

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 4 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460419

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子解析に基づいた子宮内膜癌の病理形態所見の解明

研究課題名(英文) Molecular and morphologic features of uterine adenocarcinoma

研究代表者

大石 善丈 (Ohishi, Yoshihiro)

九州大学・医学研究院・准教授

研究者番号：60444824

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年子宮頸部腺癌で”通常型”と”胃型”という亜型が確立された。我々は、一つの腫瘍の中に通常型と胃型の形態、両方を併せ持つ例を見出し、通常型+胃型腺癌とした。我々は過去の内頸部型粘液性腺癌70例を解析し、48例の通常型と9例の胃型、13例の通常型+胃型腺癌を認めた。通常型+胃型腺癌の多くは高リスク型HPVが検出されず、HIK1083発現とp53異常発現を高頻度に認めた。少数の通常型+胃型腺癌は高リスク型HPV感染が検出され通常型p16+/p53-/HIK1083-の免疫表現型を高頻度に認めた。従って通常型+胃型腺癌の多くは、真の胃型腺癌であり、小数例が真の通常型であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：WHO classification set up new entities of endocervical adenocarcinoma (ECA), namely the 'usual type' and 'gastric type.' Usual-type ECAs (U-ECAs) are virtually always associated with high-risk human papillomavirus (HR-HPV) infection. Gastric-type ECAs (G-ECAs) are believed not to be associated with HR-HPV infection. We noticed that some ECAs contain morphologically usual type-like and gastric type-like components in a single tumor; we have named these "G+U" ECAs. We analyzed 70 cases of endocervical adenocarcinoma. We identified 48 pure U-ECAs, nine pure G-ECAs and 13 G+U ECAs. Most G+U ECAs showed no HR-HPV infection and showed frequent HIK1083 expression and aberrant p53 expression. The other G+U ECAs showed HR-HPV infection and frequent p16+/p53-/HIK1083-; immunophenotype. Most of the G+U ECAs we examined were genuine HPV-unrelated G-ECAs with usual type-like components. A small population of G+U ECAs was genuine HPV-related U-ECAs with gastric type-like components.

研究分野：婦人科病理

キーワード：子宮腺癌 子宮頸部通常型腺癌 子宮頸部胃型腺癌 Human papillomavirus p16 p53 HIK1083

1. 研究開始当初の背景

子宮内膜癌は従来病理学的な形態所見をもとに分類され、endometrioid, serous, clear cell などの亜型が含まれる。約 90% が endometrioid、10% が serous でその他の亜型は非常に稀である。しかし、病理組織学的研究の進歩に伴い、従来の形態的分類におさまらない子宮内膜癌の存在が注目されている。また一方で子宮内膜癌を網羅的に遺伝子異常解析した結果が報告され、遺伝子異常によって4グループに分類されることが示された。さて子宮頸部腺癌においては第4版のWHO分類では、新たに“通常型”と“胃型”という亜型が確立された。通常型は子宮内膜癌類内膜癌に類似した形態を示し、胃型は子宮内膜癌漿液性腺癌類似の分子異常を有する。この二つの亜型は組織発生、HPV感染の有無、予後が異なると考えられている。通常型 (usual type ECA : 以降 U-ECA) は高リスク型 HPV 感染に関連し、胃型 (gastric type ECA : 以降 G-ECA) は高リスク型 HPV 感染に関連しないとされる。形態学的には、U-ECA は粘液に乏しい好酸性の細胞質を持ち類内膜腺癌に類似する(類内膜腺癌類似形態)。G-ECA は、粘液豊富で淡明な細胞質を持ち、細胞境界は明瞭である。子宮頸部胃型腺癌が本邦において頻度が高く、また HPV 感染と関連がないことから、今後のワクチン投与による社会医学的観点からも注目される亜型であり、正確な診断が重要である。しかし、通常の診断業務の中で我々は、一つの腫瘍の中に通常型様の形態と胃型様の形態、両方を併せ持つ例を認め、このような例を G+U ECA とした。この子宮内膜癌との類似性を示す子宮頸部腫瘍の組織発生は研究されておらず、その解明こそ喫緊の課題と考えた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、G+U ECA の臨床病理学的、免疫組織化学的所見と HPV 感染の有無を検討し、G+U ECA が U-ECA を模倣した真の G-ECA であるのか、もしくは G-ECA 様の形態をもつ真の U-ECA であるのかを解明することである。

3. 研究の方法

(1)対象症例

我々は、2003年11月から2010年5月に九州大学産科学婦人科学教室において治療され、2003年のWHO分類に基づいて内頸部型粘液性腺癌と診断された、連続した80症例を再評価した。上記症例を最新のWHO分類(2014年)に基づいて再分類を行い、円柱状から立方状で、細胞内粘液の乏しい好酸性の細胞質を持つ腫瘍細胞が、腺管構造や篩状、乳頭状構造を示し、胃型成分を含まないことで定義される U-ECA と、豊富で淡明、青白い粘液性の細胞質を持ち、明瞭な細胞境界で定義される G-ECA を検索した。胃型様成分と通常型様成分の両方を含む腫瘍は、G+U ECA と記録した。分葉状内頸部腺過形成 (Lobular

endocervical glandular hyperplasia : 以降 LEGH) と正常の胃幽門腺を、HIK1083 免疫組織化学染色の陽性コントロールとして用いた。またこれらの組織は、高リスク型 HPV 感染と関連しないため、高リスク型 HPV の in situ hybridization (以降 ISH) の陰性コントロールとしても用いた。

(2)免疫組織化学染色

免疫組織化学染色の解析のために、代表的なホルマリン固定パラフィン包埋組織を選定した。G+U ECA においては、通常型様成分と胃型様成分を別々に評価した。

次のモノクローナル抗体を使用した : HIK1083 (クローン HIK1083, 1/20 希釈; Kanto Kagaku, Japan), MUC6 (クローン CLH5; 1/200 希釈; Novocastra, UK), MUC5AC (クローン CLH2; 1/200 希釈; Novocastra, UK), p53 (クローン DO-7; 1/100 希釈; Novocastra, UK), estrogen receptor (ER) (クローン 1D5; 1/2 希釈; Dako, Denmark), p16^{INK4a} research kit (1/1 希釈; Roche, Germany)。

(3)In situ hybridization (ISH)によるヒトパピローマウイルス DNA の検出

代表のホルマリン固定パラフィン包埋切片を選定した。G+U ECA では、通常型様成分と胃型様成分を別々に評価した。

Biotinylated DNA probe set (Y1443, Dako) を用いて、HPV DNA の検出のため ISH を行った。このキットは13種類の高リスク HPV (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68 型) を検出する。GenPoint tyramide single amplification system (Dako) を、説明書の手順に従い使用した。他の検査結果を見ずに評価を行った。核内にドット状に発現した場合を陽性とした。

4. 研究成果

(1)HE 標本の評価と臨床病理学的事項の解析

連続した80例の子宮頸部腺癌を再評価した後、10例を除外した(4例の上皮内腺癌 [Adenocarcinoma in situ : 以降 AIS]、4例の分類不能腺癌、1例の印環細胞癌、1例の放射線治療後の手術症例)。残りの70例を、U-ECA 48例(69%)、pure G-ECA 9例、G+U ECA 13例に再分類した。13例のG+U ECAのうち、7例は胃型様成分の方が通常型様成分より多く、3例は通常型様成分の方が多かった。残りの3例は胃型様成分と通常型成分は同量だった。

9例の pure G-ECA で、LEGH を2例に、最小偏倚型粘液性腺癌様領域を2例に、胃型 AIS 病変を3例に認めた。全 Pure G-ECA で、通常型 AIS 病変を認めなかった。胃型様 AIS は、3例の G+U ECA でも認めた。

U-ECA に比べ、pure G ECA と G+U ECA は、有意に進行症例 (FIGO ステージ 期) が多く (8.3% 対 55.6% と 53.8%; $p=0.0009$ と $p=0.0029$)、リンパ節転移が多く (6.3% 対 33.3% と 66.7%; $p=0.0441$ と $p<0.0001$)、脈管侵

襲が多かった(21%対55.6%と85%; $p=0.0444$ と $p<0.0001$)。Pure G type と G+U type の間では有意差はなかった。

(2)免疫組織化学染色の解析とISHによるHPV DNA 検出

各 G+U ECA で、免疫組織化学染色の結果と高リスク型 HPV の状態は、通常型様成分と胃型様成分で同じであった。

13 例の G+U ECA 中 10 例(77%)で、ISH で高リスク型 HPV DNA が検出されなかった。この HPV 非関連 G+U ECA は、通常型様成分と胃型様成分の両方で、時折の p16 過剰発現(4/10)、高頻度の p53 異常染色(びまん性パターン 3 例とゼロパターン 4 例)と HIK1083 発現(7/10)で特徴付けられた。

残り 3 例の G+U ECA で、高リスク型 HPV DNA が検出された。通常型様成分と胃型様成分の両方で、高リスク型 HPV の核内信号が見られた。この高リスク型 HPV 関連 G+U ECA は、通常型様成分と胃型様成分の両方で、p16 過剰発現(3/3)、低頻度の HIK1083 発現(1/3)、p53 発現の欠如(0/3)で特徴付けられた。

U-ECA は、高頻度の p16 過剰発現(98%)と高リスク型 HPV DNA の検出(100%)、低頻度の HIK1083 発現(4%)、そして p53 発現の欠如で特徴付けられた。HPV 関連 G+U ECA の免疫表現型は U-ECA の免疫表現型と類似していた。Pure G-ECA は、p16 過剰発現の欠如(0%)、高リスク型 HPV DNA の欠如(0%)、そして高頻度の HIK1083 発現(67%)と p53 異常染色(89%)(びまん性パターン 33%、ゼロパターン 56%)で特徴付けられた。HPV 非関連 G+U ECA の免疫表現型は、p16 発現を除いて pure G-ECA の免疫表現型と類似していた。

U-ECA と比べて、pure G-ECA は、有意に高リスク型 HPV 検出率が低く($p<0.0001$)、p16 過剰発現率が低く($p<0.0001$)、有意に HIK1083 発現率が高く($p<0.0001$)、p53 異常染色率が高かった($p<0.0001$)。

LEGH と正常胃幽門腺では、HIK1083 の細胞質へのびまん性強陽性を認めた(HIK1083 の陽性コントロール)。高リスク型 HPV DNA の ISH に関しては、LEGH と正常胃幽門腺のいずれも、HPV 感染を示す核内ドット状信号は見られなかった(HPV ISH の陰性コントロール)。しかし、LEGH と正常胃幽門腺で細胞質内の顆粒状信号が見られた。

(3)予後解析

全 48 例の U-ECA は、執筆現在で生存している。Pure G-ECA と G+U ECA 症例は、U-ECA 症例に比べて有意に全生存期間が短かった($p=0.0003$ と $p=0.0001$)。Pure G-ECA 症例と G+U ECA 症例の間で、全生存期間の有意差は認めなかった。HPV 関連 G+U ECA の 3 例中 2 例が、術後 31 か月と 36 か月で腫瘍死し、残り 1 例は 54 か月の時点で有病生存している。

結論

ここでは、我々は、一つの腫瘍に形態学的に通常型様成分と胃型様成分を持ち、診断的に混乱をきたす症例(G+U-ECA)について調査

し、次のように結論付けた。() 大半の G+U ECA は、通常型様の類内膜腺癌類似の成分をもつ真の G-ECA である。() いくつかの G+U ECA は、G-ECA に似て粘液豊富な成分をもつ真の U-ECA である。この結論を、以下の理由から導き出した。

(1)大半の G+U ECA (13 例中 10 例)は、高リスク型 HPV ISH で核内信号を認めず、HIK1083 が陽性であることと p53 の異常染色を示す点で、pure G-ECA の免疫表現型に類似していた。通常型様成分と胃型様成分の所見は一致していた。従ってこのような G+U ECA 症例における通常型様成分と胃型様成分は真の G-ECA であり、通常型様の粘液に乏しい類内膜腺癌類似の形態は、G-ECA の形態スペクトラムとして認識すべきである。

(2)一方、少数の G+U ECA (13 例中 3 例)は、高リスク型 HPV ISH で核内信号を認め、p16 びまん性染色と HIK1083 陰性、p53 陰性を示す点で、U-ECA の免疫表現型に類似していた。従ってこの HPV 関連 G+U ECA は、粘液豊富な胃型様成分を含む真の U-ECA である。

(3)HIK1083 は胃幽門腺マーカーの一つであり、G-ECA はしばしばこのマーカーに免疫反応性を示す。今回の研究で、G-ECA (pure G-ECA と G+U ECA を含む)は 22 例中 13 例(59%)で HIK1083 が陽性発現であった。残りの症例は HIK1083 陰性であった。HIK1083 陽性の症例では、発現は腫瘍の一部の領域に限られていた(平均 28.9%)。この結果は、形態学的に(粘液豊富な細胞質と境界明瞭な細胞境界)定義された G-ECA は常に HIK1083 に免疫反応を示すわけではないことを示唆する。HIK1083 発現が無いからといって G-ECA の診断は除外されないことを、知っておくべきである。LEGH と正常胃幽門腺における HIK1083 のびまん性発現とは対照的に、HIK1083 発現が減弱することが悪性胃/幽門腺様上皮の特徴かもしれない。

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 1 件)

Wada T, Ohishi Y, Kaku T, Aman M, Imamura H, Yasutake N, Sonoda K, Kato K, Oda Y.

Endocervical Adenocarcinoma With Morphologic Features of Both Usual and Gastric Types: Clinicopathologic and Immunohistochemical Analyses and High-risk HPV Detection by In Situ Hybridization.

Am J Surg Pathol. 2017 May;41(5):696-705. doi: 10.1097/PAS.0000000000000833.

PMID:28296678

[学会発表](計 1 件)

篠崎智子、大石善丈、小田義直

通常型と胃型、両者に類似した形態が混在する子宮頸部腺癌の検討。
第 105 回日本病理学会 2016 年 5 月 13 日、
仙台

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大石 善丈 (Ohishi Yoshihiro)
九州大学大学院医学研究院・准教授
研究者番号：60444824

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

和田 (篠崎) 智子 (Wada Tomoko)