

平成 31 年 4 月 26 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08690

研究課題名(和文) VEGF依存性腫瘍血管の同定と大腸癌ベバシズマブ療法の効果予測

研究課題名(英文) Identification of VEGF-dependent tumor vessels and prediction of effectiveness of bevacizumab-based therapy for colorectal cancer

研究代表者

鴨志田 伸吾 (Kamoshida, Shingo)

神戸大学・保健学研究科・教授

研究者番号：70351020

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌組織のTK1陽性血管率(TK1-PVR; TK1/CD31二重免疫染色を利用)とKi67-PVRは正常組織よりも有意に高かったが、正常組織のTK1-PVRはKi67-PVRより有意に低かった。術前化学療法(NAC)後の大腸癌肝転移において、低血管密度群の全生存期間(OS)は有意に延長しており、低TK1-PVR群に死亡例はなかった。一方、腫瘍細胞におけるCC3やCCK18の高発現群、高CC3-PVR群のOSは有意に短縮していた。TK1/CD31二重免疫染色は腫瘍血管の同定に有用であること、NAC後の腫瘍血管やアポトーシスの解析により大腸癌肝転移患者の予後を予測できる可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術前化学療法を施行した大腸癌患者の肝転移巣切除材料を対象として、予後を制御する因子の発現を明らかにすることは、肝転移切除後の治療戦略を構築する上で役立つと期待される。また、予後不良の要因となる因子を標的とした治療薬の開発の構想につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the use of TK1/CD31 double immunostaining for identifying activated tumor vessels. TK1-positive vessel rate (PVR) and Ki67-PVR in colorectal cancers (CRCs) was greater than in normal tissues, whereas TK1-PVR in normal tissues was significantly less than Ki67-PVR. We also assessed whether CD31-positive vessel density (PVD), TK1-PVR, and apoptotic marker expression in CRC liver metastasis (CRCLM) after neoadjuvant chemotherapy (NAC) are associated with overall survival (OS). CD31-PVDLow were significantly associated with a longer OS. There were no deaths in patients with TK1-PVRLow tumors. Cleaved caspase-3 (CC3)High and cleaved cytokeratin-18High in tumor cells and CC3-PVRHigh were significantly associated with a shorter OS. Our results suggest that TK1/CD31 double immunostaining can detect activated tumor vessels more accurately than Ki67/CD31 staining, and analyses of tumor vessels and apoptosis in CRCLM after NAC could predict the prognosis of CRCLM patients.

研究分野：腫瘍病理学、免疫組織化学、臨床細胞学

キーワード：大腸癌 腫瘍新生血管 チミジンキナーゼ アポトーシス 術前化学療法 予後予測 免疫組織化学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

切除不能な進行・再発大腸癌に対する薬物療法は、FOLFOX (5-FU/ロイコボリン + オキサリプラチン)、XELOX (カペシタピン + オキサリプラチン)、FOLFIRI (5-FU/ロイコボリン + イリリノテカン)等を骨格として、分子標的薬の上乗せが検討される。大腸癌に対する分子標的薬には、抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体薬 (セツキシマブおよびパニツムマブ) と抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体薬 (ベバシズマブ) がある。抗 EGFR 抗体薬は RAS 遺伝子野生型症例での有効性が示され、RAS 遺伝子変異検査は抗 EGFR 抗体薬のコンパニオン診断法となっている。しかし、ベバシズマブのコンパニオン診断ははまだ実現していない。

ベバシズマブは血管新生因子 VEGF に対するヒト化モノクローナル抗体で、VEGF と VEGF receptor 2 (VEGFR2) の結合を阻害することにより、腫瘍血管新生を抑制する。同時に、腫瘍血管の透過性改善・正常化作用によって、併用抗癌剤の腫瘍内への移行を容易にし、抗腫瘍効果を増強させる。

したがって、免疫組織化学 (IHC) 染色を利用したベバシズマブのコンパニオン診断を実現するには、VEGF-VEGFR2 系を介して誘導された腫瘍新生血管 (以下、VEGF 依存性腫瘍血管と略す) を可視化・評価する技術を開発することが適切であると考えられる。

## 2. 研究の目的

申請時における当初の研究目的は以下の内容であった。本研究ではまず、VEGF 依存性腫瘍血管を特異的かつ正確に検出できる IHC 染色技術を確認する。そのために、血管内皮細胞増殖・生存のマーカー、血管不安定化マーカーの検出・密度評価を試みる。さらに、汎血管内皮マーカーとの二重 IHC 染色も検討する。次いで、確立された VEGF 依存性腫瘍血管検出技術を用いて、FOLFOX + ベバシズマブ療法を受けた転移性大腸癌症例の治療効果と VEGF 依存性腫瘍血管の密度との相関性を明らかにする。加えて、FOLFOX + ベバシズマブ療法後に肝転移巣切除を行った症例について、奏効群では VEGF 依存性腫瘍血管の密度が低下しているか、腫瘍細胞および腫瘍血管にアポトーシスがどのような割合で誘導されているかを確認する。

実際、血管内皮細胞増殖・生存のマーカー (リン酸化 VEGFR2、リン酸化 Akt、リン酸化 Erk、リン酸化 STAT3)、血管不安定化のマーカー (リン酸化 VE-カドヘリン) について至適染色条件を検討したところ、これらリン酸化抗原の多くは固定による染色ムラ (固定液の浸透が早い組織表面に限局して染色される) を伴っていた。そのため、細胞周期関連マーカー (Ki67、thymidine kinase 1 [TK1]、minichromosome maintenance complex component 7、topoisomerase II、cyclin A、B および D1) について追加検討したところ、腫瘍血管と既存血管の間に顕著な発現差が認められると推測されたのは Ki67 と TK1 であった。したがって、まずは Ki67 と TK1 について詳細に検討することとした。

以下、3 題の研究テーマに分けて記載する。

### (1) 優れた腫瘍血管同定法としての TK1/CD31 二重 IHC 染色

腫瘍における血管の状態は、CD31、CD34 および von Willebrand 因子のような汎血管内皮細胞マーカーの IHC 染色を利用して、血管密度を算出することによって評価されている。しかし、血管密度では腫瘍血管の機能状態を認識することはできない。ところが、増殖血管を評価すれば、腫瘍血管形成の活性化を含めた機能的情報が得られると考えられる。そのためには、腫瘍新生血管と既存血管を正確に鑑別できる染色技術が必要となる。

TK1 は、ピリミジン合成のサルベージ経路においてチミジンをデオキシチミジンリン酸に変換する反応を触媒することによって、DNA 複製および細胞増殖に関与している。In vitro 研究により、TK1 が内皮細胞の DNA 合成における重要酵素であることが示されている。一方、CD31 は他の汎血管内皮細胞マーカーよりも高い感度と特異性を有することが知られている。そこで本研究では、腫瘍新生血管と既存血管を鑑別するための TK1/CD31 二重 IHC 染色法を開発し、その有用性を評価した。

### (2) ネオアジュバント化学療法施行後大腸癌肝転移巣における腫瘍血管と患者予後との関連性

CD31 陽性血管密度が原発性大腸癌患者の全生存期間 (overall survival, OS) と相関することが報告されている。しかし、進行・再発の大腸癌を含めた化学療法施行例における腫瘍血管の密度や増殖状態の臨床的意義は明らかになっていない。そこで本研究では、FOLFOX (または XELOX) ± ベバシズマブによるネオアジュバント化学療法 (neoadjuvant chemotherapy, NAC) を受けた大腸癌肝転移症例を対象として、NAC 後の大腸癌肝転移組織における CD31 陽性血管密度および TK1 陽性血管率と OS との関連性を解析した。

### (3) ネオアジュバント化学療法施行後大腸癌肝転移巣におけるアポトーシスマーカーの発現と患者予後との関連性

アポトーシスは薬物療法や放射線療法によって誘導される反面、癌幹細胞の増殖や腫瘍の成長にも関わることが最近指摘されている。Caspase-3 は中心的アポトーシス実行酵素で、他の caspases により 2 つのサブユニットに切断 (活性化) される。その切断産物は cleaved caspase-3 (CC3) とよばれる。CC3 は、膠芽腫および胃癌では予後良好と関連するが、髄膜腫、大腸癌お

よび乳癌では予後不良と関連することが報告されている。すなわち、腫瘍における CC3 発現と患者予後との関連性については一致した見解が得られていない。

Caspase の活性化により細胞骨格タンパクの 1 つである cytokeratin-18 (CK18) が切断される。その産物である cleaved CK18 (CCK18) は上皮細胞のアポトーシスに特異的なマーカーとして利用されている。そこで本研究では、大腸癌肝転移巣における癌細胞および腫瘍血管におけるアポトーシスマーカーの発現を解析し、予後予測におけるアポトーシスマーカー発現の意義を評価した。

### 3. 研究の方法

本研究の実施に先立ち、藤田保健衛生大学（現在は藤田医科大学）医学部および神戸大学大学院保健学研究科の倫理委員会の承認を得た。

#### (1)優れた腫瘍血管同定法としての TK1/CD31 二重 IHC 染色

手術切除された原発大腸癌組織 39 例を対象とした。ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色標本を鏡検し、代表的なパラフィン包埋組織ブロックを選出した。そのブロックから薄切切片を作製し、シランコーティングスライドに貼付した。

第一段階の染色には、ヒストファインシンプルステイン MAX-P0 システムを用いた。切片を脱パラフィンした後、0.3%過酸化水素メタノールに 10 分間浸漬し、内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。加熱による抗原賦活化として、1 mM EDTA 含有 10 mM トリス塩基 (pH 9.0) 中で、120℃、8 分間の圧力鍋処理を行った。次いで、50 mM トリス緩衝食塩水 (TBS, pH 7.6) で洗浄した後、抗 TK1 マウスモノクローナル抗体 (200 倍希釈、クローン F12) を滴下し、室温で一晩反応させた。翌日、TBS で洗浄した後、ペルオキシターゼ・二次抗体標識ポリマー試薬に室温で 1 時間反応させた。次いで、再度 TBS 洗浄し、ジアミノベンジジン溶液を用いて発色した。

第二段階の染色には、ヒストファインシンプルステイン AP システムを用いた。抗原再賦活化のために、前述の方法で 3 分間加熱した。TBS 洗浄後、抗 CD31 ウサギモノクローナル抗体 (200 倍希釈、クローン EP3095) を室温で一晩反応させた。翌日、TBS で洗浄後、アルカリホスファターゼ・二次抗体標識ポリマー試薬を室温で 1 時間反応させた。洗浄後、フクシン+溶液を用いて発色した。水道水ですすいだ後、マイヤーのヘマトキシリンで核を染色した。最後に、CC/Mount を滴下し、伸展器上で 55℃、15 分間乾燥させ、マルチマウント 480 を用いて封入した。

同様に、Ki67/CD31 二重 IHC 染色についても実施した (抗 Ki67 マウスモノクローナル抗体 [100 倍希釈、クローン MIB-1] を使用)。

光学顕微鏡下で、腫瘍における CD31 陽性高密度血管領域 (ホットスポット) を 4ヶ所選択した。壊死領域を除外し、細胞が生存している腫瘍部とその周囲だけを評価した。ホットスポットにおける CD31 陽性血管数および TK1/CD31 二重陽性血管数を 200 倍視野でカウントした。そして、TK1/CD31 二重陽性血管数を CD31 陽性血管数で除すことにより TK1 陽性血管率を算出した。同様な方法で、Ki67 陽性血管率も求めた。

#### (2)ネオアジュバント化学療法施行後大腸癌肝転移巣における腫瘍血管と患者予後との関連性

手術切除された大腸癌肝転移組織 54 例 (NAC 群: 35 例、コントロール [非 NAC] 群: 19 例) を対象とした。NAC のレジメンは、FOLFOX (または XELOX) ±ベバシズマブである。各症例の HE 染色標本を鏡検し、パラフィン包埋組織ブロックの中から代表的なものを選出した。複数回手術を受けた症例に関しては初回切除標本を、肝転移が多発していた症例については NAC による腫瘍縮小効果が最も低い転移巣を対象とした。薄切切片を作製し、シランコーティングスライドに貼付した。

上記 (1) と同様に、TK1/CD31 二重 IHC 染色を実施し、CD31 陽性血管密度および TK1 陽性血管率を算出した。CD31 陽性血管密度については、ROC 曲線解析により、カットオフ値を設定した。CD31 陽性血管密度がカットオフ値 (54) 未満の場合を CD31<sup>Low</sup>、カットオフ値以上の場合を CD31<sup>High</sup> とした。また、TK1 陽性血管率が <1% の場合を TK1<sup>Low</sup>、1% の場合を TK1<sup>High</sup> とした。なお、OS は初回肝切除日から最終フォローアップ日もしくは死亡日までとした。

#### (3)ネオアジュバント化学療法施行後大腸癌肝転移巣におけるアポトーシスマーカーの発現と患者予後との関連性

肝切除を施行された大腸癌肝転移 (計 58 例; NAC 群 38 例、コントロール群 20 例) のパラフィン包埋組織切片を対象とした。HE 染色標本を観察し、組織学的変化 (the modified tumor regression grade [mTRG], usual necrosis [UN], infarct-like necrosis [ILN], three zonal changes, dangerous halo, cholesterol clefts, foamy macrophages および calcification の 8 項目) を評価した。

また、CC3 (Asp175) ウサギポリクローナル抗体 (200 倍希釈) ないし CCK18 マウスモノクローナル抗体 (M30cytoDEATH, 200 倍希釈) を用いた IHC 染色を行った。切片を脱パラフィン後、0.3%過酸化水素加メタノールに室温で 10 分間浸漬し、内因性ペルオキシターゼ活性を除去した。流水水洗後、抗原賦活化のために圧力鍋を用いて加熱した (120℃、10 分間)。加熱溶液として、1 mM EDTA 含有 10 mM トリス塩基 (pH 9.0) を用いた。TBS で洗浄後、一次抗体 (上記)

を室温で一晩反応させた。再度 TBS で洗浄後、ペルオキシターゼ・二次抗体標識ポリマー試薬を室温で1時間反応させた。TBS で洗浄後、ジアミノベンチジン溶液を用いて発色し、マイヤーのヘマトキシリンで核染色を行った。

腺癌の形態が維持され、かつ陽性細胞の数が最も多い領域（ホットスポット）を100倍視野で5カ所選択した。CC3 ないし CCK18 陽性細胞率の平均を算出し、<10%を低発現（CC3<sup>Low</sup>、CCK18<sup>Low</sup>）、10%を高発現（CC3<sup>High</sup>、CCK18<sup>High</sup>）とした。残存腫瘍細胞が極端に少ない場合は、腫瘍全体における陽性細胞率を評価した。

加えて、CC3/CD31 二重 IHC 染色を実施し、ホットスポット4ヶ所から CC3 陽性血管率を求め、OS との関連を解析した。なお、CC3/CD31 二重 IHC 染色とその評価は、TK1/CD31 二重 IHC 染色と同様な方法で行った。ROC 曲線解析により、カットオフ値を設定し、CC3 陽性血管率がカットオフ値（1.27%）未満の場合を CC3-V<sup>Low</sup>、カットオフ値以上の場合を CC3-V<sup>High</sup> とした。

#### 4. 研究成果

##### (1)優れた腫瘍血管同定法としての TK1/CD31 二重 IHC 染色

TK1 および Ki67 は核（腫瘍細胞、血管内皮細胞等）に染色（茶色）され、CD31 は細胞膜（血管内皮細胞）に染色（赤色）された。TK1 陽性血管率の平均値±SD は、大腸癌組織：23.6±9.0%、正常組織：1.7±1.9%であった（ $P<0.0001$ ）。一方、Ki67 陽性血管率の平均値±SD は、大腸癌組織：20.0±10.9%、正常組織：4.2±5.6%であった（ $P<0.0001$ ）。すなわち、腫瘍組織における TK1 陽性血管率および Ki67 陽性血管率の平均は、正常組織よりもそれぞれ 13.9 倍および 4.8 倍高かった。腫瘍組織における TK1 陽性血管率は Ki67 陽性血管率よりも有意に高かったが（ $P=0.012$ ）、正常組織における TK1 陽性血管率は Ki67 陽性血管率よりも有意に低かった（ $P<0.0001$ ）。

これらの結果は、TK1/CD31 二重 IHC 染色が、Ki67/CD31 二重 IHC 染色よりも正確に活性化腫瘍血管を同定できることを示している。また、TK1 が重要な役割を果たすサルベージ経路を介した DNA 合成が大腸癌の腫瘍血管では活発であるが、既存の正常血管では抑制されていることを示唆している。ただし、TK1 と血管新生因子（VEGF 等）との直接的な関係は不明である。

二重 IHC 染色技術を用いて増殖血管を評価した報告がなされている。増殖マーカーとしては Ki67、増殖細胞核抗原（PCNA）および bromodeoxyuridine（BrdU）がしばしば利用されてきた。しかし、先述したごとく、TK1 は内皮細胞における DNA 合成に関する重要酵素であるにもかかわらず、増殖血管の評価に TK1 を利用した研究は本研究が初めてである。

以上の成果は第 106 回日本病理学会総会で発表、また英文論文として Biotechnic & Histochemistry 誌（Vol. 94, No. 1, 2019, pp. 60–64）に掲載された。

しかしながら、TK1/CD31 二重 IHC 染色では VEGF 依存性を証明できない。そこで、TK1 と VEGFR2 の二重免疫染色法を確立し、腫瘍部と非腫瘍部における TK1/VEGFR2 陽性血管の割合を比較検討した。非腫瘍部より腫瘍部の方が有意に高いという結果が得られたが（ $P=0.003$ ）、TK1/VEGFR2 陽性血管の数は腫瘍部においても非常に少なかった。したがって、以降は TK1/CD31 二重 IHC 染色を用いて研究計画を進めていくことにした。

##### (2)ネオアジュバント化学療法施行後大腸癌肝転移巣における腫瘍血管と患者予後との関連性

TK1<sup>Low</sup> は NAC 群の 17%に認められたが、コントロール群ではすべて TK1<sup>High</sup> を示した。症例数が十分でないため、有意差は認められなかったが（ $P=0.127$ ）、NAC によって血管内皮細胞における TK1 発現、すなわち血管内皮細胞の DNA 合成（血管の増殖活性）が抑制されたと推測される。

一方、CD31 陽性血管密度および TK1 陽性血管率は、ペバシズマブ併用群（19 例）と非併用群（16 例）の間で有意な差を示さなかった。この原因として、血管新生阻害作用がペバシズマブによる VEGF 阻害に限定したものではないことが考えられる。すなわち、血管内皮細胞のアポトーシスは 5-FU を含めた殺細胞性抗癌剤によっても誘導されることが明らかにされている。したがって、残念ながら、TK1/CD31 二重 IHC 染色によってペバシズマブの上乗せ効果を予測するのは困難と考えられる。

NAC 群を対象とした場合、CD31<sup>High</sup> に比べて CD31<sup>Low</sup> では OS が有意に延長していた（ $P=0.008$ ）。しかし、性別、腫瘍原発部位、リンパ節転移、腫瘍数、腫瘍の大きさ、mTRG および TK1 発現レベルに OS との有意な相関は認められなかった。また、コントロール群を対象とした場合、いずれの因子も OS との有意な関連を示さなかった。

Kaplan-Meier 曲線解析およびログ・ランク検定を実施すると、NAC 群の CD31<sup>Low</sup> は NAC 群の CD31<sup>High</sup>、コントロール群の CD31<sup>Low</sup> に比べて有意に OS 良好であった（それぞれ  $P=0.008$ 、 $P=0.034$ ）。これらの結果から、NAC によって血管新生が抑制された症例は予後良好であることが示唆される。CD31 陽性血管密度が原発性大腸癌患者の OS 不良と相関するという報告があるが、本研究は NAC 後転移性大腸癌においても CD31 陽性血管密度が予後予測マーカーとなりうる可能性を示したものである。

一方、NAC 群の TK1<sup>High</sup> とコントロール群の TK1<sup>High</sup> は類似した生存曲線を示したが、NAC 群の TK1<sup>Low</sup> に死亡例はなかった。ただし、症例数が少ないため、残念ながら有意差は認められなかった。この結果から、血管の増殖状態が大腸癌肝転移患者の予後に影響を与えることが示唆される。NAC 群の TK1<sup>High</sup>（OS 不良例）および TK1<sup>Low</sup>（生存例）の代表的染色像を図 1 に示す。



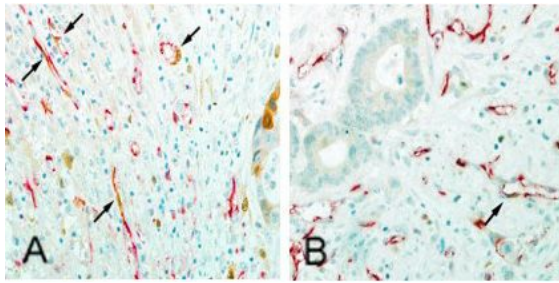


図 1. 代表的 TK1/CD31 二重 IHC 染色像 (NAC 群症例)  
(A)TK1<sup>High</sup> (OS 不良例) (B)TK1<sup>Low</sup> (生存例)  
矢印は TK1/CD31 二重陽性腫瘍血管を示す。

これらの成果は第 107 回日本病理学会総会で発表した。

(3)ネオアジュバント化学療法施行後大腸癌肝転移巣におけるアポトーシスマーカーの発現と患者予後との関連性

CC3 と CCK18 の代表的 IHC 染色像を図 2 に示す。

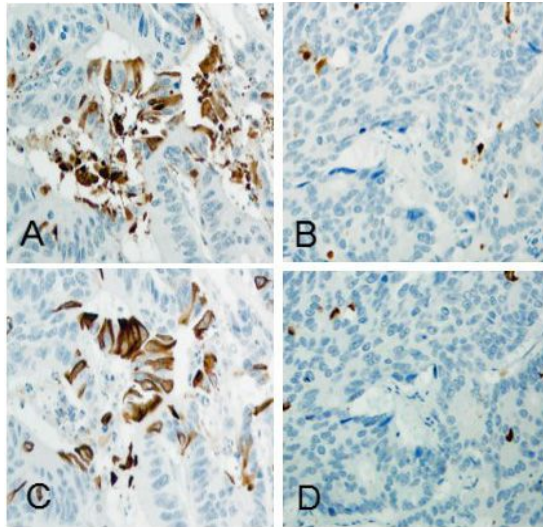


図 2 . CC3 および CCK18 の代表的 IHC 染色像 (NAC 群症例)  
(A) CC3<sup>High</sup>、(B) CC3<sup>Low</sup>、(C) CCK18<sup>High</sup>、(D) CCK18<sup>Low</sup>

NAC 群における ILN、three zonal changes、cholesterol clefts、foamy macrophages の頻度はコントロール群に比べて有意に高かった(それぞれ  $P=0.001$ 、 $P=0.02$ 、 $P=0.001$ 、 $P=0.03$ )。しかし、NAC 群とコントロール群の間で CC3 および CCK18 発現レベルに有意な差はみられなかった。

NAC 群では臨床病理学的因子および組織学的所見のうち、OS に有意な差がみられたのは cholesterol cleft のみであった ( $P=0.03$ )。一方、CC3<sup>High</sup> 群の OS は CC3<sup>Low</sup> 群に比べて有意に短縮していた ( $P=0.04$ )。同様に、CCK18<sup>High</sup> 群の OS は CCK18<sup>Low</sup> 群に比べて有意に短かった ( $P<0.001$ )。しかし、コントロール群では OS との有意な関連性を示す因子はまったく認められなかった。さらに、多変量解析を実施した結果、CC3 (ハザード比: 4.0、95% 信頼区間: 1.3-12.6、 $P=0.02$ ) および CCK18 (ハザード比: 7.3、95% 信頼区間: 2.3-23.7、 $P=0.001$ ) は OS 不良の独立予測因子であることが示された。これらの結果から、大腸癌の NAC 後肝転移巣において、アポトーシスを示す腫瘍細胞の存在が予後不良と関連することが示唆された。

化学療法施行症例にみられるアポトーシスマーカーの発現には、1) 癌の増殖能に伴った自発的な内在性アポトーシス、2) 化学療法により誘導される治療効果を反映したアポトーシス、といった 2 つの側面がある。本研究において、NAC 群とコントロール (非 NAC) 群の間に CC3 および CCK18 発現に有意な差がみられなかったことから、CC3 および CCK18 の発現は、治療効果を反映したアポトーシスを表すものではないことが推測される。すなわち、薬剤によりアポトーシスが誘導されるのは、投与終了後から 2 週間程度までとされているため、手術切除の時点で治療誘導性アポトーシス細胞はすでに消失していると考えられる。

放射線や化学療法といった重度のストレスに曝されたアポトーシス腫瘍細胞が、少数の癌幹細胞からの腫瘍再増殖を刺激する「Phoenix Rising 経路」が提唱されている。CC3 と CCK18 の高発現と OS 不良との有意な相関が NAC 群にのみ認められた原因として、NAC による治療誘導性アポトーシス細胞が消失した後に残存したアポトーシス腫瘍細胞が、腫瘍の増殖促進に関与した可能性が推察される。

以上の成果は第 107 回日本病理学会総会で発表した。

CC3 陽性血管に関する解析結果として、NAC 群では、CC3-V<sup>High</sup> を示す症例の OS は、CC3-V<sup>Low</sup> 症例に比べて有意に短縮していた ( $P=0.002$ )。しかし、コントロール群においては、CC3 陽性血管率と OS との間に有意な関連性は認められなかった。多変量解析によって、NAC 群における CC3-V は、OS 不良の独立予測因子であることが証明された (ハザード比: 0.16、95% 信頼区間: 0.37-0.70、 $P=0.01$ )。以上の結果から、NAC 後大腸癌肝転移組織における CC3-V<sup>High</sup> は、予後不良因子である可能性が示唆された。この成果は第 108 回日本病理学会総会で発表した。

(4) 以上の研究成果を要約すると、TK1/CD31 二重 IHC 染色は腫瘍血管と既存血管の鑑別に

有用である、NACによって血管新生が抑制された大腸癌肝転移症例は有意に予後良好を示す、NAC後の大腸癌肝転移組織における腫瘍細胞がCC3ないしCCK18高発現を示す症例やCC3陽性血管率が高い症例は有意に予後不良であることが明らかになった。これらの結果は、NAC後に残存している腫瘍血管の状態や腫瘍細胞のアポトーシスを解析することにより、大腸癌肝転移患者の予後をある程度予測できる可能性を示している。しかし、本研究には症例数が十分でない、NACレジメンが統一されていない、肝転移切除後治療との関連が検討されていないといった欠点がある。したがって、本研究結果を確認するために、上記問題点を払拭した大規模試験が必要である。

最後に、日本学術振興会学術研究助成基金助成金のご援助に厚くお礼を申し上げたい。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計1件)

Shunsuke Okamura, Tatsushi Osaki, Kanae Nishimura, Hiroyuki Ohsaki, Michiko Shintani, Hiroshi Matsuoka, Kotaro Maeda, Kazuya Shiogama, Tomoo Itoh, Shingo Kamoshida, Thymidine kinase-1/CD31 double immunostaining for identifying activated tumor vessels, *Biotechnic & Histochemistry*, 査読有, Vol. 94, No. 1, 2019, pp. 60-64  
DOI:10.1080/10520295.2018.1499962

[学会発表](計4件)

高畠三景、大崎博之、松岡宏、前田耕太郎、塩竈和也、鴨志田伸吾、大腸癌肝転移巣におけるcleaved caspase-3(CC3)陽性血管：患者予後との関連、第108回日本病理学会総会、2019

尾崎達司、大崎博之、松岡宏、前田耕太郎、塩竈和也、鴨志田伸吾、腫瘍新生血管同定のためのthymidine kinase 1/CD31二重免疫染色、第106回日本病理学会総会、2017  
岡村俊佑、西村奏絵、大崎博之、松岡宏、前田耕太郎、塩竈和也、鴨志田伸吾、大腸癌肝転移巣におけるthymidine kinase 1(TK1)陽性血管と予後との関連性、第107回日本病理学会総会、2018

西村奏絵、岡村俊佑、松岡宏、前田耕太郎、塩竈和也、鴨志田伸吾、化学療法後の大腸癌肝転移巣におけるアポトーシス・マーカーの発現～予後予測としての可能性～、第107回日本病理学会総会、2018

## 6. 研究組織

### (1) 研究分担者

研究分担者氏名：新谷(田中) 路子  
ローマ字氏名：(SHINTANI [TANAKA], Michiko)  
所属研究機関名：神戸常盤大学  
部局名：保健科学部  
職名：准教授  
研究者番号：40207147

### (2) 研究協力者(五十音順)

研究協力者氏名：伊藤 智雄  
ローマ字氏名：(ITO, Tomoo)  
研究協力者氏名：大崎 博之  
ローマ字氏名：(OHSAKI, Hiroyuki)  
研究協力者氏名：岡村 俊佑  
ローマ字氏名：(OKAMURA, Shunsuke)  
研究協力者氏名：尾崎 達司  
ローマ字氏名：(OSAKI, Tatsushi)  
連携研究者氏名：塩竈 和也  
ローマ字氏名：(SHIOGAMA, Kazuya)  
研究協力者氏名：西村 奏絵  
ローマ字氏名：(NISHIMURA, Kanae)  
研究協力者氏名：前田 耕太郎  
ローマ字氏名：(MAEDA, Kotaro)  
連携研究者氏名：松岡 宏  
ローマ字氏名：(MATSUOKA, Hiroshi)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。