

令和 2 年 5 月 19 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K11619

研究課題名(和文) 口腔粘膜前癌病変の病理診断基準の確立

研究課題名(英文) Histopathological diagnostic criteria of oral mucosal precancerous lesions

研究代表者

仙波 伊知郎 (SEMBA, Ichiro)

鹿児島大学・医歯学域歯学系・教授

研究者番号：60145505

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)： 口腔粘膜前癌病変の病理組織診断に有用な免疫染色マーカーとその異型発現パターンを明らかにするため、200例の前癌病変各型(上皮肥厚、軽度異形成、高度異形成、上皮内癌)を検索し、各病型の判別を多変量解析で分析した。

正常発現パターンに部位差は認めなかった。Ki-67の異型発現パターンの出現頻度は4分類の各病変に対応して異なって認められ、Ki-67とTP53は高度異形成と上皮内癌で高頻度に重層化がみられた。多項ロジスティック回帰分析では上皮肥厚と上皮内癌の的中精度は高く、各病型間の2項ロジスティック回帰分析ではどの病型間でもKi-67とTP53が有意であり、免疫染色を病理診断に用いる有用性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

口腔癌は、比較的頻度は少なく稀少癌に分類されるが、生命維持や生活の基盤となる口腔顎顔面の機能を障害するため、単なる生命予後に留まらず、早期発見と早期治療によるQOLの維持が求められており、その治療の基盤には正確な病理診断を欠かす事が出来ない。

今回の研究で用い、検証できた免疫染色マーカーは、HE染色による形態診断だけでは判別が困難な口腔粘膜前癌病変の病理診断を、より正確に、また、診断者間のばらつきを少なくすることに寄与できる事が判った。この事は、口腔癌の早期病変の同定による早期診断と早期治療の開始に結びつくと共に、手術断端の評価に基づく術後治療の根拠を明確にし、予後の改善に寄与できる。

研究成果の概要(英文)： We re-evaluated the histopathological diagnoses and IHC patterns of Ki-67, TP53, CK13, and CK17 in 200 cases of OPLs and performed multiple logistic regression analyses for their predictive accuracy. We identified and compared atypical IHC patterns in OPLs and in the normal epithelium. Ki-67 expression showed specific patterns in categorized OPLs as epithelial hyperplasia (EHP), low-grade dysplasia (LED), high-grade dysplasia (HED), and CIS. Multiple logistic regression analyses in the quadrant categories revealed that EHP and CIS had high predictive accuracies. Binominal logistic regression analysis between each quadrant category revealed satisfactory predictive accuracy of EHP vs. LED, LED vs. HED, and HED vs. CIS, and Ki-67 showed the highest adjusted odds ratio, followed by TP53.

The proposed atypical IHC patterns might serve as useful markers to supplement the morphological diagnosis of OPLs, and established IHC methods for Ki-67 and TP53 might provide stable results.

研究分野：口腔病理学

キーワード：口腔前癌病変 病理診断 免疫染色

1. 研究開始当初の背景

進行した口腔扁平上皮癌に対する標準的な治療は著しいQOLの低下を招き、時宜を得た治療には早期発見と適切な病理診断が不可欠である。多くの口腔扁平上皮癌は多段階の遺伝子変異と領域発がんにより前癌病変を経て進展するので、前癌病変の適切な病理診断が必要であるが、これまでの組織形態的基準だけでは病理診断の標準化は困難な現状であり、実用的な免疫組織染色法の確立が急務といえる。

2. 研究の目的

今回の研究では、これまでの研究で用いられてきた手間のかかる発現細胞の計数ではなく、Ki-67、TP53、CK13 および CK17 の口腔前癌病変における異型発現パターンを同定し、評価した。この異型発現パターンの認識は実際の病理診断での有用性が高く、口腔前癌病変の病理組織診断の的確性にも寄与する可能性がある。

3. 研究の方法

2014年～2018年に鹿児島大学病院にて口腔粘膜の上皮過形成(炎症性過形成は除く)、上皮異形成および上皮内癌と病理診断された200症例を対象とし、WHO(2017年)分類の細胞異型と組織異型についての形態基準を基に、上皮過形成を含む上皮異形成は軽度上皮異形成と高度上皮異形成に分類し、全体を4病型(上皮過形成、軽度上皮異形成、高度上皮異形成、上皮内癌)に再評価分類した。また、PAS染色によりカンジダ感染を検索した。なお、臨床病態記録とともに病理組織診断を再評価した症例の検索は、鹿児島大学病院臨床研究倫理委員会の承認を得て行われた(承認番号18140号)。

Summary of cases; location, number (gender), mean age (range), and histopathological diagnosis

Location	number (M / F)	age (range)	EHP	LED	HED	CIS
palate	9 (3 / 6)	66.3 (50 - 77)	6	2	1	0
gingiva	60 (27 / 33)	71.2 (37 - 89)	27	5	9	19
tongue	99 (51 / 48)	64.3 (34 - 82)	28	19	29	23
buccal	32 (10 / 22)	70.2 (42 - 91)	10	4	7	11
Total	200 (91 / 109)	67.4 (34 - 91)	71	30	46	53

EHP: Epithelial hyperplasia, LED: Low-grade epithelial dysplasia, HED: High-grade epithelial dysplasia, CIS: Carcinoma in situ

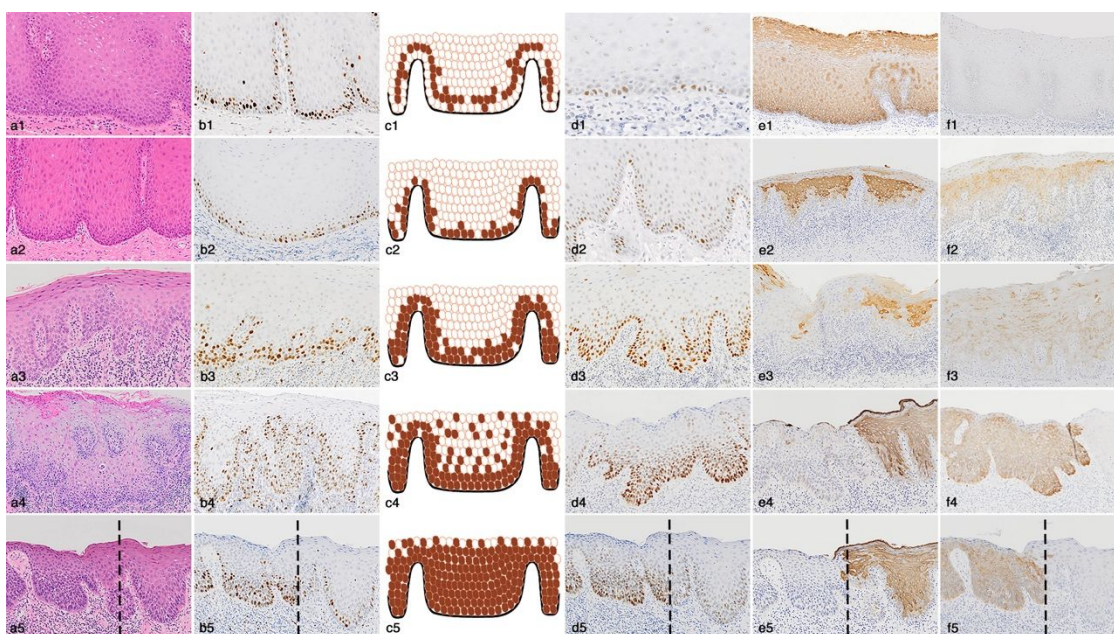
通法に従い、Ki-67(細胞増殖因子)、TP53(癌抑制遺伝子)、CK13とCK17(細胞分化因子)の免疫組織化学染色を行い、染色結果から各病変に特徴的な異型発現パターン(各4型)を同定し、各病変における異型発現パターンの出現頻度、および各病変(4分類と2分類)と異型発現パターン(各4型)の関係を多変量ロジスティック回帰分析(SPSSv24, IBM)により、病理診断を補完する際の各免疫染色マーカーの有用性について検討した。

4. 研究成果

(1) 各免疫染色マーカーの異型発現パターンの同定

正常粘膜上皮における各マーカーの免疫染色発現パターンの認識は、病変での異型発現パターンの同定の基礎となる。Ki-67は第1層(基底細胞層)の5%に陽性で、第2層(傍基底細胞層)の90%に陽性を示した。TP53は第1・2層に散在性に陽性で、陽性強度は低く、CK13は第1・2層以外の全層に均質に陽性で、CK17は陰性であった。これらの正常発現パターンに部位差は認めなかった。この正常発現パターンは上皮過形成の多くの症例に認められた。また、上皮内癌には2型(基底細胞型と角化・分化型)が認められた。

Atypical IHC expression patterns of Ki-67, TP53, CK13, and CK17 in OLPs.



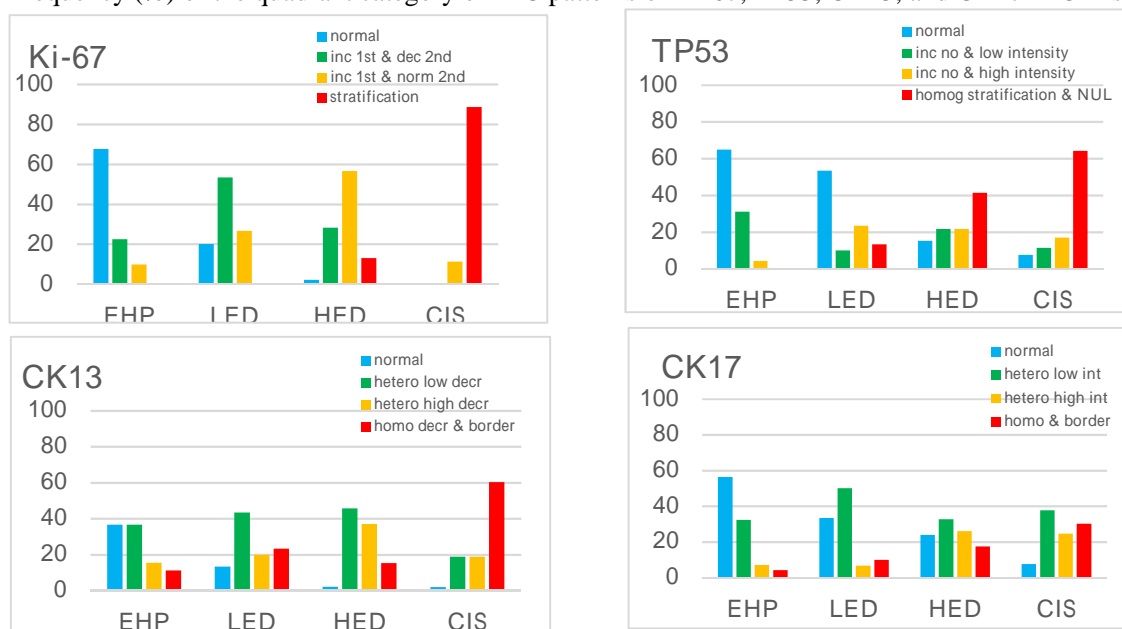
a1-5: HE (20x, a5: 10x), b1-5: Ki-67 (20x, b2: 40x, b5: 10x), c1-5: patterns of Ki-67, d1-5: TP53 (20x, d1: 40x, d5: 10x), e1-5: CK13 (10x), f1-5: CK17 (10x), a-f1: Epithelial hyperplasia, a-f2: Low-grade epithelial dysplasia, a-f3: High-grade epithelial dysplasia, a-f4: Carcinoma in situ, keratinized type, a-f5: Carcinoma in situ, basaloid type with distinct border (dotted line)

(2) 各マーカーの異型発現パタンの各病型における出現頻度

Ki-67 の 4 型の発現パタンの出現頻度は、上皮過形成、軽度上皮異形成、高度上皮異形成、上皮内癌の各病変に対応して認められた。TP53 は、正常発現パターンを多く認める上皮過形成と軽度上皮異形成に対し、重層化がみられる高度上皮異形成と上皮内癌で出現頻度は異なっていた。CK13 では上皮内癌で均質な発現低下が多く認められ、CK17 の各発現パターンは各病変間で不均一な頻度であるが、発現強度は病変進行度と共に増加する傾向が見られた。

上皮過形成では Ki-67、TP53 および CK17 は主に正常発現パターンを示すが、CK13 は軽度の発現減少が見られた。軽度上皮異形成の多くの症例では Ki-67 発現パターンは上皮過形成と異なり、基底細胞層での発現が亢進し、第 2 層目での発現が減少していた。高度上皮異形成では Ki-67 の発現が第 1・2 層で亢進すると共に TP53 発現細胞の重層化が認められた。上皮内癌では基底細胞型では Ki-67 と TP53 の発現細胞の密な重層化が、角化型では離散的な重層化が特徴的に認められると共に、CK13 の発現減少と CK17 の発現亢進が認められた。

Frequency (%) of the quadrant category of IHC patterns of Ki-67, TP53, CK13, and CK17 in OLPs.



a: Ki-67, b: TP53, c: CK13, d: CK17, EHP: Epithelial hyperplasia, LED: Low-grade epithelial dysplasia, HED: High-grade epithelial dysplasia, CIS: Carcinoma in situ, 1 - 4: quadrant category of each IHC marker

(3) 各マーカーの異型発現パタンの出現頻度の4病型分類での多項ロジステック回帰分析

4病型分類での多項ロジステック回帰分析では、上皮過形成と上皮内癌の的中精度はそれぞれ90.1%、96.2%と高かったが、軽度上皮異形成は43.3%と低かった。

Multiple logistic regression analysis of quadrant categories

	pEHP	pLED	pHED	pCIS	PA		AIC	BIC	LLR	χ^2	p
oEHP	64	4	3	0	90.1	Ki67	350.407	449.357	290.407	141.065	0.000
oLED	9	13	8	0	43.3	TP53	280.952	379.901	220.952	71.610	0.000
oHED	3	6	29	8	63.0	CK13	213.335	312.285	153.335	3.993	0.912
oCIS	0	0	2	51	96.2	CK17	225.557	324.506	165.557	16.214	0.063

B: regression coefficient, SE: standard error, Wald: Wald test, p: significance ($p < 0.05$)

Exp(B) (95% CI): adjusted odds ratio (95% confidence interval)

AIC: Akaike's Information Criterion, BIC: Bayesian information criterion

LLR: Log-Likelihood ratio, χ^2 : chi-square

また、上皮過形成と軽度上皮異形成を合わせた軽度上皮異形成群と高度上皮異形成と上皮内癌を合わせた高度上皮異形成群の2病型分類での多項ロジステック回帰分析では、それぞれ92.1%、89.9%と高い的中精度を示した。いずれもKi-67とTP53の判別への有意な寄与を示し、CK13とCK17の寄与は低かった。

Multiple logistic regression analysis of binary categories

	pLED	pHED	PA		AIC	BIC	LLR	χ^2	p
oLED	93	8	92.1	Ki67	144.898	177.881	124.898	57.818	0.000
oHED	10	89	89.9	TP53	109.956	142.940	89.956	22.876	0.000
				CK13	88.704	121.687	68.704	1.624	0.654
				CK17	89.193	122.176	69.193	2.112	0.549

B: regression coefficient, SE: standard error, Wald: Wald test

Exp(B) (95% CI): adjusted odds ratio (95% confidence interval)

AIC: Akaike's Information Criterion, BIC: Bayesian information criterion

LLR: Log-Likelihood ratio, χ^2 : chi-square, p: significance ($p < 0.05$)

(4) 各マーカーの異型発現パタンの出現頻度の各病型間の2項ロジステック回帰分析

上皮過形成と軽度上皮異形成、軽度上皮異形成と高度上皮異形成、高度上皮異形成と上皮内癌の各病型間の2項ロジステック回帰分析では、75.2%、78.9%、87.9%の的中精度であった。どの病型間でもKi-67とTP53の組み合わせが判別に有意であり、特にKi-67のオッズ比は最も高く、次いでTP53であり、高度上皮異形成と上皮内癌間の判別にはKi-67とTP53と共にCK13も有意であった。

Binominal logistic regression analysis of adjacent quadrant categories

EHP vs LED	pEHP	pLED	PA	HL		B	SE	Wald	p	Exp(B) (95% CI)
oEHP	64	7	75.2	0.486	Ki-67	1.095	0.336	10.616	0.001	2.988 (1.547 - 5.773)
oLED	18	12			TP53	0.652	0.292	4.973	0.026	1.082 (1.082 - 3.405)
LED vs HED	pLED	pHED								
oLED	18	12	78.9	0.893	Ki-67	1.488	0.425	12.271	0.000	4.426 (1.926 - 10.174)
oHED	4	42			TP53	0.692	0.248	7.771	0.005	1.998 (1.228 - 3.250)
HED vs CIS	pHED	pCIS								
oHED	39	7	87.9	0.471	Ki-67	4.308	0.920	21.926	0.000	74.289 (12.241 - 450.862)
oCIS	5	48			TP53	1.137	0.412	7.601	0.006	3.117 (1.389 - 6.995)
					CK13	0.830	0.409	4.127	0.042	2.294 (1.030 - 5.111)

o/pEHP: observed/predictive Epithelial Hyperplasia

o/pLED: observed/predictive Low-grade Epithelial Dysplasia

o/pHED: observed/predictive High-grade Epithelial Dysplasia

o/pCIS: observed/predictive Carcinoma In Situ

PA: Predictive accuracy (%), HL: Hosmer-Lemeshow test ($p \geq 0.05$), B: regression coefficient,

SE: standard error, Wald: Wald test, p: significance ($p < 0.05$)

Exp(B) (95% CI): adjusted odds ratio (95% confidence interval)

AIC: Akaike's Information Criterion, BIC: Bayesian information criterion, LLR: Log-Likelihood ratio

(5) 考察

本研究の結果は、Ki-67、TP53、CK13、CK17の免疫組織化学染色の異型発現パターンは形態診断を補完し、特にKi-67とTP53の異型発現パターンは前癌病変の各病型の分類に有用である可能性を示している。これらの免疫染色マーカーが病理診断に有用であるという結果は、これまでの報告の結果を支持するものであるが、異型発現パターンの認識は日常の病理診断において、より簡便で確実な診断方法といえる。今後、本結果と臨床的な長期的な予後との関連の研究が求められる。

現在のWHO分類では上皮異形成を異型度により2分類や3分類し、上皮内癌は高度上皮異形成と同義とされているが、本研究では上皮内癌にはKi-67とTP53の両者の重層化が高頻度で認められたが、高度上皮異形成では稀であり、両者を鑑別しうる可能性が示された。さらに、2項ロジスティック回帰分析の結果からは、CK13の明瞭な境界を伴う発現減少も両者の鑑別に寄与する可能性が示された。

Ki-67は口腔粘膜上皮の層構造の維持に寄与する基底細胞層と傍基底細胞層での細胞増殖の指標であり、この異型発現パターンと細胞異型や構造異型の程度は相関し、前癌病変の病型カテゴリーを反映している可能性がある。一方、細胞異型が乏しいことが特徴である高分化型扁平上皮癌では、Ki-67とTP53の重層化が高頻度で見られ、同様に細胞異型が乏しい上皮過形成との鑑別に有用である可能性がある。

TP53では上皮内癌や高度上皮異形成の一部で、正常部との境界明瞭な重層化、あるいは発現が全く見られない異型発現パターンが見られたが、TP53の発現強度や頻度の評価は、同一標本内の正常部と比較することが重要である。また、カンジダ感染症等の反応性変化や細胞内代謝を反映した野生型TP53の高発現を反映している可能性もあり、今後、TP53の過剰発現と遺伝子変異の関係を検証する事が必要である。

CK13やCK17の異型発現パターンによる病型の鑑別への直接的な寄与は低いが、Ki-67やTP53と組み合わせる事が有用であると考えられた。

本研究結果は、口腔前癌病変の実践的な病理組織診断に有用であり、また、診断上のピットフォールを回避する事にも有用である。今後、病理組織像のディープラーニングによるAIの病理診断支援や手術断端の評価に応用する際にも有用と考えられる。

この様に、免疫染色マーカーの異型発現パターンに着目することにより、口腔前癌病変の的確な病理組織診断を補完する免疫染色マーカーの所見を、実践的な病理診断へ応用することを推進できると考えられる。

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 Mikihito Ikeda , Kaori Shima , Tomoyuki Kondo , Ichiro Semba	4. 巻 62
2. 論文標題 Atypical immunohistochemical patterns can complement the histopathological diagnosis of oral premalignant lesions	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Oral Biosciences	6. 最初と最後の頁 93-98
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1016/j.job.2020.01.003	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1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 池田幹人、仙波伊知郎、嶋香織、 近藤智之
2. 発表標題 口腔粘膜前癌病変の病理診断基準の確立 免疫染色マーカーの有用性（上皮内癌と上皮肥厚の判別）
3. 学会等名 平成30年度 鹿児島大学大学院医歯学総合研究科 口腔先端科学教育研究センター 研究発表会
4. 発表年 2018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
研究分担者	嶋 香織 (SHIMA Kaori) (10343526)	鹿児島大学・医歯学域歯学系・准教授 (17701)	
研究協力者	池田 幹人 (IKEDA Mikihito)		
研究協力者	近藤 智之 (KONDO Tomoyuki)		