HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	大腸癌における新規予後予測マーカーとしての簇出とhCGβ発現の意義に関する研究
Author(s)	小丹枝, 裕二
Description	配架番号：2433
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第13377号
Issue Date	2018-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k13377
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/72402
Type	doctoral thesis
File Information	Yuji_Konishi.pdf



Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学位論文

大腸癌における新規予後予測マーカーとしての簇出と hCGβ 発現の意義に関する研究

（Studies on significance of tumor budding and human chorionic gonadotropin-β as a novel prognostic marker in colorectal carcinoma）

2018 年 12 月

北海道大学

小丹枝　裕二

Yuji Konishi

学位論文

大腸癌における新規予後予測マーカーとしての簇出と hCG β 発現の意義に関する研究

（Studies on significance of tumor budding and human chorionic gonadotropin-β as a novel prognostic marker in colorectal carcinoma）

2018 年 12 月

北海道大学

小丹枝　裕二

Yuji Konishi

目次

発表論文目録および学会発表目録・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１頁

要旨・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２項

略語表・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・６頁

緒言・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・７頁

実験方法・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・１７頁

実験結果・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・２１頁

考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・３７頁

総括および結論・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４１頁

謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４３頁

利益相反・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４４頁

引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・４５頁

発表論文目録および学会発表目録

本研究の一部は以下の論文に発表した。

1. Konishi Y, Kawamata F, Nishihara H, Homma S, Kato Y, Tsuda M, Kohsaka S, Einama T, Liu C, Yoshida T, Nagatsu A, Tanino M, Tanaka S, Kawamura H, Kamiyama T, Taketomi A: Tumor budding and human chorionic gonadotropin-β expression correlate with unfavorable patient outcome in colorectal carcinoma. Med Oncol. 2018 Jun 11;35(7):104.

本研究の一部は以下の学会に発表した。

1. 小丹枝裕二、本間重紀、西原広史、川俣太、柴崎晋、皆川のぞみ、川村秀樹、高橋典彦、武冨紹信：大腸癌における tumor budding と chorionic gonadotropin-β 発現の検討, 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 京都, 2014

2. 小丹枝裕二、本間重紀、西原広史、川俣太、吉田雅、柴崎晋、川村秀樹、高橋典彦、武冨紹信：大腸癌における hCGβ 発現は癌細胞の間質やリンパ管への浸潤に関与する, 第 69 回日本大腸肛門病学会学術集会, パシフィコ横浜, 2014/11/08

3. 小丹枝裕二、本間重紀、西原広史、川俣太、吉田雅、柴崎晋、川村秀樹、高橋典彦、武冨紹信：hCGβ expression in colorectal cancer correlates with tumor budding, 第 25 回日本消化器癌発生学会総会/第 8 回国際消化器癌発生会議, ホテル日航福岡, 2014/11/13

要旨

【背景と目的】大腸癌の悪性度は病期によって異なるが、同じ病期でもその予後は様々であることから、さらなる予後因子の確立が必要である。簇出 (tumor budding) とは腫瘍先進部間質に単個の腫瘍細胞もしくは 5 個までの腫瘍塊が存在することであり、大腸癌における新規予後予測因子として注目されている。簇出は、その形態や簇出細胞の遺伝子発現の変化から、上皮間葉移行 (epithelial-to-mesenchymal transition: EMT） の発現を表していると考えられているが、その真偽は明らかになっていない。我々は先行研究において、TGFβ (transforming growth factor- β) と構造的相同性を持つ hCGβ (human chorionic gonadotropin-β) が、TGFβ pathway を介して大腸癌の EMT を調整していることを明らかにした。本研究では、hCGβ が EMT を介して簇出を誘導すること、そして簇出が EMT の発現を表していることを明らかにするため、実験①では、簇出と hCGβ の関係性および臨床病理学的な意義や予後との関係性を、実験②では、hCGβ と簇出および EMT の関係性について、大腸癌組織の免疫染色標本を用いて評価検討を行った。

【対象と方法】2002～2004 年の間に当科で根治手術を施行した大腸癌患者 80 症例を対象とし、切除組織の腫瘍先進部を含む切片を用いた。実験①：簇出に関しては抗サイトケラチン抗体を用いた免疫染色を行った。簇出が最大となるエリアの腫瘍先進部間質に存在する簇出細胞の個数を高倍率の視野 (400x) でカウントし、10 個以上のものを簇出陽性とした。hCGβ の評価は連続切片を用いて抗 hCGβ 抗体で免疫染色を行い、5 個以上の hCGβ 発現細胞を認めるものを hCGβ 陽性とした。簇出と hCGβ 発現の関係性と臨床病理学的因子や予後との関連について検討した。実験②：

hCGβ 発現と簇出および EMT の関係性を調べるため、簇出陽性例において hCGβ 陽性 5 例と hCGβ 陰性 3 例において、hCGβ と EMT 関連蛋白 3 種類 (E-cadherin、Snail、Twist) それぞれとの蛍光 2 重免疫染色を行った。評価は簇出含む腫瘍先進部腫瘍細胞における EMT 関連蛋白の発現強度を点数化し (発現無し：0 点、軽度：2 点、中等度：4 点、高度：6 点) 、hCGβ 陽性例と hCGβ 陰性例、hCGβ 陽性例における hCGβ 陽性細胞と hCGβ 陰性細胞での発現強度の平均値を、それぞれ比較した。

【結果】実験①：サイトケラチン免疫染色では、HE 染色と比較して腫瘍細胞が明瞭に描出されるため簇出細胞の評価が容易であった。大腸癌 80 例における簇出細胞の個数は 0 個から 34 個 (平均±標準偏差；8.9 ± 8.5 個) であり、21 例 (26.3%) においては簇出細胞を 1 個も認めなかった。本研究で定義した、簇出細胞 10 個以上の簇出陽性症例は 80 例中 28 例 (35.0%) であった。簇出陽性はリンパ節転移 ($P < 0.01$) 、病理学的病期 ($P < 0.01$) 、リンパ管浸潤 ($P = 0.044$) 、脈管浸潤 ($P = 0.013$) と有意に関連していた。hCGβ の免疫染色では、大腸癌 80 例中 13 例 (16.3%) において hCGβ 発現陽性であった。hCGβ 陽性例では有意に簇出細胞数が多く (16.0±8.2 vs 6.7±7.2 ; $P < 0.01$) 、また簇出は hCGβ の発現と有意に関連していた ($P < 0.01$) 。80 例中 11 例で簇出と hCGβ の発現がともに陽性であった。簇出と hCGβ が共発現していたグループは、他のグループと比較して最も予後が不良であり ($P < 0.01$)、また全生存期間に対する Cox 比例ハザードモデルでは、簇出と hCGβ の共発現が独立した予後不良因子であった。実験②：hCGβ 陽性症例と hCGβ 陰性症例の EMT 関連蛋白発現強度の比較においては、hCGβ 陽性症例では hCGβ 陰性症例と比較し、E-cadherin の発現減弱 (0.5±0.58 vs 2.0±0.0 ; $P=0.007$) と、Snail の発現増加 (2.80±1.48 vs 1.33±1.53 ; $P=0.229$) 、Twist の発現減弱 (1.0±1.22 vs 5.0±1.73 ; $P=0.008$) を認めた。

hCGβ 陽性症例における hCGβ 陽性細胞と hCGβ 陰性細胞での比較では、E-cadherin (0.50±0.58 vs 3.25±1.26；p=0.007) および Twist (1.0±1.22 vs 3.2±0.84；p=0.01) の発現減弱が見られた。Snail に関しては、hCGβ 陰性細胞と陽性細胞でその発現に大きな変化は見られなかった (2.8±0.84 vs 2.8±1.48；p=1.000) 。hCGβ 陽性症例においては腫瘍先進部間質細胞の Twist 発現が顕著であった。

【考察】本研究では、大腸癌組織において簇出や腫瘍先進部に hCGβ の発現を認め、なおかつ hCGβ と簇出の発現に有意な関係性があること、そして簇出と hCGβ が共発現するとリンパ節転移の可能性が高く、最も予後が不良であることが明らかになった。これは、簇出と hCGβ が密接に関係しながら大腸癌の悪性化に寄与していることを意味する。さらに先行研究では、hCGβ が TGFβ pathway を介して EMT を誘導していることを in vivo で示していたが、実験②では hCGβ 発現により簇出含む腫瘍先進部の腫瘍細胞に EMT 様の発現蛋白の変化 (E-cadherin の発現減弱と Snail の発現増加) が誘導されることを大腸癌組織において証明した。Twist は腫瘍細胞においては発現が減弱し、先進部間質細胞で発現が顕著になっていたが、これは Twist が腫瘍細胞ではなく先進部間質に存在することで、EMT 様の変化を来し簇出を形成させるという報告に一致していた。これらの結果は、未だ明らかになっていない簇出と EMT の関係性を、肯定する一助になりうると考えられた。一連の実験結果より、簇出の誘導因子の一つとしての hCGβ の存在が示唆された。つまり、先進部の腫瘍細胞が hCGβ を自己分泌し、TGFβ レセプターに結合することで、下流の TGFβ カスケードが活性化し、EMT 関連蛋白の転写に変化を与え (E-cadherin 発現の減弱、Snail 発現の増強、Twist の間質発現の増強) 、これにより腫瘍細胞が間葉系の表現型を獲得し、簇出細胞となる。また、hCGβ と簇出の発現が不良な予後に関連する

という結果から、悪性度の増したこれらの腫瘍細胞が他臓器に転移していくのではないかと推測された。本研究の結果から、簇出と hCGβ 発現の臨床への応用方法として、①大腸癌根治切除後の標本において簇出と hCGβ の共発現が見られた場合、これらの患者は予後不良であることが予想されるため、より集学的で、可能であれば高容量での補助化学療法を行うべきなのかもしれない。また、②早期大腸癌の内視鏡的切除後の標本で根治切除が得られている症例においても、病理診断で簇出と hCGβ の共発現が見られた場合は、潜在的なリンパ節転移の可能性を示している可能性があり、リンパ節郭清を伴う外科的切除が示唆される。さらに、③hCGβ 陽性大腸癌においては、hCGβ を治療のターゲットにすることで、簇出自体や、簇出から発生する転移を予防できるかもしれない。

【結語】簇出と hCGβ 発現は EMT と密接に関連しながら、大腸癌の進展に寄与していた。簇出と hCGβ の共発現は大腸癌における新規予後予測マーカーとして、また hCGβ は簇出や転移を予防するための治療標的として、有用であるかもしれない。

略語集

本文中および図中で使用した略語は以下の通りである。

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CI	confidence interval
DFS	disease free survival (無再発生存期間)
EMT	epithelial-mesenchymal transition (上皮間葉移行)
ESMO	European Society for Medical Oncology
hCGβ	human chorionic gonadotropin β
HE	Hematoxylin-Eosin
IHC	immunohistochemistry
ITBCC	International tumor budding consensus conference
N.A	not applicable (該当無し)
NC	not calculable
OS	overall survival (全生存期間)
PFS	progression free survival (無増悪生存期間)
RR	relative risk/hazard ratio
SM	submucosal layer (粘膜下層)
TGFβ	transforming growth factor β
UICC	the Union for International Cancer Control

緒言

大腸癌と簇出

大腸癌は2012年の全世界の統計において、患者数が136万人と癌の中で3番目に多く、また死亡者数は69万人に及んでおり、主要な死因の一つとなっている (Ferlay et al., 2015; Torre et al., 2015) 。大腸癌の5年生存率はStageIであれば90%以上であるが、遠隔転移を伴うStageIVの場合は10%程度である (Brenner et al., 2014) 。大腸癌における最も重要な予後規定因子はThe Union for International Cancer Control (UICC) や American Joint Committee on Cancer (AJCC) により規定されるTNM分類である。これは大腸壁に対する腫瘍の浸潤の程度 (T) 、リンパ節転移の有無 (N) 、遠隔転移の有無 (M) の3つの因子から構成され、診断時の予後予測や治療方針の決定に役立つ (Brierley et al., 2016) 。日本においてはUICCのTNM分類と整合性が図られた大腸癌取扱い規約が用いられており、大腸癌診療ガイドラインではその病期による予後が公表されている (表１) 。

表１．大腸癌の部位別累積5年生存率 (%) (大腸癌研究会, 2016))

	病期						
	0	I	II	IIIa	IIIb	IV	全病期
盲腸	91.0	93.7	83.5	73.0	65.4	12.5	68.2
上行結腸	93.9	91.2	85.8	79.1	63.4	19.1	71.4
横行結腸	88.9	91.4	85.2	78.5	65.7	20.8	74.0
下行結腸	100.0	94.1	85.3	82.0	52.9	21.1	75.4
S 状結腸	94.2	92.3	85.8	83.0	64.7	22.0	73.7
直腸(Ra+Rb)	97.6	90.6	83.1	73.0	53.5	14.8	71.3
全部位	94.0	91.6	84.8	77.7	60.0	18.8	72.1

大腸癌の悪性度はTNMシステムで分類される病理学的性質を反映しないことが多く (Bathe and Farshidfar, 2014) 、同じ病期でも予後が様々であることから、さらなる予後因子の確立が必要である。

最近、腫瘍の悪性度を推測するための補助マーカーとして、簇出 (Tumor budding) が注目されている。簇出は、UICC/AJCCにおいては大腸癌における”additional prognostic factor”と (Gospodarowicz et al., 2006) 、European Society for Medical Oncology (ESMO) のコンセンサスガイドラインでは、早期大腸癌 (StageI-III) における”potential prognostic factor”と定められている (Schmoll et al., 2012) 。早期大腸癌と進行大腸癌の定義は日本と欧米で異なっており、日本では粘膜下層浸潤までの内視鏡的切除可能なものを早期大腸癌と、筋層浸潤したものを進行大腸癌と表現する。欧米では外科的切除可能なものを早期大腸癌と、転移や再発を伴うものを進行大腸癌と表現しており、その相違に注意が必要である。簇出のHematoxylin-Eosin (HE) 染色による顕微鏡写真を示す (図１) 。簇出とは、腫瘍先進部の間質に単独の腫瘍細胞

もしくは5個までの小さい腫瘍塊が存在すること、と定義されている (Mitrovic et al., 2012) が、その評価方法は多種多様であり、現段階で統一した基準が定まっていない。

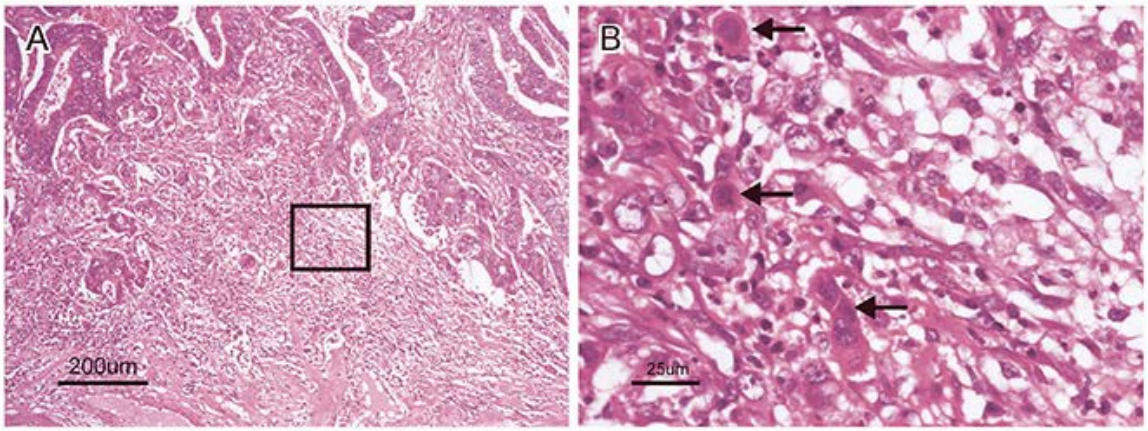


図１．簇出のHE染色による顕微鏡写真(大腸癌研究会, 2016))

癌の発育先進部間質に浸潤性に存在する単個もしくは5個未満の癌胞巣を認める。

最近、International tumor budding consensus conference (ITBCC) では、簇出の評価に関するRecommendationsを発表した。その内容には、簇出の評価にはHE染色を用いること、腫瘍先進部の一視野でカウントすること、簇出細胞の個数に応じて3段階 (0-4個、5-9個、10個以上) に分類することが盛り込まれている (Lugli et al., 2017) 。

簇出の臨床的有用性については多数の論文で述べられているが、現段階ではESMOおよび日本のガイドラインにおいて、内視鏡的切除後にリンパ節郭清を伴う外科的切除が必要かどうかの判断基準に組み込まれているのみである (Schmoll et al., 2012; 大腸癌研究会, 2016) 。

大腸癌における簇出の有無と病理学的因子や予後との関連性を報告した論文の抜粋を提示する (表２－４) (Beaton et al., 2013; Canney et al., 2012; Garcia-Solano et al.,

2011; Hase et al., 1993; Horcic et al., 2013; Kawachi et al., 2015; Keum et al., 2012; Kevans et al., 2011; Lai et al., 2014; Lugli et al., 2009; Nakadoi et al., 2012; Nakamura et al., 2008; Ohtsuki et al., 2008; Suh et al., 2012; Suzuki et al., 2009; Tateishi et al., 2010; Ueno et al., 2014; Wada et al., 2015; Wang et al., 2009; Wohlke et al., 2011) 。

表２．**StageI**大腸癌における簇出の意義

著者	年	症例数	評価法	簇出陽性率(%)	結果
Suzuki	2009	124	HE/IHC	HE:7.3 IHC:17.7	簇出、静脈浸潤が リンパ節転移と関連
Tateishi	2010	322	HE	32.9	多変量解析では簇出が リンパ節転移と関連
Keum	2012	434	HE	N.A	再発 20 例は全例が簇出陽性
Nakadoi	2012	499	HE	Colon:9.2 Rectum:15.3	多変量解析で簇出が リンパ節転移と関連
Suh	2012	435	HE	17.6	簇出、組織型、リンパ管浸潤がリンパ節転移と関連
Beaton	2013	4510	N.A	N.A	簇出、組織型、リンパ管浸潤、SM 浸潤がリンパ節転移と関連あり
Ueno	2014	3556	HE	19.4	簇出、脈管浸潤、SM 浸潤、低分化がリンパ節転移と関連あり
Kawachi	2015	806	HE	28.9	多変量解析で簇出、SM 浸潤がリンパ節転移に関連あり
Wada	2015	770	HE/IHC	N.A	簇出、リンパ管浸潤が リンパ節転移に関連あり

表３．**StageII**大腸癌における簇出の意義

著者	年	症例数	評価法	簇出陽性率(%)	結果
Hase	1993	663	HE	25.6	簇出陽性例は OS で予後不良 再発率も有意に高かった
Nakamura	2008	200	HE	34.5	簇出陽性例は 5/10 年 OS に関して有意に予後不良
Wang	2009	128	HE	45	簇出陽性例は 5 年 OS に関して有意に予後不良
Kevans	2011	258	HE	44	簇出陽性例は 5 年 OS に対して独立した予後不良因子
Canney	2012	205	HE	25-73	簇出陽性例でも 5 年 OS に有意差無し
Horcic	2013	105	IHC	42-83	簇出陽性例で 5 年 OS が予後不良
Lai	2014	135	HE	27	簇出陽性例で 5 年 OS,PFS ともに予後不良

表４．**StageI-III**大腸癌における簇出の意義

著者	年	症例数	評価法	簇出陽性率(%)	結果
Ohtsuki	2008	149	IHC	13	DFS に関しての独立した 予後不良因子
Lugli	2009	279	IHC	N.A	5 年 OS に関しての独立した 予後不良因子
Garcia-Solano	2011	81	IHC	69	5 年 OS が不良
Wohlke	2011	299	IHC	33	OS が有意に不良

HE：Hematoxylin Eosin, IHC：Immunohistochemistry, N.A：Not applicable (該当なし) , SM：Submucosal layer (粘膜下層) , OS：Overall survival (全生存期間) , PFS：Progression free survival (無増悪生存期間) , DFS：Disease free survival (無再発生存期間)

StageI大腸癌における簇出陽性率は7.3-32.9%であり、その全てにおいてリンパ節転移と有意な関連性を持っていた。またStageII大腸癌における簇出陽性率はHE染色では25-73%で、サイトケラチン免疫染色では42-83%であった。また簇出陽性例においては陰性例に比較して、OS、PFSに関して有意に予後不良であるとする報告が多かった。StageI-III大腸癌においては、サイトケラチン免疫染色において簇出陽性率は13-69%であり、陰性例に比較して、OSやDFSに関して有意に予後が不良であった。以上のことを踏まえ、Koelzerらは、すでにガイドラインに記載されている、①内視鏡的切除後標本で簇出陽性だった場合、リンパ節転移の可能性が高いためリンパ節郭清を伴う外科的切除を検討すること、に加え、②StageII大腸癌において簇出を認めた場合は再発リスクが高いため、厳重な経過観察や補助化学療法を検討すること、③術前の生検組織で簇出を認めた場合は、リンパ節転移や遠隔転移の予測因子であることから、術前化学療法やリスクに応じた術式を検討すること、など簇出の臨床応用方法を提唱している (Koelzer et al., 2016) 。

簇出と上皮間葉移行

簇出は癌における転移の第一段階と考えられている。つまり、簇出細胞は細胞外基質を通り抜けて脈管に侵入し、リンパ節や遠隔臓器に腫瘍の塊を形成する (Lugli et al., 2012) 。実際、先に述べたように、腫瘍先進部に存在する簇出の存在はリンパ節転移や遠隔転移、再発と関連していた (Bradley et al., 2016; Hase et al., 1993; Okuyama et al., 2002; Ueno et al., 2002a; Ueno et al., 2004) 。

一方、癌の分化度の制御調節機構の一つとして、上皮間葉移行 (Epithelial-mesenchymal transition：EMT) が注目されている。癌におけるEMTとは、腫瘍細胞が

上皮系から間葉系に性質を変化させ、 組織を動的に再構築するステップを意味する。EMTによって腫瘍細胞は、脱分極し細胞間接着を失うこととなるが、もう一方でアポトーシスへの抵抗性や遊走能や浸潤能を獲得することができる (Thiery, 2002) 。このプロセスの中心を担うのがE-cadherinである。これは細胞間接着分子であり基底膜の接着結合やアクチン細胞骨格にアンカーを提供する。E-cadherinを失うことは、腫瘍細胞がEMTを起こし、播種や転移を起こすために必要なことであると考えられている (Perez-Moreno et al., 2003) 。腫瘍が進展する過程においてEMTは浸潤や転移の最初の段階であり、重要な役割を果たしている。EMTは一群のEMT誘導転写因子によって制御されている。転写因子には、E-cadherin を直接抑制するzinc finger型転写因子のSnaiファミリー (Snail, Slug) やZEBファミリー (ZEB1, ZEB2) 、そして間接的に調節するbHLH 型転写因子のTwist などが存在する (Puisieux et al., 2014) 。これらのEMT誘導転写因子によりE-cadherinの発現が減少し、N-cadherinやFibronectinの発現が上昇することで、間葉系の形態に変化する (Puisieux et al., 2014; Quail and Joyce, 2013) 。簇出においても同様の分子発現が見られており (Galvan et al., 2015; Zlobec and Lugli, 2010) 、それゆえに簇出は上皮間葉移行の一部であることが推測されている。

一方で、大腸癌101例においてサイトケラチン染色を併用した2重免疫染色の検討では、簇出細胞においてE-cadherinの発現低下がみられるものの、Twist、Snail、Slugなどの EMT関連遺伝子の発現が見られなかったことから、簇出とEMTに関連性が無いとする報告もあり (Yamada et al., 2016) 、現段階で簇出とEMTとの関係性については更なる検討が必要である。

Human chorionic gonadotropinβと上皮間葉移行

Human chorionic gonadotropin（hCG）はαとβという2つのポリペプチド単位から成り立っている糖タンパクホルモンである (Cole, 2012) 。hCGは以前より妊娠や妊娠関連疾患、妊娠性絨毛性疾患のマーカーとして使用されているが、大腸癌や胃癌、膵癌、などの非絨毛性悪性疾患においても分泌されることが報告されている（Louhimo et al., 2004a; Louhimo et al., 2004b; Lundin et al., 2001）。βサブユニットであるhCGβの異所性発現は先に述べた上皮性腫瘍における現象と認識されている。過去の報告では、hCGβ分泌腫瘍はより悪性度が高く、放射線抵抗性があり、転移し易い傾向が認められている (Butler et al., 2000; Lundin et al., 2001) 。hCGβは3つのジスルフィド結合からなるCystine knot構造を有しており、EMTを惹起する主要な分子であるtransforming growth factor β (TGFβ) と構造的相同性を有している (図２) (Lapthorn et al., 1994) 。実際、TGFβをエンコードする*TGFB1*遺伝子は、hCGβをエンコードする*CGB*遺伝子と近接している（Fujii et al., 1986）。大腸癌においてTGFβやそのレセプターが高発現していることが多く（Gulubova et al., 2010; Liu et al., 2011）、TGFβ伝達経路におけるhCGβシグナルの関連性が示唆されている（Berndt et al., 2013）。

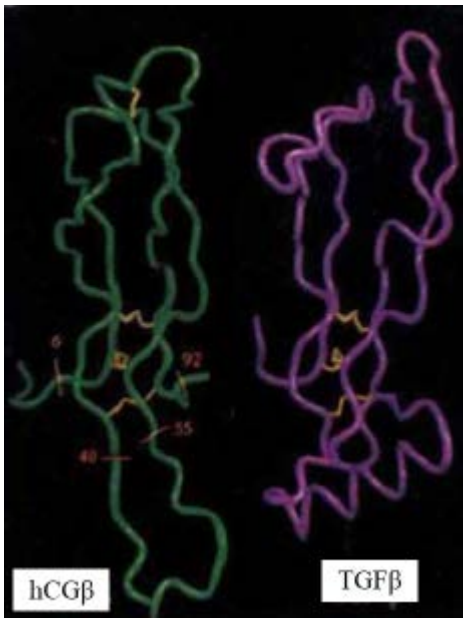


図２．hCGβとTGFβの立体分子構造 (Lapthorn et al., 1994)

hCGβとTGFβは3つのジスルフィド結合からなるCystine knot構造を有しており、構造的相同性を有している。

これらのことから癌の進展に関連してhCGβがTGFβ伝達経路に作用し、EMTを誘導していることを明らかにすべく、先行研究を行った (Kawamata et al., 2018) 。レトロウイルスベクターを用いてhCGβ過剰発現大腸癌細胞株を作成し、癌の悪性度に与える影響を調べた。hCGβ過剰発現群は対称群と比較し浸潤能と遊走能は有意に増加していた。

また、EMT関連蛋白の発現変化については、hCGβ発現大腸癌細胞株においては蛋白レベルでE-cadherinの減少とSnail、Slug、Twist、pSmad2の上昇を認め、またmRNAのレベルではSnailとTwistの発現上昇を認めた。さらにhCGβによって引き起こされるSnailやTwistの発現上昇は、TGFβ阻害薬の投与によって、その発現が減弱することを確認した。以上より、TGFβシグナル経路を介してhCGβがEMTを誘導していることを明らかにした (Kawamata et al., 2018) 。

先行研究の結果である、hCGβと上皮間葉移行の関係性 (Kawamata et al., 2018) と、過去の論文で報告されている、簇出と上皮間葉移行の関係性 (Grigore et al., 2016) から、簇出とhCGβ発現にはEMTを介在した関係性があることを推測した。このことを明らかにするために、大腸癌80症例におけるhCGβの発現に加えて、簇出の状態を評価し、臨床病理学的因子や予後との関連性を比較検討することとした。さらに大腸癌組織における簇出とhCGβ発現、EMTの関係性を検討するために、簇出陽性症例において、hCGβとEMT関連蛋白の二重免疫染色を行った。

実験方法

対象

2002 年 1 月から 2004 年 12 月の間に北海道大学病院で根治切除手術を行った大腸癌患者 80 症例を対象とした。腫瘍の部位は盲腸から直腸までの全大腸を対象とし、遠隔転移を有する症例は対象外とした。対象患者は術後から 2015 年 12 月までの期間で定期的に経過観察を行い、再発の有無、死亡の有無について確認した。この実験は北海道大学病院の院内倫理委員会の承認 (14-005) を得て、「人を対象とした医学系研究に関する倫理指針」に従って実施した。

実験①　簇出および hCGβ 発現と病理学的因子や予後との関係性の評価

病理診断と免疫染色

対象とした大腸癌 80 症例のホルマリン固定パラフィン包埋標本を収集し、各標本から腫瘍浸潤部を含む代表的なブロックを選定した。各ブロックから切り出しを行い、それぞれ連続切片を用いて HE 染色および、パンサイトケラチンと hCGβ の免疫染色を行った。腫瘍の病理学的評価は AJCC 第 7 版に準じて (Sobin and Compton, 2010) 病理医により作成されたレポートから引用した。

簇出とは単独の癌細胞もしくは5個以下の細胞集塊と定義されている (Ueno et al., 2002b) 。ITBCCでは、簇出に関する主要なデータがHE染色による評価に基づいているため、HE染色で評価すべきとしている (Lugli et al., 2017) 。しかしながら、腫瘍付近の炎症など、特定の状況において簇出細胞と間質細胞の鑑別が難しい場合があるため、本研究では、簇出細胞を見やすくするためにサイトケラチン染色を用いて

評価を行った。免疫染色はパンサイトケラチンに対するマウスモノクローナル抗体を用いた (AE1/AE3, 1:100; ACR011B; Biocare medical, Concord, USA) 。簇出細胞の個数は、簇出が最大となるエリアを高倍率の視野 (400x) でカウントした。最近、病期IからIIIまでの大腸癌において、10個以上の簇出の存在が、無再発生存期間や全生存期間についての不利な予後因子であることが報告されている (Oh et al., 2018) 。従って、本研究では高倍率視野において10個以上の簇出細胞が認められた場合を簇出陽性とし、それ以外を簇出陰性とした。

hCGβの免疫染色は製造元の指示に従って行った (Clone A0231, Dako, Tokyo, Japan) 。組織切片を脱パラフィン処理して再水和し、一次抗体である抗hCGβウサギポリクローナル抗体 (1:350; A0231; Dako, Tokyo, Japan) と共にインキュベートし、その後、二次抗体とペルオキシダーゼを混ぜたデキストランペルオキシダーゼ試薬 (Envision/HRP; Dako, Tokyo, Japan） と反応させた。全ての評価は腫瘍部位の400倍視野で行った。5個以上の細胞で細胞質や細胞膜が染色された症例をhCGβ陽性と定義し (Kawamata et al., 2018) 。

簇出とhCGβの関係性を調べるために、hCGβの発現細胞が存在する部位を、連続切片によるパンサイトケラチン染色で確認した。

実験②　大腸癌組織における**hCGβとEMT関連蛋白の発現の評価**

蛍光二重免疫染色

本研究で対象とした大腸癌80例のうち、簇出陽性に加えhCGβ陽性の5症例と、簇出陽性であるが、hCGβ陰性の3症例の計8症例を抽出し、hCGβと、EMT関連蛋白であるE-cadherin、Snail、Twistのそれぞれで蛍光二重免疫染色を行った。

蛍光二重免疫染色のプロトコールを以下に示す。組織切片を脱パラフィン処理して再水和し、一次抗体である抗hCGβウサギポリクローナル抗体 (1:300; A0231; Dako, Tokyo, Japan) と共にインキュベートし、その後、二次抗体 (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (R) ; 424144; ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan) 、蛍光検出試薬 (TSA Fluorescein System; SAT701001KT, パーキンエルマージャパン, Tokyo, Japan) と順次反応させた。抗原賦活化処理ののち、一次抗体である抗E-cadherin抗体 (1:600; M3612; Dako; Tokyo, Japan) 、抗Snail抗体 (1:300; AMAb91215; Atlas Antibodies; Bromma, Sweden) 、抗Twist抗体 (1:500; ab175430; abcam; Cambridge, USA) とそれぞれインキュベートし、二次抗体 (ヒストファインシンプルステイン MAX-PO (M) ; 424134; ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan) 、蛍光検出試薬 (TSA Cyanine3 System; NEL704A001KT, パーキンエルマージャパン, Tokyo, Japan) と順次反応させた。核の染色にはDAPIを用いた。

各症例における簇出を含む腫瘍先進部におけるEMT関連蛋白の発現を評価した。簇出を含む腫瘍先進部については、同一標本におけるサイトケラチン染色でその部位を確認した。hCGβ陽性症例においては、hCGβ陽性細胞と陰性細胞それぞれにおけるEMT関連蛋白の発現を評価した。hCGβ陰性症例では陰性細胞における発現を評価した。E-cadherinについては細胞膜が全周性に染色されるものを陽性とし、またSnailとTwistは細胞核が染色されるものを陽性とした。対象細胞における発現の強度と割合を評価し、点数化を行った。発現強度は、発現が認められない場合を0点、軽度の発現を2点、中等度の発現を4点、高度の発現を6点とした。発現割合 (30%以上) の多い強度を1種類もしくは最大2種類まで選択し、1種類の場合はその点数を、2種類の場合はその平均値をとった。

統計学的解析

簇出や hCGβ 発現の有無と、臨床病理学的データとの関連性を調べるために χ^2 検定と Fisher's 正確検定を用いた。症例の生存曲線はカプランマイヤー法を用いた。2 群間の違いを比較するために両側 *t* 検定を用いた。簇出と hCGβ 発現による予後への関連性を調べるために、単変量解析・多変量解析ともに Cox 比例ハザードモデルを使用した。結果は平均±標準偏差で表した。解析にはエクセル統計 2012 for Windows (株式会社社会情報サービス, Tokyo, Japan) を使用した。P 値が 0.05 未満の場合を有意差ありと判断した。

実験結果

対象の患者背景を表 5 に示す。対象患者 80 例の平均年齢は 65.2 歳であり、男性が 34 例であり、女性は 46 例であった。腫瘍の局在は右側結腸 (盲腸～上行結腸～横行結腸) が 29 例、左側結腸が (下行結腸～S 状結腸～直腸) が 51 例であった。高分化型腺癌が 34 例、中～低分化型腺癌が 46 例であった。深達度は pT1-2 が 17 例、pT3-4 が 63 例で、リンパ節転移は 27 例に認め、pStageIII は 27 例であった。観察期間中に 12 例が再発し、11 例が死亡したが、癌死は 7 例であった。生存期間の中央値は 79 か月だった。

表５．対象症例の背景因子

Parameter	No.
1. 年齢（平均±標準偏差）	65.2 ± 12.0
2. 性別	
男性	34
女性	46
3.腫瘍の局在	
右側結腸	29
左側結腸	51
4. 組織型	
高分化型腺癌	34
中-低分化型腺癌	46
5. 癌遺残	
R0	79
R1	1
6. 病理学的深達度	
pT1-2	17
pT3-4	63
7. 病理学的リンパ節転移	
pN0	53
pN1-3	27
8. 病理学的進行度	
I-II	53
III	27
9. 生存期間中央値（月）	79.0（10-146）

実験①　簇出と **hCGβ** 発現と病理学的因子や予後との関係性の評価

簇出と hCGβ 発現の評価

連続切片における HE 染色 (図３a) 、サイトケラチン染色 (AE1/AE3) (図３b) 、hCGβ 染色 (図３c) と、腫瘍先進部における hCGβ 染色 (図３d) の顕微鏡写真を提示する。

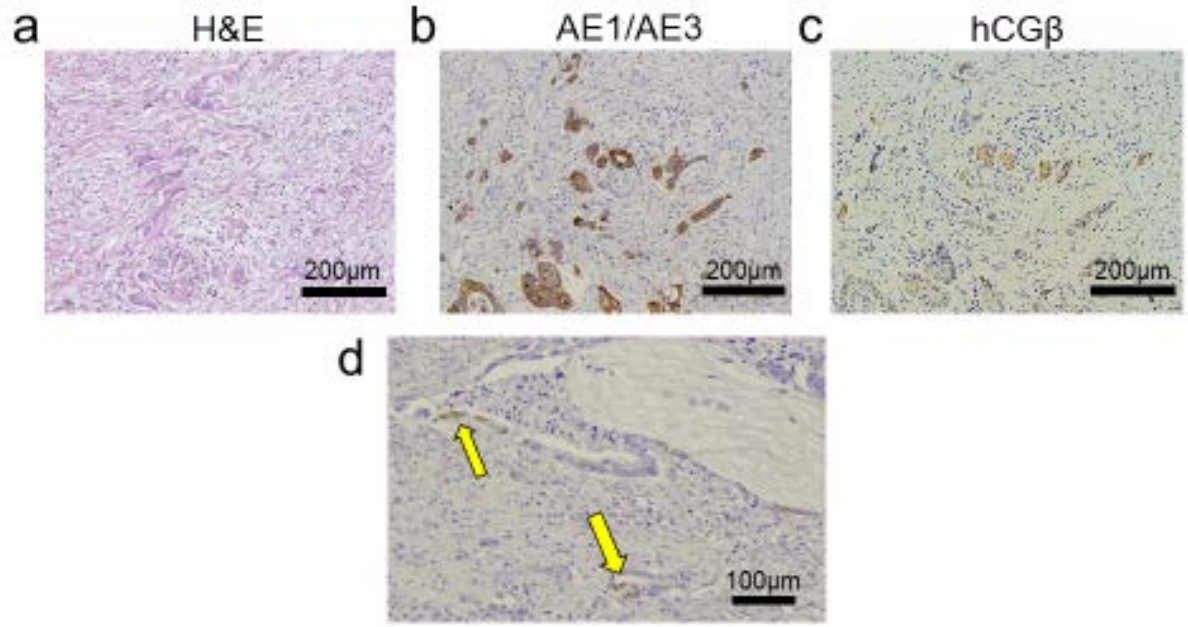


図３．大腸癌組織の腫瘍先進部と簇出細胞における顕微鏡写真

a：HE 染色, b：サイトケラチン免疫染色, c および d：hCGβ 免疫染色。サイトケラチン染色では腫瘍細胞が明瞭に描出されている。c では簇出細胞に、d では腫瘍先進部腫瘍細胞に hCGβ が発現している。

サイトケラチン染色では、HE 染色に比較して腫瘍細胞が明瞭に染色されているため、簇出細胞の評価が容易であった。大腸癌 80 例における簇出細胞の個数は 0 個から 34 個 (平均±標準偏差；8.9 ± 8.5 個) であり、21 例 (26.3%) においては簇出細胞を 1 個も認めなかった。本研究で定義した、簇出細胞 10 個以上の簇出陽性症例は 80 例中 28 例 (35.0%) であった。

hCGβ 染色による発現の評価においては、大腸癌 80 例中 13 例 (16.3%) で hCGβ 陽性であった (図３c, ３d) 。

hCGβ の発現部位については、発現陽性 13 例が全例において腫瘍の先進部に存在し (図３d) 、また 13 例中 10 例 (76.9%) においては簇出細胞そのものに hCGβ が発現していた (図３c) 。

hCGβ 発現の有無別の簇出細胞個数のヒストグラムを図４A に示す。hCGβ 陽性例では 13 例全例で最低 1 個以上の簇出細胞を認めたが、陰性例では 67 例中 23 例で簇出細胞を認めなかった。簇出細胞の平均個数は hCGβ 陽性例で 16.0 ± 8.2 個、陰性例で 6.7 ± 7.2 と有意に多く (図４B) (P<0.001) 、簇出の有無と hCGβ の有無に有意な相関を認めた (表６) (P< 0.01) 。

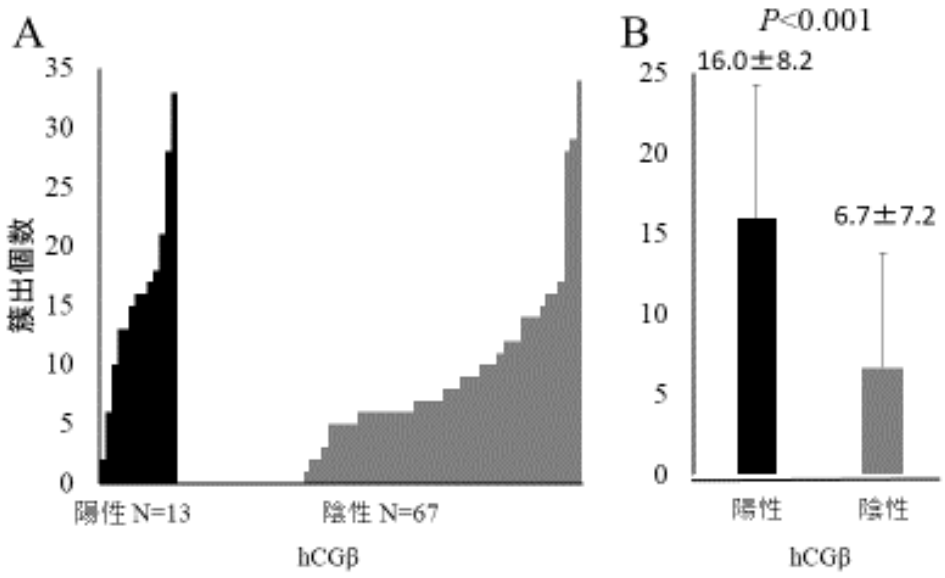


図４．hCGβ 発現の有無別、簇出個数のヒストグラム (A) と簇出個数の平均 (B)

hCGβ 陽性症例では全例で最低 1 個以上の簇出細胞を認めており、hCGβ 陰性症例と比べて平均個数は有意に多かった。

表６．簇出と hCGβ 発現の関連性

	No.		
	hCGβ 発現		
	陰性	陽性	計
簇出 (個数の平均±標準偏差)			
陰性 (3.5 ± 3.3)	50	2	52
陽性 (16.9 ± 7.0)	17	11	28
計	67	13	80

χ^2/Fisher's 正確検定で P < 0.01

簇出細胞の有無で分けると、簇出細胞数 1 個以上の 59 例中 13 例 (22%) で hCGβ 陽性であり、簇出細胞 0 個の 21 例は全例 hCGβ 陰性であった (図５) 。



図５．大腸癌 80 例の簇出細胞の有無、hCGβ 発現のプロファイル

簇出細胞を認めない 21 例は、全例が hCGβ 陰性であった。

簇出や hCGβ 発現と臨床病理学的データとの関連性

簇出や hCGβ の発現の有無について、各種病理学的因子との関連性について評価を行った(表７)。簇出陽性症例ではリンパ節転移 (P = 0.006) 、病期 (P = 0.006) 、リンパ管浸潤 (P = 0.044) 、静脈浸潤 (P = 0.013) と有意に関連していた。

hCGβ 陽性例では、分化度 (P = 0.031) 、リンパ節転移 (P = 0.021) 、病期 (P = 0.021) 、リンパ管浸潤 (P = 0.011) と有意に関連していた。

簇出陽性かつ hCGβ 発現が陽性だった症例は 11 例 (13.8%) であり、リンパ節転移 (P = 0.038) 、病期 (P = 0.038) と有意に関連していた。

近年、左側大腸癌と右側大腸癌は遺伝的に異なることが報告されているが (Arnold et al., 2017; Kuramochi et al., 2016) 、本研究の症例では簇出および hCGβ の発現と腫瘍の局在に有意な関係性は認めなかった。

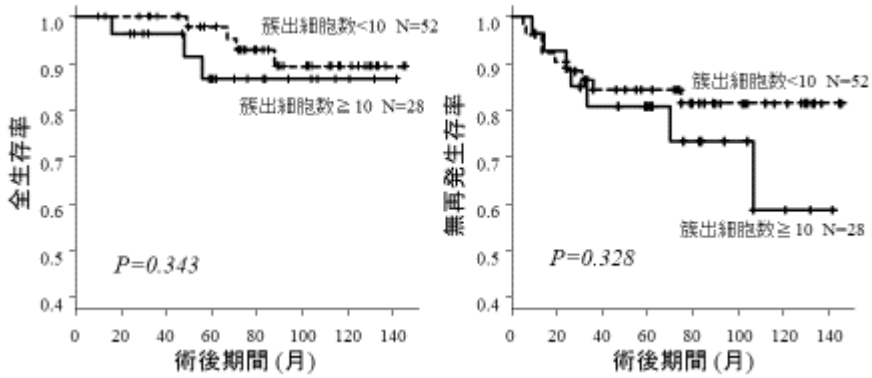
表 7．簇出の有無、hCGβ 発現の有無と各種臨床病理学的因子との関連性

		簇出			hCGβ 発現			簇出と hCGβ 発現		
評価項目	計 (n=80)	陽性 (n=28)	陰性 (n=52)	P 値	陽性 (n=13)	陰性 (n=67)	P 値	Yes (n=11)	No (n=69)	P 値
1. 腫瘍の局在										
右側結腸	29	10	19	1.000	6	23	0.531	5	24	0.515
左側結腸	51	18	33		7	44		6	45	
2. 組織型										
高分化	34	8	26	0.064	2	32	0.031*	2	32	0.106
中−低分化	46	20	26		11	35		9	37	
3. 深達度										
pT1-2	17	3	14	0.091	1	16	0.192	1	16	0.441
pT3-4	63	25	38		12	51		10	53	
4. リンパ節転移										
pN0	53	13	40	0.006*	5	48	0.021*	4	49	0.038*
pN1-3	27	15	12		8	19		7	20	
5. 病期										
I-II	53	13	40	0.006*	5	48	0.021*	4	49	0.038*
III	27	15	12		8	19		7	20	
6. リンパ管浸潤										
無し	38	9	29	0.044*	2	36	0.011*	2	36	0.051
あり	42	19	23		11	31		9	33	
7. 静脈浸潤										
無し	32	6	26	0.013*	4	28	0.458	3	29	0.511
あり	48	22	26		9	39		8	40	
8. 再発										
無し	68	23	45	0.744	10	58	0.373	9	59	0.667
あり	12	5	7		3	9		2	10	

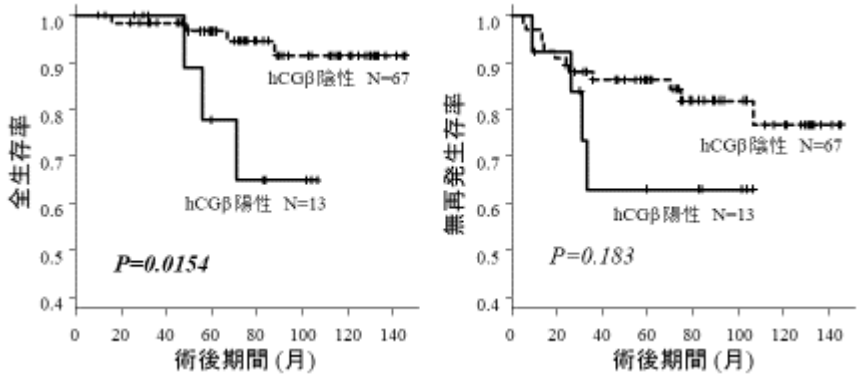
簇出および hCGβ 発現と患者予後との関連

簇出陽性例は陰性例と比較し、全生存期間と無再発生存期間において予後不良な傾向を認めたが、有意差は認めなかった (P=0.343/0.328) (図６a) 。hCGβ 陽性例では陰性例と比較し、無再発生存期間は有意差を認めなかった (P=0.183) が予後不良な傾向があり、全生存期間は有意に予後不良であった (図６b) (P = 0.02) 。簇出と hCGβ 発現の両者が陽性の場合も、無再発生存期間は有意差無かった (p=0.33) が、全生存期間は他の群と比較して有意に予後が不良であった (図６c) (P < 0.01) 。

a



b



c

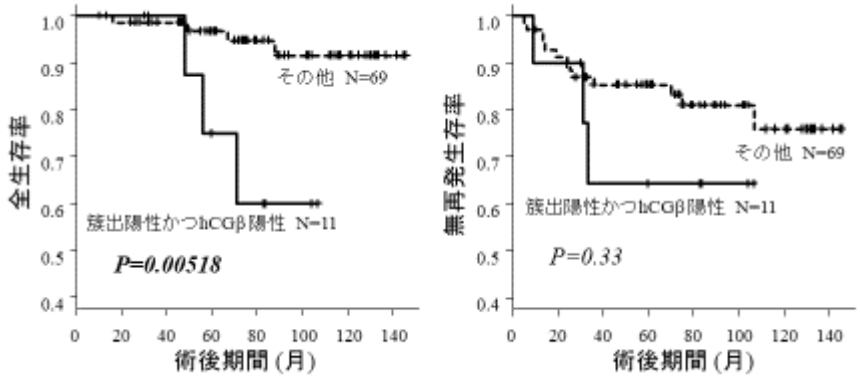


図６．腫出の有無、hCGβ 発現の有無、共発現の有無別の生存曲線

腫出陽性例、hCGβ 陽性例、腫出および hCGβ 陽性例ではそれぞれその他の症例と比較して全生存および無再発生存期間が不良であった。hCGβ 陽性例、腫出および hCGβ 陽性例の全生存期間に関しては有意差を認めた。

簇出と hCGβ 発現のさらなる意義を調べるため、全生存期間に対して Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析をおこなった。その結果、静脈浸潤、hCGβ 発現、簇出と hCGβ の共発現が有意な予後不良因子となった (表８) 。さらに多変量解析を行ったところ簇出と hCGβ の共発現が独立した予後不良因子であることが判明した。

表８．大腸癌 80 例の全生存期間に対する単変量解析と多変量解析

評価項目	計 (n=80)	単変量解析		多変量解析		
		RR (95 % CI)	P 値	RR (95 % CI)	ハザード比	P 値
1. 腫瘍の局在		3.86 (0.89-1.39)	0.239		NC	
右側結腸	29					
左側結腸	51					
2. 組織型		3.92 (1.10-2.41)	0.113		NC	
高分化型	34					
中-低分化	46					
3. リンパ節転移		2.27 (1.31-1.94)	0.163		NC	
pN0	53					
pN1-3	27					
4. 病期		2.27 (1.31-1.94)	0.163		NC	
I-II	53					
III	27					
5. リンパ管浸潤		3.56 (0.59-1.19)	0.275		NC	
無し	38					
あり	42					
6. 静脈浸潤		4.37 (1.58-4.21)	0.040*	0.95–13.18	3.53	0.353
無し	32					
あり	48					
7. 簇出		1.89 (0.65-0.90)	0.343		NC	
陰性	52					
陽性	28					
8. hCGß 発現		6.12 (0.74-5.87)	0.015*	0.08-9.92	5.33	0.054
陰性	67					
陽性	13					
9. 簇出陽性かつ hCGß 陽性		6.26 (0.82-7.82)	0.005*	1.44-29.34	6.49	0.015*
No	69					
Yes	11					

RR; Relative risk/hazard ratio, CI; confidence interval, NC; not calculable

次に大腸早期癌での hCGβ 発現について検討した。深達度が粘膜下層まで (Tis-T1)

の 17 症例の詳細を表 9 に示す。1 例のみでリンパ節転移を認め、簇出細胞は 29 個で簇出陽性だったが、hCGβ は陰性であった。hCGβ 陽性だった 1 例は簇出個数が 21 個で陽性だったが、リンパ節転移や脈管浸潤は認めていない。

表 9．深達度が粘膜下層までの 17 例の病理学的プロファイル

症例	簇出個数	hCGß 発現	生死	生存期間	再発	分化度	リンパ節転移	病期	リンパ管浸潤	静脈浸潤
1	29	陰性		59		中-低分化	あり	III	あり	あり
2	0	陰性		92		高分化	無し	0-II	無し	無し
3	0	陰性		36		高分化	無し	0-II	無し	無し
4	2	陰性		72		高分化	無し	0-II	無し	無し
5	0	陰性		104		中-低分化	無し	0-II	無し	無し
6	7	陰性		122		中-低分化	無し	0-II	無し	無し
7	21	陽性		104		高分化	無し	0-II	無し	無し
8	0	陰性		103		高分化	無し	0-II	あり	無し
9	6	陰性		57		高分化	無し	0-II	無し	あり
10	0	陰性		80		高分化	無し	0-II	無し	あり
11	0	陰性		28		高分化	無し	0-II	無し	無し
12	0	陰性		85		高分化	無し	0-II	無し	無し
13	6	陰性		90		高分化	無し	0-II	無し	あり
14	0	陰性		74		高分化	無し	0-II	無し	無し
15	0	陰性		79		高分化	無し	0-II	無し	無し
16	0	陰性		92		高分化	無し	0-II	無し	無し
17	15	陰性		61		中-低分化	無し	0-II	あり	無し

進行度別の hCGβ 発現の有無、簇出の有無、簇出細胞の有無について検索した (表１０)。大腸早期癌においては 17 例中 1 例 (5.9%) で、進行癌においては 63 例中 12 例 (19.1%) に hCGβ の発現を認めた。早期癌における hCGβ 発現頻度は低かった。また簇出については、早期癌では 17 例中 3 例 (17.6%) で、進行癌では 63 例中 25 例 (39.7%) で簇出陽性だった。また簇出細胞の有無を 0 個対 1 個以上で分けて再

評価すると、早期癌では 17 例中 7 例 (41.2%) で、進行癌では 63 例中 52 例 (82.5%) で 1 個以上の簇出細胞を認めており、進行癌と簇出の有無について有意な関連を認めた (P=0.00136) 。

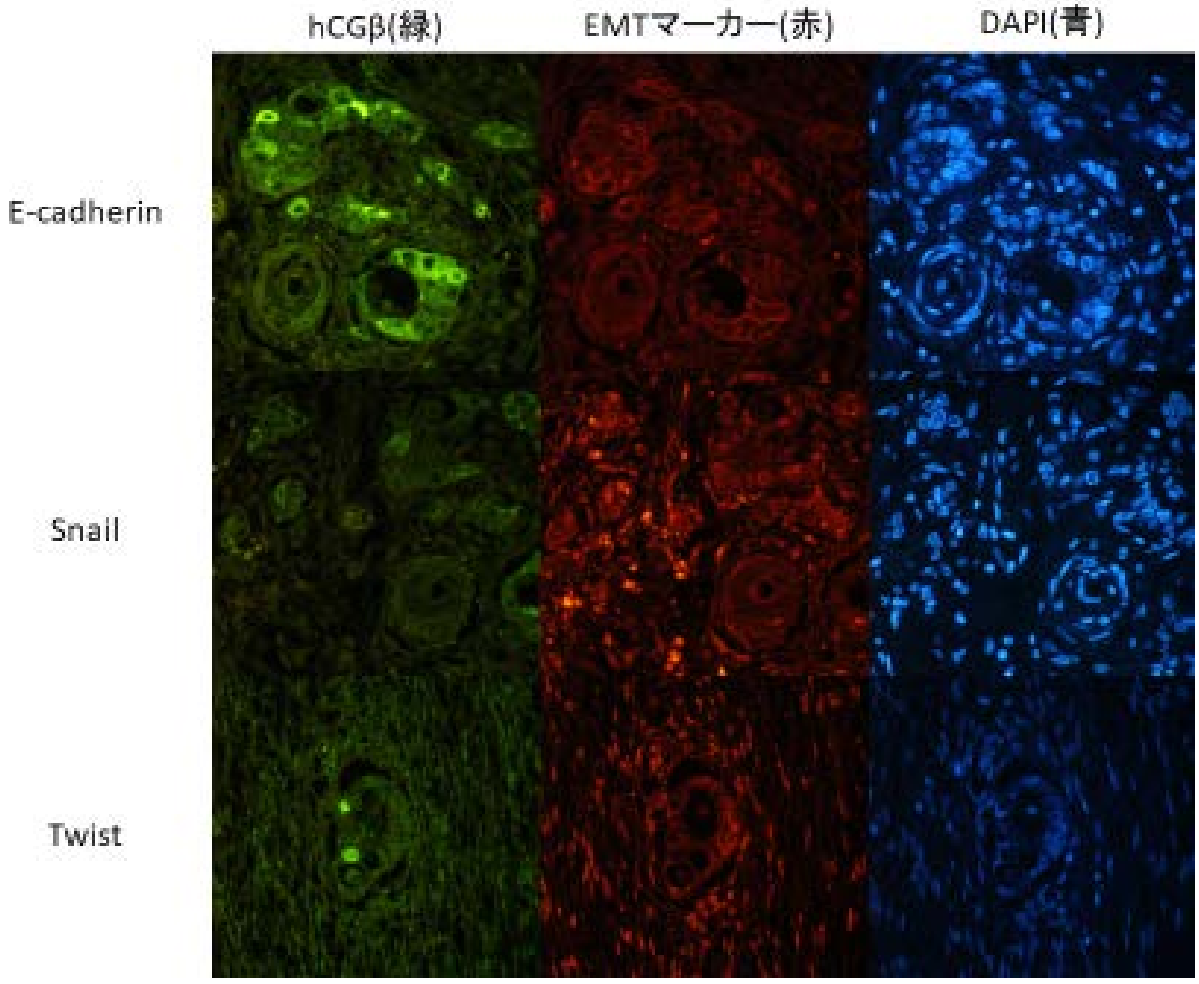
表１０

	HCGβ-expression		Total number	Positive rate (%)
	positive	negative		
Early disease	1	16	17	5.9
Advanced disease	12	51	63	19.1
Total number	13	67	80	16.3
			P=0.28	
	Tumor budding			
	Positive （≧10)	Negative (<10)		
Early disease	3	14	17	17.6
Advanced disease	25	38	63	39.7
Total number	28	52	80	35.0
			P=0.151	
	Tumor budding			
	Positive （≧1)	Negative (=0)		
Early disease	7	10	17	41.2
Advanced disease	52	11	63	82.5
Total number	59	21	80	35.0
			P=0.00136	

実験②　大腸癌組織におけるhCGβとEMT関連蛋白の発現の評価

簇出を含む腫瘍先進部における顕微鏡写真を以下に示す (図 7 A, B) 。

A. hCGβ positive case



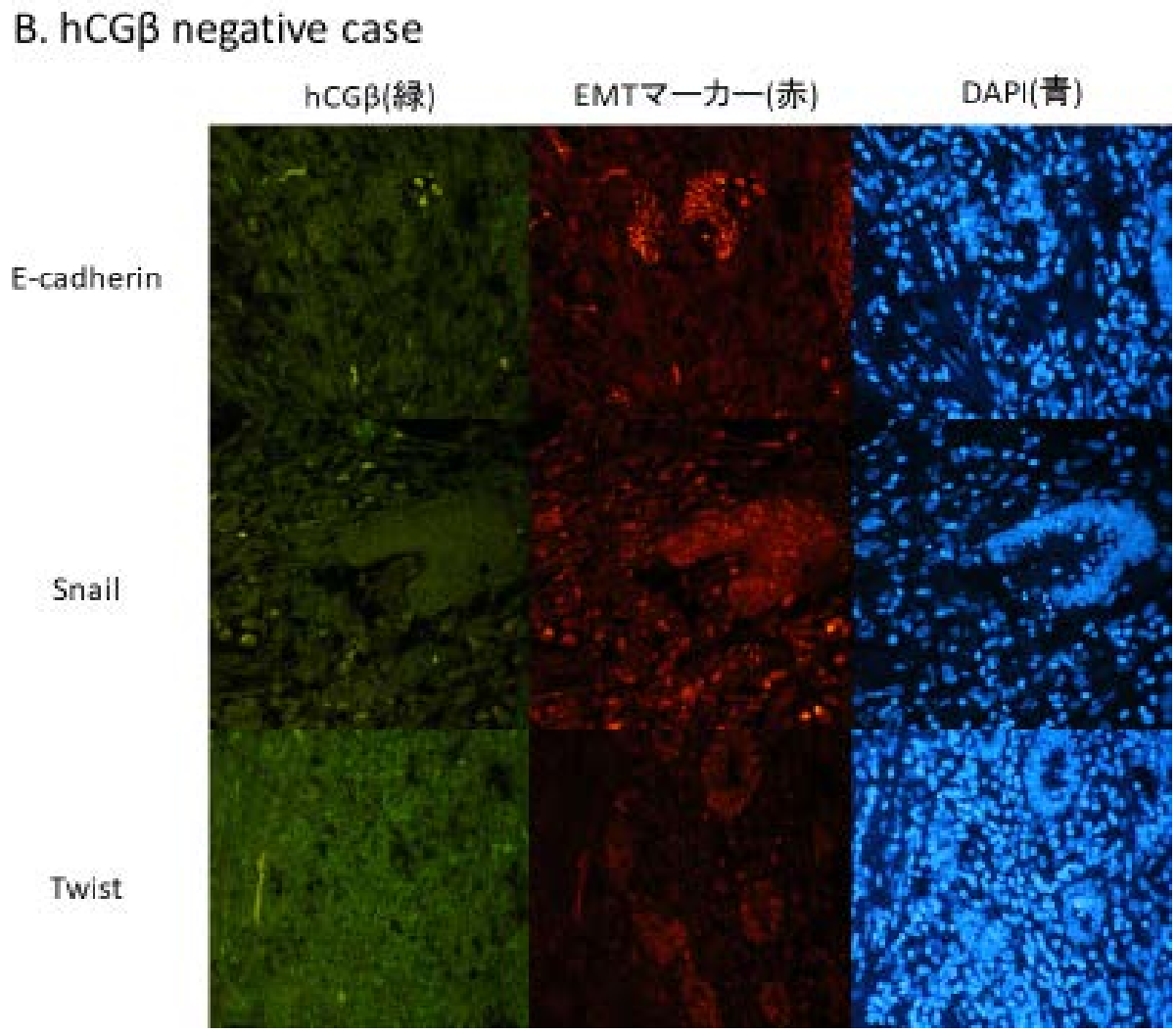


図７．簇出含む腫瘍先進部における EMT 関連マーカーの発現

A: hCGβ 陽性症例、B: hCGβ 陰性症例。それぞれ x400 倍率。

A の上段：hCGβ 陽性細胞では E-cadherin (赤) の膜発現が減弱。A の中段：hCGβ 陽性細胞では核の Snail 発現 (赤) を認める。A の下段：間質細胞の核に Twist (赤) の発現を認める。

B の上段：腫瘍細胞の膜全体に E-cadherin が強く発現している。B の中段：腫瘍細胞の核の Snail 発現は弱い。B の下段：腫瘍細胞の核に Twist の発現を認める。

hCGβ 陰性症例と hCGβ 陽性症例における EMT 関連蛋白発現強度の比較

hCGβ 陰性症例と陽性症例の簇出を含む腫瘍先進部腫瘍細胞における EMT 関連蛋白の発現強度の平均値を比較した (図８) 。E-cadherin の発現強度は hCGβ 陰性症例 vs 陽性症例では 2.0±0.0 vs 0.5±0.58　(P=0.007) であり、陽性例では E-cadherin 発現の減弱を認めた。Snail の発現強度は陰性症例 vs 陽性症例では 1.33±1.53 vs 2.80±1.48 (P=0.229) であり、陽性例において Snail 発現が増加していたが、統計学的に有意差は無かった。Twist の発現強度は陰性症例 vs 陽性症例では 5.0±1.73 vs 1.0±1.22 (P=0.008) と、陽性例での減弱を認めた。

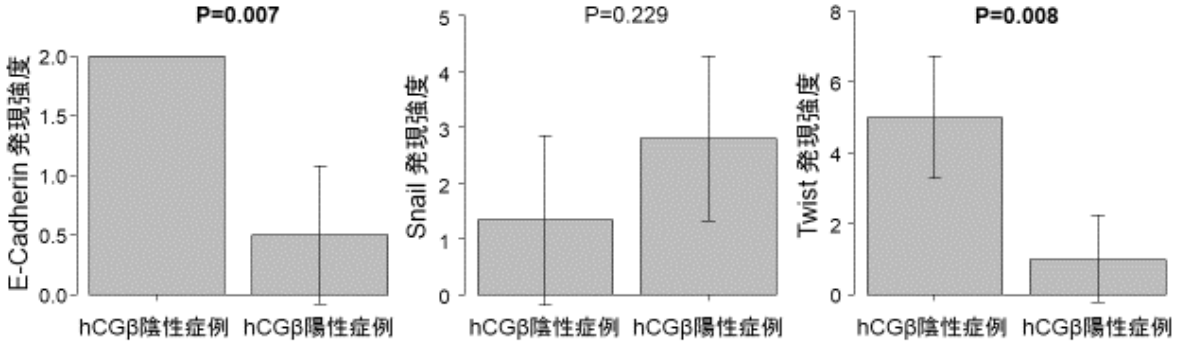


図８．hCGβ 陰性症例と hCGβ 陽性症例の腫瘍先進部における EMT 関連蛋白の発現

hCGβ 陽性症例の陽性細胞においては、hCGβ 陰性症例の hCGβ 陰性細胞と比較して E-cadherin と Twist の発現減弱と、Snail の発現増強を認めた。

hCGβ 陽性例における hCGβ 陰性細胞と hCGβ 陽性細胞の EMT 関連蛋白発現強度の比較

hCGβ 陽性症例における hCGβ 陰性細胞と hCGβ 陽性細胞での EMT 関連蛋白発現強度の平均値を比較した (図９) 。E-cadherin に関しては、hCGβ 陰性細胞よりも陽性細胞で発現の減弱が認められた (3.25±1.26 vs 0.50±0.58；p=0.007) 。Snail に関しては、hCGβ 陰性細胞と陽性細胞でその発現に大きな変化は見られなかった (2.8±

0.84 vs 2.8±1.48；p=1.000) 。Twist に関しては、hCGβ 陰性細胞より陽性細胞で発現の減弱がみられた (3.2±0.84 vs 1.0±1.22；p=0.01) 。hCGβ 陽性症例の腫瘍先進部間質細胞においては Twist の顕著な発現が認められた (図 7 A 下段) 。

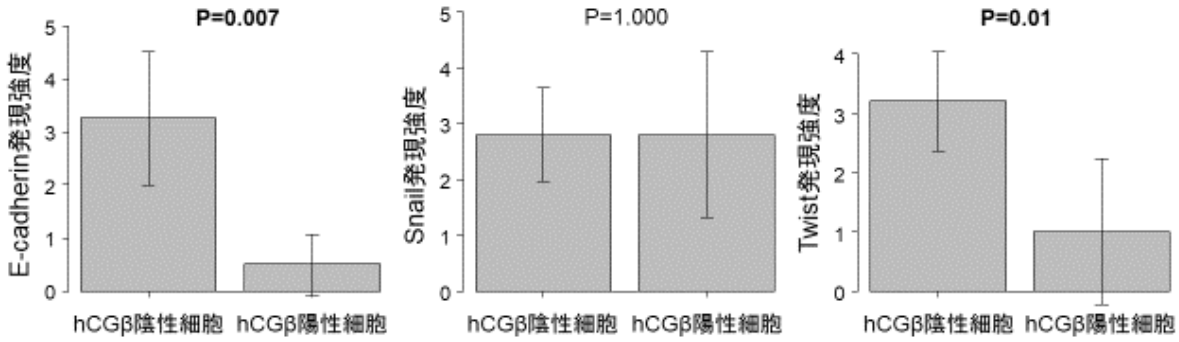


図９．hCGβ 陽性例における hCGβ 陰性細胞と hCGβ 陽性細胞の EMT 関連蛋白発現強度

hCGβ 陽性細胞では hCGβ 陰性細胞と比較して、E-cadherin と Twist の発現減弱を認めた。

考察

簇出と hCGβ 発現の意義

実験① (簇出と hCG β 発現と病理学的因子や予後との関係性の評価) では、大腸癌における簇出および hCGβ 発現の臨床病理学的な意義について検討した。今回の結果から、大腸癌の進行においてこの 2 つの因子が共に発現することで、EMT を誘導すること、そして腫瘍先進部においては簇出と hCGβ の発現に関連性があることが判明した。特に、簇出と hCGβ が共発現している症例の全生存期間は、他の群と比較して最も不良であり、リンパ節転移陽性率が高かった。本検討の症例数は 80 例であったが、今後さらに症例検討を重ね、臨床病理学的因子や再発、予後との相関を検討することができれば、簇出と hCGβ は大腸癌における有用なバイオマーカーになるかもしれない。

本研究における臨床への応用としては、①大腸癌根治切除後の標本において簇出と hCGβ の共発現が見られた場合、これらの患者は予後不良であることが予想されるため、より集学的で、可能であれば高容量での補助化学療法を行うべきなのかもしれない。また、②早期大腸癌の内視鏡的切除後の標本で根治切除が得られている症例においても、病理診断で簇出と hCGβ の共発現が見られた場合は、潜在的なリンパ節転移の可能性を示している可能性があり、リンパ節郭清を伴う外科的切除が示唆される。

実験② (大腸癌組織におけるhCGβとEMT関連蛋白の発現の評価) については、簇出はEMTの発現を表している可能性があるが、簇出細胞が腫瘍本体から分離するという仮説は立証されておらず、未だ議論され続けている。これまでに大腸癌の腫瘍

先進部は腫瘍本体と比較して、Wnt/β-catenin target genes やNF-κB target genes の発現が上昇していることが報告されている (Hlubek et al., 2007; Horst et al., 2009) 。最近では簇出細胞そのものにおいて、TGFβやWnt シグナル経路が活性化しており、EMT様の性質を持っていることが報告されている (De Smedt et al., 2017) 。先行研究においてhCGβがTGFβ receptorの活性化を介してEMTを誘導していることを報告した (Kawamata et al., 2018) 。さらに実験②において、hCGβ陽性例では陰性例と比較してE-cadherinの発現低下と、Snailの発現増加を、またhCGβ陽性例においてhCGβ陰性細胞と比較して陽性細胞でE-cadherinの発現の減弱を認めている。またTwistについてはhCGβ陽性症例の腫瘍先進部間質細胞での発現が顕著であった。このことは、Twistが腫瘍細胞ではなく、先進部間質に存在することで、EMT様の変化を来して簇出を形成させるという、Galvanらの報告に一致している (Galvan et al., 2015) 。腫瘍先進部のE-cadherin発現の減弱、Snail発現の増強、Twistの間質発現の増強という変化が、hCGβの発現により強まっていることから、hCGβにより腫瘍先進部でEMT様変化を来し、簇出を形成するという推論の裏付けになるのではないかと考えた。また、この結果は、簇出とEMTが密接に関連しているという仮定を支持するものであった。

簇出細胞や腫瘍先進部においてhCGβが発現しているという事実から、hCGβが、簇出から発生する転移に対する治療のターゲットになりうることが期待される。進行再発大腸癌において、簇出の存在はEGFR抗体に対する抵抗性と関連しているとの報告があり (Zlobec et al., 2010) 、そのような症例に対する新規治療方法の確立が必要である。ワクチンや組み換え抗体によりhCGβ陽性簇出細胞をターゲットにすることは、進行再発大腸癌や根治切除後の再発予防における新しい治療オプションの一つになりうる。実際、過去の臨床試験において、hCGβワクチンは進行再発大腸癌患

者の予後を大幅に延長させている (Moulton et al., 2002) 。

本研究では、大腸癌組織においてhCGβが腫瘍先進部や簇出細胞に発現し、EMT関連蛋白の転写に変化を与える (E-cadherin発現の減弱、Snail発現の増強、Twistの間質発現の増強) ことを明らかにした。先行研究の結果と合わせて、大腸癌の進展について以下のような新たなEMT-pathwayを提案する。先進部の腫瘍細胞がhCGβを自己分泌し、TGFβレセプターに結合することで、下流のTGFβカスケードが活性化し、EMT関連蛋白の転写に変化を与える (図１０A) 。hCGβにより遊走能と浸潤能を獲得した腫瘍細胞が本体から分離して簇出細胞となる。悪性度の増したhCGβ発現腫瘍細胞が他臓器に転移していく (図１０B) 。

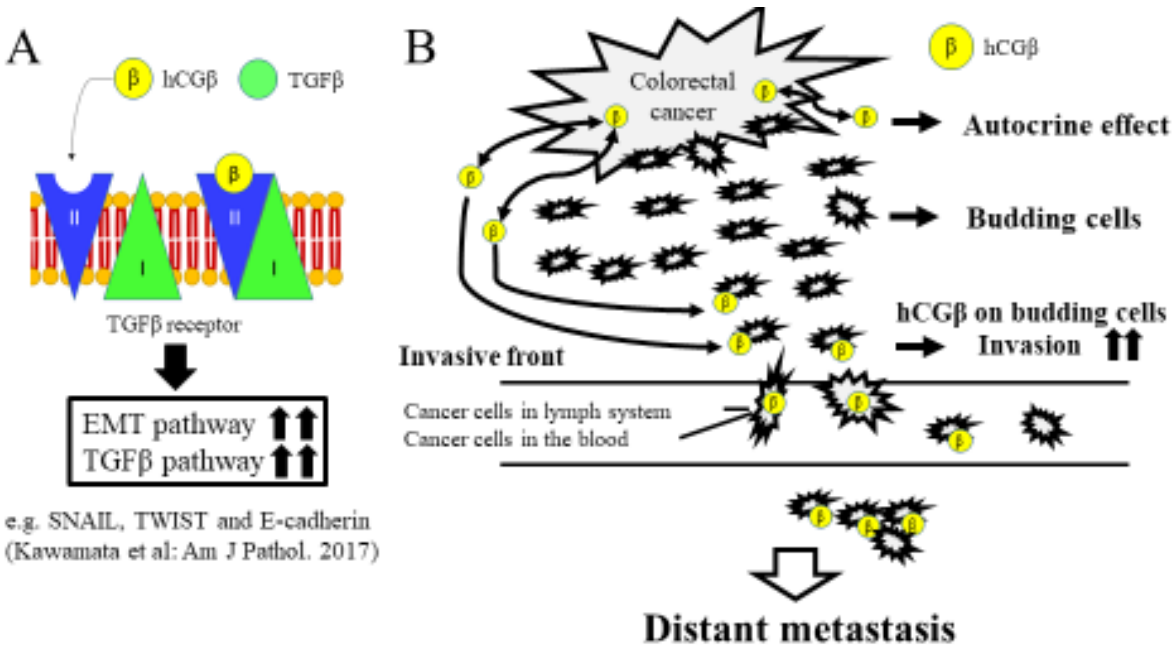


図１０．hCGβ 刺激による EMT-pathway を介した大腸癌の進展プロセス

A：hCGβがTGFβレセプターに結合することで、TGFβ pathwayが活性化し、EMTが誘導される。B：癌細胞はhCGβを自己分泌し、TGFβ pathwayを介したEMTを誘導する。それにより間葉系の性質を獲得した癌細胞は本体から離れて簇出細胞となり、

脈管浸潤を介して遠隔転移巣を形成する。

本実験では、大腸癌において簇出や腫瘍先進部にhCGβが発現すること、そして両方の性質を持つ腫瘍は予後が悪いことを明らかにした。さらにhCGβ発現はEMTを介した簇出を誘導する一因子である可能性を明らかにした。これは簇出とEMTの関係性を証明する一助になる可能性がある。簇出とhCGβの発現は大腸癌診療における新規予後予測マーカーかつ治療のターゲットとして役立つかもしれない。

総括及び結論

①本研究全体から得られた新知見

・ hCGβ の発現は腫瘍先進部や簇出に一致して存在した。

・ hCGβ 発現例では全例で簇出細胞を認めた。

・ hCGβ の発現と簇出の発現に関連性を認めた。

・ hCGβ と簇出の共発現は最も予後不良であった。

・ hCGβ の発現により、腫瘍先進部の E-cadherin 減弱、Snail 増強、先進部間質細胞の Twist 増強という変化が強まる傾向があった。

②新知見の意義

本研究は、hCGβ が、腫瘍先進部や簇出細胞に発現し、EMT へ関与していることを明らかにした研究である。先行研究において、hCGβ と EMT の関係性が明らかになり、さらに本研究で hCGβ と簇出の関係性とその予後への影響が明らかになったことから、hCGβ と簇出の共発現は大腸癌における新規予後予測マーカーとして有用である可能性がある。

大腸癌組織において、hCGβ 発現により簇出含む腫瘍先進部に EMT 様の変化を来すことは、簇出と EMT の関連性を裏付けるものであり、さらに大腸癌における簇出の誘導因子の一つとして、hCGβ 刺激による EMT の存在が示唆された。

③今後の研究展開と課題

・大腸癌の新規予後予測マーカーとしての意義を追求するため、hCGβ と簇出の共発現がリンパ節転移だけでなく、再発についての独立した予後不良因子となること

を、症例を蓄積させて証明する必要がある。

・ 大腸癌組織において簇出に EMT 関連マーカーが発現していることを、有意差をもって証明するために、簇出細胞を鑑別するためのサイトケラチン染色を含んだ、蛍光 3 重免疫染色で評価を行い、簇出と EMT の関係性を証明する。

・ hCGβ 過剰発現大腸癌細胞株のマウス移植モデルにより腫瘍周囲に簇出が誘導されることを確認する。またマウスモデルが完成した場合、hCGβ ワクチンや抗 hCGβ 抗体を用いた治療効果判定を行う。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究の機会をお与えいただき、全般にわたり直接ご指導・ご鞭撻を賜りました、北海道大学大学院医学研究院消化器外科学分野 I 教授　武冨紹信先生、同助教 本間重紀先生、北海道大学大学院医学研究院病理学講座腫瘍病理学教室教授　田中伸哉先生、慶應義塾大学病院腫瘍センター特任教授　西原広史先生に深く感謝申し上げます。

また基礎論文および学位論文の作成にあたり多大なご尽力を頂いた北海道大学大学院医学研究院消化器外科学分野 I 川俣太先生に心より感謝申し上げます。

最後に本研究の遂行にあたり、様々な点でご助言やご協力を頂きました北海道大学大学院医学研究院消化器外科学教室 I および北海道大学大学院医学研究院病理学講座腫瘍病理学教室の教室員の先生方と事務職員の皆様に厚く御礼を申し上げます。

利益相反

開示すべき利益相反状態はない。

引用文献

Arnold, D., Lueza, B., Douillard, J.Y., Peeters, M., Lenz, H.J., Venook, A., Heinemann, V., Van Cutsem, E., Pignon, J.P., Tabernero, J.*, et al.* (2017). Prognostic and predictive value of primary tumour side in patients with RAS wild-type metastatic colorectal cancer treated with chemotherapy and EGFR directed antibodies in six randomized trials. Ann Oncol *28*, 1713-1729.

Bathe, O.F., and Farshidfar, F. (2014). From genotype to functional phenotype: unraveling the metabolomic features of colorectal cancer. Genes (Basel) *5*, 536-560.

Beaton, C., Twine, C.P., Williams, G.L., and Radcliffe, A.G. (2013). Systematic review and meta-analysis of histopathological factors influencing the risk of lymph node metastasis in early colorectal cancer. Colorectal Dis *15*, 788-797.

Berndt, S., Blacher, S., Munaut, C., Detilleux, J., Perrier d'Hauterive, S., Huhtaniemi, I., Evain-Brion, D., Noel, A., Fournier, T., and Foidart, J.M. (2013). Hyperglycosylated human chorionic gonadotropin stimulates angiogenesis through TGF-beta receptor activation. FASEB J *27*, 1309-1321.

Bradley, C.A., Dunne, P.D., Bingham, V., McQuaid, S., Khawaja, H., Craig, S., James, J., Moore, W.L., McArt, D.G., Lawler, M.*, et al.* (2016). Transcriptional upregulation of c-MET is associated with invasion and tumor budding in colorectal cancer. Oncotarget *7*, 78932-78945.

Brenner, H., Kloor, M., and Pox, C.P. (2014). Colorectal cancer. Lancet *383*, 1490-1502.

Brierley, J.D., Gospodarowicz, M.K., and Wittekind, C. (2016). TNM Classification of Malignant Tumours, 8th Edition.

Butler, S.A., Ikram, M.S., Mathieu, S., and Iles, R.K. (2000). The increase in bladder carcinoma cell population induced by the free beta subunit of human chorionic gonadotrophin is a result of an anti-apoptosis effect and not cell proliferation. Br J Cancer *82*, 1553-1556.

Canney, A.L., Kevans, D., Wang, L.M., Hyland, J.M., Mulcahy, H.E., O'Donoghue, D.P., O'Sullivan, J., Geraghty, R., and Sheahan, K. (2012). Stage II colonic adenocarcinoma: a detailed study of pT4N0 with emphasis on peritoneal involvement and the role of tumour budding. Histopathology *61*, 488-496.

Cole, L.A. (2012). hCG, the wonder of today's science. Reprod Biol Endocrinol *10*, 24.

De Smedt, L., Palmans, S., Andel, D., Govaere, O., Boeckx, B., Smeets, D., Galle, E., Wouters, J., Barras, D., Suffiotti, M.*, et al.* (2017). Expression profiling of

budding cells in colorectal cancer reveals an EMT-like phenotype and molecular subtype switching. Br J Cancer *116*, 58-65.

Ferlay, J., Soerjomataram, I., Dikshit, R., Eser, S., Mathers, C., Rebelo, M., Parkin, D.M., Forman, D., and Bray, F. (2015). Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. Int J Cancer *136*, E359-386.

Fujii, D., Brissenden, J.E., Derynck, R., and Francke, U. (1986). Transforming growth factor beta gene maps to human chromosome 19 long arm and to mouse chromosome 7. Somat Cell Mol Genet *12*, 281-288.

Galvan, J.A., Helbling, M., Koelzer, V.H., Tschan, M.P., Berger, M.D., Hadrich, M., Schnuriger, B., Karamitopoulou, E., Dawson, H., Inderbitzin, D.*, et al.* (2015). TWIST1 and TWIST2 promoter methylation and protein expression in tumor stroma influence the epithelial-mesenchymal transition-like tumor budding phenotype in colorectal cancer. Oncotarget *6*, 874-885.

Garcia-Solano, J., Conesa-Zamora, P., Trujillo-Santos, J., Makinen, M.J., and Perez-Guillermo, M. (2011). Tumour budding and other prognostic pathological features at invasive margins in serrated colorectal adenocarcinoma: a comparative study with conventional carcinoma. Histopathology *59*, 1046-1056.

Gospodarowicz, M., O'Sullivan, B., and Sovin, L. (2006). Prognostic factors in cancer. 3rd ed., p.267-279.

Grigore, A.D., Jolly, M.K., Jia, D., Farach-Carson, M.C., and Levine, H. (2016). Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. J Clin Med *5*.

Gulubova, M., Manolova, I., Ananiev, J., Julianov, A., Yovchev, Y., and Peeva, K. (2010). Role of TGF-beta1, its receptor TGFbetaRII, and Smad proteins in the progression of colorectal cancer. Int J Colorectal Dis *25*, 591-599.

Hase, K., Shatney, C., Johnson, D., Trollope, M., and Vierra, M. (1993). Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum *36*, 627-635.

Hlubek, F., Brabletz, T., Budczies, J., Pfeiffer, S., Jung, A., and Kirchner, T. (2007). Heterogeneous expression of Wnt/beta-catenin target genes within colorectal cancer. Int J Cancer *121*, 1941-1948.

Horcic, M., Koelzer, V.H., Karamitopoulou, E., Terracciano, L., Puppa, G., Zlobec, I., and Lugli, A. (2013). Tumor budding score based on 10 high-power fields is a promising basis for a standardized prognostic scoring system in stage II colorectal cancer. Hum Pathol *44*, 697-705.

Horst, D., Budczies, J., Brabletz, T., Kirchner, T., and Hlubek, F. (2009). Invasion associated up-regulation of nuclear factor kappaB target genes in colorectal

cancer. Cancer *115*, 4946-4958.

Kawachi, H., Eishi, Y., Ueno, H., Nemoto, T., Fujimori, T., Iwashita, A., Ajioka, Y., Ochiai, A., Ishiguro, S., Shimoda, T.*, et al.* (2015). A three-tier classification system based on the depth of submucosal invasion and budding/sprouting can improve the treatment strategy for T1 colorectal cancer: a retrospective multicenter study. Mod Pathol *28*, 872-879.

Kawamata, F., Nishihara, H., Homma, S., Kato, Y., Tsuda, M., Konishi, Y., Wang, L., Kohsaka, S., Liu, C., Yoshida, T.*, et al.* (2018). Chorionic Gonadotropin-beta Modulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma Metastasis. Am J Pathol *188*, 204-215.

Keum, M.A., Lim, S.B., Kim, S.A., Yoon, Y.S., Kim, C.W., Yu, C.S., and Kim, J.C. (2012). Clinicopathologic factors affecting recurrence after curative surgery for stage I colorectal cancer. J Korean Soc Coloproctol *28*, 49-55.

Kevans, D., Wang, L.M., Sheahan, K., Hyland, J., O'Donoghue, D., Mulcahy, H., and O'Sullivan, J. (2011). Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. Int J Surg Pathol *19*, 751-760.

Koelzer, V.H., Zlobec, I., and Lugli, A. (2016). Tumor budding in colorectal cancer--ready for diagnostic practice? Hum Pathol *47*, 4-19.

Kuramochi, H., Nakamura, A., Nakajima, G., Kaneko, Y., Araida, T., Yamamoto, M., and Hayashi, K. (2016). PTEN mRNA expression is less pronounced in left- than right-sided colon cancer: a retrospective observational study. BMC Cancer *16*, 366.

Lai, Y.H., Wu, L.C., Li, P.S., Wu, W.H., Yang, S.B., Xia, P., He, X.X., and Xiao, L.B. (2014). Tumour budding is a reproducible index for risk stratification of patients with stage II colon cancer. Colorectal Dis *16*, 259-264.

Lapthorn, A.J., Harris, D.C., Littlejohn, A., Lustbader, J.W., Canfield, R.E., Machin, K.J., Morgan, F.J., and Isaacs, N.W. (1994). Crystal structure of human chorionic gonadotropin. Nature *369*, 455-461.

Liu, X.Q., Rajput, A., Geng, L., Ongchin, M., Chaudhuri, A., and Wang, J. (2011). Restoration of transforming growth factor-beta receptor II expression in colon cancer cells with microsatellite instability increases metastatic potential in vivo. J Biol Chem *286*, 16082-16090.

Louhimo, J., Alfthan, H., Stenman, U.H., and Haglund, C. (2004a). Serum HCG beta and CA 72-4 are stronger prognostic factors than CEA, CA 19-9 and CA 242 in pancreatic cancer. Oncology *66*, 126-131.

Louhimo, J., Kokkola, A., Alfthan, H., Stenman, U.H., and Haglund, C. (2004b). Preoperative hCGbeta and CA 72-4 are prognostic factors in gastric cancer. Int J Cancer *111*, 929-933.

Lugli, A., Karamitopoulou, E., Panayiotides, I., Karakitsos, P., Rallis, G., Peros, G., Iezzi, G., Spagnoli, G., Bihl, M., Terracciano, L.*, et al.* (2009). CD8+ lymphocytes/ tumour-budding index: an independent prognostic factor representing a 'pro-/anti-tumour' approach to tumour host interaction in colorectal cancer. Br J Cancer *101*, 1382-1392.

Lugli, A., Karamitopoulou, E., and Zlobec, I. (2012). Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. Br J Cancer *106*, 1713-1717.

Lugli, A., Kirsch, R., Ajioka, Y., Bosman, F., Cathomas, G., Dawson, H., El Zimaity, H., Flejou, J.F., Hansen, T.P., Hartmann, A.*, et al.* (2017). Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. Mod Pathol *30*, 1299-1311.

Lundin, M., Nordling, S., Lundin, J., Alfthan, H., Stenman, U.H., and Haglund, C. (2001). Tissue expression of human chorionic gonadotropin beta predicts outcome in colorectal cancer: a comparison with serum expression. Int J Cancer *95*, 18-22.

Mitrovic, B., Schaeffer, D.F., Riddell, R.H., and Kirsch, R. (2012). Tumor budding in colorectal carcinoma: time to take notice. Mod Pathol *25*, 1315-1325.

Moulton, H.M., Yoshihara, P.H., Mason, D.H., Iversen, P.L., and Triozzi, P.L. (2002). Active specific immunotherapy with a beta-human chorionic gonadotropin peptide vaccine in patients with metastatic colorectal cancer: antibody response is associated with improved survival. Clin Cancer Res *8*, 2044-2051.

Nakadoi, K., Tanaka, S., Kanao, H., Terasaki, M., Takata, S., Oka, S., Yoshida, S., Arihiro, K., and Chayama, K. (2012). Management of T1 colorectal carcinoma with special reference to criteria for curative endoscopic resection. J Gastroenterol Hepatol *27*, 1057-1062.

Nakamura, T., Mitomi, H., Kanazawa, H., Ohkura, Y., and Watanabe, M. (2008). Tumor budding as an index to identify high-risk patients with stage II colon cancer. Dis Colon Rectum *51*, 568-572.

Oh, B.Y., Park, Y.A., Huh, J.W., Yun, S.H., Kim, H.C., Chun, H.K., Kim, S.H., Ha, S.Y., Lee, W.Y., and Cho, Y.B. (2018). Prognostic Impact of Tumor-Budding Grade in Stages 1-3 Colon Cancer: A Retrospective Cohort Study. Ann Surg Oncol *25*, 204-211.

Ohtsuki, K., Koyama, F., Tamura, T., Enomoto, Y., Fujii, H., Mukogawa, T., Nakagawa, T., Uchimoto, K., Nakamura, S., Nonomura, A.*, et al.* (2008).

Prognostic value of immunohistochemical analysis of tumor budding in colorectal carcinoma. Anticancer Res *28*, 1831-1836.

Okuyama, T., Oya, M., and Ishikawa, H. (2002). Budding as a risk factor for lymph node metastasis in pT1 or pT2 well-differentiated colorectal adenocarcinoma. Dis Colon Rectum *45*, 628-634.

Perez-Moreno, M., Jamora, C., and Fuchs, E. (2003). Sticky business: orchestrating cellular signals at adherens junctions. Cell *112*, 535-548.

Puisieux, A., Brabletz, T., and Caramel, J. (2014). Oncogenic roles of EMT-inducing transcription factors. Nat Cell Biol *16*, 488-494.

Quail, D.F., and Joyce, J.A. (2013). Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. Nat Med *19*, 1423-1437.

Schmoll, H.J., Van Cutsem, E., Stein, A., Valentini, V., Glimelius, B., Haustermans, K., Nordlinger, B., van de Velde, C.J., Balmana, J., Regula, J.*, et al.* (2012). ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. Ann Oncol *23*, 2479-2516.

Sobin, L.H., and Compton, C.C. (2010). TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. Cancer *116*, 5336-5339.

Suh, J.H., Han, K.S., Kim, B.C., Hong, C.W., Sohn, D.K., Chang, H.J., Kim, M.J., Park, S.C., Park, J.W., Choi, H.S.*, et al.* (2012). Predictors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. Endoscopy *44*, 590-595.

Suzuki, A., Togashi, K., Nokubi, M., Koinuma, K., Miyakura, Y., Horie, H., Lefor, A.T., and Yasuda, Y. (2009). Evaluation of venous invasion by Elastica van Gieson stain and tumor budding predicts local and distant metastases in patients with T1 stage colorectal cancer. Am J Surg Pathol *33*, 1601-1607.

Tateishi, Y., Nakanishi, Y., Taniguchi, H., Shimoda, T., and Umemura, S. (2010). Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma. Mod Pathol *23*, 1068-1072.

Thiery, J.P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. Nat Rev Cancer *2*, 442-454.

Torre, L.A., Bray, F., Siegel, R.L., Ferlay, J., Lortet-Tieulent, J., and Jemal, A. (2015). Global cancer statistics, 2012. CA Cancer J Clin *65*, 87-108.

Ueno, H., Hase, K., Hashiguchi, Y., Shimazaki, H., Yoshii, S., Kudo, S.E., Tanaka, M., Akagi, Y., Suto, T., Nagata, S.*, et al.* (2014). Novel risk factors for lymph node metastasis in early invasive colorectal cancer: a multi-institution pathology

review. J Gastroenterol *49*, 1314-1323.

Ueno, H., Mochizuki, H., Shinto, E., Hashiguchi, Y., Hase, K., and Talbot, I.C. (2002a). Histologic indices in biopsy specimens for estimating the probability of extended local spread in patients with rectal carcinoma. Cancer *94*, 2882-2891.

Ueno, H., Murphy, J., Jass, J.R., Mochizuki, H., and Talbot, I.C. (2002b). Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. Histopathology *40*, 127-132.

Ueno, H., Price, A.B., Wilkinson, K.H., Jass, J.R., Mochizuki, H., and Talbot, I.C. (2004). A new prognostic staging system for rectal cancer. Ann Surg *240*, 832-839.

Wada, H., Shiozawa, M., Katayama, K., Okamoto, N., Miyagi, Y., Rino, Y., Masuda, M., and Akaike, M. (2015). Systematic review and meta-analysis of histopathological predictive factors for lymph node metastasis in T1 colorectal cancer. J Gastroenterol *50*, 727-734.

Wang, L.M., Kevans, D., Mulcahy, H., O'Sullivan, J., Fennelly, D., Hyland, J., O'Donoghue, D., and Sheahan, K. (2009). Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. Am J Surg Pathol *33*, 134-141.

Wohlke, M., Schiffmann, L., and Prall, F. (2011). Aggressive colorectal carcinoma phenotypes of invasion can be assessed reproducibly and effectively predict poor survival: interobserver study and multivariate survival analysis of a prospectively collected series of 299 patients after potentially curative resections with long-term follow-up. Histopathology *59*, 857-866.

Yamada, N., Sugai, T., Eizuka, M., Tsuchida, K., Sugimoto, R., Mue, Y., Suzuki, M., Osakabe, M., Uesugi, N., Ishida, K.*, et al.* (2016). Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial mesenchymal transition. Hum Pathol.

Zlobec, I., and Lugli, A. (2010). Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. Oncotarget *1*, 651-661.

Zlobec, I., Molinari, F., Martin, V., Mazzucchelli, L., Saletti, P., Trezzi, R., De Dosso, S., Vlajnic, T., Frattini, M., and Lugli, A. (2010). Tumor budding predicts response to anti-EGFR therapies in metastatic colorectal cancer patients. World J Gastroenterol *16*, 4823-4831.

大腸癌研究会 (2016). 大腸癌治療ガイドライン　医師用 2016 年版.