

子宮頸部上皮内腫瘍の補助診断法

p16免疫組織化学染色の有用性

監修

三上 芳喜 先生

(熊本大学医学部附属病院病理診断科 教授)



はじめに

子宮頸部上皮内腫瘍 (Cervical intraepithelial neoplasia: CIN) の診断におけるバイオマーカーの有用性が注目されている。文献的には、Ki-67、p16、MN蛋白、L1蛋白、p63/p73、サイクリン (cyclin) などに対する免疫組織化学染色の他、MCM2とTOP2、p16とKi-67に対する二重免疫組織化学染色の有用性が報告されている。しかし、現時点では簡便性、信頼性などの点でp16免疫組織化学染色が最も有望視されており、広く普及しつつある。

バイオマーカー (biomarker) とは

米国国立衛生研究所はバイオマーカーを「正常の生物学的過程、病的過程、あるいは治療的介入に対する薬理学的応答の指標として客観的に測定、評価される特性」と定義している。この定義の目的は、臨床試験において評価に時間やコストを要する真のエンドポイント (死亡率低下、疾患の発症率の低下、QOLの向上、副作用の低減など) の代替として容易かつ客観的な評価が可能な指標を規定することであった。バイオマーカーの具体例としては、①体液中の物質 (蛋白質、血糖、電解質、コレステロール、CRP、腫瘍マーカー) の他、②バイタルサイン (血圧、心拍数など)、心電図、画像 (X線写真、CT、MRI、PETなど)、③DNAやRNA、④環境暴露を評価する指標 (病原体、NNKなどのタバコ特異ニトロアミン代謝物など)、が挙げられる。臨床的にはバイオマーカーは、①疾病の診断、②進行期や病勢 (活動性)、腫瘍の進展の評価、③予後推定、④治療方針の決定、⑤治療に対する反応性予測、反応性評価、などを目的として用いられる。病理組織診断においては、酵素抗体法やin situ hybridizationによってバイオマーカーの局在を切片上で可視化することによって、診断確定に貢献している。

CINの診断におけるバイオマーカーの意義

CINの診断におけるバイオマーカーの意義は、①高リスク型ヒトパピローマウイルス (human papillomavirus: HPV) の有無の評価、②HPV関連病変が一過性感染ないし持続性感染、腫瘍化 (宿主細胞の不死化) のいずれによるものかの判別、③CIN1からCIN2ないしCIN3、浸潤癌への進展のリスクの評価、などに集約される。HPV DNAテストは子宮頸部細胞診に取り入れられており、ASC-US判定後のトリアージにおいて重要な役割を演じている。また、CIN1およびCIN2症例の進展リスクを目的としてHPVの型判定 (タイピング) が行われている¹⁾。しかし、これらはHPVの有無、タイプを評価しているもので、病変自体の生物学的特性、すなわちHPVによる腫瘍化の有無を評価しているものではない。

p16

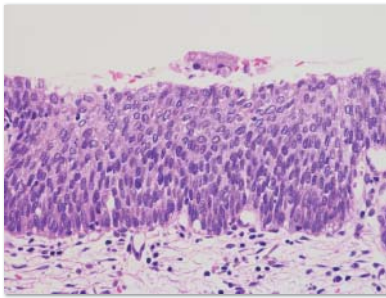
p16はサイクリン依存性キナーゼインヒビターで、E7によるRb遺伝子産物の不活化が生じた際にネガティブフィードバックによって発現が亢進する。すなわち、HPV DNAの宿主DNAへの組み込み (integration) によって細胞の腫瘍化 (transformation) が生じていることを示すマーカーである^{2,3}。p16免疫組織化学染色が有用な例を以下に挙げる。

■ CIN3 (高度異形成と上皮内癌) の診断

CIN3では重層扁平上皮の全層がN/C比の高い異型細胞で置換されるが、未熟扁平上皮化生、未熟コンジローマ (異型未熟化生)、萎縮性変化などの良性変化との判別が難しいことがある。細胞異型の有無、核分裂およびアポトーシス像の有無が重要な鑑別点だが、

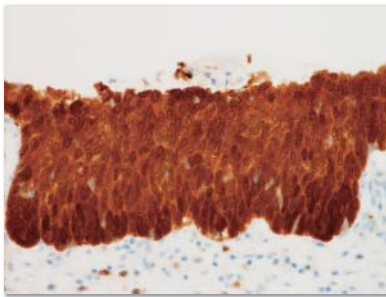
CIN3では全層にわたってN/C比の高い細胞の核と細胞質がびまん性にp16陽性となるのが大きな特徴である (図1)。これに対して、異型未熟化生 (図2) を含む他の3つの病変では陰性あるいはごく一部が弱陽性となるに過ぎない。

図1 CIN3



A HE染色

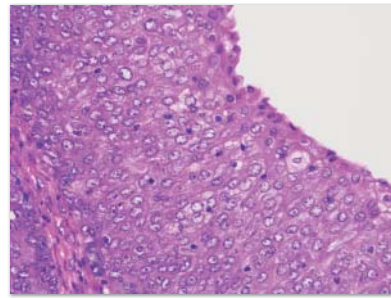
重層扁平上皮の全層がN/C比の高い異型細胞で置換されている。核大小不同、核形不整、クロマチン増量、クロマチン構造の粗造化が認められることから、CIN3と判断する。



B p16免疫組織化学染色

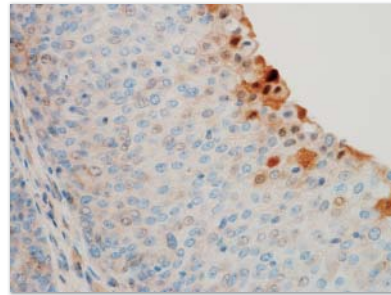
N/C比の高い異型細胞の核、細胞質がびまん性に陽性である。上皮の全層にわたって陽性細胞が分布している。

図2 異型未熟化生 (未熟コンジローマ) (p16陰性例)



A HE染色

重層扁平上皮の全層がN/C比の高い細胞で置換されている。一見CIN3に類似しているが、核の腫大、核大小不同、核形不整は軽度で、核分裂も殆ど認められない。CIN3あるいは乳頭状扁平上皮癌と誤認しないよう、注意を要する。



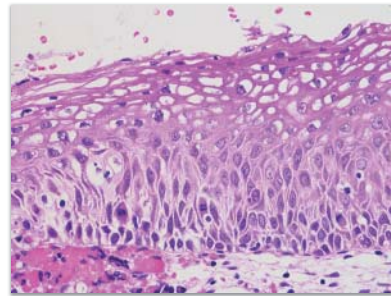
B p16免疫組織化学染色

表層で少数の陽性細胞が見られるが、N/C比の高い細胞の大部分が陰性である。p16の染色性は基底側から強陽性 (細胞質および核) の細胞が連続して存在している場合にのみ陽性と解釈する。病変は一過性のHPV感染によるもので、CIN1に準じて取り扱われる。

■ CIN2 (中等度異形成) の診断

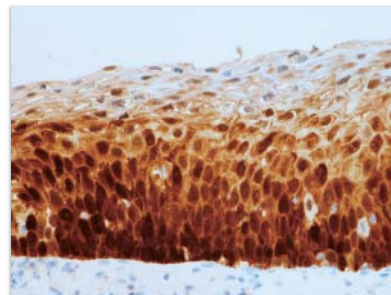
組織学的にCIN2はCIN1およびCIN3との判別がしばしば問題となる。CIN2 (図3)、CIN3はともにN/C比の高い異型細胞がびまん性にp16強陽性となるため、判別する場合は従来の組織学的診断基準(表層分化の有無、異型細胞が上皮の基底側2/3をこえるか否か)にゆだねられるが、診断の再現性は病理医間で必ずしも高いとはいえない。CIN2はCIN3と比較して高率に消失するため、本邦ではCIN2は経過観察、CIN3は治療対象と考える婦人科医が多い。これに対して、米国コルポスコピー子宮頸部病理学会(American Society of Colposcopy and Cervical Pathology:ASCCP)のガイドライン(2006年)はCIN2以上を治療対象とすることを推奨しており、その根拠としてCIN2とCIN3の判別の再現性が低いことを挙げている⁴。従って、臨床的観点からはCIN2とCIN3の判別よりも、CIN1とCIN2の判別が重要である。CIN1は30~40%がp16陽性であるため⁵、陽性の場合にはCIN1とCIN2の判別は異型の範囲(上皮の基底側1/3をこえるか否か)で鑑別される。これに対してp16陰性の場合にはCIN2は否定的で、CIN1である可能性を考慮する。従って、組織学的にCIN2が疑われるものの断定が難しい場合にはp16免疫組織化学染色を施行することが望ましい⁶。

図3 CIN2



A HE染色

重層扁平上皮の基底側2/3の範囲でN/C比の高い異型細胞が増殖しており、表層分化が保持されている。



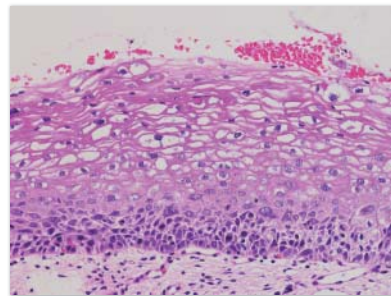
B p16免疫組織化学染色

表層では核および細胞質が弱陽性の細胞が散見される程度だが、基底側2/3を占めている異型細胞が強陽性である。

■ CIN1 (軽度異形成) の診断

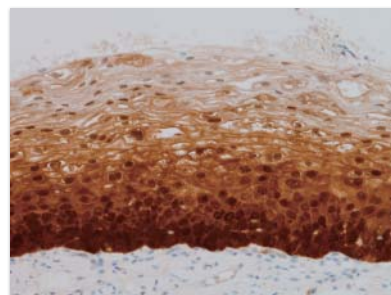
CIN1と炎症などによる反応性変化の区別はコイロサイトーシスの有無、上皮基底側の異型の有無による(図4)。しかし、コイロサイトーシスとしての形態変化や基底側の異型が軽度である場合には判別が困難となる。その場合、この二つの病変はいずれも経過観察の対象となるため、p16免疫組織化学染色は必須ではない。p16が陽性の場合にはCIN1が示唆されるが、陰性の場合もCIN1を否定するものではない。ただし、生検診断がCIN1ないし反応性であると考えられても、細胞診判定がHSILないしASC-Hの場合には切片上で高度病変が見落とされている可能性があるため、p16免疫組織化学染色を施行してもよい⁶。なお、p16の発現がCIN1の進展リスクを反映しているとみられている。CIN1として診断されている病変の中には真の腫瘍性病変と、HPVは感染しているが腫瘍化が実際には起こっていない病変が含まれていると考えられている。p16陽性CIN1は真の腫瘍で、高率にCIN3あるいは浸潤癌に移行する可能性がある^{7,8}。そのため、現在行われている高リスク型HPVの型判定とともに、p16免疫組織化学染色の進展リスク評価における有用性の検証が待たれるところである。

図4 CIN1



A HE染色

軽度から中等度の核形不整、核大小不同を示す細胞が重層扁平上皮の基底側1/3の範囲で存在している。核分裂も散見される。表層ではコイロサイトーシスがみられる。



B p16免疫組織化学染色

上皮の全層の細胞が陽性だが、強陽性の細胞は基底側1/3程度にとどまっており、表層では染色性が低下しているためにグラデーションが生じている。

The Lower Anogenital Squamous Terminology (LAST) Standardization Project for HPV-Associated Lesions

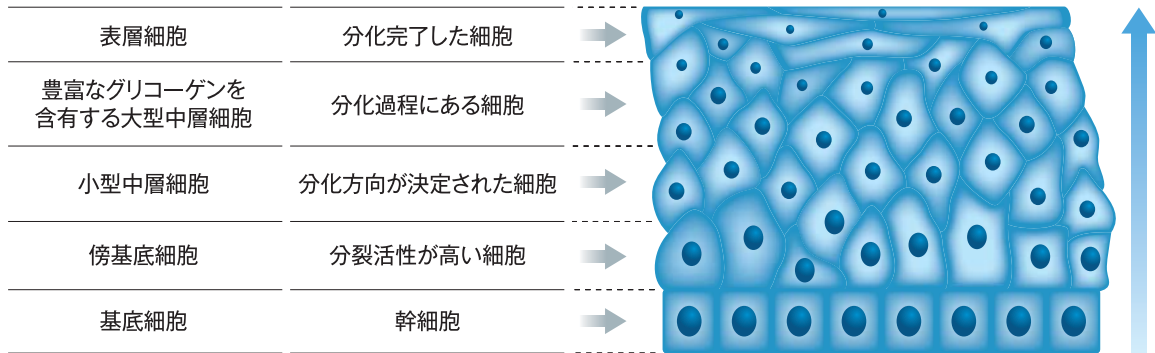
最近、米国病理学会 (College of American Pathologists:CAP)、米国コルポスコピー子宮頸部病理学会 (American Society for Colposcopy and Cervical Pathology:ASCCP) による LAST プロジェクトが子宮頸部、膣、外陰部、肛門の HPV 関連扁平上皮病変の診断のためのガイドラインを策定した⁹。このガイドラインでは本来細胞診の用語であった LSIL、HSIL を病理組織診断用語として使用することを提唱したほか、CIN3 と萎縮や未熟化生の判別、CIN2 と CIN1 の判別、を目的とした p16 免疫組織化学染色の施行を推奨している。

まとめ

CIN の診断、マネージメントにおいて p16 免疫組織化学染色の有用性が期待されている。実際の応用にあたっては染色手技の標準化、結果の解釈、組織学的評価との相関が重要である。

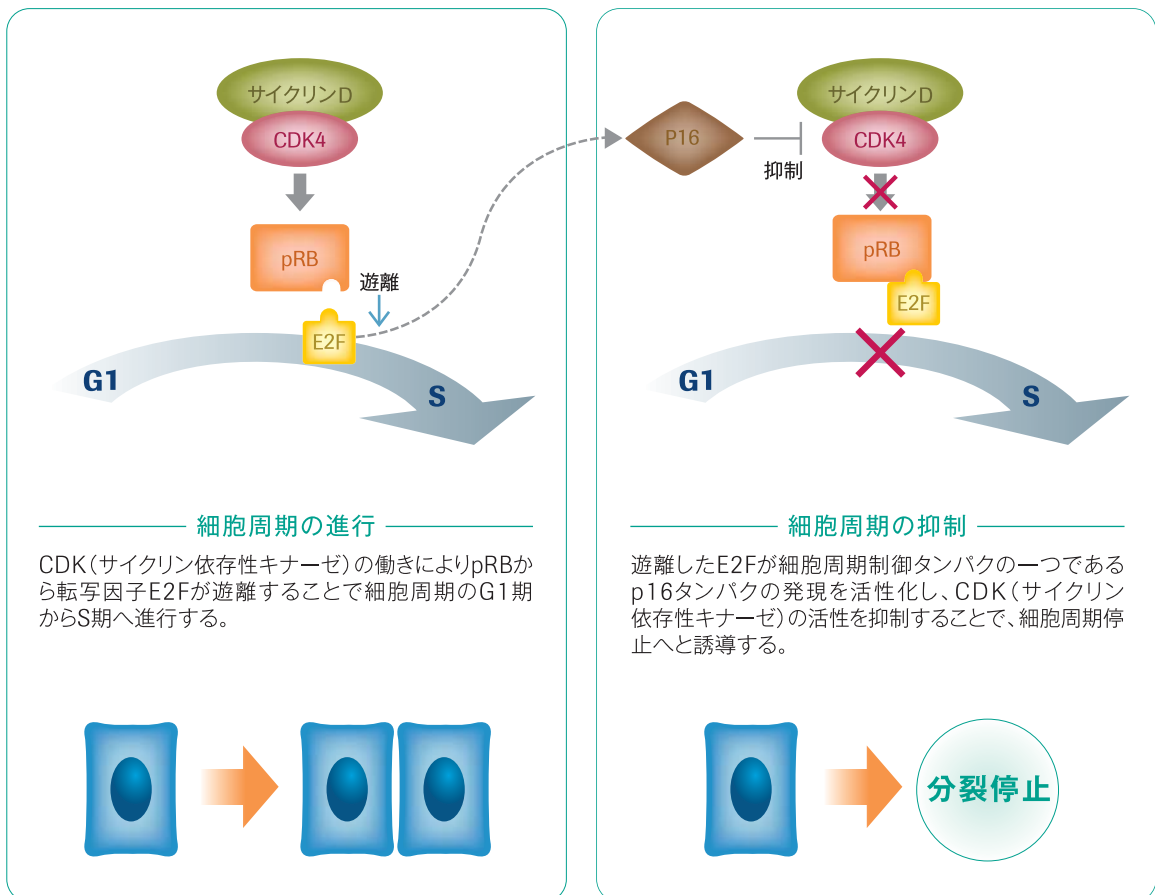
子宮頸部扁平上皮におけるp16タンパク発現メカニズム

■ 正常な子宮頸部扁平上皮



分裂能は基底細胞と傍基底細胞に限定されている。分化・成熟は中間層で行われ、表層細胞層は最終的に角質化し、剥離する。

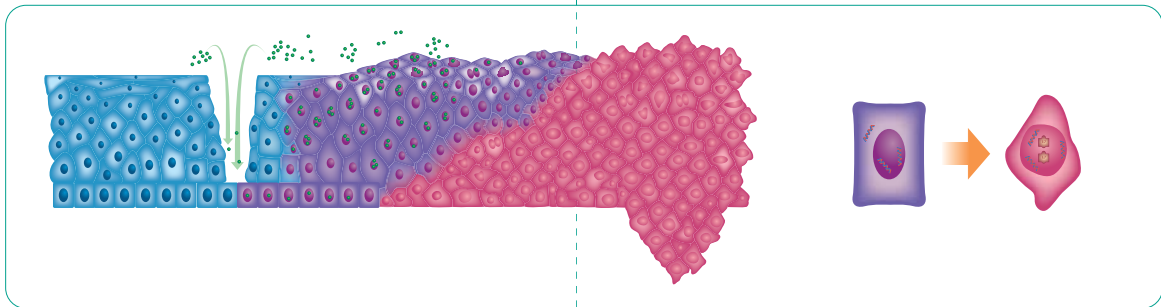
■ 細胞周期の調整



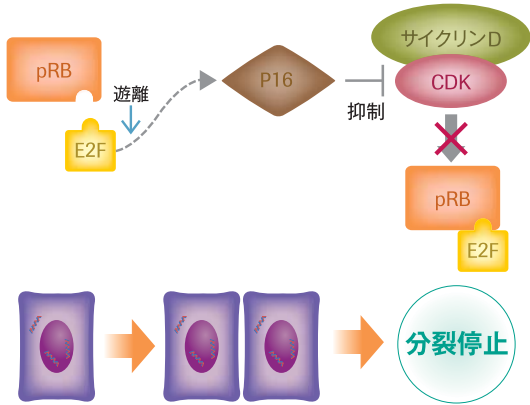
■ 高リスク型HPV感染による発癌性形質転換とp16タンパク過剰発現のメカニズム

高リスク型HPVは、基底細胞に感染する。扁平上皮の分化・成熟に伴ってHPVのDNA複製が行われる。一般的にHPV感染の大半は一過性であり、6-12ヶ月以内に消失する。

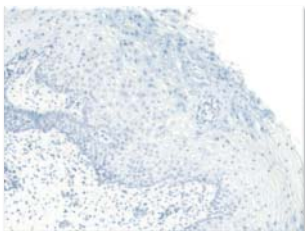
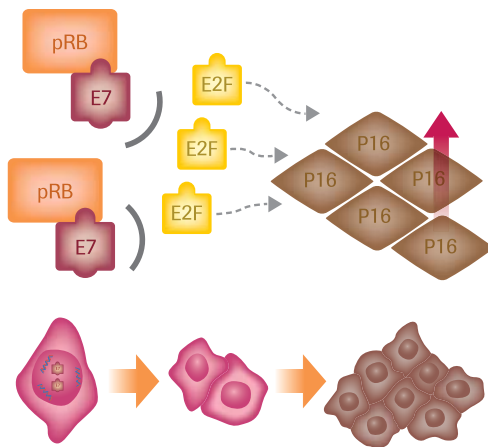
高リスク型HPV感染が持続した場合、基底細胞の形質転換を引き起こすことで、無制限の細胞周期が進行し、腫瘍化して浸潤能を獲得する。



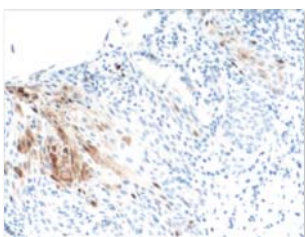
一過性の高リスク型HPV感染では細胞周期の調節に大きな影響はなく、正常な細胞周期が維持される。



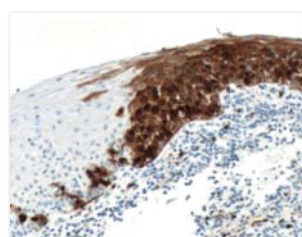
発癌性形質転換は、E7タンパクの発生と関連している。高リスク型HPV感染により形質転換した場合、pRBとE2Fの結合を妨げるE7タンパクが産生され、無秩序な細胞増殖、遺伝的不安定性およびp16タンパクの過剰発現を引き起こす。



Negativeパターン
全く染色性が認められない場合、p16タンパク過剰発現陰性とする。



Focalパターン
(限局性の染色像)
細胞単体または小さな細胞集塊として染色性を示した場合、すなわち非連続的な染色性はp16タンパク過剰発現陰性とする。



Diffuseパターン
(びまん性の染色像)
子宮頸部上皮の基底細胞層から傍基底細胞層へと連続した染色性を示した場合を、p16タンパク過剰発現陽性とする。

文 献

- 1 | Matsumoto K, Oki A, Furuta R et al. Predicting the progression of cervical precursor lesions by human papillomavirus genotyping: a prospective cohort study. *Int J Cancer* 2011;128:2898-2910.
- 2 | Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16INK4A immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005;29:674-679.
- 3 | Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D et al. Overexpression of p16 (INK4A) as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-284.
- 4 | Apgar BS, Kittendorf AL, Bettcher CM, Wong J, Kaufman AJ. Update on ASCCP consensus guidelines for abnormal cervical screening tests and cervical histology. *Am Fam Physician* 2009;80:147-155.
- 5 | Gatta LB, Berenzi A, Balzarini P et al. Diagnostic implications of L1, p16, and Ki-67 proteins and HPV DNA in low-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Int J Gynecol Pathol* 2011;30:597-604.
- 6 | Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *J Low Genit Tract Dis*;16:205-242.
- 7 | Wang SS, Trunk M, Schiffman M et al. Validation of p16INK4a as a marker of oncogenic human papillomavirus infection in cervical biopsies from a population-based cohort in Costa Rica. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2004;13:1355-1360.
- 8 | Wang JL, Zheng BY, Li XD, Angstrom T, Lindstrom MS, Wallin KL. Predictive significance of the alterations of p16INK4A, p14ARF, p53, and proliferating cell nuclear antigen expression in the progression of cervical cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10:2407-2414.
- 9 | Darragh TM, Colgan TJ, Cox JT et al. The Lower Anogenital Squamous Terminology Standardization Project for HPV-Associated Lesions: background and consensus recommendations from the College of American Pathologists and the American Society for Colposcopy and Cervical Pathology. *Arch Pathol Lab Med*;136:1266-1297.

