

卵巣粘液性腫瘍における Ovarian Cancer Immunoreactive Antigen (OCIA) 発現の
臨床病理学的意義

2013

筑波大学

永田 千草

筑波大学

博士(医学)学位論文

目次

1 背景と目的

2 材料と方法

3 結果

4 考察

5 結論

6 文献

7 謝辞

図表

図の目次

- 図 1 SEREX 法による OCIAD1 同定までの過程
- 図 2 OCIAD1、OCIAD2 の遺伝子配列
- 図 3 SOSui により予測される OCIAD2 の立体構造図
- 図 4 微小浸潤を示す肺腺癌における OCIAD2 の免疫染色
- 図 5 大腸癌における CEA の免疫染色
- 図 6 粘液性腺腫で明らかに腸型および内頸部型に分類できた腫瘍の例 (HE 染色像)
- 図 7 染色陽性の判定基準 (CEA 陽性例)
- 図 8 各悪性段階の粘液性腫瘍の組織学的所見 (HE 染色像)
- 図 9 各悪性段階の粘液性腫瘍の免疫組織学的所見 (OCIAD2)
- 図 10 各悪性段階の粘液性腫瘍の免疫組織学的所見 (OCIAD1)
- 図 11 各悪性段階の粘液性腫瘍の免疫組織学的所見 (CEA)
- 図 12 粘液性境界悪性腫瘍および粘液性腺癌における OCIAD2 の組織学的染色パターン
- 図 13 OCIAD2、OCIAD1 および CEA の各悪性度段階での染色陽性頻度
- 図 14 OCIAD2、OCIAD1 および CEA の免疫染色における FIGO ステージの分布
- 図 15 OCIAD2、OCIAD1 および CEA の腫瘍径別にみた染色性の分布

表の目次

表 1 卵巢腫瘍の組織学的分類

表 2 卵巢粘液性腫瘍 118 例の臨床病理学的情報

表 3 卵巢粘液性腫瘍における OC1AD2 の染色性

表 4 卵巢粘液性腫瘍における CEA の染色性

表 5 卵巢粘液性腫瘍における OC1AD1 の染色性

1 背景

1-1 卵巣癌(特に卵巣粘液性腫瘍)の臨床病理学的問題点

卵巣癌は未だに女性の死因の多くを占めている。その組織亜型は多彩で、表層上皮性・間質性腫瘍、性索間質性腫瘍、胚細胞腫瘍などに分類される。表層上皮系腫瘍の中でもさらなる亜分類がなされているが、漿液性腫瘍、粘液性腫瘍、類内膜性腫瘍、明細胞性腫瘍の4つがその主な亜型である(表1、P. 29)。それぞれの腫瘍では、細胞異型の程度や増殖の強さ、あるいは浸潤の有無等から悪性度が判定され、良性腫瘍である腺腫、悪性腫瘍である腺癌、その中間的な境界悪性腫瘍の3つにさらに分類される。境界悪性腫瘍は、卵巣の表層上皮性・間質性腫瘍に特有の分類であり、上皮細胞の多層化・腫瘍細胞集団の内腔への分離増殖・同一細胞型における良性と悪性の中間的な核分裂活性と核異型を有するものの、間質浸潤が欠如しているという組織学的特徴により定義されている(文献1、3-5)。

卵巣癌は一般的に、既存の表層上皮もしくは陥入嚢胞から *de novo* に発生するあるいは、良性腫瘍性病変である腺腫から境界悪性病変を経ての多段階発癌をきたすと考えられている。近年は各組織亜型ごとに、その発生母地が検討されており、組織型によって発癌の機構が異なることが提唱されてきた。例えば、明細胞腺癌と類内膜腺癌は子宮内膜症を基盤として発生することが知られており、異型内膜症を経ての発癌が示唆されている。一方で、漿液性腺癌は type I と type II に分類され、前者は K-ras, BRAF, PTEN など様々な遺伝子の突然変異によって、境界悪性あるいは高分化腺癌を発症するもの、後者は p53 の変異が関与し、急激な進行を示す低分化腺癌を発症するものとされている。つまり漿液性腺癌には遺伝的背景の異なるサブグループが存在することから、共通する境界悪性病変を有するという概念は否定的である。そして、卵巣の表層上皮性腫瘍のうち、もう一つの組織亜型である粘液性腫瘍においては、一つの腫瘍内に良性病変である

腺腫相当の部分から、境界悪性病変、微小浸潤癌および浸潤性増殖を示す癌を含むなど、一連の連続性病変をみていると判断できることも多いことから、多段階発癌説が広く受け入れられている(文献 6、7)。遺伝学的には、K-ras 変異の頻度に着目すると、卵巢の粘液性腺癌は粘液性腺腫から境界悪性腫瘍を経て進展すると考えられる(文献 8-11)。なお、卵巢粘液性腫瘍は細胞学的な特徴から、腸管の吸収上皮に類似性を示し杯細胞を有する腸上皮型(intestinal type)および、胞体内粘液により核が基底側に偏在し、子宮頸管腺に類似する円柱状の形態を示す内頸部型(endocervical type)に亜分類されるほか、癌においては浸潤部の形態から、腫瘍胞巣の辺縁が明瞭で拡大性の浸潤を示す、圧排性浸潤パターン(expansile growth)および、胞巣の崩れを伴い辺縁が不明瞭となった破壊性浸潤パターン(infiltrative growth)に分けられている。

現在、卵巢癌の診断には、腹部の診察や婦人科的診察などの身体所見、腫瘍マーカーなどの検査所見および、コンピュータ断層撮影(Computed Tomography, CT)や核磁気共鳴画像(Magnetic Resonance Imaging, MRI)などの画像所見などが用いられている(文献 1)。たとえば画像診断では、卵巢腫瘍全般における MRI での所見と組織像との関連について Pages らのレビューでは、漿液性腫瘍および粘液性腫瘍において、良性の場合 MRI では囊胞成分が主体で、囊胞内はタンパク質や粘液の存在により様々な濃度を示すとしている。これに対して境界悪性腫瘍は、造影効果のある疣贅により特徴づけられ、悪性腫瘍は厚く不規則な隔壁や大きな充実性増殖部により特徴づけられるとしている(文献 12)。さらに Stevens らが 60 例の付属器腫瘍について MRI 所見と病理組織診断とを検討した結果、腫瘍径が 4 cm 以上・充実性腫瘍あるいは充実成分を主体とする腫瘍・3 mm 以上の厚い壁を有する腫瘍・隔壁が 3 mm 以上の厚さまたは疣贅や結節を伴う腫瘍・壊死の存在という 5 つの基準を満たす場合、高頻度に悪性と正確な診断ができることを述べている(文献 13)。また Bent らは、26 患者で延べ 31 例の卵巢境界悪性腫瘍について MRI における画像的な特徴を検討している。その結果、囊胞状腫瘍においては、隔壁が多く、プラーク様の肥厚を示すものがもっとも多くみられ、このような場合に境界悪性と悪性を鑑

別するには、腹水貯留や大網・腹膜病変の有無、対側卵巣への病変波及の有無などに加え、臨床的に患者の年齢や腫瘍マーカーなども加えての検討が必要であると結論づけている(文献 14)。また、前述の文献 14 での検討の際にも、MRI 所見での悪性を示唆する指標として用いられているが、Bazot らが 136 例の卵巣腫瘍について、MRI 所見と術中迅速診断および、最終病理診断との比較を行った結果では、両側での腫瘍・4 cm 以上の腫瘍サイズ・充実性成分を主体とする腫瘍・嚢胞状腫瘍における疣贅・造影される腫瘍の 5 項目が悪性を示唆する指標として結論づけられている(文献 15)。粘液性腫瘍に限ってみると、例えば Okamoto らは 67 例の粘液性嚢胞性腫瘍の MRI 画像について、腫瘍の最大径および嚢胞の数、充実性増殖部の有無を検討し、境界悪性以上の腫瘍では、腫瘍の最大径・嚢胞の数・嚢胞の数/腫瘍の最大径が、腺腫と比較して有意に増加していることを示した(文献 16)。しかしながら、典型的な画像所見を示す腫瘍ばかりではなく、良性腫瘍でも巨大なサイズのものや、隔壁肥厚を伴うものもみられることがあり、完全に正確な診断は未だに困難である。

画像診断以外に、卵巣腫瘍の良悪性の判定には、新鮮凍結標本による術中迅速診断も多く用いられている。しかし、ホルマリン固定後の永久標本での診断とには乖離がある場合もあり、術中に良悪の判定を行うことは問題が多くみられるため、術前に悪性を示す所見を見い出すことは重要とえられる。例えば、Kim らによると診断の不一致による患者の予後への影響は明らかでなかったとされているものの、境界悪性腫瘍の新鮮凍結標本による正診率は 60%であった。診断の不一致を生ずる原因としては、粘液性腫瘍および境界悪性腫瘍における under-diagnosis が主体といわれている(文献 17)。また、Ilvan らによる検討では、境界悪性腫瘍の新鮮凍結標本における正診率は 87%と高かったが、診断の不一致がみられた症例はすべて悪性を境界悪性と判定する、または境界悪性を良性と判定するなどの偽陰性であり、特に粘液性腫瘍と境界悪性腫瘍において診断上の問題が多くみられたとされている。この原因としては、卵巣粘液性腫瘍は良性から境界悪性、悪性までの様々な組織型を構成要素としており、迅速診断時の標本採取部位に

よるサンプリングエラーが起こりやすいことが挙げられている。これに対しては、肉眼所見の詳細な観察や、捺印細胞診・穿刺吸引細胞診など他の診断的手法との組み合わせが効果的であろうことが指摘されている(文献 18)。さらに Houck らの報告では、境界悪性腫瘍における迅速標本と永久標本での診断の一致率は 60%であり、不一致の内訳としては over-diagnosis が 10.7%、under-diagnosis が 29.3%であった。Under-diagnosis となるのは、漿液性以外の組織型・腫瘍径が 20 cm 以上・卵巣に局限した腫瘍において起こりやすいとされている(文献 19)。術前の MRI による画像診断との関連については、Bazot によると画像上充実性成分の存在は悪性の指標とされているものの、良性腫瘍と境界悪性腫瘍の区別には有用でなかったとされている。また、良性腫瘍である腺線維腫や卵巣甲状腺腫などでは造影効果のある充実性成分を有し、画像上は悪性と判定されやすく疑陽性となる可能性が示唆された(文献 15)。

卵巣の粘液性腫瘍は、欧米での頻度は少ないものの、日本を含むアジア人では比較的多くみられる組織亜型である。また、腹腔内に大量の粘液貯留を示し、腹膜偽粘液腫とよばれる致死的な病態において、特に欧米ではその原発巣は虫垂腫瘍が殆どとされるが、わが国においては虫垂に腫瘍が明らかでなく、卵巣が原発巣と考えられるものも含まれている。腹膜偽粘液腫とは、腹腔内に広範囲にゼラチン様物質が貯留し、原発巣の組織型が癌でなくても、臨床的に悪性の経過をたどるもので、臨床的には、食思不振や悪心嘔吐、腹部膨満などの症状で発症し、腫瘍性の貯留物が腹腔内を圧迫することで腸閉塞や腸管麻痺、腸管皮膚瘻の形成や悪液質により死の転帰をとることが多いことから、近年では低悪性度の癌性腹膜炎の一種と考えられている。組織学的には、原発巣は良性から悪性まで幅広いスペクトルを示し、主には粘液腺腫から粘液性境界悪性腫瘍に分類される。原発巣は虫垂や卵巣が大部分とされるが、原発巣を同定できない場合もある。治療としては、外科的切除が行われることが多いものの、確立された有効な治療法は未だにない(文献 2、20、21)。

1-2 Ovarian Cancer Immunoreactive Antigen(OCIA)

一方、我々の研究室(筑波大学医学医療系 診断病理学)では、肺の腺癌のうち非浸潤癌と早期浸潤癌での発現遺伝子の差異に注目し、これを網羅的に比較してきた。そしてその中から、非浸潤癌に比較して早期浸潤癌において有意に高発現している遺伝子の一つとして、Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 2(OCIAD2)を見い出した(文献 22)。免疫組織学的な検討では、OCIAD2 は、多くの早期浸潤肺癌において発現が確認でき、正常肺組織では全く発現がみられなかった。一方で、Luo らは、卵巣癌の腫瘍細胞が発現する cDNA ライブラリをファージに導入し、ファージコロニーからなるプラークをニトロセルロース膜に転写して、これを卵巣癌患者から採取した腹水でスクリーニングし、二次抗体での発色反応が得られた陽性クローンをピックアップすることで、卵巣癌患者の腹水中に存在する自己抗体である Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1(OCIAD1)を見い出した(文献 23、図 1)。OCIAD1 と OCIAD2 とは、Blast での検索によると 41%と高い相同性を有している(図 2、P. 35)。OCIAD1 に関しては、Sengupta らの報告によると、転移巣を有する進行卵巣癌の患者において、原発巣に比べて転移先の組織で OCIAD1 がより高発現しており、癌細胞の接着や遊走に影響を及ぼし、転移巣の形成に関与していることが指摘されている(文献 24)。また、Wang らによると OCIAD1 の発現は 18:1 リソフォスファチジル酸(LPA)の存在下で時間および量に依存して増加しており、OCIAD1 の高発現が化学療法への感受性に影響を及ぼしているとされ、OCIAD1 の阻害が再発をきたした卵巣癌での治療戦略となる可能性が示されている(文献 25)。その一方で、OCIAD2 は、SOSui によるタンパク質の 2 次構造予測によると、2 回膜貫通タンパクとされ(図 3、P. 36)、OCIAD1 と同様に癌特異的抗原であると考えられるが、OCIAD2 の機能に関する研究成果は未だに発表されていない。

1-3 本研究の目的

OC1AD2 はもともと卵巣癌特異抗原として単離された OC1AD1 と相同性を有する遺伝子なので、我々は OC1AD2 の発現は肺の腺癌と同様に、卵巣癌の悪性度の判定に有用なマーカーなのではないかと考えた。

本研究では、卵巣の粘液性腫瘍における OC1AD2 の発現を確認し、その悪性度分類や生物学的な振る舞いとの関連がみられるかについて、OC1AD1 や既によく知られた腫瘍マーカーである CEA とも比較し、OC1AD2 の卵巣粘液性腫瘍に対するバイオマーカーとしての意義を明らかにすることを目的に研究を行った。

2 材料と方法

2-1 材料

はじめに、粘液性境界悪性腫瘍 40 例(うち腸型 30 例、内頸部型 10 例)および、粘液性腺癌 34 例(うち破壊性浸潤 8 例、圧排性浸潤 26 例)を準備した。つぎにこれと同時期に切除された 842 例の粘液性腺腫(良性病変)の中から、年齢の分布が境界悪性・腺癌と同様になるように 43 例を準備した。一般的に、良性病変である粘液性腺腫については、腸型および内頸部型に亜分類することはさほどなく、必ずしもこのいずれかに分類できない、分類不能なものも多いとされているが、境界悪性腫瘍との比較のために分類してみたところ、明らかに腸型と考えられるものが 7 例、明らかに内頸部型と考えられるものは 9 例、分類困難なものが 27 例であった(図 6、P. 39)。材料に用いた全ての腫瘍は、1996 年から 2009 年に筑波大学附属病院で手術的に切除された症例および 2004 年から 2009 年に国立病院機構霞ヶ浦医療センターで手術的に切除された症例であり、すべての患者から材料使用に関する包括同意を得ている。また筑波大学附属病院および国立病院機構霞ヶ浦医療センターの両方の研究倫理審査委員会で承認を得た。組織はホルマリン固定後、パラフィン包埋され、HE 染色および免疫染色を行った。はじめに、婦人科病理医を含む 4 名の病理医がそれぞれ全症例の HE 染色標本を鏡検し、組織診断について確認した(図 7、P. 40)。診断に際しては 2003 年発行の WHO 分類における婦人科腫瘍の項に従った(文献 26-28)。粘液性境界悪性腫瘍の診断に関しては、おもに乳頭状増殖部および上皮の異型に着目し、明らかな間質浸潤を示さないものを選ぶことで、粘液性腺腫および粘液性腺癌との鑑別を行った(文献 29-32)。よって、境界悪性腫瘍と診断されたものは全てが古典的(典型的)な境界悪性腫瘍であり、微小浸潤を伴うものや上皮内癌を並存するものは当研からは除いた。粘液性境界悪性腫瘍と診断されたうちの 1 例は、腹膜偽粘液腫を呈していたが、虫垂に腫大や腫瘍性病変は明らかでなく、卵巣が原発と考え

られた。そこから各症例について、最も特徴的な組織ブロックを1個ずつ選定し、研究に用いた。患者の臨床情報については匿名化したうえで、年齢・左右の別・腫瘍の最大径・FIGO ステージなどの情報を収集した(表 2、P. 30)。

2-2 OClAD2 抗体の作成

OClAD2 ポリクローナル抗体の作成は、タカラバイオ株式会社(滋賀県大津市)に委託して行った。OClAD2 タンパクの細胞外ドメインである、C 末端側の 15 アミノ酸配列(CKIKHGLSEKGSQP)に対応する合成ペプチドを作成し、これを抗原としてウサギに免疫したうえで、抗体価を測定した後、全血清を採血した。これを、合成ペプチドを Sepharose に固定化して作成したペプチドカラムに通してダイレクト精製した。こうして得られたポリクローナル抗体を用いて、以下の免疫染色を行った。

2-3 免疫染色

各切片は脱パラフィン後、クエン酸バッファーを用いて 121℃、10 分間の加熱処理にて抗原の賦化を行ったのち、1000 倍希釈したウサギポリクローナル抗 OClAD2 抗体(タカラバイオ)にて免疫染色を行った。同じ切片を用いて、抗原賦活化は行わずに、200 倍希釈したマウスモノクローナル抗 CEA 抗体(CEM010、タカラバイオ)での免疫染色および、TE バッファーを用いて 105℃、15 分間の加熱処理にて抗原賦活化を行ったのち、400 倍希釈したウサギポリクローナル抗 OClAD1 抗体(プロテインテックグループ)での免疫染色も行った。これらの免疫染色には、ヒストステイナー36A(ニチレイ)を使用した。

2-4 染色性の評価

OClAD2 の染色性を評価するにあたり、in situ hybridization 法で OClAD2 の mRNA が

高発現を示した肺腺癌の1症例を陽性コントロールとして用いた。また染色性としては胞体内に顆粒状の染色性が得られたものを染色陽性と判定した(図4、P. 37)。OC1AD1の染色性に関しても、OC1AD2と同様に胞体内の顆粒状陽性像を染色陽性と判定した。CEAの染色性評価には、血清中のCEAが高値を示していた大腸癌の症例を陽性コントロールとし、極性を有する腺腔側の陽性像ではなく、極性を失った胞体内でのびまん性陽性像を染色陽性と判定した(図5、P. 38)。CEAの免疫染色において、良性病変である粘液性腺腫の全てが、組織切片上の面積で、全体の30%未満にのみ陽性像を示していたため、全体の30%以上の領域で陽性像を示すものを染色陽性と定義した(図7、P. 40)。一方で、陽性症例に関しては、染色強度に大きな差はなく、比較的容易に染色陽性の判定が可能であったため、染色強度は評価項目に加えなかった。

OC1AD2、OC1AD1 および CEA の染色性と腫瘍の悪性度との相関を統計学的に判定するため、 χ^2 検定を行った。OC1AD2、OC1AD1 および CEA の染色性間に相関があるかについて統計学的に判定するため、スピアマンの順位相関係数を用いた。

3 結果

3-1 腺腫での免疫染色

卵巣粘液性腺腫において、OC1AD2 は 43 例中 6 例と僅かに 14%の腫瘍において陽性所見がみられた(図 9(P. 42), 表 3(P. 31))。これに対し OC1AD1 は 43 例中 21 例と 49%の腫瘍において比較的高頻度に陽性所見がみられた(図 10(P. 43), 表 4(P. 32))。CEA では、43 例のいずれでも陽性所見はみられなかった(図 11(P. 44), 表 5(P. 33))。OC1AD2, OC1AD1 の陽性症例における染色性としては、いずれも胞体内粘液を避けるようにして、顆粒状の陽性像を認めた。腫瘍細胞以外には、OC1AD2 では嚢胞内に分泌された粘液および刷子縁の粘液にも染色性がみられ、時折腫瘍細胞の核に一致した染色性も認められた。OC1AD1 においても、刷子縁の粘液への染色性が同様に確認できた。これらの所見は、陽性コントロールとした肺腺癌での染色ではみられなかったものであり、胞体内での顆粒状陽性のみを陽性と判定した。また、OC1AD1 では OC1AD2 とは異なり、腫瘍間質の細胞への陽性所見が認められた。CEA では、腫瘍細胞での陽性所見は認められなかったが、嚢胞内に分泌された粘液や刷子縁の粘液に染色性がみられた。これらは大腸などの正常粘膜においてもみられる染色性であり、腫瘍性病変に特異的な所見ではないため陰性と判定した。

3-2 境界悪性腫瘍での免疫染色

卵巣粘液性境界悪性腫瘍において、OC1AD2 は 40 例中 25 例と 63%(うち腸型の腫瘍では 10 例中 8 例と 80%)の腫瘍で陽性所見がみられた(図 9(P. 42), 表 3(P. 31))。OC1AD1 においても、40 例中 26 例(うち腸型の腫瘍では 10 例中 9 例と 90%)と殆ど同じ割合で陽性所見がみられた(図 10(P. 43), 表 4(P. 32))。CEA においては、40 例中 10 例(うち腸型

の腫瘍では 10 例中 5 例と 50%) で陽性所見がみられ、OC1AD ファミリーに比して陽性率は低かった(図 11(P. 44), 表 5(P. 33))。腫瘍細胞以外には、OC1AD2 では嚢胞内に分泌された粘液および刷子縁の粘液にも染色性を示し、その他腫瘍細胞の核に一致した染色性もみられた。OC1AD1 では、腺腫の場合と同様に、腫瘍間質の細胞における陽性所見が認められた。8 例の腫瘍では、粘液性上皮には OC1AD1 陰性であったが腫瘍間質のみで OC1AD1 陽性を示していた。CEA では、嚢胞内に分泌された粘液や刷子縁の粘液にも強い染色性がみられ、腫瘍細胞の核への陽性像や腫瘍間質での陽性像も確認された。このため、染色性の確認は困難であったが、腫瘍胞体内でのびまん性陽性像を陽性と判定した。OC1AD2 の染色性で特徴的であったのは、腫瘍細胞が乳頭状増殖を示す領域において、上皮の平坦な部分に比べて強い陽性像が認められたことである(図 12、P. 45)。

3-3 粘液性腺癌での免疫染色

卵巣粘液性腺癌において、OC1AD2 は 34 例中 26 例(うち 6 例は破壊性浸潤、20 例は圧排性浸潤)と 74%の腫瘍に陽性所見がみられた(図 9(P. 42), 表 3(P. 31))。OC1AD1 では、34 例中 30 例(うち 7 例が破壊性浸潤、23 例が圧排性浸潤)と 86%の腫瘍に陽性所見がみられた(図 10(P. 43), 表 4(P. 32))。CEA では、34 例中 25 例(うち 5 例が破壊性浸潤、20 例が圧排性浸潤)と 71%の腫瘍に陽性所見がみられた(図 11(P. 44), 表 5(P. 33))。腫瘍細胞以外には、OC1AD2 では境界悪性腫瘍のときと同様に、嚢胞内に分泌された粘液および刷子縁の粘液にも染色性を示し、その他腫瘍細胞の核に一致した染色性もみられた。OC1AD1 では、腺腫や境界悪性でのときと同様に、腫瘍間質の細胞への染色性が認められた。CEA では、嚢胞内に分泌された粘液や刷子縁の粘液にも強い染色性がみられ、腫瘍細胞の核への陽性像や腫瘍間質での陽性像も確認されたが、腫瘍胞体内でのびまん性陽性像を陽性と判定した。OC1AD2 の染色性で特徴的であったのは、間質浸潤を示す部位において、上皮の平坦な部分に比べて強い陽性像が認められたことである(図 12、P. 45)。

OC1AD1 の染色性は OC1AD2 と類似しており、刷子縁の粘液も陽性を示した。しかしながら、嚢胞内に分泌された粘液および核への陽性所見は明らかでなかった。

3-4 腹膜偽粘液腫を呈していた境界悪性腫瘍について

今回の組織標本には、腹膜偽粘液腫を呈していた境界悪性腫瘍が 1 例含まれていた。腹膜偽粘液腫の多くは、虫垂原発であるとの議論もあるが、この症例に関しては、虫垂に腫大や腫瘍性病変は認められず、卵巣病変から腹膜偽粘液腫をきたしたものと考えられる。当症例については、OC1AD2 陽性であったが OC1AD1 および CEA には陰性であった。

3-5 統計学的解析

OC1AD2 に陽性を示す腫瘍の割合は、腫瘍の悪性度が増すにつれて増加し、粘液性腺癌では 70%以上の腫瘍が陽性を示した。この傾向は OC1AD1, CEA についても同様で、粘液性腺癌の 70%以上が陽性を示していた。OC1AD2, OC1AD1 および CEA の発現は、腫瘍の悪性度が増すにつれて統計学的有意差を持って増加していた(表 3-5、いずれも $p < 0.01$)。また、各免疫染色での染色性には相関がみられた(OC1AD2 と OC1AD2 では $R=0.349$ 、OC1AD2 と CEA では $R=0.338$ 、OC1AD1 と CEA では $R=0.279$)。腺腫においては OC1AD2 に 6 例(14%)、OC1AD1 に 21 例(49%)、CEA に 0 例(0%)が陽性を示したのに対して、境界悪性以上の腫瘍ではそれぞれ、OC1AD2 に 51 例(68%)、OC1AD1 に 56 例(75%)、CEA に 35 例(47%)が陽性を示した。

それぞれのバイオマーカーの陽性率の推移を図 13(P. 46)に示した。いずれのバイオマーカーも前述したように悪性度が増すに従ってその陽性率は上昇したが、OC1AD1 は良性から悪性のいずれの状態でも他の 2 つのバイオマーカーに比べて高い陽性率を示した。これに対し、CEA は特に悪性の陽性率が高い傾向にあった。一方、OC1AD2 は良性では陽

性頻度は低いものの、境界悪性を境にしてその陽性率が上昇する特徴があった。

それぞれのバイオマーカーの染色態度と FIGO の stage との関係 (図 14、P. 47)、腫瘍径との関係 (図 15、P. 48) をグラフで示した。統計学的な有意差はみられないが、OC1AD2 のみが stage III, IV で他のバイオマーカーより陽性頻度が高い傾向にあった。また腫瘍径については 10cm 以下の腫瘍で CEA の陽性頻度が低い傾向にあった。

4 考察

OC1AD (ovarian cancer immunoreactive domain) ファミリーは OC1AD1 と OC1AD2 からなる。2001 年に Luo らは卵巣癌患者の腹水を用いて、卵巣癌で発現している cDNA ライブラリをスクリーニングし、自己抗体が産生されている癌特異的抗原として OC1AD1 を見出した(図 1、文献 23)。つまり、OC1AD1 は癌特異的蛋白ということができ、癌を検出・診断する手段として有用であると考えられる。事実、この数年で OC1AD1 の発現が癌細胞の接着や遊走に影響を及ぼすことで、卵巣癌の転移巣の形成に関与していると言う報告や、進行性卵巣癌における化学療法の感受性に影響を及ぼしているという報告がなされている(文献 24、25)。一方で、OC1AD2 については 2001 年に Strausberg らによって初めて報告された。OC1AD2 は OC1AD1 と高い相同性を有しているが、現在までに癌との関連や自己抗体としての役割についての報告はみられていない。当研究室(筑波大学医学医療系 診断病理学)の石山らは、小型肺腺癌を用いた suppression subtractive hybridization (SSH) 法によって、OC1AD2 が上皮内肺腺癌に比較して初期浸潤肺腺癌に高発現していることを見出した(文献 22)。この報告は OC1AD2 が腫瘍細胞に特徴的に発現していることを示した初めての報告である。そこで当研究では、OC1AD2 が OC1AD1 と高い相同性を有することから、OC1AD2 も卵巣癌で特徴的な発現を示すのではないかと考え、卵巣腫瘍とくに画像診断や組織学的な診断が困難で有用なバイオマーカーに乏しい粘液性腫瘍における新規バイオマーカーの候補として、OC1AD2 を利用できないかと考えた。

OC1AD ファミリーと他のバイオマーカーとの関連を検索するため、OC1AD2, OC1AD1 および CEA の発現を免疫組織学的に検討した。OC1AD2 は卵巣粘液性癌の 74%および粘液性境界悪性腫瘍の 63%(悪性性質を有する卵巣粘液性腫瘍の 69%)に陽性を示したが、良性病変である粘液性腺腫においては 14%のみが陽性であった。OC1AD2 は腫瘍細胞の胞体に顆粒状の陽性像を示したが、平坦な上皮に比べて乳頭状増殖を示す部位や間質浸潤を伴う

部位での強い陽性像が目立ち、OC1AD2 の発現が腫瘍の悪性度と関連していることが示唆された。境界悪性粘液性腫瘍に着目すると、OC1AD2, OC1AD1, CEA のいずれにおいても、腸型形質を示す腫瘍での陽性が、内頸部腺型に比べて多くみられる傾向を示した。ただし、内頸部腺型の腫瘍細胞は腸型に比べて、胞体内に粘液を多く有していることが多く、陽性の判定が難しく、両者における違いは少ない可能性もある。これに対して癌においては、圧排性浸潤と破壊性浸潤での、各蛋白の発現頻度に違いはみられなかった。

OC1AD1 と CEA の染色性は OC1AD2 に類似していたが、いくつかの違いも認められた。OC1AD1 は卵巣粘液性癌の 86%および粘液性境界悪性腫瘍の 65%(悪性形質を有する卵巣粘液性腫瘍 75%)に陽性を示していたが、良性病変である粘液性腺腫でも、49%が陽性を示した。つまり、OC1AD1 は卵巣粘液性腫瘍の悪性化のごく初期においても、発現増加がみられると考えられる。また、非特異的反応の可能性もあるものの、OC1AD1 では OC1AD2 とは異なり間質細胞に陽性反応が認められた。これらの結果からは OC1AD2 は OC1AD1 に比べて、卵巣粘液性腫瘍により特異的であり、その悪性度により大きく関わっているマーカーであるといえる。

CEA は卵巣粘液性癌の 71%および粘液性境界悪性腫瘍の 25%(悪性形質を有する卵巣粘液性腫瘍の 47%)に陽性を示していた。CEA は卵巣粘液性腫瘍の悪性度診断において、もっとも特異度が高いといえ、卵巣腫瘍の診断に際して非常に有用なバイオマーカーであることが分かる。CEA の陽性率は、境界悪性腫瘍から癌へといたる段階で主に増しており、CEA は OC1AD2 に比べて、より悪性へと進行した段階の粘液性腫瘍と関連している可能性が示唆された。

OC1AD2 の染色性は OC1AD1 に比べて腫瘍特異的であり、かつ良性病変である腺腫における陽性率は低い傾向にある。また CEA の染色性に比べると、境界悪性腫瘍や腺腫における陽性率が高い傾向にある(図 13、P. 46)。以上を考察すると、OC1AD2 は CEA に比して悪性度の低い、しかし悪性化の可能性のある腫瘍を選択できている可能性が示唆された。

OCIAD2 は、SOSui によるタンパク質の 2 次構造予測によると 2 回膜貫通タンパクとされ、腫瘍細胞の膜に局在しているものと考えられる (図 3、P. 36)。しかし免疫組織学的には、腫瘍細胞の膜での陽性像は認められず、胞体内への陽性を示していた。この理由は明らかではないが、膜に分泌される前の胞体内に存在する OCIAD2 を検出しているもしくは、何らかの分泌障害を伴っている可能性が考えられる。

今後、検出系を検討した上で、腹水中や血中に分泌された OCIAD2 を検出できれば、卵巣粘液性腫瘍における新たなバイオマーカーとして利用することも考えられる。また、正常ではほとんど発現が見られない OCIAD2 産生蛋白の機能的意義についても解析していく必要がある。

5 結論

当研究では、種々の悪性度を示す卵巣粘液性腫瘍において、腫瘍特異抗原である OC1AD2 の発現について免疫組織学的に検討した。OC1AD2 は OC1AD1 に比して悪性度の高い卵巣腫瘍における特異度が高く、CEA よりも感度が高いことが明らかとなった(文献 33)。OC1AD2 は、卵巣粘液性腫瘍の悪性度を判定する上で、免疫組織学的なマーカーとして有用であると考えられる。OC1AD2 は肺癌など他の悪性腫瘍と同様に、卵巣粘液性悪性腫瘍においても高発現している膜蛋白であるが、その機能については未知の部分も多い。OC1AD2 は腫瘍特異抗原であり、正常細胞には発現していないことから、更なる研究を進めることで、癌の検出や治療への応用が可能となる重要な遺伝子であると考えられる。

6 文献

1. 青木 陽一 婦人科疾患の診断・治療・管理 腫瘍と類腫瘍 日本産科婦人科学会雑誌 2009 年 5 月 61 巻 5 号 165-177 頁
2. 湯澤 映ほか 腹膜偽粘液腫の一例 青森臨床産婦人科医会誌 2002 年 第 17 巻 56-60 頁
3. Hart R William. Borderline epithelial tumors of the ovary. Mod Pathol. 2005; 18: 33-50.
4. Tamakoshi K, Kikkawa F, Nakashima N et al. Clinical behavior of borderline ovarian tumors: a study of 150 cases. J Surg Oncol 1997; 64:147-152.
5. Hart RW, Norris HJ. Borderline and malignant mucinous tumors of the ovary: histologic criteria and clinical behavior. Cancer 1973; 31: 1031-1045.
6. Feeley KM, Wells M. Precursor lesions of ovarian epithelial malignancy. Histopathol. 2001;38:87-95.
7. Shih IeM, Kurman RJ. Ovarian Tumorigenesis: A Proposed Model Based on Morphological and Molecular Genetic Analysis. Am J Pathol. 2004;164(5):1511-1518.
8. Kurman RJ, Shih IeM. Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer-shifting the paradigm. Hum Pathol. 2011;42(7):918-931.
9. Auner V, Kriegshäuser G, Tong D et al. KRAS mutation analysis in ovarian samples using a high sensitivity biochip assay. BMC Cancer. 2009;9:111.
10. Kurman RJ, Visvanathan K, Roden R et al. Early detection and treatment of ovarian cancer: shifting from early stage to minimal volume of disease based on a new model of carcinogenesis. Am J Obstet Gynecol. 2008;198(4):351-356.
11. Kurman RJ, Shih IeM. Pathogenesis of Ovarian Cancer. Lessons from Morphology and Molecular Biology and their Clinical Implications. Int J Gynecol Pathol. 2008;27(2):151-160.

12. Pages EB, Perrochia H, Merigeaud S et al. MR Imaging of primary ovarian tumors with pathologic correlation. J Radiol 2009; 90: 787-802.
13. Stevens SK, Hricak H, Stern JL. Ovarian lesions: detection and characterization with gadolinium enhanced MR imaging at 1.5 T. Radiology 1991; 181(2): 481-188.
14. Bent CL, Sahdev A, Rockall AG et al. MRI appearance of borderline ovarian tumors. Clinical Radiology 2009; 64: 430-438.
15. Bazot M, Slaba JN, Naggara IT et al. MR imaging compared with intraoperative frozen-section examination for the diagnosis of adnexal tumors: correlation with final histology Eur Radiol 2006; 16: 2687-2699.
16. Okamoto Y, Tanaka YO, Tsunoda H et al. Malignant or borderline mucinous cystic neoplasms have a larger number of loculi than mucinous cystadenoma: a retrospective study with MR. J Magn Reson Imaging 2007; 26: 94-99.
17. Kim K, Chung HH, Kim JW et al. Clinical impact of under-diagnosis by frozen section examination is minimal in borderline ovarian tumors. EJSO 2009; 35: 969-973.
18. Ilvan S, Ramazanoglu R, Akyildiz EU et al. The accuracy of frozen section(intraoperative consultation) in the diagnosis of ovarian masses. Gynecologic Oncology 2005; 97: 395-399.
19. Houck K, Nikrui N, Duska L et al. Borderline tumors of the ovary: correlation of frozen and permanent histologic diagnosis. Obstetrics and Gynecology 2000; 95: 839-843.
20. Jivan S, Bahal V. Psudomxoma peritonei. Postgrad Med J 2002; 78: 170-172.
21. Gough B David, Donohue H John, Schutt J Alan et al. Pseudomyxoma peritonei: Long-term patient survival with an aggressive regional approach. Annals Of Surgery 1994; 219(2): 112-119.
22. Ishiyama T, Kano J, Anami Y et al. OCIA domain containing 2 is highly expressed in adenocarcinoma mixed subtype with bronchioloalveolar carcinoma component and is

associated with better prognosis. *Cancer Sci* 2007; 98: 50-57.

23. Luo LY, Soosaipillai A, Diamandis EP. Molecular cloning of a novel human gene on chromosome 4p11 by immunoscreening of an ovarian carcinoma cDNA library. *Biochem Biophys Res Commun* 2001; 280: 401-406.

24. Sengupta S, Michener CM, Escobar P et al. Ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1(OCIAD1), a key player in ovarian cancer cell adhesion. *Gynecologic Oncology* 2008; 109: 226-233.

25. Wang C, Michener CM, Belinson JL et al. Role of the 18: 1 lysophosphatidic acid-ovarian cancer immuno-reactive antigen domain containing 1(OCIAD1)-integrin axis in generating late-stage ovarian cancer. *Mol Cancer Ther* 2010; 9(6): 1709-1718.

26. Tavassoli FA, Devilee P, editors. World Health Organization: Tumours of the Breast and Female Genital Organs (WHO/IARC Classification of Tumours). IARC Press: Lyon; 2003.

27. Cho KR, Shih IeM. Ovarian cancer. *Annu Rev Pathol.* 2009;4:287-313.

28. Kaku T, Ogawa S, Kawano Y et al. Histological classification of ovarian cancer. *Med Electron Microsc.* 2003;36(1):9-17.

29. Koskas M, Uzan C, Gouy S et al. Prognostic factors of a large retrospective series of mucinous borderline tumors of the ovary (excluding peritoneal pseudomyxoma). *Ann Surg Oncol.* 2011;18(1):40-48.

30. McCluggage WG. The pathology of and controversial aspects of ovarian borderline tumors. *Curr Opin Oncol.* 2010;22(5):462-472.

31. Chen S, Leita MM, Tornos C et al. Invasion patterns in stage I endometrioid and mucinous ovarian carcinomas: a clinicopathologic analysis emphasizing favorable outcomes in carcinomas without destructive stromal invasion and the occasional malignant course of carcinomas with limited destructive stromal invasion. *Mod Pathol.*

2005;18(7):903-911.

32. Nomura K, Aizawa S. Noninvasive, microinvasive, and invasive mucinous carcinomas of the ovary: a clinicopathologic analysis of 40 cases. *Cancer*. 2000;89(7):1541-1546.

33. Nagata C, Hiromi K, Akiko S et al. Increased expression of OCIA domain containing 2 during stepwise progression of ovarian mucinous tumor. *Pathol Int* 2012;62(7):471-476.

7 謝辞

本研究を進めるにあたり、常に熱心かつ丁寧なご指導を賜りました、筑波大学医学医療系 野口雅之教授に厚く御礼申し上げます。また研究に関して多大なるご助言、ご指導を頂きました筑波大学診断病理学研究室の皆様、心より感謝いたします。検体採取や標本借用において、快くご協力いただきました、国立病院機構霞ヶ浦医療センター産婦人科 新井ゆう子先生および西田正人先生に、心から感謝申し上げます。本研究に際して、特に技術的な面において、多くのご理解、ご協力を頂きました筑波大学病院病理部 古屋周一郎氏をはじめ、病院病理部職員の皆様方に深く御礼申し上げます。

表 1 卵巣腫瘍の組織学的分類

	良性腫瘍	境界悪性腫瘍	悪性腫瘍
I. 表層上皮性・ 間質性腫瘍	漿液性嚢胞腺腫	漿液性嚢胞性腫瘍、境界悪性	漿液性(嚢胞)腺癌
	粘液性嚢胞腺腫	粘液性嚢胞性腫瘍、境界悪性	粘液性(嚢胞)腺癌
	類内膜腺腫	類内膜腫瘍、境界悪性	類内膜腺癌
	明細胞腺腫	明細胞腫瘍、境界悪性	明細胞腺癌
	腺線維腫 表在性乳頭腫	腺線維腫 表在性乳頭状腫瘍、境界悪性	腺癌線維腫 癌肉腫 中胚葉性混合腫瘍 (癌肉腫)
	ブレンナー腫瘍	ブレンナー腫瘍、境界悪性	悪性ブレンナー腫瘍
			移行上皮癌 未分化癌
II. 性索間質性腫瘍	莢膜細胞腫 線維腫 硬化性間質性腫瘍 セルトリ・間質細胞腫瘍 (高分化型) ライディック細胞腫 [門細胞腫] 輪状細管を伴う性索腫瘍	顆粒膜細胞腫 セルトリ・間質細胞腫瘍 (中分化型) ステロイド[脂質]細胞腫瘍 (分類不能型) ギナンドロプラストーマ	線維肉腫 セルトリ・間質細胞腫 (低分化型)
III. 胚細胞腫瘍	成熟嚢胞性奇形腫 [皮様嚢胞腫] 成熟充実性奇形腫 卵巣甲状腺腫瘍	未熟奇形腫(G1,G2) カルチノイド 甲状腺腫性カルチノイド	未分化胚細胞腫 卵黄嚢腫瘍 胎芽性癌 多胎芽腫 絨毛癌 悪性転化を伴う 成熟奇形腫 未熟奇形腫(G3)
IV. その他	非特異的軟部腫瘍 腺腫様腫瘍	性腺芽腫(純粋型)	癌腫 肉腫 悪性リンパ腫(原発性) 二次性(転移性)腫瘍

(文献 1 より引用)

表 2 卵巣粘液性腫瘍 117 例の臨床病理学的情報

	粘液性腺腫(良性)	粘液性境界悪性腫瘍	粘液性腺癌(悪性)
患者年齢	18-76(平均 45.7)	17-90(平均 49.6)	22-77(平均 54.8)
病側卵巣			
右	20	14	14
左	23	24	20
不明	0	2	0
腫瘍の最大径(cm)	1.5-28(平均 10.5)	4-40(平均 13.6)	5-26(平均 14)
FIGO 病期		Ia 34 Ic 1 IIb 1 IIIc 2 IIb 1 IV 1	Ia 15 Ib 1 Ic 8 IIa 1 IIb 2 IIc 1 IIIa 1 IIIc 5
経過観察期間(月)	1-108	7-156	1-144
患者の予後			
無病生存	43	38	26
死亡	0	1	5
不明	0	1	3

表 3 卵巣粘液性腫瘍における OCIAD2 の染色性

	粘液性腺腫	粘液性境界悪性腫瘍	粘液性腺癌	合計
陽性	6 (14%)	25 (63%)	26 (74%)	57
陰性	37 (86%)	15 (37%)	8 (26%)	60
合計	43	40	34	117

腫瘍細胞の 30%以上で陽性を示した症例を陽性と判定した。(I-2(2) 染色性の評価参照)

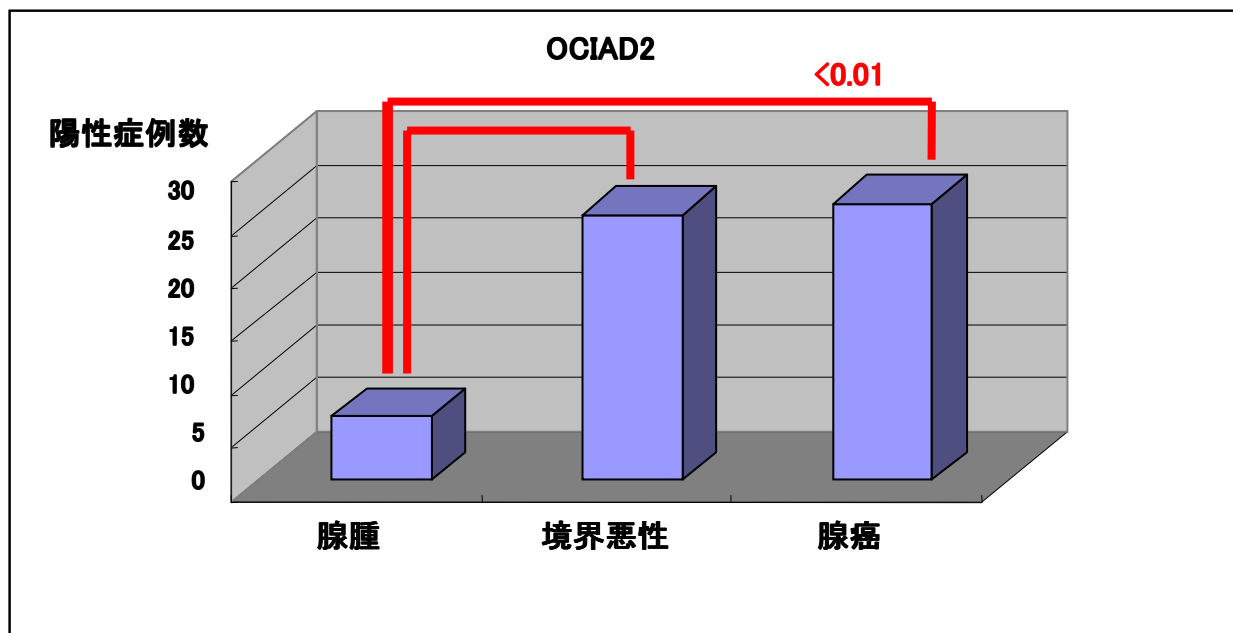


表 4 卵巣粘液性腫瘍における OCIAD1 の染色性

	粘液性腺腫	粘液性境界悪性腫瘍	粘液性腺癌	合計
陽性	21 (49%)	26 (65%)	30 (86%)	77
陰性	22 (51%)	14 (35%)	4 (14%)	40
合計	43	40	34	117

腫瘍細胞の 30%以上で陽性を示した症例を陽性と判定した。(I-2 (2) 染色性の評価参照)

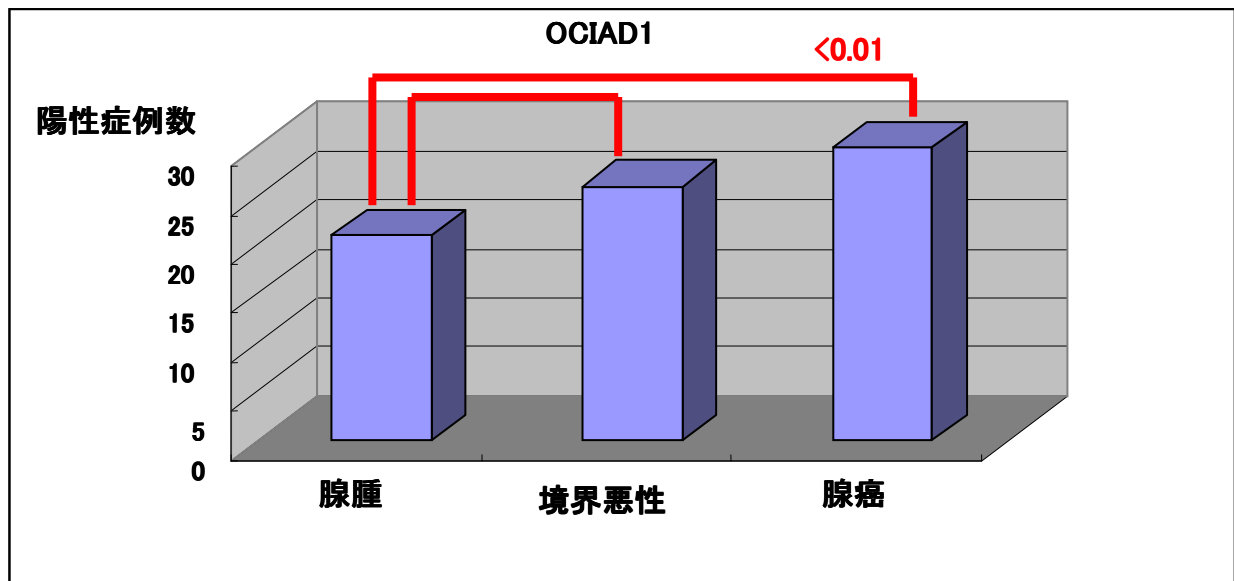


表 5 卵巣粘液性腫瘍における CEA の染色性

	粘液性腺腫	粘液性境界悪性腫瘍	粘液性腺癌	合計
陽性	0 (0%)	10 (25%)	25 (71%)	35
陰性	43 (100%)	30 (75%)	9 (29%)	82
合計	43	40	34	117

腫瘍細胞の 30%以上で陽性を示した症例を陽性と判定した。(I-2 (2) 染色性の評価参照)

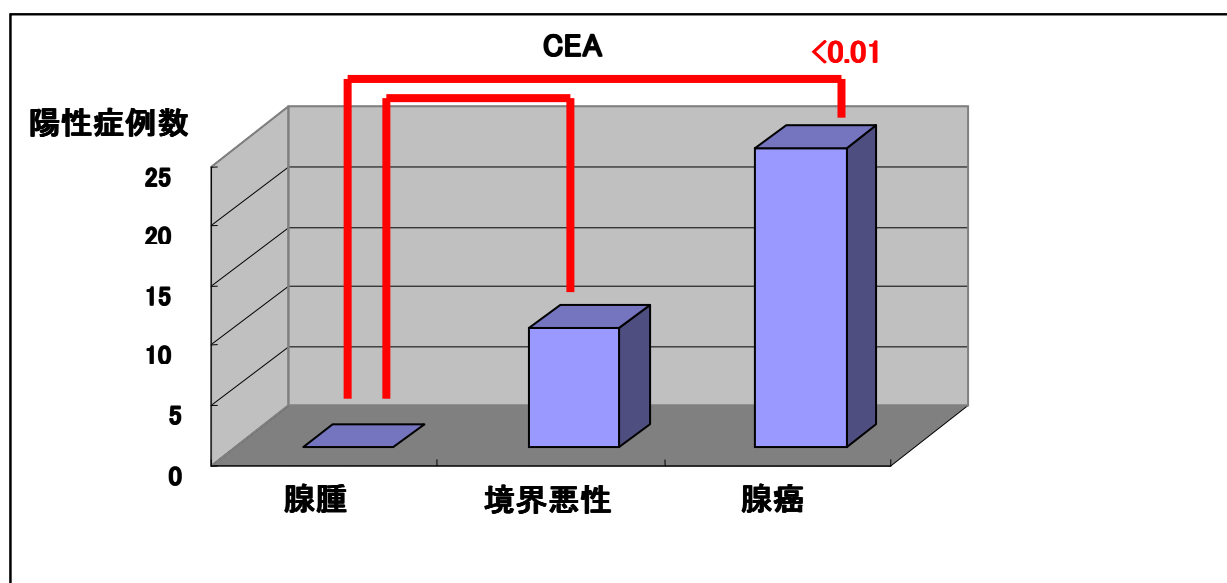


図1 SEREX 法による OCIAD1 同定までの過程

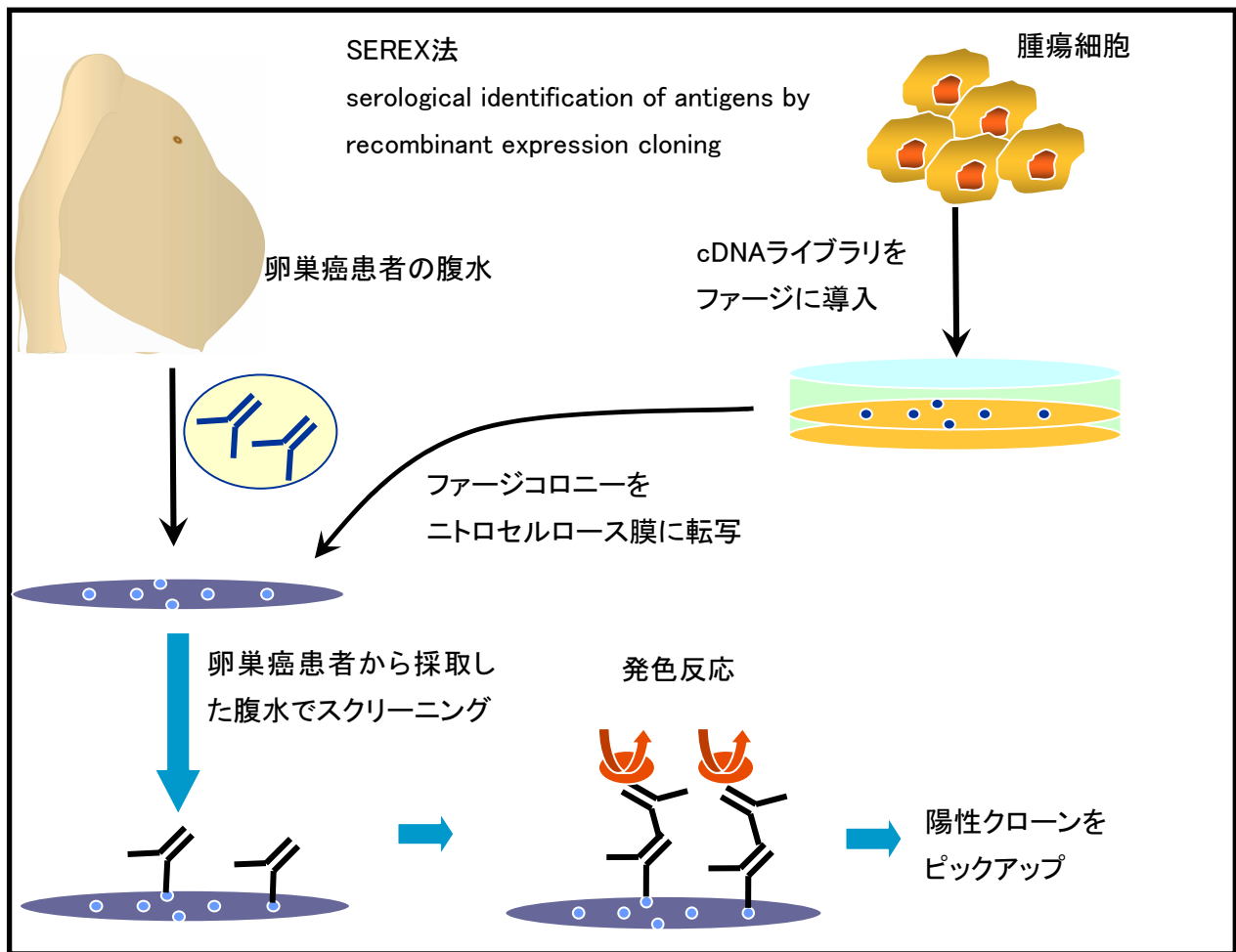


図2 OCIAD1、OCIAD2 の遺伝子配列

		10	20	30	40	50	60
NP_001014446	Sequence	MASASARGNQ	DKDAHFPPPS	KQSLLFCPKS	KLH1HRAEIS	KIMREQQEES	FWKRALPFSL
NP_001073309	Sequence	--MNGRADFR	EPNAEYPRRI	PH---IGPD-	--YIPTEEER	RVFAEQNDES	FWFRSYPLAA
		70	80	90	100	110	120
NP_001014446	Sequence	VSMLVTOGLV	YGGYLAANSR	FGSLPKVALA	GLLGFLGKIV	SYIGVQSKKF	HFFEDQLRGA
NP_001073309	Sequence	TSMLITOGLI	SKGILSSHPK	YGSIPKLILA	CIMGYFAGNL	SYVKTCQEKF	KKLENSPLGE
		130	140	150	160	170	180
NP_001014446	Sequence	GFGP-QHNH	CLLTCEECH	KHGLSEKQDS	---QPSAS-	-----	-----
NP_001073309	Sequence	ALRSGQARRS	SPPGHYYQKS	KYDSSVSGQS	SFVTSFAADN	IEMLPHYEPI	PFSSSMNESG
		190	200	210	220	230	240
NP_001014446	Sequence	-----	-----	-----	-----	-----	-----
NP_001073309	Sequence	PTGITDHIYQ	VKVNKYGDTW	DE.....	-----	-----	-----

上段が OCIAD2、下段が OCIAD1 で、41%の相同性を有する。Blast での検索による。

図3 SOSuiにより予測されるOCIAD2の立体構造図

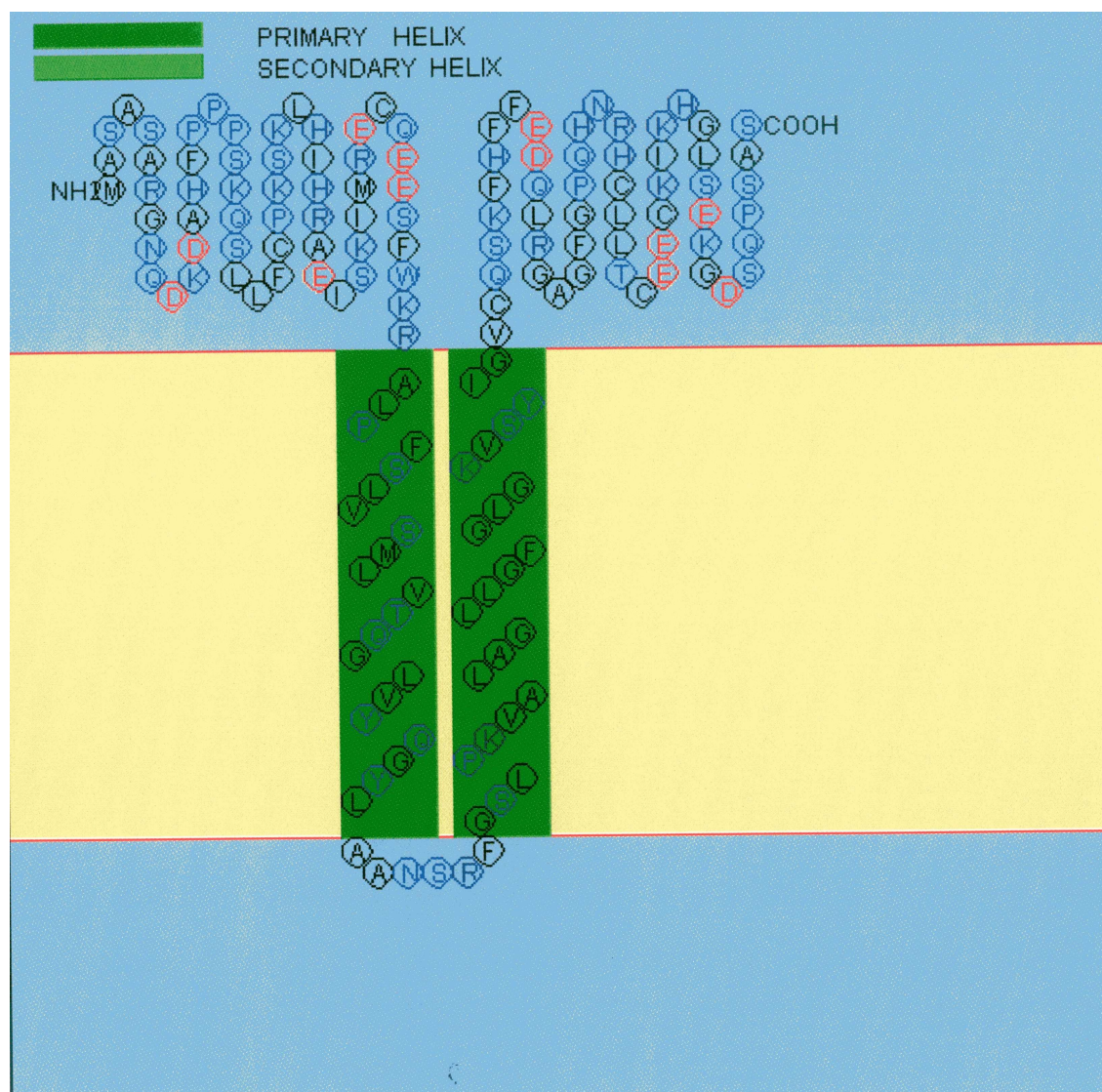


図 4 微小浸潤を示す肺腺癌における OC1AD2 の免疫染色
胞体内における顆粒状の染色像を陽性と判定した。

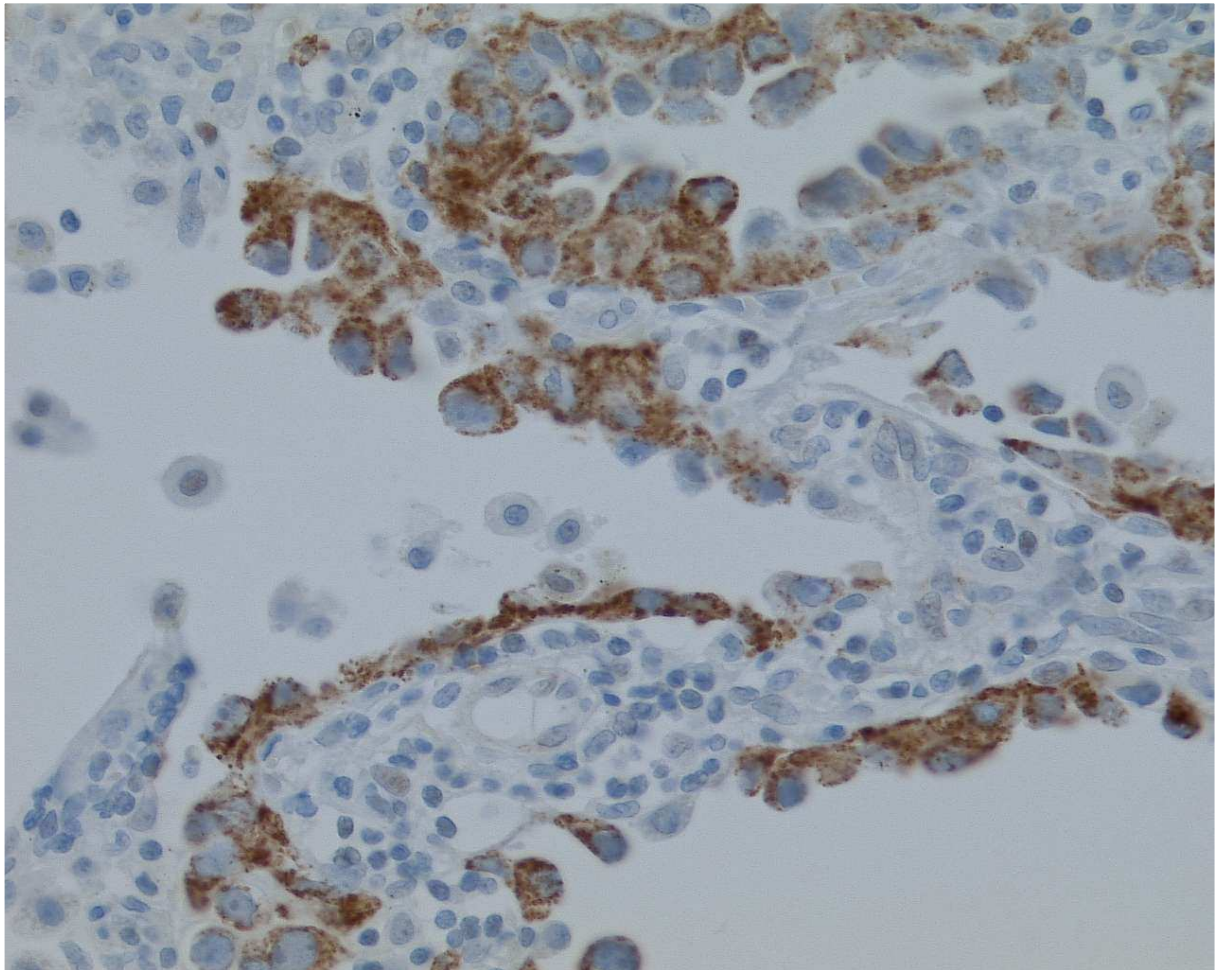


図5 大腸癌における CEA の免疫染色(管腔側に限局した極性を有する染色像ではなく、胞体内にびまん性の染色像を陽性と判定し、これを陽性コントロールとした)

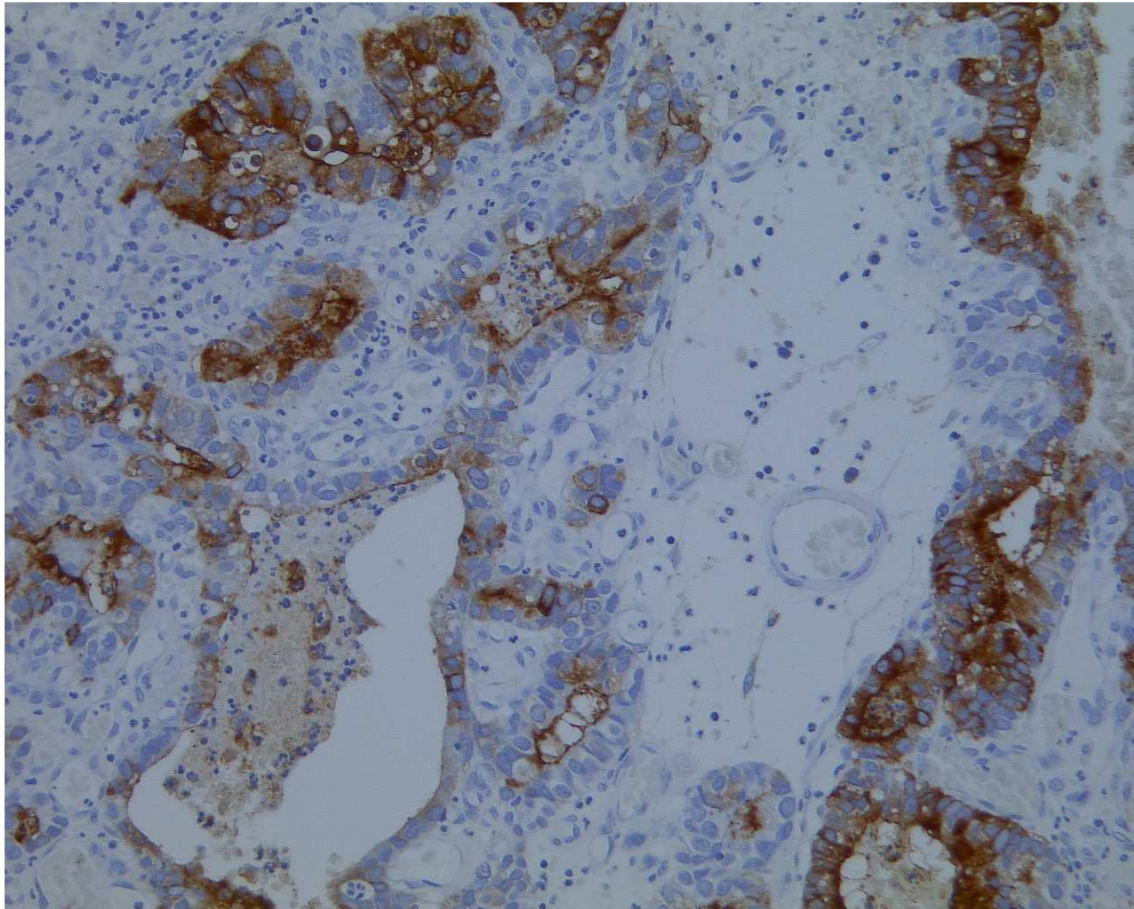
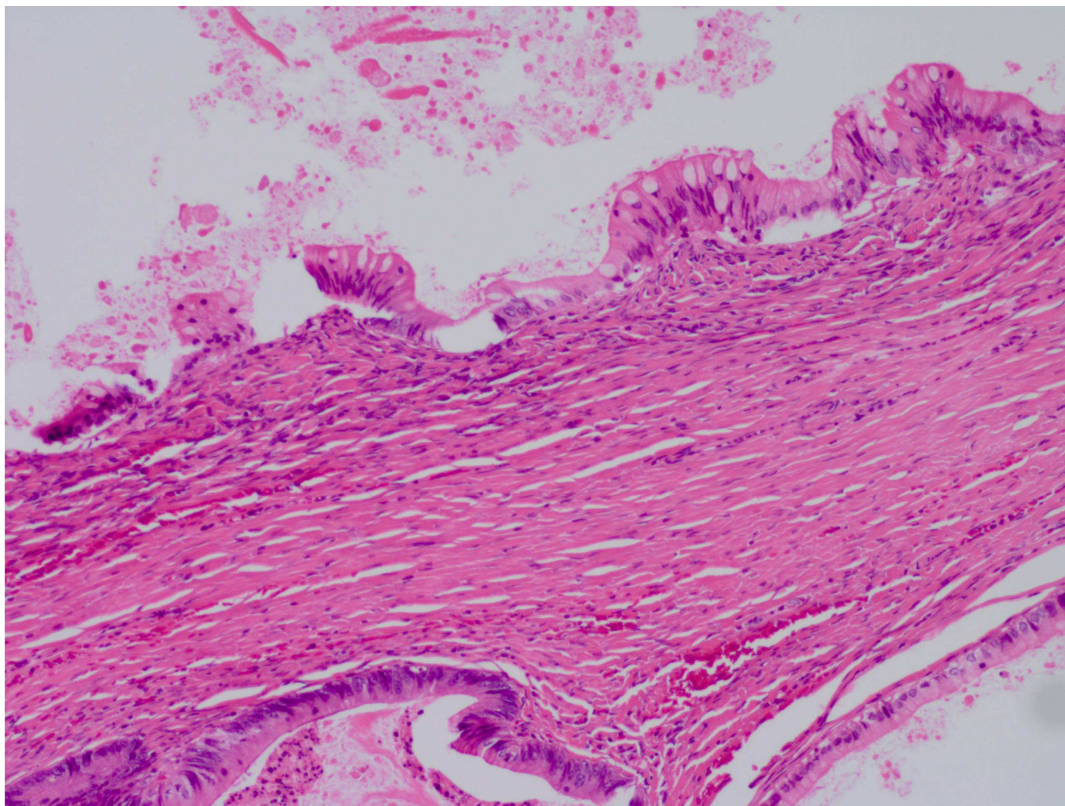
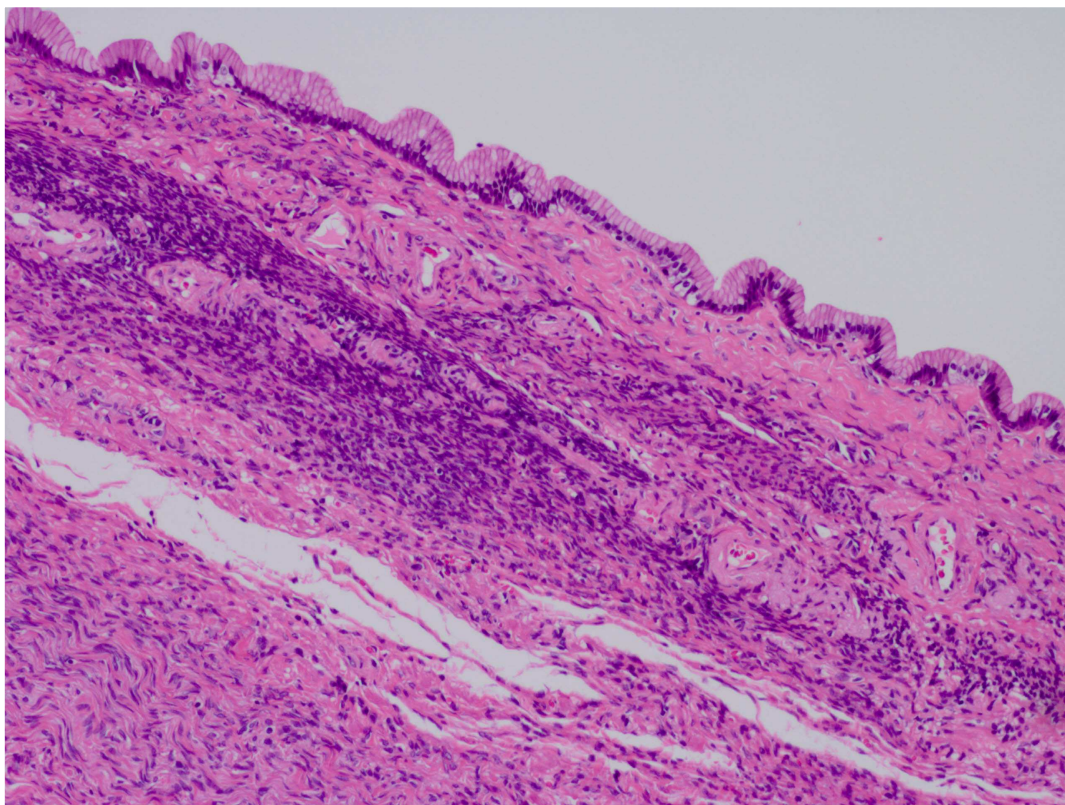


図 6 粘液性腺腫で明らかに腸型および内頸部型に分類できた腫瘍の例 (HE 染色像)

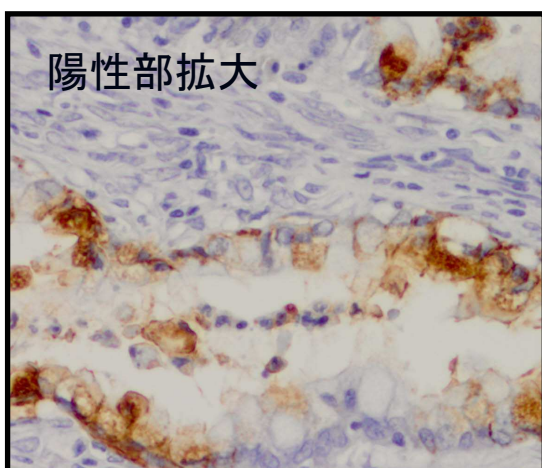


腸型



内頸部型

図 7 染色陽性の判定基準 (CEA 陽性例)

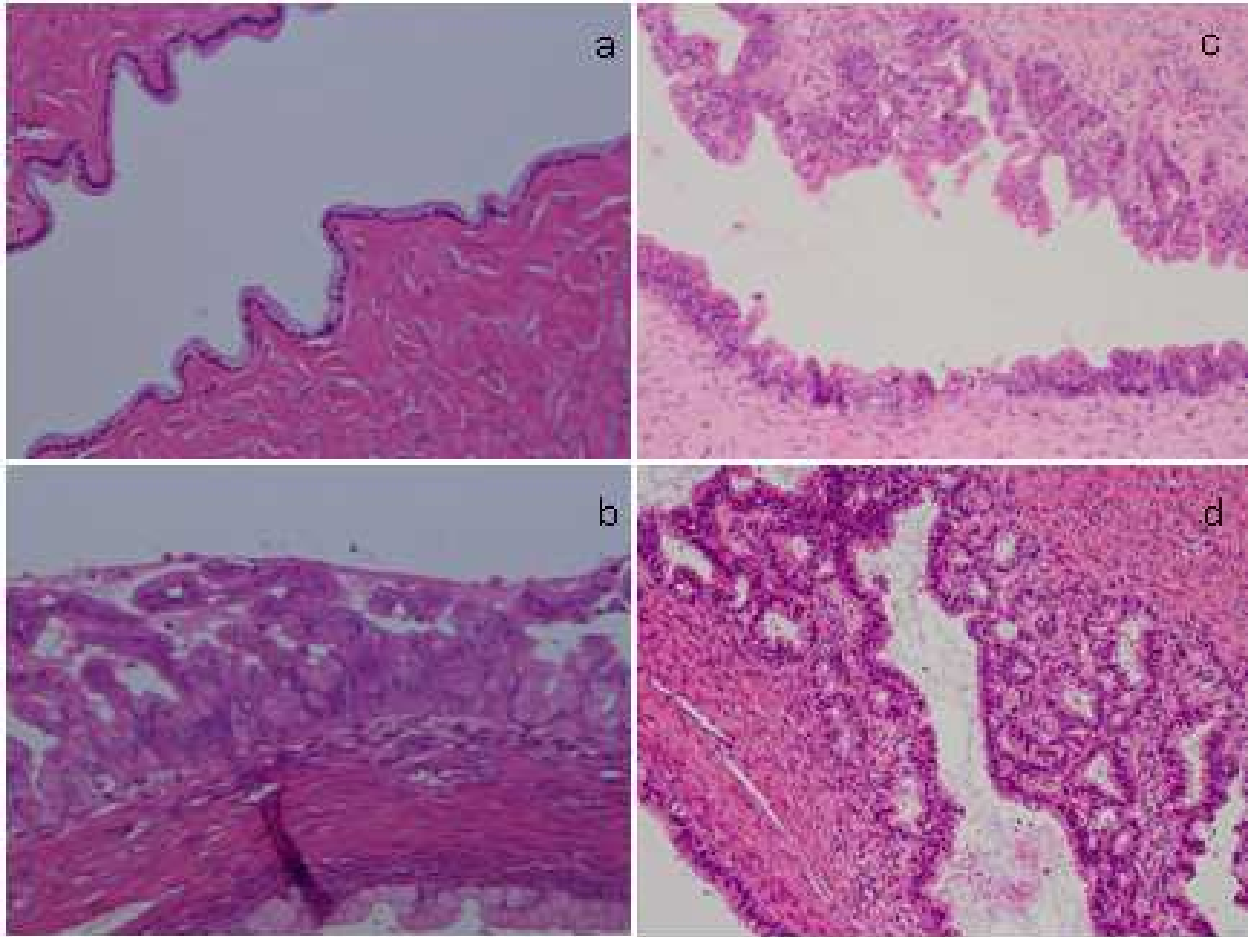


腺腫における CEA 免疫染色で最も陽性領域の広い症例 (全体面積の 10-30%が陽性)

CEA 染色陽性領域	症例数
0%	39
<10%	3
≥10%, <30%	1
≥30%, <60%	0
≥60%	0
合計	43

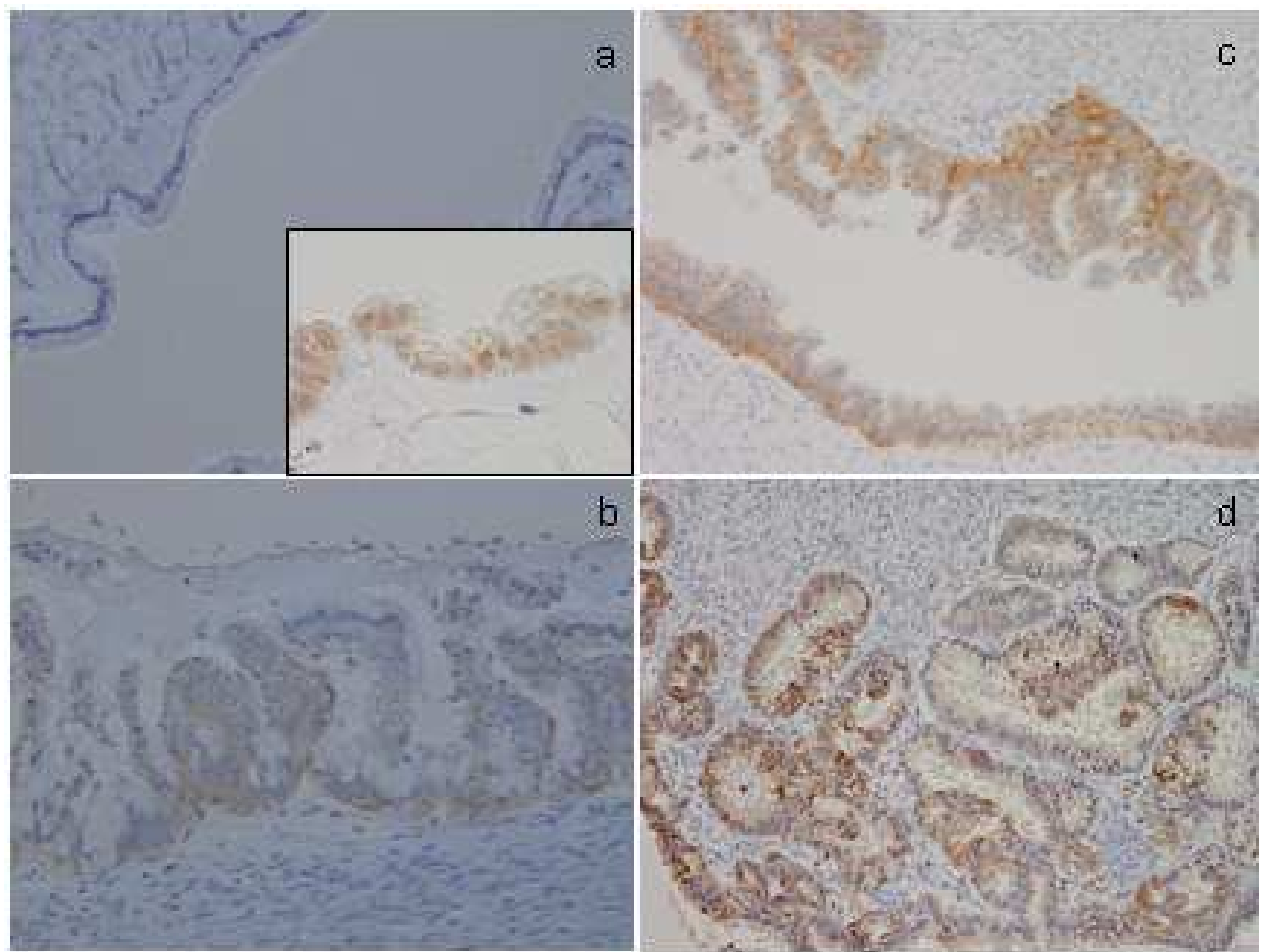
30%以上の領域で陽性の場合を陽性と評価すると、腺腫の全症例が CEA 陰性となる

図 8 各悪性段階の粘液性腫瘍の組織学的所見 (HE 染色像)



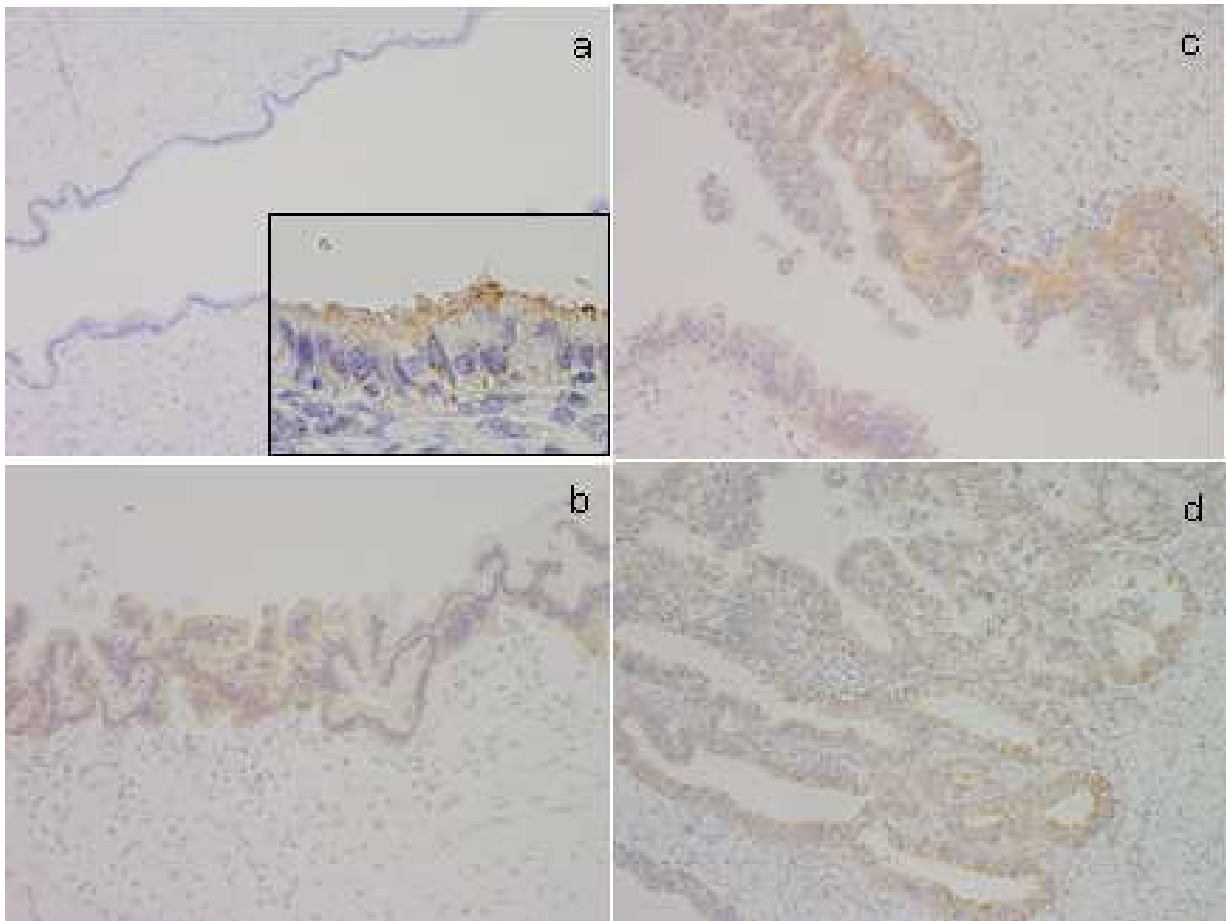
- (a) 粘液性腺腫
- (b) 粘液性境界悪性腫瘍(内頸部型)
- (c) 粘液性境界悪性腫瘍(腸型)
- (d) 粘液性腺癌

図 9 各悪性段階の粘液性腫瘍の免疫組織学的所見 (OC1AD2)



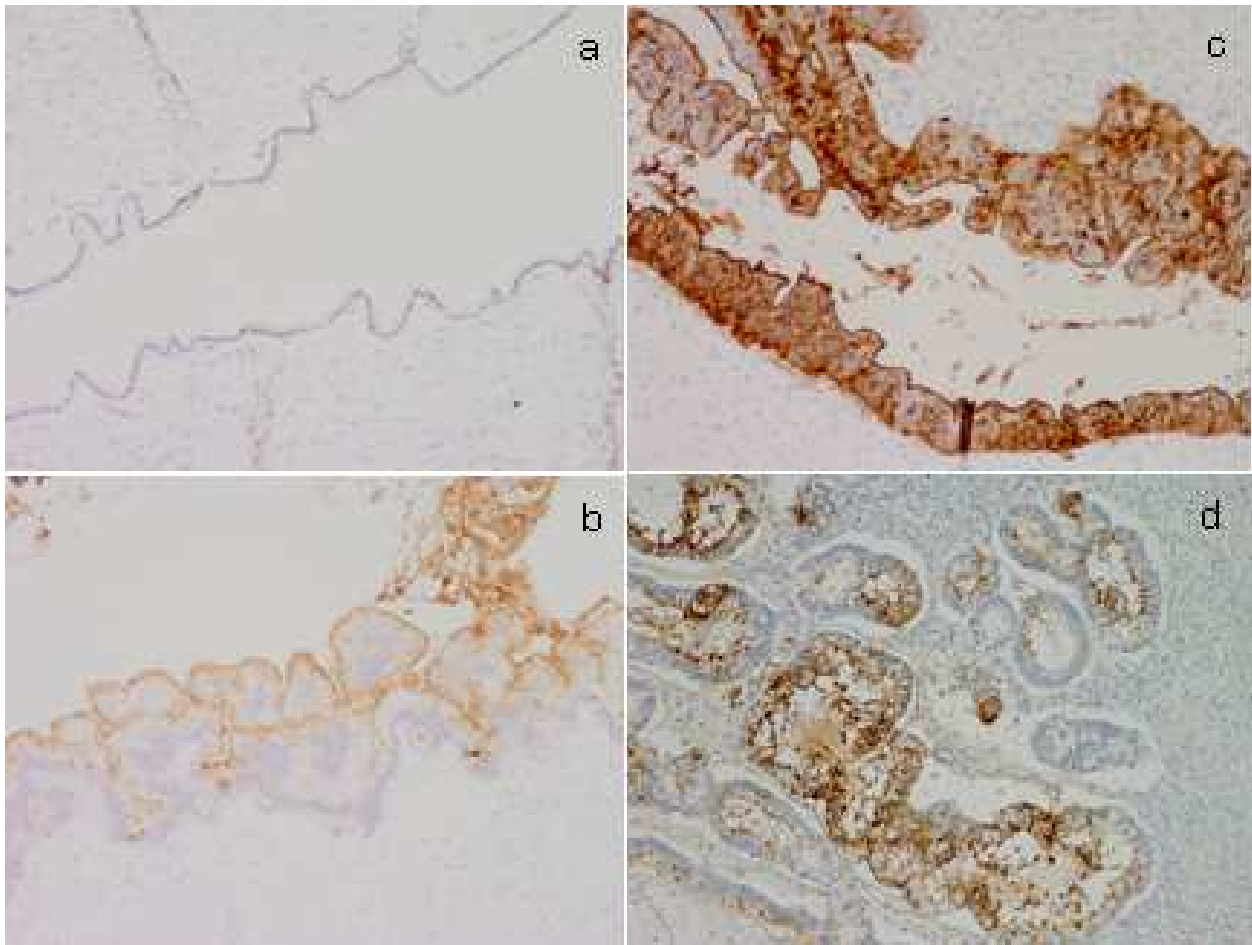
- (a) 粘液性腺腫 (囲み図は陽性を示した例)
- (b) 粘液性境界悪性腫瘍 (内頸部型)
- (c) 粘液性境界悪性腫瘍 (腸型)
- (d) 粘液性腺癌

図 10 各悪性段階の粘液性腫瘍の免疫組織学的所見 (OC1AD1)



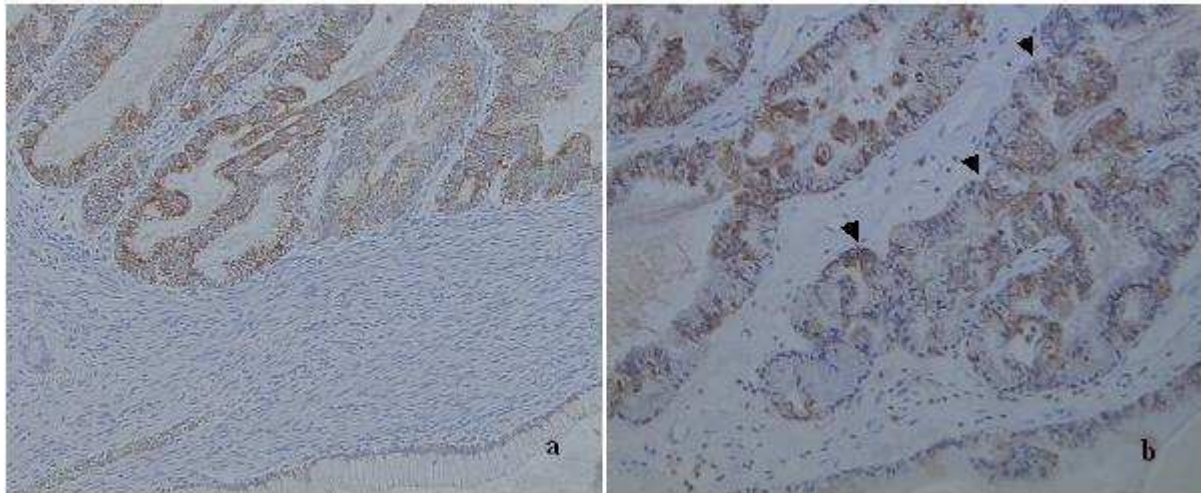
- (a) 粘液性腺腫 (囲み図は陽性を示した例)
- (b) 粘液性境界悪性腫瘍 (内頸部型)
- (c) 粘液性境界悪性腫瘍 (腸型)
- (d) 粘液性腺癌

図 11 各悪性段階の粘液性腫瘍の免疫組織学的所見 (CEA)



- (a) 粘液性腺腫
- (b) 粘液性境界悪性腫瘍(内頸部型)
- (c) 粘液性境界悪性腫瘍(腸型)
- (d) 粘液性腺癌

図 12 粘液性境界悪性腫瘍および粘液性腺癌における OC1AD2 の組織学的染色パターン



- (a) 粘液性境界悪性腫瘍における OC1AD2 の免疫染色像。上皮の平坦な部分に比べて、乳頭状増殖を示す部位では強い陽性像が認められる。
- (b) 粘液性腺癌における OC1AD2 の免疫染色像。上皮の平坦な部分に比べて、間質浸潤を示す部位において強い陽性像が認められる(矢頭)。

図 13 OICAD2, OCIAD1, CEA の各悪性段階での染色陽性頻度(縦軸%)

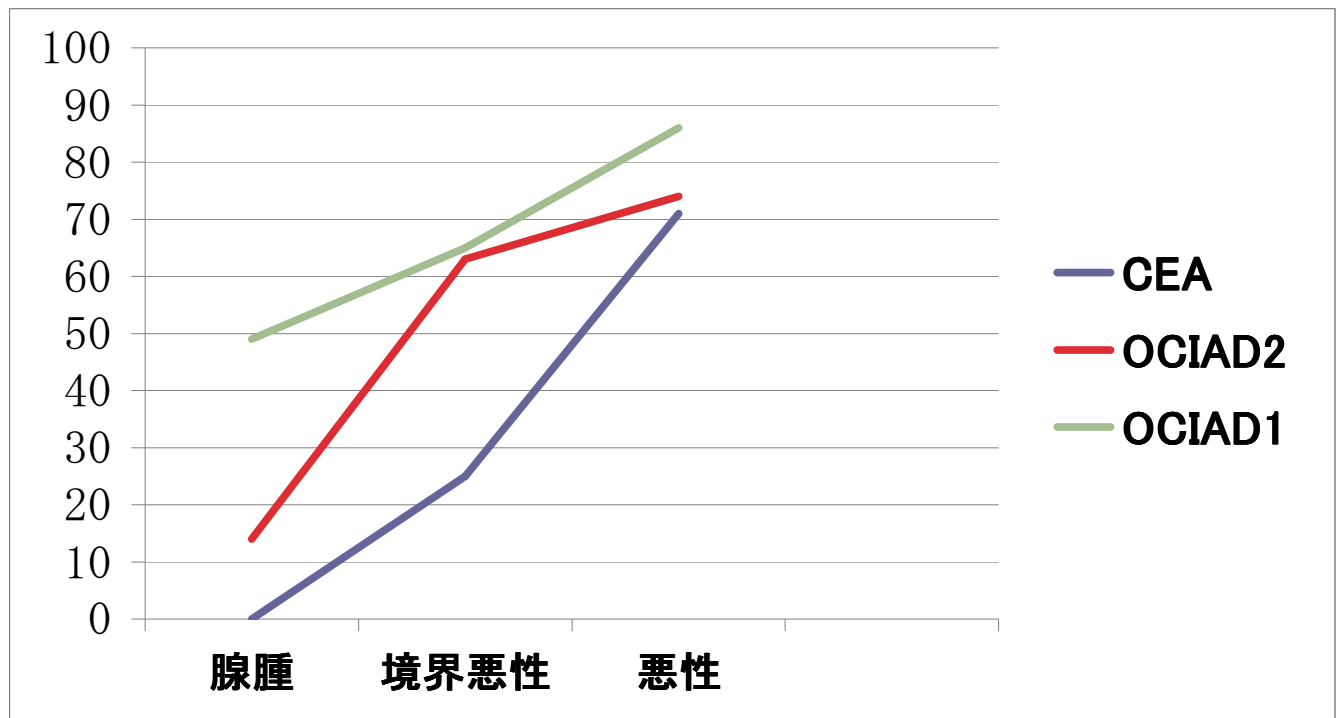


図 14 OCIAD2、OCIAD1 および CEA の免疫染色における FIGO ステージの分布

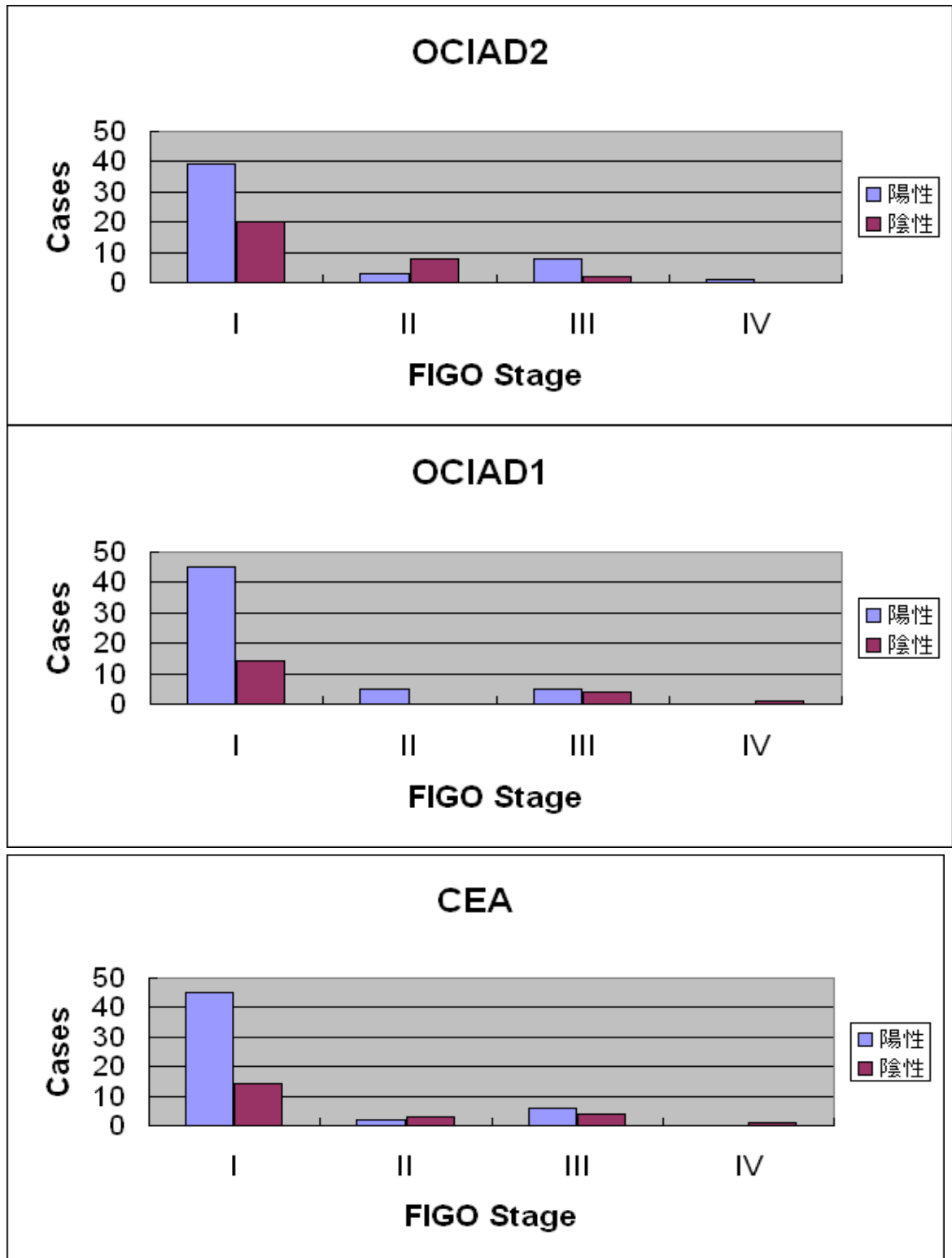


図 15 OCIAD2、OCIAD1 および CEA の腫瘍径別にみた染色性の分布

