



Title	浸潤先進部の病理学的プロファイルを用いた大腸癌新規予後層別化因子の開発に関する研究 [全文の要約]
Author(s)	松井, 博紀
Description	この博士論文全文の閲覧方法については、以下のサイトをご参照ください。 配架番号：2660 他
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(医学)
Dissertation Number	甲第14744号
Issue Date	2021-12-24
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/83879">https://hdl.handle.net/2115/83879</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Hiroki_Matsui_summary.pdf



# 学 位 論 文 (要約)

浸潤先進部の病理学的プロファイルを用いた  
大腸癌新規予後層別化因子の開発に関する研究  
(Studies on the development of the novel prognostic  
stratification factor in colorectal cancer based on  
the pathological profile of the invasive front)

2021年12月

北 海 道 大 学

松 井 博 紀



# 学 位 論 文 (要約)

浸潤先進部の病理学的プロファイルを用いた  
大腸癌新規予後層別化因子の開発に関する研究  
(Studies on the development of the novel prognostic  
stratification factor in colorectal cancer based on  
the pathological profile of the invasive front)

2021 年 12 月

北 海 道 大 学

松 井 博 紀

## 【背景と目的】

2020年の全世界における大腸癌の罹患数は1,931,590人で、乳癌、肺癌に次いで3番目に多く、死亡数は935,173人で、肺癌に次いで2番目に多い。また本邦における2018年の大腸癌の罹患数は152,254人と最も多く、死亡数は51,420人で、肺癌に次いで2番目に多い。大腸癌は世界的にも本邦においても罹患数、死亡数ともに多く、診断および治療法の確立が急務である。

大腸癌は他の多くの癌種と同様にTNM分類による病期診断を元に治療方針を決定している。しかし、同じ病期に分類された症例の間にも明らかな予後の相違があり、Stage IIの症例に対して術後補助化学療法を施行するべきか、Stage IIIの症例に対する術後補助化学療法にオキサリプラチンを併用するべきか、などの臨床的疑問が生じる。すなわち、現行のTNM分類に加え、新規予後層別化因子が必要である。腫瘍浸潤先進部の組織学的特徴は様々な癌種で予後的意義を有すると報告されている。大腸癌では、腫瘍浸潤先進部の病理組織所見に基づく予後層別化因子として、①線維性癌間質反応 (desmoplastic reaction, 以下DR)、②Klintrup grade、③低分化胞巣 (poorly differentiated cluster, 以下PDC) が近年注目されている。

DRは腫瘍の進行に伴って出現する線維組織の増生で、主に癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblast, 以下CAF) によって形成される。腫瘍中央部のDRは形態的に単調で均質であるが、腫瘍浸潤先進部のDRは多様性に富んでおり、悪性度の高い腫瘍では特異的な膠原線維が出現する。DR分類は、腫瘍浸潤先進部に出現する膠原繊維の種類に基づいており、悪性度の高い腫瘍ではmyxoidな間質やケロイド様コラーゲンが認められると報告されている。Klintrup gradeは、腫瘍浸潤先進部での炎症細胞浸潤と腫瘍細胞破壊に基づく分類である。腫瘍浸潤先進部に炎症細胞浸潤や腫瘍細胞破壊が認められない症例はlow grade、認められる症例はhigh gradeに分類され、前者の予後が不良であると報告されている。PDCは、間質に浸潤した5個以上の癌細胞で構成され、腺様構造を持たない癌胞巣と定義される。PDC grade分類は腫瘍浸潤先進部に出現するPDCの数に基づいており、その数が多いほど予後不良であると報告されている。

DR分類、Klintrup grade、PDC grade分類はいずれもHE染色標本で評価可能な所見であるため日常診療に取り入れることが容易である。また、これらは腫瘍浸潤先進部を観察して評価する所見であり、同時評価が可能である。

分子生物学的意義として、DR は CAF、Klintrup grade は腫瘍免疫、PDC は上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition, 以下 EMT) との関連が示唆されており、これらの所見を組み合わさることで、大腸癌の予後をより強く層別化できると想定される。本研究では、DR 分類、Klintrup grade、PDC grade 分類を組み合わせることによって新規予後層別化因子である Invasion front grade を作成し、中間リスク群である Stage II-III の大腸癌の予後をより強力に層別化することが可能であるか検証することを目的とした。これが達成されれば、Stage II-III の症例の中で真に術後補助化学療法の恩恵が得られる症例を同定できる可能性がある。

## 【対象と方法】

2008 年 4 月から 2017 年 3 月までに北海道大学病院消化器外科 I で根治切除を施行した Stage II-III の大腸癌症例を対象とした。術前に化学療法や放射線療法を施行した症例、虫垂癌、肛門管癌、colitic cancer、遺伝性大腸癌、重複癌と診断された症例は除外した。DR 分類は固有筋層外における腫瘍浸潤先進部を評価する所見であるため、Stage III の症例については壁深達度が固有筋層以浅の症例を除外し、計 162 例を対象とした。

対象症例の HE 染色標本を再観察し、DR 分類、Klintrup grade および PDC grade 分類を評価した。DR 分類は、腫瘍浸潤先進部に myxoid な間質を有する場合を immature、ケロイド様コラーゲンを有する場合を intermediate、いずれも有さない場合を mature と分類した。Klintrup grade は、腫瘍浸潤先進部の炎症細胞浸潤および腫瘍細胞破壊の程度から、スコア 0 (炎症細胞浸潤：なし、腫瘍細胞破壊：なし)、1 (炎症細胞浸潤：軽度、腫瘍細胞破壊：なし)、2 (炎症細胞浸潤：中等度、腫瘍細胞破壊：軽度)、3 (炎症細胞浸潤：高度、腫瘍細胞破壊：中等度以上) の 4 段階に半定量的に分類し、スコア 0-1 を high grade、スコア 2-3 を low grade と判定した。PDC grade 分類は、対物 20 倍視野で浸潤先進部を観察して PDC の数をカウントし、5 個未満を Grade 1、5-9 個を Grade 2、10 個以上を Grade 3 と分類した。DR 分類、Klintrup grade、PDC grade 分類の評価は二人の検査者 (消化器外科医と病理専門医) で予後に関するデータを盲検化して別々に行った。二人の評価が分かれた場合は該当する HE 染色標本を同時に観察し、議論を行った上で最終判定した。また、消化器外科医は少なくとも 3 ヶ月以上の期間をあけて DR

分類の評価を 2 回行った。

Invasion front grade は DR 分類、Klintrup grade、PDC grade 分類を組み合わせて作成した。DR 分類は mature、intermediate をスコア 0、immature をスコア 1、Klintrup grade は high grade をスコア 0、low grade をスコア 1、PDC grade 分類は Grade 1-2 をスコア 0、Grade 3 をスコア 1 と定義し、3 つのスコアの合計が 0-1 を Grade A、2-3 を Grade B と分類した。

Invasion front grade が Grade A の症例 6 例と Grade B の症例 6 例の腫瘍浸潤先進部から total ribonucleic acid を抽出し、nCounter® Analysis System を用いて遺伝子発現解析を行った。

Invasion front grade の再現性を評価するために検査者間および検査者内の  $\kappa$  係数を求めた。 $\kappa$  係数の値が 0.61-0.80 を「かなりの一致」、0.81-1.00 を「ほぼ完全な一致」と判定した。Invasion front grade と予後との関連を調べるために、それぞれの因子のカテゴリーごとに Kaplan-Meier 曲線を作成し、log-rank 検定を行った。さらに、Cox 比例ハザードモデルによる単変量・多変量解析を行った。単変量解析では、検査の予測性能の指標となる concordance index を算出した。Invasion front grade で Grade A の症例と Grade B の症例で発現量に差がある遺伝子群を同定するため、遺伝子のカウント数を対数変換した後に t 検定および Benjamini & Hochberg 法による多重検定の補正を行った。

## 【結果】

DR 分類は mature が 47 例 (29.0%)、intermediate が 54 例 (33.3%)、immature が 61 例 (37.7%)、Klintrup grade は high grade が 119 例 (73.5%)、low grade が 43 例 (26.5%)、PDC grade 分類は Grade 1 が 66 例 (40.7%)、Grade 2 が 38 例 (23.5%)、Grade 3 が 58 例 (35.8%) であった。Invasion front grade は Grade A が 116 例 (71.6%)、Grade B が 46 例 (28.4%) であった。Invasion front grade の  $\kappa$  係数は検査者間が 0.81、検査者内が 0.74 で、検査者間の一致度は「ほぼ完全な一致」と判定され、検査者内の一致度は「かなりの一致」と判定された。Invasion front grade の Grade A、Grade B の 3 年無再発生存率はそれぞれ 90.4%、55.9% であった ( $p < 0.001$ )。Cox 比例ハザードモデルを用いた単変量解析で、Invasion front grade は、DR 分類や Klintrup grade、PDC grade 分類単独よりも再発について予後層別化能

が高い因子であった (HR [95% C.I.]; 6.40 [3.01-13.61],  $p < 0.001$ , concordance index 0.712)。さらに多変量解析で、Invasion front grade は再発の独立した予後因子であった (HR [95% C.I.]; 5.30 [2.30-12.19],  $p < 0.001$ )。

遺伝子発現解析では、*MGP*、*PRELP*、*NR4A3*、*MEOX2*、*SFRP2*、*PTGIS*、*SPARCL1*、*ID4*、*CLU*、*ZFPM2*、*JAM3*、*MPDZ*、*LHFPL6*、*AEBP1*、*ELK3*、*APC* の 16 遺伝子が予後不良群である Grade B で有意に発現が上昇し、*MMP12*、*COL7A1*、*WARS1*、*PGK1* の 4 遺伝子が予後良好群である Grade A で有意に発現が上昇していた。

## 【考察】

Invasion front grade は DR 分類、Klintrup grade、PDC grade 分類を前述のように組み合わせて作成した。 $\kappa$  係数から Invasion front grade は検査者間の一致度が非常に高く、検査者内の一致度はかなり高かった。それぞれのカテゴリーについて Kaplan-Meier 曲線を作成して log-rank 検定を行ったところ、Grade A が Grade B よりも予後不良であることが示された。また、Cox 比例ハザードモデルによる多変量解析から独立した再発リスク因子であった。さらに concordance index の値から臨床予測性能が高い検査であることが示された。以上のように Invasion front grade は非常に有望な予後層別化因子であることが示されたが、Invasion front grade が CAF による腫瘍微小環境、腫瘍免疫、EMT を包含した所見であることがその要因であると考えられた。

遺伝子発現解析から Invasion front grade の予後層別化に寄与する 20 種類の遺伝子を同定した。それらの遺伝子についてより多くの症例で発現量を検討することによって大腸癌術後再発予測における多遺伝子アッセイの開発が期待される。さらに、これらの遺伝子の中には今までに大腸癌との関連性について報告がない、またはほとんどない遺伝子として、*PRELP*、*MPDZ*、*LHFPL6*、*ELK3*、*PGK1*、*COL7A1* の 6 種類の遺伝子が含まれていたが、これらの遺伝子について分子生物学的な検討を行うことによって、大腸癌進展のメカニズムに関する新たな知見が得られることが期待されるとともに、新規分子標的薬のターゲット分子を同定できる可能性を秘めている。

## 【結論】

DR 分類、Klintrup grade および PDC grade 分類を組み合わせて作成した新規予後層別化因子である Invasion front grade は Stage II-III 大腸癌の予後を強力に層別化できる。遺伝子発現解析から Invasion front grade の予後層別化に寄与する遺伝子として、*MGP*、*PRELP*、*NR4A3*、*MEOX2*、*SFRP2*、*PTGIS*、*SPARCL1*、*ID4*、*CLU*、*ZFPM2*、*JAM3*、*MPDZ*、*LHFP*、*AEBP1*、*ELK3*、*APC*、*MMP12*、*COL7A1*、*WARS*、*PGK1* が同定された。