

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：20101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K15827

研究課題名（和文）口腔癌発育先進部における腫瘍微小環境の解明と治療への応用

研究課題名（英文）The elucidation of tumor microenvironment in invasive front of oral cancer and its application to therapy

研究代表者

平塚 博義（Hiratsuka, Hiroyoshi）

札幌医科大学・医学部・教授

研究者番号：50165180

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,600,000円

研究成果の概要（和文）：生検および外科的切除した組織切片を一部採取し、特殊染色した癌細胞を顕微鏡で観察し浸潤様式（YK分類）、Tumor Buddingを評価した。その結果、手術前の検査で頸部リンパ節転移のない早期口腔癌患者で以下の治療戦略を推奨できることが示唆された。1）5個以上のTumor BuddingおよびYK-4C, 4Dの場合は手術後、短期間の間隔で注意深く経過観察を続け、画像診断の結果に関わらず頸部リンパ節に後発転移を認めた場合はできるだけ早く頸部郭清術を行う。2）10個以上のTumor Budding、およびYK-4Dが観察された場合は原発腫瘍切除時に予防的に頸部郭清術を行う。

研究成果の概要（英文）：91 cases of cT1,2N0M0 OSCC treated with transoral resection of the primary tumor were assessed based on 3 types of invasive tumor patterns on histopathologic and pancytokeratin-stained immunohistological sections: the mode of invasion, worst pattern of invasion (WPOI), and tumor budding. The correlations among invasive tumor patterns, regional metastasis, and disease-free survival were analyzed. Of the 91 cases, 22 had pathologically proven regional metastasis. The mode of invasion and tumor budding were associated with regional metastasis as well as lymphovascular invasion in univariate analysis. All three invasive patterns, the mode of invasion, WPOI, and tumor budding, were found to be significant predictors of 5-year disease-free survival as well as lymphovascular invasion and perineural invasion.

Our results indicate that the intensity of tumor budding may be a novel diagnostic biomarker, as well as a therapeutic tool, for regional metastasis in patients with cT1,2N0M0 OSCC.

研究分野：口腔癌

キーワード：Tumor Budding

1. 研究開始当初の背景

2012年の統計で口腔扁平上皮癌(OSCC)は10万人あたり2.7人と報告されている。治療法の進歩・発展に伴って口腔癌の治療成績も確実に向上しているが、一方で、UICC(国際対癌連合)、AJCC(アメリカ対癌連合委員会)やWHO(世界保健機構)が提唱する癌の予後因子、悪性度評価の基準は、必ずしも個々の症例に合致しなくなっている。

原発巣の外科的切除は、頸部リンパ節転移が陰性であるT1およびT2口腔扁平上皮癌(cT1,2N0 OSCC)の患者に対する治療法である。しかしながら、潜在性リンパ節転移は30%を超えており、頸部転移の評価はCT、MRI、USやPET-CTなどの画像検査を含め、血清腫瘍マーカーでも予測不能である。従ってこの高い潜在性頸部転移のリスクにもかかわらず、臨床的に頸部転移陰性である患者に予防的頸部郭清術を推奨するかどうかの問題は、長年にわたって議論されてきた。

2. 研究の目的

臨床的に頸部転移陰性のOSCCにおける局所転移を予測する分子や形態学的な予後因子に関する研究がさかに行われているが、それらのどれもがコンセンサスを得られていないのが現状である。

最近、OSCCの腫瘍浸潤発育先進部における高強度のTumor Buddingは、局所転移および予後不良を示し、OSCCの腫瘍発育先進部に位置する癌細胞は、転移能の点でより攻撃的であると長い間考えられてきた。そこでこれらの観察結果をもとに、cT1,2N0M0 OSCCにおける局所転移を予測し腫瘍浸潤先進部における腫瘍浸潤パターンを同定するための浸潤様式(YK分類)、Worst Pattern Of Invasion(WPOI)およびTumor Buddingをもとに、ヘマトキシリンおよびエオジン染色切片、サイトケラチン免疫染色切片を用いて病理組織学的所見と3つの腫瘍浸潤

パターンの関連性を検討することが必要である。

本研究では、cT1,2N0 OSCC患者のリンパ節転移および生存率の関与するリスク因子と腫瘍浸潤パターンの関連性を検討し、現在の口腔癌治療に相応した予後因子を探索し、新たな悪性度評価法を確立することを目的とする。

3. 研究の方法

患者サンプルは、2004年1月から2013年12月まで札幌医科大学病院歯科口腔外科にて原発巣切除術を施行し、検体採取の同意を得られたcT1,2N0 OSCCの患者91名を対象とした。なお検体には術前補助療法を施行した患者は含まれていない。病期分類および組織病理学的な診断は、AJCC/UICC TNM分類(第7版)に従って分類された。

Tumor Buddingは、ITBCC 2016の分類に従って、低強度(<5 budding/field)、中強度(5~<10 budding/field)および高強度(10 budding/field)に分類された。なお低強度群は、Tumor Buddingを検出できない切片を含む。これらの腫瘍浸潤パターンを、3人の観察者が同時にオリンパス顕微鏡デジタルカメラ(Olympus Co.Tokyo)のDP2-BSWソフトウェアを用いて評価した。

浸潤様式、WPOI、Tumor Budding、種々の組織学的なパラメーター、およびリンパ節転移の相関を推定するために、カイ二乗検定およびフィッシャーの正確検定を用いた。生存時間は、手術日から腫瘍再発またはsecondary primaryの悪性腫瘍の発症までとし、エンドポイントは、死亡または2016年12月と定義した。生存分析はKaplan-Meier法を用いて行い、各群の対数ランク検定を用いて比較した。すべての統計解析では、 $p < 0.05$ を統計的に有意差ありとみなした。統計分析は、SPSSバージョン23.0/Windows用ソフトウェア(IBM, Chicago, IL)を使用した。

4. 研究成果

局所転移と浸潤様式($p < 0.01$)およびTumor

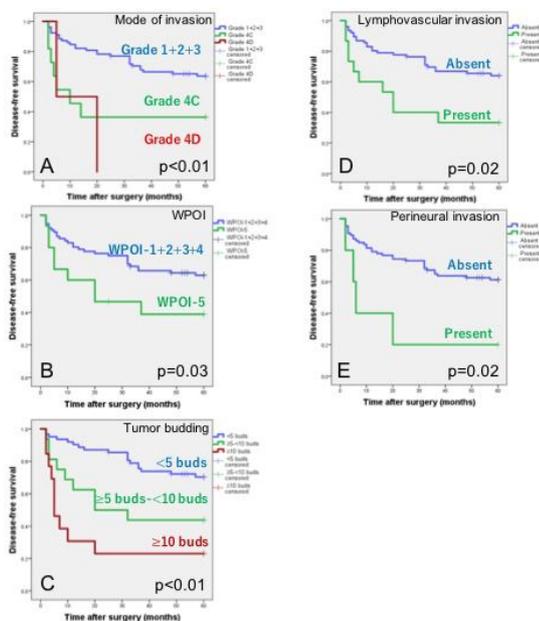
Budding の強度 ($p < 0.01$) に関して強い関連性が観察された。また、脈管浸潤も局所転移と有意に関連していた ($p = 0.04$, Table 1)。ロジスティック回帰分析では、Tumor Budding のみを局所転移の指標として同定した ($HR = 3.05, 95\% CI = 0.29-5.30, p < 0.01$, Table 2)。5年間の無病生存率は 54.2% であった。YK-1+2+3、YK-4C、および YK-4D の浸潤様式 ($p < 0.01$)、WPOI-1+2+3+4 と WPOI-5 との間 ($p = 0.03$) で 5 年無病生存期間における顕著な差異が観察された (Fig 1)。また Tumor Budding の強度も無病生存率の予後パラメータであった ($p < 0.01$)。他の組織学的パラメータに関しては、脈管侵襲および神経周囲浸潤の有無は、無病生存率に有意性を示した ($p = 0.02$, Table 3)。Cox 多変量解析のステップワイズモデルでは、cT1,2N0M0 OSCC の患者における最も有意で独立した予後マーカーとして Tumor Budding が有意性を示した ($HR = 2.18, 95\% CI = 1.49-3.20, p < 0.01$, Table 4)。

高強度の Tumor Budding の患者は予後不良であったが、浸潤様式または WPOI と組み合わせた Tumor Budding の強度に基づいてグループ分けをしたところ、5 年生存率が中強度の Tumor Budding+YK-4C の浸潤様式、高強度の Tumor Budding+YK-4D の浸潤様式、および高強度の Tumor Budding+ WPOI-5 の高強度は生存率が最も低かった (Fig 2)。これらと 3 つの腫瘍浸潤パターンの相関関係を調べたところ、浸潤様式と WPOI の関係、および浸潤様式と Tumor Budding の関係は統計的に有意な相関を示したが、WPOI と Tumor Budding の関係はなかった ($p < 0.01, p < 0.01$ および $p = 0.14$, Table 5)。以上の結果より、局所転移を伴う cT1,2N0M0 OSCC 患者において 5 つ以上の Tumor Budding および YK-4C または 4D の浸潤様式との関連性が観察され、高強度の Tumor Budding が多変量解析における局所転移と有意な相関を示した。

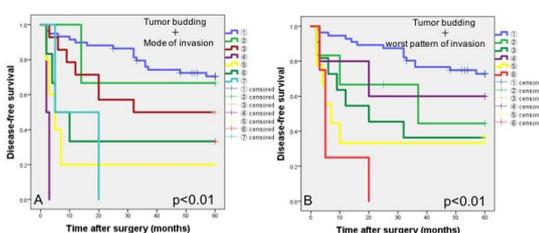
本研究結果を踏まえて、cT1,2N0 OSCC 患者の局所転移を同定するため、以下の治療戦略を

推奨できた。すなわち、(1) Tumor Budding を pancytokeratin 免疫染色された生検および外科的に切除された組織切片における浸潤の様式を評価する。(2) 5 つ以上の Tumor budding および YK-4C、4D で高強度の Tumor Budding を伴う場合は、一次手術の後は短い間隔で注意深く経過観察を続け、画像診断の結果にかかわらず後発転移の症状がある場合は、できるだけ早く頸部郭清を行う。さらに(3) 10 個以上の Tumor budding、および YK-4D の浸潤様式が観察された場合は、予防的頸部郭清術を実施することが重要である。

(Figure 1)



(Figure 2)



(Table 1)

Variables	No. of Patients	Regional lymph node metastasis		p-value
		No	Yes	
Sex				0.61
Men	53	42	11	
Women	38	28	10	
Age				0.04
<68 years	49	42	7	
≥68 years	42	28	14	
Tumor site				0.78
Tongue/Floor of mouth	66	50	16	
Others	25	20	5	
Clinical tumor classification				1.00
cT1	38	29	9	
cT2	53	41	12	
Surgical margin status				0.71
Negative (clear and close margins)	80	62	18	
Positive (involved margins)	11	8	3	
Depth of invasion				0.77
<4mm	68	53	15	
≥4mm	23	17	6	
Lymphovascular invasion				0.10
Absence	76	61	15	
Presence	15	9	6	
Perineural invasion				0.32
Absence	86	67	19	
Presence	5	3	2	
Histologic grade				0.13
Well differentiated	45	37	8	
Moderately differentiated	43	32	11	
Poorly differentiated	3	1	2	
Mode of invasion				<0.01
Grade 1+2+3	78	67	14	
Grade 4C	11	6	5	
Grade 4D	2	0	2	
Worst pattern of invasion (WPOI)				0.1
WPOI-1,2,3,4	76	61	15	
WPOI-5	15	9	6	
Tumor budding				<0.01
Low intensity (<5 buds)	62	55	7	
Intermediate intensity (≥5 buds-<10 buds)	16	10	6	
High intensity (≥10 buds)	13	5	8	

(Table 2)

Variable	HR	95% CI	p-value
Age (<68 years vs. ≥68 years)	2.23	0.72-6.93	0.16
Mode of invasion (grade 1+2+3 vs. grade 4C vs. grade 4D)	1.74	0.44-6.80	0.42
Tumor budding (<5 buds vs. ≥5 buds-<10 buds vs. ≥10 buds)	2.89	1.32-6.29	<0.01

Abbreviations: HR, hazard ratio; CI, confidence interval.

(Table 3)

Variables	No. of Patients	Five-year disease free survival		
		No. of events	Survival (%)	Log-rank test
Total	91		54.2	-
Sex				0.22
Men	53	19	64	
Women	38	18	52	
Age				0.02
<68 years	49	49	69.3	
≥68 years	42	42	47.1	
Tumor site				0.36
Tongue/Floor of mouth	66	25	62	
Others	25	12	50.2	
Clinical tumor classification				0.15
cT1	38	12	67.8	
cT2	53	25	52.8	
Surgical margin status				0.05
Negative (clear and close margins)	80	29	63.6	
Positive (involved margins)	11	8	21.2	
Depth of invasion				0.53
<4mm	68	29	56.7	
≥4mm	23	8	65.2	
Lymphovascular invasion				<0.01
Absence	76	27	64	
Presence	15	10	33.3	
Perineural invasion				0.01
Absence	86	33	61.2	
Presence	5	4	20	
Histologic grade				0.24
Well differentiated	45	17	61.1	
Moderately differentiated	43	18	58.1	
Poorly differentiated	3	2	33.3	
Mode of invasion				<0.01
Grade 1+2+3	78	28	63.6	
Grade 4C	11	7	36.4	
Grade 4D	2	2	0	
Worst pattern of invasion (WPOI)				0.04
WPOI-1,2,3,4	76	28	62.9	
WPOI-5	15	9	38.9	
Tumor budding				<0.01
Low intensity (<5 buds)	62	18	70.3	
Intermediate intensity (≥5 buds-<10 buds)	16	9	43.8	
High intensity (≥10 buds)	13	10	23.1	

(Table 4)

Variables	Hazard ratio	p-value	95% CI
Before stepwise selection			
Tumor budding	1.95	0.01	1.12-3.40
WPOI	1.47	0.36	0.63-3.40
Mode of invasion	0.99	0.98	0.47-2.08
Perineural invasion	1.32	0.64	0.40-4.32
Lymphovascular invasion	1.16	0.74	0.48-2.78
Age	1.81	0.08	0.91-3.59
After stepwise selection			
Tumor budding	2.18	<0.01	1.49-3.20
Age	1.84	0.07	0.94-3.61

(Table 5)

	Mode of invasion					p-value	Worst pattern of invasion (WPOI)					p-value
	Grade 1 (11/25)	Grade 2 (12/25)	Grade 3 (4/25)	Grade 4C (1/25)	Grade 4D (1/25)		WPOI-1 (4/25)	WPOI-2 (12/25)	WPOI-3 (1/25)	WPOI-4 (1/25)	WPOI-5 (1/25)	
WPOI-1	2	2	0	0	0							
WPOI-2	4	2	4	0	0							
WPOI-3	3	2	0	1	0	p=0.81						
WPOI-4	1	0	0	0	0							
WPOI-5	0	0	0	0	2							
Tumor budding (<5 buds (64.3%))	10	40	20	3	0		4	6	16	50	6	
Tumor budding (≥5 buds-<10 buds (17.8%))	0	1	13	2	0	p<0.01	0	0	3	6	6	p<0.04
Tumor budding (≥10 buds (14.9%))	0	0	0	0	2		0	0	1	0	4	

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文) (計2件)

1) Shimizu S, Miyazaki A, Nakamori K, Nakai H, Ogi K, Hasegawa T, Hiratsuka H.

Immunophenotypic analysis of tumor infiltrating lymphocytes in Epstein - Barr virus – negative lymphoepithelial carcinoma of the oral cavity: Report of a case.

Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology, 2017, 29, 581-586 (査読有)

2) Shimizu S, Miyazaki A, Sonoda T, Koike K, Ogi K, Kobayashi J, Kaneko T, Igarashi T, Ueda M, Dehari H, Miyakawa A, Hasegawa T, Hiratsuka H. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: with special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. PLOS ONE, 2018; 13: e0195451 (査読有)

(学会発表) (計1件)

1) 清水翔太, 宮崎晃亘, 小林淳一, 中井裕美, 岡本準也, 平塚博義: EBV 陰性リンパ上皮癌における腫瘍浸潤リンパ球の免疫組織学的解析. 第41回日本頭頸部癌学会, 京都, 2017

(図書) (計0件)

(産業財産権)

出願状況 (計0件)

取得状況 (計0件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

平塚 博義(HIRATSUKA HIROYOSHI)
札幌医科大学・医学部・教授
研究者番号: 50165180

(2) 研究分担者

宮崎 晃亘(MIYAZAKI AKIHIRO)
札幌医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 10305237

荻 和弘(OGI KAZUHIRO)
札幌医科大学・医学部・講師
研究者番号: 40433114

上田 愛(UEDA MEGUMI)
札幌医科大学・医学部・診療医
研究者番号: 80568105

小林 淳一(KOBAYASHI JUNICHI)
札幌医科大学・医学部・助教
研究者番号: 80404739

(3) 連携研究者

なし