

## 17-22 大腸がん肝転移の予知ならび予防的治療に関する研究

主任研究者 国立がんセンター中央病院 藤田 伸

### 研究成果の要旨

深達度、静脈侵襲、浸潤先進部の脱分化、リンパ節転移、CD10の5つの因子を組み合わせて、それぞれの因子を認めるものを1（深達度のみmp: 0、ss: 1、se, si: 2）とスコア化し、その総和により肝転移低リスク群（0-2）、中間リスク群（3-5）、高リスク群（6）の3つに分類したところ、それぞれの肝転移率は、5%、30%、70%であることを示した。real time PCRによるRNAレベルの検討においても原発巣のCD10発現レベルが非肝転移症例に比べ肝転移症例において高値であることを明らかにし、CD10を定量することによる肝転移予測の可能性を示した。さらにこの結果を検証するために、過去ならびに現在の症例を用いての多施設共同臨床試験の研究計画書を作成した。研究計画書の倫理審査が終了次第、臨床試験を開始する。この他、E-cadherin、Il-8、MMP-9、クロマチン構造蛋白HMGB-1などの分子が肝転移と関連することを明らかにした。また腫瘍の低分化領域程度と肝転移との関連も明らかにした。DNAマイクロアレイ解析により非肝転移群と肝転移群との間で発現の差のある遺伝子群が抽出可能であることを示した。いずれも検討症例が少ないため、現在症例を増やして検討中である。

### 研究者名および所属施設

研究者名	所属施設および職名	分担研究課題
藤田 伸	国立がんセンター中央病院 医長	大腸癌肝転移予測と予防
下田忠和	国立がんセンター中央病院 医長	大腸癌肝転移の予測因子の解析
平井 孝	愛知県がんセンター中央病院 部長	大腸癌肝転移に対する化学療法
國安弘基	奈良県立医科大学 教授	分子病理から見た大腸癌の肝転移機序
大植雅之	大阪府立成人病センター 医長	臨床的予後因子による肝転移予測
八尾隆史	九州大学大学院医学研究院 助教授	腫瘍の形態発現と肝転移
班友		
大矢雅敏	癌研有明病院 医長	大腸がん肝転移に関与する遺伝子についてのマイクロアレイ解析を用いた研究
吉田直矢	熊本医療センター 医師	大腸がんのdrainage vein 中のIL-8レベルと肝転移の予知に関する研究

### 総括研究報告

#### 1 研究目的

大腸癌の肝転移は、その予後を左右する極めて重要な事象である。この肝転移を初回手術時に予測できれば、

早期に対応が可能となり、予後の改善が期待される。これまでの基礎的な研究から、深達度、静脈侵襲、リンパ節転移、CD10の発現、浸潤先進部の脱分化が肝転移と

強く相関することが示され、これらを組み合わせること  
で肝転移の予測も可能となって来ている。本研究では、  
過去の多数症例さらには現在の症例を用いて、これまでの  
基礎研究の結果を裏付け、臨床的な有用性を明らかに  
することで、肝転移高危険群を明確にする。

新たな肝転移予測因子も検討し、臨床的な有用性を明  
らかにし、さらに肝転移の分子機構の解明をめざす。

以上の基礎的検討から、肝転移高危険群と診断された  
症例に対しては、新たな肝転移予防補助療法のレジメを  
作成し、臨床試験を行う。

## 2 研究成果

### 1) 大腸がん肝転移リスクのスコア化

過去の研究で深達度、静脈侵襲、リンパ節転移、CD10  
発現、浸潤先進部の脱分化が有意な因子で、浸潤部での  
炎症反応は転移抑制因子であることが明らかにしていた  
が、さらに深達度、静脈侵襲、浸潤先進部の脱分化、リ  
ンパ節転移、CD10の5つの因子を組み合わせ、それ  
ぞれの因子を認めるものを1(深達度のみmp: 0,ss: 1, se,  
si: 2)とスコア化し、その総和により肝転移低リスク群  
(0-2)、中間リスク群(3-5)、高リスク群(6)の3つ  
に分類したところ、それぞれの肝転移率は、5%、30%、  
70%であることを示した。すなわち通常の病理学的因子  
にCD10の発現を加味することで肝転移予測の臨床応用  
可能性を明らかにした。

以上の結果を検証するために、過去ならびに現在の症  
例を用いての多施設共同臨床試験の研究計画書を作成し  
た。国立がんセンター中央病院の倫理委員会の承認はす  
でに得ており、各参加施設で研究計画書の倫理審査が終  
了次第、多施設共同臨床試験を開始する。

### 2) CD10、VEGF、TGF- $\alpha$ 、CD44v6発現と肝転移

T3、T4の進行大腸癌のうち同時性肝転移60  
例、非肝転移例60例、異時性肝転移例(原発  
巣30例、肝転移巣22例)のホルマリン固定パ  
ラフィン標本に対して、CD10、VEGF  
(vascular endothelial growth factor)、TGF  
(transforming growth factor)- $\alpha$ 、CD44v6の  
免疫染色を施行し、これら発現ならびに臨床病  
理学的因子と肝転移との関連を多変量解析で  
検討したところ、リンパ節転移、CD10発現、  
VEGF発現が有意な肝転移危険因子となり、こ  
れら3因子すべてが陽性の症例では肝転移率は

93%であった。

stage IIIで異時性肝転移12例と非肝転移12例のCD10  
発現をreal time PCR法にて検討したところ、正常粘膜  
の3倍以上のCD10の発現がみられたのは、肝転移症例12  
例中10例(83%)、非肝転移症例12例中4例(33%)で、  
有意差を認めた。CD10発現と肝転移との関連が免疫染  
色以外の方法でも示された。

### 3) 静脈侵襲と肝転移

大腸進行癌473例について、浸潤最深部を含む一切片  
についてVictoria blue HE染色を施行して静脈侵襲像を  
検討したところ、HE染色のみでは、肝転移症例の85%  
に静脈侵襲陽性であったが、Victoria blue HE染色を追  
加することで93%まで陽性率を引き上げられた。静脈侵  
襲の存在する深さでは、固有筋層までと漿膜下層では優  
位に肝転移率に差があり、前者は31%、後者は49%に肝  
転移が見られた。侵襲を受ける静脈の直径および腫瘍辺  
縁から侵襲を受ける静脈までの距離は肝転移との優位な  
相関は見られなかった。侵襲静脈内での線維増生は肝転  
移と負の相関があり、線維増生を認めない場合には肝転  
移率51%に対し、線維増生を認める場合には16%と有意  
に低下していた。

### 4) E-cadherin、IL-8、MMP9血中濃度と肝転移

門脈血中E-cadherin濃度は、非肝転移例1848.4  $\pm$   
734.6 ng/ml (n = 95)、同時性肝転移例3324.2  $\pm$  1176.5  
ng/ml (n = 24)、同時性肝外転移例2260.7  $\pm$  744.9  
ng/ml (n = 8)、異時性肝転移3585.6  $\pm$  541.0 ng/ml (n =  
13)、異時性肝外転移2261.8  $\pm$  1239.2 ng/ml (n = 8)であ  
り、異時性肝転移例、異時性肝外転移例と非転移例との  
間に有意差を認め、カットオフ値を3000 ng/mlとした  
場合の異時性肝転移予測正診率は64.3%であった。

末梢血IL-8濃度は、非肝転移例143.4  $\pm$  9.7 ng/ml (n =  
26)、同時性肝転移例240.0  $\pm$  61.0 ng/ml (n = 4)、  
異時性肝転移例136.2  $\pm$  5.9 ng/ml (n = 5)であり、同時  
性肝転移と非転移例との間に有意差を認めた。末梢血  
MMP-9濃度は、非転移例16.1  $\pm$  1.5 ng/ml (n = 26)、  
同時性肝転移例77.0  $\pm$  78.3 ng/ml (n = 4)、異時性肝  
転移例14.8  $\pm$  1.8 ng/ml (n = 5)であり、IL-8と同様、  
同時性肝転移と非転移例との間に有意差を認めた。いず  
れも異時性肝転移との関連は認められなかった。門脈血  
IL-8、MMP-9濃度も同様に検討したが、肝転移との関  
連はあきらかではなかった。

## 5) stage II 大腸癌肝転移リスク因子

stage II 大腸癌 282 例の臨床病理学的背景因子(年齢、性、組織型、腫瘍最大径、リンパ管侵襲、脈管伸侵襲、静脈侵襲、化学療法、深達度、CEA)と肝転移との関連をロジスティックモデルにて単変量、多変量解析を行ったが、有意な因子は見いだせなかった。

## 6) マイクロアレイ解析による新たな肝転移関連分子の同定と肝転移予測

同時性肝転移例14例と深達度ss以深の非肝転移例18例からマクロダイセクションで癌部と正常粘膜を正確に採取、RNAを抽出し、マイクロアレイ解析を行ったところ、異時性肝転移例と非肝転移例との間で発現に差がある9遺伝子が抽出された。これら9遺伝子を用いて個々の対象症例に関する異時性肝転移の予測の正診率を検討したところ、s異時性肝転移例20例中の19例で異時性肝転移ありと予測、非肝転移例18例中16例で肝転移なしと予測、肝転移正診率は35/38(92%)であった。

## 7) クロマチン構造蛋白 HMGB1 と肝転移

大腸癌細胞を用いた *in vitro* 実験系により癌細胞が分泌するクロマチン構造蛋白 HMGB1、増殖因子・サイトカインが宿主マクロファージ系細胞にアポトーシスを誘導することで宿主がん免疫に影響を与え、大腸癌の転移を促進することを明らかにした。免疫染色においてもヒト大腸癌リンパ節転移例・非転移例各 25 例の転移のないリンパ節組織内の HMGB1 濃度を測定し、CD68 陽性マクロファージ数との関連を検討した結果、リンパ節転移陽性例の非転移リンパ節では有意なリンパ節内 HMGB1 濃度上昇とマクロファージ減少が見られ、両者には相関が認められた。In vivo 大腸癌肝転移モデルにおいても、HMGB1 投与により肝 Kupffer 細胞の減少と肝転移促進することが示され、HMGB1 が大腸癌肝転移において大きな役割を果たしていることが示唆された。

## 3 倫理面への配慮

本研究では、過去の症例、ならびに現在の症例の病理組織を用いる必要があるが、過去の症例に関しては、各施設の倫理委員会で承認された方法でインフォームドコンセントが得られている症例を用いる。新たな症例に関しては、新たに各施設の倫理委員会の審査の承認を受け、インフォームドコンセントが得られた症例で検討を行う。

## 研究成果の刊行発表

## 外国語論文

1. Matsushita H, Fujita S, et.al., A new method for isolating colonocytes from naturally evacuated feces and its clinical application to colorectal cancer diagnosis. *Gastroenterology*. 129:1918-1927.2005.
2. Yamamoto S, Fujita S, et.al.. Safety of laparoscopic intracorporeal rectal transection with double-stapling technique anastomosis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech*. 15(2):70-4.2005.
3. Moriya Y, Fujita S, et.al. Total pelvic exenteration with distal sacrectomy for fixed recurrent rectal cancer. *Surg Oncol Clin N Am*. 14(2):225-38.2005.
4. Yamamoto S, Fujita S, et.al. Postsurgical surveillance for recurrence of UICC stage I colorectal carcinoma: is follow-up by CEA justified? *Hepatogastroenterology*. 52(62):444-9. 2005.
5. Tominaga K, Shimoda T, et al., Predictive histopathologic factors for lymph nodes metastasis in patients with nonopendunculated submucosal invasive colorectal carcinoma. *Dis Colon Rectum*. 48 : 92-100. 2005
6. Fujimoto Y, Shimoda T, et al., CD10 expression in colorectal carcinoma correlates with liver metastasis. *Dis Colon Rectum*. 48:1883-1889. 2005
7. Endo M, Shimoda T, et al., Bizzare paraosteal Osteochondromatous proliferation with a t(1:17) translocation. *Virchow Arch*. 447:99-102, 2005
8. Igaki H, Shimoda T, et al., Surgery for clinical T3 carcinomas of the upper thoracic esophagus and the need for new strategies. *Br J Surg*. 92: 1235-1240. 2005
9. Nunobe S, Shimoda T, et al., Distribution of the deepest penetrating point of minute submucosal gastric cancer. *Jpn J Clin Oncol*. 35:587-590. 2005.
10. Tashiro T, Shimoda T, et al., Gastrointestinal stromal tumour of the stomach showing lymph node metastases. *Histtopathology*. 47:438-439.2005
11. Etoh T, Shimoda T, et al., Extranodal metastasis

- is an indicator of poor prognosis in patients with gastric carcinoma. Br J Surg. 2006.
12. Kuniyasu H. The molecular pathology of gastric cancer. In: New Perspectives in Cancer Research and Therapy 2005, 85-98 Research Signpost, Kerala, India 2005.
  13. Kuniyasu H, Bhawal UK. et.al Association of expression of receptors for advanced glycation end-products (RAGE) and invasive and metastatic activity of oral squamous cell carcinoma. Oncology 69: 246-255. 2005.
  14. Kuniyasu H, Kondo T, et.al. Loss of heterozygosity and histone hypoacetylation of the PINX1 gene are associated with reduced expression in gastric carcinoma. Oncogene 24: 157-164. 2005.
  15. Kuniyasu H, Sasaki T, et.al. Heme oxygenase-1 accelerates protumoral effects of nitric oxide in cancer cells. Virchows Archiv 446:525-531. 2006.
  16. Kuniyasu H, Sasahira T. et.al. Expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE) and HMGB1/amphoterin in colorectal adenomas. Virchows Archiv 446: 411-415. 2005.
  17. Kuniyasu H, et.al. Colon cancer cell derived-HMGB1/amphoterin induces growth inhibition and apoptosis in macrophages. Am J Pathol 166: 751-759. 2005.
  18. Kuniyasu H, Oue N, et.al. Genes involved in invasion and metastasis of gastric cancer identified by array-based hybridization and serial analysis of gene expression. Oncology 68: 17-22. 2005.
  19. Kuniyasu H, et.al. Conjugated linoleic acid inhibits peritoneal metastasis in human gastrointestinal cancer cells. Int J Cancer 118: 571-576, 2006.
  20. Kuniyasu H, Sasaki T, et.al. Inhibitory effect of linoleic acid on transformation of IEC6 intestinal cells by *in vitro* azoxymethane treatment. Int J Cancer 118: 593-599. 2006.
  21. Kuniyasu H, Sasaki T, et.al. Peritoneal metastasis inhibition by linoleic acid with activation of PPAR $\gamma$  in human gastrointestinal cancer cells. Virchows Archiv, in press (Epub ahead of print).
  22. Kuniyasu H, Sasaki T, et.al. Discrepancy between E-cadherin protein expression and morphology in human gastric carcinoma cells. Hepato-Gastroenterol 52: 1920-1924. 2005.
  23. Kuniyasu H, Oue N. et.al. Accumulation of DNA methylation is associated with tumor stage in gastric cancer. Cancer, in press (Epub ahead of print)
  24. Matsumoto T, Ohue M. Feasibility of autonomic nerve-preserving surgery for advanced rectal cancer based on analysis of micrometastases. Brit J Surg. 92(11) : 1444-1448. 2005.
  25. Kim BM, Ohue M. Methylation and expression of p16INK4 tumor suppressor gene in primary colorectal cancer tissues. Int J Oncol. 26(5) : 1217-1226. 2005.
  26. Fukunaga H, Ohue M. Fusion image of positron emission tomography and computed tomography for the diagnosis of local recurrence of rectal cancer. Ann Surg Oncol. 12(7) : 561-569. 2005.
  27. Izawa H, Ohue M. Effects of p21cip1/waf1 overexpression on growth, apoptosis and differentiation in human colon carcinoma cells. Int J Oncol. 27 : 69-76. 2005.
  28. 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.
  29. 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.
  30. Moriyama T, Yao T, et.al. Mucosal proinflammatory cytokine and chemokine expression of gastroduodenal lesions in Crohn's disease. Aliment Pharmacol Ther 21:85-91, 2005.
  31. Nakamura T, Yao T, et.al. Loss of phenotypic expression is related to tumor progression in early gastric differentiated adenocarcinoma. Histopathol 47 : 357-367, 2005.
  32. Nakamura N, Yao T, et.al. Prognostic significance of abnormalities of cell-cycle regulatory proteins in gastrointestinal stromal tumor and relevance of the risk-grading system. Hum Pathol 36:

- 828-37.2005.
33. Nakamura S, Yao T, et.al. Overexpression of caspase recruitment domain (CARD) membrane-associated guanylate kinase 1 (CARMA1) and CARD9 in primary gastric B-cell lymphoma. *Cancer* 104:1885-1893, 2005.
  34. Ueno M, Oya M, et al. Incidence and prognostic significance of lateral lymph node metastasis in patients with advanced low rectal cancer. *Br J Surg* 92(6): 756-763.2005.
  35. Kinoshita , Oya M, et al. Increase in the frequency of K-ras codon 12 point mutation in colorectal carcinoma in elderly males in Japan: the 1990s compared with the 1960s. *Cancer Sci* 96(4): 218-220.2005.
  36. Yamamoto J, Oya M, et al. Surgical treatment for metastatic malignancies. Nonanatomical resection of liver metastasis: indications and outcomes. *Int J Clin Oncol* 10(2): 97-102 ,2005.
  - 1173-1176. 2005.
  12. 東山聖彦, 大植雅之. 大腸癌肺転移に対する外科治療—手術の適応、工夫と成績について. *臨床消化器内科*. 20(2) : 199-206. 2005.
  13. 鈴木玲, 大植雅之. 消化器癌術後の静脈血栓塞栓症予防に対するダナパロイド投与の安全性と有効性の検討. *Therapeutic Research*. 26(6) : 160-162. 2005.
  14. 田中晃司, 大植雅之. 直腸癌局所再発に対して Tissue Expander を用いて放射線化学療法を行った1例. *癌と化学療法* 32(10) : 1779-1781. 2005.
  15. 富丸慶人, 大植雅之. 直腸癌の管腔内転移により発症したと考えられた転移性痔瘻癌の1例. *癌と化学療法* 32(10) : 1776-1778. 2005.
  16. 大矢雅敏. 化学放射線療法 直腸癌. *Mebio Oncology* 2(4): 58-64 2005.
  17. 大矢雅敏. 大腸癌のすべて. 外科治療, 低位前方切除術. *消化器外科* 28(5): 730-738 . 2005.

日本語論文

1. 藤田伸,他 : 側方郭清-予防的側方郭清と治療的側方郭清. *消化器外科*. 28, 799-805.2005.
2. 藤田伸 : 大腸がんの治療戦略, ガイドライン, 臨床試験. *がん看護*, 10, 206-210. 2005
3. 藤田伸 : 転移再発時の治療戦略. *がん看護*, 10, 232-235.2005.
4. 山本聖一郎, 藤田伸, 他 : 直腸癌に対する補助化学療法と補助放射線療法. *コンセンサス癌治療* .4(3). 126-129.2005.
5. 上原圭介, 藤田伸,他 : 仙骨合併骨盤内臓全摘術. *手術*. 59(8) 1149-1153.2005.
6. 森谷宜皓, 藤田伸,他 : 骨盤内臓全摘術. *手術*. 59(6) 833-840.2005.
7. 平井孝.直腸癌骨盤内再発の診断法と治療法の選択. *コンセンサス癌治療* 4:158-161. 2005.
8. 平井孝.大腸がん.現代医学 53:23-28 2005.
9. 平井孝. 直腸癌骨盤内再発の画像診断と病理所見. *消化器外科* 29:29-34.2006.
10. 平井孝. 肛門括約筋手術後の失禁. *ストーリーナビゲーション-実践と理論* :61-64 2006.
11. 畑泰司, 大植雅之. ダナパロイドナトリウムを用いた消化器癌術後、静脈血栓塞栓予防における安全性と効果について. *Therapeutic Research*. 25(6) :