

令和 2 年 6 月 1 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09010

研究課題名(和文) 子宮頸管分泌液中のTFF検出による子宮頸部腺系病変の早期発見に関する検査法の開発

研究課題名(英文) Trefoil factor family (TFF) proteins in cervical discharge as a screening test of endocervical glandular lesions

研究代表者

太田 浩良(Ota, Hiroyoshi)

信州大学・学術研究院保健学系・教授

研究者番号：50273107

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：子宮頸部腺系病変[分葉状内頸腺過(LEGH)、上皮内癌、浸潤癌]は免疫組織化学的に胃型、腸型、胃腸混合型、ミューラー管型とその他に分類された。LEGHは全例胃型、上皮内癌と浸潤癌における各型の頻度(%)はそれぞれ、5.6/22.7、27.8/13.6、8.3/10.6、50/34.8、8.3/18.2であった。頸管分泌液のTFF ELISAによるLEGH診断の感度特異度はTFF1/TFF3比：93.8%86.2%、TFF2/TFF3比：78.1%78.1%であった。TFF2は胃型に、TFF1は胃型以外にも発現しているため、TFF1/TFF3比は子宮頸部腺系病変全般の診断へ応用が期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

子宮頸部腺系病変[分葉状内頸腺過(LEGH)、上皮内癌(AIS)、浸潤癌(ECA)]は免疫組織化学的解析による構成細胞の細胞系列により胃型、腸型、胃腸混合型、ミューラー管型とその他に分類することができた。今後、子宮頸部腺系病変の診断および腫瘍発機序の研究は細胞系列に基づいた解析が可能と考える。子宮頸部腺系病変においてTFF2は胃型病変に特異的に発現しているのに対してTFF1は胃型以外にも発現がみられるため、頸管分泌物のTFF ELISAによるTFF2/TFF3比は子宮頸部胃型病変の、一方、TFF1/TFF3比は子宮頸部腺系病変全般のスクリーニング検査への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：Endocervical glandular hyperplasia (LEGH), 36 adenocarcinoma in situ (AIS) and 66 invasive endocervical adenocarcinoma (ECA) samples were immunohistochemically analyzed using cell lineage specific markers. All LEGHs were categorized as gastric-type. The AISs and ECAs were classified as gastric (5.6%/22.7%), intestinal (27.8/13.6), gastrointestinal (8.3/10.6), Mullerian-type (50/34.8), and NOS (8.3/18.2). TFF1, TFF2, and TFF3 in cervical discharge were measured by ELISA. Both TFF1/TFF3 and TFF2/TFF3 in LEGH group [(TFF1/TFF3, 3.18% (IQR, 1.87%-6.04%); TFF2/TFF3, 4.95 (1.70-10.37)] were significantly higher than those in non neoplastic group (TFF1/TFF3, 0.10 (0.04-0.30); TFF2/TFF3, 0.57 (0.28-1.33)) According to ROC analysis, the optimal cut-off values of TFF1/TFF3 and TFF2/TFF3 in the discrimination between LEGH patients and non-tumor patients were 0.58% (sensitivity, 93.8%; specificity, 86.2%) and 1.57% (sensitivity, 78.1%; specificity, 78.1%), respectively.

研究分野：診断病理

キーワード：子宮頸部腺癌 トレフォイルファクター 分葉状頸管腺過形成 LEGH TFF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

子宮頸部腺癌は子宮頸癌の20~25%を占め、近年増加傾向にあり、早期発見が難しい。また、子宮頸部腺癌は子宮頸部扁平上皮癌よりも悪性度が高く、なかでも胃粘膜上皮細胞に分化した腺癌(胃型腺癌)は悪性度が高いとされている。このため、子宮頸部腺癌の早期診断法やスクリーニング検査法の開発が待たれている。

我々はヒト胃癌の免疫組織化学による表現型解析¹⁾に始まる、ヒト腺癌に関する一連の表現型解析の研究から、胃型腺癌とその前癌病変が胃以外の臓器にも発生し、臨床病理学的に特徴を示すことを報告してきた(杯細胞型肺胞上皮癌^{2,3)}、子宮頸部悪性腺腫とその前癌病変^{4,5)}、膀胱癌とその前癌病変^{3,6)}、大腸锯齿状病変⁷⁾)。

これらの一連の研究の過程で、我々は北里大学石原らのグループとの共同研究により胃腺粘液細胞ムチンに対する特異的なモノクローナル抗体HIK1083の開発に成功した^{8,9)}。現在、HIK1083抗体は胃腺粘液細胞のマーカーとして病理診断分野^{3,10)}のみならず、子宮頸部胃型腺癌およびその前癌病変の一つされる分葉状頸管腺過形成(LEGH)(以下、両者をまとめて子宮頸部腺系病変と表現する)のラテックス凝集検査キット¹¹⁾利用されている。子宮頸部腺癌におけるHIK1083抗体の特異性に関して、申請者らは腸上皮に分化した腺癌、ミューラー管上皮に分化した腺癌、および特定の細胞への分化を確認できない腺癌(Null型)はHIK1083抗体陰性となることを見出している。この様に、HIK1083抗体を用いた検査では胃型腺癌以外の子宮頸部腺癌は検出できない。また、HIK1083抗体は胃腺窩上皮細胞ムチンには反応しないため、子宮頸部胃型腺癌において胃腺窩上皮細胞に分化した腺癌細胞は検出できないと考えられる。

我々は子宮頸部腺系病変の免疫組織学的解析により粘液細胞から分泌される trefoil factor family protein (TFF: TFF1, 2, 3の3種が知られている)が子宮頸部腺系病変において以下のような特異的な発現を示していることを見出している^{5,12)}。正常子宮頸管粘膜にはTFF3は構成的に発現しているが、TFF1とTFF2は発現していない。子宮頸部腺系病変においては、TFF2の発現はHIK1083抗体反応糖鎖の発現と一致しており^{5,13)}、TFF1は胃型以外の病変にも発現がみられ¹²⁾、TFF3は子宮頸管腺系病変全般で発現が保たれている。また、HIK1083抗体はIgM抗体のため、ELISA測定系への応用が難しいが、TFFに関して、我々はELISA測定系を構築している¹⁴⁾。

2. 研究の目的

子宮頸部腺癌は近年増加傾向にあり、早期発見が難しく、子宮頸部扁平上皮癌よりも悪性度が高く、なかでも胃粘膜上皮細胞に分化した腺癌(胃型腺癌)は悪性度が高いとされている。このため、子宮頸部腺癌の早期診断法やスクリーニング検査法の開発が待たれている。本研究では1)子宮頸管分泌液中のTFFの検出の意義と適応の評価のために必要となる子宮頸部腺系病変の構成細胞の細胞系列に基づいた分類(免疫表現型分類)の確立と2)宮頸管分泌液中のTFFの検出による、子宮頸部腺系病変のスクリーニング検査法の開発を目指した。

3. 研究の方法

1) 子宮頸部腺系病変の免疫表現型に基づいた分類

信州大学医学部附属病院で1996年~2018年に実施された生検ないしは手術切除材料のホルマリン固定パラフィン包埋されたLEGH(25例)子宮頸部上皮内腺癌(adenocarcinoma in situ: AIS)(36例)と子宮頸部浸潤性腺癌(invasive adenocarcinoma: IAC)(usual type 24例、mucinous, NOS 10例 mucinous, intestinal type 4例、Mucinous invasive SMILE 7例、gastric type 14例、endometrioid type 1例、Adenocarcinoma, NOS 6例)の連続症例を対象とした。免疫表現型分類には細胞系列マーカーとして以下の発現を免疫組織化学的に検討した。Claudin18(胃上皮の包括マーカー)^{15,16)}、CDH17(腸上皮の包括マーカー)¹⁶⁻¹⁸⁾およびPAX8(ミューラー管起源の上皮細胞の包括マーカー)¹⁹⁾。免疫染色結果は以下の基準に基づき陽性細胞数を半定量化して評価した。スコア0(0-4%)、1(5-24%)、2(25-49%)、3(50-74%)、4(75%以上)

免疫表現型は以下の基準に基づいて分類した。胃型(claudin18スコア3以上かつcadherin17スコア2以下)腸型(claudin18スコア2以下かつcadherin17スコア3以上)胃腸型(claudin18スコア3以上かつcadherin17スコア3以上)ミューラー管型(claudin18スコア2以下、cadherin17スコア2以下かつPAX8陽性スコア3以上)その他(上記の基準を充たさない)

2) 子宮頸管分泌液中のTFFのELISA測定

HIK1083ラテックス凝集試験の残余検体を用いて、子宮頸管分泌液中のTFF1、TFF2およびTFF3のELISA測定を行った。対象としては病理組織学的に子宮腺系病変の確定診断がなされた症例を用いた。一方、対照症例はHIK1083ラテックス凝集試験陰性かつ臨床的に子宮にLEGHを含め腫瘍性病変を認めない症例を用いた。子宮頸管分泌液の採取量は検体によるばらつきが大きく、また、分液中にはTFF濃度を補正する基準物質が無いため、子宮頸管円柱上皮に構成的に発現しているTFF3²⁰⁾に着目してTFF1/TFF3比とTFF2/TFF3比を疾患群と対照群と比較検討した。ELISA法によるTFF1、TFF3とTFF2の定量測定は申請者らが報告した方法に準じて実施した¹⁴⁾。

4. 研究成果

1) 子宮頸部腺系病変の免疫表現型分類

(1) 正常子宮頸管上皮における細胞系列マーカーの発現

正常子宮頸管上皮には claudin18 と cadherin17 の発現はみられず、PAX8 は瀰漫性に上皮の核に陽性像が観察された。

(2) LEGH と上皮内腺癌における細胞系列マーカーの発現と免疫表現型分類

LEGH は免疫表現型の観点からは全例胃型であった。上皮内腺癌は免疫表現型に基づいて、胃型(2例、5.6%)、腸型(10例、27.8%)、胃腸型(3例、8.3%)、ミューラー管型(18例、50%)とその他(3例、8.3%)に分類された²¹⁾。組織像の特徴は以下の様に要約された。

胃型は好酸性ないしは明るい胞体を持った円柱上皮から構成され、細胞頂部に少量の粘液を認めた。腸型には杯細胞が明瞭なものと円柱上皮が明瞭な2つの亜型が認められた。胃・腸型は胃型と腸型の間型の組織像を呈するものが多かった。ミューラー管型は従来の通常型の組織像を呈するものが多く、胞体粘液に乏しい、両染色ないしは淡好酸性の円柱上皮で構成され、特に細胞の腺腔側は腔内に向かい膨らんで突出する(apical snouts)像や線毛が観察された。また、ミューラー管型には胞体内粘液に富んだ頸管円柱上皮に類似した細胞で構成されたものも観察された。

(3) 浸潤性腺癌における細胞系列マーカーの発現と免疫表現型分類とその意義

免疫表現型に基づいて、胃型(15例、22.7%)、腸型(9例、13.6%)、胃腸型(7例、10.6%)、ミューラー管型(23例、34.8%)とその他(12例、18.2%)に分類された²²⁾。子宮頸部腺癌の国際分類(IECC2018)²³⁾と免疫表現型分類の対比を図1に要約した。

HPV感染の有無と病理組織像に基づいた子宮頸部腺癌の国際分類(IECC2018)²³⁾と免疫表現型分類には以下の様に解離がみられるものがあつた。胃型の多くはgastric type(73.3%)であつたが、mucinous, NOS(6.7%)にも胃型が認められた。腸型はusual type(55.6%)の頻度が高く、ついでmucinous, intestinal type(33.3%)とADC, NOS(HPV-unassociated)(11.1%)が含まれていた。胃腸型にはgastric type(42.9%)とmucinous, NOS(42.9%)が同程度含まれ、mucinous, intestinal typeは1例(14.3%)と頻度が低かつた。ミューラー管型にはusual type(65.2%)主体で、次いでmucinous, NOS(21.7%)の頻度が高く、mucinous, iSMILE, endometrioidとadenocarcinoma, NOS(HPV unassociated)がそれぞれ1例(4.3%)づつ認められた。免疫表現型の観点からはusual typeにはミューラー管型(62.5%)に次いで腸型(20.8%)の頻度が高く、mucinous, NOSには胃型(10%)、胃腸型(30%)、ミューラー管型(50%)が認められた。一方、mucinous, intestinal typeは腸型(75%)と胃腸型(25%)で構成され、gastric typeは胃型(78.6%)と胃腸型(21.4%)で構成されており、組織像と免疫表現型は概ね一致していた。また、予後の観点からは胃型と腸型・胃腸型はミューラー管型に比べ予後が悪いことが示された²²⁾。以上の様に、病理組織分類のusual typeとmucinous, NOSは複数の細胞系列で構成されていること、特にmucinous, NOSは構成する細胞系列が多岐にわたっていること確認された。今後、細胞系列特異的なマーカーを用いた免疫表現型に基づいた子宮頸部腺癌の分類は子宮頸部腺癌の発癌機構に関わる伝子プロファイル解析への応用が期待される。

図1 組織分類(IEC2018)と免疫表現型の対応

組織分類 (IECC2018)	免疫表現型					合計(%)
	胃型	腸型	胃腸型	ミューラー管型	その他	
HPV-associated						
Usual type	0	5	0	15	4	24(36)
Mucinous, NOS	1	0	3	5	1	10(15)
Mucinous, Intestinal	0	3	1	0	0	4(6)
Mucinous, iSMILE	0	0	0	1	6	7(11)
Adenocarcinoma, NOS	2	0	0	0	0	2(3)
HPV-unassociated						
Gastric type	11	0	3	0	0	14(21)
Endometrioid	0	0	0	1	0	1(2)
Adenocarcinoma, NOS	0	1	0	1	2	4(6)
合計(%)	15(22.7)	9(13.6)	7(10.6)	23(34.8)	12(18.2)	66

2) 子宮頸管分泌液中の TFF ELISA の診断的意義

子宮頸管腺系病の対象としては検体が集積できた LEGH 症例(36 検体)と対照例(147 検体)の比較検討を行った。

TFF1/TFF3 比と TFF2/TFF3 比はともに、LEGH 群[(TFF1/TFF3, 中央値 3.18×10^{-3} (IQR, 1.87×10^{-3} - 6.04×10^{-3}); TFF2/TFF3, 4.95×10^{-3} (1.70×10^{-3} - 10.37×10^{-3})]は対照群(TFF1/TFF3, 0.10×10^{-3} (0.04×10^{-3} - 0.30×10^{-3}), $p=8.9 \times 10^{-16}$; TFF2/TFF3, 0.57×10^{-3} (0.28×10^{-3} - 1.33×10^{-3}), $p=1.7 \times 10^{-10}$)に比べ有意に高値を示した。また、ROC 解析に基づいた TFF1/TFF3 比と TFF2/TFF3 比の LEGH の診断における最適カットオフ値

と感度および特異度はそれぞれ、 0.58^{-3} (感度= 93.8%; 特異度 = 86.2%)、 1.57^{-3} (感度=78.1%; 特異度 = 78.1%)であった。免疫組織学的には TFF1 と TFF2 は正常子宮頸部において発現がみられず、一方、子宮頸部腺系病変において TFF2 は胃型病変に特異的に発現している^{5, 13)}のに対して TFF1 は胃型以外にも発現が認められている¹²⁾。以上の点から、TFF2/TFF3 比は子宮頸部胃型病変の、一方、TFF1/TFF3 比は子宮頸部腺系病変全般のスクリーニング検査への応用が期待される。

文献

- 1) Fujimori Y, Akamatsu T, Ota H, et al.: Proliferative markers in gastric carcinoma and organoid differentiation. *Hum Pathol.* 1995,26:725-734
- 2) Honda T, Ota H, Ishii K, et al.: Mucinous bronchioloalveolar carcinoma with organoid differentiation simulating the pyloric mucosa of the stomach: clinicopathologic, histochemical, and immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol.* 1998,109:423-430
- 3) Ota H, Hayama M, Nakayama J, et al.: Cell lineage specificity of newly raised monoclonal antibodies against gastric mucins in normal, metaplastic, and neoplastic human tissues and their application to pathology diagnosis. *Am J Clin Pathol.* 2001,115:69-79
- 4) Ishii K, Katsuyama T, Ota H, et al.: Cytologic and cytochemical features of adenoma malignum of the uterine cervix. *Cancer Cytopathol.* 1999,87:245-253
- 5) Ota H, Harada O, Uehara T, et al.: Aberrant expression of TFF1, TFF2, and PDX1 and their diagnostic value in lobular endocervical glandular hyperplasia. *Am J Clin Pathol.* 2011,135:253-261
- 6) Kobayashi M, Fujinaga Y, Ota H. Reappraisal of the Immunophenotype of Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms (IPMNs)-Gastric Pyloric and Small Intestinal Immunophenotype Expression in Gastric and Intestinal Type IPMNs. *Acta Histochem Cytochem.* 2014,47:45-57
- 7) Mochizuka A, Uehara T, Nakamura T, et al.: Hyperplastic polyps and sessile serrated 'adenomas' of the colon and rectum display gastric pyloric differentiation. *Histochem Cell Biol.* 2007,128:445-455
- 8) Ishihara K, Kurihara M, Goso Y, et al.: Establishment of monoclonal antibodies against carbohydrate moiety of gastric mucins distributed in the different sites and layers of rat gastric mucosa. *Glycoconj J.* 1996,13:857-864
- 9) Ota H, Nakayama J, Momose M, et al.: New monoclonal antibodies against gastric gland mucous cell-type mucins: a comparative immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol.* 1998,110:113-119
- 10) Nakajima K, Ota H, Zhang MX, et al.: Expression of gastric gland mucous cell-type mucin in normal and neoplastic human tissues. *J Histochem Cytochem.* 2003,51:1689-1698
- 11) Ishii K, Kumagai T, Tozuka M, et al.: A new diagnostic method for adenoma malignum and related lesions: latex agglutination test with a new monoclonal antibody, HIK1083. *Clin Chim Acta.* 2001,312:231-233
- 12) 浅香志穂, 中嶋智之, 久郷佳央梨, 他. TFF1の免疫染色による子宮頸部腺系病変における胃型病変の検出とその有用性について. 第105回日本病理学会総会. 仙台国際センター 仙台; 2016.
- 13) Asaka S, Nakajima T, Momose M, et al.: Trefoil factor family 2 protein: a potential immunohistochemical marker for aiding diagnosis of lobular endocervical glandular hyperplasia and gastric-type adenocarcinoma of the uterine cervix. *Virchows Arch.* 2019,474:79-86
- 14) Kubota S, Yamauchi K, Sugano M, et al.: Pathophysiological investigation of the gastric surface mucous gel layer of patients with *Helicobacter pylori* infection by using immunoassays for trefoil factor family 2 and gastric gland mucous cell-type mucin in gastric juice. *Dig Dis Sci.* 2011,56:3498-3506
- 15) Krause G, Winkler L, Mueller SL, et al.: Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta.* 2008,1778:631-645
- 16) Matsusaka K, Ushiku T, Urabe M, et al.: Coupling CDH17 and CLDN18 markers for comprehensive membrane-targeted detection of human gastric cancer. *Oncotarget.* 2016,7:64168-64181
- 17) Berndorff D, Gessner R, Kreft B, et al.: Liver-intestine cadherin: molecular cloning

- and characterization of a novel Ca(2+)-dependent cell adhesion molecule expressed in liver and intestine. *J Cell Biol.* 1994,125:1353-1369
- 18) Su MC, Yuan RH, Lin CY, et al.: Cadherin-17 is a useful diagnostic marker for adenocarcinomas of the digestive system. *Mod Pathol.* 2008,21:1379-1386
 - 19) Woodard AH, Yu J, Dabbs DJ, et al.: NY-BR-1 and PAX8 immunoreactivity in breast, gynecologic tract, and other CK7+ carcinomas: potential use for determining site of origin. *Am J Clin Pathol.* 2011,136:428-435
 - 20) Wiede A, Hinz M, Canzler E, et al.: Synthesis and localization of the mucin-associated TFF-peptides in the human uterus. *Cell Tissue Res.* 2001,303:109-115
 - 21) Asaka S, Nakajima T, Kugo K, et al.: Immunophenotype analysis using CLDN18, CDH17, and PAX8 for the subcategorization of endocervical adenocarcinomas in situ: gastric-type, intestinal-type, gastrointestinal-type, and Mullerian-type. *Virchows Arch.* 2020,476:499-510
 - 22) Asaka S, Nakajima T, Ida K, et al.: Invasive Endocervical Adenocarcinoma with Gastric and Intestinal Shiho Shiho Asaka, Immunophenotype Correlates with Adverse Clinicopathological Features and Patient Outcome. USCAP 2020 Annual Meeting, Los Angeles Convention Center, Los Angeles, CA, USA (Modern Pathology 2020 Vol133 suppl 2 (1055A))
 - 23) Stolnicu S, Barsan I, Hoang L, et al.: International Endocervical Adenocarcinoma Criteria and Classification (IECC): A New Pathogenetic Classification for Invasive Adenocarcinomas of the Endocervix. *Am J Surg Pathol.* 2018,42:214-226

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shiho Asaka, Tomoyuki Nakajima, Kaori Kugo, Risako Kashiwagi, Nozomi Yazaki, Tsutomu Miyamoto, Takeshi Uehara, Hiroyoshi Ota	4. 巻 476
2. 論文標題 Immunophenotype analysis using CLDN18, CDH17, and PAX8 for the subcategorization of endocervical adenocarcinomas in situ: gastric-type, intestinal-type, gastrointestinal-type, and Mullerian-type	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virchows Archiv	6. 最初と最後の頁 499-510
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00428-019-02739-x	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Shiho Asaka, Tomoyuki Nakajima, Takeshi Uehara, Hiroyoshi Ota
2. 発表標題 An Immunophenotypic Classification of Endocervical Adenocarcinoma in situ Based on Comprehensive Immunohistochemical Markers: Gastric-Type, Gastrointestinal-Type, Intestinal-Type, and Muellerian-Type
3. 学会等名 United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP) 108th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shiho Asaka, Tomoyuki Nakajima, Koichi Ida, Ryoichi Asaka, Tsutomu Miyamoto, Takeshi Uehara, Hiroyoshi Ota
2. 発表標題 Invasive Endocervical Adenocarcinoma with Gastric and Intestinal Immunophenotype Correlates with Adverse Clinicopathological Features and Patient Outcome
3. 学会等名 United States and Canadian Academy of Pathology (USCAP) 109th Annual Meeting (国際学会)
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	浅香 志穂 (ASAKA Shiho)		
研究協力者	重藤 聖子 (SHIGETO Seiko)		
研究協力者	重藤 翔平 (SHIGETO Shohei)		