

氏名（本籍） さとう けいすけ
佐藤 啓介 (福岡県)

学位の種類 博士（医学）

報告番号 甲第 1482 号

学位授与の日付 平成 26 年 3 月 25 日

学位授与の要件 学位規則第 4 条第 1 項該当（課程博士）

学位論文題目

Tumor budding in colorectal carcinoma assessed by cytokeratin immunohistochemistry and budding areas: possible involvement of c-Met

（大腸癌 tumor budding: サイトケラチン免疫組織化学と簇出範囲による評価および c-Met の関与）

論文審査委員（主査）	福岡大学	教授	鍋島 一樹
（副査）	福岡大学	教授	岩下 明德
	福岡大学	教授	黒木 政秀
	福岡大学	教授	乗富 智明

【背景】

結腸直腸癌では、予後予測と治療のために UICC の TNM 分類が広く使用されている。この分類に基づき低リスク群に分類されても、予後不良な腫瘍が存在する。より正確に患者を層別化できる追加的な予後因子が求められており、多くの研究の焦点となっている。その中で癌細胞の tumor budding/sprouting (簇出) は、結腸直腸癌における独立した予後不良因子と報告されているが、各研究者間で定義と評価方法が、大きく異なっている。簇出を示す癌細胞は周囲の微小環境の変化によって、HE 染色標本のみでは検出困難な場合がある。また、これまでの評価法では簇出範囲は評価に含まれておらず、簇出の生物学的特性を十分に反映していない可能性もある。

簇出の分子学的メカニズムは未だ解明されていない。肝細胞増殖因子/細胞分散因子 (Hepatocyte growth factor (HGF)/Scatter factor) 受容体として知られる c-Met は、結腸直腸癌の進行および転移を含む腫瘍形成 (tumorigenesis) に重要な役割を果たしており、その活性化 (リン酸化) は細胞の増殖・分化のみならず遊走や浸潤にも関与する。

【目的】

本研究の目的は以下の 2 つである。(1) より客観的に評価された budding grade と budding 範囲より成るスコアリングシステムを確立し、臨床病理学的事項や予後との相関について検討する。(2) 簇出と c-Met の関連を免疫組織化学および FISH を用いてタンパク質および遺伝子レベルで評価する。

【対象と方法】

2005 年 1 月から 2009 年 12 月に福岡大学病院消化器外科で外科的切除術を施行された原発性結腸直腸癌 139 症例 (内視鏡治療が困難な pTis 症例を 10 例含み、114 例が治癒切除) について臨床病理学的に検討した。HE およびサイトケラチン免疫染色 (AE1/AE3) 標本を用いて、癌発育先進部における budding grade を評価し、臨床病理学的事項との関連を検討した。また budding grade と budding 範囲より成る budding score を考案し、臨床病理学的因子および予後との関連を検討した。さらに、この budding score に基づいて budding low-/high-score 群に分類し、癌発育先進部の c-Met、リン酸化 c-Met のタンパク発現 (免疫組織化学) および MET 遺伝子コピー数 (FISH) との関連を評価・検討した。

【結果】

1. サイトケラチン免疫染色による budding grade は、HE のみによる評価に比べて upgrade し、さらに脈管侵襲、リンパ節転移とより信頼性の高い相関を示した。
2. HE による low budding grade 群において、サイトケラチン免疫染色で upgrade した群は、grade の変わらなかった群と比較して、無病生存期間が有意に短縮していた。
3. Budding high-score 群では、low-grade 群と比較して、壁深達度、脈管侵襲およびリンパ節転移が有意に進行していた。
4. Budding low-/high-score 群のいずれにおいても、腫瘍表層部より発育先進部で

有意に c-Met および p-c-Met 発現が高かった。

5. Budding high-score 群では、low-score 群に比較して、発育先進部で有意に高い c-Met および p-c-Met の発現を認めた。
6. *MET* 遺伝子コピー数は、budding high-score 群の発育先進部において、low-score 群よりも有意に高かったが、いずれも 2.5 未満であった。
7. FISH を施行した 43 例において、*MET* 遺伝子の amplification はみられなかった。
8. Budding high-score および high-grade 群はそれぞれ、low-score, low-grade 群に比較して、無病生存期間は有意に短く、budding score が budding grade よりも統計学的により信頼性の高い相関を示した
9. p-c-Met 発現の高い症例は、低い症例よりも、有意に無病生存期間が短かった。

【考察】

1. サイトケラチン染色による budding grade は、HE による budding grade に比較して、より客観的であり、さらに浸潤転移性、腫瘍再発とより相関する優れた評価法だと考えた。
2. Budding grade とその範囲を含む評価法は、日常診療に適しているかは議論の余地があるが、簇出の分子レベルでのメカニズムを検討する上でより適した評価法であると思われる。
3. Budding high-score 群の発育先進部で、腫瘍表層部よりも c-Met、p-c-Met が高発現していたことより、c-Met の活性化が簇出形成に関連している可能性が示された。FISH による検討でも、*MET* 遺伝子コピー数の違いは小さく、post-transcriptional な制御が主であることを示している。
4. 腫瘍間質の線維芽細胞から分泌された HGF が c-Met を介して、腫瘍細胞の浸潤・増殖を促進させることが報告されており、本研究の癌発育先進部において認められた c-Met の発現およびリン酸化には、間質との反応が関与しているかもしれない。
5. 無病生存期間の結果より、budding score、p-c-Met 発現が術後再発予測因子であることが示され、c-Met の活性化阻害が再発予防のターゲットとなるかもしれない。

【結論】

サイトケラチン免疫染色を用いた budding grade とその範囲を含むスコアリング法は、簇出の特性を反映した有用な評価法であった。また、c-Met シグナル経路により促進された細胞浸潤能および遊走能が、簇出の惹起と形態的特徴に関与している可能性を、タンパク質および遺伝子レベルで示した。

審査の結果の要旨

本研究では、**tumor budding/sprouting**（簇出）評価の客観性とその範囲に着目し、それに基づいた新たなスコアリングを提唱して、簇出と浸潤性、リンパ節転移、腫瘍再発との相関を明らかにした。また、未だ解明されていない簇出の分子学的メカニズムについて、細胞浸潤・遊走を誘導する **c-Met** 活性化（リン酸化）との関連をタンパク質および遺伝子レベルで示した研究である。

1. 斬新さ

免疫組織学的な簇出の評価によって、**HE** のみの評価では把握できなかった短期再発群を抽出できることを示した。また、簇出範囲を含む評価法を作成し、簇出範囲も簇出の生物学的特性をより正確に把握する上で重要な因子であることを示した。さらに、簇出と **c-Met** の活性化（リン酸化）との関連を示した初めての報告であり、同時に **MET** 遺伝子レベルでの増幅がないことも明らかにした。

2. 重要性

現在広く用いられている **HE** 染色による簇出の評価法の日常診断としての有用性を示した。一方で、サイトケラチン染色による **budding grade** とその範囲を含むスコアリングシステムは、簇出の特性をより正確に評価する上で有用な手段であることを示した。また **c-Met** の活性化と簇出が関連している可能性を示したことで、今後の分子学的メカニズム解明、補助治療の開発に寄与すると考えられる。

3. 実験方法の正確性

簇出の評価については、大腸癌研究会の定めた定義・**grading** に則り、またサイトケラチン免疫染色を用いることで客観性・正確さが向上し、再現性も高いことを示した。**c-Met** の免疫組織化学、**FISH**(*fluorescence in situ hybridization*)は、適切なコントロールと共に複数回施行し、方法を確立すると共に、再現性を確認している。

4. 表現の明確さ

対象症例について、臨床病理学事項、肉眼所見、組織所見を含め、研究目的、研究方法と結果、考察が簡潔かつ明瞭に記載されている。

5. 主な質疑応答

Q-1

簇出は、生体による影響もしくは腫瘍自体の変化と考えられるか。

A-1

肺癌、乳癌において、線維芽細胞から分泌される **HGF** の関与が報告されている。発育先進部や簇出している細胞は、間質と接しており、周囲の間質細胞からの影響があると考えられる。

Q-2

簇出範囲を決定する際に、簇出がない箇所は癌胞巢はないのか。

A-2

簇出の定義において、5 個未満の細胞巢と規定しているため、5 個以上の細胞巢は含まれていない。圧排性浸潤を示し、全く簇出のない部分と 5 個以上の細胞集団を伴う部分とがある。簇出ではないと判断した。

Q-3

HE およびサイトケラチン染色の budding grade は、いずれも臨床病理学的事項との関連が示されているが、どのように解釈したのか。

A-3

本研究において、HE による評価は、脈管侵襲、リンパ節転移との相関が示された。サイトケラチン染色による評価でも、同様の結果が得られ、同評価法も研究を進める上で信頼できる評価法であることを確認した。

Q-4

コストや人的負担を考えると、やはり HE による評価なのか。

A-4

日常診断においては、HE による評価は予後予測因子として、十分有用だと考えている。

Q-5

c-Met、p-c-Met の免疫染色において、範囲の評価は目視もしくは診断ソフトなどの機器を使用したのか。

A-5

目視でおこなった。

Q-6

小胞巢に含まれる癌細胞が 5 個以上のものでも、予後や悪性度との関連はあると考えられるか。

A-6

本研究で検討していないが、日常診断において、小胞巢に含まれる癌細胞の数に関わらず、間質に浸潤性に増殖しているものは、リンパ節転移が多くみられ、予後不良や高悪性度との関連はあるという印象がある。

Q-7

サイトケラチン染色の利点は何か。

A-7

サイトケラチン染色により、客観性が向上する。HE 染色は臨床において十分に予後予測因子として有用であることが示されたが、簇出の特性やメカニズムを検討する上では簇出範囲を含む budding score が HE よりも有用であると考えられる。また、サイトケラチン染色によ

り、HE 評価による **low grade** 群の中から再発危険群を抽出でき、再発予測因子としてはサイトケラチン染色による評価が HE より優れていた。

Q-8

カウントの際、癌細胞の生存・壊死などの判断はしたのか。抗サイトケラチン抗体は、CAM 5.2 ではなく AE1/AE3 を使用した理由は何か。

A-8

簇出を数える際、核と細胞質が明瞭なものをカウントし、染色された壊死物質や小片はカウントしていない。CAM 5.2 に関しては、今回検討していない。

Q-9

簇出の存在・程度は臨床側へ伝えているのか。また、その意義は何か。

A-9

病理診断書に簇出の有無、程度は報告している。臨床的には、術後フォローアップにおける検査の選択や頻度、予後予測や治療選択の判断材料となり得る。また、早期大腸癌に対する内視鏡的切除後に、リンパ節郭清を伴う追加治療の適応判断に利用できる。

以上の質疑応答のように、正確な回答をもって対応し、本論文は学位を授与するに値する研究と評価された。