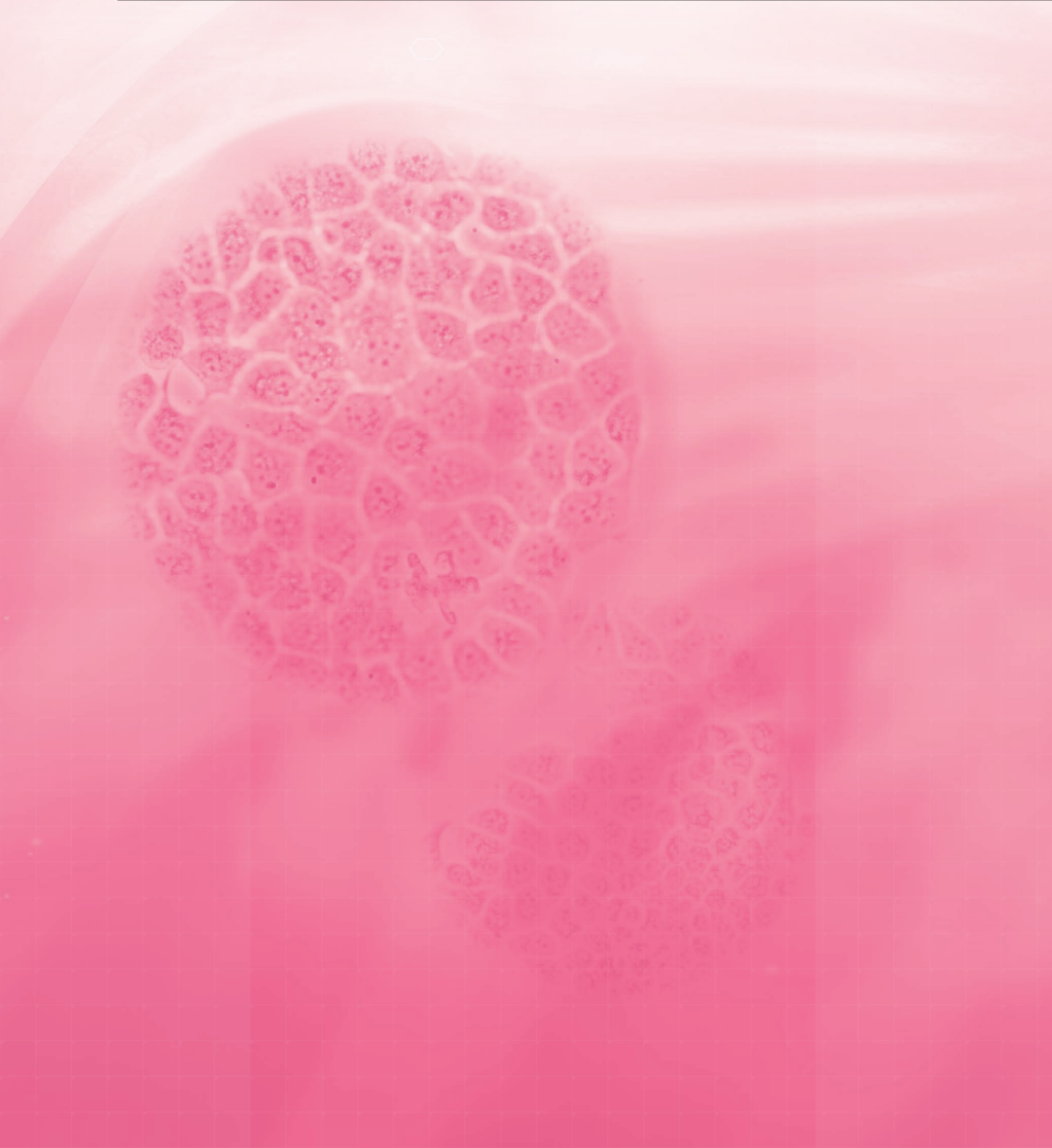


乳癌リンパ節転移巣における CK19蛋白質低(無)発現とOSNA法の成績



目 次

- ▶ はじめに
- ▶ CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の発生頻度
- ▶ CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節に対するOSNA法の成績
- ▶ まとめと考察

【参考情報】

1. 原発巣におけるCK19蛋白質低(無)発現例の発生頻度と特徴
 - 1.1 OSNA 法開発段階での検討
 - 1.2 文献報告
2. 原発巣におけるCK19蛋白質発現とリンパ節転移
 - 2.1 リンパ節転移有無との関係
 - 2.2 リンパ節転移巣におけるCK19蛋白質発現との関係
3. CK19蛋白質発現量とCK19mRNA発現量の関係

はじめに

サイトケラチン 19 (CK19) は、上皮性細胞で共通に発現している細胞骨格を構成する低分子蛋白質であり、各種の上皮由来癌細胞のマーカーとして用いられている。大部分の乳癌の原発巣およびリンパ節転移巣では、CK19 蛋白質の発現が一様に認められ、免疫染色によって CK19 蛋白質が検出されることが示されているが、稀に CK19 蛋白質の発現量が少ないケース（以下、低発現）、または、CK19 蛋白質が全く発現していないケース（以下、無発現）が存在する。

OSNA 法は、CK19 の mRNA をマーカーとしてリンパ節転移の陽性・陰性を判定する分子生物学的な癌転移検査法であり、診療の現場で広く用いられている。しかしながら、上述のような CK19 蛋白質が低発現または無発現の癌細胞（転移巣）を有するリンパ節（以下、CK19 蛋白質低（無）発現転移陽性リンパ節）においては、CK19 mRNA 発現量も少ないことが予想される。すなわち、CK19 蛋白質低（無）発現転移陽性リンパ節に対しては、癌細胞が存在するにもかかわらず、OSNA 法では誤って陰性と判定してしまう（以下、偽陰性）リスクがあるものと考えられる。

本資料では、乳癌における CK19 蛋白質低（無）発現転移陽性リンパ節の発生頻度と、それらのリンパ節に対する OSNA 法の判定成績を、病理検査法（H&E 染色と CK19 免疫染色を併用）を対照とした OSNA 法の臨床性能評価試験の結果に基づいて報告する。

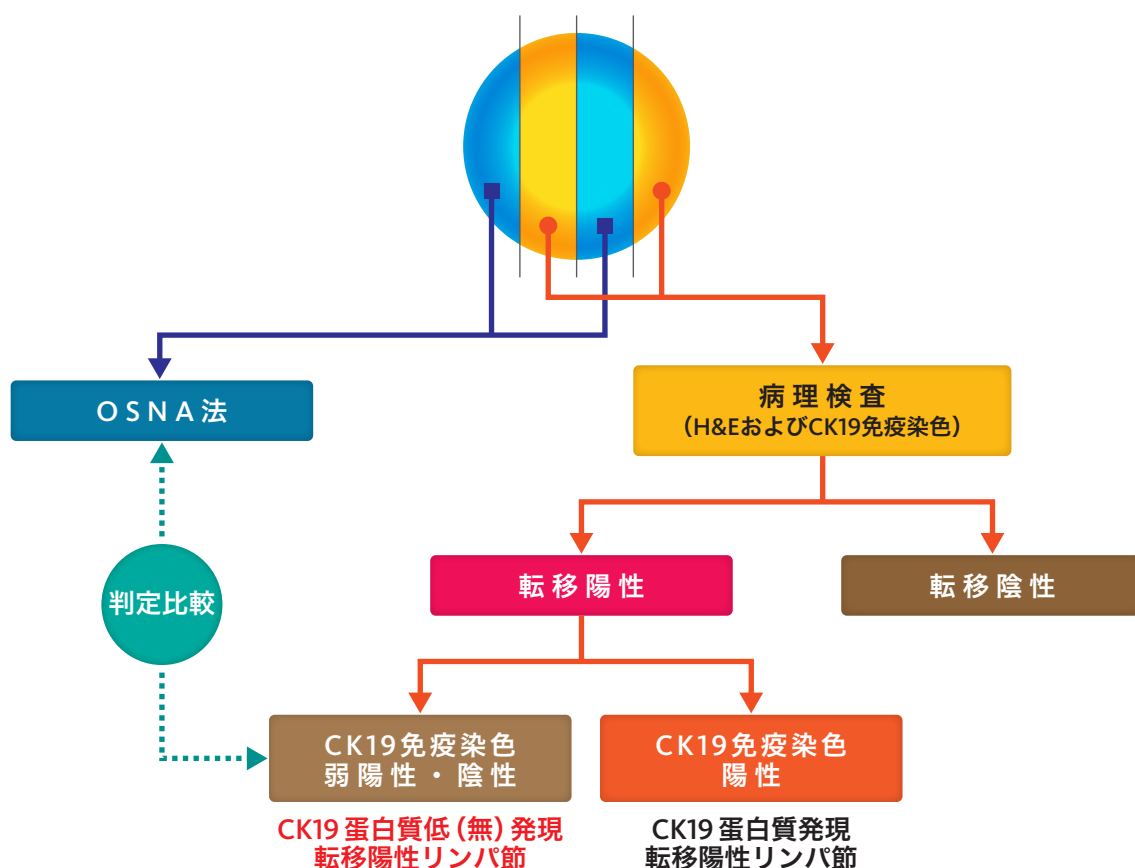


図. CK19蛋白質低（無）発現転移陽性リンパ節に対する OSNA 法判定成績の検討のフローチャート

CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の発生頻度

これまでに4つの臨床性能評価試験において、CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の発生頻度が報告されている^{1) 2) 3) 4)}。これらの報告をまとめると、検索された全てのリンパ節1,654個中、CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節は7個(0.4%)であった(表1)。また、転移陽性リンパ節に占めるCK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の割合は2.1%(329個中7個)であった。なお、症例数ベースでは、合計595例中5例(0.8%)の発生頻度であった。

CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節に対するOSNA法の成績

上述の臨床性能評価試験において、OSNA法は、CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節7個のうち4個を陽性と判定し、3個を陰性と判定した(OSNA法陽性率57.1%)(表1)。すなわち、CK19蛋白質低(無)発現が原因と考えられるOSNA法偽陰性リンパ節は、転移陽性リンパ節329個のうち3個であった(0.9%)。全リンパ節に対するOSNA法偽陰性例の発生頻度は1,654個中3個(0.18%)であり、症例数ベースでは595例中3例(0.5%)であった。

なお、OSNA法偽陰性例3例のうち1例については、CK19蛋白質低(無)発現を原因とする偽陰性ではなく、微小な転移巣が病理検査に供されたブロックのみに局在していた(OSNA法に供したブロックには転移巣が含まれていなかった)ことが原因であったと報告されている⁴⁾。

表1. CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の頻度とOSNA法の判定結果

文 献	総リンパ節数 (症例数)	転移陽性 リンパ節数	CK19蛋白質低(無)発現 転移陽性リンパ節数 (症例数)	CK19蛋白質低(無)発現 転移陽性リンパ節に対する OSNA法の判定内訳	
				陽性	陰性
Tsujimoto M, et al. ¹⁾	325 (101)	45	2 (1)	2	0
Schem C, et al. ²⁾	343 (93)	106	1 (1)	1	0
Tamaki Y, et al. ³⁾	574 (198)	100	3 (2)	1	2
Snook KL, et al. ⁴⁾	412 (203)	78	1* (1)	0	1*
合 計	1654 (595)	329	7 (5)	4	3

*このリンパ節は、CK19蛋白質低(無)発現が原因ではなく、微小な転移巣が病理検査に供したブロックに局在したために、OSNA法では陰性と判定されたと報告されている。

まとめと考察

CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の発生頻度は全リンパ節の約0.4%であり、また、転移陽性リンパ節に占める割合は約2%と必ずしも高くないと考えられた。しかしながら、OSNA法では、CK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節を約43%の確率で陰性と判定してしまうことが示された。すなわち、OSNA法では、転移陽性リンパ節のうち約1%に対して、CK19蛋白質低(無)発現を原因とする偽陰性をもたらす可能性がある。

OSNA法の実運用にあたっては、これらのCK19蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節の存在およびOSNA法の偽陰性のリスクを認識した上で、必要に応じて、術前の生検組織におけるCK19蛋白質の発現状況の確認や、他のリンパ節転移検索方法(病理検査法、捺印細胞診)との併用を考慮することが推奨される。

1. 原発巣におけるCK19蛋白質低(無)発現例の発生頻度と特徴

1.1 OSNA法開発段階での検討

OSNA法の開発段階において、CK19のマーカーとしての妥当性を検討するために、乳癌原発巣の組織型別にCK19蛋白質の発現頻度を検討した（シスメックス株式会社と大阪けいさつ病院の共同研究、シスメックス(株)社内資料）。本検討では、免疫染色による腫瘍部の染色が50%以上の場合をCK19蛋白質陽性とした。

その結果、全体でのCK19蛋白質発現頻度は93.6%（47例中44例）であり、組織型別では、浸潤性乳管癌では35例全例、特殊型乳癌では12例中9例で、CK19蛋白質の発現が認められた（表2）。すなわち、CK19蛋白質は大部分の組織型において発現していた。興味深いことに、CK19蛋白質陰性例3例の組織型は、髄様癌、腺様嚢胞癌、骨・軟骨化生を伴う癌が各々1例ずつであったが、これらはいわゆるトリプルネガティブ乳癌と呼ばれる一群に分類される組織型であった。

表2. 各種組織型におけるCK19蛋白質の発現状況

組織型		CK19蛋白質陽性例* ／全例
浸潤性乳管癌 (35例)	乳頭腺管癌	11／11
	充実腺管癌	11／11
	硬癌	13／13
特殊型 (12例)	粘液癌	3／3
	髄様癌	0／1
	浸潤性小葉癌	3／3
	腺様嚢胞癌	0／1
	アポクリン癌	2／2
	骨・軟骨化生を伴う癌	1／2
合 計		44／47

*CK19蛋白質陽性例：免疫染色による腫瘍部の染色が50%以上の場合

1.2 文献報告

主な文献報告におけるCK19蛋白質低(無)発現例の発生頻度を、表3に示した。文献によって用いた抗体、判定基準、方法が異なることや、対象症例に偏りがあることなどから、一概には述べられないが、乳癌全体のうち、およそ10%程度がCK19蛋白質低(無)発現であると考えられる。

表3. 文献報告におけるCK19蛋白質低(無)発現例の発生頻度

文献	CK19蛋白質低(無)発現例／全例	CK19蛋白質低(無)発現例の割合	特記事項
Abd El-Rehim DM, et al. ⁵⁾	132／1838	7.2%	TMAによる検討
Willipinski-Stapelfeldt B, et al. ⁶⁾	298／2219	13.4%	TMAによる検討
Chu PG, et al. ⁷⁾	10／300	3.3%	複数の文献報告の結果をまとめた成績
Alvarenga CA, et al. ⁸⁾	13／116	11.2%	特殊型乳癌のみ TMAによる検討
Parikh RR, et al. ⁹⁾	27／132	20.5%	若年乳癌(49歳以下)のみ TMAによる検討
Moinfar F, et al. ¹⁰⁾	17／150	11.3%	非浸潤性乳管癌のみ TMAによる検討
辻本らの報告 ¹¹⁾	23／596	3.9%	代表断面による検討
浅川らの報告 ¹²⁾	11／300	3.7%	代表断面による検討
Vilardell F, et al. ¹³⁾	6／197	3.0%	針生検サンプルによる 検討

*TMA : tissue microarray

これまでに報告されているCK19蛋白質低(無)発現乳癌の主な特徴は、以下の通りである。

- 原発巣におけるCK19蛋白質発現と組織型の相関性については様々な報告がある。Willipinski-Stapelfeldtらの報告では、組織型分類(乳管癌、小葉癌、その他)との相関性は認められていない⁶⁾。また、Alvarengaらは、116例の特殊型乳癌(微小乳頭癌、アポクリン癌、管状癌、粘液癌、髄様癌、乳頭癌、小葉癌、骨・軟骨化生を伴う癌、混合型)で検討し、いずれの組織型においてもCK19蛋白質が高頻度で発現していたことから、CK19蛋白質は組織型によらず広く発現している可能性を示唆している⁸⁾。一方で、Abd El-Rehimらの詳細な組織型分類による検討では、CK19蛋白質低(無)発現例の頻度は、髄様癌では45例中12例、腺様嚢胞癌では5例中4例、化生癌では3例中2例、紡錘細胞癌では1例中1例と報告されており⁵⁾、これらの組織型では、一般的な浸潤性癌、小葉癌、その他の特殊型乳癌に比べてCK19蛋白質低(無)発現例の頻度が高いという可能性が示唆される。
- CK19蛋白質低(無)発現は、核異型高度や低分化、エストロゲンレセプター(ER)陰性またはプロゲステロンレセプター(PgR)陰性との相関性が報告されている⁵⁾⁶⁾。また、トリプルネガティブ乳癌(ER陰性・PgR陰性・HER2陰性)においても、非トリプルネガティブ乳癌に比べてCK19蛋白質低(無)発現例が多いことが報告されている⁹⁾。
- Asakawaらは、29例のCK19蛋白質低(無)発現例と46例の対照群(CK19蛋白質発現例)との間で各種マーカー蛋白質の発現状況を比較した検討において、basal-likeマーカーが、前者では21%に、後者では2%に認められたことを示し、CK19蛋白質低(無)発現例でbasal-likeマーカーの発現頻度が高かったことを報告している¹⁴⁾。

2. 原発巣におけるCK19蛋白質発現とリンパ節転移の関係

2.1 リンパ節転移有無との関係

原発巣におけるCK19蛋白質発現とリンパ節転移の有無に関しては有意な相関性は認められていない⁵⁾⁶⁾⁹⁾。

2.2 リンパ節転移巣におけるCK19蛋白質発現との関係

原発巣におけるCK19蛋白質発現とリンパ節転移巣におけるCK19蛋白質発現の関係性は明らかになっていない。

Tamakiらは、リンパ節転移巣がCK19蛋白質低発現であることを確認した2症例は、原発巣においてもCK19蛋白質低発現であったと報告している³⁾。一方、Asakawaらは、原発巣CK19蛋白質低(無)発現かつリンパ節転移陽性の9例のうち、6例はリンパ節転移巣ではCK19蛋白質が発現していたと報告している¹⁵⁾¹⁶⁾。これらの結果からは、原発巣でCK19蛋白質低(無)発現の例においては、リンパ節転移巣でもCK19蛋白質低(無)発現が維持されるケースと、リンパ節転移巣ではCK19蛋白質が高発現を示すケースが存在することが示唆される。

なお、Asakawaらは、原発巣CK19蛋白質発現かつリンパ節転移陽性の24例については、24例ともリンパ節転移巣でもCK19蛋白質が発現していたと報告しており¹⁶⁾、原発巣でCK19蛋白質発現かつリンパ節転移巣ではCK19蛋白質低(無)発現となるケースは稀であると考えられる。

3. CK19蛋白質発現量とCK19mRNA発現量の関係

上述の通り、CK19 蛋白質の発現については多くの報告がされているが、これらの報告に基づいて OSNA 法における偽陰性のリスクを検討する上では、OSNA 法がマーカーとしている CK19mRNA の発現と CK19 蛋白質の発現の違いを考慮する必要がある。

たとえ mRNA レベルでは発現していても、翻訳段階での制御によって蛋白質レベルでは低(無)発現となる可能性が考えられる。また、蛋白質と mRNA では、検出法とその検出感度が異なるため、免疫染色では CK19 蛋白質が十分に検出されず低(無)発現と判定されても、OSNA 法では陽性と判定するのに十分な量の CK19mRNA が検出される可能性がある。

実際に、上述の通り、これまでの臨床研究^{1) 2) 3) 4)}においても、CK19 蛋白質低(無)発現転移陽性リンパ節 7 個に対して、OSNA 法は 4 個を陽性と判定していた。

引用文献

- 1) Tsujimoto M, et al., One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2007; 13:4807-16.
- 2) Schem C, et al., One-step nucleic acid amplification-a molecular method for the detection of lymph node metastases in breast cancer patients; results of the German study group., *Virchows Arch.* 2009; 454:203-10.
- 3) Tamaki Y, et al., Molecular detection of lymph node metastases in breast cancer patients: results of a multicenter trial using the one-step nucleic acid amplification assay. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:2879-84.
- 4) Snook KL, et al., Multicentre evaluation of intraoperative molecular analysis of sentinel lymph nodes in breast carcinoma., *Br J Surg.* 2011; 98:527-35.
- 5) Abd El-Rehim DM, et al., Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma., *J Pathol.* 2004; 203:661-71.
- 6) Willipinski-Stapelfeldt B, et al., Changes in cytoskeletal protein composition indicative of an epithelial-mesenchymal transition in human micrometastatic and primary breast carcinoma cells. *Clin Cancer Res.* 2005; 11:8006-14.
- 7) Chu PG, et al., Keratin expression in human tissues and neoplasms., *Histopathology.* 2002; 40:403-39.
- 8) Alvarenga CA, et al., Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol.* 2011; 64:493-7.
- 9) Parikh RR, et al., Outcomes in young women with breast cancer of triple-negative phenotype: the prognostic significance of CK19 expression., *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 70:35-42.
- 10) Moinfar F, et al., Use of keratin 35betaE12 as an adjunct in the diagnosis of mammary intraepithelial neoplasia-ductal type--benign and malignant intraductal proliferations., *Am J Surg Pathol.* 1999; 23:1048-58.
- 11) 辻本正彦, 他, 第8回 SNNS研究会学術集会, 一般演題 O-7 OSNA法/乳癌リンパ節転移迅速診断 -CK19陰性乳癌の検討-, 2006
- 12) 浅川英輝, 他, 第8回 SNNS研究会学術集会, 一般演題 O-8 サイトケラチン19発現陰性乳癌の頻度と組織学的特徴についての検討, 2006
- 13) Vilardell F, et al. Importance of assessing CK19 immunostaining in core biopsies in patients subjected to sentinel node study by OSNA. *Virchows Arch.* 2012; 460:569-75.
- 14) Asakawa H, et al. Application of cytokeratin 19 to molecular diagnosis of sentinel lymph nodes: On phenotypic and immunophenotypic characteristics of breast cancers with no or low cytokeratin 19 expression. *Ann Surg Oncol.* 2008; 15(Suppl. 1):33
- 15) 小俣二郎, 他, 第9回 SNNS研究会学術集会, 一般演題 O-2 サイトケラチン (CK)19低発現乳癌症例における原発巣と転移巣でのCK19発現の変化, 2007
- 16) Asakawa H, Tsuda H, Tsujimoto M, et al. Manuscript in preparation

発行元

シスメックス株式会社

ライフサイエンス事業推進本部

神戸市西区室谷1-3-2 〒651-2241

Tel 0120-413-034

<http://lifescience.sysmex.co.jp>

Copyright © 2012 Sysmex Corporation

