

## 13 - 12 表面型大腸がんの悪性度解析及び発育進展に関する研究

主任研究者 国立がんセンター中央病院 下田 忠和

### 研究成果の要旨

大腸癌の発生には 3p21.3 の RASSF1A のメチル化が関連している。とくに de novo type の癌ではその頻度が、腺腫由来の癌に比して高く、かつ周囲の非腫瘍性粘膜にも高発現していた。これは高異型度癌の発生と密接に関係していると考えられる。さらに高異型度癌では早期に多数の遺伝子異常が見られる。すなわち表面型大腸癌の多くは腺腫由来の癌とは明らかに異なることを解明した。この高異型度癌は早期に浸潤し、進行がんでは肝転移を来す可能性が示唆される。また大腸癌の肝転移はリンパ節転移、静脈侵襲、がん細胞の脱分化、CD10 発現が独立した因子で、さらにその組み合わせにより、従来よりは精度の高い肝転移予測が可能で、肝転移低危険度群、中間群、高危険度群に分けることが可能となった。

### 研究者名および所属施設

### 分担研究課題

下田 忠和 国立がんセンター中央病院 医長  
味岡 洋一 新潟大学大学院 医歯学総合研究科  
助教授  
藤井 博昭 順天堂大学医学部 講師  
渡邊 聡明 東京大学医学部 助教授  
八尾 隆史 九州大学大学院医学研究院 助教授  
菅井 有 岩手医科大学 助教授

表面型大腸腫瘍の悪性度とその増殖形態の関連  
表面型大腸腫瘍悪性度解析  
表面型大腸腫瘍の LOH 解析及び遺伝子メチル化の解析  
表面型大腸腫瘍の遺伝子解析  
形質発現からみた大腸癌の悪性度  
DNA 量と遺伝子変異から見た大腸癌の悪性度

### 総括研究報告

#### 1 研究目的

本研究の目的は表面型大腸腫瘍の悪性度解析及び、大腸癌の初期病変から進行癌にいたる発育進展を解明することである。早期大腸癌には隆起(ポリープ)型癌とは異なり、10mm 以下の極めて小さい粘膜内癌から悪性度を増し、粘膜下層に浸潤する表面型大腸癌がある。これは従来考えられてきた大腸癌の組織発生、形態発生経路ならびに遺伝子異常の経路とは異なることが明らかにされつつある。

また大腸癌には組織学的に低と高異型度癌があり、低異型度癌から高異型度癌へ、あるいは初期から高異型度癌として発生するものまで多彩な組織異型を示す。この違いが大腸癌の発育進展に反映され、また遺伝子異常にも関連していると想定される。しかし癌の異型度別の観点から遺伝子異常の蓄積経路についての研究は少ない。従来、腺腫由来の癌の遺伝子異常の経路は追及されてきたが、de novo

type の癌、すなわち 10mm 以下で発見される高異型度癌の特性ならびにその発生機序は殆ど解析されてこなかった。これまでに本研究では高異型度癌は初期から 17p, 3p など多くの染色体領域で多彩な遺伝子異常が来され、腫瘍の増大とともに 5p, 18q, 22q 等の異常を来すこと、さらに 3p ではそのメチル化が癌周囲粘膜にも認めることなどを報告してきた。高異型度癌は de novo 発生すると考えられるが、その発生母地、あるいは前癌病変は未だ不明である。また肉眼的に表面型を呈する粘膜内の高異型度癌は早期に粘膜下層に浸潤し、通常型の 2 型進行癌に進展し、その中にはリンパ節、さらには肝転移をきたすものがある。浸潤した癌のリンパ節、肝転移を来す因子に関しては腫瘍細胞の脱分化などが報告されているが、まだその詳細は不明である。今年度は高異型度癌の特性について転移の予測因子も含めて検討した。

## 2 研究成果

### 1) 表面型大腸癌の LOH 解析と遺伝子メチル化の解析

**RASSF1A 遺伝子(3p21.3)のメチル化**: RASSF1A は 3p21.3 に位置するがん抑制遺伝子であり多くの腫瘍において promoter のメチル化による不活化が知られている。しかし、通常の進行大腸癌ではそのメチル化は低頻度 (45/222=20%) で、さらに K-ras 変異とは相反する関係にあると報告されている。K-ras 変異が表面型大腸腫瘍では低頻度、また 3p LOH が比較的頻度が高いとのこれまでの報告に基づき、RASSF1A メチル化および 3p 領域の詳細な LOH を 48 症例につき検討した。3p マイクロサテライト・マーカーのうち一つでも LOH を認めた症例は 52% (24/46)、そのうち homogeneous な LOH が 39.1% (18/46) と 3p LOH は比較的早期に高頻度に生じていた。領域別に見ると 3p21.3 領域の LOH は 47.6% (20/42) であった。RASSF1A のメチル化は腫瘍部分において 81.3% (39/48) と高頻度に認められた。また、腫瘍においてメチル化のあった症例では腫瘍周囲の正常粘膜部分においても 49% (19/39) すでにメチル化が認められた。K-ras 変異は従来の報告同様に低頻度 (14.6%) であり、特に RASSF1A のメチル化を認める症例では少ない傾向があった。すなわち、RASSF1A のメチル化状態と K-ras 変異は有意に相反する関係にあった ( $p=0.017$ )。

一方、RASSF1A のメチル化は 3p21.3 LOH の有無に関わらず認められた。以上より RASSF1A は表面型大腸腫瘍の発育進展において K-ras 変異を介さずに、ras シグナル系の機能異常に関与する重要な遺伝子であると考えられた (Oncogene, 2004, 23:8900-8907)。

### 2) 表面型大腸腫瘍の LOH 解析

表面型大腸腫瘍ではこれまでに 5q, 17p, 18q LOH は隆起型由来の大腸癌と同様の頻度で認められているとの報告がある。特に 17p は腫瘍発生早期から関与している。また、3p LOH は上記のごとく 17p LOH 程高頻度ではないが比較的早期から認められる症例が存在する。その他の染色体領域に関しても LOH 頻度を表面型大腸腫瘍で検索した。Genome wide screening の後、2q, 4q, 5q, 12q, 14q, 15q, 17p, 18p, 18q, 22q に絞り 43 症例の解析を行った。多数部位より microdissection を行うことによりその獲得時期についての情報が得られる。homogeneous LOH (すべての腫瘍部位において LOH が共通してみられる。すなわち腫瘍の発生初期に獲得された変化と考えられる) および heterogeneous LOH (LOH が腫瘍の一部のみみられるか、部位により LOH の allele が異なる。腫瘍の早期発育進展途上、粘膜内ないしは浸潤部で獲得される変化である) に分類して検索をした。また、これを元に heterogeneity index (HI) を染色体腕毎に、heterogeneous LOH 症例数 / (homogeneous + heterogeneous) LOH の症例数として表示する。HI が低い腫瘍ほど発生初期から関与する (表 1)。

17p, 18q LOH が高頻度に早期から起こる傾向がある。さらに 18p LOH, 22q LOH の頻度も高く、特に 18p, 18q LOH は共通している症例が多い。18p LOH は予後の悪い乳癌、肺癌、脳腫瘍などで報告されている。大腸癌での 18p LOH に関する研究報告は少ないが進行症例に頻度が高いとの報告がある。22q LOH は通常の進行大腸癌でも高頻度に認められ特に 22q13 が重要欠失領域とされている。表面型大腸腫瘍ではこれらの LOH が早期から関与しており、異型度、悪性度の高さを反映すると考えられる。10 染色体での fractional allelic loss (FAL) は heterogeneous LOH / homogeneous LOH で、0.57、homogeneous LOH のみで 0.37 であった。これをこれまでの通常型進行大腸癌に関

する報告論文(Thorstensen L, et al. Int J Cancer 1996, 69:452)につき、10染色体で計算すると、原発、局所再発で0.9-1.8、転移部で0.28となる。すなわち、明らかに表面型大腸腫瘍ではFALの高い腫瘍に属することが明らかである。17p, 18p, 18q LOH すべてのみみられる症例はheterogeneous/homogeneous LOHで、72%(21/29)、すべてhomogeneous LOHは38%(11/29)となる。また、17p, 18p, 18q, 22LOHは同様順に37%(10/27), 15%(4/27)であった。以上より、これらの染色体領域のLOHが早期から、共通にみられる症例の多いことがわかった。

以上、LOHパターンからみた表面型大腸腫瘍の特徴は  
 1)多くの症例ではFALが高い腫瘍であり、通常では進行癌、予後不良癌、悪性度の高い大腸癌でみられるLOHが多数、早期から関与している。悪性度の高い腫瘍であることはFALが高いことが一因と考えられる。2)17p, 3pに加え、18p, 18q, 22qLOHの頻度が高く、しかも早期から関与する傾向がある。3)その他のLOH (5q, 14q, 15q, 2q, 1q, 4q)も比較的頻度が高く、腫瘍早期進展途上に獲得されうる。4)多数LOHが腫瘍発生当初から認められる現象はde novo 発癌を強く示唆する。5) LOHの頻度、獲得時期が隆起型腫瘍におけるVogelsteinの多段階発癌機構とは異なる。

表1 Summary of LOH in 43 cases

	2q	4q	5q	12q	14q	15q	17p	18p	18q	22q
%LOH (homo/ hetero)	39	32	61	36	44	41	92	81	81	51
%LOH (homogeneous)	20	24	22	27	22	24	68	53	53	34
HI	0.5	0.25	0.64	0.25	0.50	0.43	0.26	0.34	0.34	0.33

3)大腸癌の発生部位に基づいた genotyping の試み  
 大腸癌を左側、右側に分ける分類の有用性が報告されている。これらの分類は、臨床病理学的観点のみならず、遺伝子異常の点から両者に明確な差異があるとされている。一方、大腸癌は分子発癌様式から chromosomal instability (CIN, LOH 型)、microsatellite instability 型 (MSI)、CpG

islands methylated phenotype (CIMP)に分類できることが明らかになってきた。そこで、我々は分子発癌様式の観点から大腸癌を左側型、右側型に分類できるかどうかを検討した。腺管分離法を用いて119例(左側、84例;右側、35例)の大腸癌手術材料から正常腺管及び腫瘍腺管を単離・回収した。PCR-LOH (loss of heterozygosity)法を用いて LOH (1p; 5q; 8q; 18q; 17p; 22q)とmicrosatellite instability (MSI)の解析を行った。p53 及び ki-ras 遺伝子変異の解析もPCR-SSCP 及び直接シーケンス法で行った。更にmethylation-specific PCR法でゲノムワイドのメチル化 (CpG islands methylation phenotype, CIMP)を MINT1; 2; 31; MLH-1; MGMT; p16; p14; PASSF-1Aを用いて検索した。LOH 及び CIMP statusは低、高度に分類した。MSIは陽性、陰性に分類した。その結果 LOH 型は左右共に60-70%にみられ、両者に差はみられなかった。MSIは右側に多くみられた(4/5例)。CIMPは有意に右側に多くみられた。LOH-high例においてもCIMP-highは右側に多かった。p53変異は左側に多くみられたが、ki-ras変異には左右差は認められなかった。p53変異はhigh LOH statusに相関するが、ki-ras変異には関連はみられなかった。Low-LOH statusでは左側でp53変異がやや多くみられたが、CIMP-highは両者に多くみられた。各マーカー及び遺伝子のメチル化は右側に多いタイプ (type I) と両者に差のみ見られないタイプ (type II) に分類できた。すなわち左側癌の特徴はLOH-high+p53 変異あり、右側癌のそれはLOH-high+CIMP-high だった。MSI癌は右側に多いが、その頻度は10%であった。

4)瘍性大腸炎合併大腸腫瘍における遺伝子変異  
 潰瘍性大腸炎合併大腸腫瘍および非腫瘍性粘膜におけるMicrosatellite Instability (MSI)を解析し、潰瘍性大腸炎における癌発生における MSI の意義を明らかにする。さらにMSIにより、潰瘍性大腸炎症例のうち癌あるいは dysplasia 合併のハイリスク症例の選別が可能か検討する。  
 潰瘍性大腸炎24症例に認められた癌18病変、dysplasia48病変、合計66病変について、D2S123、D5S346、D17S250、BAT25、BAT26、の5つのマーカーにてMSIが2つ以上のマーカーで認められた場合をMSI-H、1つのマーカーで認

められた場合を MSI-L、1 つも認められない場合を MSS として分類した。癌病変では、18 病変のうち 2 病変(11.1%)が MSI-H であり、残りの 16 病変は MSS(88.9%)であった。Dysplasia48 病変のうち 1 病変(2.1%)が MSI-H であり、残りの 47 病変(97.9%)は MSS であった。

サーベイランスした非担癌の潰瘍性大腸炎 39 例における生検標本は全て MSS を呈し、MSI は認められなかった。さらに hMLH1 遺伝子の promotor region の methylation を解析した 20 症例からの合計 60 個のサンプルの内、解析が可能であった 57 サンプルの 3 サンプル(5.9%)に、hMLH1 遺伝子の promotor region の methylation が認められた。しかし、これら 20 症例のうち、サーベイランス内視鏡検査後に癌あるいは dysplasia の発生を認め、methylation の解析が可能であった 4 例には、何れも hMLH1 遺伝子の promotor region の methylation は認められなかった。

潰瘍性大腸炎合併大腸腫瘍における MSI の頻度は 15% - 40% と報告されている。このように報告により頻度に差が認められる一つの原因としては、潰瘍性大腸炎合併大腸腫瘍自体が比較的稀な疾患であり、解析可能な病変数が少なかった影響が考えられる。今回の検討では、欧米を含めて過去の潰瘍性大腸炎合併癌あるいは dysplasia の MSI の検討のどの報告より対象症例数の多い検討を行った。その結果、潰瘍性大腸炎合併癌における MSI-H の頻度は一般大腸癌における MSI-H の頻度とほぼ同率であることが明らかとなった。さらに dysplasia においては MSI-H の頻度はさらに低いことが明らかとなった。次に、潰瘍性大腸炎の非腫瘍性粘膜における MSI の頻度も、これまでの報告では 0% - 83% と差が認められている。この原因の一つとしては、これまでの報告ではパラフィン包埋ブロックから DNA を抽出している検討が多く、このため DNA の quality に問題があった可能性が考えられる。そこで、今回の検討では、過去の報告より多くの症例数で、さらに解析の精度の高い凍結生標本で検討した結果、潰瘍性大腸炎の非腫瘍性粘膜における MSI の頻度は、解析した 39 例における 317 カ所の大腸粘膜の何れにも認められなかった。また、hMLH1 遺伝子の promotor region の methylation は 5.9% に認められたが、サーベイランス内視鏡検査後に癌あるいは dysplasia を発症した 4 例は

何れも hMLH1 遺伝子の methylation は認められず、MSI、hMLH1 遺伝子の methylation とともに癌あるいは dysplasia 発症のハイリスク症例の選別に有効とは考えられなかった。

[結語] 潰瘍性大腸炎における癌の発生における MSI の関与は、一般大腸癌の場合とほぼ同程度であると考えられた。潰瘍性大腸炎の癌あるいは dysplasia 発生リスクの同定における MSI あるいは hMLH1 遺伝子の promotor region の methylation の有用性は認められなかった。

#### 5) 大腸 s m 癌のリンパ節転移因子

大腸 s m 癌の浸潤先進部 蔞出(脱分化)の病理学的意義につき外科切除大腸 s m 癌 54 例を対象として検討した。蔞出は、癌細胞が 5 個未満の個細胞あるいは小腺管からなるものとした。蔞出と ly との関係:ly(+)例は ly(-)例に比べ、蔞出平均個数(6.0 ± 4.0 vs 1.4 ± 2.1)、最大個数(14.7 ± 7.7 vs 3.9 ± 4.6)ともに有意に高値であった(p<0.0001)。2) 蔞出と v との関係:v(+)例は v(-)例に比べ、平均個数(4.5 ± 3.9 vs 2.5 ± 3.4)、最大個数(10.6 ± 7.5 vs 6.6 ± 7.8)ともに高値であったが、統計的には有意の傾向のみであった(p=0.052 と p=0.051)。3) リンパ節転移との関係:ITC(+)例と n(+)例は n(-)例に比べ、平均個数(6.5 ± 3.4 vs 5.2 ± 4.6 vs 1.4 ± 2.0)、最大個数(14.1 ± 6.5 vs 12.5 ± 8.7 vs 4.5 ± 5.9)ともに有意に高値であった(全て p<0.005)。大腸 s m 癌の発育先進部 蔞出(脱分化)は、リンパ管侵襲、所属リンパ節転移の有無と有意に関連しており、大腸 s m 癌の悪性度判定に有用な指標になりうると考えられた。

#### 6) 大腸癌の肝転移予測因子の解析

大腸癌の肝転移因子として従来、がん細胞の静脈侵襲、さらには癌浸潤先進部でのがん細胞脱分化、さらには CD10 の発現が独立した因子であると報告してきた。しかしそれらの因子をもってしても、実際に肝転移を来たするのは 20-30% である。そこで手術後の肝転移をより高率に予測する因子について T2-4 の進行大小癌 505 例の検討を行った。その結果、単変量解析で中分化腺癌、癌の浸潤度、リンパ管ならびに静脈侵襲、癌浸潤先進部での脱分化現象、神経浸潤、癌細胞での CD10 発現、リンパ節転移が肝転移の因子として認められ、またがん浸潤部での炎症性細胞浸潤

は肝転移に対して負の因子であった。このうち癌浸潤度 ( $p = 0.006$ , OR1.96)、静脈侵襲 ( $P < 0.001$ , OR3.17)、脱分化現象 ( $P = 0.036$ , OR1.71)、リンパ節転移 ( $p < 0.001$ , OR2.55) CD10 発現 ( $P < 0.006$ , OR2.23) が独立した肝転移を来す因子であった。これらの因子に対して各 1 点のスコアをつけ、認めた因子の合計のスコアと肝転移の関係を検討した。その結果、肝転移 low risk(スコア 0-2, 9/186, 4.8%)、中間群(スコア 3-5, 93/288, 32.3%)、high risk(スコア 6, 20/29, 69%)に分けることが可能であった。さらに浸潤度を除いた 5 つの因子の、組み合わせではリンパ節転移とほかの因子のうち少なくとも 2 つを認める例では、それ以外の例に比較して 6-8 倍の頻度で肝転移を来すことが判明した ( $P < 0.001$ )、以上から今後、術後の肝転移予測が従来よりは高精度に行える可能性が示された。

### 3.倫理面への配慮

本研究では一部過去の症例解析であるが、そのほかはすべて IC の得られた材料である。また患者の個人情報各施設で完全に保管され、班員間での患者情報は一切守秘されている。

(班長協力者)

石黒 信吾	大阪府立成人病センター
岩下 明德	福岡大学医学部筑紫病院
落合 淳志	国立がんセンター東病院
加藤 洋	癌研究会癌研究所
佐野 寧	国立がんセンター東病院
渡辺 英伸	新潟大学医学部

研究成果の刊行発表

外国語論文

1. Yamada H, Shimoda T., et al., Long-Term Follow-Up Study of Gastric Adenoma/Dysplasia. Endoscopy, 36: 390-396, 2004.
2. Yachida S, Shimoda T., et al., Adenosquamous Carcinoma of the Esophagus, Oncology, 66; 218-225, 2004.
3. Kitajima K., Shimoda T., et al., Correlations between lymph node metastasis and depth of submucosal invasion in submucosal invasive colorectal carcinoma: a Japanese collaborative study, Journal of Gastroenterology, 39: 534-543, 2004.
4. Yamaguchi U., Shimoda T., et al., Differential diagnosis of gastrointestinal stromal tumor and other spindle cell tumors in the gastrointestinal tract based on immunohistochemical analysis, Virchows Arch, 445: 142-150, 2004.
5. Tominaga K., Shimoda T., et al., Predictive histopathologic factors for lymph node metastasis in patients with nonpedunculated submucosal invasive colorectal carcinoma. Dis colon Rectum Online, 2004, 10, 26.
6. Hasegawa T, Shimoda T., et al., Interobserver variability in histologic recognition, interpretation of KIT immunostaining and determining MIB-1 labeling indices in gastrointestinal stromal tumors and other spindle cell tumors of the gastrointestinal tract. AIMM in press.
7. Sekine S., Shimoda T., et al., High-grade dysplasia associated with fundic gland polyposis in a familial adenomatous polyposis patient, with special reference to APC mutation profiles. Mod Pathol, 17: 1421-1426, 2004.
8. Sakamoto N., Shimoda T., et al., Frequent hypermethylation of RASSF1A in early flat-type colorectal tumors. Oncogene, 23: 8900-8907, 2004.
9. Kano H., Ajioka Y., et al., MUC1, MUC2, and MUC5AC mucin core protein expression in ulcerative

colitis associated colorectal carcinoma. *Acta Medica et Biologica*, 52: 21-27, 2004.

10. Hirano H., Ajioka Y., et al., Bidirectional gastric differentiation in cellular mucin phenotype (foveolar and pyloric) in serrated adenoma and hyperplastic polyp of the colorectum. *Pathol Int*, 54; 401-407, 2004.

11. Kitajima K., Ajioka Y., et al., Correlations between lymph node metastasis and depth of submucosal invasion in submucosal invasive colorectal carcinoma: a Japanese collaborative study. *J Gastroenterol*, 39; 534-543, 2004.

12. Takamura M., Ajioka Y., et al., Reduced expression of liver-intestine cadherin is associated with progression and lymph node metastasis of human colorectal carcinoma. *Cancer Lett*, 30; 253-259, 2004.

13. Sakamoto M., Ajioka Y., et al., Frequent hypermethylation of RASSF1A in early flat-type colorectal tumors. *Oncogene*, (in press).

14. Baba Y., Ajioka Y., et al., The absence of a significant role for  $\beta$ -catenin in the tumorigenesis of the serrated adenoma of the colorectum: a comparative study with the traditional tubular colorectal adenoma. *Acta Medica et Biologica*, 52; 127-132, 2004.

15. Sato T., Fujii H., et al., A patient with TSC1 germline mutation whose clinical phenotype was limited to lymphangioleiomyomatosis. *J Intern Med*, 256; 166-173, 2004.

16. Sakamoto N., Fujii H., et al., Frequent hypermethylation of RASSF1A in early flat-type colorectal tumors. *Oncogene*, 23; 8900-8907, 2004.

17. Miyai K., Fujii H., et al., Loss of heterozygosity analysis in uterine cervical adenocarcinoma. *Gynecol Oncol*, 94; 115-120, 2004.

18. Matsumoto T., Fujii H., et al., Loss of heterozygosity analysis shows monoclonal evolution with frequent genetic progression and divergence in esophageal carcinosarcoma. *Hum Pathol*, 35; 322-327, 2004.

19. Arakawa A., Fujii H., et al., Loss of heterozygosity in

clonal evolution with genetic progression and divergence in spindle cell carcinoma of the gallbladder. *Hum Pathol*, 35; 418-423, 2004.

20. Tran TN., Fujii H., et al., Frequent promoter hypermethylation of RASSF1A and p16INK4a and infrequent allelic loss other than 9p21 in betel-associated oral carcinoma in a Vietnamese non-smoking/non-drinking female population. *J Oral Pathol Med*, 34; 150-156, 2005.

21. Fujii H., hino O., et al., Frequent down-regulation of HIVEP2 in human breast cancer, *Breast Cancer Res Treatment*, in press, 2005.

22. Watanabe T., et al., Chemotherapy and survival in colorectal cancer patients with and without microsatellite instability: Can MSI be a prognostic marker? *Gastroenterology*, 127(2); 688-689, 2005.

23. Watanabe T., et al., Pitfalls of pit pattern diagnosis in ulcerative colitis-associated dysplasia. *Gastroenterology* 126(1); 374-376, 2005.

24. Kazama S., Watanabe T., et al., Expression pattern of vascular endothelial growth factor-C in human colorectal normal mucosa and neoplastic mucosa. *Hepatogastroenterology*, 51(56); 391-395, 2005.

25. Kitajima K., Watanabe T., et al., Correlations between lymph node metastasis and depth of submucosal invasion in submucosal invasive colorectal carcinoma: a Japanese collaborative study.

26. Koketsu S., Watanabe T., et al., Expression of DNA repair protein: MYH, NTH1, and MTH1 in colorectal cancer. *Hepatogastroenterology*, 51(57); 638-642, 2005.

27. Okaji Y., Watanabe T., et al., Vaccination with autologous endothelium inhibits angiogenesis and metastasis of colon cancer through autoimmunity. *Cancer Science*, 95(1); 85-90, 2004.

28. Sasaki S., Watanabe T., et al., Effects of expression of hRFI on adenoma formation and tumor progression in colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Exp Clin Cancer Res*, 23(3); 507-512, 2004.

29. Shida D., Watanabe T., et al., Aberrant expression of lysophosphatidic acid (LPA) receptors in human colorectal cancer. *Lab Invest*, 84(10); 1352-1362, 2004.
30. Yamamoto H., Yao T., et al, c-kit and PDGFRA mutations in extragastrointestinal stromal tumor (gastrointestinal stromal tumor of the soft tissue). *Am J Surg Pathol*, 28: 480-488, 2004.
31. Yamanaka N., Yao T., et al, Nuclear factor-kB p65 is a prognostic indicator in gastric carcinoma. *Anticancer Res*, 24: 1071-1075, 2004.
32. Esaki M., Yao T., et al, Immunohistochemical characteristics of duodenal adenomas in familial adenomatous polyposis with special reference to cell kinetics. *Human Pathology*, 36: 66-73, 2005.
33. Iwai K., Yao T., et al, Multiple gastric carcinoids and endocrine cell micronests in type A gastritis: Nuclear morphometric and immunohistochemical analysis. *Oncol Reports*, 13: 397-404, 2005.
34. Nakamura T., Yao T., et al, Loss of phenotypic expression is related to tumor progression in early gastric differentiated adenocarcinoma. *Histopathol*, (in press), 2005.
35. Sugai T., et al., Analysis of Ki-ras and p53 gene mutations in laterally spreading tumors of the colorectum. *Pathol Int*, 53: 829-836, 2004.
36. Sugai T., et al., Resection of liver metastasis from extrahepatic bile duct carcinoma previously treated by pancreatoduodenectomy. *Hepatogastroenterology*, 51: 245-246, 2004.
37. Sugai T., et al., Analysis of Ki-ras gene mutations within the same tumor using a single tumor crypt in colorectal carcinomas. *J Gastroenterol*, in press, 2004.
38. Jiao YF., Sugai T., et al., Application of the crypt isolation technique to the flow cytometric analysis of DNA content in gastric carcinoma. *Hum Pathol*, in press, 2004.
39. Sugai T., et al., Analysis of mucin, p53 protein and Ki-67 expressions in gastric differentiated-type intramucosal neoplastic lesions obtained from endoscopic mucosal resection samples: A proposal for a new classification of intra mucosal neoplastic lesions based on nuclear atypia. *Pathol Int*, in press, 2004.