

シリーズ—腫瘍マーカーの免疫染色

第3回 増殖マーカーと腫瘍ウイルスマーカー

つつみ病理診断科クリニック 院長
堤 寛 Yutaka Tsutsumi, M.D.

本稿では、増殖マーカー、アポトーシスマーカーと腫瘍ウイルスマーカーの意義を記載する。腫瘍の増殖能判定に Ki-67 免疫染色が普及している。一方、PCNA は増殖終了後の核に残存するため、増殖能判定に不適である。その他の増殖細胞マーカーとして、PHH3、DNA polymerase α/δ 、DNA topoisomerase II α がパラフィン切片に応用できる。アポトーシスの免疫組織化学的マーカーには cleaved caspase-3 が最適である。cleaved CK18、cleaved actin、ssDNA、 γ H2AX も利用できる。一方、腫瘍の原因ウイルスも証明可能である。EBER は EBV の small nuclear RNA を証明するための *in situ* hybridization (ISH) 法である。EBER 陽性の EBV 関連腫瘍に LMP-1 が陽性であれば latency level II、LMP-1 とともに EBNA2 が陽性であれば latency level III と判定される。HHV8、MCPyV、HTLV-1 に対する免疫染色はそれぞれ、カポシ肉腫、Merkel 細胞癌、成人 T 細胞白血病・リンパ腫 (ATLL) の原因診断に利用できる。癌原性 HPV の証明には、粘膜型 HPV に対するカクテルプローブを用いた ISH 法が有用である。p16^{INK4a} 蛋白は HPV 関連腫瘍で過剰発現するため、免疫染色が広く利用されている。

増殖マーカーとアポトーシスマーカー (表 1)

腫瘍の悪性度基準には、増殖マーカーによる増殖能の判定が用いられる。古典的には核分裂像の数で判断していたが、核分裂か否かの判断が難しい場合が少なくない点に加えて、検体採取後、腫瘍細胞が固定液に接するまでの間に核分裂が進行する結果 (核分裂に要する時間は 20 分程度)、核分裂数が減少してしまう点が大きな問題だった (特に、手術材料では腫瘍深部にホルマリンが到達するのに相当の時間を要する)。

そこで用いられるようになったのが、Ki-67 (クローン名 MIB-1) である。増殖サイクルにある細胞を安定的に検出する増殖マーカーであり、有用性が高いことから幅広く利用されてい

る (図 1)¹⁾。当初、PCNA (proliferating cell nuclear antigen) が用いられていたが、PCNA は核内代謝が遅く、増殖サイクル終了後も長く核内に残留するため、非増殖細胞の核も陽性となってしまう。コルヒチンで増殖サイクルを止めると PCNA の核内残留が助長されることもわかっている²⁾。実際に、非増殖性 (Ki-67 陰性) の腫瘍性巨細胞はしばしば PCNA 陽性を呈するため、現在では PCNA は増殖マーカーとしては利用されていない。一方、phosphohistone-H3 (PHH3) は核分裂細胞を特異的に認識する³⁾。核分裂細胞の正確な数値化に適したマーカーであり、有用性が期待できる。ちなみに、p27/KIP は G0 期にある非増殖性細胞の核に発現する⁴⁾。

パラフィン切片に応用可能な増殖マーカーと

表 1 増殖マーカー（上段）とアポトーシスマーカー（下段）

増殖マーカー名	特 徴	発現部位や特徴など
DNA polymerase α	—	増殖細胞の核に発現
DNA polymerase δ	—	増殖細胞の核に発現
DNA topoisomerase II α	—	増殖細胞の核に発現
germinin	—	増殖細胞の核に発現
Ki-67 (MIB-1)	有用性の高い増殖マーカー	増殖細胞の核にびまん性・ドット状に陽性
MCM-2	—	増殖細胞の核に発現
MCM-3	—	増殖細胞の核に発現
p27/KIP	非増殖細胞を同定	G0 期細胞の核に発現
PCNA	有用性は低い（分裂後にも核内に残存）	増殖細胞の核にびまん性陽性
phosphohistone-H3 (PHH3)	核分裂細胞に特異的	有糸分裂像に陽性
アポトーシスマーカー名	特 徴	発現部位や特徴など
AIF (apoptosis-inducing factor)	ミトコンドリア経路のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved actin (fractin)	非上皮系細胞のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved Bid	一部のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved caspase 3	アポトーシス細胞を安定的に証明	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved caspase 6	消化管上皮細胞のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved caspase 8	一部のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved caspase 9	一部のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved CK18	円柱上皮系細胞のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved lamin A/C	一部のアポトーシスを検出	細胞質・アポトーシス小体に陽性
cleaved PARP-1	アポトーシスマーカー	細胞質・アポトーシス小体に陽性
γ H2AX (phosphohistone H2AX)	アポトーシスマーカー	アポトーシス細胞の核に発現
ssDNA	アポトーシス（固定による人工産物あり）	細胞質・アポトーシス小体に陽性

して、他に DNA polymerase α , DNA polymerase δ および DNA topoisomerase II α , MCM-2, MCM-3, germinin が知られているが⁵⁾, Ki-67 との比較など、今後の検証が必要である。ちなみに、PCNA は DNA polymerase δ の補助蛋白として機能する。

一方、アポトーシスの観察も腫瘍の形態解析に重要である。アポトーシスの証明法として名高い TUNEL 法は固定条件の影響が大きく、技術的にもやや難しい。通常ホルマリン固定パラフィン切片で安定的にアポトーシスを証明するには、cleaved caspase 3 に対する免疫染色

がもっとも適している。

円柱上皮（腺癌）に限れば、cleaved CK18 (cytokeratin 18) が利用できる。cleaved actin (fractin) は非上皮性細胞のアポトーシスを検出する⁶⁾。cleaved caspase 6, 8, 9, cleaved lamin A/C, cleaved Bid, cleaved PARP-1 や AIF (apoptosis-inducing factor) に対する抗体も市販されているが、いずれもアポトーシスの一部に限って反応する（AIF はミトコンドリア経由のアポトーシスに反応）。ssDNA (single-stranded DNA) 抗体もアポトーシスを検出するが、ホルマリン固定で DNA が断片

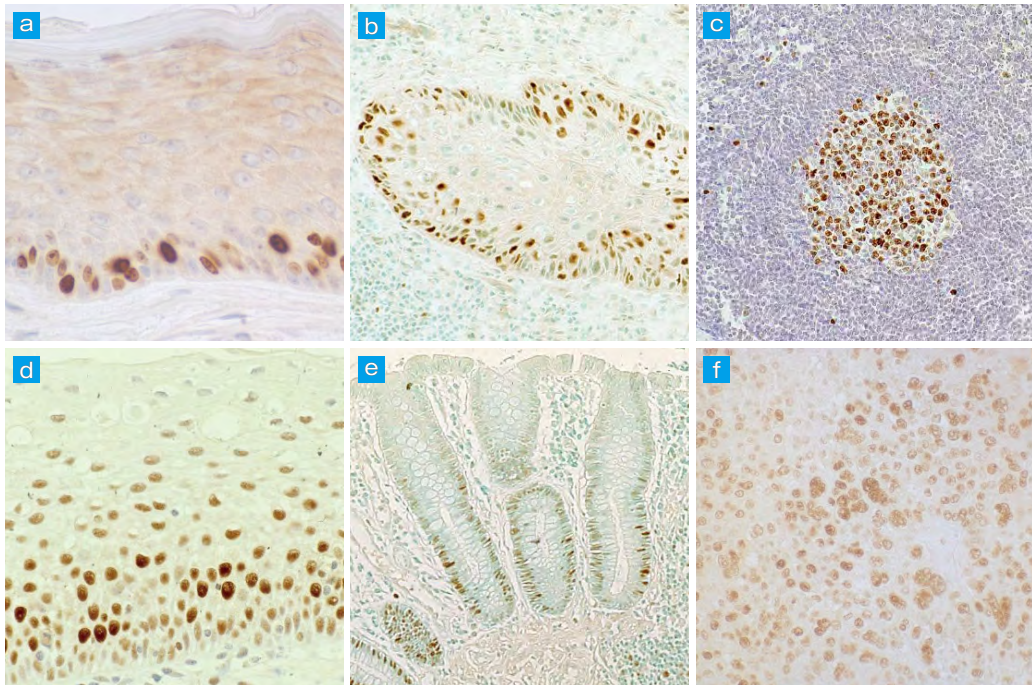


図 1 細胞増殖マーカー

a : 正常表皮における Ki-67, b : 舌の扁平上皮癌における DNA polymerase α , c : 扁桃リンパ濾胞における DNA topoisomerase II α , d : 正常表皮における PCNA, e : 正常小腸粘膜における PCNA, f : 転移性乳癌における PCNA.

Ki-67, DNA polymerase α , DNA topoisomerase II α は増殖細胞の核を限定的に染め出している。正常表皮では、Ki-67 陽性増殖細胞は傍基底細胞と一部の基底細胞に限られる。PCNA は中層細胞の核も陽性となり、増殖後の核内残留が示される。正常小腸粘膜でも、Ki-67 に比してより幅広い細胞帯が PCNA 陽性となる。乳癌ではほぼすべての核が陽性となり、Ki-67 標識率と大きく異なる。

化すると、断片の DNA が一本鎖化するため、偽陽性が増すという大きな欠点があるので利用を推奨できない⁶⁾。 γ H2AX (リン酸化されたヒストン H2AX) は DNA の二本鎖切断部に集積し、DNA 損傷修復酵素による DNA 修復を助ける。言い換えれば、 γ H2AX の免疫染色によってアポトーシス細胞を可視化できる (図 2)⁷⁾。

図 3 には、術前化学療法が奏効した大腸癌における cleaved CK18 と TUNEL 法の二重染色、cleaved CK18 と Ki-67 の二重染色および fractin の免疫染色像を示す。それぞれ、化学療法によりアポトーシスに陥った癌細胞とアポトーシスした炎症細胞が可視化されている。

正常状態のみならず、腫瘍においても細胞増

殖とアポトーシスは強く相関する。増殖能の高い腫瘍 (未分化癌、精上皮腫、肺小細胞癌、Burkitt リンパ腫など) では、アポトーシスも多数観察される (Burkitt リンパ腫の tingible body macrophage がアポトーシスの代表的な形態指標である)⁸⁾。

図 4 では、正常皮膚、Bowen 病、皮膚扁平上皮癌におけるアポトーシスを cleaved caspase 3 染色によって比較している。正常表皮では陰性だが、Bowen 病と皮膚扁平上皮癌ではアポトーシス像が観察され、皮膚扁平上皮癌ではより明瞭である。正常表皮角質層におけるアポトーシスには caspase 14 の関与が示唆されている⁹⁾。

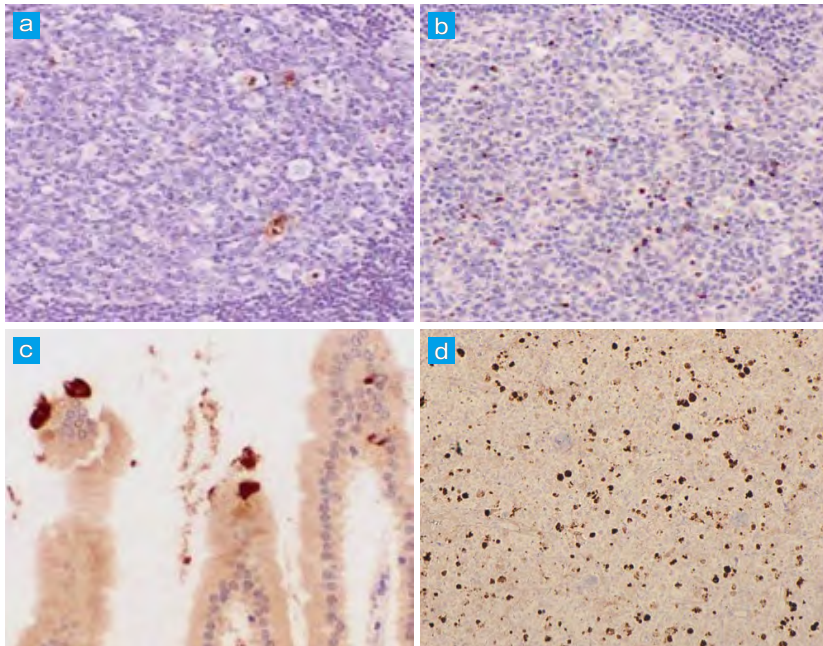


図 2 アポトーシス細胞の検出 ①

a : ssDNA, b : γ H2AX (phosphohistone H2AX), c, d : cleaved caspase 3.

a, b : 扁桃リンパ濾胞胚中心, c : 正常小腸絨毛, d : 壊死性リンパ節炎.

ssDNAと γ H2AXはともに2本鎖DNA切断部を示す。ssDNAはホルマリン固定による人工的DNA切断の影響を強く受けるため、aに示すような特異的局在を常に示すとは限らない。 γ H2AXとcleaved caspase 3は安定的にアポトーシス細胞の分布を可視化する。アポトーシスはリンパ濾胞胚中心、小腸絨毛先端部、壊死性リンパ節炎の病変部に分布する。壊死性リンパ節炎における細胞死はネクローシスでなく、アポトーシスである。

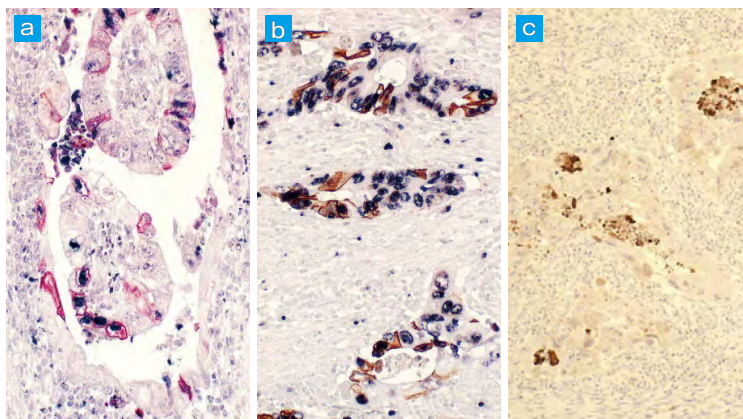


図 3 アポトーシス細胞の検出 ②

術前化学療法が奏効した大腸癌.

a : cleaved CK18とTUNEL法の二重染色, b : cleaved CK18とKi-67の二重染色, c : fractin.

aでは、TUNEL陽性核(青)とCK18陽性の細胞質(褐色)がほぼ重なっている。bでは、化学療法によってKi-67陽性増殖性癌細胞(青)の一部がアポトーシスしている所見(褐色)が可視化されている。cのfractin(cleaved actin)は、アポトーシスした炎症細胞を染め出している(癌細胞は陰性)。

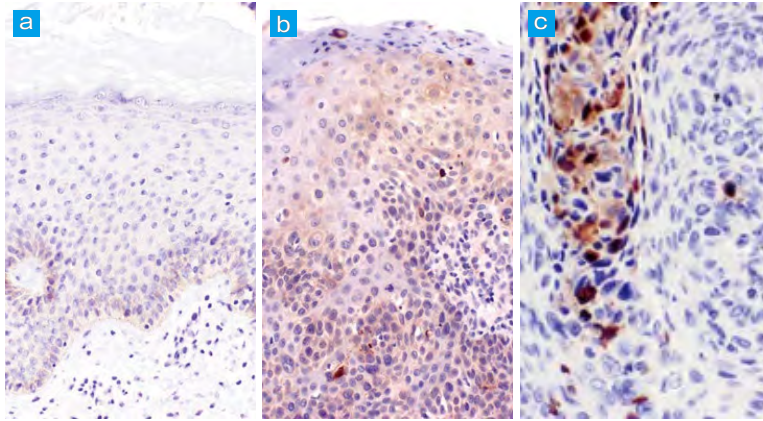


図 4 正常および腫瘍性表皮における cleaved caspase 3 陽性のアポトーシス像
 a：正常表皮，b：Bowen 病，c：皮膚扁平上皮癌。
 正常表皮には cleaved caspase 3 陽性像は観察されない。上皮内癌である Bowen 病では cleaved caspase 3 陽性細胞が散見され，皮膚扁平上皮癌ではアポトーシス細胞が集簇している。増殖能とアポトーシス活性はほぼ並行する。

表 2 腫瘍ウイルスマーカー

マーカー名	腫瘍名	発現部位や特徴など
EBER	ISH 法：EBV-encoded small nuclear RNA	核に発現
EBNA2	膿胸関連リンパ腫，免疫不全随伴リンパ腫	細胞膜に発現，EBV latency level III
HHV8	カポジ肉腫，原発性滲出性（体腔液）リンパ腫	核に発現
HPV-capsid Ag	ウイルス粒子を作らない腫瘍はほぼ陰性	核に発現
HPV-ISH	ISH 法：粘膜型 HPV ゲノム	核にドット状陽性
p16	HPV 関連腫瘍に高度に発現（CIN2 以上），中咽頭（扁桃）癌，高分化型脂肪肉腫	核・細胞質に発現
HBV (HBs antigen)	肝硬変部に陽性，肝細胞癌には陰性	細胞質に発現
HCV	肝硬変部に陽性，肝細胞癌には陰性	細胞質に顆粒状発現
HTLV-1	成人 T 細胞白血病	細胞質に発現
LMP-1	Hodgkin リンパ腫，NK/T リンパ腫，上咽頭癌，免疫不全随伴リンパ腫	細胞膜に発現，EBV latency level II
Merkel cell polyomavirus	Merkel 細胞癌	核に発現

CIN2 (cervical intraepithelial neoplasia-2)：中等度異形成。

腫瘍ウイルスマーカー (表 2)

ウイルス発癌によって発生する悪性腫瘍については，腫瘍細胞に感染するウイルス自体の証明が求められる。頻用されるのは EBV (Epstein-Barr virus) の感染を示すための EBER 法で，ISH 法によって核内に蓄積する EBV 関連短鎖

RNA が証明される。EBV 関連リンパ増殖性疾患として，Hodgkin リンパ腫，リンパ腫様肉芽腫症，Burkitt リンパ腫，NK/T リンパ腫，膿胸関連リンパ腫，免疫不全随伴リンパ腫（日和見リンパ腫），高齢者の EBV 関連大細胞性 B 細胞リンパ腫，形質芽球性リンパ腫，慢性活動性 EBV 感染症などが知られている。その他に，

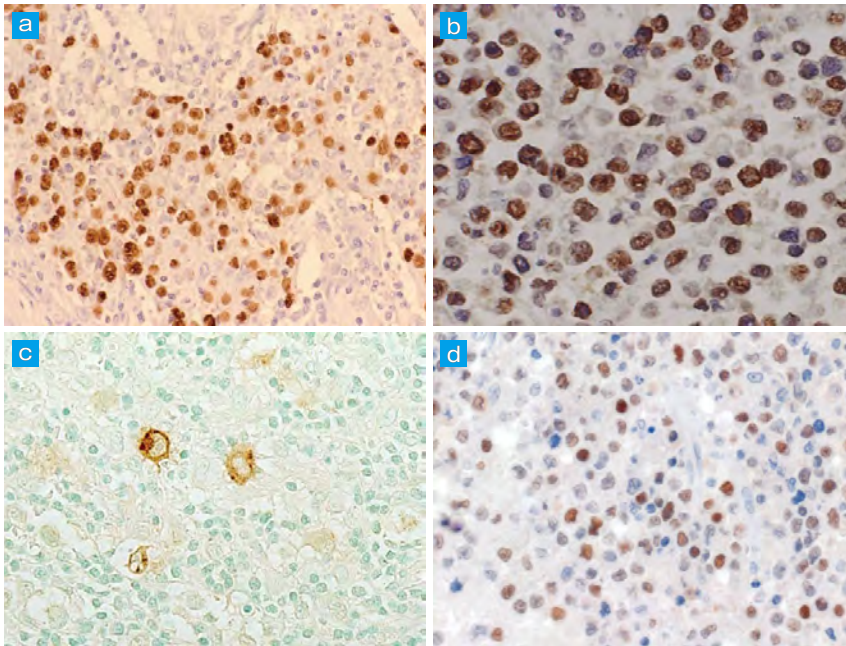


図 5 EBV 関連腫瘍

a：リンパ球浸潤性胃癌における EBER, b：膵胸関連 B 細胞リンパ腫における EBER, c：Hodgkin リンパ腫における LMP-1, d：エイズに続発する大脳半球の B 細胞リンパ腫における EBNA2.

EBER は EBV 感染病変に共通の特徴である。胃癌では latency level I, 膵胸関連リンパ腫は latency level II に区分される。Hodgkin リンパ腫では Hodgkin 細胞の細胞質で LMP-1 陽性となり level II に、免疫不全に合併したリンパ腫では核に EBNA2 陽性となり level III に属す。

EBER 陽性腫瘍として鼻咽頭腫瘍(上咽頭癌), リンパ球浸潤性胃癌, 諸臓器に発生するリンパ上皮腫様癌がある¹⁰⁾。

EBV の潜伏感染は 3 つの latency levels に分けられる¹¹⁾。EBER のみが陽性の latency level I, EBER とともに LMP-1 (latent membrane protein-1) が発現する latency level II, EBER, LMP-1 に加えて EBNA2 も発現する latency III である。Level I には Burkitt リンパ腫, 胃癌, 上咽頭癌が, level II には Hodgkin リンパ腫, リンパ球様肉芽腫症, NK/T リンパ腫, 膵胸関連リンパ腫, 1/3 の上咽頭癌が, level III には日和見リンパ腫と EBV 関連大細胞性 B 細胞リンパ腫が含まれる (図 5)。

HHV8 (human herpesvirus-8) はカポシ肉

腫, 多中心性 Castleman 病, 体腔に発生する原発性滲出性リンパ腫 (primary effusion lymphoma) の成因である。HHV8 抗体を用いた免疫染色により, 腫瘍細胞の核内に感染したウイルスを証明できる¹²⁾。これと同様に, Merkel 細胞ポリオーマウイルス (MCPyV) やヒト成人 T 細胞白血病ウイルス (HTLV-1) の証明にも免疫染色が有効である (図 6)^{13,14)}。

一方, ヒトパピローマウイルス (HPV) には 200 をこえる亜型が知られており, 亜型の証明には PCR 法が利用される。HPV 感染の組織化学的証明には ISH 法がもっとも適しているが, 亜型一つ一つを証明するには手間がかかりすぎる。子宮頸癌の成因となる粘膜型 HPV には, HPV16, HPV18, HPV31, HPV33, HPV35,

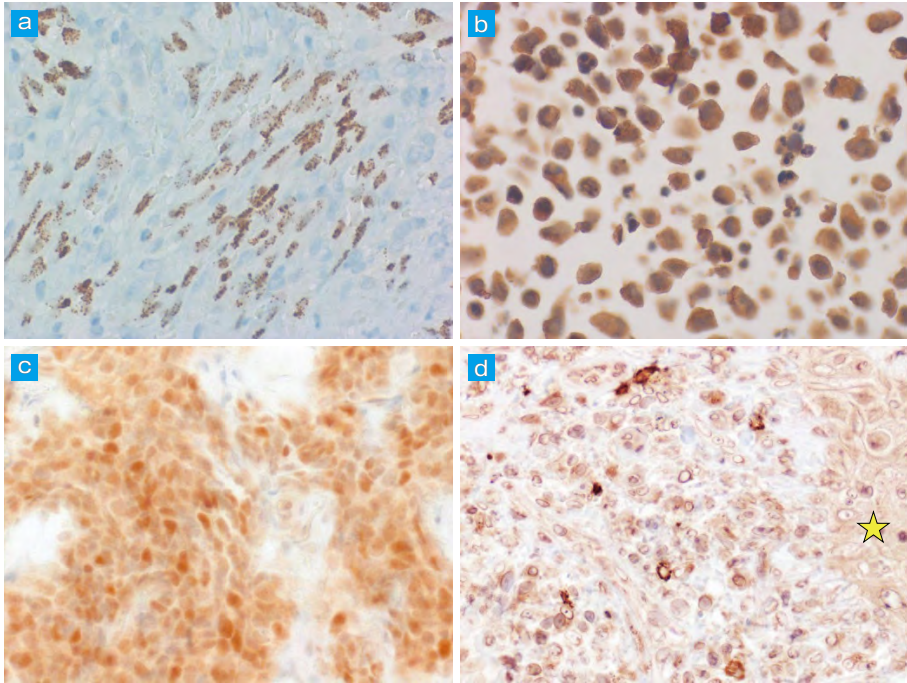


図 6 腫瘍ウイルス抗原に対する免疫染色
 a : カポシ肉腫における HHV8, b : 原発性滲出性リンパ腫（腹水）における HHV8, c : Merkel 細胞癌における MCPyV, d : 成人 T 細胞白血病に随伴した扁平苔癬様皮疹における HTLV-1.
 DNA ウイルスである HHV8 と MCPyV は核内にウイルス抗原が観察される。レトロウイルスである HTLV-1 は、真皮に浸潤する腫瘍性 T 細胞の細胞質に陽性となる。成人 T 細胞白血病 (ATL) はときに、扁平苔癬様皮疹で発症する（星印：表皮）。

HPV45, HPV51, HPV52, HPV56, HPV58 などが含まれる。一方, HPV6, HPV11 は性感染症としての尖圭コンジローマ（性器イボ）の成因であり, 癌化をもたらさない。こうした粘膜型 HPV を広く証明するために, Enzo Life Sciences 社から利便性が高い digoxigenin 標識カクテルプローブ「PATHO-GENE®」(HPV6/11/16/18/31/33/51 を認識) が市販されている¹⁵⁾。

皮膚の尋常性疣贅は HPV1, HPV2, HPV4, HPV7, HPV60 の感染が主体で, 癌化につながらない。HPV capsid 抗原に対する抗体が HPV 感染の証明に利用できる。特に, 核周囲が白く抜けて見える koilocytosis を伴う細胞が免疫染色陽性となり, 感染細胞の核内で capsid 抗原を

有する成熟ウイルス粒子が産生されていることがわかる。言い換えれば, HPV 免疫染色が陽性となるのは, HP 皮膚型 HPV 感染による疣贅と非癌原性粘膜型 HPV (HPV6/11 型) の感染による尖圭コンジローマである。一方, 成熟ウイルス粒子が産生されない (koilocytosis を欠く) 異形成や扁平上皮癌では, HPV 抗体による免疫染色は陰性である。

図 7 に子宮頸部の浸潤性扁平上皮癌と上皮内腺癌の染色像を提示する。粘膜型 HPV に対するカクテルプローブを利用した ISH 法によって, 腫瘍細胞の核内に HPV ゲノムがドット状に観察される。ドット状の陽性反応は, ウイルスゲノムが腫瘍細胞ゲノムに integrate さ

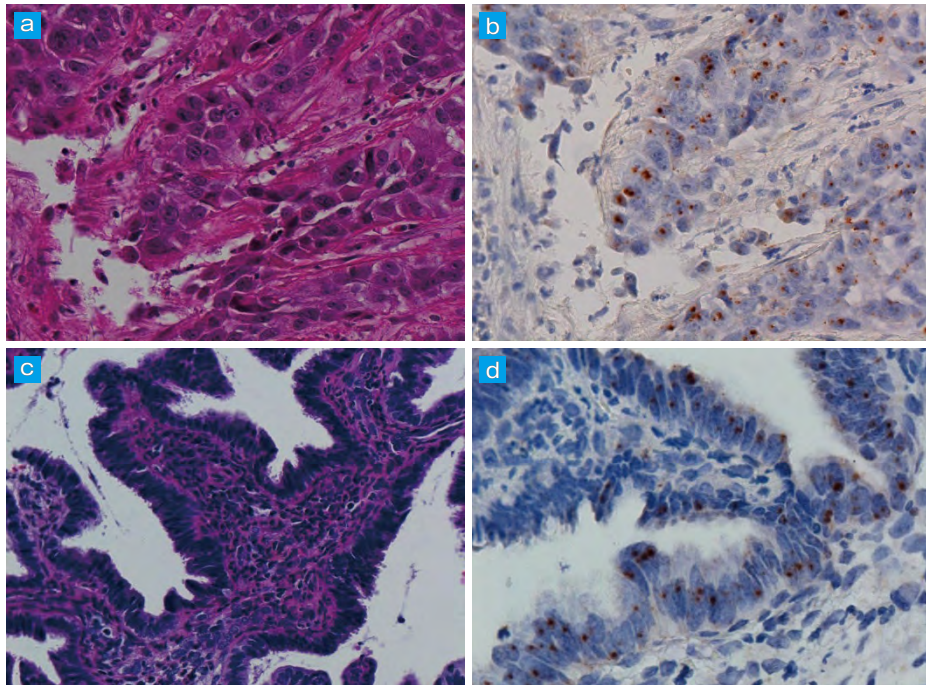


図7 子宮頸部の浸潤性扁平上皮癌 (a, b) と上皮内腺癌 (c, d) における HPV 感染の証明
 a, c: HE 染色, b, d: 粘膜型 HPV に対するカクテルプローブを利用した ISH 法。
 ともに、癌細胞の核内に粗大ドット状の陽性シグナルが観察される。扁平上皮癌では HPV16、腺癌では HPV18 の感染が想定される。ドット状の陽性所見は癌原性 HPV 感染の特徴である。

れた結果（癌原性 HPV の感染）を反映している¹⁶⁾。扁平上皮癌では HPV16 型、腺癌では HPV18 型の感染が多い。

一般に HPV-ISH 法による検索は、異形成病変には高い確率で陽性となるが、癌性病変での陽性率は高くない。外陰部に発生するコンジローマ様癌 (condylomatous carcinoma: warty carcinoma) では、HPV-ISH 法のみならず、HPV 抗原が癌細胞の核内に例外的に観察される (図8)¹⁷⁾。

癌原性 HPV の感染は E6 蛋白による p53 機能の不活化、E7 蛋白による *Rb* 遺伝子の不活化をきたした結果、代償的に p16^{INK4a} 蛋白 (p16 蛋白) が過剰発現する。実際に、癌原性 HPV の感染巣 (子宮頸部異形成や扁平上皮癌) では p16 蛋白が強陽性を呈する。したがって、p16 陽性

所見は HPV 感染の存在を示唆する (ただし、HPV 感染と無関係に p16 が過剰発現する場合もある)。中年以降の男性に多い中咽頭癌 (扁桃癌) は HPV 感染が成因ととらえられている。事実、中咽頭由来の非角化型扁平上皮癌は p16 が細胞質および核に強陽性を示す (図9)¹⁸⁾。p16 免疫染色は HPV 関連腫瘍のスクリーニングに適している。なお、角化型扁平上皮癌は p16 陰性である。

謝 辞

病理診断のさまざまな側面で支援・指導していただいた橘充弘先生 (島田市立総合医療センター病理診断科部長) に心より感謝します。塩竈和也先生 (藤田医科大学医療科学部臨床・教育連携ユニット形態・病理診断学分野 准教授) および鳴志田伸吾先生 (神戸大学大学院保健学研究科病態解析学領域 教授) には、長きにわたって技術的側面で多大なる知恵と協力をいただきました。深謝します。

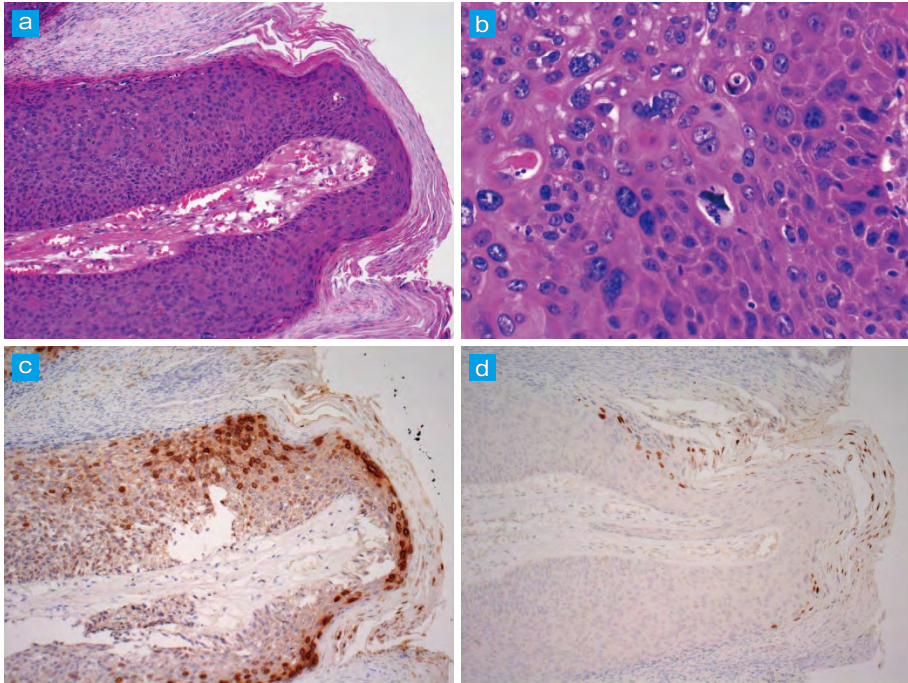


図 8 外陰部の condylomatous carcinoma (warty carcinoma)

a, b : HE 染色, c : HPV-ISH, d : HPV capsid 抗原.

30 代女性にみられた巨大コンジローマ様のポリープ状病変である。高倍率観察 (b) で、増殖細胞に異型・多形が強く、核分裂像が目立つ。ISH 法に加えて、免疫染色でも陽性所見が得られる。HPV ゲノム陽性細胞が capsid 抗原陽性細胞より多い。ウイルス粒子が形成される (HPV capsid 抗原陽性となる) 腫瘍は例外的である。

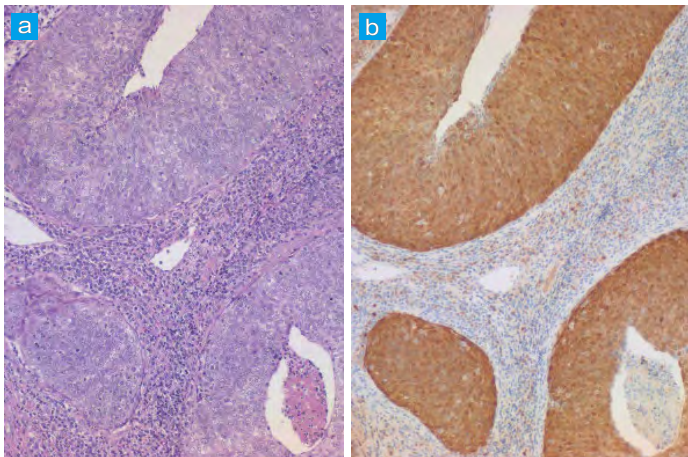


図 9 非角化型中咽頭癌 (扁桃癌 : 64 歳男性) における p16 抗原の発現

a : HE 染色, b : p16 抗原.

口蓋扁桃のリンパ球性間質に浸潤する非角化型扁平上皮癌に p16 抗原がびまん性に強陽性を示す (核および細胞質)。発癌に HPV 感染の関与が推定されている。なお、角化型扁平上皮癌では p16 抗原陰性である。

文献/URL

- 1) Li, L. T., et al. : Ki67 is a promising molecular target in the diagnosis of cancer (review). *Mol. Med. Reports*, **11** (3) : 1566-1572, 2015.
- 2) 堤寛, 他 : 増殖細胞のマーカー : 免疫組織化学的見地から, 病理と臨床 臨時増刊号, **6** (10) : 1229-1236, 1988.
- 3) Hans, F., et al. : Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*, **20** (24) : 3021-3027, 2001.
- 4) Newcomb, E. W., et al. : Expression of the cell cycle inhibitor p27KIP1 is a new prognostic marker associated with survival in epithelial ovarian tumors. *Am. J. Pathol.*, **154** (1) : 119-125, 1999.
- 5) Abcam plc. : The cell proliferation guide. <https://www.abcam.com/primary-antibodies/the-cell-proliferation-guide> (2023年3月13日アクセス)
- 6) Tsutsumi, Y., et al. : Pitfalls and caveats in histochemically demonstrating apoptosis. *Acta Histochem. Cytochem.*, **36** (4) : 271-280, 2003.
- 7) Qvarnström, O. F., et al. : gammaH2AX and cleaved PARP-1 as apoptotic markers in irradiated breast cancer BT474 cellular spheroids. *Int. J. Oncol.*, **35** (1) : 41-47, 2009.
- 8) Topham, C. H., et al. : Mitosis and apoptosis : how is the balance set? *Curr. Opin. Cell Biol.*, **25** (6) : 780-785, 2013.
- 9) Nicotera, P., et al. : Caspase-14 and epidermis maturation. *Nat. Cell Biol.*, **9** (6) : 621-622, 2007.
- 10) Fan, H., et al. : Molecular methods for detecting Epstein-Barr virus (Part I) : *in situ* hybridization to Epstein-Barr virus-encoded RNA (EBER) transcripts. *Methods Mol. Med.*, **49** : 301-311, 2001.
- 11) Kempkes, B., et al. : Epstein-Barr virus latency : current and future perspectives. *Curr. Opin. Virol.*, **14** : 138-144, 2015.
- 12) Iftode, N. et al. : Update on Kaposi sarcoma-associated herpesvirus (KSHV or HHV8) - review. *Rom. J. Intern. Med.*, **58** (4) : 199-208, 2020.
- 13) Paik, J. Y., et al. : Immunohistochemistry for Merkel cell polyomavirus is highly specific but not sensitive for the diagnosis of Merkel cell carcinoma in the Australian population. *Hum. Pathol.*, **42** (10) : 1385-1390, 2011.
- 14) 大島孝一, 他 : 成人T細胞白血病/リンパ腫. 悪性リンパ腫 臨床と病理-WHO分類(第4版)に基づいて一(吉野正, 他 編著). pp.396-416, 先端医学社, 2009.
- 15) Enzo Life Sciences, Inc. : PATHO-GENE® HPV screening probe. <https://www.enzolifesciences.com/ENZ-32884/patho-gene-hpv-screening-probe/>(2023年3月13日アクセス)
- 16) Tsutsumi, Y., et al. : Ultrastructural visualization of human papillomavirus DNA in verrucous and precancerous squamous lesions. *Acta Pathol. Jpn.*, **41** (10) : 757-762, 1991.
- 17) Dekmezian, R., et al. : DNA hybridization for human papillomavirus (HPV) in cervical lesions. Relationship of the presence of various viral subtypes to expression of HPV structural proteins, involucrin, and carcinoembryonic antigen. *Arch. Pathol. Lab. Med.*, **111** (1) : 22-27, 1987.
- 18) Shimizu, Y., et al. : Clinical impact of p16 positivity in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope Investig. Otolaryngol.*, **7** (4) : 994-1001, 2022.

* * *