

高分化型類内膜癌における間質構成細胞の 免疫組織化学的評価

細川翔*, 則松良明*

Immunohistochemical evaluation of stromal component cells in well-differentiated endometrial carcinoma

Sho HOSOKAWA*, Yoshiaki NORIMATSU*

Abstract

The endometrium is a highly dynamic tissue, and its structural changes include epithelial cells, intimal stromal cells, and blood vessels. Here, we evaluated the endometrial stroma using immunohistochemical and special staining to clarify the types and distribution of cells. Double immunohistochemical staining was performed using CD10, CD31, CD146, and α SMA as markers of endometrial vascular stroma in 10 patients with highly differentiated endometrial carcinoma. Additionally, the positional relationship between the basement membrane and perivascular cells was evaluated using double PAS reaction. CD10-positive stromal and CD31-positive vascular endothelial cells were found along the fibrous bundles supporting well-differentiated endometrial carcinoma and inner vessel lumen, respectively. The cells surrounding the endothelial cells expressed CD146 and α SMA, suggesting that they were pericytes surrounded by a basement membrane. Eventually, a comparative analysis with other pathological conditions must be performed, and its application in endometrial cytology is expected.

Keywords: 子宮内膜, 免疫組織化学染色

序 文

子宮体部の内側を覆う子宮内膜は、月経サイクルを通して再生、分化、脱落を繰り返す非常に動的な組織である¹⁾。また、ホルモン環境に応じて増殖期、月経期、分泌期、さらには閉経後の萎縮内膜と、全ての時期で細胞形態が変化し、その影響は上皮細胞に留まらず内膜間質細胞、血管などにも及ぶ^{2,3)}。

加えて子宮内膜は、ホルモン環境異常、炎症、腫瘍性変化などによっても様々な構造変化を示す^{4,5)}。子宮体部癌の9割を占める類内膜癌では、複雑な乳頭状構造、腺管の癒合、篩状構造などが観察され、病変の進行とともに血管を含む間質の新生を伴いながら腺管が複雑に増生する⁶⁾。これらの組織学的背景は細胞診検体にも反映され、出現する不整形な集塊には、Back to Back構造、篩状構造、集塊を貫

く小管状束の血管などが観察される^{6,7)}。また、子宮内膜細胞は化生変化をしばしば起こすため、個々の細胞所見だけでなく、組織構造の変化を反映する集塊の構造異型、および集塊を支持する血管性間質を注意深く観察することが重要となる。

我々はこれまでに、高分化型類内膜癌の血管性間質について、臨床検査でも主要な血管内皮細胞マーカーであるCD31などを用いた免疫組織化学的評価をおこなったが、マーカーの組み合わせが少なく、構成細胞の十分な同定には至らなかった⁸⁾。我々は、特殊染色と免疫組織化学染色の組み合わせを工夫することで、血管性間質を構成する細胞の同定が可能になると考えた。

以上より、本研究では高分化型類内膜癌の支持性間質を構成する細胞の種類と分布を明確にすることを目的に、免疫組織化学染色及び特殊染色による評価を実施した。

*愛媛県立医療技術大学保健科学部臨床検査学科

方 法

1. 患者選択

2018年4月から2020年12月まで、福井大学医学部附属病院の産婦人科外来において、不正性器出血などの婦人科的症状および/または画像診断(経膈超音波検査)での子宮内膜厚異常(5mm以上)を有し、内膜癌のリスク増加を示す患者に対し、書面によるインフォームドコンセントを得た上で登録した。病理組織症例は子宮内膜組織生検において診断された高分化型類内膜癌10例(平均年齢:59.5歳)を用いた。なお、本研究は福井大学医学系研究倫理審査委員会(承認番号:20200012)、愛媛県立医療技術大学研究倫理審査委員会(承認番号:R4T-006)の審査・承認を受けて実施した。

2. 染色

1) CD10免疫組織化学染色

パラフィン切片(4 μ m)を3%過酸化水素水で処理し、内因性ペルオキシダーゼを不活化した後、抗原賦活液(Target Retrieval Solution pH9, [Agilent Technologies, Inc., USA])による賦活を98℃, 5分間実施した。自然冷却した標本をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸し、子宮内膜間質細胞マーカー抗CD10マウスモノクローナル抗体 [clone 56C6, ready-to-use, Agilent Technologies, Inc., USA] で室温・60分間処理した。次にPBSで3回洗浄した後、Histofine[®] Simple Stain[™] MAX PO MULTI [Nichirei Bioscience Inc., Tokyo]で室温・30分間処理した。再度PBSで3回洗浄した後、DAB基質キット[Nichirei Bioscience Inc., Tokyo]を用いて発色を行った。対比染色にはヘマトキシリンを用いた。

CD10発現の評価について、細胞質に茶褐色顆粒状の反応が観察された場合を陽性とした。

2) CD31, α SMA, CD146, CD10を組み合わせた免疫二重組織化学染色

本研究ではさらに、血管内皮マーカーCD31 (clone JA70A, ready-to-use, Agilent Technologies, Inc., USA), 血管平滑筋細胞の主マーカー α -平滑筋アクチン(α SMA) (クローン1A4, 希釈率1:20, Agilent Technologies, Inc., USA: 茶褐色), 周皮細胞の主マーカー CD146 (クローンEPR3208, 希釈率1:200, ab75769, Abcam plc, UK: 赤色), および子宮内膜間質細胞マーカーCD10による免疫二重組織化学染色を実施した。方法は、上記の免疫組織化学染色の手順で最初の抗原をDAB発色した後、標本を抗原賦活液(Target Retrieval Solution pH9, [Agilent Technologies, Inc., USA])で98℃, 5分間加熱した。自然冷却した標本をリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に浸し、一次抗体で室温・60分間処理した。次にPBSで3回洗浄し、

Histofine[®] Simple Stain[™] AP (MULTI)試薬を用いて室温で30分間処理した。再度PBSで3回洗浄した後、ファーストレッドII基質キット[Nichirei Bioscience Inc., Tokyo]で赤色発色した。対比染色にはヘマトキシリンを用いた。染色の組み合わせはCD31/CD10, CD31/CD146, および α -SMA/CD10とした。

CD31と α SMAの評価については、細胞質に茶褐色顆粒状の反応が観察された場合を陽性とした。CD10とCD146の評価について、細胞質に赤色顆粒状の反応が観察された場合を陽性とした。

3) α SMA/PAS-免疫特殊二重組織化学染色

パラフィン切片(6 μ m)について、 α SMA免疫組織化学染色を上記と同様の手順でDAB発色した後に、PAS反応を実施した。PAS反応の方法は、DAB発色後の標本を1%過ヨウ素酸水溶液で10分処理した後、水洗を挟み、シッフ試薬で15分処理した。次に亜硫酸水で置換した後、流水水洗で5分間発色した。対比染色にはヘマトキシリンを用いた。 α SMAの評価について、細胞質に茶褐色顆粒状の反応が観察された場合を陽性とした。PASの評価は、濃赤～赤紫色に発色した部位を陽性と判定した。

結 果

CD10免疫組織化学染色の結果、乳頭状に増殖した腫瘍細胞を支持する血管性間質の線維状細束に沿って陽性像(茶褐色)を示す細胞をみとめた(図1)。一方、間質内で血管構造を構成する血管内皮細胞、およびその周囲の細胞には陽性像はみとめなかった。

血管内皮細胞マーカーであるCD31とCD10の免疫二重組織化学染色の結果、CD10陽性(赤色)内部の血管内腔を裏打ちする血管内皮細胞にCD31 (茶褐色)陽性像が観察された(図2)。

CD31/CD146免疫二重組織化学染色の結果、血管内腔を裏打ちする血管内皮細胞にCD31陽性像(茶褐色)と、CD146(赤色)の共陽性像をみとめた(図2)。またその周囲に血管内皮細胞を取り巻くCD146陽性細胞(赤色)をみとめた。

α SMA /CD10免疫二重組織化学染色の結果、血管内腔を裏打ちする血管内皮細胞に陽性像はみとめず、それを取り巻く細胞に α SMA陽性像(茶褐色)をみとめた(図2)。また、血管外の線維状細束を構成する細胞の一部には、CD10 (赤色)と α SMAの共陽性像が点在して観察された。

α SMA/PAS免疫特殊二重組織化学染色の結果、血管内皮細胞を取り巻く α SMA陽性像(茶褐色)を包み込む膜状のPAS陽性(濃赤～赤紫)物質が観察された(図3)。

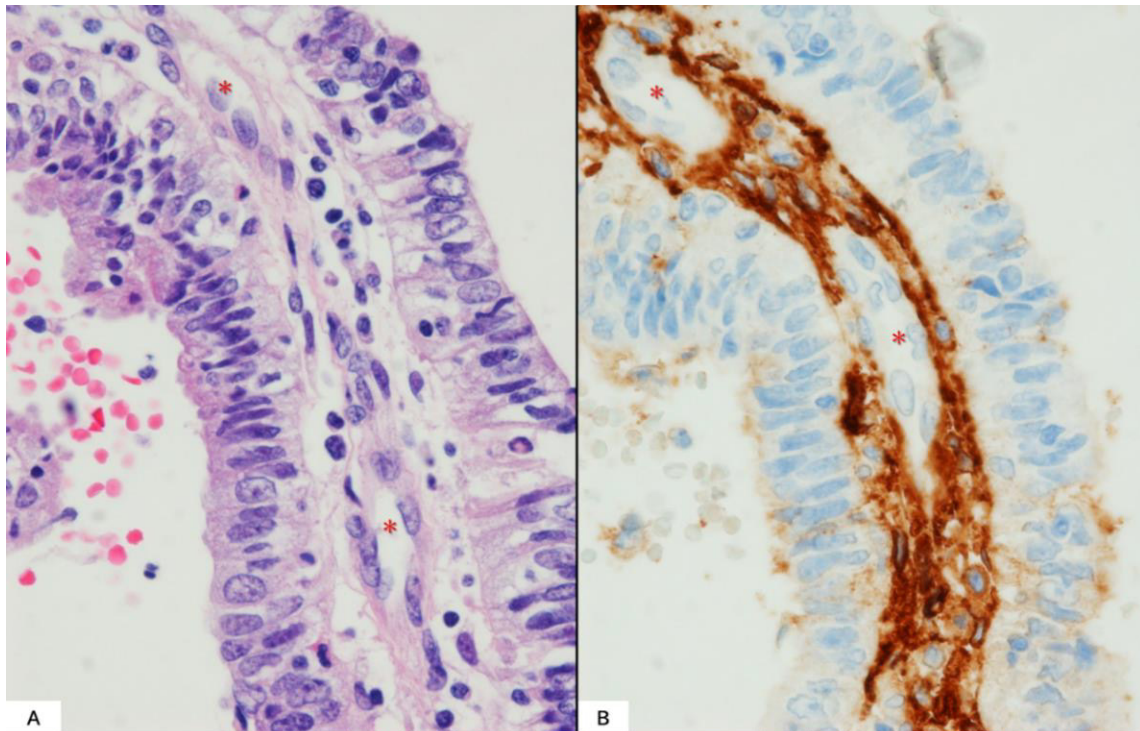


図1 高分化型類内膜癌における線維血管性間質のCD10免疫組織化学染色

乳頭管状増殖を呈する高円柱状の腫瘍細胞を支持する血管性間質の線維状細束。白血球や線維芽細胞など多様な細胞が存在し、線維の内部には血管構造(*)をみとめる(A)。線維状細束に沿って、CD10 陽性像(茶褐色)をみとめる。血管(*)を構成する細胞や内膜腫瘍細胞にはCD10陽性像はみとめられない。(B)(A: ヘマトキシリン・エオジン染色,B:CD10免疫組織化学染色, A, B:総合倍率400倍)

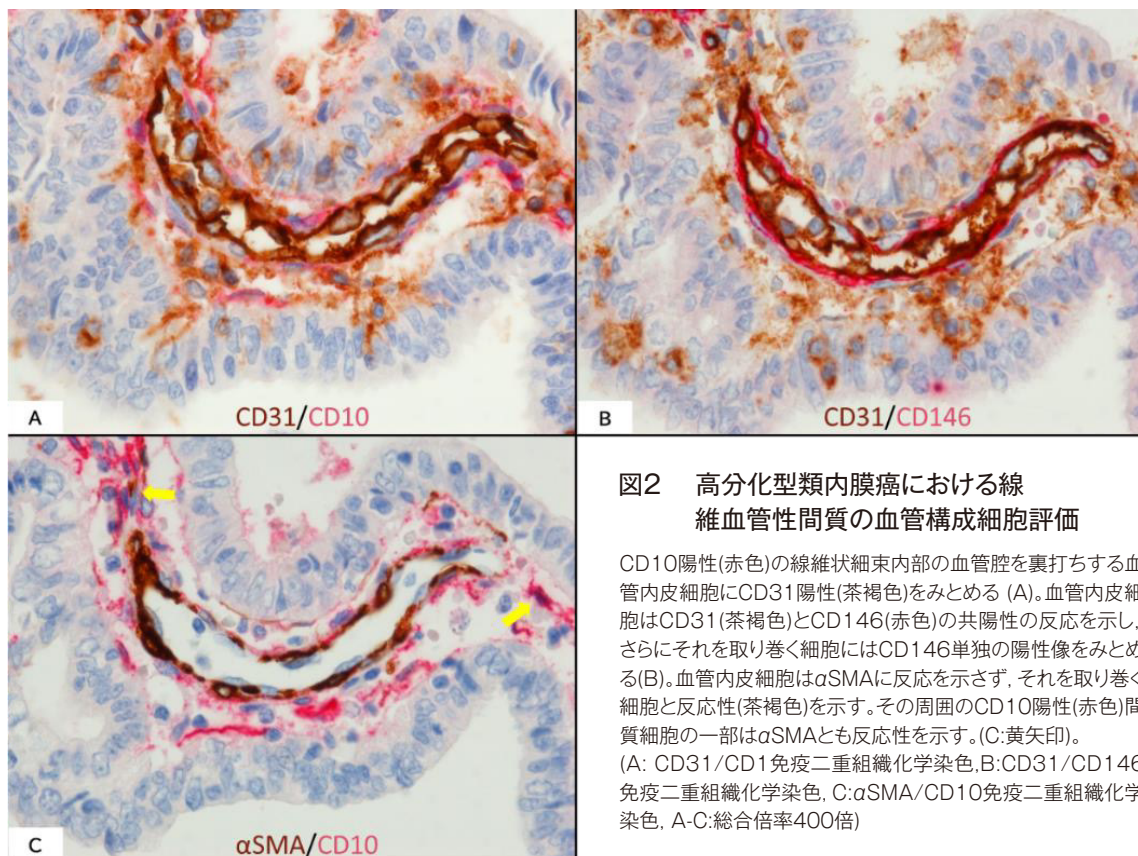


図2 高分化型類内膜癌における線維血管性間質の血管構成細胞評価

CD10陽性(赤色)の線維状細束内部の血管腔を裏打ちする血管内皮細胞にCD31陽性(茶褐色)をみとめる (A)。血管内皮細胞はCD31(茶褐色)とCD146(赤色)の共陽性の反応を示し、さらにそれを取り巻く細胞にはCD146単独の陽性像をみとめる(B)。血管内皮細胞は α SMAに反応を示さず、それを取り巻く細胞と反応性(茶褐色)を示す。その周囲のCD10陽性(赤色)間質細胞の一部は α SMAとも反応性を示す。(C:黄矢印)。

(A: CD31/CD10免疫二重組織化学染色,B:CD31/CD146免疫二重組織化学染色, C: α SMA/CD10免疫二重組織化学染色, A-C:総合倍率400倍)

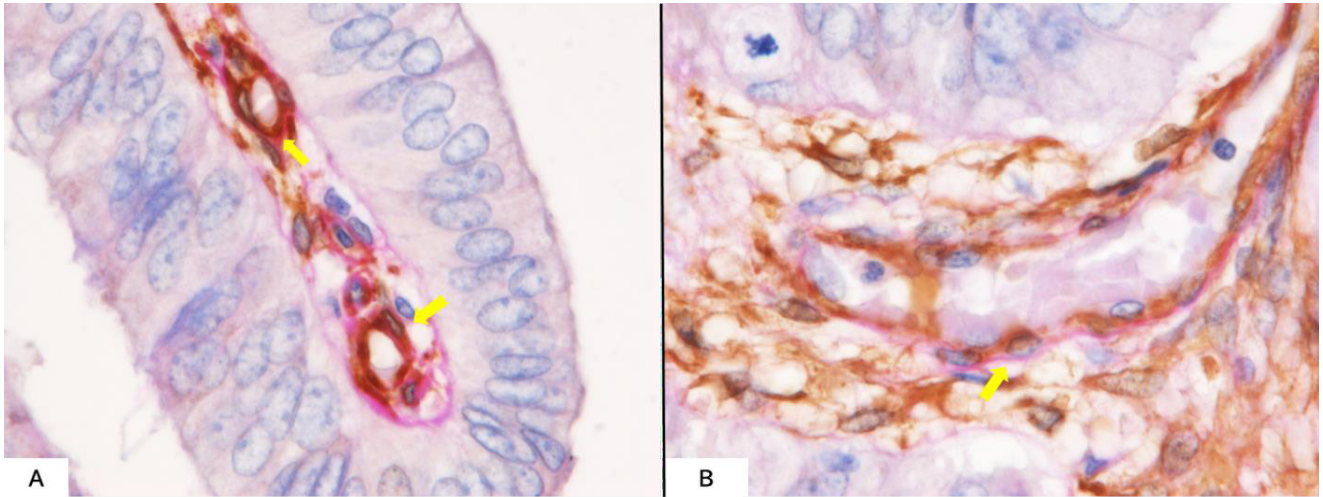


図3 高分化型類内膜癌における線維血管性間質の血管壁細胞評価

血管腔に沿って、 α SMA陽性像(茶褐色)を包み込む膜状のPAS陽性物質(濃赤～赤紫:黄矢印)をみとめる(A,B)。また血管周囲の一部の間質細胞に α SMA陽性像をみとめる(B)(A,B: α SMA/PAS免疫特殊二重組織化学染色, A,B:総合倍率600倍)



図4 本検討で実施した二重組織化学染色の組み合わせ

考 察

子宮内膜腺を裏打ちする支持性間質は、間質性線維芽細胞、血管構成細胞、および白血球などにより構成され、病態に応じて多様に変化する。本研究では、高分化型類内膜癌を対象に免疫組織化学染色を実施し、血管性間質を構成する細胞について評価を行った。

乳頭状に増殖する腫瘍細胞を支持する線維血管性間質の線維状細束に、子宮内膜間質細胞マーカーであるCD10の陽性細胞をみとめた(図1)。また、内部の微小な血管には、管腔内表面に沿って血管内皮細胞マーカーであるCD31の陽性細胞をみとめた(図2)。高分化型類内膜癌の細胞診検体で出現する不整形集塊を貫く小管状束は、このような血管性間質をコアとした組織構造を反映したものと推定される⁸⁾。そのため、立体的な集塊として出現する内膜細胞検体を

判定する上では、元の組織構造の構築について理解を深めておくことが重要である。

我々はさらに血管構成細胞についても注目した。微小な血管や毛細血管の血管内皮細胞周囲には血管壁細胞である周皮細胞が存在し、血管の発生、成熟、リモデリングにおいて重要な役割を果たす⁹⁾。周皮細胞の主なマーカーにはCD146が用いられ、血管内皮細胞と共通して発現を示す¹⁰⁾。高分化型類内膜癌を対象にCD31/CD146免疫二重組織化学染色を実施した結果、血管内皮細胞にCD31とCD146の共陽性像をみとめ、さらにCD146陽性細胞が内皮細胞を取り囲む像をみとめた。また α SMAは、同じく血管壁細胞である血管平滑筋細胞の主なマーカーであるが、周皮細胞でも共通して発現すると報告されている¹⁰⁻¹²⁾。 α SMA / CD10免疫二重組織化学染色の結果、血管内皮細胞を取り巻く α SMA陽性細胞をみとめた。周皮細胞は血管内皮細胞とともに基底膜に埋もれた形で存在する一方、血管平滑筋細胞

は基底膜を隔てて存在し、血管内皮細胞との直接の接触を持たない¹³⁾。 α SMA/PAS免疫特殊二重組織化学染色の結果、 α SMA陽性細胞を包み込む膜状のPAS陽性物質が観察された。以上より、高分化型類内膜癌の血管性間質の血管壁細胞の構成は周皮細胞が主体であることが示唆された。今回の検討では、特殊染色および免疫組織化学染色の組み合わせを増やすことで、線維血管性間質を構成する細胞の分布を明確にした(図4)。特に本研究では免疫組織化学染色だけでなく、PAS反応により基底膜を染色したことで、より詳細な評価が可能となった。

細胞診検体では、細胞が重積した集塊として出現するため、形態学的評価に苦慮する事例は少なからず発生する。それ故、組織構造を反映する細胞集塊において、その構成成分を検出することは細胞診判定の一助となる。近年、液状化検体細胞診の導入によって複数枚の標本作製が可能となり、免疫細胞化学染色を加味した判定が容易となった。今回行った染色の組み合わせは、血管構成細胞の評価に応用できることが示唆された。

本検討では高分化型類内膜癌を対象に、免疫組織化学染色及び特殊染色を行い、血管性間質の構成細胞を調査した。しかしながら実際には、免疫細胞や構成間葉系幹細胞に加え、腫瘍微小環境においては細胞癌関連線維芽細胞(CAF)なども参画し、より複雑な構成となる^{12, 14)}。CAFは腫瘍微小環境の中で活性化された線維芽細胞が、筋線維芽細胞の状態となり、 α SMAを発現する。今回の検討でも α SMAとCD10の共陽性を示す間質細胞が観察され、CAFへの変化が示唆された。今後は、マーカーおよび対象症例を拡充し、各病変との違いを明らかにするための追加の検討を行う。

引用文献

- 1) Gargett CE, Ye L (2012): Endometrial reconstruction from stem cells. *Fertil Steril*, 98, 11-20.
- 2) Holdsworth-Carson SJ, Menkhorst E, Maybin JA, et al. (2023): Cyclic processes in the uterine tubes, endometrium, myometrium, and cervix: pathways and perturbations. *Mol Hum Reprod*, 29, gaad012
- 3) Hong IS (2024): Endometrial Stem Cells: Orchestrating Dynamic Regeneration of Endometrium and Their Implications in Diverse Endometrial Disorders. *Int J Biol Sci*, 20, 864-879.
- 4) Nelson LR, Bulun SE (2001): Estrogen production and action. *J Am Acad Dermatol*, 45, S116-S124.
- 5) Nees LK, Heublein S, Steinmacher S, et al. (2022): Endometrial hyperplasia as a risk factor of endometrial cancer. *Arch Gynecol Obstet*, 306, 407-421.
- 6) 植田政嗣, 小笠原利忠, 矢野恵子, 他. (2015): 子宮体部. 細胞診ガイドライン1 婦人科・泌尿器 2015 年版. 日本臨床細胞学会編, 52-108, 金原出版
- 7) Yasuo Hirai, Jun Watanabe (2022): Overview of the Yokohama System for Reporting Endometrial Cytology, *The Yokohama System for Reporting Endometrial Cytology*. Yasuo Hirai, Franco Fulciniti (eds), 11-17, Springer
- 8) Norimatsu Y, Nishikawa T, Suzuki H, et al. (2022): The expression pattern of CD10 and CD31 identifies fine fibrovascular stroma of grade 1-endometrial endometrioid carcinomas in cytology. *Cytopathology*, 33, 362-373.
- 9) Armulik A, Genové G, Betsholtz C (2011): Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises. *Dev Cell*, 21, 193-215.
- 10) Avolio E, Alvino VV, Ghorbel MT, et al. (2017): Perivascular cells and tissue engineering: Current applications and untapped potential. *Pharmacol Ther*, 171, 83-92.
- 11) Crisan M, Corselli M, Chen WC, et al. (2012): Perivascular cells for regenerative medicine. *J Cell Mol Med*, 16, 2851-2860.
- 12) Trapero C, Vidal A, Rodríguez-Martínez A, et al. (2019): The ectonucleoside triphosphate diphosphohydrolase-2 (NTPDase2) in human endometrium: a novel marker of basal stroma and mesenchymal stem cells. *Purinergic Signal*, 15, 225-236.
- 13) Morris AW, Carare RO, Schreiber S, et al. (2014): The Cerebrovascular Basement Membrane: Role in the Clearance of β -amyloid and Cerebral Amyloid Angiopathy. *Front Aging Neurosci*, 6, 251.
- 14) Kalluri R, Zeisberg M (2006): Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 392-401.

要 旨

子宮内膜は非常に動的な組織で、その構造変化は上皮細胞に留まらず内膜間質細胞、血管などにも及ぶ。本研究では高分化型類内膜癌の支持性間質を構成する細胞の種

類と分布を明確にすることを目的に、免疫組織化学染色及び特殊染色による評価を実施した。高分化型類内膜癌10症例を対象に、子宮内膜血管性間質のマーカーとしてCD10, CD31, CD146, 及び α SMA を用い、免疫組織化学染色を実施した。加えてPAS反応との二重染色により、基底膜と血管周囲細胞の位置関係を評価した。その結果、高分化型類内膜癌を支持する線維血管性間質の線維状細束に沿ってCD10陽性の間質細胞をみとめ、その内部の血管腔を裏打ちするCD31陽性の血管内皮細胞が確認された。血管内皮細胞を取巻く細胞はCD146と α SMAを発現し、基底膜に包まれて存在する周皮細胞であることが示唆された。今後、他の病態との比較解析を行うとともに、子宮内膜細胞診への応用が期待される。

利 益 相 反

本研究に開示すべき利益相反はない。