

## Epidermal growth factor receptor (EGFR)、 p53 免疫染色を用いた尿細胞診の良悪性鑑別

総合病院土浦協同病院病理部

池田 聡

### 背景

膀胱や腎盂に出来る尿路上皮癌の頻度は近年増加している。この尿路上皮癌の診断や経過観察において尿細胞診は最も重要な手段の1つである。この検査は、患者への負担が小さく繰り返しの検査が容易であることから尿細胞診の診断価値は非常に高く、検査の頻度は年々増加している。

しかし、実際、尿細胞診の判定を行う上で幾つかの不利な現象がある。まず、尿の検体では細胞に経時的な変性を伴うことが多く、異型細胞と正常な細胞の変性像との区別が困難となることがある。また、カテーテル挿入などにより機械的に細胞集塊の剥離が起き、異常な細胞の集塊と区別しづらくなる。これらの現象に対しては、一般的な Pap 染色や Giemsa 染色のみでは良悪性の判定に苦慮することがあり、これが尿細胞診の判定に際し障害となっている。したがって、診断精度を上げるためには尿細胞診を補う客観的手法を追加する必要があると考えられる。

尿細胞診以外に客観的に膀胱癌を証明できるような検査の開発は、以前より行われてきた。客観的に膀胱癌を証明できるような生化学的方法としては、尿中の NMP-22 の測定が知られている。スクリーニング検査としてしばしば行われているが、炎症細胞などによる偽陰性率が高く特異性に問題がある。また、尿中のテロメラーゼを測定する方法やメチレーション検出なども検討されその有用性が報告されたが、何より手技が煩雑で一般病院では行えない。そしてこれらの結果は、形態的要素が失われるので細胞診のようなインパクトがない。FISH 法により遺伝子異常を検出する方法も開発されているが、これも費用や手技の面で一般化は難しい。

われわれは尿細胞診の良悪性鑑別能力の向上に関して、尿中に出現する異型細胞の形態所見を損なわず、なおかつ簡便な手技で客観的情報を付加できるという利点のある免疫染色が一番導入しやすいと考えた。しかし、いまのところ客観的に膀胱癌の存在を示唆できるような免疫細胞化学的なマーカーについてはあまり研究されていないため、今回、尿細胞診の良悪性鑑別に有用なマーカーの検索を行った。

### 基礎検討

尿細胞診の良悪性鑑別に有用なマーカーを検索するためにまず、組織標本を用いて基礎検討を行った。対象は当院で TUR により切除された 20 例の尿路上皮癌組織と 9 例の尿路上皮癌の既往のない解剖例の膀胱上皮組織のパラフィン包埋切片である。基礎検討では尿路上皮癌での発現が報告されている蛋白について選択し、組織標本に対し Epidermal growth factor receptor (EGFR: クローン 31G7 および 113)、p53、HER2、p504s、ser473 リン酸化 Akt 抗体の 6 種類の免疫染色を行った。

**EGFR**: 代表的な癌遺伝子の 1 つで、さまざまな癌の増殖に関与すると言われ、その遺伝子変異と肺癌の治療薬イレッサの効果との関連で最近注目されている。尿路上皮癌では癌の進行に伴って過剰発現していることが知られている。

**p53**: 多くの癌で異常が指摘されている分子で、消化器癌などの客観的診断にすでに応用されその有用性が認められてきている。尿路上皮癌については、p53 は悪性度や進行度と正相関し、予後不良因子として報告されている。

**HER2**: EGFR と同類のレセプター分子である。乳癌治療薬ハーセプチンとの関連で、この HER2 の発現を調べる免疫染色キットが、現在一般病院でも使用されている。

**p504s**: 前立腺の異型成や癌で特異的に発現していると注目される分子で、前立腺癌の診断には不可欠なものとなりつつある。

**p-AKT (ser473)**: リン酸化 AKT は EGFR などのレセプター分子の下流で活性化する蛋白の 1 つである。

生検標本でのそれぞれの染色で、陽性細胞が癌組織のどのくらいを占めていたかを調べると図1のようになり、EGFRのクローン31G7（以下EGFR）とp53での陽性率が高いことがわかった。図2に染色例を示した。p53は上皮細胞の核に染色された。非上皮細胞には全く反応しなかった。非癌部の上皮細胞でも陽性細胞が見られたが、その数は癌部より少なかった。解剖例では全く反応は見られなかった。EGFRは上皮細胞の細胞膜に線状に反応した。非上皮細胞には全く反応しなかった。解剖例では少数例の基底部を除いて全く反応は見られなかった。この結果、EGFRとp53が尿細胞診の良悪性鑑別に有用である可能性が示された。

ところで、さらに症例を増やして検討したところ、手術標本における浸潤癌症例では、腫瘍周囲や尿管部の正常に見えるような場所においてもEGFRとp53の過剰発現が認められ、癌が発生する患者の尿路組織では、発ガンに関わる因子に暴露されることによって組織の広範囲にEGFRとp53が恒常的に過剰発現していることがわかった。

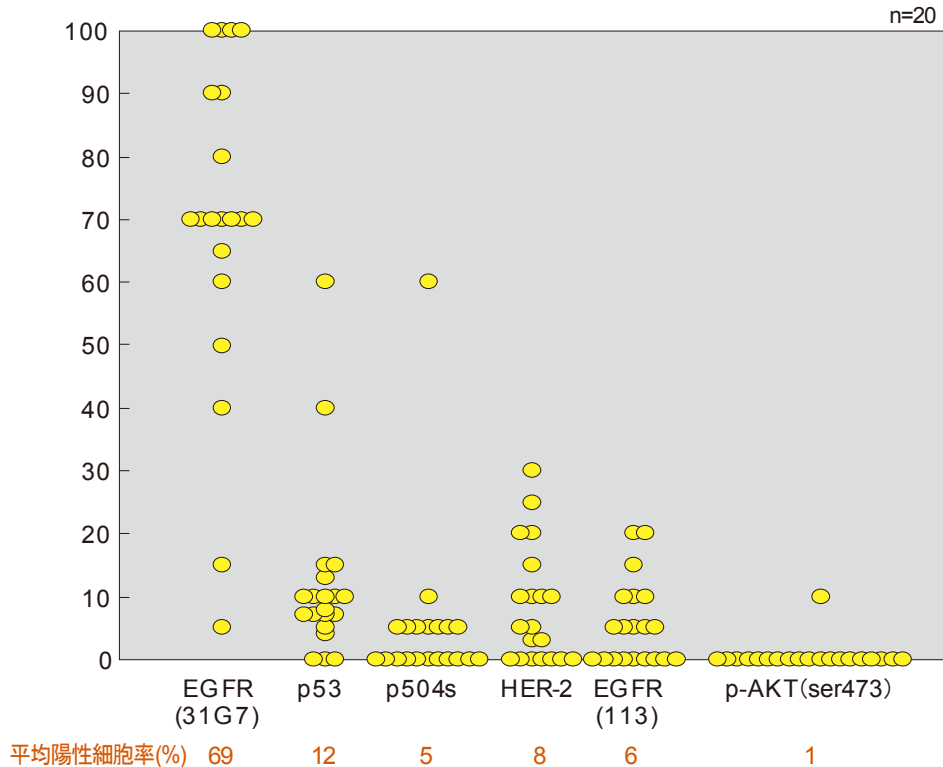


図1 生検組織標本における腫瘍細胞の陽性率  
解剖例ではすべての蛋白がほとんど染まらなかった。

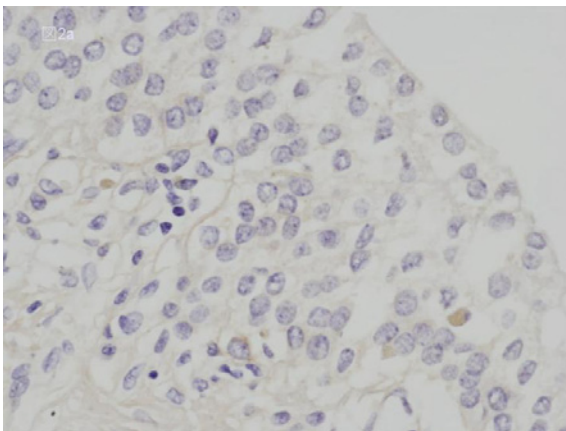


図2a 解剖例におけるEGFR  
陽性の反応は見られない。

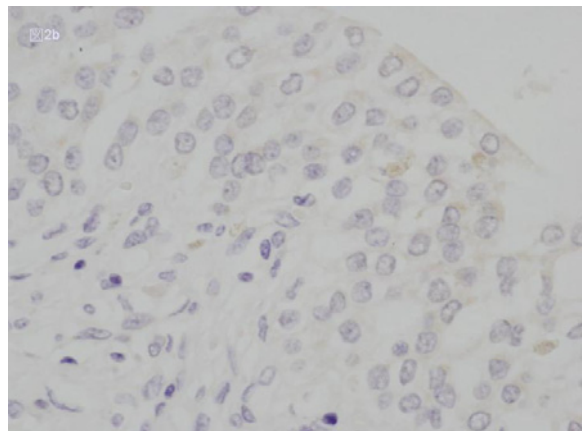


図2b 連続切片におけるp53  
陽性の反応は見られない。



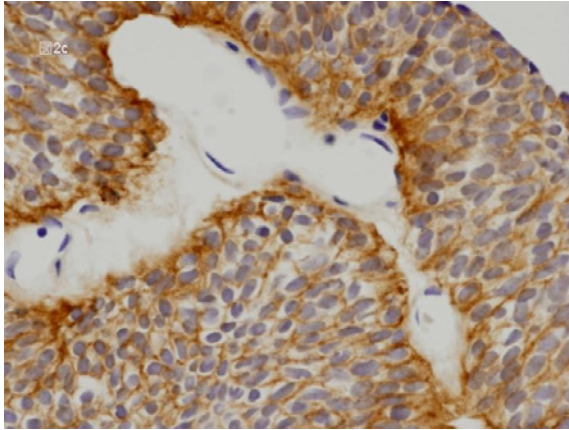


図 2c 非浸潤性尿路上皮癌における EGFR  
腫瘍細胞の膜に沿って強い反応が見られる。

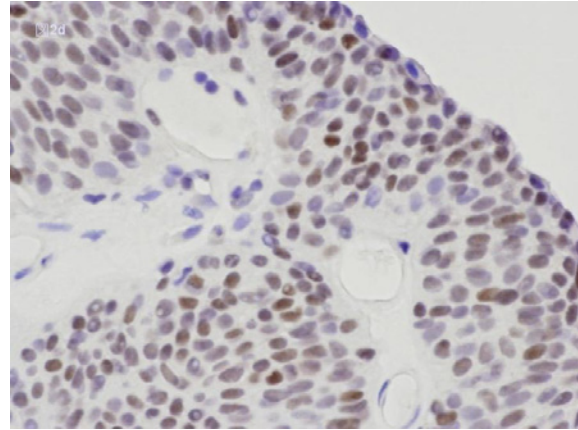


図 2d 連続切片における p53  
腫瘍細胞の核に反応が見られる。

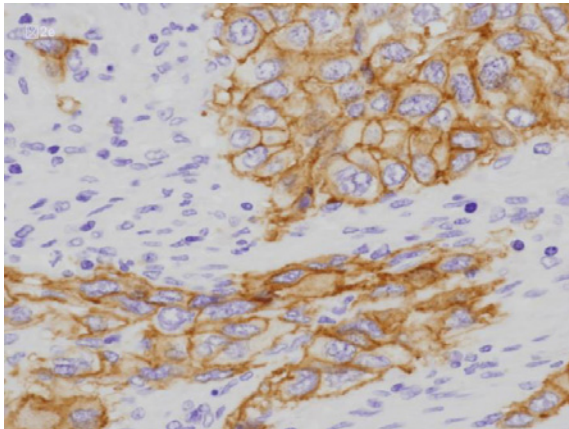


図 2e 浸潤癌例における EGFR  
図 2c と同様の反応が認められる。

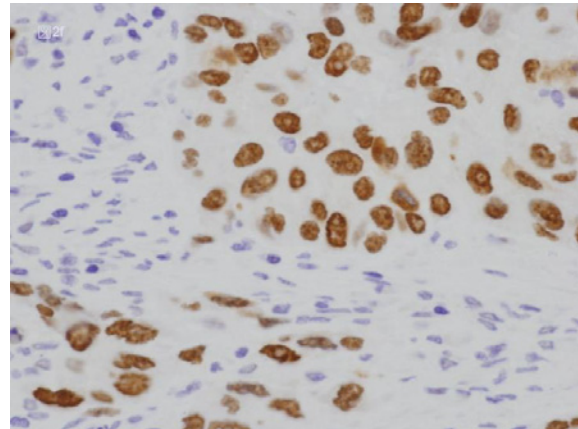


図 2f 連続切片における p53  
腫瘍細胞の核に反応が見られる。図 2d よりもその反応は強く彌慢性である。

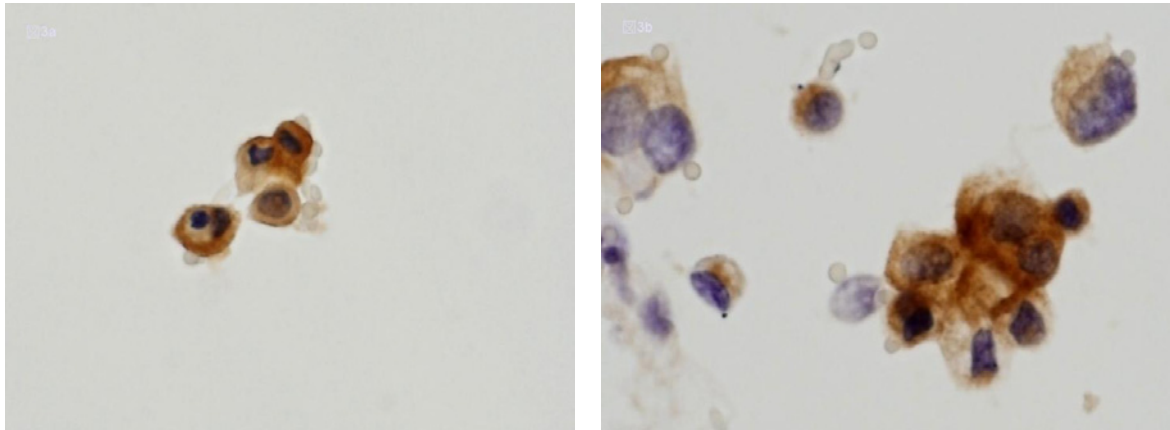
### 尿細胞診標本への応用

この基礎検討の結果に基づき、日常検査に提出された尿細胞診標本へ EGFR、p53 を応用してみた。染色は EGFR と p53 の抗体を混合したカクテル抗体にて染色を行った。尿細胞診標本は 2008 年の 1 月から 2 月の期間に採取された 64 例の自発尿の標本で、細胞診陽性（クラスⅢ以上）の 8 例のうち 3 例は同時期に採られた組織診断で癌と診断されている（残り 5 例は組織標本の裏づけがない）。細胞診陰性の 56 例のうち 37 例は膀胱癌の前歴のないもので、残り 19 例は膀胱癌の前歴があり経過観察中の症例であった。細胞診断については細胞診指導医も交えた複数により行われた。この検討に際しては、ニチレイバイオサイエンス社から発売されている抗 EGFR 抗体（クローン 31G7）、抗 p53 抗体（クローン DO-7）およびヒストファイン シンプルステイン MAX-PO (MULTI) を使用した。

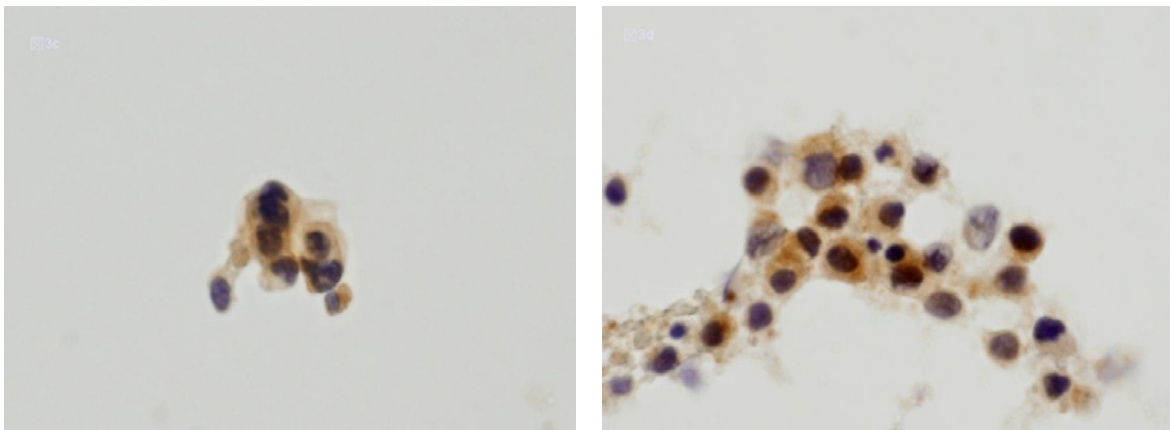
細胞標本では染色の結果、細胞の核、細胞膜および細胞質に反応が見られた（図 3）。細胞診で陽性と判定された 8 例中 7 例（88%）の異型細胞に反応があった。組織診断で悪性が確定している 3 例は全例が陽性だった。一方、良性と判定された 56 例中 6 例（11%）の異型の不明瞭な移行上皮細胞に発色があり、この 6 例のうち 4 例は尿路上皮癌の前歴のある患者の検体であった（表 1）。

組織診断に関しては、細胞増殖率と同様にサイトケラチン 20 (CK 20) が有用であるとの報告がある。確かに CK 20 に関しては幾つかの論文が報告され信憑性が高い。しかし、CK 20 は尿路上皮の表層にあるアンブレラ細胞に反応することが知られており、これを尿細胞診標本に応用する場合、非常に判定を困難にする可能性がある。今回、実際に尿細胞診標本に CK20 染色を行うと散在性に出現するアンブレラ細胞に強く反応してしまい、異型細胞の判定は困難となった（図 4）。一方、今回検討した EGFR の発現は、正常組織では基底部に限られるため正常の自発尿では反応する細胞は出現しにくいと思われた。

また、良性と判定されたスメアで **EGFR**、**p53** を発現する細胞が観察された症例の半数以上が尿路上皮癌の前歴のある患者の経過観察中の検体であった。この理由としてはまず、浸潤癌での検討では非癌部や尿管部ですでに **p53**、**EGFR** を発現する症例があり、**EGFR**、**p53** 陽性細胞の出現は、形態的な異常が起きるまえの前癌状態を表している可能性が考えられる。別な理由としては炎症などの刺激により出現していることも考えられるが、この検討での **p53**、**EGFR** の発現と炎症所見とは関連がなかった。つまりこの検査は、形態学的に異型を検出できない細胞の中から前癌状態にある細胞を拾い出せるかもしれない。



**図 3a,b** 尿細胞診カクテル染色における **EGFR**  
細胞診標本では細胞膜よりもむしろ細胞質に反応している。

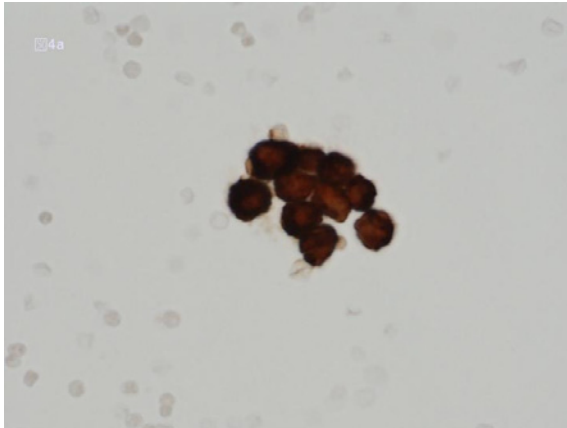


**図 3c,d** 尿細胞診カクテル染色における **p53**  
組織標本と同様に核に反応している。

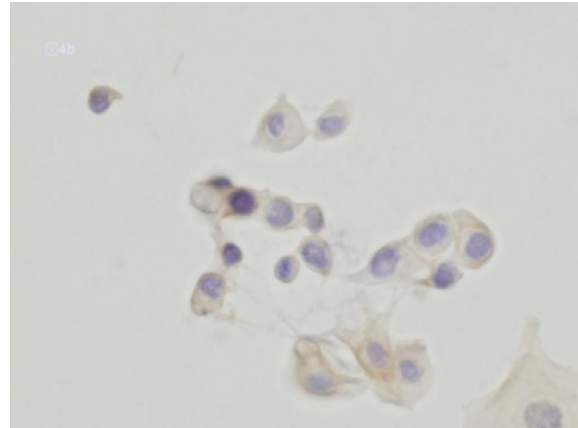
**表 1** 尿細胞診標本におけるカクテル抗体の陽性率

	陽性例 (%)	陽性の抗体		両方
		p53	EGFR	
<b>細胞診陽性例</b>				
n=8	7(88)*	1	3	3
組織診で悪性が確認されている (n=3)	3(100)	1	0	2
組織診がまだ行われていない (n=5)	4(80)	0	3	1
<b>細胞診陰性例</b>				
n=56	6(11)*	2	3	1
悪性の前歴なし (n= 37)	2(5)	1	1	0
悪性の前歴がある (n=19)	4(21)	1	2	1

\*Fisher's test p<0.0001



**図 4a 尿細胞診 CK20 染色**  
異型のない上皮細胞にも強く反応し紛らわしい。



**図 4b 同一例におけるカクテル染色**  
紛らわしい反応は見られない。

### まとめ

今回の検討では、**p53**、**EGFR** は正常な膀胱組織では発現がほとんどなく、悪性化すると高率に過剰発現することが組織標本での検討で明らかになった。細胞診標本ではこれらのカクテルの免疫染色を行うことで悪性のスメアの大部分の異型細胞に陽性所見があり、細胞診標本上の悪性細胞を客観的に検出することが出来た。良悪性の判定の困難なスメアに対しこの方法を用いることで、形態学的判定の補助に有用となる可能性があり、手技も簡単なので一般病院でも検査導入が容易である。以上のように尿細胞診標本に **p53**、**EGFR** のカクテルの免疫染色を行うことは、良悪性判定の補助として実用的であると考えられる。