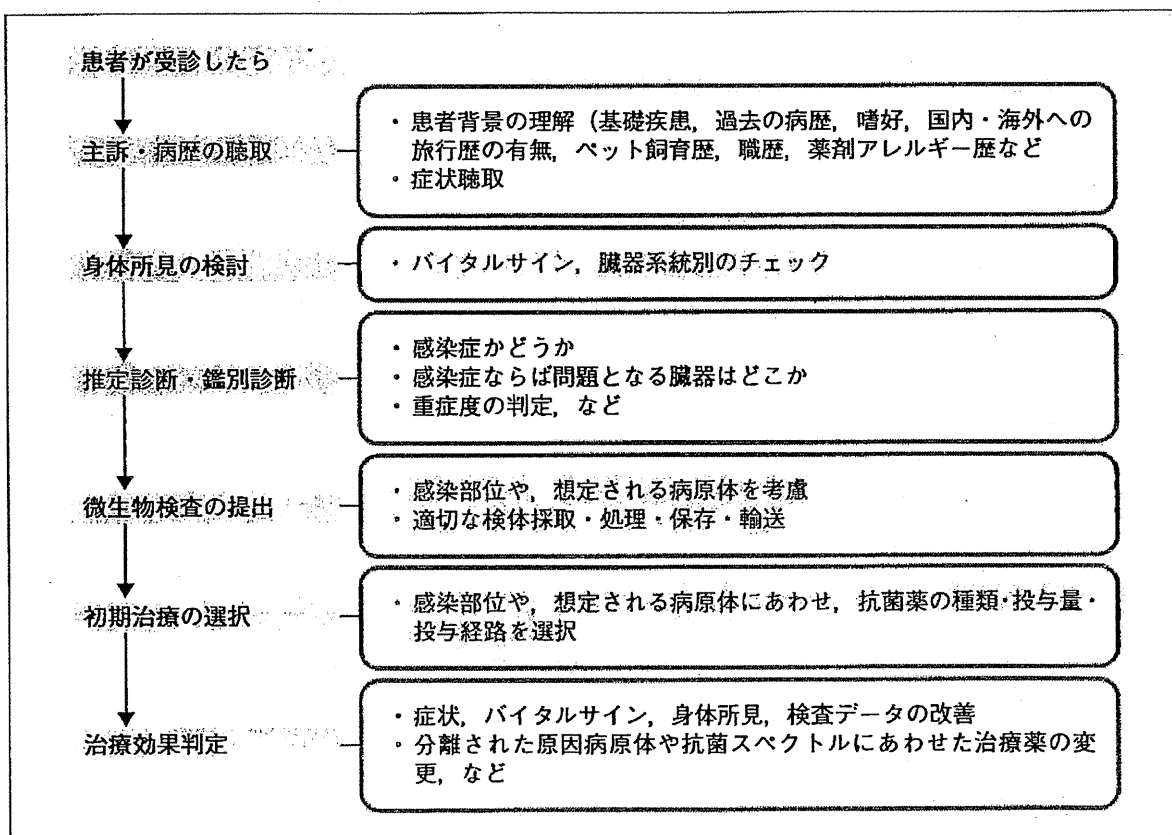


図3 感染症診断へのアプローチ

表9 感染症診断に役立つ臨床情報

主 訴	受診の原因となったエピソードを時間の流れに沿って記載	
患者背景		
既往歴	<ul style="list-style-type: none"> <li>基礎疾患 呼吸器疾患 (COPD, 喘息など), 糖尿病, 悪性腫瘍, 肝疾患, 心疾患, 脳血管障害, 膠原病, 腎疾患, 人工透析歴, など</li> <li>主要な感染性疾患の既往と治療歴 HBV, HCV, HIV, 梅毒, 結核, など</li> <li>ワクチン接種歴</li> <li>手術歴の有無 術式, 侵襲度, 術後経過, など</li> <li>輸血歴の有無</li> <li>留置デバイスの有無 カテーテル (血管, 膀胱, 腹腔, 胸腔など), 人工呼吸管理, 気管切開, など</li> <li>薬剤アレルギー</li> </ul>	
服用中の薬剤	<ul style="list-style-type: none"> <li>投与量, 投与回数, 投与期間など</li> <li>抗がん化学療法・免疫抑制薬投与の有無 抗がん薬, 免疫抑制薬 (ステロイド, 抗リウマチ薬等) など</li> <li>抗菌薬投与歴の有無 マクロライド少量療法, など</li> </ul>	
社会歴	<ul style="list-style-type: none"> <li>嗜好 喫煙, 飲酒, 静注麻薬常用, など</li> <li>動物接触歴</li> <li>旅行歴 温泉, 海外渡航, など</li> <li>性的活動</li> <li>職業</li> </ul>	
臨床症状・身体所見	<ul style="list-style-type: none"> <li>バイタルサイン 意識障害, 熱型, 血圧, 脈拍, 呼吸回数, など</li> <li>身体所見 頭頸部, 胸腹部, リンパ節腫大, 皮膚, 神経学的所見, などのように系統的にチェックする</li> </ul>	
検査所見	<ul style="list-style-type: none"> <li>炎症マーカー 白血球数, 分画, CRP, など</li> <li>迅速検査 尿中肺炎球菌抗原, 尿中レジオネラ抗原, インフルエンザウイルス抗原, など</li> </ul>	

表10 肺炎における原因病原体の検索のための検体採取法

<ul style="list-style-type: none"> <li>血液培養</li> <li>喀痰塗沫グラム染色, 培養</li> <li>咽頭ぬぐい液培養</li> <li>気管支鏡下検体培養 気管支内採痰, 気管支肺泡洗浄 (BAL), protected specimen brushings (PSB), 経気管支鏡的マイクロサンプリング法 (BMS)</li> <li>経気管支肺生検 (TBLB)</li> <li>経気管的針吸引法 (TBNA)</li> <li>経皮的肺針吸引法 (TTNA)</li> <li>遺伝子診断法</li> <li>尿中抗原検査: 肺炎球菌, レジオネラ</li> <li>鼻腔・咽頭ぬぐい液抗原検査: インフルエンザウイルス, アデノウイルス, RSウイルス, 溶連菌など</li> <li>血清抗体価測定 細菌: クラミドフィラ, マイコプラズマ, レジオネラ, コクシエラなど, 真菌: カンジダ, アスペルギルス, クリプトコックスなど, ウイルス: アデノウイルス, インフルエンザウイルス, RSウイルス, コクサッキーウイルスなど</li> </ul>
---

(日本呼吸器学会 呼吸器感染症に関するガイドライン作成委員会: 日本呼吸器学会「呼吸器感染症に関するガイドライン」成人市中肺炎診療ガイドライン, 2005より改変)



## 感染症疾患と気管支鏡下で得られる検体の採取方法 (表 11)<sup>7)</sup>

気管支鏡下で得られる検体の種類として、気管支内吸引痰、気管支肺胞洗浄、protected specimen brushings、経気管支鏡的マイクロサンプリング法、経気管支的生検などがあるが、感染症の場合、目的に応じ特別な注意をはらい、適切な方法を選択する必要がある。採取の際には、リドカインの局所投与で病原体の発育を阻害したり、BAL液中の細胞数を増加させたりすることが知られているため、過剰な投与に注意する必要がある<sup>2)</sup>。

### ● 気管支内吸引痰

気管支内吸引痰のグラム染色は、人工呼吸器関連肺炎 (ventilator-associated pneumonia : VAP) の初期の抗菌薬選択において、原因病原体の特定のため有用である。染色や培養の検査材料として、喀痰と同様に取り扱う。口腔内や気管支鏡吸引チャンネル内の汚染などの影響を受けやすいため、その培養結果の判定には慎重を要する。

### ● 気管支洗浄液

気管支内に生理食塩水を注入後、分泌物を吸引する方法である。染色や培養の検査材料として、喀痰や気管支内吸引痰と同様に取り扱う。気管支内吸引痰同様、口腔内や気管支鏡吸引チャンネル内の汚染などの影響を受けやすい。気管支洗浄の有用性は、治療抵抗性の気管支炎や細気管支炎の診断に限られる。

### ● 気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage : BAL)

下気道感染の検査・診断に最も有用性の高い方法である。気管支鏡を気管支内腔にしっかり楔入固定することにより、病変領域から効果的に検体を採取することが可能である。洗浄液は37℃に温めた (温度刺激による咳反射や気管支攣縮を避けるため) 無菌生理食塩水を用いて行う。レジオネラを疑う際には、生理食塩水により菌の発育が阻害される場合があるため、滅菌水を用いて行うこともある。注入量は、患者の状態や疾患により異なるが、通常、計150～200 mLで行う。1回目の吸引液は気管支からの分泌物が多く含まれるため、細菌培養を行う場合この液は一般的に破棄するが多い。染色や培養の検査材料として喀痰と同様に取り扱う。喀痰や気管支内吸引痰ほどではないが、上気道からの汚染の影響を受ける可能性があり、一般細菌が培養された場合には、慎重に評価する必要がある。

### ● protected specimen brushings (PSB)

二重のシース構造をもった気管支鏡用ブラシで、口腔内や気管支鏡チャンネル内の菌の汚染を受けずに検体採取することが可能である。欧米では以前から広く普及しており、院内肺炎やVAPなど、下気道からの検体採取が困難な場合に有用である。検体採取後は先端をアルコールで洗浄した後、無菌的にカットし、1 mLの生理食塩水で希釈する。

表 11 気管支鏡下の検体採取方法と適応疾患

採取方法	適応疾患	推奨される検査
気管支洗浄	<ul style="list-style-type: none"> <li>治療抵抗性の気管支炎や細気管支炎の診断に有用</li> <li>肺炎では、結核菌やレジオネラ、ニューモシスチスのような特殊病原体によるものに限られる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>検出したい病原体に適した染色や選択培地への接種・定量培養</li> </ul>
BAL	<ul style="list-style-type: none"> <li>日和見病原体のすべてに有用</li> <li>VAPの診断にも有用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>細菌の染色・定量培養</li> <li>真菌の染色・培養</li> <li>ウイルスのDFA、培養</li> <li>ニューモシスチスの染色、DFA</li> <li>レジオネラの染色・培養</li> </ul>
PSB	<ul style="list-style-type: none"> <li>細菌性肺炎の診断にのみ有用</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>細菌の染色・定量培養</li> </ul>
TBB	<ul style="list-style-type: none"> <li>肺炎での役割は限定される</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>ニューモシスチスと結核菌ではおそらく有用</li> </ul>

BAL：気管支肺胞洗浄、PSB：protected specimen brushings、TBB：経気管支的生検、DFA：直接蛍光抗体法 (harp SE, Robinson A, Saubolle M, et al. (松本哲哉, 満田年宏, 柳原克紀 訳)：検体処理法と輸送法. CUMITECH 7B 下気道感染検査ガイドライン. 医歯薬出版, 東京, 9-20, 2007より改変)

### ● 経気管支鏡的マイクロサンプリング法 (bronchoscopic microsampling : BMS)<sup>8)</sup>

気管支上皮被覆液を採取する目的で石坂らにより開発された方法である。BMSのファイバロット (図4) は吸水性、保水性に優れ、1本で約20 $\mu$ Lの検体を定量的に回収できる。また、低侵襲性でくり返し施行できることから、感染症の診断や治療効果の判定に役立つことが期待されている。

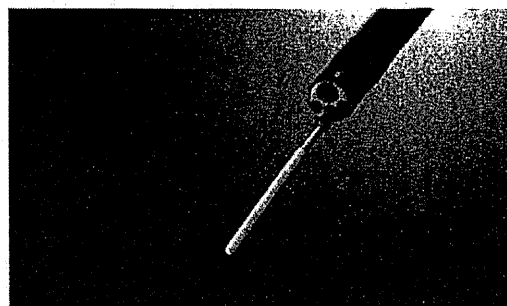


図4 マイクロサンプリングチューブ  
(画像提供：オリンパスメディカルシステムズ株式会社)

### ● 経気管支的生検 (transbronchial biopsy : TBB)

病理学的検査により、抗酸菌や真菌、ウイルスの封入体の存在を証明することが可能である。また、サルコイドーシスや腫瘍のような非感染性疾

患の存在を証明するためにも用いられる。他の微生物学的検査にも用いられることがあるが、上気道からの汚染の危険があるため、結果の評価には注意を要する。

## ● ● 感染症診断における検体処理の注意点<sup>9,10)</sup> ● ●

採取した検体の質を保証することにより、確実な原因病原体の特定が可能となる。検体提出の前には必ず検体の質をチェックし、培養検査に適した検体かどうか確認の上、微生物検査室に提出することが必要である。

検体の採取時期は、抗菌薬の投与開始前が原則である。抗菌薬開始約2～4時間で検体内の細菌に変化が認められ、病原体が検出できないことが多い。何らかの理由ですでに抗菌薬投与が開始されており、やむをえず検体を採取する場合には、可能な限り24時間以上抗菌薬投与を中止し、検体採取することが望ましい。患者の状態などにより中止できない場合には、抗菌薬の血中濃度が最も低いレベルにある時期の検体採取を考慮する。

一般に採取した検体は、室温であれば2時間以内に微生物検査室まで運ぶことが望ましい。しかし、夜間の緊急検査時など、採取後2時間以内に

検査室へ輸送できない場合には、4℃の冷蔵庫であれば24時間以内の保存が可能である。ただし、肺炎球菌やインフルエンザ菌など難発育菌の場合には、長時間の保存により検出感度が悪くなる可能性があり、培養結果の判断には注意を要する。また、嫌気性菌を疑う場合には、嫌気ポーターによる保存・輸送を行う (表12, 13)。

検体採取、処理を行う際には医療従事者の感染や環境の汚染に十分注意を行う<sup>11)</sup>。標準予防策 (standard precaution) が原則だが、感染様式により予防策が異なるため、気管支鏡検査を行う前に、どのような病原体を疑い検査を行うかということを検討することが非常に重要である (表14)。特に結核などの空気感染をきたす感染症を疑う場合には、検査前までに十分な検索を行い気管支鏡検査を行う必要がある。

表12 検体採取時の一般的注意点

① 検体の採取時期、採取方法	<ul style="list-style-type: none"> <li>発病初期、化学療法開始前の採取</li> <li>採取容器は頑強で空気漏れが少なく、検査しやすいものを選ぶ</li> <li>検体量は適量（できるだけ多く）採取する</li> </ul>
② 過量なリドカイン局所投与を避ける	<ul style="list-style-type: none"> <li>病原体の発育阻害をしたり、BAL液中の細胞数を増加させたりするため、注意を要する</li> </ul>
③ 検体の乾燥を避ける	<ul style="list-style-type: none"> <li>乾燥すると多くの微生物は死滅する</li> <li>微量検体は直接培地に接種する</li> </ul>
④ 嫌気性菌の存在を疑う場合	<ul style="list-style-type: none"> <li>専用容器に採取する</li> <li>専用容器がない場合には、検体容器を材料で満たし、死腔を少なくする</li> <li>菌の死滅を防ぐため、直ちに検査室に届ける</li> </ul>
⑤ 検体の室温保存は厳禁	<ul style="list-style-type: none"> <li>検体は培地の役目をするため、菌が増殖し、成績を誤らせる</li> <li>複数菌混在例では、発育の遅い病原菌の検出が困難となる</li> </ul>
⑥ 検体保存は冷蔵保存が原則	<ul style="list-style-type: none"> <li>淋菌、髄膜炎菌、赤痢アメーバなど低温に弱いものは例外</li> </ul>
⑦ 他施設に輸送して検査する場合	<ul style="list-style-type: none"> <li>検体を適当な輸送培地に採取し、冷蔵して輸送する</li> </ul>

(小栗豊子:微生物検査材料の採取と保存, 臨床微生物検査ハンドブック 第2版, 小栗豊子編, 三輪書店, 東京, 19-24, 2000より改変)

表13 検体採取と輸送の注意点

検体の種類	検体処理の注意点	その他のコメント
気管支肺胞洗浄	<ul style="list-style-type: none"> <li>多量の検体採取が可能, 滅菌容器で輸送すること</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>嫌気性菌の培養にはPSBほど適さない</li> <li>BALは遠心後の検体を染色や培養に用いるべき</li> <li>VAPの診断では細菌の定量培養が必要</li> <li>ニューモシスチスの検出に適している</li> </ul>
気管支洗浄/ ブラッシング	<ul style="list-style-type: none"> <li>滅菌容器や1mLの滅菌生理食塩水で輸送</li> <li>検体を乾燥させない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>少量の検体では可能な検査の種類が限られる</li> </ul>
喀痰	<ul style="list-style-type: none"> <li>口腔内常在菌を取り除くため, うがいをさせた後, 採取する</li> <li>深い咳嗽をさせ, 下気道からの分泌物を採取する</li> <li>滅菌容器で輸送</li> <li>細菌培養には1mL, 抗酸菌や真菌検査には5mL以上必要</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>上皮細胞が多い検体は, 口腔内常在菌のコンタミネーションと考えられ, 一般細菌の培養には適さない。ただし, 抗酸菌や真菌の培養には使用可能</li> <li>二形性真菌*以外の真菌には用いない場合もある</li> </ul>
誘発喀痰	<ul style="list-style-type: none"> <li>滅菌生理食塩水のネブライザー吸入を行う</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>口腔内常在菌のコンタミネーションがある</li> <li>上皮細胞の有無にかかわらず培養を行う</li> <li>ニューモシスチスの検査に有用</li> </ul>
気管からの吸引	<ul style="list-style-type: none"> <li>喀痰と同様の扱いをする</li> <li>誘発喀痰のようにスクリーニングには使用すべきでない</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>口腔内常在菌のコンタミネーションがある</li> <li>上皮細胞の有無にかかわらず培養を行う</li> </ul>
生検	<ul style="list-style-type: none"> <li>検体の湿度を保ち, 直ちに検査室へ輸送すること。静菌性の生理食塩水やホルマリンは使用しない</li> <li>得られた生検検体は検体が得られた部位に応じ, 一般細菌, 真菌, 抗酸菌, 嫌気性菌の培養の適応となる</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>生検した部位により, 一般細菌以外の特定の病原微生物が疑われる場合もある (例: ノカルジア, バルトネラ, ヒストプラズマ, など)</li> </ul>
膿瘍	<ul style="list-style-type: none"> <li>吸引した膿や液体の輸送は嫌気ポーターの使用が望ましい。ぬぐい検体はグラム染色や培養には望ましくない</li> <li>嫌気ポーター内の吸引物は, 嫌気性菌だけでなく, 好気性菌, 真菌, 抗酸菌培養も可能</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>シリンジに吸引した検体を直ちに輸送することも可能。空気を抜いてキャップをした後, 輸送すること</li> <li>検体提出の際には, 適切な臨床情報を付加すること (例: 外科的感染症, 外傷, 咬傷など)</li> </ul>

\*二形性真菌: 菌糸状と酵母状のいずれの形態でも発育できるもの。

例) コクシオイデス, ヒストプラズマ, カンジダ (*C. glabrata*を除く)

(Murray PR, Tenover FC, Tenover FC, Tenover FC: The clinician and the microbiology laboratory. Principles and practice of infectious diseases, 7th ed. Mandell, GL, Bennett, JE, Dolin R, ed. Elsevier, Philadelphia, ; 233-265, 2009より改変)

表14 検体採取時における感染経路別予防策

空気感染予防策	<ul style="list-style-type: none"> <li>結核菌、水痘や麻疹ウイルスなどの微生物を含む微小飛沫核（直径5 μm以下）が、長時間空中を浮遊し経気道的に吸入されることにより感染する様式</li> <li>全外気方式の空調設備（検体採取場所が外部に対し陰圧、すべての供給空気を新鮮外気とする）が望ましい</li> <li>空調設備の設置が難しい施設では、検査室内にHEPAフィルター付簡易循環式空調装置を設置することが望ましい</li> <li>検査中、ドアは常時閉めておく</li> <li>終了後は一定時間紫外線照射を行う</li> <li>咳のある患者には、検査前後は必ずサージカルマスクを着用させる</li> <li>結核患者や結核が疑われる患者の検査は最後に行う</li> <li>肺結核患者では、内視鏡操作により病巣から大量に排菌される可能性があるため、結核の疑いがある患者の検査時には、術者・介助者は必ずN95型マスクを装着する</li> </ul>
飛沫感染予防策	<ul style="list-style-type: none"> <li>インフルエンザウイルス、マイコプラズマ、髄膜炎菌などの微生物を含む大きい飛沫（&gt;直径5 μm）が、咳、くしゃみ、会話に伴って発生し、経気道的に粘膜に付着し伝播する感染様式</li> <li>飛沫の飛散範囲は1m以内</li> <li>床面に落下すると感染性はなくなる</li> <li>検査は可能な限り隔離された病室で行う</li> <li>咳、くしゃみのある患者には、検査前後は必ずサージカルマスクを着用させる</li> <li>患者から1m以内での検体採取を行う際には、医療従事者は必ずサージカルマスクを装着する</li> </ul>
接触感染予防策	<ul style="list-style-type: none"> <li>MRSA、腸管出血性大腸菌、A型肝炎やロタウイルス、疥癬虫などの微生物を含む患者の痰、便、感染性皮膚などと直接または間接的接触により伝播される感染様式</li> <li>検査は可能な限り隔離された病室で行う</li> <li>検査前から手袋を着用し、検査終了後は手洗いや擦式消毒をする</li> </ul>

(二宮 清:検体採取時の感染の危険性と防御法. ベッドサイドで役立つ微生物検査ガイド 河野 茂, 平潟洋一編. 文光堂, 東京, 186-191, 2006より改変)

文献

- 1) 特発性間質性肺炎－診断と治療の手引き－, 南江堂, 2011.
- 2) BJORAKER JA, et al: Prognostic significance of histopathologic subsets in idiopathic pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 199-203, 1998.
- 3) 千田金吾 ほか: 本邦における特発性間質性肺炎の実態. 平成13年度特定疾患びまん性肺疾患調査研究班報告書, 106-108, 2002.
- 4) FLAHERTY KR, TRAVIS WD, COLBY TV, et al: Histopathologic variability in usual and nonspecific interstitial pneumonias. *Am J Respir Crit Care Med* 164: 1722-1727, 2001.
- 5) NAGAI S, HANDA T, ITO Y, TAKEUCHI M, IZUMI T: Bronchoalveolar lavage in idiopathic interstitial lung diseases. *Semin Respir Crit Care Med* 28: 496-503, 2007.
- 6) HARP SE, ROBINSON A, SAUBOLLE M, et al. (松本哲哉, 満田年宏, 柳原克紀訳): 検体処理法と輸送法. CUMITECH 7B 下気道感染症検査ガイドライン. 医歯薬出版株式会社. 東京, 9-20, 2007.
- 7) 井上義一, 平潟洋一ら: BAL法の手技. 気管支肺胞洗浄(BAL)法の手引き. 日本呼吸器学会びまん性肺疾患学術部会, 厚生労働省難治性疾患克服研究事業びまん性肺疾患調査研究班 編. 克誠堂出版. 東京, 8-29, 2008.
- 8) SASABAYASHI M, YAMAZAKI Y, TSUSHIMA K, et al.: Usefulness of bronchoscopic microsampling to detect the pathogenic bacteria of respiratory infection. *Chest* 131 (2): 474-479, 2007.
- 9) 小栗豊子: 微生物検査材料の採取と保存. 臨床微生物検査ハンドブック 第2版. 小栗豊子編. 三輪書店. 東京, 19-24, 2000.
- 10) MURRAY PR, WITEBSKY FG: The clinician and the microbiology laboratory. Principles and practice of infectious diseases. 7th ed. Mandell. GL, Bennett. JE, Dolin R. ed. Elsevier. Philadelphia, 233-265, 2009.
- 11) 二宮 清: 検体採取時の感染の危険性と防御法. ベッドサイドで役立つ微生物検査ガイド 河野 茂, 平潟洋一編. 文光堂 東京, 186-191, 2006.

# Enhancer of Zeste Homolog 2 Is a Novel Prognostic Biomarker in Nonsmall Cell Lung Cancer

Huqun, MD, PhD<sup>1,2</sup>; Rinako Ishikawa, MD<sup>1</sup>; Jialing Zhang, PhD<sup>1,3</sup>; Hitoshi Miyazawa, PhD<sup>4</sup>; Yoshiya Goto, PhD<sup>5</sup>; Yoshihiko Shimizu, MD, PhD<sup>6</sup>; Koichi Hagiwara, MD, PhD<sup>4</sup>; and Nobuyuki Koyama, MD, PhD<sup>1</sup>

**BACKGROUND:** Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) epigenetically silences many genes through the trimethylation of histone H3 lysine 27 and is implicated in tumor growth, invasion, and metastasis. However, its role in lung cancer has not been well characterized. The objective of the current study was to elucidate the role of EZH2 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) by investigating both clinical samples and cell lines. **METHODS:** An immunohistochemical analysis of EZH2 expression was performed in samples from patients with stage I NSCLC to investigate the association of EZH2 expression levels with clinicopathologic variables. An in vitro cell growth assay and a Matrigel invasion assay also were conducted in the *EZH2*-expressing NSCLC cell lines A549 and H1299 after knocking down *EZH2* expression by using an *EZH2*-specific short-hairpin RNA. **RESULTS:** The immunohistochemical analysis classified stage I NSCLC samples (n = 106) into a negative EZH2 expression group (n = 40; 37.7%) and a positive EZH2 expression group (n = 66; 62.3%). Positive EZH2 expression was associated significantly with larger tumor size (P = .014). Kaplan-Meier survival analyses and log-rank tests demonstrated that patients whose samples were classified into the positive EZH2 expression group had a significantly shorter overall survival (P = .015). Experiments in the NSCLC cell lines revealed that the knockdown of EZH2 expression reduced the tumor growth rate and invasive activity. **CONCLUSIONS:** The current results indicated that EZH2 promotes progression and invasion of NSCLC, and its expression is a novel prognostic biomarker in NSCLC. *Cancer* 2011;000:000-000. © 2011 American Cancer Society.

**KEYWORDS:** EZH2, nonsmall cell lung cancer, prognostic biomarker, tumor size, tumor progression, tumor invasion.

## INTRODUCTION

Lung cancer is a leading cause of cancer death worldwide. Two-thirds of patients with lung cancer are diagnosed with the disease after it has advanced to a stage at which curative resection is not possible. Even early stage disease exhibits a high mortality rate that reflects the frequent emergence of metastatic lesions and local recurrence after resection. Information on the mechanism of cancer progression and metastasis in early stage lung cancers is vital for establishing an efficient treatment strategy that can improve patient outcomes.

Epigenetic silencing of tumor suppressor genes (TSGs), including retinoblastoma (*RB*), *ras*-association domain family 1 isoform A (*RASSF1A*), and semaphorin 3B (*SEMA3B*), is an important mechanism in lung tumorigenesis.<sup>1-3</sup> In addition to promoter hypermethylation,<sup>4-6</sup> modification of the histone structure is another main mechanism of epigenetic silencing of TSGs: Histone deacetylase deacetylates lysine in core histones (H2A, H2B, H3, and H4), strengthens histone-DNA binding, and, thus, silences TSGs.<sup>7</sup>

Polycomb group proteins are transcriptional repressors that form 2 protein complexes: polycomb repressor complex 1 (PRC1) and PRC2.<sup>8-10</sup> PRC2 has 3 core components: suppressor of zeste 12, embryonic ectoderm development, and

**Corresponding author:** Nobuyuki Koyama, MD, PhD, Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University International Medical Center, 1397-1 Yamane Hidaka-shi Saitama, 350-1298, Japan; Fax: (011) 81-42-984-4790; nkoyama@saitama-med.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University International Medical Center, Saitama, Japan; <sup>2</sup>Department of Medical Oncology, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot, China; <sup>3</sup>Clinical Research Center, The Affiliated Hospital of Inner Mongolia Medical College, Hohhot, China; <sup>4</sup>Department of Respiratory Medicine, Saitama Medical University, Saitama, Japan; <sup>5</sup>Department of Pathology, Saitama Medical University International Medical Center, Saitama, Japan; <sup>6</sup>Department of Pathology, Saitama Prefectural Cardiopulmonary Center, Saitama, Japan

The first 2 authors contributed equally to this article.

We thank Drs. Kunihiko Kobayashi (Saitama Medical University International Medical Center) and Minoru Kanazawa (Saitama Medical University) for discussions.

**DOI:** 10.1002/ncr.26441, **Received:** December 20, 2010; **Revised:** June 12, 2011; **Accepted:** June 17, 2011, **Published online** in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com)

enhancer of zeste homolog 2 (EZH2). EZH2 trimethylates histone H3 lysine 27 and, thus, epigenetically silences the genes involved in development, differentiation, and growth, as well as TSGs.<sup>11-14</sup> Moreover, EZH2 recruits DNA methyltransferases to their target promoters. Therefore, EZH2 is involved in both DNA methylation and histone methylation, and it also is involved in the suppression of TSGs through multiple mechanisms.<sup>15</sup> Indeed, it has been demonstrated that *EZH2* expression induces the development of aggressive and metastatic phenotypes in early stage cancers.<sup>16-19</sup> However, a seemingly conflicting phenomenon has been observed in malignant lymphoma and myelodysplastic syndrome, in which inactivation of the *EZH2* gene by chromosomal deletion or somatic mutation promotes tumorigenesis.<sup>20,21</sup> EZH2 may silence different sets of genes in different cell types, and the role of EZH2 needs to be studied in each type of cancer. Currently, information on the role of EZH2 in nonsmall cell lung cancer (NSCLC) is scarce. The objective of the current study was to elucidate the association between EZH2 expression and NSCLC.

In the current study, we analyzed the association of EZH2 expression in stage I NSCLC samples with clinicopathologic variables. We observed that positive and stronger EZH2 expression is associated with larger tumor size and shorter overall survival (OS). This finding suggests that EZH2 is involved in progression of NSCLC. In vitro experiments produced consistent results: Knocking down *EZH2* expression in A549 and H1299 NSCLC cells inhibited cell growth and invasion. Our observations demonstrated that EZH2 drives malignant behavior of NSCLC, and its expression is a novel prognostic biomarker in early stage NSCLC.

## MATERIALS AND METHODS

### Cell Cultures

Lung cancer cell lines were obtained from the following sources: NCI-H1299 cells (large cell neuroendocrine carcinoma) were purchased from the American Type Culture Collection (Rockville, Md); PC-7 and PC-9 cells (adenocarcinomas) were purchased from IBL (Takasaki, Japan); RERF-LCA2, RERF-LC-MS, and PC-3 cells (adenocarcinomas) along with RERF-LC Sq-1 cells (squamous cell carcinomas) were purchased from the Japanese Collection of Research Bioresources (Tokyo, Japan); RERF-LC-KJ, LC2/ad, and PC-14 cells (adenocarcinomas) were purchased from the Riken Bioresource Center (Tsukuba, Japan); and A549 cells (adenocarcinoma) along with

LK79, LK2, and Sq-1 cells (squamous cell carcinomas) were obtained from the Cell Resource Center for Biomedical Research (Tohoku University, Sendai, Japan). Cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma, St Louis, MO) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS) (CELLect GOLD; MP Biomedicals, Eschwege, Germany) in a humidified chamber with air containing 5% CO<sub>2</sub>.

### Patients

Patients who were included in this study underwent surgical resection for NSCLC at Saitama Medical University Hospital from 2000 to 2006 and were diagnosed with pathologic stage I NSCLC. We retrospectively analyzed clinicopathologic characteristics in a total of 106 patients. OS was calculated from the date of surgery to the date of death or the end of observation period in censored patients, regardless of treatment for recurrent disease.

### Immunohistochemical Analysis

Thin sections of 10% formalin-fixed, paraffin-embedded tissue specimens were stained using mouse antihuman EZH2 monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA). The percentage of positively stained cancer cells was determined by investigating more than 4 visual fields at  $\times 400$  magnification. Samples were investigated independently by 2 pathologists and classified into 2 groups: negative EZH2 staining (no cells were intensely stained), and positive EZH2 staining (at least some cells were intensely stained). The positive staining group was divided further into 2 groups according to the intensity of staining: high EZH2 staining (>50% of cells were intensely stained) and low EZH2 staining (<50% of cells were intensely stained).

### Semiquantitative Real-Time Polymerase Chain Reaction Analysis

Total RNA from each cell line or from normal human lung tissue (Clontech, Mountain View, CA) was reverse transcribed, mixed with SYBR Premix Ex Taq (Takara Inc., Shiga, Japan), and amplified by polymerase chain reaction (1 cycle at 95°C for 120 seconds, 45 cycles at 95°C for 5 seconds and 56°C for 20 seconds) using the Smart Cycler (Cepheid Innovation, Sunnyvale, CA). The following primers were used: for *EZH2*, 5'-AGAAT AAT-CATGGGCCAGACTG-3' (forward) and 5'-GTA GCAGATGTCAAGGGATTTC-3' (reverse); for glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*), 5'-CC TCAACGACCACCTTTGTCA-3' (forward) and 5'-TTA CTCCTTGGAGGCCATGT-3' (reverse). The amount

of *EZH2* messenger RNA (mRNA) was normalized by the amount of *GAPDH* mRNA.

#### Short-Hairpin RNA

Short-hairpin RNAs (shRNAs) against *EZH2* 5'-AAGACTCTGAATGCAGTTGCT-3' and its scrambled control (SCR) 5'-TCTTAATCGCGTATAAGGC-3' were integrated into a pSINsi-hU6 vector (Takara Bio Inc., Shiga, Japan). Recombinant retrovirus particles for each shRNA were produced using the Retrovirus Packaging Kit Amphi (Takara Bio Inc.) according to the manufacturer's protocol. A549 and H1299 cells were exposed to each retrovirus for 2 hours and then cultured in Dulbecco Minimal Essential Medium containing neomycin (4 mg/mL) for 1 week; stable transfectants of each shRNA, which we called shEZH and shSCR, were established. Mock-transfected A549 and H1299 cells were used as controls (Cont).

#### Immunoblot Analysis

The shEZH, shSCR, and control cells were plated into 100-mm dishes and incubated in 10 mL RPMI-1640 medium for 24 hours. Cell lysates were prepared using CelLytic M Cell Lysis Reagent (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) and subjected to Western blot analysis. In brief, cell lysates were dissolved in CelLytic M Cell Lysis Reagent, heated at 95°C for 5 minutes, electrophoresed in 5% to 10% Ready Gels J (Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA), and transferred onto polyvinylidene fluoride membranes (Millipore, Billerica, MA) with iBlot (Invitrogen, Carlsbad, CA). The membranes were immersed in Tris-buffered saline (TBS), pH 7.6, containing 5% skim milk and 0.1% Tween-20 to block nonspecific binding. The membranes were incubated with mouse antihuman *EZH2* monoclonal antibody (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) diluted with Immuno-Enhancer Reagent A (Wako, Osaka, Japan) for 1 hour at 25°C, and then with antimouse immunoglobulin G conjugate (Promega, Madison, WI) diluted with Immuno-Enhancer Reagent B (Wako) for 1 hour at 25°C. The membranes were washed with TBS-Tween, then with TBS, and the specific signals were observed with Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase (Promega).

#### In Vitro Cell Growth Assay

The shEZH, shSCR, and control cells were seeded into 96-well dishes (2500 cells per well) containing 100 mL of RPMI-1640 with 2% FBS (day 0). Cell Counting Kit-8 reagent (10 µL; DOJINDO, Kumamoto, Japan) was

added to each well for 3 hours, and absorbance at 450/620 nm was measured at 32 hours and at 68 hours. Experiments were done in triplicate for each cell line.

#### Matrigel Invasion Assay

BD BioCoat Matrigel Invasion Chambers (Bio-Rad Laboratories, Inc.) were used in the Matrigel invasion assay according to the manufacturer's protocol. The chambers were immersed in RPMI-1640 medium at 37°C for 2 hours. After removal of the medium, shEZH, shSCR, or control cells ( $5 \times 10^4$  cells per well) were seeded, and medium with or without 10% FBS was added as an inducer. The chambers were incubated at 37°C for 22 hours. After the removal of noninvading cells, the remaining cells were stained with hematoxylin and eosin, and cell numbers were counted. The invasion rate was calculated as ratio of the number of invaded cells observed in the chamber with 10% FBS to the number of invaded cells observed with 0% FBS. Experiments were done in triplicate for each cell line.

#### Statistical Analysis

Correlations between *EZH2* expression and each clinicopathologic characteristic were analyzed by *t* tests or chi-square tests. Correlations between OS and *EZH2* expression were investigated using Kaplan-Meier analysis and log-rank tests. Factors that contributed to OS were assessed with a multivariate Cox proportional hazards model. Differences in the measurements of shRNA-mediated knockdown of *EZH2* expression (ie, the in vitro cell growth assay and the Matrigel invasion assay) were assessed with a median test. *P* values < .05 were considered significant.

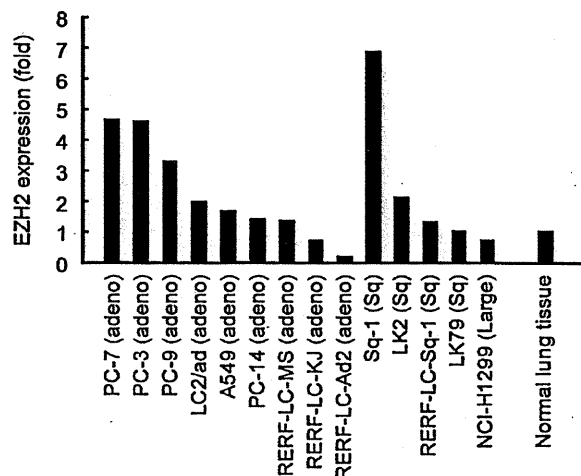
#### Ethical Considerations

The current study was approved by the ethical committee of Saitama Medical University. Immunohistochemical analyses were performed after patients provided informed consent.

## RESULTS

### *EZH2* Messenger RNA Expression in Lung Cancer Cell Lines

First, we examined the expression of *EZH2* mRNA in NSCLC cell lines. *EZH2* mRNA was increased in 11 of 14 cell lines and was decreased in 3 cell lines compared with normal human lung tissue (Fig. 1). No significant differences in *EZH2* expression were observed between histologic types. The increased expression in many of the cell lines indicated that *EZH2* may significantly contribute toward determining the molecular characteristics of



**Figure 1.** Enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) messenger RNA expression is illustrated in lung cancer cell lines. Expression levels were measured by real-time polymerase chain reaction and were normalized to the levels in normal lung tissue. Adeno indicates adenocarcinoma; Sq, squamous cell carcinoma; Large, large cell neuroendocrine carcinoma.

NSCLC; thus, we decided to further investigate EZH2 using resected cancer specimens from patients.

**Immunohistochemical Analysis of EZH2 Expression in Stage I Non-small Cell Lung Cancer**

There have been several reports that EZH2 is involved in early stage cancers; thus, we focused on stage I NSCLC. First, we investigated whether EZH2 expression was associated with any clinicopathologic variables in 106 specimens of stage I NSCLC to evaluate the role of EZH2 (Table 1). The samples were classified into 2 groups based on EZH2 staining level: a negative EZH2 expression group (n = 40; 37.7%) and a positive EZH2 expression group (n = 66; 62.3%) (Fig. 2A). Then, the association of each clinicopathologic variable with EZH2 expression was studied. The results revealed that tumor size was the only variable with a significant association (P = .014) (Table 1). EZH2 expression was more frequent in larger tumors (Fig. 2B). These results suggested that EZH2 may play a role in cancer cell growth.

Progression of NSCLC is determined not only by its speed of cell growth but also by the ability of cancer cells to metastasize. Metastasis status is especially important for surgically resected stage I disease, because, at this stage, it is believed that all visible local lesions are removed successfully. In addition, the rate of metastasis directly influences OS. To further evaluate the role of EZH2 in cancer progression, we investigated the relation between EZH2

**Table 1. Patient Characteristics**

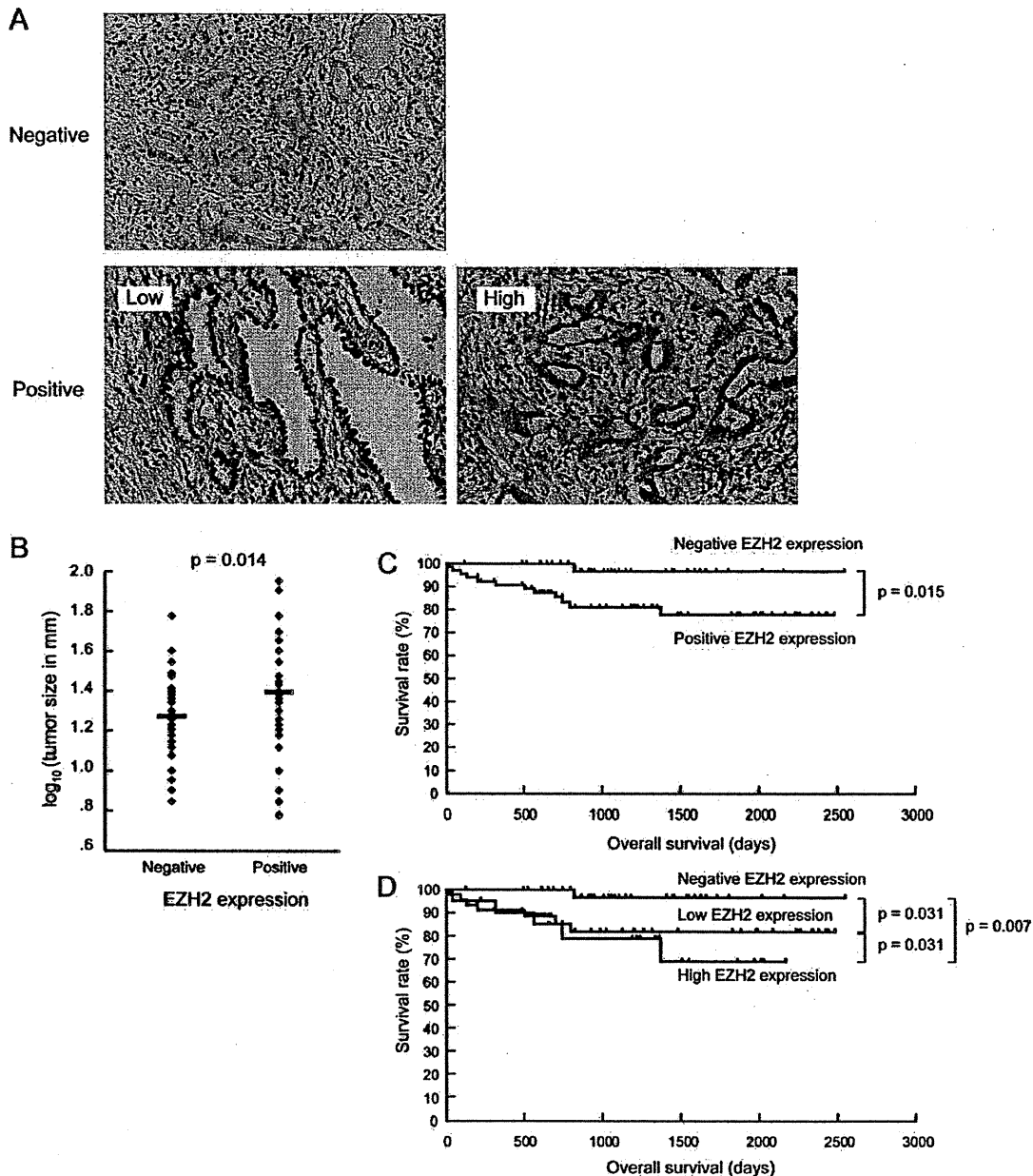
Characteristic	EZH2 Expression			P
	All (n = 106)	Negative (n = 40)	Positive (n = 62)	
<b>Sex</b>				<b>.167</b>
Men	62	20	42	
Women	44	20	24	
Average age, y	64.1	65.1	63.5	<b>.463</b>
<b>Histologic type</b>				<b>.235</b>
Adenocarcinoma	75	31	44	
Squamous cell carcinoma	31	9	22	
<b>Differentiation</b>				<b>.688</b>
Well differentiated	67	27	40	
Moderately differentiated	28	10	18	
Poorly differentiated	11	3	8	
<b>Stage</b>				<b>.157</b>
IA	78	33	45	
IB	28	7	21	
Average greatest tumor dimension, mm	25.8	21.3	28.5	<b>.014*</b>
<b>p factor</b>				<b>.103</b>
0	80	34	46	
1	21	6	15	
2	5	0	5	
<b>ly factor</b>				<b>.389</b>
0	96	35	61	
1	9	5	4	
2	1	0	1	
<b>v factor</b>				<b>.987</b>
0	95	36	59	
1	8	3	5	
2	3	1	2	

Abbreviations: EZH2, enhancer of zeste homolog 2; p factor, the grade of tumor invasion into visceral pleura; ly factor, the grade of tumor invasion into lymphatic vessels; v factor, the grade of tumor invasion into veins.  
\* Significant P value.

expression and OS using Kaplan-Meier analysis and log-rank tests. The positive EZH2 expression group had a significantly shorter OS (P = .015) (Fig. 2C). Moreover, when the positive EZH2 expression group was divided further into a high EZH2 expression group and a low EZH2 expression group (Fig. 2A), the length of OS was in the order of negative EZH expression group > low EZH expression group > high EZH2 expression group (Fig. 2D). This dose-dependent relation between EZH expression level and OS suggests that EZH2 has a role in tumor progression by influencing both the growth and metastasis of cancer cells.

Next, we evaluated the factors that contribute to OS using a multivariate Cox proportional hazards model. The analysis revealed that EZH2 expression and tumor





**Figure 2.** An immunohistologic analysis of enhancer of zeste homolog 2 (EZH2) expression is illustrated. (A) These are representative images of EZH2 expression. (B) This scatter plot demonstrates a significant correlation between EZH2 expression level and tumor size. (C) Kaplan-Meier analysis is shown for 2 EZH2 expression groups. (D) Kaplan-Meier analysis is shown for 3 EZH2 expression groups.

size were correlated independently with OS (EZH2 expression: hazard ratio [HR], 8.30; 95% confidence interval [95% CI], 1.078-63.881;  $P = .04$ ; tumor size: HR, 115.729; 95% CI, 8.955-1495.680;  $P = .0027$ ) (Table 2). These results suggest that EZH2 has a role in cancer progression by enhancing cell growth and promoting metastasis.

#### Effects of EZH2 on Lung Cancer Growth and Invasion

We also performed in vitro experiments to investigate the effect of shRNA-mediated knockdown of *EZH2* mRNA using the *EZH2*-expressing NSCLC cell lines A549 and H1299 (Fig. 1). Each cell line in which *EZH2* shRNA had been introduced (shEZH cells) had reduced levels of

**Table 2.** Lifetime Analysis Using a Cox Proportional Hazards Model

Variable	HR	95% CI	P
EZH2 expression	2.80	1.19-6.59	.018 <sup>a</sup>
Age	1.05	0.98-1.13	.150
Sex	0.72	0.17-2.99	.649
Histology	0.94	0.28-3.25	.927
Disease stage	0.91	0.13-6.20	.920
Tumor size	125.8	1.01-14399	.046 <sup>a</sup>

Abbreviations: CI, confidence interval; EZH2, enhancer of zeste homolog 2; HR, hazard ratio.

<sup>a</sup> Significant P values.

*EZH2* mRNA measured by real-time polymerase chain reaction analysis (Fig. 3A) and protein measured by Western blot analysis (Fig. 3B), whereas cell lines in which scrambled shRNA (shSCR cells) had been introduced had expression levels similar to those in mock-transfected cells (control cells). The in vitro cell growth assay using both A549 cells and H1299 cells demonstrated that the growth rate of shEZH cells was reduced significantly compared with the growth rate of shSCR cells and control cells ( $P < .01$ ), indicating that EZH2 has growth-promoting activity in NSCLC cells (Fig. 3C). The Matrigel invasion assay revealed that shEZH significantly attenuated the invasive activity of A549 and H1299 cells ( $P < .05$ ), suggesting that EZH2 may enhance metastasis of NSCLC cells (Fig. 3D). These results support the observations obtained from clinical samples that EZH2 may enhance cancer progression by enhancing cell growth and promoting metastasis.

## DISCUSSION

EZH2 is frequently overexpressed in a variety of human cancers and has been associated with aggressiveness, metastasis, and poor outcome of several cancer types. EZH2 mediates histone methylation and recruits DNA methyltransferase in the silencing of a variety of genes. These previous reports prompted us to investigate the role of EZH2 in NSCLC. EZH2 was associated positively with tumor size and was associated negatively with OS in patients with stage I NSCLC. The repression of EZH2 expression in A549 and H1299 NSCLC cells inhibited cancer cell growth and decreased invasive activity. All of these results indicate that EZH2 is involved in cancer progression and is a novel predictive biomarker of poor outcome.

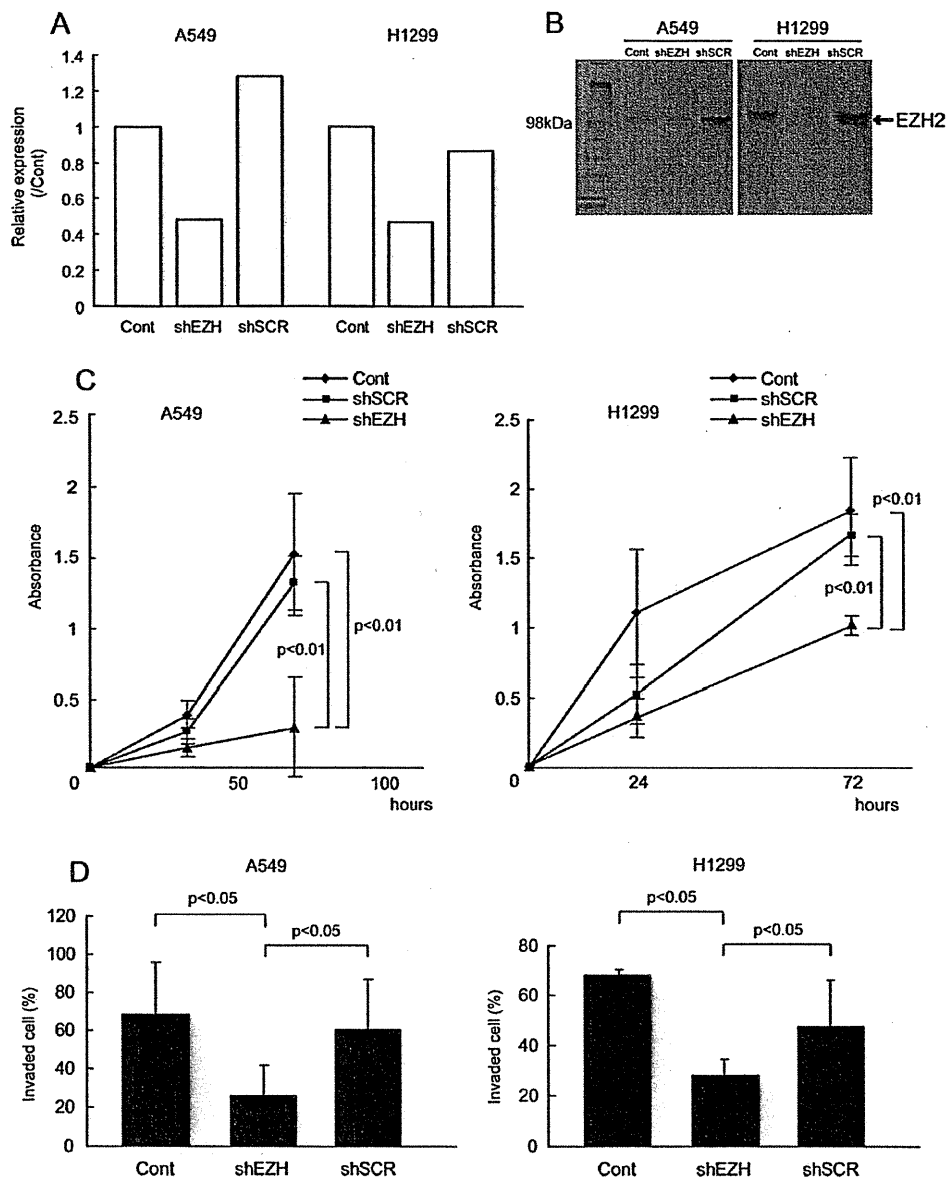
From the data on 6644 resected NSCLC specimens, the greatest difference in the 5-year survival rate between cancer stages was observed between stage IA (pathologic stage; 79.5%) and stage IB (60.1%).<sup>22</sup> This indicates that lung cancers frequently develop subclinical tumor pro-

gression or metastasis during stage I of the disease and that molecular changes that occur during stage I disease are important determinants of outcome. The gene that is involved in these changes will be a good marker for prognosis and should be targeted therapeutically to improve outcomes. *EZH2* is one such gene; It is associated with changes in tumor size that occur during stage I disease and is involved in cell growth and invasion. Bachmann et al reported that EZH2 expression was positively correlated with tumor growth or prognosis in several cancers, including melanoma and endometrial, prostate, and breast cancers,<sup>23</sup> and studies of the value of EZH2 both as a molecular marker and as a therapeutic target are warranted.

Prognostic markers may be different in different stages of cancers. Examples are epidermal growth factor receptor (*EGFR*) and *K-Ras* gene mutations, which have been associated with survival in locally advanced or metastatic NSCLCs,<sup>24,25</sup> whereas the association has not been well established in early stage NSCLCs. Whether *EZH2* is a prognostic marker in later stages of NSCLCs, and whether *EZH2* is associated with *EGFR* or *K-Ras* mutation in such stages will be important issues for the elucidation of the role of EZH in the progression of NSCLCs.

EZH2 may change the expression of genes that are related to responsiveness to currently available therapeutic modalities through its ability to silence other genes. Thus, EZH2 may indirectly change the responsiveness of cancer cells to therapies. Recent reports have demonstrated that EZH2 expression is able to predict therapeutic response to chemoradiation in patients with esophageal squamous cell carcinoma, and decreased EZH2 expression is associated with the expression of estrogen receptor and improves responsiveness to tamoxifen therapy in patients with advanced breast cancer.<sup>26,27</sup> Molecular-targeted therapies that use the gene silencing ability of EZH2 will be an interesting approach to cancer therapy. This warrants a clinical trial investigating the efficacy of post-operative chemotherapy for patients with EZH2-positive, stage IA NSCLC.

There have been several reports that EZH2 targets several genes, including p15 (*INK4b*), p16 (*INK4a*), cyclin A, cyclin D1, cyclin-dependent kinase 1C (*CDKN1C*; *p57*), and E-cadherin (*CDH1*).<sup>28-31</sup> These genes, in turn, regulate other genes in a manner specific to each cancer cell type.<sup>32,33</sup> A comprehensive analysis of gene expression changes may be required to clarify the whole picture on the roles of EZH2 in NSCLC, which will be attained only by summarizing studies from many laboratories.



**Figure 3.** In vitro experiments are illustrated. (A) This chart illustrates the measurement of enhancer of zeste homolog 2 (*EZH2*) messenger RNA (mRNA) by real-time polymerase chain reaction (PCR) after short-hairpin RNA (shRNA)-mediated knockdown of *EZH2* mRNA in (Left) A549 cells and (Right) and H1299 cells. Cont indicates control; shEZH, short-hairpin enhancer of zeste homolog; shSCR, scrambled control shRNA. (B) Immunoblot analysis reveals *EZH2* expression in the A549 and H1299 cell lines. (C) In vitro cell growth assays are illustrated in A549 and H1299 cells. The growth of shEZH was significantly slower than the growth of shSCR and controls. (D) Matrigel invasion assays are illustrated in A549 and H1299 cells. The invasive activity of shEZH was significantly weaker than the invasive activity of shSCR and controls. Error bars indicate standard deviations.

In conclusion, EZH2 acts as a positive regulator of NSCLC growth and invasion, and its expression may be useful as a novel prognostic biomarker in early stage NSCLC. Studies on EZH2 should provide a novel perspective on personalized cancer therapies.

#### FUNDING SOURCES

This study was supported in part by Grants-in-Aid for Scientific Research (grant 21591001) from the Japan Society for the Promotion of Science, Grants-in-Aid for Encouragement for Medical Research from Takeda Science Foundation, an investigative research grant from Daiwa Securities Health Foundation,

Saitama Medical University Internal Grant 20-2-2-04, and an Ishitsu Shun Memorial Scholarship.

## CONFLICT OF INTEREST DISCLOSURES

The authors made no disclosures.

## REFERENCES

- Sakai T, Toguchida J, Ohtani N, Yandell DW, Rapaport JM, Dryja TP. Allele-specific hypermethylation of the retinoblastoma tumor-suppressor gene. *Am J Hum Genet.* 1991; 48:880-888.
- Dammann R, Li C, Yoon JH, Chin PL, Bates S, Pfeifer GP. Epigenetic inactivation of a RAS association domain family protein from the lung tumour suppressor locus 3p21.3. *Nat Genet.* 2000;25:315-319.
- Kuroki T, Trapasso F, Yendamuri S, et al. Allelic loss on chromosome 3p21.3 and promoter hypermethylation of semaphorin 3B in non-small cell lung cancer. *Cancer Res.* 2003;63:3352-3355.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med.* 2003; 349:2042-2054.
- Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004;429:457-463.
- Vogelstein B, Kinzler KW. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med.* 2004;10:789-799.
- Santos-Rosa H, Caldas C. Chromatin modifier enzymes, the histone code and cancer. *Eur J Cancer.* 2005;41:2381-2402.
- Erhardt S, Su IH, Schneider R, et al. Consequences of the depletion of zygotic and embryonic enhancer of zeste 2 during preimplantation mouse development. *Development.* 2003;130:4235-4248.
- Boyer LA, Plath K, Zeitlinger J, et al. Polycomb complexes repress developmental regulators in murine embryonic stem cells. *Nature.* 2006;441:349-353.
- Lee TI, Jenner RG, Boyer LA, et al. Control of developmental regulators by polycomb in human embryonic stem cells. *Cell.* 2006;125:301-313.
- Kuzmichev A, Nishioka K, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Reinberg D. Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of zeste protein. *Genes Dev.* 2002;16:2893-2905.
- Cao R, Wang L, Wang H, et al. Role of histone H3 lysine 27 methylation in polycomb-group silencing. *Science.* 2002; 298:1039-1043.
- Muller J, Hart CM, Francis NJ, et al. Histone methyltransferase activity of a Drosophila polycomb group repressor complex. *Cell.* 2002;111:197-208.
- Kondo Y, Shen L, Cheng AS, et al. Gene silencing in cancer by histone H3 lysine 27 trimethylation independent of promoter DNA methylation. *Nat Genet.* 2008;40:741-750.
- Vire E, Brenner C, Deplus R, et al. The polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature.* 2006;439:871-874.
- Varambally S, Dhanasekaran SM, Zhou M, et al. The polycomb group protein EZH2 is involved in progression of prostate cancer. *Nature.* 2002;419:624-629.
- Merola E, Mattioli E, Minimo C, et al. Immunohistochemical evaluation of pRb2/p130, VEGF, EZH2, p53, p16, p21waf-1, p27, and PCNA in Barrett's esophagus. *J Cell Physiol.* 2006;207:512-519.
- Samaratunga H, Epstein JI. What is the molecular pathology of low-risk prostate cancer? *World J Urol.* 2008;26: 431-436.
- Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, et al. Distinctive expression of the polycomb group proteins Bmi1 polycomb ring finger oncogene and enhancer of zeste homolog 2 in non-small cell lung cancers and their clinical and clinicopathologic significance. *Cancer.* 2010;116:3015-3024.
- Morin RD, Johnson NA, Severson TM, et al. Somatic mutations altering EZH2 (Tyr641) in follicular and diffuse large B-cell lymphomas of germinal-center origin. *Nat Genet.* 2010;42:181-185.
- Nikoloski G, Langemeijer SM, Kuiper RP, et al. Somatic mutations of the histone methyltransferase gene EZH2 in myelodysplastic syndromes. *Nat Genet.* 2010;42:665-667.
- Goya T, Asamura H, Yoshimura H, et al. Prognosis of 6644 resected non-small cell lung cancers in Japan: a Japanese Lung Cancer Registry study. *Lung Cancer.* 2005;50:227-234.
- Bachmann IM, Halvorsen OJ, Collett K, et al. EZH2 expression is associated with high proliferation rate and aggressive tumor subgroups in cutaneous melanoma and cancers of the endometrium, prostate, and breast. *J Clin Oncol.* 2006;24:268-273.
- Keedy VL, Temin S, Somersfield MR, et al. American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion: epidermal growth factor receptor (EGFR) mutation testing for patients with advanced non-small-cell lung cancer considering first-line EGFR tyrosine kinase inhibitor therapy. *J Clin Oncol.* 2011;29:2121-2127.
- Rodenhuis S, Boerrigter L, Top B, et al. Mutational activation of the K-ras oncogene and the effect of chemotherapy in advanced adenocarcinoma of the lung: a prospective study. *J Clin Oncol.* 1997;15:285-291.
- He LR, Liu MZ, Li BK, et al. Prognostic impact of H3K27me3 expression on locoregional progression after chemoradiotherapy in esophageal squamous cell carcinoma [serial online]. *BMC Cancer.* 2009;9:461.
- Reijm EA, Jansen MP, Ruijgrok-Ritstier K, et al. Decreased expression of EZH2 is associated with upregulation of ER and favorable outcome to tamoxifen in advanced breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;125:387-394.
- Ezhkova E, Pasolli HA, Parker JS, et al. Ezh2 orchestrates gene expression for the stepwise differentiation of tissue-specific stem cells. *Cell.* 2009;136:1122-1135.
- Tonini T, Bagella L, D'Andrilli G, Claudio PP, Giordano A. Ezh2 reduces the ability of HDAC1-dependent pRb2/p130 transcriptional repression of cyclin A. *Oncogene.* 2004; 23:4930-4937.
- Shi B, Liang J, Yang X, et al. Integration of estrogen and Wnt signaling circuits by the polycomb group protein EZH2 in breast cancer cells. *Mol Cell Biol.* 2007;27:5105-5119.
- Yang X, Karuturi RK, Sun F, et al. CDKN1C (p57) is a direct target of EZH2 and suppressed by multiple epigenetic mechanisms in breast cancer cells [serial online]. *PLoS One.* 2009;4:e5011.
- Cao Q, Yu J, Dhanasekaran SM, et al. Repression of E-cadherin by the polycomb group protein EZH2 in cancer. *Oncogene.* 2008;27:7274-7284.
- Fujii S, Ochiai A. Enhancer of zeste homolog 2 downregulates E-cadherin by mediating histone H3 methylation in gastric cancer cells. *Cancer Sci.* 2008;99:738-746.