様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ２６ 年　 ６ 月 １２ 日現在

機関番号：１３５０１
研究種目：基盤研究(C)
研究期間：2011～2013
課題番号：２３５９２４４０

研究課題名（和文）子宮頸部胃型腺系病変の生物学的解析

研究課題名（英文）Analysis of the gastric lesion of the uterine cervix

研究代表者
端　晶彦（HASHI, Akihiko）

山梨大学・医学部附属病院・准教授

研究者番号：１０２０８４３１

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　4,000,000円、（間接経費）　　1,200,000円

研究成果の概要（和文）：(研究１）浸潤子宮頸部粘液性腺癌症例の組織より連続切片を作成し免疫組織学的検討およびIn situ hybridization法の検討を行った。子宮頸部胃型粘液陽性とされた粘液性腺癌ではp53の過剰発現が高頻度に見られHPV-DNAの発現は極めて少なく、胃型粘液陰性とされた粘液性腺癌ではp53の過剰発現は低頻度でHPV-DNAの発現が高率であった。子宮頸部胃型粘液陽性腺癌には発癌経路において通常型と考えられる子宮頸部粘液性腺癌とは異なる可能性がある。(研究２）PDX-1の発現、TFF2の発現からLEGHは幽門腺化生病変であることが再認識された。TFF2は LEGHのマーカーとしても有用である。

研究成果の概要（英文）：(Study1)Endocervial-type adenocarcinoma of the uterine cervix were examined.We performed immunohistochemistry and in situ hybridization(ISH) on sections of routinely processed. Immunoexpression of p53, HIK1083 and p16 were investigated manually. ISH was performed using a GenPoint Catalyzed Signal Amplication System(DAKO Japan). The gastric mucin (HIK1083 positive) expression group were more likely to have frequent p53 overexpression and rare HPV signals compared with nongastric mucin expression group. There were a significant difference in each group. There is a probability that the carcinogenesis of the gastric mucin expression group is different from that of nongastric mucin expression group.
(Study2)We have demonstrated gastric pyloric pattern of cell differentiation in LEGH by the expression of PDX-1 and TFF2. TFF2 is useful immunohistochemical markers for LEGH.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・産婦人科学

キーワード：子宮頸部腺がん　子宮頸部胃型形質

１．研究開始当初の背景

癌である子宮頸部悪性腺腫(adenoma malignum)(近年は最小偏倚腺癌 Minimal deviation adenocarcinoma：MDA と記述されることが多いので MDA を使用する)は極めて分化度の高い粘液性腺癌と知られている。この MDA と類似した症状を示すが、良性疾患とされる子宮頸部分葉状頸管腺過形成（Lobular endocervical glandular hyperplasia、以下 LEGH と略す）が新たな概念として注目されている。胃型粘液(幽門腺型粘液：以下は胃型粘液と表現する)の発現が両疾患の共通した点とされてきたが、従来は内頸部型に分類されていた腺癌の一部にも胃型粘液の発現が報告され、子宮頸部腺癌の分類に新たなカテゴリーが生まれる可能性が高くなっている。

２．研究の目的

子宮頸癌のうち、扁平上皮癌においてはその発ガンにヒトパピローマウイルス(Human papillpma virus;以下 HPV)感染の関与が確実視されている。扁平上皮癌の 99%以上に HPV 感染が確認される。頚部腺癌においても約 80%の症例において HPV 感染が報告されているが、若年者に比べて高齢者では HPV 感染が関与しない腺癌が多い可能性が指摘されている。現在 HPV 感染が関与しない頸部腺癌の発ガンについての詳しい検討はほとんどない。我々は世界で初めて LEGH から子宮頸部粘液性腺癌が発生したと考えられる症例を報告してきたがこれらの発癌には HPV 感染が関与しないと報告してきた。HPV 感染が関与しない頸部腺癌の発ガンの新しい経路に胃型形質を示す頸部病変が注目されている。しかしその生物学的特性については不明な点が極めて多い。

我々はすでに LEGH をはじめとする胃型形質を示す頸部病変に関して数多くの論文を発表してきたが、本研究により胃型形質を示す子宮頸部病変のさらなる生物学的特性を解明することを目的とする。

３．研究の方法

県内・外の多数例の MDA と LEGH 症例、頸部腺癌症例を既に集積しており、解析する標本は準備できている（全例インフォームドコンセントを得た上で、研究に供する）。

臨床病理学的背景の検討

検査所見、既往歴、術式、転帰を詳細に再検討することによりその臨床病理学的特徴を明らかにする。検討項目は、主訴、年齢、妊娠分娩歴、ホルモン剤の使用の有無、細胞診所見、画像所見、手術内容、追加治療の有無、転帰、経過観察時間他である。

画像所見の特徴の検討

LEGH、MDA、胃型腺癌を含めた画像所見の特徴を明らかにする。最終病理学検討を詳細に行なった結果に基づき、MRI画像を詳細に検討する。嚢胞の有無、大きさ、数、局在、造影効果、拡散強調像などを詳細に検討する。

免疫組織化学染色の検討

生物学的特性検討目的で、未染標本にて Ki-67、$p16^{INK4a}$, CEA, p53, Apoptosis, HIK1083, HER/neu, MUC1～13、リンパ内皮マーカー D2-40、TFF（Trefoil factor family)2、pancreatic-duodenal homeobox factor-1(以下PDX-1)、Chromograninの免疫組織化学染色を行い、alcian blue / periodic acid-Schiff (AB-PAS)二重染色も行う。

上記免染の目的の一つとして下記を検討する。

胃幽門腺には粘液分泌細胞の他に神経内分泌細胞が見られ、胃幽門腺の粘液産生細胞にはTFF（Trefoil factor family)2の発現が報告されている。さらに転写因子 pancreatic-duodenal homeobox factor-1(以下PDX-1)が胃の幽門前底部から十二指腸近位部での発現が報告されている。LEGHのさらなる生物学的特性を検討することを目的にこれらの新たな因子を含めて検討する。

組織学的局在の検討

LEGH 病変は子宮頸部の比較的高位に位置（内子宮口寄りに主座をおくことが多い）することが多いとされている。子宮頚部割面における肉眼的および病理組織学的腫瘍の局在を確認し、HE 標本により腫瘍の局在を子宮頸部割面上でマッピングする。これまで子宮頸部胃型腺癌の局在の検討はない。マッピングは発生学的検討にも重要である。

子宮頸部胃型粘液発現病変における HPV-DNA 発現の有無

子宮頸部胃型腺癌、通常の頸部腺癌、MDA、LEGH に腺癌合併症例におけるパラフィン包埋組織より切片を作成し、ISH 法により HPV DNA の核内への組み込みの有無、PCR 法により HPV の型を検討する。ISH 法は catalyzed signal amplication sysytem を応用した超高感度 ISH 法(GenPoint System)を用いる。PCR 法は L1C1/L1C2 プライマーを用いて PCR 法を行い、陽性検体を用いてシークエンス解析で

HPV 型判定を行う。

LEGH および類似疾患の診断、治療フローチャートの作成

LEGH はHPV感染が関与しない頸部腺癌の前駆病変の可能性もあり取り扱いは重要となる。上記所見より LEGH および類似疾患の診断、治療フローチャートの作成を検討する。

胃型形質病変における子宮頸部細胞診の LBC 法と直接塗抹法（従来法）と比較

LEGH の症状として水様性帯下は重要であるが自覚症状のない症例も多い。子宮頸部細胞診で通常見られる頸管腺細胞質内のエオジン好性の粘液とは異なる淡黄色調の胃型粘液の所見（いわゆる two color pattern）が LEGH の発見の端緒となることもある。近年液状化検体細胞診(LBC 法）が普及してきたが LBC 法での two color pattern についてまとまった報告はない。直接塗抹法と LBC 法における胃型粘液の検出について検討する。インフォームド・コンセントを得た LEGH 症例で検討する。LEGH 症例および正常症例について従来法と BD Sure Path（LBC 法）により頸管細胞を採取し Papanicolaou 染色にて観察する。細胞診標本における胃型粘液細胞の存在および部位は HIK1083 の免疫染色を行い確認する。

４．研究成果

Lobular encocervical gland hyperplasia (LEGH)の生物学的特性の検討

「方法」当科で手術療法を行った LEGH 14 症例および正常子宮頸管腺５例、tunnel cluster Type B ５例の合計 24 例のパラフン包埋組織より連続切片を作成した。HE 染色、TFF2 抗体、PDX-1 抗体、Chromogranin 抗体、胃幽門腺型ムチン抗体 HIK1083(HIK 染色)のそれぞれの免疫染色を行なった。全例でインフォームド・コンセントを得た。

「成績」TFF2 は LEGH 症例全例（14/14 例)で細胞質に良好に染色された。正常子宮頸管腺、tunnel cluster Type B では全例陰性であった。PDX-1 陽性細胞率はばらつきがあるが LEGH14 例 13 例で陽性細胞を認めた。Chromogranin も陽性細胞率は正常幽門腺同様に高くはないが LEGH 14 例 13 例に陽性細胞を認めた。LEGH 症例では HIK 染色は全例で陽性細胞を認めた。一方正常子宮頸管腺、tunnel cluster Type B では PDX-1 染色、Chromogranin 染色、HIK 染色においては陽性細胞は認めなかった。

「結論」神経内分泌細胞の出現態度および PDX-1 の発現、TFF2 発現から LEGH は幽門腺化生病変であることが再確認された。TFF2 は LEGH での高発現が認められ LEGH のマーカーとしても有用と考えられる。

LEGH および類似疾患の診断、治療フロチャート
（子宮頸部嚢胞性病変への対応を中心に）

水様性帯下や子宮頸部の嚢胞性病変(超音波検査)
↓
細胞診（従来法）での黄色調粘液細胞の検出　or HIK1083 標識ラテックス凝集反応

陰性　　ナボット嚢胞　他

陽性（胃型粘液陽性症例を　細胞像と MRI と所見により下記の４パターンに分類）

①　細胞異型あり　充実性病変あり
②細胞異型あり　コスモスサイン
③　細胞異型なし　コスモスサイン
④細胞異型なし　病変なし

上記の４パターンの所見がそれぞれ下記の診断となる。

① MDA,胃型腺癌　疑い
② LEGH + with atypia or AIS/Ca 疑い
③ LEGH 疑い
④ 小さな胃上皮化生

それぞれの診断によって方針が下記となる。

① Biopsy or Conization 後根治手術　(Radical hyst.)
② Conization(or biopsy) 後根治手術 (Simple hyst. Or　mRH or radical hyst.)
③ Simple hyst.　Or　observation
④ Observation

子宮頸部胃型粘液発現病変における HPV-DNA 組み込みの有無および p53 他の発現の検討

「目的」子宮頸部粘液性腺癌の一部にも胃型粘液が出現することが報告され、さらに胃型粘液陽性が予後不良因子である可能性が報告され注目されている。我々は当科で子宮頸部粘液性腺癌と診断した症例に対して胃型粘液の有無を検討し、その臨床病理学的検討を行った。「成績」当科で手術療法を行った浸潤子宮頸部粘液性腺癌症例 38 症例のパラフィン包埋組織より連続切片を作成し、免疫組織学的検討および In situ hybridization 法の検討を行った。38 例中胃型粘液陽性とされたものは 11 例（28.9%）であった。その 11 例中 p53 過剰発現は 7 例（63.6 %）に認めた。胃型粘液陰性とされた 27 例中 2 例（ 7.4%）で p53 過剰発現を認めた。p53 の過剰発現は胃型粘液陽性腺癌で有意に高率であった（ p < 0.001 ）。　２.HPV の頻度の検討　ISH 法により HPV DNA の核内への組み込みの有無を検討した。ISH 法は catalyzed signal amplication sysytem を応用した超高感度 ISH 法(GenPoint System)を用いた。胃型粘液陽性とされた 11 例中 HPV DNA の核内への組み込みは２例（18.2%）に認め、胃型粘液陰性とされた 27 例中 24 例（ 88.8%）で HPV DNA の核内への組み込みを認めた。「結論」胃型粘液陽性とされた粘液性腺癌では p53 の過剰発現が高頻度に見られ、HPV-DNA の発現は極めて少なく、胃型粘液陰性とされた粘液性腺癌では、p53 の過剰発現は低頻度で、HPV-DNA の発現が高率であった。胃型粘液陽性腺癌には発癌経路において通常型と考えられる粘液性腺癌とは異なる可能性がある。

胃型形質病変における子宮頸部細胞診の LBC 法と直接塗抹法（従来法）と比較

「方法」4 例の LEGH 症例をインフォームド・コンセントを得て検討した。LEGH の診断は子宮全摘術などの病理診断症例が 2 例、MRI 画像で LEGH に特徴的なコスモスサインを認めかつ頸管粘液で HIK1083（関東化学）凝集反応陽性症例 2 例である。従来法と BD Sure Path（LBC 法）により頸管細胞を採取し Papanicolaou 染色(Pap Stain)にて観察した。細胞診標本における胃型粘液細胞の存在および部位は HIK1083 の免疫染色を行い確認した。

「結果」4 例とも従来法において胃型粘液は Pap Stain で黄色調を示し通常頸管腺粘液のピンク調との違いが容易に観察できた（two-color pattern）。LBC 法では免疫染色で HIK1083 陽性細胞は存在するが、Pap Stain では two color pattern がわからず胃型形質病変を推定するのは困難であった。

「結語」従来法とは違い LBC 法(BD Sure Path)による Pap Stain では胃型形質病変を推定することは難しい。

５．主な発表論文等
（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計　3 件）

①
子宮頸部腺系病変の臨床的取り扱いについて
山梨産科婦人科学会雑誌 4(1):2-18, 2013 年
大森　真紀子、端　晶彦、弓持納　勉、中澤久美子、石井喜雄、奈良政敏、近藤哲夫、加藤良平、平田修司　　（査読有）

②
分葉状頸管腺過形成(Lobular encocervical gland hyperplasia ; LEGH)
山梨産科婦人科学会雑誌 2(2):3-13, 2012 年
端　晶彦, 奈良政敏、大森真紀子、平田修司、近藤哲夫、弓持納　勉　　（査読有）

③
Preoperative differential diagnosis of minimal deviation adenocarcinoma and lobular endocervical glandular hyperplasia of the uterine cervix: a multicenter study of clinicopathology and magnetic resonance imaging findings
Akiko Takatsu, Tanri Shiozawa, Tsutomu Miyamoto, Kazuko Kurosawa, Hiroyasu Kashima, Tomoko Yamada, Tsunehisa Kaku, Yoshiki Mikami, Takako Kiyokawa, Hitoshi

Tsuda, Keiko Ishii, Kaori Togashi, Takashi Koyama, Yasunari Fujinaga, Masumi Kadoya, Akihiko HASHI, Nobuyuki Susumu, Ikuo Konishi
Int J Gynecol Cancer 21(7):1287-1296 2011 （査読有）

〔学会発表〕（計 8 件）

①
第６６回日本産科婦人科総会 （東京）
子宮頸部細胞診の LBC 法(BD Sure Path)は直接塗抹法（従来法）と比較して Papanicolaou 染色で胃型形質病変を推定することが難しい 2014 年 4 月 18-20 日 端 晶彦 他

②
第 52 回日本臨床細胞学会秋季大会(大阪)
直接塗抹法(従来法)と LBC 法における胃型粘液の検出についての比較
2013 年 11 月 2-3 日 端 晶彦 他

③
第 65 回日本産科婦人科総会 (札幌)
Lobular encocervical gland hyperplasia (LEGH)の生物学的特性の検討
2013 年 5 月 10-12 日 端 晶彦 他

④
第 64 回日本産科婦人科学会総会 (神戸)
胃型形質を発現する子宮頸部粘液性腺癌の臨床病理学的検討 2012 年 4 月 13-15 日
端 晶彦 他

⑤
第２８回日本臨床細胞学会熊本支部総会
胃型形質を有する子宮頸部腺癌（悪性腺腫を含む）とその類似疾患の臨床と細胞診（熊本）
2012 年 2 月 18-19 日 端 晶彦 他

⑥
第 50 回日本臨床細胞学会秋季大会（東京）
胃型形質を有する子宮頸部腺癌(悪性腺腫含む)とその類似疾患の臨床と細胞診
2011 年 10 月 22-23 日 端 晶彦 他

⑦
第 63 回日本産科婦人科学会総会（大阪）
子宮頸部粘液性腺癌における胃型粘液の発現とその臨床病理学的意義 2011 年 8 月 29-31 日 端 晶彦 他

⑧
第５２回日本臨床細胞学会（福岡）
LEGH をはじめとする胃型形質を有する子宮頸部病変について
2011 年 5 月 20-22 日 端 晶彦 他

６．研究組織
(1)研究代表者
端 晶彦 （ HASHI Akihiko ）
山梨大学 医学部附属病院 准教授

研究者番号：10208431