

博士論文

同時性多発大腸癌の臨床病理・分子学的解析

荒川敬一

# 同時性多発大腸癌の臨床病理・分子学的解析

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 外科学専攻

指導教員 石原聡一郎教授

荒川敬一

## 目次

目次 .....	1
略語一覧 .....	3
要旨 .....	4
序文 .....	5
第1章 同時性多発大腸癌の臨床病理学的解析	
1-1 背景 .....	10
1-2 対象・方法 .....	13
1-3 結果 .....	15
1-4 考察 .....	26
1-5 小括 .....	29
第2章 同時性多発大腸癌の分子遺伝学的解析	
2-1 背景 .....	30
2-2 対象・方法 .....	32
2-3 実験結果 .....	48
2-4 考察 .....	64

2-5 小括 .....	68
結論 .....	69
謝辞 .....	70
引用文献 .....	71

## 略語一覽

APC: adenomatous polyposis coli

BRAF: v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1

CA19-9: carbohydrate antigen 19-9

CEA: carcinoembryonic antigen

CIN: chromosomal instability

KRAS: v-Ki-Ras2 Kristen rat sarcoma viral oncogene homolog

LS: Lynch syndrome

LLS: Lynch like syndrome

MLH1: mutL homolog 1

MSH2: mutS homolog 2

MSH6: mutS homolog 6

MSI: microsatellite instability

MSI-H: microsatellite instability – high

MSS: microsatellite stable

PMS2: postmeiotic segregation increased 2

UICC: Union of International Cancer Control

## 要旨

本研究では、同時性多発大腸癌患者を対象としてその臨床病理学的特徴及び予後を調べ、手術検体を用い各病変の分子遺伝学的解析を行った。その結果、同時性多発大腸癌は無再発生存率において独立した予後不良因子の一つとなる可能性が示された。また、同時性多発大腸癌の同一症例内の病変間においては *MSI*, *KRAS*, *BRAF*, *p53*,  $\beta$ -*catenin* の分子サブタイプ的一致が少なく、*MSI-H* 症例では *MLH1* メチル化の関与した症例が多いことから、各病変はそれぞれ異なる経路から発生している可能性が示唆された。

## 序文

大腸癌は増加傾向であり、社会的な関心も高い [1]。日本においては、部位別罹患数では大腸癌は全ての癌の中で最多であり、部位別死亡率でも大腸癌は肺癌に次いで二番目に多い死因となっている [2]。近年のゲノム解析の進歩に伴い、プレジジョンメディシンが注目されるようになってきている。大腸癌の分野においては *carcinogenesis* の分子遺伝学的特徴や癌の占拠部位が分子標的薬の選択に関連しており臨床的にも重要となっている [3]。大腸癌の発癌は CIN *chromosomal instability* (CIN) 経路と *microsatellite instability* (MSI) 経路の二つに大別される (図 1)。これらを包括する分類として、2012 年に The Cancer Genome Atlas ネットワークは、MSI を含む非常に多くの遺伝子変異の蓄積と多様性を持つ *hypermuted type* と、*APC* や *KRAS*, *TP53* などの変異を主体とした *non hypermuted type* に大腸癌を分類している [4]。発癌経路については 1989 年の Vogelstein らの報告以降、腺腫性のポリープに複数の遺伝子変異が蓄積していくことで段階的に悪性化が進展していく *adenoma-carcinoma sequence* が分子遺伝学的基盤として理解されてきた [5]。典型的には、最初に *APC* 癌抑制遺伝子の不活化が生じ、*KRAS* 遺伝子の活性化、*TP53* 遺伝子の欠失が続いて生じ発癌に至る経路である。大腸癌の約 80%では広範囲に染色体の増加・減少が発癌に関与し、Vogelstein らのモデルを含めたこれらの発癌経路が CIN と総称される [6]。この CIN 経路以外に、鋸歯状ポリープなどを母地として MSI・*MLH1* メチル化・*BRAF* 変異が関与し発癌に至る MSI 経路が報告されている [7, 8]。大腸癌の約 15%に認められる MSI 経路においては、ミスマッチ修復遺伝子自体の変異や近傍のプロモーター領域のメチル化に伴う遺伝子

発現の抑制により、塩基配列の修復が不能となることで遺伝子異常が蓄積し発癌に至る。MSI 経路での発癌は ① 生殖細胞系列にミスマッチ修復遺伝子の変異を認めるリンチ症候群 (Lynch syndrome, LS) ② 散発的に体細胞系列のミスマッチ修復遺伝子の変異を認めるリンチ様症候群 (Lynch like syndrome, LLS) ③ *MLH1* がメチル化により発現抑制を受け発癌する *MLH1* メチル化症例の 3 つに分類される [8]。さらに、近年では大腸癌症例の一部には DNA のメチル化が高頻度に蓄積した CpG Island Methylator Phenotype (CIMP) を呈する一群が存在することが報告されており、CIMP-High の大腸癌では *MLH1* メチル化により MSI-H を呈することが知られている [9]。

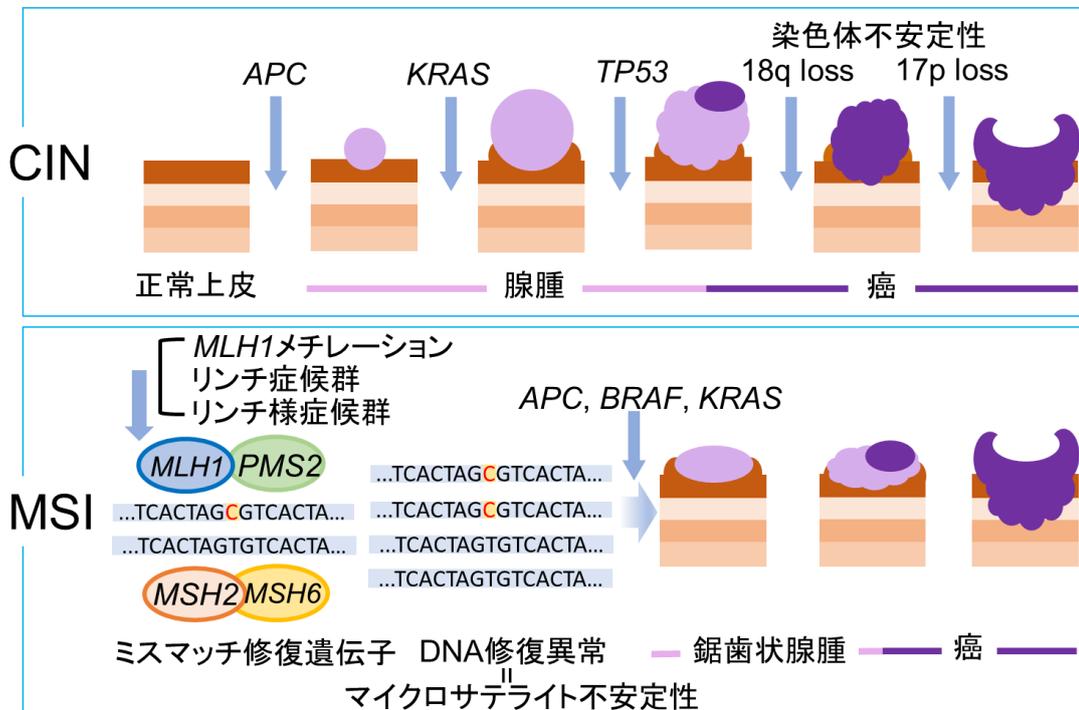


図 1. 大腸癌の carcinogenesis

大腸癌の発生経路は adenoma-carcinoma sequence を含む CIN 経路と、マイクロサテライト不安定性を呈するミスマッチ修復遺伝子の抑制・変異による MSI 経路の二つに大別される。

また、大腸癌は遺伝性大腸癌と非遺伝性である散発性大腸癌に大別される。遺伝性大腸癌のうち頻度が高いものは家族性大腸腺腫症とLSである。生殖細胞系列にAPC変異を認めCIN経路により発癌をきたす家族性大腸腺腫症は、内視鏡検査による臨床的診断が比較的容易である。ミスマッチ修復遺伝子の変異を生殖細胞系列に認めMSI経路により発癌をきたすLSは、大腸癌の他に子宮内膜癌、卵巣癌、胃癌、小腸癌、腎盂・尿管癌などの発症リスクが高まる疾患であるが、臨床的特徴に乏しいため散発性大腸癌と区別されることなく多くが見逃されている可能性がある [10]。

さらに、近年では大腸癌におけるcarcinogenesisの特徴は治療にも影響を与えている。KRAS・BRAFに変異を認める場合は抗EGFR抗体の効果がないことがわかっており、切除不能再発進行癌の化学療法はKRASやBRAFのサブタイプに合わせたレジメンが用いられている [4]。MSI-Hの固形癌についても免疫チェックポイント阻害薬であるペムブロリズマブが日本において2018年に認可されており、MSIの状態により分子標的薬の選択をすることとなっている [11]。

大腸癌は時として多発する癌であることが知られており、同時性多発大腸癌（多発大腸癌）の頻度は1-8%と報告されている [12]。多発大腸癌の代表病変の分子遺伝学的解析をした報告は散見されるものの、同一症例内の病変間の分子遺伝学的特徴を分析した報告は少なく、多発大腸癌の発生経路について統一した見解はないのが現状である [13]。多発大腸癌の分子遺伝学的特徴を解明することは、学問的な興味にとどまらず、プレジジョンメディシンという観点からも適切な診断・治療を行う上で臨床的に非常に重要であると考えられる。

以上のような背景を踏まえ、本研究では多発大腸癌の症例を対象に第1章では

臨床病理学的特徴及び予後の解析を、また第 2 章では腫瘍の分子遺伝学的解析を行い、多発大腸癌の臨床病理学的特徴と分子遺伝学的発生経路の解明を行った。

# 第 1 章

## 同時性多発大腸癌の臨床病理学的解析

### 1-1 背景

多発大腸癌は Billroth らが 1889 年に初めて報告し [14]、1932 年には Warren らが、”転移性病変ではなく、互いに接していない複数の大腸癌” と定義している [15]。その後も散発的に報告はあるものの、多発大腸癌の発生率は 1-8%と低いため症例蓄積が不十分であり、未だ臨床病理学的特徴は不透明な部分が多い [12, 16, 17]。さらに、多発大腸癌は病変が複数あり文献により解析方法が異なるため臨床病理学的因子の特徴が明確になりづらいことも指摘されている [12, 18]。これまでに報告されている多発大腸癌のリスク因子としては、男性・高齢の他、潰瘍性大腸炎、家族性大腸腺腫症、LS が挙げられる [12, 19]。日本の遺伝性大腸癌診療ガイドライン [20] では LS の一次スクリーニングとして改訂ベセスダガイドライン [21] を挙げ、5 つの項目の 1 つに多発大腸癌が含まれている。これらに該当する場合は二次スクリーニングとして MSI 検査あるいはミスマッチ修復遺伝子の免疫染色検査を行い、さらに確定診断のための生殖細胞系列の遺伝学的検査へと進むことになる。海外では LS の頻度は 1-13%程度と報告されているが [10, 22]、生殖細胞系列の遺伝学的検査は倫理面や個人情報観の観点から日本においては全例では行われてはおらず正確な頻度は不明である。また、多発大腸癌を認める頻度が高いことで知られる LS の予後については比較的良なことが報告されている [10]。多発大腸癌の予後に関する文献的報告では、1996

年に Passman らがステージ別に多発大腸癌と単発癌の予後を初めて比較し有意差無しとの報告 [23] をして以来、多発大腸癌の予後は単発癌と同等であるとする報告が散見される。一方で、近年の報告では多発大腸癌の全生存率が単発癌より不良としているものもある [13, 19, 24] (表 1)。これらの背景から、これまでに報告されている Yang らと Lam らの二つの総説では、多発大腸癌の予後が単発癌より不良であるかについては controversial としている [12, 18]。

以上の背景を踏まえ、本研究では多発大腸癌について単発癌と比較することで臨床病理学的特徴と予後について詳細な検討を行った。

表 1. 多発大腸癌の予後に関する先行研究

全生存率								
著者	報告年	国	多発癌 症例数	単発癌 症例数	単変量	多変量	HR	
Passman	[23]	1996	カナダ	160	4718	N.S.	N.A.	-
Chen	[25]	2000	台湾	52	1728	N.S.	N.A.	-
Oya	[24]	2003	日本	42	834	多発癌*	N.A.	1.16
Papadopoulos	[26]	2004	ギリシャ	26	1160	N.S.	N.A.	-
Latournerie	[17]	2008	フランス	596	14966	N.S.	N.S.	0.99
Nosho	[13]	2009	アメリカ	47	2021	多発癌*	多発癌*	1.47
Mulder	[19]	2011	オランダ	534	17146	多発癌*	N.S.	1.02
Lam	[27]	2011	オーストラリア	102	1793	N.S.	N.A.	-
Bae	[28]	2012	韓国	46	105	N.S.	N.A.	-
Hu	[29]	2013	アメリカ	58	109	単発癌*	N.A.	-
Malesci	[30]	2014	イタリア	39	748	多発癌*	多発癌*	1.82
Huang	[16]	2015	台湾	122	5179	N.S.	N.A.	-
Kato	[31]	2016	日本	84	921	N.S.	N.A.	-

無病生存率

著者	報告年	国	多発癌 症例数	単発癌 症例数	単変量	多変量	HR	
Lam	[27]	2011	オーストラリア	102	1793	N.S.	N.A.	-

\*, 予後不良

略語: HR, hazard ratio; N.A., not available; N.S., not significant

多発癌, 同時性多発大腸癌; 単発癌, 単発大腸癌

## 1-2 対象・方法

### 【対象】

2005年1月から2015年12月に東京大学腫瘍外科で外科的切除を施行された大腸癌患者1295症例を対象とし、同時性多発大腸癌患者群（多発群）と、単発大腸癌患者群（単発群）に分類した。同時性多発大腸癌の定義としては、Warrenらが定義した①腫瘍が悪性であること②腫瘍がそれぞれ離れており転移でないこと③同時に診断されたかあるいは6ヶ月以内に診断されていること、の3項目を用いた [15]。

### 【方法】

診療録より後方視的に情報を収集し、多発群と単発群で臨床病理学的因子と無再発生存率及び全生存率を比較した。炎症性腸疾患合併大腸癌患者、家族性大腸腺腫症の患者は除外した。多発大腸癌の病変の序列に関しては既存の報告に従い、深達度の深い順とし、深達度が同じ場合は最大腫瘍径の大きい順に第一癌・第二癌と序列を付与し、症例毎の検討では第一癌のデータを用いて解析を行った [13, 24]。腫瘍の占拠部位は盲腸、上行結腸、横行結腸を右側大腸と定義し、下行結腸、S状結腸、直腸を左側大腸と定義した。大腸癌のStage分類には、Union of International Cancer Control (UICC) のTNM分類第8版を用いた [32]。

## 【統計学的解析】

全ての統計学的解析には JMP pro version 14 software packages (SAS Institute) を使用した。連続変数の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。カテゴリー変数の比較には Pearson's chi-squared 検定または Fisher の正確検定を用いた。CEA 値に関しては 5.0 ng/mL を、CA19-9 値については 37.0 U/mL を、腫瘍径に関しては 50 mm をカットオフ値 [33] として 2 群に層別化した。累積生存率の推定は Kaplan-Meier 法を用い、群間の生存率の比較には log-rank 検定を用いた。無再発生存期間及び全生存期間に対するハザード比は、Cox の比例ハザードモデルにより単変量解析ならびに多変量解析を行い算出した。p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とし、多変量解析には単変量解析の p 値が 0.05 未満の因子を用いた。

## 【倫理】

本研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を受けて施行した（審査番号 3252-(6)）。

### 1-3 結果

#### 【患者背景・臨床病理学的因子 (症例毎)】

まず、症例毎に多発群と単発群で患者背景と臨床病理学的因子を比較した。多発群は 92 症例 (7.1%)、単発群は 1203 症例 (92.9%) であり、多発群の内訳は、二重癌 79 症例、三重癌 11 症例、四重癌 1 症例、五重癌 1 症例であった。全症例の追跡期間中央値は 3.7 年 (0.1-14.8 年) であった。多発群と単発群の患者背景・臨床病理学的因子の比較を表 2 に示す。多発群と単発群で有意差を認めた因子は、腫瘍径と分化度であった。腫瘍径では 50 mm 以上の症例は多発群で単発群より多く (44.6% vs. 33.8%,  $p = 0.0403$ )、分化度では低分化・粘液癌の症例が多発群で単発群より多かった (20.6% vs. 7.0%,  $p < 0.001$ )。ただし、症例毎の解析のため、多発群では同一症例内で最も深達度の深い第一癌のデータを用いて解析しており、腫瘍径の差に影響を及ぼしている可能性が示唆される。年齢、性別、CEA、CA19-9、占拠部位、リンパ管侵襲、静脈侵襲、TNM Stage については多発群と単発群でその頻度に有意な差を認めなかった。

表 2. 患者背景・臨床病理学的因子 (症例毎)

		多発群 (%)		単発群 (%)		p 値	
		N=92	(7.1)	N=1203	(92.9)		
年齢 (歳)	中央値	69		67		0.1549	
	範囲	37-90		26-90			
性別	男性	54	(58.7)	699	(58.1)	0.9118	
	女性	38	(41.3)	504	(41.9)		
CEA (ng/mL)	中央値	5.3		4.6		0.0761	
	範囲	1-1406		0.6-6841			
	<5	41	(44.6)	635	(52.8)		0.1283
≥5	51	(55.4)	568	(47.2)			
CA19-9 (U/mL)	中央値	13		12		0.4825	
	範囲	1-1106		1-13250			
	<37	69	(75.0)	967	(80.4)		0.2255
	≥37	23	(25.0)	236	(19.6)		
占拠部位	右側	21	(22.8)	377	(31.3)	0.0801	
	左側	71	(77.2)	826	(68.7)		
腫瘍径 (mm)	中央値	40		40		0.1082	
	範囲	12-120		5-155			
	<50	51	(55.4)	796	(66.2)		0.0403
	≥50	41	(44.6)	407	(33.8)		
分化度	高・中分化	73	(79.4)	1119	(93.0)	<0.001	
	低分化・粘液癌	19	(20.6)	84	(7.0)	0.0542	
	低分化	7	(7.6)	39	(3.2)		
	粘液癌	12	(13.0)	45	(3.7)	<0.001	

表 2. 患者背景・臨床病理学的因子（症例毎）

		多発群 N=92	(%) (7.1)	単発群 N=1203	(%) (92.9)	p 値
T 因子	1	9	(9.8)	156	(13.0)	<b>0.0215</b>
	2	15	(16.3)	183	(15.2)	
	3	44	(47.8)	558	(46.4)	
	4	24	(25.9)	306	(25.4)	
T1-2 vs. T3-4	T1-2	23	(25.0)	338	(28.1)	0.5189
	T3-4	69	(75.0)	865	(71.9)	
N 因子	N0	50	(54.4)	676	(56.2)	0.7314
	N1-2	42	(45.6)	527	(43.8)	
リンパ管侵襲	陰性	62	(67.4)	812	(67.5)	0.9832
	陽性	30	(32.6)	391	(32.5)	
静脈侵襲	陰性	26	(28.3)	333	(27.7)	0.9048
	陽性	66	(71.7)	870	(72.3)	
Stage	I	13	(14.1)	258	(21.5)	0.3281
	II	33	(35.9)	383	(31.8)	
	III	33	(35.9)	401	(33.3)	
	IV	13	(13.4)	161	(13.4)	
Stage I-II vs. III-IV	I-II	47	(51.1)	641	(53.2)	0.6896
	III-IV	45	(48.9)	562	(46.8)	

### 【患者背景・臨床病理学的因子 (病変毎)】

前述の症例毎の検討では第一癌の特徴のみを比較したが、全病変の臨床病理学的特徴を明らかにすることを目的とし、多発群 92 症例における 200 病変と単発群 1203 病変の臨床病理学的因子の比較を行った (表 3)。両群間で有意差を認めた因子は、分化度と T 因子であった。分化度では低分化・粘液癌の頻度が多発群において単発群と比較して有意に高く (12.5% vs. 6.9%,  $p = 0.0113$ )、深達度では T1-2 の病変の頻度が多発群において単発群より有意に高かった (52.0% vs. 28.1%;  $p < 0.0001$ )。占拠部位の比率は両群間で有意差を認めなかった。

表 3. 患者背景・臨床病理学的因子 (病変毎)

		多発群		単発群		p 値
		N=200 病変	(%)	N=1203 病変	(%)	
占拠部位	右側	53	(26.5)	377	(31.3)	0.1645
	左側	147	(73.5)	826	(68.7)	
分化度	高・中分化	175	(87.5)	1119	(93.1)	0.0113
	低分化・粘液癌	25	(12.5)	84	(6.9)	
	低分化	12	(6.0)	39	(3.2)	
	粘液癌	13	(6.5)	45	(3.7)	
T 因子	1	71	(35.5)	156	(13.0)	0.0721
	2	33	(16.5)	183	(15.2)	
	3	70	(35.0)	558	(46.4)	
	4	26	(13.0)	306	(25.4)	
T1-2 vs. T3-4	T1-2	104	(52.0)	339	(28.1)	<0.0001
	T3-4	96	(48.0)	864	(71.9)	

### 【予後の解析】

続いて、多発群と単発群の全生存率及び無再発生存率の解析結果を図2に示す。5年全生存率は両群間において有意差を認めなかった。一方で、5年無再発生存率は単発群では75.1%であったのに対し、多発群では65.3%であり、多発群は有意に予後不良であった ( $p=0.0347$ )。各 TNM Stage 別の予後の解析結果を図3, 4に示す。Stage 別の全生存率は両群間において有意差を認めなかった。Stage IV の無再発生存率は多発群が予後不良な傾向 ( $p=0.0830$ ) であった。

次に、全生存率及び無再発生存率について、Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析の結果を表4, 5に示す。全生存率においては多発大腸癌は予後因子とはならなかったが、無再発生存率においては多発大腸癌は独立した予後不良因子であることが示された (HR 1.52, 95%CI 1.02-2.18,  $p = 0.0392$ )。

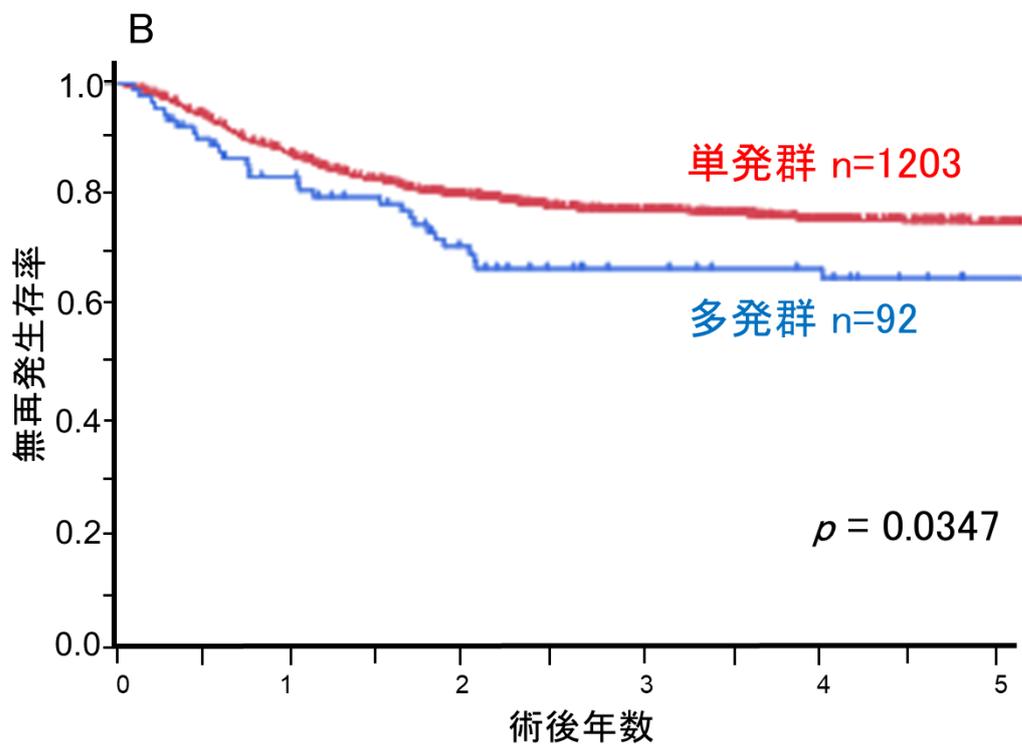
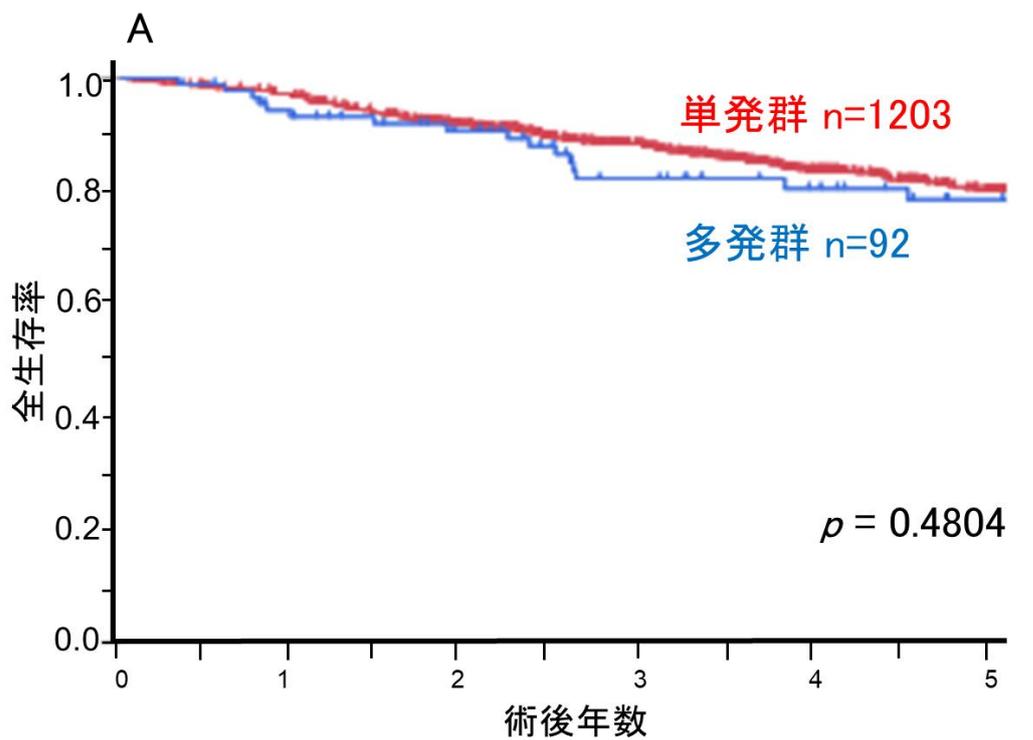


図 2. 全 Stage における多発群と単発群の全生存率 (A) 及び無再発生存率 (B) 全生存率は両群間において有意差を認めなかった。一方で、累積無再発生存率は単発群では 75.1%であったのに対し、多発群では 65.3%であり、多発群は有意に予後不良であった ( $p=0.0347$ )。

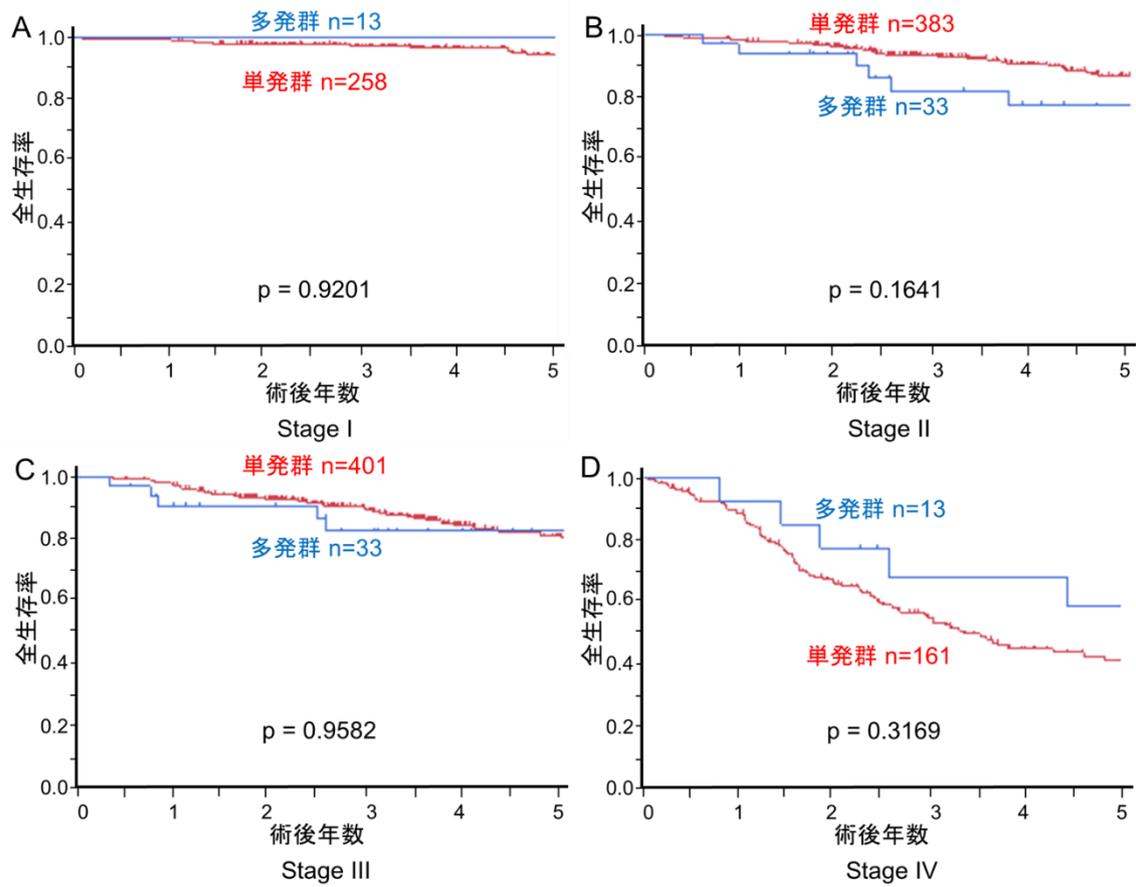


図 3. Stage 別の多発群と単発群の全生存率

各 Stage において両群間では全生存率に有意差を認めなかった。

- A: Stage I
- B: Stage II
- C: Stage III
- D: Stage IV

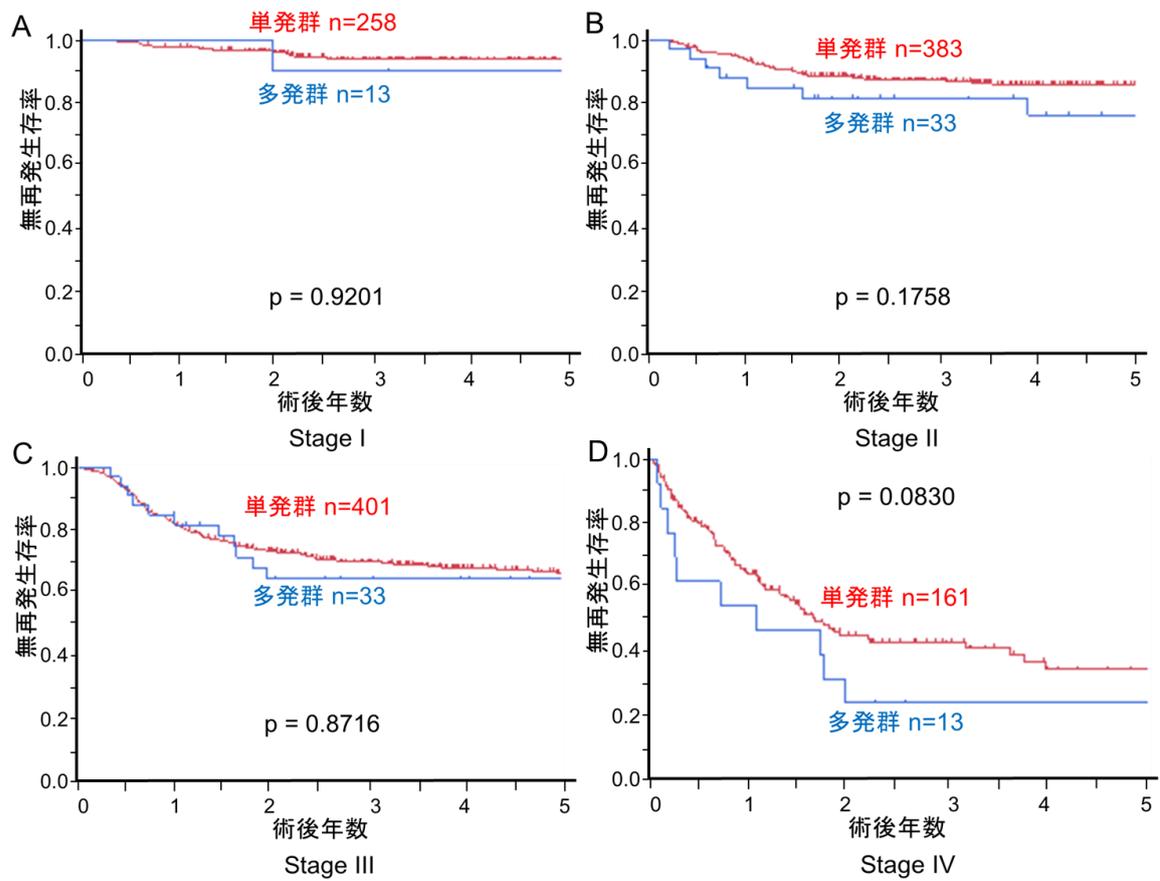


図4. Stage別の多発群と単発群の無再発生存率

Stage IVでは無再発生存率において多発群は単発群に対し予後不良の傾向 ( $p = 0.0830$ ) を示した。Stage I-IIIでは有意差を認めなかった。

- A: Stage I
- B: Stage II
- C: Stage III
- D: Stage IV

表 4. 全生存率の単変量・多変量解析結果

因子		単変量解析	多変量解析		
		p 値	HR	95%CI	p 値
年齢 (歳)	≥50 vs. <50	0.9573			
性別	女性 vs. 男性	0.3639			
CEA(ng/mL)	≥5.0 vs. <5.0	<0.0001	1.50	1.11-2.05	0.0089
CA19-9(U/mL)	≥37.0 vs. <37.0	<0.0001	1.43	1.06-1.90	0.0167
占拠部位	左側 vs. 右側	0.6778			
分化度	低分化・粘液癌 vs. 高・中分化	<0.0001	1.41	1.07-1.84	0.0123
T 因子	T3,4 vs. T1,2	<0.0001	1.74	1.18-2.66	0.0076
N 因子	N1-2 vs. N0	<0.0001	1.22	0.91-1.64	0.1932
リンパ管侵襲	陽性 vs. 陰性	<0.0001	1.35	1.01-1.79	0.0400
静脈侵襲	陽性 vs. 陰性	<0.0001	1.48	1.01-2.22	0.0511
M 因子	M1 vs. M0	<0.0001	3.36	2.51-4.48	<0.0001
多発大腸癌	多発大腸癌 vs. 単発癌	0.4912			

略語: CI, confidence interval; HR, hazard ratio

表 5. 無再発生存率の単変量・多変量解析結果

因子		単変量解析		多変量解析	
		p 値	HR	95%CI	p 値
年齢 (歳)	≥50 vs. <50	0.0043	0.84	0.66-1.07	0.1681
性別	女性 vs. 男性	0.2633			
CEA(ng/mL)	≥5.0 vs. <5.0	<0.0001	1.17	0.90-1.52	0.2333
CA19-9(U/mL)	≥37.0 vs. <37.0	<0.0001	1.60	1.23-2.07	0.0005
占拠部位	左側 vs. 右側	0.0302	1.16	0.90-1.51	0.2523
分化度	低分化・粘液癌 vs. 高・中分化	0.0948			
T 因子	T3,4 vs. T1,2	<0.0001	2.21	1.53-3.29	<0.0001
N 因子	N1-2 vs. N0	<0.0001	1.87	1.44-2.44	<0.0001
リンパ管侵襲	陽性 vs. 陰性	<0.0001	1.22	0.96-1.56	0.1096
静脈侵襲	陽性 vs. 陰性	<0.0001	1.61	1.16-2.31	0.0038
M 因子	M1 vs. M0	<0.0001	2.48	1.88-3.25	<0.0001
多発大腸癌	多発大腸癌 vs. 単発癌	0.0468	1.52	1.02-2.18	0.0392

略語: CI, confidence interval; HR, hazard ratio

## 1-4 考察

多発大腸癌の臨床病理学的因子と予後の解析については、複数の報告で検討されているものの未だ一定の見解がない [12, 18]。本研究は日本人 1295 症例のコホートにおいて多発群 92 症例の臨床病理学的因子及び予後を解析した結果、多発群の累積無再発生存率は単発群よりも有意に不良であり、多発大腸癌は無再発生存率における独立した予後不良因子であることが示されたが、全生存率においては予後因子とはならなかった。臨床病理学的因子の解析では、多発群と単発群の各因子を比較した結果、多発群において粘液癌の頻度が高かった。

多発群と単発群の予後を比較した文献はこれまでに本研究を含め 14 編ある (表 1)。その中で、全生存率について単変量解析を行った 14 編のうち両群間に有意差を示した文献は 5 編あり、そのうち 4 編は多発群の予後が不良であり、1 編は単発群の予後が不良であったと報告している [13, 19, 24, 29, 30]。多変量解析を行っているものはその中で 2 編であり、ともに多発大腸癌が独立した予後不良因子であったと報告している [13, 30]。Malesci らは多変量解析で多発大腸癌が予後不良因子であったことを述べているが、MSI-High (MSI-H) 症例に限って解析した場合は多発群と単発群の全生存率に有意差はなかったとしている [30]。また、Hu らは 58 症例の多発群を含むコホートにおける単変量解析で単発群の予後が不良であったことを指摘しているが、その理由として多発大腸癌の鋸歯状腺腫合併症例では一例も死亡がなかったことを挙げている [29]。これらの報告からは、MSI-H や鋸歯状腺腫の存在が多発大腸癌の予後に影響を与えている可能性が示唆される。また、再発について解析している論文は本研究を含め 2 編のみであり、Lam らは 102 症例の多発群を含むコホートにおける単

変量解析で無病生存率は多発群と単発群で同等であったと報告している [27]。本研究では、無再発生存率に対しての多変量解析において多発大腸癌が予後不良因子であることを示した。その理由としては、多発大腸癌症例においては、それぞれの腫瘍が再発する確率を合計すると単発癌症例より再発率が高くなる可能性があり、Nosho からも多発大腸癌が予後不良因子である原因を同様に考察している [13]。また、Stage の予後に対する影響を考慮して本研究では Stage 別の解析も行ったが、Stage IV において多発群の無再発生存率の不良傾向を示すのみであった。また、ステージ別の解析において多発群の症例数は各ステージで 13-33 症例と少なく、このことは limitation となっている。他にも、*BRAF* や *MSI* のような予後に影響する遺伝子変異の頻度は研究対象となる地域や人種で異なっており、このような差が既存の多発大腸癌の予後報告における結論の相違に関与している可能性はある [34, 35]。一方で、本研究において全生存率は多発群と単発群で有意差を認めなかった。再発巣の切除率について検討すると、多発群では再発 30 症例中切除可能であった症例は 7 症例 (23%) であったのに対し、単発群では再発 281 症例中切除可能であった症例は 47 症例 (17%) とやや低かった。他の要因としては、今回のコホートが大学病院での症例に限定されていることに関係している可能性もある。長期的なフォローが他院で行われ、その後の死亡イベントはカウントされずに打ち切りとなっている症例が全生存率に影響している可能性は考えられる。このような背景が本研究において全生存率で両群間に有意差を認めなかった要因の一つである可能性はあるが、明確な理由を示すことはできなかった。また、本研究結果からは、多発大腸癌は単発癌と比較した場合再発率が高く、多発大腸癌では単発癌よりもより化学療法の必要となる症例が多いことが示唆される。用いられる分子標的薬の選択については、転移再発部位における標的分子のサブタイ

プを確認する必要がある、その点に関しては次章で検討する。

続いて、各臨床病理学的因子に関してであるが、本研究では多発群で粘液癌の頻度が有意に高いことが示された。本研究結果と同様に既存の報告においても、多発大腸癌では粘液癌の頻度が高いことが報告されている[12, 27, 29, 35]。MSI 経路による発癌は粘液癌の頻度が高いことが知られており、また、多発大腸癌で MSI-H の頻度が高いことも報告されている [8, 10, 21, 37]。これらの理由から本研究では粘液癌の頻度が多発大腸癌で単発癌より有意に高かった可能性が考えられた。

本研究においては、いくつかのlimitationがある。第一に、本研究が単施設の後方視的研究での解析であるため選択バイアスが避けられない。第二に、追跡期間が短いことは本研究の予後の解析結果に影響している可能性があげられる。第三に、本研究では無病生存率は評価していない。既存の報告では無病生存率について述べているものがあるが、本研究では多発大腸癌の再発を解析対象とし無再発生存率を評価した。第四に、本研究では化学療法の施行の有無や種類に関しては時代変遷もあり解析対象としておらず、予後解析への影響は否定できない。本研究の対象患者数は既存の報告と比較して大規模ではなく、今後の症例の蓄積が必要と考える。

## 1-5 小括

無再発生存率は多発大腸癌患者で単発癌患者と比較し有意に低く、多発大腸癌が無再発生存率の独立した予後不良因子の一つであったが、全生存率においては予後因子とはならなかった。

## 第 2 章

### 同時性多発大腸癌の分子遺伝学的解析

#### 2-1 背景

大腸癌においては CIN による発癌が約 80%を占め、MSI による発癌は 15%程度と  
言われている [8]。多発大腸癌に関しては MSI による発癌の頻度が高いことが文献で  
は示唆されており、単発癌における MSI-H の頻度 12-17%に対し、多発大腸癌にお  
ける頻度は少数例の報告で 30%-37% とされている [8, 13, 29, 38-40]。このように、  
多発大腸癌では MSI-H の病変が多いことが示唆されているが、多発大腸癌の同一症  
例内の病変間における分子遺伝学的解析の比較を詳細に行っている報告は少ない。  
多発大腸癌は同一の環境的背景から発生する別個の腫瘍という特性を持っており、  
各病変の分子サブタイプについて解析することは carcinogenesis の研究およびプレシ  
ジョンメディシン時代の治療選択において重要であると考えられる。

多発大腸癌において、近年では腸管粘膜の DNA メチル化の影響による発癌が  
Field effect の一部として注目されている。Odinらが腫瘍から離れた粘膜における DNA  
メチル化の変化を報告したものが最初の報告である [41] が、さらにNoshoらは *LINE-1*  
メチル化が正常腸管に生じることで多発大腸癌が発生することを少数例の報告で提  
唱している [13, 42]。多発大腸癌の背景因子としては遺伝性である LS も挙げられ、同  
一症例内の全病変で MSI-H となる可能性がある [8, 43]。一方で散発性の多発大腸  
癌の場合、同一症例内の病変間で MSI の状態は異なる可能性が指摘されている。こ

れまでに MSI を含めた複数の分子サブタイプに対し同一症例内の病変間で解析をした報告は 4 編ある [13, 28, 44, 45]。症例数の最も多い報告は Bae らの 46 症例であり、最も少ない報告は Noshō らの 10 症例である。この 4 編の報告では、同一症例内の病変間で MSI-H が一致していた頻度は 9-30%としている。同様に KRAS 変異は 11-40%、BRAF 変異は 0-14%の頻度で同一症例内の病変間において一致していたとしている。しかしながら、これらの報告の症例数は多くはなく、統計学的に分子サブタイプの一致度を検討しているものは Noshō らの報告のみである。

KRAS や BRAF の分子サブタイプは抗 EGFR 抗体に対する分子標的療法の選択に重要であるが、これまでに多発大腸癌において KRAS ・ BRAF の分子サブタイプを詳細に報告したものは 1 編のみである [46]。Giannini らは 26 症例の KRAS ・ BRAF 変異状態を測定し 11 症例 (42%) で KRAS ・ BRAF の分子サブタイプが一致しないことを報告している [46]。この報告は少数症例のコホートではあるが、同一症例内の病変間における KRAS ・ BRAF 変異の相違を示しており分子標的薬の選択において注意が必要であることを示唆している。

以上のような背景から、本研究では多発大腸癌 59 症例の各病変の MSI、KRAS、BRAF、p53、 $\beta$ -catenin の分子サブタイプを解析し、同一症例内の病変間において分子サブタイプが一致しているかについて調べ、多発大腸癌の発癌経路の特徴を明らかにすることを目的とした。

## 2-2 対象・方法

### 【対象と方法】

2005年1月から2015年12月の期間に東京大学腫瘍外科において手術を施行し、ホルマリン固定検体が入手可能であった同時性多発大腸癌患者 59 症例 (130 検体) を対象とした。術前に化学療法や放射線治療が施行されている症例、炎症性腸疾患合併大腸癌の症例及び家族性大腸腺腫症の症例は本研究から除外した。ホルマリン固定検体は免疫染色用は 3  $\mu\text{m}$ 、DNA 採取用は 10  $\mu\text{m}$  の厚さでパラフィン包埋切片を作成した。

多発大腸癌の病変の序列に関しては既存の報告に従い、深達度の深い順とし、深達度が同じ場合は最大腫瘍径の大きい順に第一癌・第二癌と序列を付与し、症例毎の検討では第一癌のデータを用いて解析を行った [13, 24]。腫瘍の占拠部位は盲腸、上行結腸、横行結腸を右側大腸と定義し、下行結腸、S 状結腸、直腸を左側大腸と定義した。大腸癌の Stage 分類には、UICC の TNM 分類 第 8 版を用いた [32]。

### 【倫理】

本研究は東京大学大学院医学系研究科・医学部倫理委員会の承認を受けて施行した (審査番号 G3552-(5))。

## 【免疫組織化学染色】

免疫組織化学染色は酵素ポリマー法にて行った。ホルマリン固定後パラフィン包埋された 3  $\mu\text{m}$  の組織標本をスライドグラスにマウントした。キシレンおよびエチルアルコールにて、脱パラフィンおよび脱キシレン処理を行った。抗原賦活化のため、0.01 M クエン酸緩衝液中にてマイクロウェーブ処理 (5 分) し、次いで内因性ペルオキシダーゼ不活化のため、1%  $\text{H}_2\text{O}_2$  入りメタノールにて室温 30 分間で処理した。更に一次抗体の非特異的結合をブロッキングするために bovine serum にて室温 30 分間処理した。一次抗体として各倍率に希釈した抗ヒト抗体 (表 6) を 4°C にて一昼夜反応させた後、ペルオキシダーゼと二次抗体を結合させた標識ポリマーを 30 分間室温にて反応、発色時間は 10 分とした (Dako envision kit, Dako)。ヘマトキシリンにて核染色を施行した後観察した [47]。

最深部を含む最大断面を顕微鏡下 (200 倍) で観察し、異なる 2 視野における染色強度を判定に用いた。p53 については既報に基づき 50%以上の細胞の核が染色されている場合陽性とした (図 5) [48, 49]。APC についてはその機能が喪失した場合  $\beta$ -catenin の分解が抑制され  $\beta$ -catenin が核内に移行・蓄積することが知られており、 $\beta$ -catenin の免疫染色結果を用いて判定することとした [47]。 $\beta$ -catenin 染色評価については既報に基づき細胞膜を1点・細胞質・核を2点とする計 5 点で評価し 3 点以上を陽性とした (図 6) [13, 51]。MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 については腫瘍細胞の核が染色されず、間質細胞の核が染色されているものを loss の判定とした (図 7) [52]。上記の評価については、客観性を担保するため、臨床病理学的因子に関する情報を伏せて実施した。免疫染色の判定は二名の異なる外科医が独立して評価を行った ( $\kappa=0.69$ ,  $p=0.0383$ ) [53]。

表 6. 免疫染色に使用した一次抗体

抗体名	製造元	クローン名	希釈濃度
抗ヒト p53 マウスモノクローナル抗体	Dako	CloneDO7	1:100
抗ヒト $\beta$ -catenin マウスモノクローナル抗体	BD	Clone14	1:500
抗ヒト MLH1 マウスモノクローナル抗体	Dako	CloneES05	1:50
抗ヒト PMS2 ラビットモノクローナル抗体	Dako	CloneEP51	1:50
抗ヒト MSH2 マウスモノクローナル抗体	EMD	CloneFE11	1:50
抗ヒト MSH6 マウスモノクローナル抗体	BD	Clone44	1:50

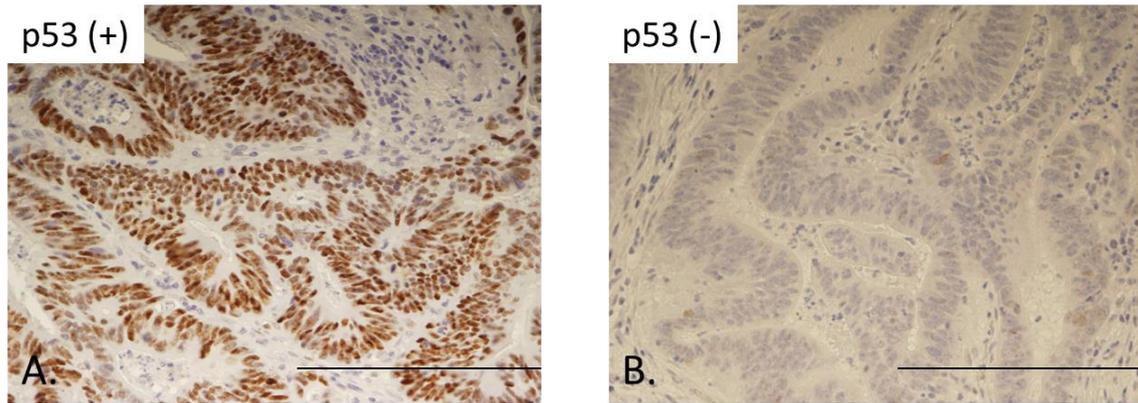


図 5. p53 抗体の免疫染色結果例  
 A は腫瘍細胞の核が濃染され陽性の判定、B は核が染色されず陰性の判定。  
 — 200 $\mu$ m

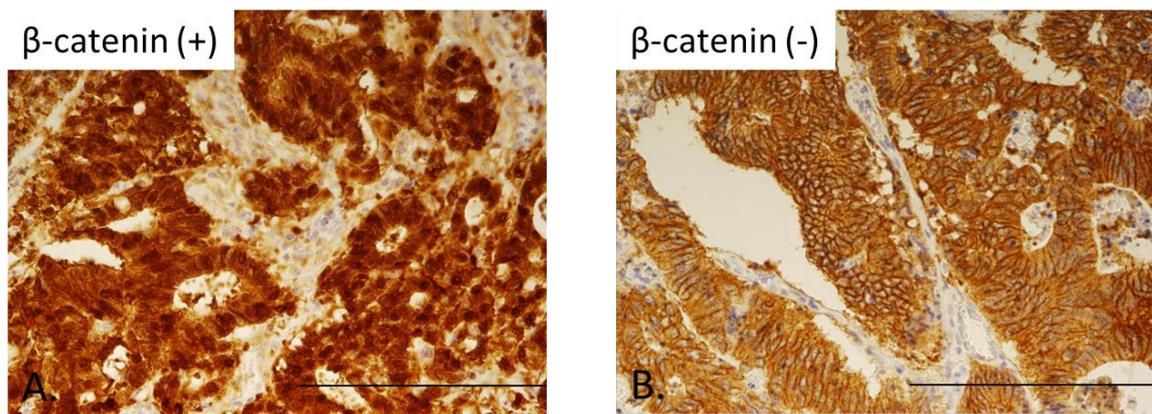


図 6.  $\beta$ -catenin 抗体の免疫染色結果例  
 A は腫瘍細胞の核と細胞質が濃染されており陽性の判定、B は細胞膜の染色がみられるが、核は染色されず細胞質の染色も弱いため陰性の判定。  
 — 200 $\mu$ m

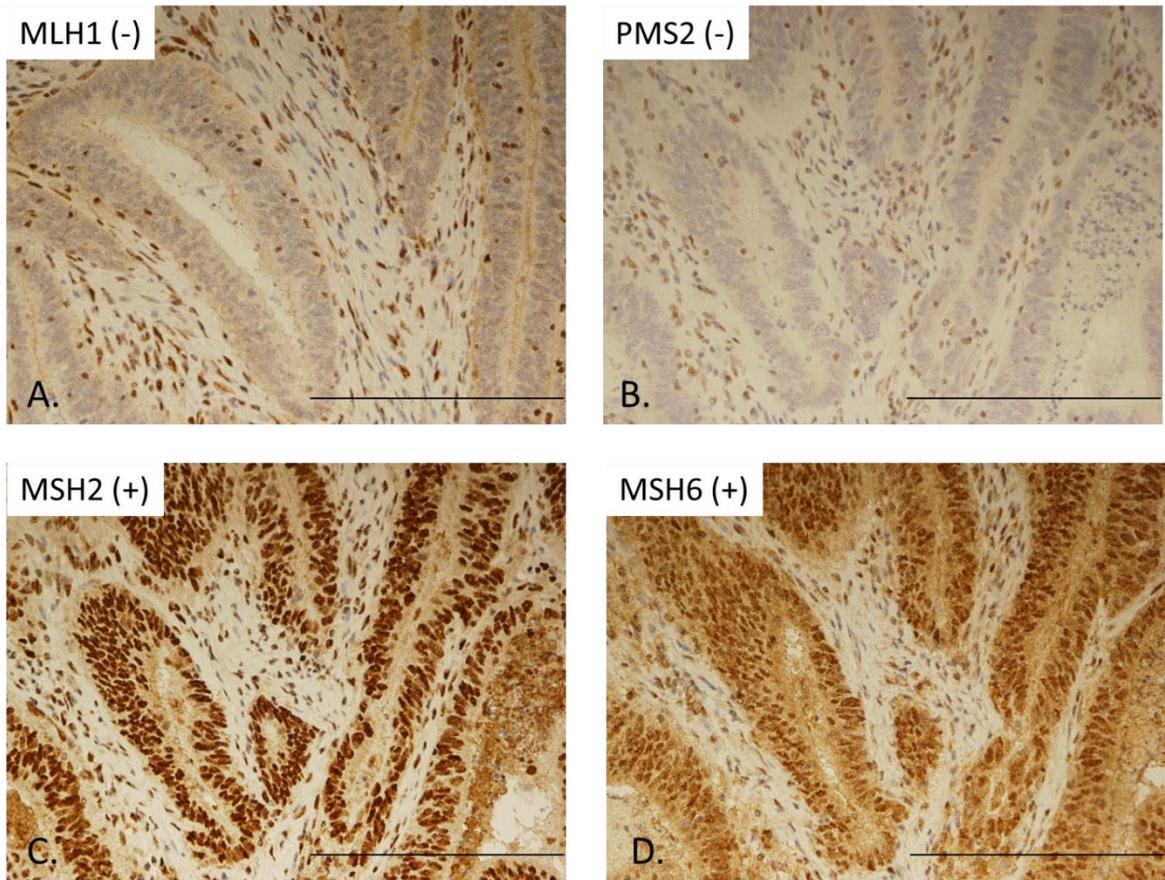


図 7. ミスマッチ修復関連抗体の免疫染色結果例

A, B ともに間質の細胞核は染色されているが腫瘍細胞の核は染色されておらず陰性の判定。C,D は腫瘍細胞の核が染色されており、陽性の判定。

— 200 $\mu$ m

A: MLH1

B: PMS2

C: MSH2

D: MSH6

### 【組織からの DNA 抽出】

大腸癌組織および対応する正常粘膜からの DNA の抽出は、QIAamp DNA FFPE Tissue (QIAGEN) を用い、製造元のマニュアルに従って施行し DNA 濃度は  $1 \text{ ng}/\mu\text{l}$  に調整して使用した。

### 【*KRAS*、*BRAF* 変異の測定】

*KRAS* はコドン 12 及び 13 の変異を、*BRAF* はコドン 600 の変異をサンガーシーケンス法を用いて測定した [54]。プライマーはカスタマイズ作製されたプライマーを用いた (表 7)。PCR 反応は Gene Amp PCR system 9700 (Applied Biosystems) を用いて 10 秒間  $98^\circ\text{C}$ 、15 秒間  $55^\circ\text{C}$ 、15 秒間  $68^\circ\text{C}$  を 35 サイクル行った。PCR 生成物は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) 上で capillary 電気泳動・シーケンスを行い、そのデータを GENESCAN (Applied Biosystems) と Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems) を用いて解析した。*BRAF* のシーケンスについては外部業者 (Eurofins Genomics) に委託した。

*KRAS*、*BRAF* の変異判定については、近年では次世代シーケンサーやパイロシーケンス、リアルタイム PCR も行われている。本研究では、変異の知られている大腸癌細胞株の実験結果を参考に判定した [55]。解析例を図 8 に示す。SW480 は *KRAS* G12V の両アレル変異を持つこと、HT29 は *KRAS* に変異を持たないことが報告されている [56]。HT29 から抽出した DNA 検体に、SW480 の DNA 検体の比率を変えて混ぜ、シーケンスを行い変異判定の参考とした。同様に HT29 は *BRAF* V600E の片側アレル変異を認めるが、SW480 では野生型であることが知られている [56]。これらを *KRAS* の実験と同様の比率で混ぜた。また、Nucleo Spin Tissue (TAKARA Bio) を用

いて細胞株からの DNA 抽出を施行した。*KRAS*、*BRAF* については、変異含有量の 25%以上を変異判定の基準として行った。

表 7. *KRAS*, *BRAF* シーケンス用プライマー

分子	配列
<i>KRAS</i>	Forward 5'-TGAATATAAACTTGTGGTAGTTGGAGC-3'
nt 25245234-25245379	Reverse 5'-GGTCCTGCACCAGTAATATGC-3'
<i>BRAF</i>	Forward 5'-ATAGGTGATTTTGGTCTAGCTACA-3'
nt 140753215-140753361	Reverse 5'-AACTCAGCAGCATCTCAGGG-3'

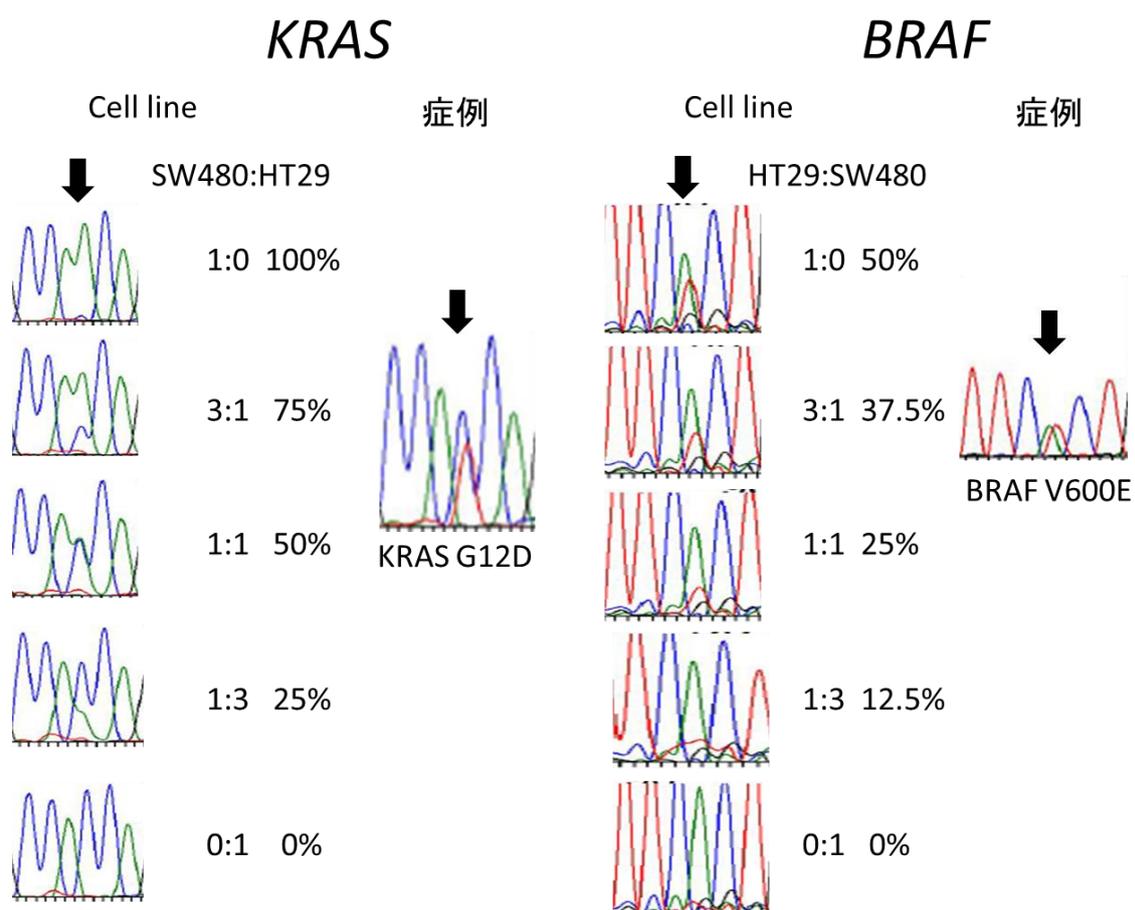


図 8. *KRAS*, *BRAF* の細胞株と症例におけるシーケンス結果例

SW480 は *KRAS* G12V の両アレル変異を認めており、HT29 は *KRAS* に変異を認めない。HT29 から抽出した DNA 検体に、SW480 の DNA 検体を比率を変えて混ぜ、PCR 及びシーケンスを行い変異判定の参考とした。同様に HT29 は *BRAF* V600E の変異を認めるが、SW480 では野生型であり、これらを *KRAS* と同様の比率で混ぜた。*KRAS*、*BRAF* の判定については、変異含有量の 25%以上を変異判定の基準とした。

## 【MSIの測定】

MSIの検討には5つのマーカー (NCIパネル: BAT25, BAT26, D2S123, D5S346, D17S250) を用い、MSI マーカーに対するプライマーはカスタマイズ作製された蛍光ラベル標識プライマーを用いた (表 8) [21, 57, 58]。PCR 反応は 95°C 10 分間のホットスタートの後、30 秒間 95°C、60 秒間 59°C、30 秒間 72°Cを 35 サイクル、そして 30 分間 70°Cの順で行った。プライマーは蛍光色素 FAM、VIC、あるいは NED で蛍光ラベルされたものを用い、PCR 生成物は ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer 上で電気泳動し、そのデータを GENESCAN (Applied Biosystemes)、Peak scanner (Thermo Fisher Scientific) を用いて解析した [59]。判定については、2 個以上のマーカーが不安定性を示した場合 MSI-High (MSI-H)、1 個のマーカーのみが不安定性を示した場合 MSI-Low (MSI-L)、いずれのマーカーにも不安定性がない場合 Microsatellite stable (MSS) と分類した [8]。解析例を図 9 に示す。

表 8. MSI 測定用プライマー

MSI マーカー		蛍光ラベル	配列
BAT25	Forward	NED	5'-TCGCCTCCAAGAATGTAAGT-3'
nt 54731985-54732108	Reverse		5'-TCTGCATTTTAACTATGGCTC-3'
BAT26	Forward	FAM	5'-TGACTACTTTTGACTTCAGCC-3'
nt 47414348-47414469	Reverse		5'-AACCATTCAACATTTTAAACCC-3'
D2S123	Forward	VIC	5'-GCCAGAGAAATTAGACACAGTG-3'
nt 51061350-51061450	Reverse		5'-CTGACTTGGATAACCATCTATCTA-3'
D5S346	Forward	FAM	5'-TACTCACTCTAGTGATAAATCGG-3'
nt 112877953-112878052	Reverse		5'-TTCAGGGAATTGAGAGTTACAG-3'
D17S250	Forward	NED	5'-AATAGACAATAAAAATATGTGTGTG-3'
nt 38995849-38995980	Reverse		5'-TATATATTTAAACCATTTGAAAGTG-3'

## MSI症例

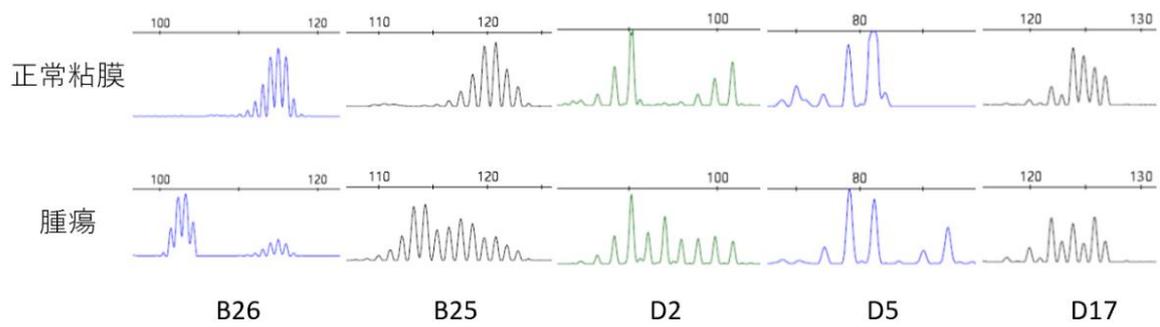


図 9. MSI のシーケンス結果例

上記の症例では B26 (BAT26), B25 (BAT25), D2 (D2S123), D5 (D5S346), D17 (D17S250) の全マーカーで正常粘膜とは異なる領域に増幅が認められるため MSI-H と判定される。

### 【*MLH1* メチル化の測定】

*MLH1* メチル化の測定は Methylation Specific PCR 法で行った [60]。バイサルファイト処理は MethylEasy Xceed Rapid DNA Bisulphite Modification kit (Takara Bio) を用い、製造元のプロトコールに従って行った。バイサルファイト処理産物に対し Episcopy MSP kit (TAKARA Bio) を用いて PCR を行った。プライマーは既存の報告で使用されているものを用い (表 9) [61]、95°C30 秒間のホットスタートの後、5 秒間 98°C、30 秒間 55°C、60 秒間 72°C の順に 40 サイクル行った。PCR 産物を 2% アガロースゲルで電気泳動し、*MLH1* のメチル化の評価を行った。大腸癌細胞株である HT29 は *MLH1* のメチル化を認める細胞株であり、SW480 は *MLH1* の非メチル化の細胞株であることから、これらをコントロールとして用いた [62]。解析例を図 10 に示す。

表 9. *MLH1* メチル化測定用プライマー

<i>MLH1</i> メチル化	配列	
<i>MLH1</i> メチル化	Forward	5'- ACGTAGACGTTTTATTAGGGTCGC -3'
Amplicon size:115bp	Reverse	5'- CCTCATCGTAACTACCCGCG -3'
<i>MLH1</i> 非メチル化	Forward	5'- TTTTGATGTAGATGTTTTATTAGGGTTGT -3'
Amplicon size:124bp	Reverse	5'- ACCACCTCATCATAACTACCCACA -3'

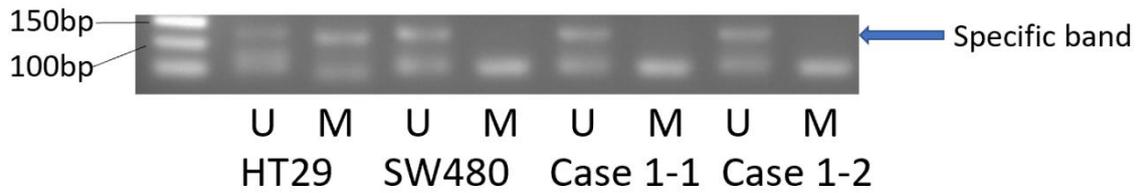


図 10. *MLHI* メチル化測定結果例

大腸癌細胞株である HT29 はメチル化を認める細胞株であり、SW480 は *MLHI* 非メチル化の細胞株であることから、これらをコントロールとして用いた。Case1-1,1-2 は SW480 と同様に *MLHI* メチル化のバンドを認めず、*MLHI* 非メチル化病変である。

略語: U, Unmethylation, 非メチル化; M, Methylation, メチル化

## 【統計学的解析】

全ての統計学的解析には JMP pro version 14 software packages (SAS Institute) を使用した。連続変数の比較には Mann-Whitney U 検定を用いた。カテゴリー変数の比較には Pearson's chi-squared 検定または Fisher の正確検定を用いた。CEA 値に関しては 5.0 ng/mL を、CA19-9 値については 37.0 ng/mL を、腫瘍径に関しては 50 mm をカットオフ値として 2 群に層別化した。一致度に関しては  $k$  統計量を用いて評価した [53]。分子サブタイプと占拠部位の関連については、Cochran-Armitage 傾向検定を用いて解析した。p 値が 0.05 未満を統計学的に有意とした。

## 2-3 実験結果

### 【多発大腸癌における MSI・KRAS・BRAF・p53 ・ $\beta$ -catenin の解析結果】

まず、多発大腸癌 59 症例における MSI、KRAS、BRAF、p53 (免疫染色) 、 $\beta$ -catenin (免疫染色) の解析結果を表 10 に示す。症例毎の解析では、MSI-H 病変を含む症例は 15.3% 、KRAS 変異は 59.3%、BRAF 変異は 20.3%、p53 免疫染色陽性は 47.5%、 $\beta$ -catenin の免疫染色陽性は 71.2%に認めた。また、本研究では MSI-low の病変は認めなかった。

多発大腸癌における MSI-H の頻度については複数の報告があり海外では 30%-37%とされている [13, 29, 39, 40]。日本での多発大腸癌における MSI-H の頻度の報告は少なく、少数例の報告で 14-21%とされており、本研究結果も同等であった [63, 64]。また、今回の多発大腸癌の MSI-H 頻度は日本における単発癌の MSI-H 頻度 (4-8% [65-67]) より高かった。多発大腸癌における BRAF 変異の頻度については、日本での報告はないため海外の報告との比較になるが、4-35%と報告されており、BRAF 変異についても本研究結果は既存の報告と同等であった [13, 28, 68]。

次いで、各症例の病変毎の分子遺伝学的解析を行った。最大深達度である第一癌と、それ以外の癌の分子変異の頻度の比較した結果を表 10 に示す。第一癌と他の癌では、MSI-H、KRAS 変異、BRAF 変異、p53 陽性、 $\beta$ -catenin 陽性の頻度に有意差を認めないことが示された。

表 10. 多発大腸癌の分子遺伝学的解析結果

		全症例*	全病変			p 値
				第一癌**	第二癌以降***	
		59 症例 (%)	130 病変(%)	59 病変(%)	71 病変(%)	
MSI	MSS	50 (84.7)	118 (90.8)	52 (88.1)	66 (92.9)	0.3453
	MSI-H	9 (15.3)	12 (9.2)	7 (11.9)	5 (7.1)	
<i>KRAS</i>	野生型	24 (40.7)	85 (65.4)	42 (71.2)	43 (60.6)	0.2033
	変異型	35 (59.3)	45 (34.6)	17 (28.8)	28 (39.4)	
<i>BRAF</i>	野生型	47 (79.7)	114 (87.7)	52 (88.1)	62 (87.3)	0.8884
	変異型	12 (20.3)	16 (12.3)	7 (11.9)	9 (12.7)	
p53 (免疫染色)	陰性	31 (52.5)	70 (53.9)	31 (52.5)	39 (54.9)	0.7858
	陽性	28 (47.5)	60 (46.1)	28 (47.5)	32 (45.1)	
β-catenin (免疫染色)	陰性	17 (28.8)	36 (27.7)	17 (28.8)	19 (26.8)	0.7947
	陽性	42 (71.2)	94 (72.3)	42 (71.2)	52 (73.2)	

\* , 変異を 1 病変以上で認めた場合は変異症例として扱う

\*\* , 各症例における最大深達度の病変

\*\*\* , 第一癌以外の全ての病変

略語: MSI, microsatellite instability; MSI-H, microsatellite instability-high;  
MSS, microsatellite stable

### 【MSI-H 病変と MSS 病変の他因子との関連性】

ここまでの解析結果から MSI-H の頻度が多発大腸癌で高い可能性が示唆されたため、多発大腸癌における MSI-H 病変の臨床病理学的・分子遺伝学的特徴を解析することとした。多発大腸癌 130 病変を MSI-H 病変と MSS 病変に分類し、臨床病理学的因子・分子遺伝学的因子との関連性を調べた結果を表 11 に示す。

結果として、MSI-H 病変は MSS 病変と比較すると、右側大腸 ( $p=0.0190$ )、低分化・粘液癌 ( $p=0.0244$ )、*BRAF* 変異 ( $p=0.0060$ ) が有意に多い結果であり、*KRAS* 変異、p53 陽性、 $\beta$ -catenin 陽性については有意差を認めなかった。MSI-H 病変が右側大腸・粘液癌・*BRAF* 変異に多いことは単発癌で知られていることであり、多発大腸癌においても同様であることが示された [8]。

表 11. MSI-H 病変と MSS 病変の比較

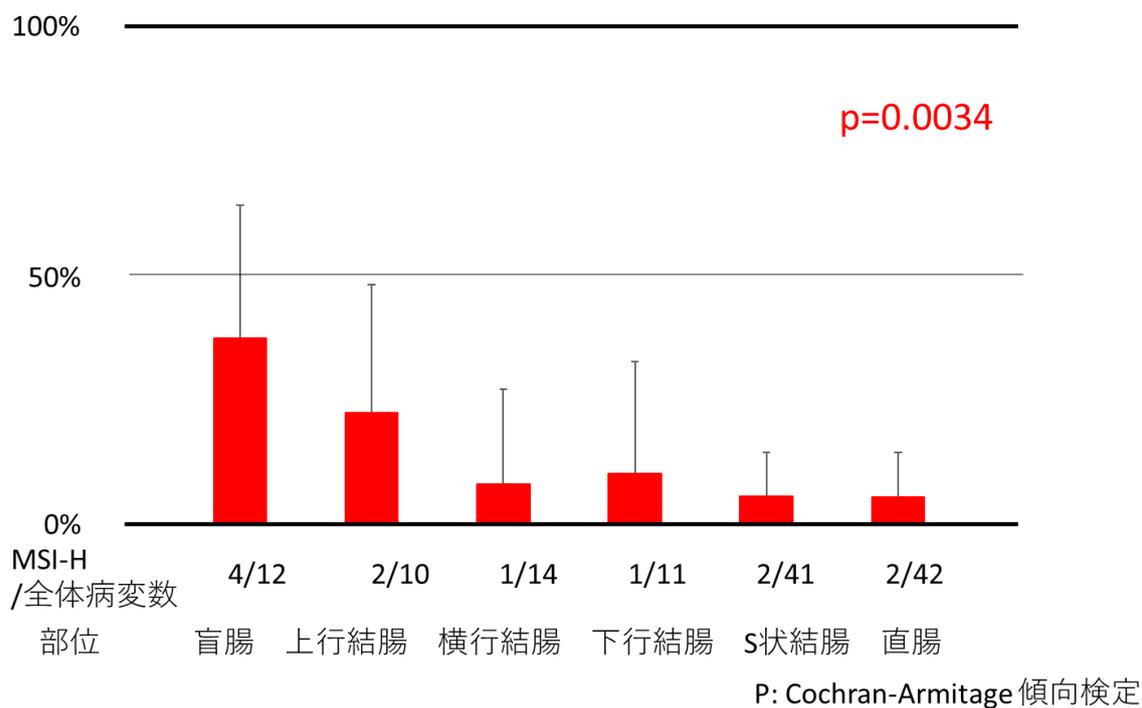
130 病変	MSI-H 病変		MSS 病変		p 値
	N=12	(%)	N=118	(%)	
腫瘍部位					
右	7	(58.3)	29	(24.6)	0.0190*
左	5	(41.7)	89	(75.4)	
深達度					
T1-2	4	(33.3)	63	(53.4)	0.1823
T3-4	8	(66.7)	55	(46.6)	
病理組織					
高-中分化	8	(66.7)	108	(91.5)	0.0244*
低分化・粘液癌	4	(33.3)	10	(8.5)	
<i>BRAF</i>					
野生型	7	(58.3)	107	(90.7)	0.0060*
変異型	5	(41.7)	11	(9.3)	
<i>KRAS</i>					
野生型	9	(75.0)	76	(64.4)	0.4516
変異型	3	(25.0)	42	(35.6)	
p53					
陰性	8	(66.7)	62	(52.5)	0.3443
陽性	4	(33.3)	56	(47.5)	
$\beta$ -catenin					
陰性	5	(41.7)	31	(26.3)	0.2735
陽性	7	(58.3)	87	(73.7)	

略語: MSI-H, microsatellite instability high; MSS, microsatellite stable

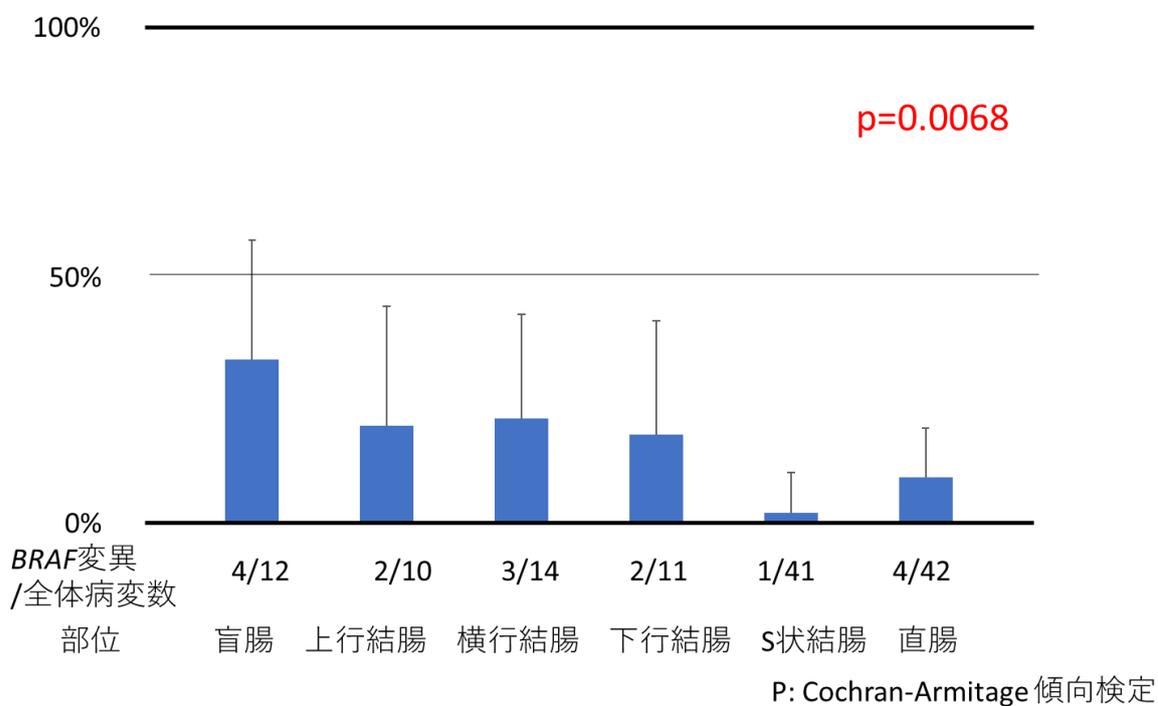
### 【病変の占拠部位と MSI, *KRAS*, *BRAF* の関係性】

次に、病変の占拠部位と MSI、*KRAS*、*BRAF* の変異状態の相関について解析した。大腸における占拠部位別の MSI-H 病変数を図 11A に示す。結果として、直腸から盲腸へと右側にいくに従い MSI-H 病変の頻度が有意に高くなることがわかった ( $p=0.0034$ )。図 11B においては病変の占拠部位が右側にいくに従い *BRAF* 変異病変の頻度が有意に高くなることが示された ( $p=0.0068$ )。*KRAS* については図 11C に示したが、占拠部位による有意差は認めなかった ( $p=0.0635$ )。

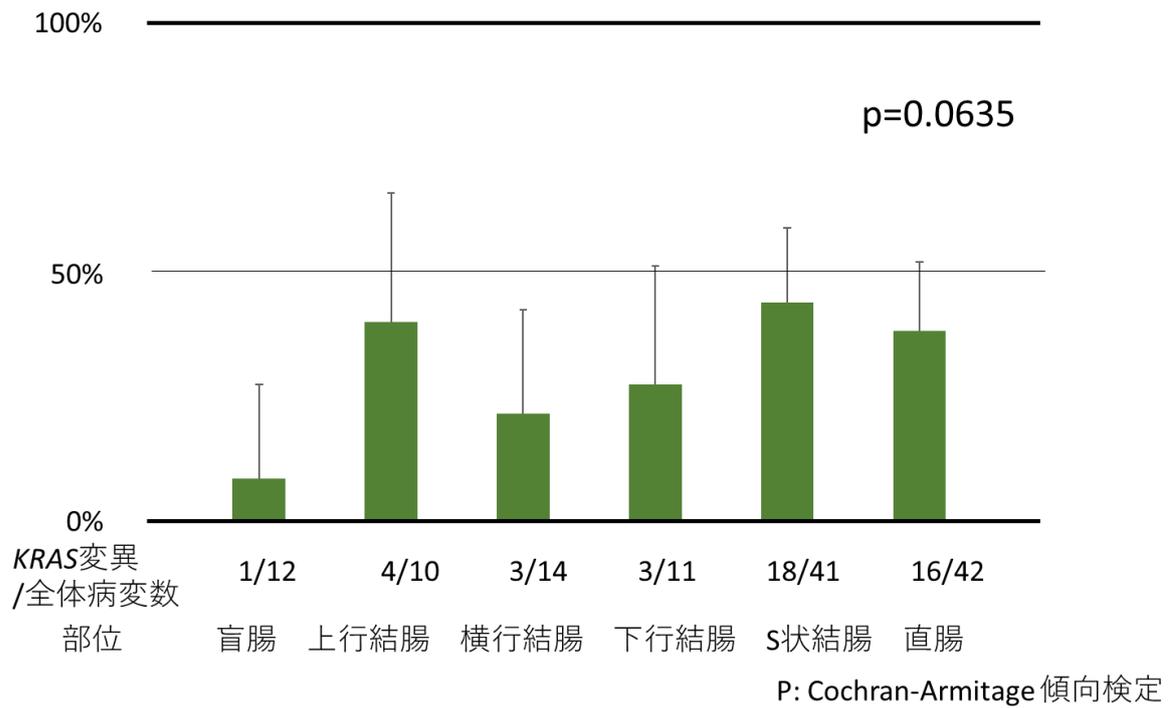
MSI-H、*BRAF* 変異が右側で多く、*KRAS* 変異は占拠部位による差がないことは単発癌でも報告されており、本研究の多発大腸癌でも単発癌の既報と同様の結果であることが示された [8, 69]。



A. 占拠部位別の MSI-H の頻度



B. 占拠部位別の BRAF 変異の頻度



### C. 占拠部位別の *KRAS* 変異の頻度

図 11 占拠部位における各分子マーカーの変異頻度  
 直腸から右側に行くにつれ MSI-H 病変の頻度が有意に高くなり ( $p=0.0034$ )、右側に行くにつれ *BRAF* 変異頻度が有意に高くなっている ( $p=0.0068$ )。  
 略語: MSI-H, microsatellite instability-high

### 【症例内での各分子の一致度】

ここまでの病変毎の解析結果では、多発大腸癌の病変は単発癌に類似した臨床病理学的・分子遺伝学的特徴を呈していることが示された。次に、多発大腸癌の発癌経路が病変間で共通であるかを調べることを目的として、同一症例内の病変間で同じ分子サブタイプを認めるかについて検討した。多発大腸癌 59 例を対象とし、症例毎に第一癌と第二癌の MSI-H、*KRAS* 変異、*BRAF* 変異、p53 陽性、 $\beta$ -catenin 陽性について解析した。第一・第二癌における各分子サブタイプ及び一致度を表 12 に示す。

結果として、MSI-H、*KRAS* 変異、*BRAF* 変異、p53 陽性、 $\beta$ -catenin 陽性の中で第一癌と第二癌の間に有意に相関が認められたものは MSI-H、*BRAF* 変異、 $\beta$ -catenin 陽性であったが、各々の一致度の  $k$  値は低かった (MSI-H,  $k$  値 = 0.3035,  $p$  値 = 0.0146; *BRAF* 変異,  $k$  値 = 0.4230,  $p$  値 = 0.0010;  $\beta$ -catenin 陽性,  $k$  値 = 0.3692,  $p$  値 = 0.0085)。また、*KRAS* 変異と p53 陽性では第一癌と第二癌の間に相関は認められなかった。以上の結果から、同じ症例内では第一癌と第二癌に共通の分子変異が生じている可能性は低いことが示唆された。

尚、3 重癌以上の 9 症例の詳細について表 13 に示す。全ての病変が MSI-H や *BRAF* 変異型、p53 陽性である症例はなく、*KRAS* 変異型であった症例を 2 例、 $\beta$ -catenin 陽性であった症例を 5 例認めた。

表 12. 症例における分子遺伝学的解析結果の一致度 (第一・第二癌)

		59 症例		一致度		
		第二癌		一致率	k 値	p 値
		MSS (%)	MSI-H (%)			
第一癌	MSS	50 (84.8)	2 (3.4)	0.88	0.3035	0.0146
	MSI-H	5 (8.5)	2 (3.4)			
		第二癌				
		<i>KRAS</i> 野生型(%)	<i>KRAS</i> 変異型(%)			
第一癌	<i>KRAS</i> 野生型	28 (47.5)	14 (23.7)	0.61	0.1262	0.3234
	<i>KRAS</i> 変異型	9 (15.3)	8 (13.6)			
		第二癌				
		<i>BRAF</i> 野生型(%)	<i>BRAF</i> 変異型(%)			
第一癌	<i>BRAF</i> 野生型	47 (79.7)	5 (8.5)	0.86	0.4230	0.0010
	<i>BRAF</i> 変異型	3 (5.1)	4 (6.8)			
		第二癌				
		p53-陰性(%)	p53-陽性(%)			
第一癌	p53-陰性	15 (25.4)	16 (27.1)	0.46	0.0876	0.5012
	p53-陽性	16 (27.2)	12 (20.3)			
		第二癌				
		$\beta$ -catenin-陰性(%)	$\beta$ -catenin-陽性(%)			
第一癌	$\beta$ -catenin-陰性	9 (15.3)	8 (13.6)	0.75	0.3692	0.0085
	$\beta$ -catenin-陽性	7 (11.9)	35 (59.3)			

表 13. 3 重癌以上の症例の解析結果

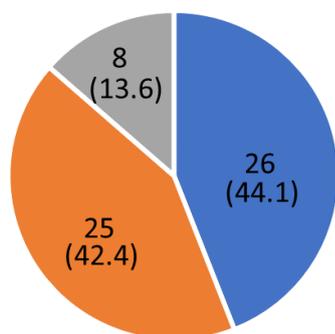
9 症例			MSI	<i>KRAS</i>	<i>BRAF</i>	p53	$\beta$ -catenin
症例 No.	病変番号	位置					
症例 4	1	S					
	2	C					
	3	D					
症例 6	1	T					
	2	A					
	3	S					
症例 7	1	C					
	2	D					
	3	A					
症例 17	1	S					
	2	S					
	3	T					
症例 19	1	R					
	2	R					
	3	R					
	4	R					
症例 20	1	S					
	2	R					
	3	R					
症例 35	1	D					
	2	A					
	3	C					
症例 47	1	R					
	2	T					
	3	S					
症例 52	1	C					
	2	S					
	3	T					
	4	T					
	5	D					

網掛けは MSI-H, *KRAS* 変異型, *BRAF* 変異型, p53 陽性,  $\beta$ -catenin 陽性病変  
 略語: C, 盲腸; A, 上行結腸; T, 横行結腸; D, 下行結腸; S, S 状結腸; R, 直腸;  
 MSI, microsatellite instability

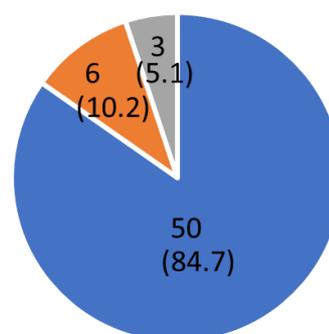
### 【*KRAS* 及び *BRAF* 変異を認める症例の頻度】

これまでの解析において、多発大腸癌における *KRAS* と *BRAF* の分子サブタイプに関して述べてきた。特に再発時の分子標的薬選択の上で問題となるのは、同一症例内の病変間において分子サブタイプが一致していない場合であり、その頻度を図 12 に示す。同一症例で *KRAS* 野生型と *KRAS* 変異型病変が混在している症例は 42.4% に、*BRAF* 野生型と *BRAF* 変異型病変が混在している症例は 10.2% に認め、*KRAS* あるいは *BRAF* のどちらかが変異を示す病変と *KRAS*・*BRAF* ともに野生型を示す病変が混在する症例は、全体の 50.8% であることが示された。

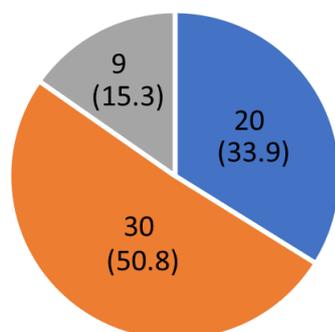
### KRAS 変異の割合



### BRAF 変異の割合



### KRAS あるいは BRAF 変異の割合



数値： 症例数 (%)

図 12. 多発大腸癌症例における病変間 *KRAS*・*BRAF* の変異の組み合わせ別頻度  
 同一症例で *KRAS* 野生型と *KRAS* 変異型病変が混在している症例は 42.4%に、*BRAF* 野生型と *BRAF* 変異型病変が混在している症例は 10.2%に認め、*KRAS* あるいは *BRAF* のどちらかが変異を示す病変と *KRAS*・*BRAF* ともに野生型を示す病変が混在する症例は、全体の 50.8%であることが示された。

### 【MSI-H 病変の分子遺伝学的解析】

MSI-H 病変を認める場合、序章でも述べたがその原因としては ① LS ② LLS ③ *MLH1* メチル化の 3 つの可能性が考えられる。そこで *MLH1* メチル化の検査及びミスマッチ修復遺伝子の免疫染色検査を用いて MSI-H の原因について詳細に検討することとした。MSI-H 病変を含む多発大腸癌 9 症例について、各病変のミスマッチ修復遺伝子 (*MLH1*、*PMS2*、*MSH2*、*MSH6*) の免疫染色及び *MLH1* のメチル化を判定し、推測される病態について表 14 に、各症例の病変の占拠部位を図 13 に示した。尚、LS と LLS の鑑別は生殖細胞系列の遺伝学的検査を施行する必要があり本研究では行っていない [70]。

MSI-H 病変である 12 病変のうち 8 病変は *MLH1* メチル化を伴っていた。病変が全て *MLH1* 非メチル化の MSI-H 病変である症例は症例 1 のみで、症例 1-3 は *MLH1* 非メチル化の MSI-H 病変を含んだ症例であった。*MLH1* 非メチル化の MSI-H 症例はミスマッチ修復遺伝子の変異を有する可能性が高いとされているため [10]、症例 1-3 は LS または LLS が疑われる症例となる。症例 4 は、第一癌は MSS であり、第二・第三癌は *MLH1* メチル化を伴う MSI-H 病変 (*MLH1/PMS2* の loss) であることから通常の MSS 経路の病変と *MLH1* メチル化病変が併存していると考えられる。症例 5-9 については、MSS 病変と *MLH1* メチル化を伴う MSI-H 病変 (*MLH1/PMS2* の loss) を認められることから、MSS 経路の病変と *MLH1* メチル化病変が併存している症例と考えられる。

以上の解析結果を踏まえ、本研究の同時性多発大腸癌 59 症例の分類を図 14 に示す。全 59 症例のうち、MSI-H を含む症例は 9 症例、その中で *MLH1* メチル化を含む症例は 7 症例であった。

表 14. MSI-H 症例での分子遺伝学的解析結果

症例	性別	年齢	家族歴	位置	MSI	メチル化	MMR	KRAS	BRAF	β-catenin	p53	Suspicious condition	
1	男	55	-	C	MSI-H	-	MSH2/MSH6	-	-	+	-	LS, LLS	
				S	MSI-H	-	MSH2/MSH6	G12D	-	+	+	LS, LLS	
2	男	68	-	S	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	G12V	-	+	-	Methyl	
				R	MSI-H	-	PMS2	-	-	+	+	LS, LLS	
3	男	53	-	S	MSS			-	+	+	+		
				R	MSI-H	-	MSH2/MSH6	-	-	-	-	-	LS, LLS
4	女	85	-	S	MSS			-	-	+	+		
				C	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	-	V600E	-	-	-	Methyl
				D	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	G12V	-	+	+	Methyl	
5	男	70		C	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	-	V600E	-	-	Methyl	
				S	MSS			-	-	-	-		
6	女	80	-	T	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	-	V600E	+	-	Methyl	
				A	MSS			-	V600E	+	+		
				S	MSS			G12V		+	-		
7	男	55	-	C	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	-	V600E	+	-	Methyl	
				D	MSS			-	-	+	-		
				A	MSS			G13D	-	-	+		
8	女	78	+	A	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	-	-	-	-	Methyl	
				S	MSS			-	-	-	-		
9	女	76	-	A	MSI-H	Methyl	MLH1/PMS2	-	V600E	-	+	Methyl	
				S	MSS			G12A	-	+	-		

略語: C, 盲腸; A, 上行結腸; T, 横行結腸; D, 下行結腸; S, S 状結腸; R, 直腸;  
 LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch like syndrome; Methyl, *MLH1* methylation;  
 MSI, microsatellite instability; MSI-H, microsatellite instability-high; MSS, microsatellite stable

MSI-H  MSS  Methyl 

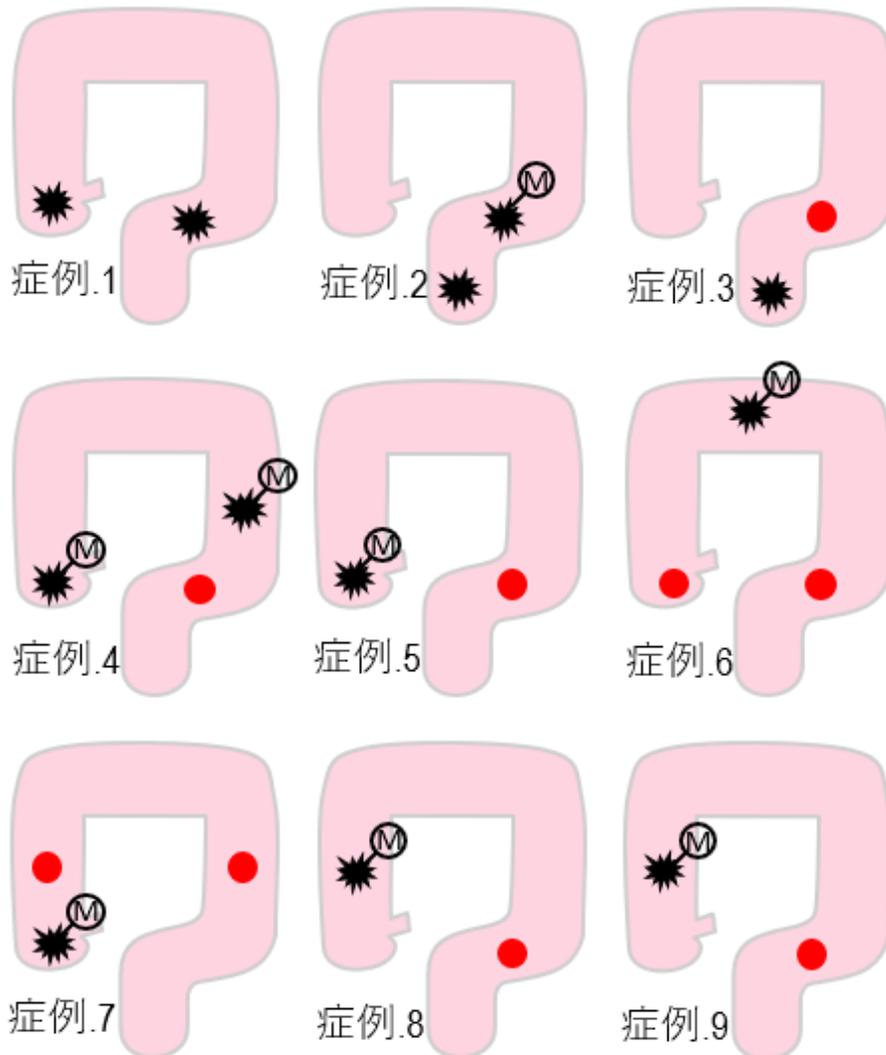


図 13. MSI-H 病変の各症例における位置関係

非メチル化の MSI-H 病変を認めるのは症例 1-3 である。MSI-H 病変は右側に多い傾向を認め、66.7% (8/12 症例) において *MLH1* メチル化を伴っている。

略語: Methyl, *MLH1* methylation;

MSI-H, microsatellite instability-high; MSS, microsatellite stable

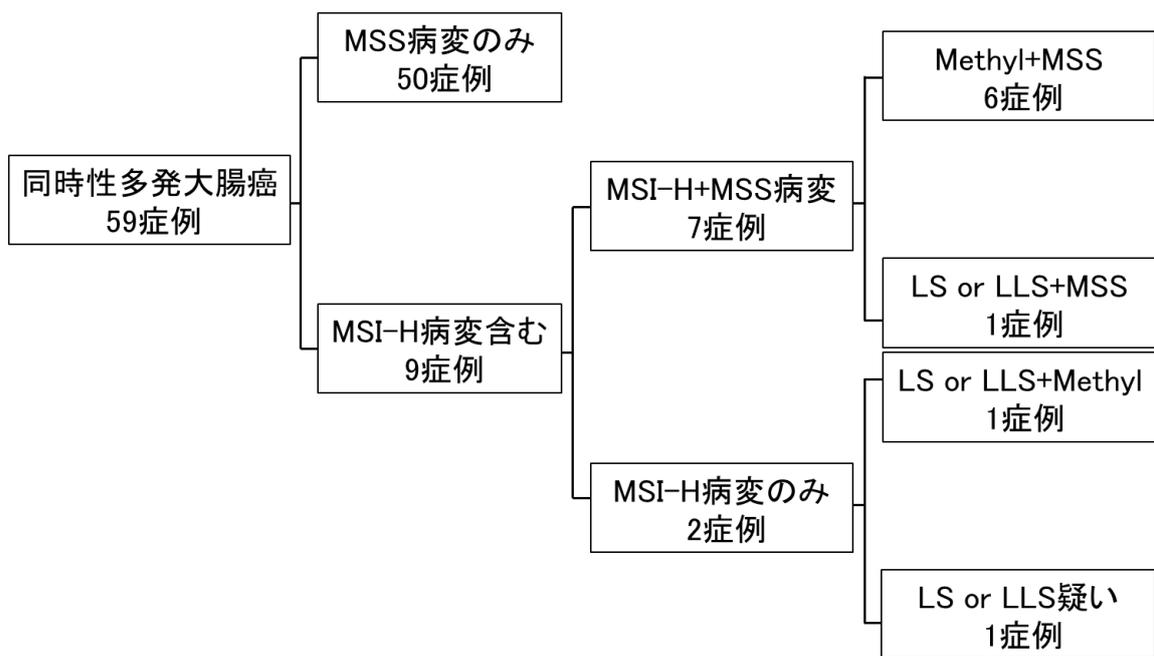


図 14. 本研究における同時性多発大腸癌の分類

全 59 症例のうち、MSI-H を含む症例は 9 症例、その中で *MLH1* メチル化を伴う症例は 7 症例であった。

略語: LS, Lynch syndrome; LLS, Lynch like syndrome;

Methyl, *MLH1* methylation;

MSI-H, microsatellite instability-high; MSS, microsatellite stable

## 2-4 考察

本研究では、多発大腸癌59症例の手術検体から採取した組織を用いて各病変のMSI-H、*KRAS*変異、*BRAF*変異、p53陽性、 $\beta$ -catenin陽性の頻度を測定し同一症例内の第一・第二癌の比較を行うことで発癌経路の特徴を検討した。その結果、同一症例内の病変間における*KRAS*、p53の相関は認めずMSI、*BRAF*、 $\beta$ -cateninの弱い相関は認めるものの一致度が低いことが示された。また、多発大腸癌のMSI-H病変においては*MLH1*のメチル化が原因となっている病変が多いことが示された。以上の結果から、多発大腸癌の発癌経路は同一症例内の病変間では異なることが多く、MSI-H病変を含む症例の背景因子として*MLH1*のメチル化病変が多い可能性が示唆された。

まず、同一症例内の病変間における分子サブタイプの一貫性が低いことについて述べる。本検討では同一症例内の病変間においてMSI経路による発癌が必ずしも共通には生じていなかった。LSのような背景因子がある場合には同一症例内の病変間では78%ですべての病変がMSI-Hとなることが報告されているが、本研究においてはすべての病変が非メチル化のMSI-Hであった症例は9症例中1症例にとどまった [43]。 $\beta$ -cateninやp53、*KRAS*はCIN経路の多段階発癌を代表する分子であるが、その分子サブタイプの一貫性が低いことは同様に同一症例内の病変間で発癌経路が共通していないことを示唆している。以上より、MSI経路とCIN経路における複数の分子サブタイプの一貫性が低いことから、同時期に同一症例内に多発する大腸癌であってもそれぞれの病変は異なる発癌経路で発生している可能性が高いことが示された。また、本研究では同一症例内の病変間で*KRAS*・*BRAF*の分子サブタイプが異なる症例は多発大腸癌の半数近くに上ることが示された。多発大腸癌の*KRAS*・*BRAF*の分子サブ

タイプ的一致について報告した論文は背景で述べた症例数の少ない一編のみであり、本研究の結果は重要である [46]。

大腸癌におけるプレシジョンメディシンに関係する分子標的薬としては、*KRAS*や*BRAF*野生型大腸癌に対する抗EGFR抗体や、*MSI-H*大腸癌に対する免疫チェックポイント阻害剤が知られている [71, 72]。多発大腸癌において、*KRAS*、*BRAF*あるいは*MSI*が同一症例内の病変間で異なる分子サブタイプを示す場合、切除不能進行再発大腸癌に対する薬物療法の選択には再発巣の分子サブタイプの評価が望ましいと考えられる。腹腔内の再発巣の切除が困難な場合は、CTガイド下生検による再発巣の組織採取は選択肢の一つとなる [73]。また、将来的には、腫瘍組織由来の血中cell free DNAから分子サブタイプを調べるリキッドバイオプシーも臨床応用される可能性がある [74]。これらの点から、同一症例内の病変間の分子サブタイプが各々異なることが本研究で示されたことは分子標的薬の選択という観点から臨床的に重要であると考えられた。

次に、*MSI-H*の機序について述べる。*MSI-H*病変については*MLH1*のメチル化状態を調べることにより、*MSI-H*の原因が*MLH1*メチル化か、非メチル化に大別できる [8]。*MLH1*非メチル化病変はさらにLSとLLSに分かれるが、これを正確に鑑別するには生殖細胞系列の遺伝学的検査を行う必要があり、本研究では*MLH1*メチル化と非メチル化の鑑別にとどめた。本研究では*MSI-H*の12病変中8病変、*MSI-H*を含む9症例中7症例については*MSI-H*の原因は*MLH1*のメチル化であることが示された (表14)。そのうち6症例は*MSI-H*と*MSS*の病変を同一症例内に認める症例であった。*MSI*経路の中でも*MLH1*のメチル化による発癌と、*MSS*経路が同一症例内に共存しているという点はcarcinogenesisを考えるうえで興味深い。また、全病変が*MSI-H*を示している症例

は2症例のみであった。症例2は*MLH1*のメチル化と非メチル化の病変が共存しており、この症例についても2つの病変がMSI-Hでありながら病変間の発癌経路は異なっていることが示唆された (図13)。症例1については2病変共に*MLH1*の非メチル化を示していることからLSあるいはLLSを疑う症例であり、さらに2病変共にミスマッチ修復遺伝子の免疫染色においてMSH2/MSH6のlossを認めた。これらの状況から、*MSH2*に2病変共に偶然somatic double mutationをきたした可能性もあるが、*MSH2*に生殖細胞系列の変異を有するLSの可能性が高い症例と考えられる (図13)。以上より、多発大腸癌の発癌においても、MSI-Hの原因として*MLH1*のメチル化の頻度が高いという可能性が示唆された。

最後に、本研究におけるlimitationについて述べる。第一に、ミスマッチ修復遺伝子の生殖細胞系列での遺伝学的検査をしておらず、LSの確定診断、LS・LLSの鑑別は行っていない点である。本研究のみならず、日本においてはLSの実数把握がされていないなどの問題があるが、特に生殖細胞系列の遺伝学的検査については倫理面や個人情報保護の観点から今後も極めて慎重に行っていく必要がある。第二に本研究では*RAS*の評価は*KRAS* コドン12, 13のみに対し施行しており、All *RAS*検査を施行していない。また、網羅的に次世代シーケンサーを使用すればより詳細な検討も可能になると考えられる。本研究ではコストの観点からも文献的にAll *RAS*の90.2%を占めると報告されている*KRAS*コドン12, 13の変異に焦点をあて [75, 76]、*KRAS*コドン12,13以外の*RAS*については対象外とした。第三に、DNA抽出においては、用手的にFFPE検体から削り出しを行っているため間質細胞の混入を完全に否定することは困難である。その点については顕微鏡下で腫瘍細胞を確認しながら施行することで、混入を最小限度にとどめたが、腫瘍含有量に影響を与えている可能性は否定できず、limitationと

考える。第四に、単発癌の分子サブタイプを評価できていないことが挙げられる。本研究の主眼は多発大腸癌の同一症例内の病変間における分子サブタイプの解析であり、単発癌との比較については過去の文献を参考とすることで対応した。第五に本研究では多発大腸癌症例の病変間の *heterogeneity* を解析の対象とし、腫瘍内の *heterogeneity* については調べていない。Watanabeらの大腸癌における腫瘍内*KRAS*変異についての*heterogeneity*に関する文献によると、原発病変と転移病変との間に *heterogeneity* を認める場合は、原発病変内で腫瘍内*heterogeneity* を認めることが報告されている [77]。腫瘍内*heterogeneity* を認める場合は原発巣と転移巣での分子サブタイプが異なる可能性があり、そのことは分子標的薬の選択において重要である。今後は多発大腸癌においても腫瘍内*heterogeneity* の解析が望まれる。

本研究では、同一症例内では病変間の多くの遺伝子変異の一致度が低いこと、*MSI-H* を含む症例は*MLH1* のメチル化が関与した散发性*MSI-H* と考えられる病変が大半を占めていることが示された。このことから、多発大腸癌において同一症例内では各病変は独立した経路で発生している可能性が示唆される。その中には*LS* のような特殊な症例が含まれる可能性も否定はできないが、多くは別個に発生してきた病変で形成されるものであると考えられる。

## 2-5 小括

多発大腸癌において、同一症例内の病変間では多くの分子サブタイプの一貫度は低く、多発大腸癌のMSI-H病変では、*MLH1*メチル化による発癌が多いことが示された。

## 結論

本研究では同時性多発大腸癌の臨床病理学的・分子学的解析をテーマとして、臨床情報および手術検体を使用して解析を行い、以下の結果を得た。

1. 無再発生存率は多発大腸癌患者で単発癌患者と比較し有意に低く、多発大腸癌が独立した予後不良因子の一つであったが、全生存率では予後因子とはならなかった。
2. 多発大腸癌の同一症例内の病変間の分子サブタイプの一致度は低い。また、多発大腸癌の MSI-H 病変では *MLH1* メチル化の関与した散発性 MSI-H 病変が多いことが示された。

以上より、多発大腸癌においても同一症例内で各病変は独立した分子遺伝学的経路で発生してきており、多くは別個に発生してきた腫瘍である可能性が高いことが示唆された。多発大腸癌患者の再発率は高く、個々の病変の分子サブタイプが異なる可能性があることを踏まえて、分子標的薬の選択の際には再発巣の分子サブタイプを調べるのが望ましいと考えられた。

## 謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 石原聡一郎教授、並びに故 渡邊聡明前教授には研究全般にわたり多大なる御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝致します。また、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科 畑啓介特任講師、山本陽子先生には、具体的な実験方法、データの解釈、研究の進め方、また論文の作成など、多岐に渡る詳細な御指導を頂き、深く感謝いたします。

また、実際の実験に際しましては、多くの先生方に多大なる御協力を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

## 引用文献

1. Arnold M, Sierra MS, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F. Global patterns and trends in colorectal cancer incidence and mortality. *Gut*. 66(4): 683-691. 2017.
2. Hori M, Matsuda T, Shibata A, Katanoda K, Sobue T, Nishimoto H, et al. Cancer incidence and incidence rates in Japan in 2009: a study of 32 population-based cancer registries for the Monitoring of Cancer Incidence in Japan (MCIJ) project. *Japanese journal of clinical oncology*. 2015;45(9):884-91.
3. Van Cutsem E, Cervantes A, Adam R, Sobrero A, Van Krieken JH, Aderka D, Aranda Aguilar E, Bardelli A, Benson A, Bodoky G, Ciardiello F, D'Hoore A, Diaz-Rubio E, Douillard JY, Ducreux M, Falcone A, Grothey A, Gruenberger T, Haustermans K, Heinemann V, Hoff P, Köhne CH, Labianca R, Laurent-Puig P, Ma B, Maughan T, Muro K, Normanno N, Österlund P, Oyen WJG, Papamichael D, Pentheroudakis G, Pfeiffer P, Price TJ, Punt C, Rieke J, Roth A, Salazar R, Scheithauer W, Schmoll HJ, Tabernero J, Taïeb J, Tejpar S, Wasan H, Yoshino T, Zaanan A, Arnold D. ESMO consensus guidelines for the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Annals of Oncology*. 27(8): 1386-1422. 2016.
4. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 487(7407): 330-337. 2012.
5. Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE, Hamilton SR, Preisinger AC, Nakamura Y, White R. Allelotype of colorectal carcinomas. *Science (New York, NY)*. 244(4901): 207-211. 1989.
6. Pino MS, Chung DC. The chromosomal instability pathway in colon cancer.

- Gastroenterology. 138(6): 2059-2072. 2010.
7. Leggett B, Whitehall V. Role of the serrated pathway in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 138(6): 2088-2100. 2010.
  8. Boland CR, Goel A. Microsatellite instability in colorectal cancer. *Gastroenterology*. 138(6): 2073-2087.e2073. 2010.
  9. Ogino S, Nosho K, Kirkner GJ, Kawasaki T, Jeffrey AM, Massimiliano L, Edward LG, Charles SF. CpG island methylator phenotype, microsatellite instability, BRAF mutation and clinical outcome in colon cancer. *Gut*. 58: 90—96. 2009
  10. Lynch HT, Lynch PM, Lanspa SJ, Snyder CL, Lynch JF, Boland CR. Review of the Lynch syndrome: history, molecular genetics, screening, differential diagnosis, and medicolegal ramifications. *Clinical genetics*. 76(1): 1-18. 2009.
  11. Xiao Y, Freeman GJ. The microsatellite instable subset of colorectal cancer is a particularly good candidate for checkpoint blockade immunotherapy. *Cancer discovery*. 5(1): 16-18. 2015.
  12. Lam AK, Chan SS, Leung M. Synchronous colorectal cancer: clinical, pathological and molecular implications. *World journal of gastroenterology*. 20(22): 6815-6820. 2014.
  13. Nosho K, Kure S, Irahara N, Shima K, Baba Y, Spiegelman D, Meyerhardt JA, Giovannucci EL, Fuchs CS, Ogino S. A prospective cohort study shows unique epigenetic, genetic, and prognostic features of synchronous colorectal cancers. *Gastroenterology*. 137(5): 1609-1620.e1601-1603. 2009.
  14. Billroth T. *Die allgemeine chirurgische pathologie und therapie*: G. Reimer; 1889.
  15. Warren S, Gates O. Multiple primary malignant tumors: survey of the literature and statistical study. *Am J Cancer* 16: 1358-1414. 1932.

16. Huang CS, Yang SH, Lin CC, Lan YT, Chang SC, Wang HS, Chen WS, Lin TC, Lin JK, Jiang JK. Synchronous and metachronous colorectal cancers: distinct disease entities or different disease courses? *Hepato-gastroenterology*. 62(138): 286-290. 2015.
17. Latournerie M, Jooste V, Cottet V, Lepage C, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and prognosis of synchronous colorectal cancers. *The British journal of surgery*. 95(12): 1528-1533. 2008.
18. Yang J, Peng JY, Chen W. Synchronous colorectal cancers: a review of clinical features, diagnosis, treatment, and prognosis. *Digestive surgery*. 28(5-6): 379-385. 2011.
19. Mulder SA, Kranse R, Damhuis RA, de Wilt JH, Ouwendijk RJ, Kuipers EJ, van Leerdam ME. Prevalence and prognosis of synchronous colorectal cancer: a Dutch population-based study. *Cancer epidemiology*. 35(5): 442-447. 2011.
20. Ishida H, Yamaguchi T, Tanakaya K, Akagi K, Inoue Y, Kumamoto K, Shimodaira H, Sekine S, Tanaka T, Chino A, Tomita N, Nakajima T, Hasegawa H, Hinoi T, Hirasawa A, Miyakura Y, Murakami Y, Muro K, Ajioka Y, Hashiguchi Y, Ito Y, Saito Y, Hamaguchi T, Ishiguro M, Ishihara S, Kanemitsu Y, Kawano H, Kinugasa Y, Kokudo N, Murofushi K, Nakajima T, Oka S, Sakai Y, Tsuji A, Uehara K, Ueno H, Yamazaki K, Yoshida M, Yoshino T, Boku N, Fujimori T, Itabashi M, Koinuma N, Morita T, Nishimura G, Sakata Y, Shimada Y, Takahashi K, Tanaka S, Tsuruta O, Yamaguchi T, Sugihara K, Watanabe T, Japanese Society for Cancer of the C, Rectum. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) Guidelines 2016 for the Clinical Practice of Hereditary Colorectal Cancer (Translated Version). *Journal of the Anus, Rectum and Colon*. 2(Suppl.I): S1-S51.

- 2018.
21. Umar A, Boland CR, Terdiman JP, Syngal S, de la Chapelle A, Ruschoff J, Fishel R, Lindor NM, Burgart LJ, Hamelin R, Hamilton SR, Hiatt RA, Jass J, Lindblom A, Lynch HT, Peltomaki P, Ramsey SD, Rodriguez-Bigas MA, Vasen HF, Hawk ET, Barrett JC, Freedman AN, Srivastava S. Revised Bethesda Guidelines for hereditary nonpolyposis colorectal cancer (Lynch syndrome) and microsatellite instability. *Journal of the National Cancer Institute*. 96(4): 261-268. 2004.
  22. Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *Journal of medical genetics*. 36(11): 801-818. 1999.
  23. Passman MA, Pommier RF, Vetto JT. Synchronous colon primaries have the same prognosis as solitary colon cancers. *Diseases of the colon and rectum*. 39(3): 329-334. 1996.
  24. Oya M, Takahashi S, Okuyama T, Yamaguchi M, Ueda Y. Synchronous colorectal carcinoma: clinico-pathological features and prognosis. *Japanese journal of clinical oncology*. 33(1): 38-43. 2003.
  25. Chen HS, Sheen-Chen SM. Synchronous and "early" metachronous colorectal adenocarcinoma: analysis of prognosis and current trends. *Diseases of the colon and rectum*. 43(8): 1093-1099. 2000.
  26. Papadopoulos V, Michalopoulos A, Basdanis G, Papapolychroniadis K, Paramythiotis D, Fotiadis P, Berovalis P, Harlaftis N. Synchronous and metachronous colorectal carcinoma. *Techniques in coloproctology*. 8 Suppl 1: s97-s100. 2004.
  27. Lam AK, Carmichael R, Gertraud Buettner P, Gopalan V, Ho YH, Siu S. Clinicopathological significance of synchronous carcinoma in colorectal cancer.

- American journal of surgery. 202(1): 39-44. 2011.
28. Bae JM, Cho NY, Kim TY, Kang GH. Clinicopathologic and molecular characteristics of synchronous colorectal cancers: heterogeneity of clinical outcome depending on microsatellite instability status of individual tumors. *Diseases of the colon and rectum*. 55(2): 181-190. 2012.
  29. Hu H, Chang DT, Nikiforova MN, Kuan SF, Pai RK. Clinicopathologic features of synchronous colorectal carcinoma: A distinct subset arising from multiple sessile serrated adenomas and associated with high levels of microsatellite instability and favorable prognosis. *The American journal of surgical pathology*. 37(11): 1660-1670. 2013.
  30. Malesci A, Basso G, Bianchi P, Fini L, Grizzi F, Celesti G, Di Caro G, Delconte G, Dattola F, Repici A, Roncalli M, Montorsi M, Laghi L. Molecular heterogeneity and prognostic implications of synchronous advanced colorectal neoplasia. *British journal of cancer*. 110(5): 1228-1235. 2014.
  31. Kato T, Alonso S, Muto Y, Noda H, Miyakura Y, Suzuki K, Tsujinaka S, Saito M, Perucho M, Rikiyama T. Clinical characteristics of synchronous colorectal cancers in Japan. *World journal of surgical oncology*. 14(1): 272. 2016.
  32. Gospodarowicz MK, Brierley JD, Wittekind C. *TNM classification of malignant tumours*: John Wiley & Sons; 2017.
  33. Shibata J, Kawai K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Hata K, Nozawa H, Kazama S, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Kitayama J, Sugihara K, Watanabe T. Prognostic Impact of Histologic Type in Curatively Resected Stage IV Colorectal Cancer: A Japanese Multicenter Retrospective Study. *Ann Surg Oncol*. 22: 621-629. 2015

34. Guinney J, Dienstmann R, Wang X, de Reynies A, Schlicker A, Sonesson C, Marisa L, Roepman P, Nyamundanda G, Angelino P, Bot BM, Morris JS, Simon IM, Gerster S, Fessler E, De Sousa EMF, Missiaglia E, Ramay H, Barras D, Homicsko K, Maru D, Manyam GC, Broom B, Boige V, Perez-Villamil B, Laderas T, Salazar R, Gray JW, Hanahan D, Tabernero J, Bernards R, Friend SH, Laurent-Puig P, Medema JP, Sadanandam A, Wessels L, Delorenzi M, Kopetz S, Vermeulen L, Tejpar S. The consensus molecular subtypes of colorectal cancer. *Nature medicine*. 21(11): 1350-1356. 2015.
35. Margonis GA, Buettner S, Andreatos N, Kim Y, Wagner D, Sasaki K, Beer A, Schwarz C, Loes IM, Smolle M, Kamphues C, He J, Pawlik TM, Kaczirek K, Poultsides G, Lonning PE, Cameron JL, Burkhart RA, Gerger A, Aucejo FN, Kreis ME, Wolfgang CL, Weiss MJ. Association of BRAF Mutations With Survival and Recurrence in Surgically Treated Patients With Metastatic Colorectal Liver Cancer. *JAMA surgery*. 153(7): e180996. 2018.
36. Adloff M, Arnaud JP, Bergamaschi R, Schloegel M. Synchronous carcinoma of the colon and rectum: prognostic and therapeutic implications. *American journal of surgery*. 157(3): 299-302. 1989.
37. Jass JR, Do KA, Simms LA, Iino H, Wynter C, Pillay SP, Searle J, Radford-Smith G, Young J, Leggett B. Morphology of sporadic colorectal cancer with DNA replication errors. *Gut*. 42(5): 673-679. 1998.
38. Grady WM, Carethers JM. Genomic and epigenetic instability in colorectal cancer pathogenesis. *Gastroenterology*. 135(4): 1079-1099. 2008.
39. Pedroni M, Tamassia MG, Percesepe A, Roncucci L, Benatti P, Lanza G, Jr., Gafa R, Di Gregorio C, Fante R, Losi L, Gallinari L, Scorcioni F, Vaccina F, Rossi G,

- Cesinaro AM, Ponz de Leon M. Microsatellite instability in multiple colorectal tumors. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 81(1): 1-5. 1999.
40. Dykes SL, Qui H, Rothenberger DA, Garcia-Aguilar J. Evidence of a preferred molecular pathway in patients with synchronous colorectal cancer. *Cancer*. 98(1): 48-54. 2003.
41. Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Willen R, Carlsson G, Spears CP, Larsson L, Gustavsson B. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 9(16 Pt 1): 6012-6019. 2003.
42. Giovannucci E, Ogino S. DNA methylation, field effects, and colorectal cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 97(18): 1317-1319. 2005.
43. Roth RM, Haraldsdottir S, Hampel H, Arnold CA, Frankel WL. Discordant Mismatch Repair Protein Immunoreactivity in Lynch Syndrome-Associated Neoplasms: A Recommendation for Screening Synchronous/Metachronous Neoplasms. *American journal of clinical pathology*. 146(1): 50-56. 2016.
44. Zauber P, Huang J, Sabbath-Solitare M, Marotta S. Similarities of molecular genetic changes in synchronous and metachronous colorectal cancers are limited and related to the cancers' proximities to each other. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 15(5): 652-660. 2013.
45. Jesinghaus M, Pfarr N, Kloor M, Endris V, Tavernar L, Muckenhuber A, von Knebel Doeberitz M, Penzel R, Weichert W, Stenzinger A. Genetic heterogeneity in synchronous colorectal cancers impacts genotyping approaches and therapeutic

- strategies. *Genes, chromosomes & cancer*. 55(3): 268-277. 2016.
46. Giannini R, Lupi C, Loupakis F, Servadio A, Cremolini C, Sensi E, Chiarugi M, Antoniotti C, Basolo F, Falcone A, Fontanini G. and genotyping of synchronous colorectal carcinomas. *Oncology letters*. 7(5): 1532-1536. 2014.
  47. Harada Y, Kazama S, Morikawa T, Murono K, Yasuda K, Otani K, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Nozawa H, Yamaguchi H, Ishihara S, Watanabe T. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 and CD133 expression is associated with tumor progression and resistance to preoperative chemoradiotherapy in low rectal cancer. *Oncology letters*. 14(6): 7791-7798. 2017.
  48. Reles A, Schmider A, Press MF, Schonborn I, Friedmann W, Huber-Schumacher S, Strohmeyer T, Lichtenegger W. Immunostaining of p53 protein in ovarian carcinoma: correlation with histopathological data and clinical outcome. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 122(8): 489-494. 1996.
  49. Eguchi K, Yao T, Konomoto T, Hayashi K, Fujishima M, Tsuneyoshi M. Discordance of p53 mutations of synchronous colorectal carcinomas. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 13(2): 131-139. 2000.
  50. Morin PJ, Kinzler KW, Sparks AB. beta-Catenin Mutations: Insights into the APC Pathway and the Power of Genetics. *Cancer research*. 76(19): 5587-5589. 2016.
  51. Jass JR, Biden KG, Cummings MC, Simms LA, Walsh M, Schoch E, Meltzer SJ, Wright C, Searle J, Young J, Leggett BA. Characterisation of a subtype of colorectal cancer combining features of the suppressor and mild mutator pathways. *Journal of clinical pathology*. 52(6): 455-460. 1999.

52. Nakano K, Yamamoto H, Fujiwara M, Koga Y, Tsuruta S, Ihara E, Oki E, Nakamura M, Ogawa Y, Oda Y. Clinicopathologic and Molecular Characteristics of Synchronous Colorectal Carcinoma With Mismatch Repair Deficiency. *The American journal of surgical pathology*. 42(2): 172-182. 2018.
53. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 33(1): 159-174. 1977.
54. Arakawa K, Hata K, Yamamoto Y, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Kawai K, Nozawa H, Yoshida M, Fukuhara H, Fujishiro M, Morikawa T, Yamasoba T, Koike K, Fukayama M, Watanabe T. Nine primary malignant neoplasms-involving the esophagus, stomach, colon, rectum, prostate, and external ear canal-without microsatellite instability: a case report. *BMC cancer*. 18(1): 24. 2018.
55. Malapelle U, Bellevicine C, Salatiello M, de Luca C, Rispo E, Riccio P, Sparano L, De Stefano A, Carlomagno C, Maiello FM, Vita G, Nappi O, Troncone G. Sanger sequencing in routine KRAS testing: a review of 1720 cases from a pathologist's perspective. *Journal of clinical pathology*. 65(10): 940-944. 2012.
56. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknaes M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2: e71. 2013.
57. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer research*. 58(22): 5248-5257. 1998.

58. Umetani N, Sasaki S, Watanabe T, Ishigami H, Ueda E, Nagawa H. Diagnostic primer sets for microsatellite instability optimized for a minimal amount of damaged DNA from colorectal tissue samples. *Annals of surgical oncology*. 7(4): 276-280. 2000.
59. Tanaka J, Watanabe T, Kanazawa T, Tada T, Kazama Y, Tanaka T, Nagawa H. Left-Sided microsatellite unstable colorectal cancers show less frequent methylation of hMLH1 and CpG island methylator phenotype than right-sided ones. *Journal of surgical oncology*. 96(7): 611-618. 2007.
60. Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 95(12): 6870-6875. 1998.
61. de Maat MF, Narita N, Benard A, Yoshimura T, Kuo C, Tollenaar RA, de Miranda NF, Turner RR, van de Velde CJ, Morreau H, Hoon DS. Development of sporadic microsatellite instability in colorectal tumors involves hypermethylation at methylated-in-tumor loci in adenoma. *The American journal of pathology*. 177(5): 2347-2356. 2010.
62. Herman JG, Graff JR, Myohanen S, Nelkin BD, Baylin SB. Methylation-specific PCR: a novel PCR assay for methylation status of CpG islands. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 93(18): 9821-9826. 1996.
63. Abe Y, Masuda H. Genetic alterations of sporadic colorectal cancer with microsatellite instability, especially characteristics of primary multiple colorectal

- cancers. *Journal of surgical oncology*. 74(4): 249-256. 2000.
64. Kamiyama H, Suzuki K, Maeda T, Koizumi K, Miyaki Y, Okada S, Kawamura YJ, Samuelsson JK, Alonso S, Konishi F, Perucho M. DNA demethylation in normal colon tissue predicts predisposition to multiple cancers. *Oncogene*. 31(48): 5029-5037. 2012.
65. Kumamoto K, Ishida H, Suzuki O, Tajima Y, Chika N, Kuwabara K, Ishibashi K, Saito K, Nagata K, Eguchi H, Tamaru J, Iwama T. Lower prevalence of Lynch syndrome in colorectal cancer patients in a Japanese hospital-based population. *Surgery today*. 46(6): 713-720. 2016.
66. Ishikubo T, Nishimura Y, Yamaguchi K, Khansuwan U, Arai Y, Kobayashi T, Ohkura Y, Hashiguchi Y, Tanaka Y, Akagi K. The clinical features of rectal cancers with high-frequency microsatellite instability (MSI-H) in Japanese males. *Cancer letters*. 216(1): 55-62. 2004.
67. Kadowaki S, Kakuta M, Takahashi S, Takahashi A, Arai Y, Nishimura Y, Yatsuoka T, Ooki A, Yamaguchi K, Matsuo K, Muro K, Akagi K. Prognostic value of KRAS and BRAF mutations in curatively resected colorectal cancer. *World journal of gastroenterology*. 21(4): 1275-1283. 2015.
68. Balschun K, Haag J, Wenke AK, von Schonfels W, Schwarz NT, Rocken C. KRAS, NRAS, PIK3CA exon 20, and BRAF genotypes in synchronous and metachronous primary colorectal cancers diagnostic and therapeutic implications. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 13(4): 436-445. 2011.
69. Sinicrope FA, Mahoney MR, Yoon HH, Smyrk TC, Thibodeau SN, Goldberg RM, Nelson GD, Sargent DJ, Alberts SR. Analysis of Molecular Markers by Anatomic Tumor Site in Stage III Colon Carcinomas from Adjuvant Chemotherapy Trial

- NCCTG N0147 (Alliance). *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 21(23): 5294-5304. 2015.
70. Mensenkamp AR, Vogelaar IP, van Zelst-Stams WA, Goossens M, Ouchene H, Hendriks-Cornelissen SJ, Kwint MP, Hoogerbrugge N, Nagtegaal ID, Ligtenberg MJ. Somatic mutations in MLH1 and MSH2 are a frequent cause of mismatch-repair deficiency in Lynch syndrome-like tumors. *Gastroenterology*. 146(3): 643-646.e648. 2014.
71. Benson AB, 3rd, Venook AP, Cederquist L, Chan E, Chen YJ, Cooper HS, Deming D, Engstrom PF, Enzinger PC, Fichera A, Grem JL, Grothey A, Hochster HS, Hoffe S, Hunt S, Kamel A, Kirilcuk N, Krishnamurthi S, Messersmith WA, Mulcahy MF, Murphy JD, Nurkin S, Saltz L, Sharma S, Shibata D, Skibber JM, Sofocleous CT, Stoffel EM, Stotsky-Himelfarb E, Willett CG, Wu CS, Gregory KM, Freedman-Cass D. Colon Cancer, Version 1.2017, NCCN Clinical Practice Guidelines in Oncology. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 15(3): 370-398. 2017.
72. Le DT, Uram JN, Wang H, Bartlett BR, Kemberling H, Eyring AD, Skora AD, Luber BS, Azad NS, Laheru D, Biedrzycki B, Donehower RC, Zaheer A, Fisher GA, Crocenzi TS, Lee JJ, Duffy SM, Goldberg RM, de la Chapelle A, Koshiji M, Bhaijee F, Huebner T, Hruban RH, Wood LD, Cuka N, Pardoll DM, Papadopoulos N, Kinzler KW, Zhou S, Cornish TC, Taube JM, Anders RA, Eshleman JR, Vogelstein B, Diaz LA, Jr. PD-1 Blockade in Tumors with Mismatch-Repair Deficiency. *The New England journal of medicine*. 372(26): 2509-2520. 2015.
73. Schiavon LHO, Tyng CJ, Travesso DJ, Rocha RD, Schiavon A, Bitencourt AGV. Computed tomography-guided percutaneous biopsy of abdominal lesions:

- indications, techniques, results, and complications. *Radiol Bras.* 51(3): 141-146. 2018
74. Koyanagi K, Bilchik AJ, Saha S, Turner RR, Wiese D, McCarter M, Shen P, Deacon L, Elashoff D, Hoon DS. Prognostic relevance of occult nodal micrometastases and circulating tumor cells in colorectal cancer in a prospective multicenter trial. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 14(22): 7391-7396. 2008.
75. Modest DP, Ricard I, Heinemann V, Hegewisch-Becker S, Schmiegel W, Porschen R, Stintzing S, Graeven U, Arnold D, von Weikersthal LF, Giessen-Jung C, Stahler A, Schmoll HJ, Jung A, Kirchner T, Tannapfel A, Reinacher-Schick A. Outcome according to KRAS-, NRAS- and BRAF-mutation as well as KRAS mutation variants: pooled analysis of five randomized trials in metastatic colorectal cancer by the AIO colorectal cancer study group. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.* 27(9): 1746-1753. 2016.
76. Douillard JY, Oliner KS, Siena S, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocakova I, Ruff P, Blasinska-Morawiec M, Smakal M, Canon JL, Rother M, Williams R, Rong A, Wiezorek J, Sidhu R, Patterson SD. Panitumumab-FOLFOX4 treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *The New England journal of medicine.* 369(11): 1023-1034. 2013.
77. Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Inuma H, Shibuya H, Eshima K. Heterogeneity of KRAS status may explain the subset of discordant KRAS status between primary and metastatic colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 54(9): 1170-1178. 2011