

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 30 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25461958

研究課題名(和文) 特殊光観察を応用した新規腹腔鏡下大腸癌手術法の開発

研究課題名(英文) New diagnostic strategy during laparoscopic surgery for patients with colorectal cancer

研究代表者

堀田 司 (HOTTA, TSUKASA)

和歌山県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：50244744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：特殊光観察NBI (Narrow band imaging)を応用した新規腹腔鏡下大腸癌手術法の開発に取り組んだ。進行大腸癌40例を対象に、NBI腹腔鏡装置を用いて腹腔鏡手術を行ない、癌の壁深達度・腹膜播種・肝転移・リンパ節転移・正常臓器の観察の描出から腫瘍漿膜面の血管密度と線維化の独自の分類を見出した(血管新生と線維化の程度：grade 0, 1, 2)。抗癌剤や放射線感受性遺伝子の発現の関与は明らかではなかったが、原発巣漿膜浸潤の診断や腹膜播種、肝転移の診断に関して、腹腔鏡下NBI観察による血管新生・線維化grade 2の判定が、他の診断modalityよりも優れていることを証明した。

研究成果の概要(英文)： We tried to demonstrate new diagnostic strategy during laparoscopic surgery for patients with colorectal cancer. We defined angiogenesis and fibrosis grades using NBI laparoscopy for 40 patients with colorectal cancer. In NBI laparoscopy, angiogenesis and fibrosis grades were correlated with serosa surface invasion, metastatic peritoneal nodules, and metastatic liver nodules.

It was not clear of the effect of chemo-radiation sensitizing gene expression. Intra-operative diagnosis by NBI laparoscopy was superior to other modalities including common laparoscopic observation, preoperative computed tomography, preoperative barium enema, and preoperative colonoscopy.

研究分野：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：大腸癌 腹腔鏡手術

1. 研究開始当初の背景

NBI (Narrow band imaging)は画像強調観察の一つである。1999年マルチスペクトルカメラと大光量証明装置を使った研究により、415nmの狭帯域光を使うことで白色光下では観察困難であった微細血管像のコントラストを向上できることがわかり(Gono K et al. J Biomed Opt 9: 568-577, 2004)、現在ではNBI内視鏡は国内外の消化器内視鏡分野における癌の質的診断においてなくてはならない存在となっており日常臨床に使用されている。しかしながら腹腔鏡分野においては観察の意義については未解明の分野である。産婦人科領域では腹腔鏡NBIの意義について研究が進みつつあるが、内膜症などの良性疾患や少数例の悪性疾患の報告にすぎない。子宮内膜症に対してNBI腹腔鏡でのみ観察できる血管新生変化を指摘し早期の子宮内膜症病変を診断できる可能性を示唆した(Kuroda K et al. J Minim Invas Gyn 16: 618-621, 2009)。また、良悪性境界型卵巣腫瘍や再発子宮頸癌に対する腹膜播種の有無をNBIを用いて観察し有効性を示唆している (Fanfani F et al. J Minim Invas Gyn 17: 146-147, 2010, Fanfani F et al. J Minim Invas Gyn 18: 146-147, 2011, Iori K et al. Int J Oncol 40: 350-356, 2012)。いっぽう消化器外科領域においては腹膜播種の診断に関する数編の国内の学会発表を認めるのみであり、詳細な研究報告は見当たらない。また正常消化器臓器に対する腹腔鏡によるNBI観察画像の教科書すら存在しない。

近年大腸癌に対する手術療法は国際的にも腹腔鏡下切除が中心となり、高度進行癌に対しても適応が拡大されてきた。そのため術中に癌の進展状況を適確に把握する必要があるとともに、手術を安全に遂行するための工夫が必要である。本研究では腹腔鏡下大腸切除にNBI観察を行うことにより術中の癌進展状況を適確に把握する方法を

開発し手術を安全に施行するためのNBI Navigation surgeryを構築することを目的とする。

結腸直腸癌患者の腫瘍浸潤辺縁に表れる病理学的現象の報告において、腫瘍浸潤辺縁に起こりうる変化として fibrosis (desmoplasia), eosinophilia, abscesses, inflammation, lymphocytic cuffs を挙げ、とりわけ fibrosis がもっとも強い予後因子であると結論されている(Halborsen TB et al. J Clin Pathol 1989;42:162-166)。進行直腸癌に病理学的検討を行い、漿膜面からの癌の露出の程度を Local peritoneum involvement (LPI)と定義し、その予後との相関を検討し、癌の漿膜露出の際の特徴として血管拡張を挙げている (Shepard et al. J Clin Pathol 1995;48:849-855)。Stage 結腸癌患者や5年以内に死亡もしくは再発した結腸癌術後患者に対してLPI、組織型、脈管浸潤、神経浸潤に対して予後との相関を検討し、LPIと脈管侵襲が Stage 結腸癌の高危険因子であることを提唱されている (Lenon et al. Am J Clin Pathol 2003;119:108-113, Stewart CJR et al. Histopathology 2007;51:372-378)。以上から癌の漿膜面変化として fibrosis と血管拡張変化が予後に関する危険因子として重要であると考えられている。これに対しNBI観察を癌の漿膜面変化の分析に応用し、Peritoneal involvementに伴う病理学的変化(病的血管変性、炎症性の膠原繊維増殖など)を術中から認識し癌の悪性度を判断する方法を開発する必要がある。

大腸癌手術患者の検討で、開腹直後の腹腔洗浄細胞診よりも手術終了時における腹腔洗浄細胞診陽性が局所再発に関連しとくに漿膜浸潤大腸癌では重要であることが報告されており、愛護的な術中操作の必要性が述べられている(Hase K et al. Dis Colon Rectum 41: 1134-1140, 1998)。進行胃癌において、根治手術のみ・根治手術に抗癌剤腹

腔内投与併用・根治手術に 10 リットル生理食塩水による十分な洗浄による遊離癌細胞除去後に抗癌剤腹腔内投与を併用した 3 群を比較した結果、生理食塩水で十分な洗浄を行なった群が有意に生命予後が改善し腹膜再発も減少したことが報告されている (Kuramoto M et al. *Ann Surg* 250: 242-246, 2009)。大腸癌細胞を使用した In vitro 研究においても、腹腔内浄の重要性を示唆させて報告がある (Huguet EL et al. *Dis Colon Rectum* 47: 2114-2119, 2004)。また、大腸癌における術中洗浄細胞診陽性は予後不良因子であることが報告されている (Temesi R et al. *World J Surg* 2012 July 18 Epub ahead of print PMID 22806209, Kobayashi H et al. *Int J Clin Oncol* 2012 Feb 28 Epub ahead of print PMID 22370903, Nishikawa T et al. *Dis Colon Rectum* 52: 2016-2021, 2009)。また、腹膜播種がないが術中洗浄細胞診陽性大腸癌に術中抗癌剤腹腔内投与することにより腹膜再発や予後を改善することができることが報告された (Noura S et al. *Ann Surg Oncol* 18: 396-404, 2011)。以上から、進行大腸癌において大腸癌細胞の腹腔内遊離は再発を促進し予後を悪くすると考えられ、より愛護的な操作による大腸癌細胞の腹腔内遊離阻止と腹腔内洗浄の徹底さらには手術中の抗癌剤腹腔内投与による局所再発の低下を試みる必要がある。また化学療法に関しては、癌に対してより高い抗腫瘍効果が期待でき、ホストにとってより副作用が少ない薬剤を選択することが重要である。化学療法の効果予測としては、感受性試験や薬剤代謝酵素とそれを規制する遺伝子の発現からアプローチする方法が検討されており (Ichikawa W et al. *Br J Cancer* 89: 1486-1492, 2003)、我々も、これまで、消化器癌に対する化学療法の効果予測を証明してきた (Yamaue H et al. *Br J Cancer* 66: 794-799, 1992, Yamaue H et al. *Dis Colon Rectum* 39: 416-422, 1996,

Hotta T et al. *Oncol Rep* 16: 177-182, 2006, Iwahashi M et al. *Anticancer Res* 25: 3453-3460, 2005)。現在、大腸癌化学療法のキードラッグは 5-FU であり、その効果を規定する 5-FU 代謝関連遺伝子 [Thymidylate synthase (TS) ・ Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) ・ Orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) ・ Thymidine phosphorylase (TP)] が判明している。また直腸癌の放射線療法の効果として Apoptosis 誘導が考えられており (Fu CG et al. *Dis Colon Rectum* 41: 68-74, 1998, Komuro Y et al. *Cancer* 95: 1199-1205, 2002, Watanabe T et al. *Cancer Res* 66: 3370-3374, 2006)、apoptosis 関連遺伝子として Bax、Bcl-2、Bcl-xL が関与していることが報告されている (Violette S et al. *Int J Cancer* 98: 498-504, 2002)。以上から、腹腔鏡下大腸癌手術に NBI 搭載腹腔鏡装置を用いて腹腔内観察を行ない、癌の壁深達度・腹膜播種・肝転移・リンパ節転移の観察とともに正常臓器の観察も行ない特徴的画像所見を記録する。分子生物学的手法により摘出標本の抗癌剤感受性遺伝子 (DPD, TS, TP, OPRT) や放射線感受性遺伝子 (Bcl-2, Bcl-XL, Bax,) の発現を解析する。NBI データと癌治療に対する特異性因子と臨床的效果 (腫瘍縮小効果・副作用・合併症) の連性を検討し確実な予測診断を確立する。以上の結果に基づいた前向き治療による予後の改善を証明する。

NBI Navigation surgery の構築は世界初の試みである。これにより手術中所見から大腸癌細胞の腹腔内遊離阻止のための愛護的な操作や徹底的な腹腔内洗浄の必要性の判断や手術中の抗癌剤腹腔内投与の必要性が判定されるようになり、生命予後が改善されることが考えられる。また、とくに重篤な合併疾患を有する患者に対しては、進行度を超えた過度なリンパ節郭清の防止や不必要

な多臓器合併切除の回避や効果のない手術中抗癌剤投与の防止など至適な手術方法が可能となる。さらに本研究成果は大腸癌以外の消化器癌や他領域疾患たとえば婦人科悪性腫瘍などの治療にも応用でき意義は非常に大きいと考える。

2. 研究の目的

腹腔鏡下大腸切除にNBI観察を応用することにより、これまでなかった術中の癌進展状況を適確に把握し治療法を決定する新しい方法を開発するために、

1. 腹腔鏡下大腸癌手術に NBI 搭載腹腔鏡装置を用いて腹腔内観察を行ない、癌の壁深達度・腹膜播種・肝転移・リンパ節転移の観察とともに正常臓器の観察も行ない特徴的画像所見を記録する。

2. 分子生物学的手法により摘出標本の抗癌剤感受性遺伝子 (DPD, TS, TP, OPRT) や放射線感受性遺伝子 (Bcl-2, Bcl-XL, Bax,) の発現を解析する

3. NBI データと癌治療に対する特異性因子と臨床的効果 (腫瘍縮小効果・副作用・合併症) の連性を検討し確実な予測診断を確立する

4. 以上の結果に基づいた前向き治療による予後の改善を証明する

腹腔鏡下大腸癌手術症例に対して、術前に注腸検査・CT・MRI・CF・PET検査・腫瘍マーカーを含めた血液検査を施行し術前評価を行なう。手術中に通常腹腔鏡画像とNBI画像による検索を行なう。正常臓器観察・深達度診断・腹膜播種診断・リンパ節転移診断・肝転移診断を行ない特徴的所見を詳細に画像システムに記録する。癌治療に対する特異性として抗癌剤の感受性遺伝子・放射線感受性遺伝子の発現について検討する。手術による切除標本や生検材料から腫瘍組織および正常粘膜を採取し、total RNAを抽出する。逆転写反応を行いcDNAを作製し、real-time RT-PCRを施行して5-FU

代謝関連遺伝子[Thymidylate synthase (TS)・Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)・Orotate phosphoribosyl transferase (OPRT)・Thymidine phosphorylase (TP)]や放射線感受性遺伝子としてのapoptosis関連遺伝子 (Bax、Bcl-2、Bcl-xL) の発現を定量し、その後の治療効果を観察する。各種画像診断・病理診断・遺伝子発現診断・再発予後データと腹腔鏡NBI診断のデータとの関連を明らかにする。次に前向き治療として、腹腔鏡下大腸癌手術において悪性度が高いと判断されるNBI画像を呈する症例には手術中より愛護的な操作行なうとともに徹底的は大量腹腔内洗浄を行なう。さらに、抗癌剤感受性が良いと判断される症例には、手術中抗癌剤治療も行ない、術後補助化学療法も行なう。悪性度が低いNBI画像と判断された場合は従来の手術手技と補助療法を施行する。以上、前向き治療による再発予防や予後の改善効果の検討を行なうことにより従来の治療との比較検討を行う。

3. 研究の方法

【対象】組織学的に確定診断された進行大腸癌 40 例

【方法】

1. 術前評価：術前に注腸検査・CF・CT・MRI・PET 検査・腫瘍マーカーを含めた血液検査を施行し術前進行度評価を行なう。
2. 術中モニタリング：セッティング機器として、VISERA ELITE ビデオシステムセンター(OLYMPUS OTV-S190)・VISERA ELITE 高輝度光源装置 (OLYMPUS CLV-S190)・高速気腹装置 UHI-3・手術環境統合システム ENDOALPHA・高解像度 LCD モニター(OEV261H)・ハイビジョン画像記録装置(IMH-20)・モービルワークステーション WM-NP2 を使用し、腹腔鏡により通常光観察と NBI 観察を行なう。正常臓器観察・深達度診断・腹膜播種診断・リンパ節転移診断・肝転移診断を行なう。

Angiogenesis や fibrosis の grading や特徴的所見を詳細に画像システムに記録する。転移が疑われる臓器には通常の手検処置を行ない、洗浄細胞診検査も施行する。

3. real-time RT-PCR による mRNA 量の定量化：NBI 腹腔鏡手術を施行した大腸癌症例の摘出標本から腫瘍組織および正常粘膜を採取し、RNeasy(Qiagen)で total RNA を抽出する。Reverse Transcription System(Promega)にて cDNA を合成する。TS mRNA, DPD mRNA, OPRT mRNA, TP mRNA や Bax mRNA, Bcl-2 mRNA, Bcl-xL mRNA に対する primer および probe を設計作製し、real-time RT-PCR (lightCycler, Roche, 現有設備)を使用して定量する。

4. 癌治療に対する特異性 (抗癌剤の感受性・放射線感受性) について検討：進行大腸癌症例に対しては術後化学療法により再発診断の有無を行ない、さらに進行直腸癌に対しては術前の化学放射線療法による腫瘍縮小効果も検討し。癌治療に対する特異性として抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現との相関を検討する。

5. 腹腔鏡NBI画像診断の総合評価：術前の各種画像診断所見、術中生検・摘出標本の病理組織結果、抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現、その後の補助療法の反応や術前化学放射線療法の効果を腹腔鏡下NBI画像診断で得られた所見との相関を検討する。

6. 腹腔鏡NBI画像診断に基づく治療による予後調査：以上の結果に基づいた前向き治療による予後の改善効果や長期合併症の検討、従来の治療との比較によりNBI Navigation surgeryの有効性・安全性の検証を行う。

4. 研究成果

1) 腹腔鏡下大腸癌手術に NBI 搭載腹腔鏡装置を用いて腹腔内観察を行ない、癌の壁深達度・腹膜播種・肝転移・リンパ節転移の観察とともに正常臓器の観察も行ない特

徴的画像所見を記録した。これに対して過去のNBI内視鏡診断報告による文献を参考にし、腹腔鏡下NBI観察・摘出標本の病理診断・術前画像診断から、NBI観察による腫瘍漿膜面の血管密度々線維化に関する独自の分類を見出すことができた。

血管新生の程度を grade 0: No evident of irregular vessels、grade 1: Irregular vessels in terms of caliber and branching、grade 2: Atypical aspects of vessels in terms of caliber, distribution, and branching と定義作成することができた。さらに、線維化の程度を grade 0: No fibrotic appearance、grade 1: Fibrotic appearance with vessels、grade 2: Fibrotic appearance with missing vessels と定義作成することができた。

2) 腹腔鏡下NBI観察による血管新生 grade 2・線維化 grade 2 を原発巣壁浸潤因子・転移巣悪性因子と定義し、大腸癌原発巣での漿膜浸潤の診断を解析した結果、腹腔鏡下NBI観察での sensitivity 86%, specificity 88%, positive predictive value 74%, negative predictive value 94%, overall accuracy 88%であった。

通常腹腔鏡観察での sensitivity 46%, specificity 89%, positive predictive value 65%, negative predictive value 78%, overall accuracy 76%であった。

術前CTでの sensitivity 21%, specificity 85%, positive predictive value 35%, negative predictive value 65%, overall accuracy 66%であった。

術前注腸造影検査での sensitivity 64%, specificity 64%, positive predictive value 44%, negative predictive value 80%, overall accuracy 64%であった。

術前大腸内視鏡検査での sensitivity 45%, specificity 77%, positive predictive value 44%, negative predictive value 75%, overall accuracy 67%であった。

腹腔鏡下NBI観察での sensitivity は通常腹腔鏡観察と術前大腸内視鏡検査での sensitivity より優れていた ($P=0.018$)、さらに術前CTでの sensitivity より良好であった ($P<0.001$)。腹腔鏡下NBI観察での overall accuracy は術前CT・術前注腸造影検査・術前大腸内視鏡

検査での overall accuracy より良好であった($P = 0.004, P = 0.002, P = 0.007$)。

さらに腹膜播種と肝転移の診断に関する検討では、

腹膜播種の腹腔鏡下 NBI 観察では sensitivity 88%, specificity 99%, positive predictive value 99%, negative predictive value 92%, overall accuracy 96% であり、肝転移巢の腹腔鏡下 NBI 観察では sensitivity 73%, specificity 98%, positive predictive value 98%, negative predictive value 86%, overall accuracy 89% であり、転移巢でも良好な結果であった。

3) 摘出標本のサンプル保存不良により 6 例のみ解析。TS, DPD, TP は assay 不成功であった。摘出標本の OPRT/GAPDH は血管新生 grade 2・線維化 grade 2:血管新生 grade 1・線維化 grade 1 が

0.009080952±0.007865842 :

0.009100132±0.008533514、摘出標本の Bcl-2/GAPDH は血管新生 grade 2・線維化 grade 2 : 血管新生 grade 1・線維化 grade 1 が 0.000003531±0.000003243 :

0.000003627±0.000003772、摘出標本の Bcl-xL/GAPDH は血管新生 grade 2・線維化 grade 2 : 血管新生 grade 1・線維化 grade 1 が 0.000080517±0.000090241 :

0.000082541±0.000088413、摘出標本の Bax/GAPDH は血管新生 grade 2・線維化 grade 2 : 血管新生 grade 1・線維化 grade 1 が 0.001152462±0.001805824 :

0.001202328±0.001510547 でいずれも差がなかった。

4) 摘出標本病理での大腸癌原発巣での漿膜浸潤陽性症例の特徴は、男女比 45%:55%、65 歳以上の高齢者率 64%、原発巣が結腸癌対直腸癌の比が 70%:30%、腫瘍組織型の高分化腺癌対その他の組織型 70%:30%、腫瘍最大径 5cm 以上が 15%、腹膜播種陽性率は 5%、肝転移陽性率は 25%、肺転移陽性率は 0%、リンパ節転移陽性率は

65%、リンパ管侵襲陽性率は 78%、静脈侵襲陽性率は 68%、血清 CEA 正常範囲を超える率は 35%、血清 CA19-9 正常範囲を超える率は 4%、血清 CRP 陽性率は 30%、血清 WBC 正常範囲を超える率は 2%であった。以上の結果を腹腔鏡下 NBI 観察での術中漿膜浸潤の正診率と比較しても腹腔鏡下 NBI 観察は優れていることが判明した。腹腔鏡NBI画像診断の結果に基づいた前向き治療は同意が得られず施行できなかった。最終的には摘出病理結果によりその後の治療を施行した。

5 . 主な発表論文等 現時点で未発表

〔雑誌論文〕(計 0 件)
〔学会発表〕(計 0 件)
〔図書〕(計 0 件)
〔産業財産権〕出願状況(計 0 件)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

堀田 司 (HOTTA TSUKASA)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 50244744

(2)研究分担者

瀧藤 克也 (TAKIFUJI KATSUNARI)
和歌山県立医科大学・医学部・准教授
研究者番号 : 00254540

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)
和歌山県立医科大学・医学部・教授
研究者番号 : 20191190

横山 省三 (YOKOYAMA SHOZO)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 90398462

中村 公紀 (NAKAMURA MASAKI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 80364090

松田 健司 (MATSUDA KENJI)
和歌山県立医科大学・医学部・講師
研究者番号 : 30398458

(3)連携研究者 なし