

氏名	みやざき まさる 宮崎 健		
学位の種類	博士（医学）		
報告番号	甲第 1761 号		
学位授与の日付	平成 31 年 3 月 14 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	Poorly differentiated clusters predict a poor prognosis for external auditory canal carcinoma (癌細胞の低分化胞巣は外耳道癌の予後因子である)		
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	近藤 誠二
	福岡大学	教授	長町 茂樹
	福岡大学	講師	末田 尚之

## 内容の要旨

### 【目的】

外耳道扁平上皮癌は稀で予後不良である (Jackler 2000, Morton 1984)。特に進行癌は予後が悪く (Higgins 2010)、侵襲的な手術が必要であり、患者の生活の質が低下する合併症が生じる。予後と生活の質の改善のために優れた予後因子の確立が必要である。現在、外耳道扁平上皮癌ではピッツバーグ大学の TNM 分類 (Moody 2000) が用いられているが、進行癌にも関わらず予後良好な症例や早期癌にも関わらず予後不良な症例がみられる。より正確な予後因子の開発が求められている。我々は 2015 年に、外耳道扁平上皮癌における tumor budding (TB) と laminin5- $\gamma$ 2 の発現と予後の関係について報告した (Okado 2015)。TB は病理組織学的に癌発育先進部の間質に存在する 5 個未満の癌細胞で構成された小集塊での浸潤様式である。TB が多い high-grade の症例は予後不良であるが、low-grade の症例の中にも予後不良な症例がみられた。癌の間質には TB 以外に 5 個以上の癌細胞で構成される小胞巣での浸潤様式も存在し、poorly differentiated clusters (PDCs) と呼ばれる (Ueno 2012)。PDCs は大腸癌においてよく研究されており、局所再発やリンパ節、肝、肺への転移と相関する (Ueno 2012)。今回、外耳道扁平上皮癌の生検検体を用いて PDCs と予後の関係について解析した。

### 【対象と方法】

対象は福岡大学耳鼻咽喉科で 2006 年 4 月から 2015 年 12 月までに同一プロトコール (Nakagawa 2006) の治療を受けた外耳道扁平上皮癌で、治療前の生検検体 31 例について病理組織学的に後ろ向きに解析した。ピッツバーグ大学の TNM 分類を用いて病期分類した。

対象の生検検体を 10%ホルマリン固定、パラフィン包埋し 4 $\mu$ m に薄切しヘマトキシリン・エオジン染色を行った。免疫組織化学的にサイトケラチン AE1/AE3 染色を行った。臨床所見を知らされていない 2 人の病理医で半定量的に標本を評価した。外耳道扁平上皮癌における PDCs は癌の間質に存在する 5 個以上の癌細胞で構成される癌胞巣とした。外耳道扁平上皮癌における PDCs の評価方法を以下に示す。顕微鏡低倍視野で PDCs の最も密度高い病変を探し、顕微鏡の対物レンズ 20 倍視野に合わせる。視野の中の PDCs の個数を数える。PDCs が 5 個未満の症例を grade 1, 5 個から 9 個の症例を grade 2, 10 個以上の症例を grade 3 とし PDCs grade を評価した。PDCs grade が grade 1 の症例を low-grade, grade 2, 3 の症例を high-grade とした。TB は先行研究 (Okado 2015) に従い評価した。PDCs の観測者間の評価の一致性について重み付け  $\kappa$  係数を用いて解析した。

### 【結果】

外耳道扁平上皮癌 31 例において PDCs が high-grade の症例は low-grade の症例に比べ有意に予後不良であった ( $p=0.0317$ )。同様の 31 例において TB が high-grade の症例は low-grade の症例に比べ予後不良であった ( $p=0.0805$ )。TB が high-grade の 6 症例はすべて PDCs も high-grade であった。一方、TB が low-grade の 25 症例は PDCs により、さらに 2 つに分けることができ、PDCs が high-grade の症例は low-grade の症例に比べ有意に予後不良であった ( $p=0.0494$ )。コックス比例ハザードモデルの多変量解析では PDCs high-grade は独立した予後不良因子であった。進行癌 21 例において TB および PDCs grade 共に high-grade の症例が最も予後が悪く、次に TB は low-grade で PDCs が high-grade の症例で、TB も PDCs 共に low-grade の症例では最も予後が良いという傾向が認められた。PDCs grade の観測者間の一致性は、 $\kappa$  係数が 0.888 と良好であった。

### 【結論】

外耳道扁平上皮癌の生検検体において PDCs の high-grade は独立した予後不良因子であった。PDCs grade は TB grade と組み合わせることで、より正確に予後を評価することができた。

## 審査の結果の要旨

本論文は、外耳道扁平上皮癌の予後をより正確に推定できる新たな方法を提唱したものである。現在用いられているピッツバーグ大学の TNM 分類の予後評価では十分に予後を反映していない。本研究では外耳道扁平上皮癌の治療前の生検材料において、tumor budding (TB) grade のみならず、poorly differentiated clusters (PDCs) grade を併用することによって TB のみでは low grade とされていた群の中から予後不良症例を選び出せることを示した。

## 1. 斬新さ

今回の研究で新たに提唱した予後の評価方法は、大腸癌で確立された予後因子である TB と PDCs の 2 つを併用した方法であるが、その評価にあたっては、それぞれ 3 grade で評価されていたものを、low, high の 2 grade で評価し、さらにそれを組み合わせることで比較的少ないコホート数でも統計学的に有意差を示すことができた。より生物学的態度を反映した方法であると考えている。この方法を用いることで治療前の生検標本でより正確な予後の情報が得られることは、臨床的に有用だと考える。

## 2. 重要性

臨床的に診断の為に必ず行われている生検標本を用いて、病理学的観察によって予後を予測することができるという点が臨床的に最も重要である。TB grade と PDCs grade の 2 つを使って進行癌の予後を 3 つに分けることができたが、最も low grade な群は再発進行のない症例群であり、治療法の選択に極めて有用と考えられる。この評価方法は細胞の数で規定された、客観的で簡単でかつ観測者間一致性の高い評価方法である。

## 3. 研究方法の正確性

免疫組織化学的にサイトケラチン染色を用いることで TB grade および PDCs grade をより正確に、再現性高く評価できた。PDCs grade の評価は 2 人の評価者でそれぞれ独立して行ったが、2 人の観測者間一致性は優れたものであった。また本研究の症例はすべて同一施設で同一術者により手術を施行されたものである。

## 4. 表現の明確さ

本論文は英語論文であり、既に Head and Neck Pathology に掲載された。本雑誌による専門性の高い複数の査読者による厳密な査読を経て、目的、方法、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

Q1: PDCs は腫瘍細胞の集塊となっている。EMT で腫瘍細胞がばらばらになり TB になると理解しているが、PDCs は Epithelial-mesenchymal transition (EMT) とは関係しないのか。

A1: PDCs は collective cell migration のひとつであると考えている。Collective cell migration は腫瘍細胞が集団となってお互いの結合を維持し力学的に強い力を持ち一定の方向に浸潤するものである。Collective cell migration も *in vitro* の実験で EMT との関連が示されている。EMT と関連がある代表的な分子として E-cadherin と  $\beta$ -catenin がある。大腸癌の病理組織標本でこれらの蛋白の発現を免疫組織化学的に確認した論文がある。腫瘍細胞の大きな集塊では E-cadherin は細胞膜に発現が強く、核内の  $\beta$ -catenin の発現がみられないのに対して、TB や PDCs は E-

cadherin の発現が減弱し核内の  $\beta$ -catenin の発現がみられるものが多くなっている。これは TB や PDCs が EMT と関連したことを示唆していると考えられる。

Q2: TB と PDCs は癌発育先進部での構造の一形態をみているが、TB grade と比較し PDCs grade は予後をよく反映していると思われる。この2つに予後の差がみられることについての考察は。見ているものが違うのか。何か特殊なものが反映されているのか。

A2: PDCs grade は TB grade で検出できない予後不良症例を検出できる因子であった。確かに TB grade より PDCs grade は予後不良症例の選択において感度が高い評価方法であると考え。免疫組織化学的な違いとして EMT に関する蛋白の発現について、TB と PDCs は類似しているという報告があり、違いを示した報告はない。また、臨床的な予後因子としてもリンパ節転移、遠隔転移、局所再発と、この2つの反映するものは類似している。この2つの反映する予後が異なるのは、構成する細胞集塊の細胞数（胞巣の大きさ）が関係していると考えている。TB grade では選択できなかった再発進行例を選択するのに、PDCs grade で捉える腫瘍胞巣の大きさが重要であったのだろうと考えている。

Q3: 生存曲線による予後の比較で PDCs grade は TB grade に比べ low grade 群と high grade 群の間の開きが大きかった。これだけ PDCs grade において予後に差が出るならば PDCs grade だけで予後を評価できるのではないか。TB grade と PDCs grade を組み合わせた方が良い理由は何か。

A3: これまでの癌の浸潤の評価方法からも形成される胞巣の大きさにより反映する予後が異なることが示されている。TB と PDCs は大きさが異なる胞巣であり、それぞれ反映する予後が異なると思われる。TB grade ではより予後が悪い症例を選択でき、PDCs grade では TB low grade の中のかかなり予後が悪い症例を選び出すことができる。TB grade も PDCs grade も両方必要であると考え。

Q4: Grade 1, 2, 3 と3つに分けて評価した場合の予後について生存曲線に差は出たのか。PDCs grade を結果的に low grade と high grade の2つに分けた場合の違いは何か。中間的な分類もあった方が良いのではないか。

A4: 今回のコホートで PDCs grade を Grade 1, 2, 3 に分けて予後を評価すると曲線は grade 2, 3 では分けることはできなかった。コホート数が多いと3つの分類それぞれで予後に分けることができるかもしれない。今回の研究の症例数は31例と少ないが、少ない症例数で予後に統計学的な有意差まで至る結果が見られたことは、より強く生物学的な態度を反映しているのかもしれない。（よって、少ないコホートで有意差を認めた2つの評価方法でそれぞれ2群ずつ予後に分け、この2つを合わせることで結果的に3群に分ける方法を発見できた。）

Q5: TB は PDCs から出てくるといふ可能性はあるのか。

A5: 癌の浸潤形態を病理学的に連続切片で 3 次元に再構成し、TB も PDCs も大きな腫瘍細胞集塊と多くが連続していることを示した報告がある。TB では、大きな胞巣から実際に分離した癌細胞集塊は、病理標本上に確認される集塊のうち約 1, 2 割しかないという報告もある。通常、腫瘍細胞は大きなものから小さなものへ連続しているため、TB は PDCs から出ている可能性が考えられる。

Q6: 今回の研究で TB high grade は多変量解析にて独立した予後不良因子となっていない。交絡因子として PDCs high grade の影響を受けたために解析で残らなかった可能性があるのでは。そのためそれぞれ外して解析してみてもは。

A6: TB high grade は先行研究で既に独立した予後不良因子であることがわかっていたので、変数に TB grade を加えて PDCs grade を外した条件での解析はしていない。ご指摘のように、それぞれを外して解析してみたい。

Q7: Table 2 において PDCs grade と統計学的に有意差がでた臨床病理学的所見は他にも、たとえば TNM 分類などあるが、これらは多変量解析の変数にいれなかったのはなぜか。

A7: TNM 分類は癌の進行の結果そのものを表したものであるため変数にいれなかった。コホート数が少ないため変数の数に限りがあったこともあるが、癌の進行状態(生物学的態度)を反映する病理学的な予後因子を中心に解析したかった意図があり、今回の変数に留めた。

Q8: 論文の materials and methods に CT, MRI であまり大きさが変わらなかったものを治療効果ありとしたとあるが、治療効果の判定方法の詳細は。今回は SD (stable disease) を含めて良くなっていると判断しているのか。

A8: 進行癌で手術を行わず放射線化学療法を行っている症例もあり PFS を中心に予後を評価している。制御できていると考え、SD も含めて治療効果ありと判断している。

Q9: CT と MRI の治療効果の判定方法で PD (Progressive disease) の症例はあったのか。PD の症例は TB high grade と PDCs high grade の両方があったと理解してよいのか。

A9: PD の症例は 12 例あり、TB も PDCs も両方 high-grade の症例は 4 例あった。また、TB が low-grade で PDCs が high-grade の症例が 8 例あった。どちらも low-grade の症例は 1 例もなかった。

Q10: Overall survival (OS) を調べていないのはなぜか。亡くなった症例がなかった  
ので Progression-free survival (PFS) で解析したのか。OS と PDCs grade に関連は  
あったのか。

A10: OS も PFS もどちらも解析した。実際に亡くなった症例もあり OS でも傾向がみ  
られたが統計学的な有意差までは至らなかった。論文では統計学的な結果に至った方  
を採用した。

Q11: 論文の Clinicopathological parameter で患者数 n=32 とあるが、2 回評価した  
症例があるのか。

A11: 症例数は 31 例であり、2 回評価した症例はない。誤植である。

Q12: 今後の研究で MMP を解析しているが、腫瘍細胞だけでなく線維芽細胞も含めて  
みているということなのか。通常、MMP は腫瘍細胞では産生されず、線維芽細胞で産  
生されるが外耳道扁平上皮癌ではどうだったのか。

A12: 外耳道扁平上皮癌でも MMP-2 の発現を免疫組織化学的に確認している。MMP-2  
は腫瘍細胞にも間質にも発現がみられた。腫瘍細胞にも発現がみられたのは間質で産  
生された MMP-2 を、腫瘍細胞が受け取るためだと考えらえる。

Q13: 今後の研究についてさらなる詳細は。

A13: CD73 は間質の線維芽細胞に発現している症例もあった。emmprin は主に腫瘍細  
胞で発現するが、CD73 は腫瘍細胞と間質に発現する。腫瘍細胞の emmprin の発現は予  
後と関係があったが、CD73 は腫瘍細胞の発現については予後と関係がみられず、間質  
での発現と関係がみられた。また腫瘍細胞の emmprin の発現と間質の CD73 の発現が  
どちらも強い症例は予後が不良であり、独立した予後不良因子であった。

Q14: 生検標本で CD73 をみると予後の予測がつく可能性があるということなのか。

A14: 生検標本で評価した結果、予後との関係が示せたので生検標本において免疫組  
織化学的に CD73 の発現を確認することで予後が予測可能であると考えている。

本論文は、内容の斬新さ、重要性、研究方法の正確性、表現の明確さおよび質疑応答の  
結果を踏まえ、審査員全員での討議の結果、学位論文に値すると評価された。