

抄読会(2023/8/18)

査読者 小池 吉彦

Can dual staining with p16 and Ki67 be biomarkers of epithelial dysplasia in oral lesions?

Bharti A, Qayoom S, Jaiswal R, Agarwal P, Singh RK, Agarwal SP, Bhalla S, Makker A, Goel MM.

Cancer Res Ther. 2022 Jul-Sep;18(4):1003-1008.

#### 【要旨】

背景：口腔癌の発生は、口腔上皮性異形成を前癌状態とする多段階プロセスである。口腔上皮異形成の診断と悪性度の判定には診断者間の差が大きい。ヒトパピローマウイルス (HPV) は口腔発癌と強い関係があると考えられているため、p16 をバイオマーカーとして用いることで癌化細胞の特定に有用である。しかし p16 の陽性率は低いため、p16/Ki67 の二重染色が形質転換細胞を同定するための有用なバイオマーカーとなる可能性がある。本研究は、口腔上皮異形成のバイオマーカーとして p16/Ki67 の二重染色、および臨床病理学的事項との関連を評価することを目的とした。

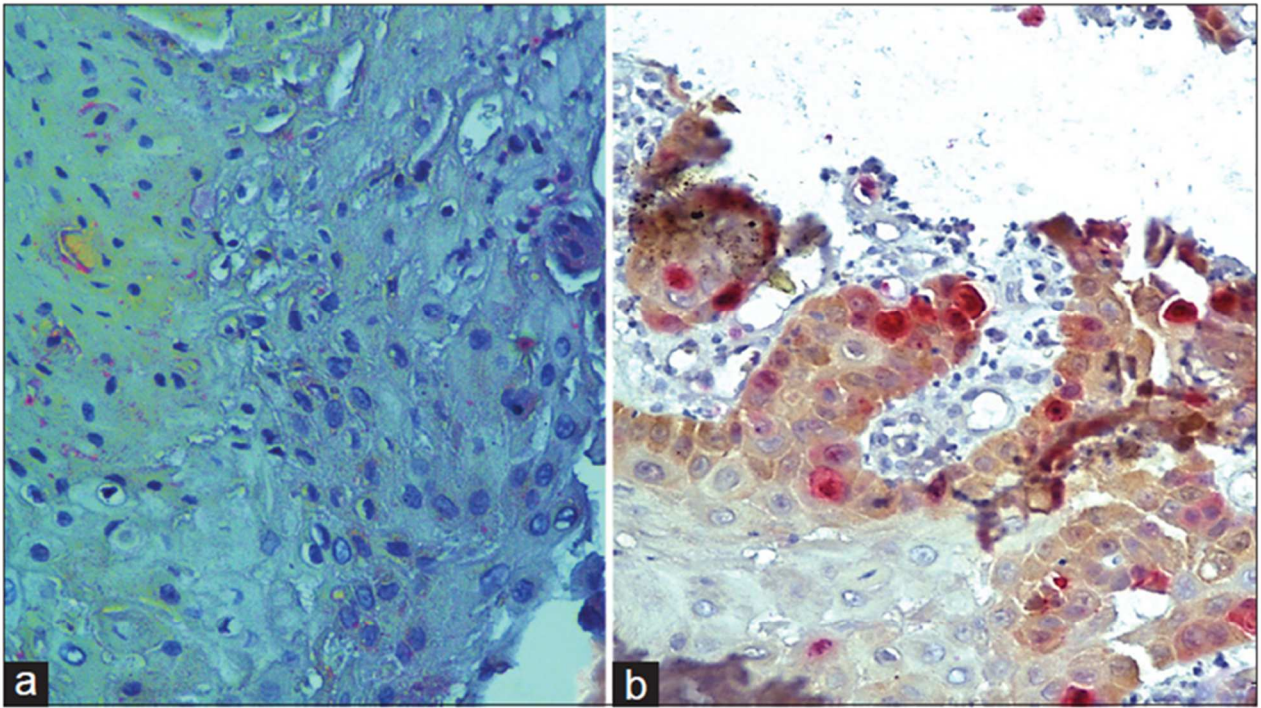
対象と方法：5 例の正常組織と、30 例の前癌口腔病変と、36 例の口腔扁平上皮癌 (OSCC) の生検組織について、CINtec PLUS キットを用いた二重染色により、p16 と ki67 の免疫組織化学解析を行った。

結果：30 例の前悪性病変は、口腔粘膜下層線維症 (OSMF; Oral submucosal fibrosis) 6 例、白板症 (LKP; Leukoplakia) 9 例、異形成を伴う白板症 (LKPD; Leukoplakia with dysplasia) 15 例であった。CINtec 陽性は LKPD (7/15, 46.7%) と OSCC (9/36, 25%) のみに認め

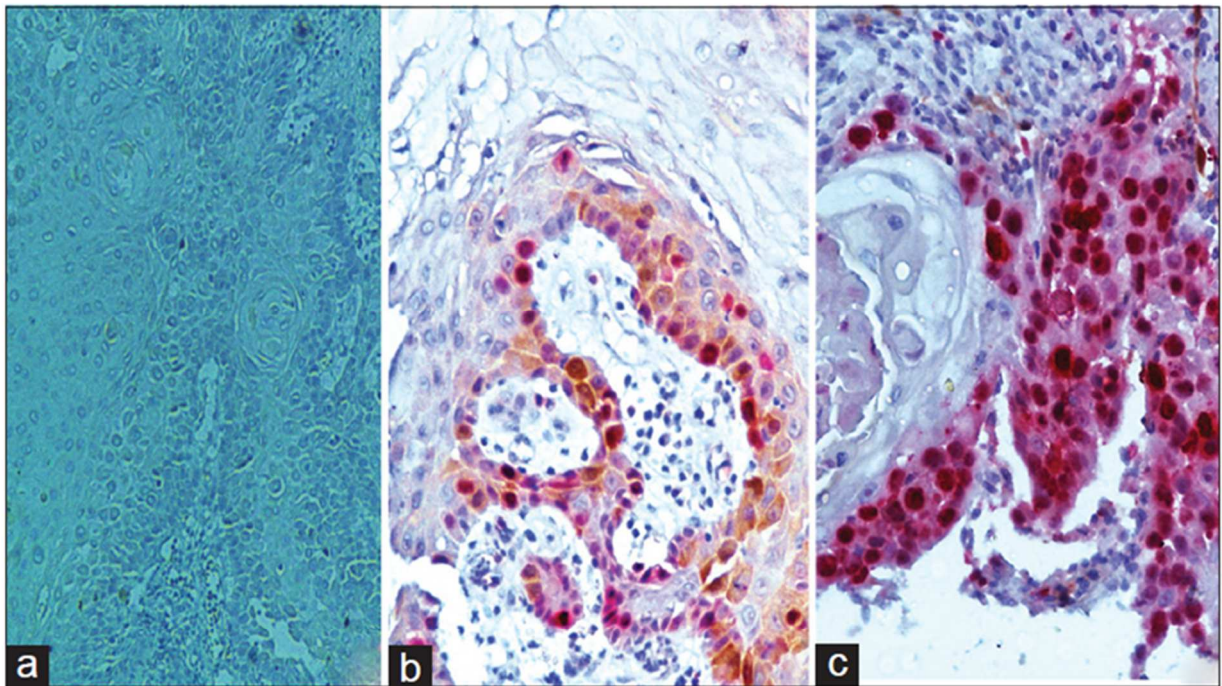
られた [表 1]。LKP や OSMF では、CINtec plus 染色で陽性となった症例はなかった。正常組織、OSMF、LKP 症例のいずれも p16 単独の陽性例はなかった。Ki67 単独陽性は、OSMF (1/6; 16.67%)、LKP (3/9; 33.33%)、LKPD (10/15: 66.67%)、OSCC (28/36 ; 77.78%) でみられた。ki67 の平均発現率は、OSMF で 5%、LKP で 8%、LKPD で 25%、SCC で 40%であった [表 2]。LKPD と OSCC の症例を CINtec PLUS の免疫発現に基づいて CINtec 陽性群と CINtec 陰性群に分け、年齢や性別、部位、リスクファクターを含む臨床病理学的事項で検討した [表 3, 表 4]。LKPD では、臨床病理学的事項との有意な関連性は認めなかった。OSCC では、アルコール摂取が CINtec 陽性と有意な関連性を示した。

#### 【take home message】

- HPV は口腔癌と強い関係があるとされているが、口腔前癌病変および OSCC における p16 の発現低下が報告されている。また p16 は非腫瘍細胞や 5%~10%の HPV 陰性の OSCC で過剰発現しているとの報告もある。
- 口腔の前癌病変および口腔癌における HPV 感染の特定には、p16/ki67 二重染色は有用である可能性がある。



**Figure 1:** Leukoplakia without dysplasia staining negative for dual stain (p16<sup>INK4A</sup>/Ki67) (a, x20) Leukoplakia with dysplasia showing dual stain positivity (p16<sup>INK4A</sup>/Ki67) in dysplastic epithelium (b, x20)



**Figure 2:** Case of squamous cell carcinoma staining negative for dual stain (p16<sup>INK4A</sup>/Ki67) (a, x20) Squamous cell carcinoma showing dual stain positivity with moderate proliferative index (p16<sup>INK4A</sup>/Ki67) (b, x20) and high proliferative index (c, x20)



**Table 1: Expression of P16<sup>INK4A</sup> and ki67 in various subgroups**

Study group	P16 <sup>INK4A</sup> (%)	Ki67 (%)	Dual staining (%)
1 Normal tissue	0/5	0/5	0/5
2 OSMF	0/6	1/6 (16.67)	0/6
3 LKP	0/9	3/9 (33.33)	0/9
4 LKPD	5/15 (33.33)	10/15 (66.6)	7/15 (46.67)
5 SCC	7/36 (19.44)	28/36 (77.0)	9/36 (25)

OSMF=Oral submucosal fibrosis, LKP=Leukoplakia, LKPD=Leukoplakia with dysplasia, SCC=Squamous cell carcinoma

**Table 2: Quantitative result of Ki67 labelling index other than basal layer on Immunohistochemistry**

Study group	Mean Ki67 (%)	Minimum (%)	Maximum (%)
1 OSMF	5	5	5
2 LKP	8	6	18
3 LKPD	25	15	40
4 SCC	40	30	70

OSMF=Oral submucosal fibrosis, LKP=Leukoplakia, LKPD=Leukoplakia with dysplasia, SCC=Squamous cell carcinoma

**Table 3: Association of CINtec Plus immunoexpression with clinicopathological parameters in patients with leukoplakia with dysplasia**

Clinicopathological parameter	CINtec plus		Chi-square test	
	Positive (n=7), n (%)	Negative (n=8), n (%)	$\chi^2$	P
Age (years)				
≤40	5 (71.4)	6 (75)	0.024	0.876
>40	2 (28.6)	2 (25)		
Gender			2.019	0.155
Male	7 (100)	6 (75)		
Female	0 (0)	2 (33.3)		
Topographical site			0.535	0.464
BM	4 (57.1)	6 (75)		
Tongue	3 (42.9)	2 (25)		
Risk factors				
Smoking	3 (42.9)	5 (62.5)	0.578	0.446
Tobacco	5 (71.4)	3 (37.5)	1.727	0.188
Alcohol	3 (42.9)	3 (37.5)	0.044	0.832

BM= Buccal Mucosa

**Table 4: The association of CINtec plus immunoexpression with clinicopathological parameters in patients with oral squamous cell carcinoma**

Clinicopathological parameter	CINtec plus		Chi-square test	
	Positive (n=9), n (%)	Negative (n=27), n (%)	$\chi^2$	P
Age (years)				
≤40	1 (11.1)	7 (25.9)	0.8571	0.354
>40	8 (88.9)	20 (74.1)		
Gender			0.2667	0.605
Male	8 (88.9)	22 (81.5)		
Female	1 (11.1)	5 (18.5)		
Topographical site				
BM	2 (22.2)	9 (33.3)	0.574	0.448
Tongue	6 (66.7)	15 (55.5)	0.342	0.558
Palate	1 (11.1)	1 (3.7)	0.705	0.400
FOM	0 (0)	1 (3.7)	0.342	0.558
Lip	0 (0)	1 (3.7)	0.342	0.558
Risk factors				
Smoking	7 (77.8)	16 (59.2)	1.00	0.316
Tobacco	7 (77.8)	20 (74.1)	0.049	0.824
Alcohol	4 (44.4)	1 (3.7)	9.368	0.002
Degree of differentiation				
WD	4 (44.4)	15 (55.5)	0.155	0.693
MD	5 (55.56)	12 (44.5)		

WD=Well-differentiated, MD=Moderately differentiated