

## 論文の内容の要旨

論文題目 側方発育型大腸腫瘍の臨床病理学および分子生物学的特徴の検討

指導教員 小俣 政男 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 16 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

杉 本 貴 史

### 背景・目的

近年、スクリーニング下部消化管内視鏡検査の普及や、高画質電子スコープ、拡大鏡、特殊光など内視鏡装置の発達と、内視鏡技術の向上とともに、従来のポリープ状の隆起性腫瘍とは形態的に異なる腫瘍の報告が増加している。その中で、側方発育型大腸腫瘍(LST)は、側方発育傾向を示す上皮性腫瘍で、10mm以上の大きさを示す病変と定義される。LSTは、特徴的な形態のみならず、発生部位や発育様式にも特徴があるが、その特徴を明確にする臨床的検討や、その特徴を規定する分子生物学的検討はまだまだ少ないのが現状である。さらに、LSTは、顆粒型(granular type; LST-G)と非顆粒型(non-granular type; LST-NG)の2種に大別される。この2種は、病変の形態のみならず、発生部位や担癌率においても相違があると考えられているが、その詳しい発生、発育進展様式や、それらの基盤となる分子生物学的メカニズムの差異についてはいまだ不明な点が多い。今回の研究では、LSTという病態に着目して、当科の大腸疾患データベースからLSTの臨床的背景および病理学的特徴と、内視鏡的切除術を施行したLST検体から分子生物学的特徴について検討した。

### 方法

#### 1. LSTの臨床病理学的検討

1995年9月から2007年3月までの間に、東京大学消化器内科において下部消化管内視鏡検査を施行した、初回患者6501例を対象に、年齢、性別、大腸腫瘍の発生と、その局在部位、大きさ、形態、癌の有無、病理学的特徴について検討した。統計学的手法として、カイ2乗検定、Student t-test、Kruskal-Wallis検定を用い、 $p < 0.05$ を統計学的有意と判定した。

#### 2. LSTの分子生物学的検討

東京大学消化器内科において、2005年9月から2006年9月までの1年間に、内視鏡的粘膜

切除術 (Endoscopic Mucosal Resection, EMR) または内視鏡的粘膜下層剥離術 (Endoscopic Submucosal Dissection, ESD) にて内視鏡的に一括切除された 10mm 以上の大腸腫瘍 104 例 (LST 54 例、Polypoid 50 例) を対象とした。大腸腫瘍で高頻度に報告されている KRAS, BRAF, PIK3CA, CTNNB1 遺伝子の塩基配列を、LST 検体から PCR ダイレクトシーケンス法を用いて解析した。また、大腸腫瘍で高頻度に報告されている TP53, CTNNB1, MYC について免疫組織化学で検討した。さらに、APC 遺伝子の変異については、大腸癌で報告されるように、2 か所のマイクロサテライトマーカーを用いた染色体 5q21-22 領域の LOH 解析を行った。統計解析には、カイ 2 乗検定、Student-t test、多重ロジスティック回帰分析を用い、 $p < 0.05$  を統計学的有意と判定した。

## 結果

### 1. LST の臨床病理学的検討

全体 6,501 症例の内、42.4%にあたる 2754 症例に合計 5591 病変を認めた。Small adenoma を 4,049 病変 (2,222 症例)、Advanced lesion を 1,279 病変 (958 症例)、Invasive cancer を 263 病変 (252 症例) に認めた。また、Advanced lesion 1,279 病変の内、Polypoid を 1,073 病変 (812 症例)、LST を 174 病変 (161 症例)、IIC を 32 病変 (32 症例) に認めた。

LST は、Polypoid と比べて、高齢者 ( $P < 0.0001$ )、腫瘍径の大きな病変が多く ( $P < 0.0001$ )、右側結腸に多く ( $P < 0.0001$ )、担癌率も高かった ( $P = 0.0344$ )。女性の頻度がやや上昇するが、統計学的に有意差はなかった ( $P = 0.2296$ )。LST は、IIC と比べて、腫瘍径の大きな病変が多く ( $P = 0.0081$ )、担癌率は低かった ( $P < 0.0001$ )。年齢、性別、部位に統計学的に有意差はなかった (それぞれ  $P = 0.2800$ 、 $P = 0.9181$ 、 $P = 0.1015$ )。

LST は、Polypoid や IIC よりも腫瘍径の大きな病変が多いが、IIC と同様の年齢、性別の分布を示し、その発生部位も同様であった。一方で、担癌率は IIC の 1/3 程度であり、むしろ Polypoid に近い性質を有していた。

### 2. LST の分子生物学的検討

アミノ酸変異については、LST と Polypoid を比較して、KRAS, BRAF, PIK3CA の全てにおいて統計的な有意差は認めなかった (それぞれ  $P = 0.182$ 、 $P = 0.710$ 、 $P = 0.132$ )。免疫組織化学では、LST と Polypoid を比較して、TP53, CTNNB1 とも統計的な有意差は認めなかった (それぞれ  $P = 0.176$ 、 $P = 0.850$ )。LST と Polypoid の比較では、一見すると分子生物学的な特徴に差がないように思われたが、LST には LST-G と LST-NG の 2 種類の形態があり、形態別に解析する必要があった。

形態別に解析すると、KRAS 変異は、LST-G 群 19/35 (42.6%)、LST-NG 群 4/19 (21.1%) と統計学的に有意な差を認め ( $P = 0.0156$ )、CTNNB1 陽性は、LST-G 群 13/35 (37.1%)、LST-NG 群 13/19 (68.4%) と統計学的に有意な差を認めた ( $P = 0.0267$ )。他の背景因子による影響ではないことを確かめるため、さらにロジスティック回帰分析を用いて多変量解析を行った。KRAS では、年齢 (/歳) でオッズ比 1.001、95%CI 0.947-1.058、性別(男性/女性)でオッズ比 0.502、

95%CI 0.118-2.131、LST の部位 (左/右) でオッズ比 1.597、95%CI 0.415-6.140、LST の大きさ (mm) でオッズ比 0.987、95%CI 0.942-1.034、肉眼型 (NG/G) でオッズ比 0.222、95%CI 0.056-0.883、癌組織の有無でオッズ比 0.483、95%CI 0.105-2.217 であり、肉眼形態のみが KRAS の恒常活性化型変異の有無と相関を示した。CTNNB1 では、年齢 (/歳) でオッズ比 0.992、95%CI 0.935-1.053、性別(男性/女性)でオッズ比 4.313、95%CI 0.830-22.41、LST の部位 (左/右) でオッズ比 2.578、95%CI 0.617-10.78、LST の大きさ (mm) でオッズ比 1.008、95%CI 0.959-1.059、肉眼型 (NG/G) でオッズ比 4.512、95%CI 1.124-18.11、癌組織の有無でオッズ比 5.105、95%CI 0.881-29.58 であり、肉眼形態のみが CTNNB1 の活性状態の有無と相関を示した。

LST の形態による分子生物学的特徴の差について、CTNNB1 の免疫組織化学染色の差に着目して、Wnt シグナル系の遺伝子についての解析を追加した。CTNNB1 のアミノ酸変異、APC 遺伝子の 2 か所のマイクロサテライトマーカーを用いた LOH 解析、Wnt シグナル系の下流である MYC 遺伝子の免疫組織化学染色を検討した。CTNNB1 の恒常活性化型変異は、Exon3 領域で報告されているが、LST 54 症例の中には、1 例も変異を認めなかった。MYC 陽性症例は、LST-G 6/35 (17.1%)、LST-NG 8/19 (42.1%) であり、統計学的に有意差があった ( $P=0.0491$ )。APC 遺伝子の LOH は、LST-G で 7/25 (28%)、LST-NG で 9/15 (60%) に認め、LST-NG で 5q21-22 領域の欠失が有意に多いという結果であった ( $P=0.0302$ )。

## 考察

進行癌へ進展するハイリスク群、大腸腫瘍摘除治療の絶対適応群として Advanced lesion という概念が提唱されている。Advanced lesion は、①粘膜内癌、②病変の大きさが 10mm 以上の腺腫、③異型度が高度異型 (severe atypia) の腺腫、④絨毛成分 (villous component) を含む腺腫病変、のいずれかを満たす病変と定義される。本研究で対象とした LST は、10mm 以上である点において、すでに Advanced lesion すなわち大腸進行癌のハイリスク群の範疇に含まれるべき病態である。Advanced lesion は、Polypoid、LST、IIC の 3 つの肉眼型を示す。Advanced lesion に含まれるこの 3 種類の病態について臨床的特徴を検討すると、LST は、IIC と同様に右側結腸に多いが、担癌率は IIC より有意に低く、Polypoid と同程度であった。LST は、病変の肉眼形態のみならず、臨床的特徴でも Polypoid や IIC と異なる特徴を有していた。また、本研究では Advanced lesion 1279 病変中、Polypoid 1073 病変、LST 174 病変、IIC 32 病変を認めた。LST の Advanced lesion 全体における割合が約 14%と高く、LST は症例報告の範疇ではなく、大腸腫瘍の診断学上に無視できない位置を占めていることがわかった。

さらに、LST の形態別にわけると、LST-G は LST-NG に比べて女性に多く、盲腸、上行結腸および直腸と大腸内で離れた分布を示していた。一方、LST-NG は LST-G と比べ男性に多く、肝彎曲を中心とした上行結腸から横行結腸に分布していた。今回の検討では、LST-G と LST-NG の間に、性別、病変部位以外には、年齢、腫瘍径、担癌率で統計学的に有意な臨床的特徴の差を認めなかった。LST の中でも、形態により臨床的特徴に差異があり、それ故、その腫瘍発生や進展のメカニズムにも相違があるのではないかと推察された。

分子生物学的検討では、大腸腫瘍(腺腫および癌)で頻度の高い KRAS、BRAF、PIK3CA の遺伝子変異をダイレクトシーケンス法で、TP53、CTNNB1、MYC の発現異常を免疫組織化学で調べた。LST と Polypoid の 2 群間には、その肉眼形態と臨床背景の差にもかかわらず、意外なことに 5 種類の遺伝子すべてについて、統計学的に有意な差は認められなかった。LST の KRAS 活性型遺伝子変異に関する既報によると、Takahashi らの報告では、LST が Polypoid よりも統計学的に有意に KRAS 変異が多かったが(LST: Polypoid=35%:13%)、Mikami らの報告では LST: Polypoid=25%:16%、Noro らの報告では、LST: Polypoid=21%:26%で、いずれも統計学的有意差はなかった。今回の検討は前述 2 報告の LST の KRAS 変異に有意差がないことを支持する結果であったが、報告毎に相違がある理由は不明である。ただし、LST の形態を考慮せずに行われた検討であり、LST-G と LST-NG に分けて検討することで解決できるのではないかと考えた。

LST-G と LST-NG の形態別に分けると、LST-G は LST-NG よりも KRAS 変異が有意に多かった。特に、LST-G は Polypoid や進行癌と比べても KRAS 変異の頻度が有意に高く、興味深い結果であった。LST-G には KRAS の活性型遺伝子変異が強く関与していることが考えられた。

KRAS 変異については、つい最近、平岡らが 2006 年に、LST-G と LST-NG にわけた検討を発表しており[58]、LST-G が LST-NG に比して有意に頻度が高いという結果であった。本研究は、KRAS 変異に関してこの報告を支持する結果であった。

一方で、CTNNB1 の発現異常では、LST-NG が LST-G より有意に頻度が高かった。CTNNB1 の免疫組織化学について、LST-G と LST-NG に分類した報告はない。CTNNB1 の核移行は Wnt の活性化を裏付ける所見であり、LST-NG において、Wnt シグナルの活性化が重要な役割を担っている可能性が示唆された。Wnt シグナルの活性化には、大腸腫瘍においては、がん抑制遺伝子の APC の異常と癌遺伝子の CTNNB1 遺伝子の異常が報告されている。LST では、CTNNB1 遺伝子の変異は、0/54 例であった。APC 遺伝子近傍の 5q21-22 領域の LOH について検討した所、やはり LST-NG は、LST-G に比べ LOH が多かった。LST-NG において、Wnt シグナルの活性化には APC の LOH が一因として関与している可能性が考えられた。

## 結論

LST は、下部消化管内視鏡検査の普及、発達とともに、進行する前に早期発見されるようになった病変であり、疫学、治療法、分子生物学的特徴すべてにおいて未知な事が多い病変である。今回の検討で、LST の臨床的特徴と分子生物学的特徴の一端が示された。臨床的には、LST は Polypoid や IIc と異なった特徴を有することが示された。分子生物学的には、Polypoid、LST-G、LST-NG の 3 種類の病態は、同じ病理学的特徴を持ちながら、遺伝子レベルではそれぞれ異なる特徴を有する可能性を示す興味深い結果となった。