

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：15401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08385

研究課題名(和文)大腸T1癌術前転移予測とゲノムマーカーによる新たな内視鏡的根治判定基準の開発

研究課題名(英文) Novel curative condition after endoscopic resection for colorectal T1 carcinoma using genome biomarker

研究代表者

岡 志郎 (Oka, Shiro)

広島大学・医系科学研究科(医)・教授

研究者番号：30403538

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸T1癌に対する完全切除のための新たな術前診断能の確立を目的として、腫瘍先進部から固有筋層までの距離を指標とするtumor free margin (TFM) の概念を導入し、新たなEUS分類を提唱した。また、ゲノムバイオマーカーによる新たな内視鏡的治療根治判定基準を策定することを目的に大腸腫瘍のクローン進化を検討した。Tis癌の発生は WNT/TGF $\beta$ 、p53、RTK/RAS/MAPK経路で発生し、最も頻度が高いのはWNT/TGF $\beta$ 経路であることを明らかにし、PIK経路はT1以深癌の発生に関与する発癌経路である可能性を明らかにした。今後、転移との関連を検討する予定である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

内視鏡技術の進歩により、大腸粘膜下層浸潤(T1)癌の内視鏡的完全切除が可能となったが、大腸T1癌は約10%のリンパ節転移リスクがあり、内視鏡的切除後の追加外科手術の決定にはより正確なリンパ節転移予測が必須である。大腸T1癌関連遺伝子の網羅的解析を行うことによって、癌の浸潤や転移に関するドライバー変異を同定し、大腸T1癌の内視鏡的切除病変の取り扱いの基準となる転移リスクの層別化モデルを構築することである。本研究の成果により、浸潤・転移リスクの極めて低い大腸T1癌を明らかとし、不要なover-surgery症例をなくすことで、患者の生活の質の向上と医療費削減に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：The risk of local recurrence might be low in T1 colorectal carcinoma with a tumor vertical margin  $>500\ \mu\text{m}$  by endoscopic resection. The distance from the tumor invasive front to the muscle layer on EUS was defined as the tumor-free distance (EUS-TFD) and classified as Type I (EUS-TFD  $>1\ \text{mm}$ ) and II ( $<1\ \text{mm}$ ). EUS-TFD classification is a novel diagnostic indicator to predict VM  $>500\ \mu\text{m}$  in ESD preoperatively. In addition, I examined the clonal progression of colorectal tumors for the purpose of establishing new endoscopic treatment curative criteria using the genome biomarker. The outbreak of Tis cancer occurred by WNT/TGF $\beta$ , p53, RTK/RAS/MAPK course and clarified that it was WNT/TGF $\beta$  course that was the most frequent and clarified the possibility that PIK course was the carcinogenesis pathway that participated in the T1 carcinoma.

研究分野：大腸癌の発育進展

キーワード：大腸T1癌 リンパ節転移 内視鏡切除 超音波内視鏡 ゲノムバイオマーカー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

大腸 T1 癌には約 10%にリンパ節 (LN) 転移が存在する。このような症例を内視鏡治療後に経過観察した場合には再発をきたすが、LN 再発の初期診断は難しく発見時には既に遠隔転移を伴っていることも多い。最近の全国集計では、内視鏡治療後に経過観察し再発をきたした場合、約 6 割は救命できないと報告されている。内視鏡治療後に外科手術を行うか経過観察するかどうかは切除標本の HE 標本による病理学的評価に基づいて決定されるが、本基準による治療方針の決定は必ずしも最適なものではない。実際、転移高リスク症例の効果的な絞り込み方法は十分とはいえず、新しいリスク因子の開発や精度の高いリスクの階層化が焦点の課題である。このようなリンパ節転移の危険性のある病変に対して内視鏡治療を行うためには、より正確な術前診断法の確率と治療手技の標準化、LN 転移リスクをより正確に予測することが重要である。我々はこれまで、大腸 T1 癌において LN 転移と様々な臨床病理学的組織所見 (浸潤部組織型、簇出、粘膜筋板の状態など) や浸潤部の免疫染色による分子病理マーカーとの関連を報告している。しかしながら、従来の病理学的所見あるいは分子病理マーカーのみでは LN 転移リスクを完全に予測することは困難であり、従来の LN 転移の病理組織学的予測因子に加えて、転移・浸潤に特異的なゲノムバイオマーカーの同定が本領域におけるブレイクスルーとなる可能性が期待される。

## 2. 研究の目的

大腸 T1 癌に対する完全切除のための新たな術前診断能の確立と既存の概念とは全く異なったゲノムバイオマーカーによる新たな内視鏡的治療根治判定基準を策定し over-surgery 例を減少させることを目標とする。また、次世代シーケンサーを用いて治療のバイオマーカーを同定し臨床応用することは、今後の医療の主流の一つとなりつつある。本研究の特徴は、まず早期の段階である大腸 T1 癌を用いることによって、腫瘍の heterogeneity の影響を小さくできること。次にこれまで報告されている LN 転移の病理組織学的予測因子と本研究で同定されたゲノムバイオマーカーを組み合わせることによって臨床応用可能な大腸 T1 癌転移のリスク層別化モデルを構築することである。

## 3. 研究の方法

大腸 T1 癌に対して内視鏡的粘膜下層剥離術 (ESD) を施行した症例の術前超音波内視鏡検査 (EUS) の所見を解析することで ESD 完全一括切除を予測する新たな診断基準の策定を行う。

また、大腸 T1 癌の FFPE 切片からレーザーマイクロダイセクションを用いて、癌部 (癌表層部と浸潤部) より組織を切り出し、市販の DNA 抽出キットにて gDNA を抽出する。癌部は LMD の際に強拡大で観察し、できる限り間質成分を除去し、癌の部分のみを抽出する。gDNA の抽出量が解析の必要量に足りない場合は全ゲノム増幅をや DNA 修復キットを用いて収量を増やす。血液中のリンパ球からも同様の手法で gDNA を抽出する。また、出された gDNA を超音波 DNA 断片化装置にて至適サイズに断片化後、市販のライブラリー調整キットを用いて大腸癌関連遺伝子の

エクソン領域を抽出しハイスループットの次世代シーケンサーを用いてシーケンスを行う。ヒトリファレンス配列へのマッピング、癌部でのゲノム変異をリンパ球と比較することによって、癌ゲノムのみの特異的起きている Somatic mutation を検出する。検出された変異から公開されている dbSNP や HAPMAP, 1000genome, HGVD, iJGVD に登録されている多型や germ line の変異を除外する。また、間質由来の変異も除外することによって癌特異的な変異を同定する。また、Sanger 型シーケンサーで結果が妥当であるかどうか検証する。

#### 4. 研究成果

EUS 所見と病理学的所見の 1 対 1 対応が可能であった大腸 pT1b 癌 75 例を対象に、EUS にて深達度 M/SM-s(第 3 層で 1mm 未満の浸潤)と診断した 28 例(EUS-A 群)と、SM-d(第 3 層で 1mm 以上の浸潤)と診断した 47 例(EUS-B 群)に分類した。さらに B 群は、腫瘍先進部から固有筋層までの距離が 1mm 以上の 15 例(EUS-B1 群)と、1mm 未満の 32 例(EUS-B2 群)に分類した。VM1 は 9 例(12%)で、各群別の VM1 率は、EUS-A 群 7%(2/28)、EUS-B 群 15%(7/47)であった。また、EUS-B 群における VM1 率は、EUS-B1 群 0%(0/15)、EUS-B2 群 22%(7/32)であり、EUS-B2 群は EUS-A/B1 群と比較し VM1 の割合が有意に高かった大腸 T1b 癌に対する内視鏡切除生検目的の ESD 術前 EUS は、VM0 切除可能か否かの術前評価に有用なモダリティと考えられた。ただし、SM 高度線維化や浸潤先進部組織型が未分化型、表面型の EUS-B2 群は VM1 のリスクであり注意を要することが明らかとなった。

また、側方発育型大腸腫瘍(結節混在型) 21 病変 [tubular adenoma (TA) 4 例, Tis 癌 13 例, T1b 癌 3 例, T2 癌 1 例]について全症例の結節と辺縁より計 73 個の組織を全エキソン解析し、公共データベースを用いて病的変異を同定した。同一症例で結節部と辺縁部の遺伝子変異を対比し、腫瘍のクローン進化を検討した。遺伝子変異量(TMB)は  $2.79 \pm 1.51/\text{Mb}$  で、10 を超える TMB-H は認めなかった。遺伝子変異数と病理所見を比較すると、全変異数では有意な差を認めなかったが、ドライバー変異数が TA, Tis 癌, T1 癌の順で有意に多かった。各症例の検討では、結節、辺縁に共通する変異を全症例で認め、共通する変異は、APC を 20 例(95%)で、9 例(43%)は 2nd hit も認めた。APC の変異を認めなかった 1 例に BRAF の変異を認めた。KRAS の変異は 16 例(76%)に認めた。TA 4 例の結節では、クローン進化を認めなかったが、結節部が Tis 癌の 13 例は、p53 経路の変異を 2 例(TP53 1 例, ATM 1 例)、WNT/TGF $\beta$  経路の変異を 6 例(FBXW7 3 例, SMAD4 2 例, ARID1A 1 例)、RTK/RAS/MAPK 経路の変異を 4 例(KRAS 1 例, NRAS 1 例, APC 1 例, EGFR 1 例)に認めた。上記以外の経路の変異は MTOR 1 例であった。3 例の結節部にクローン進化を認めなかった。T1 以深癌 4 例の結節部は、PIK 経路の変異を 3 例(PIK3CA 2 例, AKT1 1 例)、RTK/RAS/MAPK 経路の変異を 1 例(ERBB4 1 例)に認めた。また PIK 経路の変異は T1 以深癌以外で認めなかった。以上より Tis 癌の発生は WNT/TGF $\beta$ , p53, RTK/RAS/MAPK 経路で発生し、最も頻度が高いのは WNT/TGF $\beta$  経路であった。一方で PIK 経路は T1 以深癌の発生に關与する発癌経路である可能性が考えられた。現在、本結果をベースに PIK 経路から大腸 T1 癌の LN 転移のバイオマーカーに関する解析を進めている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nishimura T, Oka S, Kamigaichi Y, Tamari H, Shimohara Y, Okamoto Y, Inagaki K, Tanaka H, Yamashita K, Yuge R, Urabe Y, Arihiro K, Shimamoto F, Tanaka S.	4. 巻 -
2. 論文標題 Vertical tumor margin of endoscopic resection for T1 colorectal carcinoma affects the prognosis of patients undergoing additional surgery	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-021-08977-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Inagaki K, Kunisho S, Takigawa H, Yuge R, Oka S, Tanaka S, Shimamoto F, Chayama K, Kitadai Y.	4. 巻 112
2. 論文標題 Role of tumor-associated macrophages at the invasive front in human colorectal cancer progression	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 2692-2704
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14940	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Nishimura Tomoyuki, Oka Shiro, Tanaka Shinji, Asayama Naoki, Nagata Shinji, Tamaru Yuzuru, Kuwai Toshio, Yamashita Ken, Ninomiya Yuki, Kitadai Yasuhiko, Arihiro Koji, Kuraoka Kazuya, Kaneko Mayumi, Shimamoto Fumio, Chayama Kazuaki	4. 巻 36
2. 論文標題 Clinical significance of immunohistochemical lymphovascular evaluation to determine additional surgery after endoscopic submucosal dissection for colorectal T1 carcinoma	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 949 ~ 958
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-020-03795-5	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西村朋之, 田中信治, 岡 志郎, 山下 賢, 桑井寿雄, 永田信二, 茶山一彰
2. 発表標題 大腸T1癌ESD後根治度判定における免疫染色を用いた脈管侵襲評価の有用性 - 多施設前むき研究 -
3. 学会等名 第16回 日本消化管学会総会学術集会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 西村朋之, 田中信治, 茶山一彰
2. 発表標題 大腸T1癌ESD後追加腸切除考慮群の取り扱いの現状 - 多施設前向き観察研究 -
3. 学会等名 第99回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Tomoyuki Nishimura, Shinji Tanaka, Shiro Oka, Ken Yamashita, Toshio Kuwai, Shinji Nagata, Kouji Arihiro, Fumio Shimamoto, Kazuaki Chayama
2. 発表標題 Impact of the immunohistochemical lymphovascular evaluation in judgement of curability for patients with colorectal T1 carcinoma after ESD - a multicenter prospective study
3. 学会等名 United European Gastroenterology Week 2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 卜部祐司 <sup>1</sup> , 岡 志郎 , 田中信治
2. 発表標題 側方発育型大腸腫瘍におけるクローン進化の解析
3. 学会等名 第7回Gastro plus
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	田中 信治	広島大学・病院(医)・教授	
	(Tanaka Shinji)		
	(00260670)	(15401)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	ト部 祐司  (Urabe Yuji)  (10648033)	広島大学・病院(医)・寄附講座准教授    (15401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関