

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 11 日現在

機関番号：13601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460673

研究課題名(和文) 子宮頸部固有上皮型腺癌、胃腸型腺癌、前癌病変の病理診断基準と検査診断法の開発

研究課題名(英文) Diagnostic markers of glandular lesion and their precursor lesions of uterine cervix

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) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：分葉状内頸腺過形成，上皮内腺癌，浸潤性腺癌におけるTFF1，TFF2，HIK1083の陽性頻度(%)はそれぞれ100/75/82.8，100/37.5/44.8，100/37.5/44.8であった．TFF2陽性細胞とHIK1083陽性細胞の分布は一致しており，腺管分泌物もTFF2陽性であった．頸管擦過液のTFF2-ELISA定量値はHIK1083ラテックス高凝集群で有意に高値であった．

研究成果の概要(英文)：In lobular endocervical glandular hyperplasia (LEGH), adenocarcinoma in situ and invasive adenocarcinoma, TFF1 was expressed 100/75/82.5%, TFF2 was expressed 100/37.5/44.8% and GlcNAc 6S recognized by antibody HIK1083 was expressed 100/37.5/44.8%. TFF2 expressed the same localizations with those of GlcNAc 6S. The secretions within the glandular lumens reacted positively for TFF2. TFF2 levels in cervical discharge measured using ELISA were higher in patients with higher scores of latex agglutination test using HIK1083 antibody. Screening of TFFs in cervical discharge may facilitate detection of cervical glandular lesion.

研究分野：病理学

キーワード：胃型腺癌 子宮頸部腺系病変

1. 研究開始当初の背景

(1) 研究代表者らは表現型に着目した腺癌の一連の研究から、胃ムチンが胃癌¹のみならず、胃以外の臓器発生の病変(杯細胞型肺腺癌^{2,3}、子宮頸部悪性腺腫およびその前癌病変^{4,5}、膵癌およびその前癌病変^{3,6}、大腸锯齿状病変⁷)にも発現し、これらの病変においては、胃表層粘液細胞と胃腺粘液細胞に分化した細胞が認められること、また、極めて分化度が高いため形態学的には診断が困難な症例が含まれていることを明らかにしてきた。(2) 胃粘液の検出に関しては、共同研究者の北里大学石原ら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 が開発され⁸、我々は免疫染色により HIK1083 抗体の胃腺粘液細胞ムチン特異性を報告した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内頸腺過形成 (lobular endocervical glandular hyperplasia: LEGH) における胃粘液検出用のラテックス凝集検査キット^{11,12}に利用されている。

(3) 消化管では胃粘液細胞のムチンコア蛋白とされる MUC5AC と MUC6 は正常子宮頸管粘液細胞に発現していることから⁵、これらのムチンコア蛋白の発現に基づいた、胃型形質の評価は子宮頸部腺系病変においては困難である。一方、HIK1083 反応性ムチンは正常子宮頸部には発現がみられないことから胃型子宮頸部腺系病変の病理診断マーカーとしては HIK1083 の有用性が示されている⁵。しかしながら、HIK1083 抗体を用いた検査では胃表層粘液細胞に分化した胃型腺系病変は検出できない。また、HIK1083 は IgM 型抗体のため、ELISA への利用には難点がある。HIK1083 反応性ムチンに代わるマーカーとして、研究代表者らは LEGH の免疫組織学的解析により TFF1 (胃表層粘液細胞のマーカー) と TFF2 (胃腺粘液細胞のマーカー) は正常子宮頸管上皮には発現がみられず、LEGH に高頻度に発現していることを報告した⁵。

2. 研究の目的

(1) 本研究では子宮頸管腺系病変における特に胃型の表現型発現に着目して、LEGH、子宮頸部原発性腺癌およびその前癌病変における、TFF1およびTFF2の病理診断マーカーとしての有用性の検討と非浸襲的な臨床検査法への応用を検討した。

3. 研究の方法

(1) 信州大学医学部附属病院で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 (16 例)、子宮頸部上皮内腺癌 (adenocarcinoma in situ: AIS)

(24 例) と子宮頸部浸潤性腺癌 (invasive adenocarcinoma: IAC) (usual type 16 例および mucinous type 13 例) を対象として、以下のマーカーの発現を免疫組織化学的に検討した。TFF1 (胃表層粘液細胞マーカー)、TFF2 (胃腺粘液細胞マーカー)、GlcNAc 1 4Gal R (HIK1083 抗体で認識される糖鎖、胃腺粘液細胞マーカー)、claudin18 (胃上皮の包括マーカー)^{13,14}、CDX2 (腸上皮の包括マーカー) および PAX8 (ミューラー管起源の上皮細胞の包括マーカー)¹⁵。PAX8 の特異性の検討のため、胃癌 20 例から組織マイクロアレイを作成して、PAX8 の免疫染色を行った。

(2) 子宮頸部擦過液につき、ELISA 法による TFF2 の定量測定と HIK1083 ラテックス凝集試験 (HIK1083 のラテックス粒子の懸濁液を用いて、ラテックス凝集の有無を目視により半定量的に判定) を比較検討した。ELISA 法による TFF2 の定量測定は研究代表者らが報告した方法に準じて実施した¹⁶。

4. 研究成果

(1) 正常子宮頸管円柱上皮および子宮頸部腺系病変における組織特異的マーカーの発現

正常子宮頸管上皮には TFF1、TFF2、GlcNAc 1 4Gal R、Claudin18 および CDX2 は陰性であった。LEGH、AIS、IAC-usual type および IAC-mucinous type における TFF1 の発現頻度は、100/75/87.5/79.6%、TFF2 の発現頻度は 100/37.5/37.5/83.8%、HIK1083 反応性ムチンの発現頻度は 100/37.5/37.5/83.8%であった。TFF1 は HIK1083 陰性の細胞にも発現がみられ、更に、いずれの検討群においても高頻度に発現していた。TFF1 は胃型の形質発現とは別に、腫瘍化によって子宮頸部腺系病変に発現が誘導されている可能性があり、子宮頸部腺系病変における TFF1 の細胞特異性については更なる検討が必要と考える。また、TFF1 は正常子宮頸部には発現がみられないことから、子宮頸部腺系病変の汎用マーカーとしての利用が考えられる。一方、TFF2 陽性細胞の分布は、いずれの検討群においても、HIK1083 陽性細胞の分布に一致しており、TFF2 は子宮頸部腺系病変において、胃腺粘液細胞への分化マーカーとして利用できるものと考えられる。HIK1083 抗体は海外での入手が限られていることから、子宮頸部腺系病変における胃型の表現型発現の検出に TFF2 は HIK1083 抗体に代わり海外でも広く利用が可能と期待される。また、TFF1 と TFF2 は細胞質に加え、腺管内への分泌物にも陽性像がみられたことから、TFF1 と TFF2 は粘液とともに頸管に分泌されているものと考えられる。

胃型形質を示す子宮頸部腺癌は形態的には胞体内粘液に富んだ腺癌とされているが、今回の検討では IAC において mucinous type に加

え, usual type にも胃型形質が確認されたことから, 胃型形質の発現と病理組織像との対応は再考が必要と考える. また, AIS においても胃型形質が認められたことから, 胃型形質を発現する浸潤癌の前駆病変として, LEGH に加え, AIS からの進展も想定される.

Claudin はタイトジャンクションの主要構成分子であり, ゲノム解析から 24 種が同定され, 組織分布特異性と多様性が明らかになっている. そのなかでも Claudin18 は胃粘膜上皮に特異的に発現しており¹³, 免疫染色では胃粘膜上皮の基底側および外側の細胞膜が陽性となる¹⁷. 子宮頸部腺管病変においても, 胃粘液細胞への分化を包括的に同定するマーカーとして報告されている¹⁴. しかしながら, 今回我々が検討した条件では, TFF2, GlcNAc 1 4Gal R が陽性の細胞において, Claudin18 が陰性となる傾向がみられ, 染色条件の再検討が必要と考えられた.

CDX2 は TFF2 および HIK1083 陽性の胃型形質を示す子宮頸部腺系病変に種々の程度に発現していた. 子宮頸部発生の胃型形質の病変は胃と腸上皮への分化を種々の程度に示す胃・腸型病変と考えられた.

PAX8 はミユラー管起源の上皮細胞に発現していると報告されていることから, 子宮頸部固有上皮に分化した子宮頸部腺系病変の組織マーカーになるものと予測されたが¹⁵, 今回の検討では PAX8 は胃型形質の子宮頸部腺系病変にも高頻度に発現がみられた. PAX8 は消化管原発の腺癌では陰性と報告されており¹⁵, 今回の検討でも胃癌症例は PAX8 陰性であった. 胃型形質の子宮頸部病変と胃原発の腺癌とは組織発生が異なっているものと推測される. また, 胃型形質を示す転移性腫瘍の原発巣の推定にあたり, PAX8 はミユラー管起源の臓器原発を推定する組織マーカーとしての利用が考えられる.

(2) 子宮頸管分泌物中の TFF の測定とその診断的意義

免疫組織化学的検討から子宮頸部腺系病変において, 腺腔内への分泌物に TFF1 と TFF2 が認められ, 特に TFF2 陽性細胞の分布は, いずれの検討群においても, HIK1083 陽性細胞の分布に一致していることが確認された. 子宮頸部擦過液中の TFF2 の ELISA 定量と HIK1083 ラテックス凝集反応の比較を行ったところ, 子宮頸部擦過液中の TFF2 は ELISA により, 再現性良く定量が可能であり, TFF2 の定量値は HIK1083 ラテックス高凝集群で有意な上昇がみられた. しかしながら, 子宮頸部擦過液は採取量や採取状態が様々であることから, 子宮頸部擦過液中の TFF2 の定量を臨床検査に応用するには, 内部標準となる指標による TFF2 値の補正が必要であり, 今後の課題と考える.

引用文献

- [1] Fujimori Y, Akamatsu T, Ota H, Katsuyama T: Proliferative markers in gastric carcinoma and organoid differentiation. *Hum Pathol* 1995, 26:725-34.
- [2] Honda T, Ota H, Ishii K, Nakamura N, Kubo K, Katsuyama T: Mucinous bronchioloalveolar carcinoma with organoid differentiation simulating the pyloric mucosa of the stomach: clinicopathologic, histochemical, and immunohistochemical analysis. *Am J Clin Pathol* 1998, 109:423-30.
- [3] Ota H, Hayama M, Nakayama J, Hidaka H, Honda T, Ishii K, Fukushima M, Uehara T, Kurihara M, Ishihara K, Hotta K, Katsuyama T: 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, Watanabe T, Matsuyama I, Tsuchiya S, Shiozawa T, Toki T: Cytologic and cytochemical features of adenoma malignum of the uterine cervix. *Cancer* 1999, 87:245-53.
- [5] Ota H, Harada O, Uehara T, Hayama M, Ishii K: Aberrant expression of TFF1, TFF2, and PDX1 and their diagnostic value in lobular endocervical glandular hyperplasia. *Am J Clin Pathol* 2011, 135:253-61.
- [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, Kobayashi Y, Ota H: Hyperplastic polyps and sessile serrated 'adenomas' of the colon and rectum display gastric pyloric differentiation. *Histochem Cell Biol* 2007, 128:445-55.
- [8] Ishihara K, Kurihara M, Goso Y, Ota H, Katsuyama T, Hotta K: Establishment of monoclonal antibodies against carbohydrate moiety of gastric mucins distributed in the different sites and layers of rat gastric mucosa.

- Glycoconj J 1996, 13:857-64.
- [9] Ota H, Nakayama J, Momose M, Kurihara M, Ishihara K, Hotta K, Katsuyama T: New monoclonal antibodies against gastric gland mucous cell-type mucins: a comparative immunohistochemical study. *Histochem Cell Biol* 1998, 110:113-9.
- [10] Nakajima K, Ota H, Zhang MX, Sano K, Honda T, Ishii K, Nakayama J: Expression of gastric gland mucous cell-type mucin in normal and neoplastic human tissues. *J Histochem Cytochem* 2003, 51:1689-98.
- [11] Ishii K, Kumagai T, Tozuka M, Ota H, Katsuyama T, Kurihara M, Shiozawa T, Noguchi H: A new diagnostic method for adenoma malignum and related lesions: latex agglutination test with a new monoclonal antibody, HIK1083. *Clin Chim Acta* 2001, 312:231-3.
- [12] Omori M, Hashi A, Ishii Y, Yuminamochi T, Nara M, Kondo T, Hirata S, Katoh R, Hoshi K: Clinical impact of preoperative screening for gastric mucin secretion in cervical discharge by HIK1083-labeled latex agglutination test. *Am J Clin Pathol* 2008, 130:585-94.
- [13] Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE: Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta* 2008, 1778:631-45.
- [14] Matsusaka K, Ushiku T, Urabe M, Fukuyo M, Abe H, Ishikawa S, Seto Y, Aburatani H, Hamakubo T, Kaneda A, Fukayama M: Coupling CDH17 and CLDN18 markers for comprehensive membrane-targeted detection of human gastric cancer. *Oncotarget* 2016, 7:64168-81.
- [15] Woodard AH, Yu J, Dabbs DJ, Beriwal S, Florea AV, Elishaev E, Davison JM, Krasinskas AM, Bhargava R: 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, 136:428-35.
- [16] Kubota S, Yamauchi K, Sugano M, Kawasaki K, Sugiyama A, Matsuzawa K, Akamatsu T, Ohmoto Y, Ota H: 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, 56:3498-506.

- [17] Matsuda Y, Semba S, Ueda J, Fuku T, Hasuo T, Chiba H, Sawada N, Kuroda Y, Yokozaki H: Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. *Cancer Sci* 2007, 98:1014-9.

5. 主な発表論文等

[学会発表](計 3件)

1. 浅香 志穂, 矢崎 望, 伊藤 雅之, 小林 千夏, 井田 耕一, 中嶋 智之, 小林 幸弘, 石井 恵子, 本田 孝行, 太田 浩良. 子宮頸部胃型腺系病変の診断におけるTFF2 の免疫染色の有用性. 第106 回日本病理学会総会. 2017年4月27-29日. 京王プラザホテル. 東京
2. Shiho Asaka, Tomoyuki Nakajima, and Hiroyoshi Ota. Trefoil Factor Family 2 Protein: A Promising Immunohistochemical Marker for Diagnosing Lobular Endocervical Glandular Hyperplasia and Gastric-type Adenocarcinoma of Uterine Cervix. USCAP 2017 Annual Meeting. March 4, 2017 to March 10, 2017. Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, TX. USA
3. 浅香志穂, 中嶋智之, 久郷佳央梨, 柏木里沙, 仲田梨恵, 小林幸弘, 上原剛, 石井恵子, 太田浩良. 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. 2016年5 月12 -14 日. 仙台国際センター. 仙台

6. 研究組織

(1)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

(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

浅香 志穂 (ASAKA, Shiho)

久保田 聖子 (KUBOTA, Seiko)