

## 論文の内容の要旨

### 論文題目

#### 同時性多発大腸癌の臨床病理・分子学的解析

荒川敬一

#### 【研究の目的】

近年のゲノム解析の進歩に伴い、プレジジョンメディスンが注目されるようになってきた。大腸癌の分野でも carcinogenesis における分子遺伝学的特徴や癌の占拠部位と治療との関連が重要となってきた。特に *KRAS*・*BRAF* 変異を認める大腸癌は抗 EGFR 抗体耐性であり、MSI-H を認める大腸癌には免疫チェックポイント阻害剤の効果が期待されている。同時性多発大腸癌（多発大腸癌）は同一の遺伝的・環境的背景から発生する腫瘍という特性のため癌研究において重要と考えられる。また、実臨床においては分子標的薬選択のため分子サブタイプ解析の必要性があるという点からも、多発大腸癌の臨床病理学的・分子遺伝学的特徴の解明が望まれる。本論文では、第 1 章において多発大腸癌の臨床病理学的解析を、また第 2 章において分子遺伝学的解析を行うことでその臨床病理・分子学的特徴を明らかにすることを目的とした。

#### 第 1 章 同時性多発大腸癌の臨床病理学的解析

##### 【背景】

近年の多発大腸癌の発生率は 1-8%と報告され、これまでに報告されている多発大腸癌の臨床病理学的なリスク因子としては、男性・高齢・潰瘍性大腸炎、家族性大腸腺腫症、リンチ症候群が挙げられる。本邦の遺伝性大腸癌診療ガイドラインではリンチ症候群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を挙げ多発大腸癌が含まれている。海外ではリンチ症候群の頻度は 1-13%程度と報告されているが、本邦においては正確な頻度は不明であり、リンチ症候群の予後は比較的良好であることが報告されている。多発大腸癌の予後に関する文献的報告では、1996 年の単発癌と比較し有意差無しとの報告以来、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り、多発大腸癌の予後については controversial である。

##### 【対象と方法】

東京大学腫瘍外科で手術を施行した 1295 例の大腸癌患者を対象とし、同時性多発大腸癌患者群 (多発群)、単発大腸癌患者群 (単発群) に分類して解析した。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。多発大腸癌の主病変については最大深達度の病変を第一癌、以降小さくなるごとに第二・第三癌とし、症例毎の解析では第一癌のデータを用いて行った。

#### 【結果】

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。追跡期間中央値は 3.7 年 (0.1-14.8 年) であった。症例毎の解析においては、多発群が単発群より腫瘍径が 50 mm 以上の症例が多く (44.6% vs. 33.8%,  $p = 0.0403$ )、病理組織の分化度では多発群が単発群より低分化・粘液癌の症例が多かった (20.6% vs. 7.0%,  $p < 0.001$ )。病変毎の解析においては、多発群 200 病変と単発群 1203 病変を比較すると、多発群では単発群より低分化・粘液癌が有意に多く (12.5% vs. 6.9%,  $p = 0.0113$ )、多発群では単発群より深達度の浅い T1-2 の病変が有意に多かった (52.0% vs. 28.1%,  $p < 0.0001$ )。全生存率については両群間において有意差を認めなかったが、無再発生存率については単発群 75.1%に対し、多発群 65.3%と有意に多発群が予後不良であった ( $p = 0.0347$ )。生存率の多変量解析については、全生存率では多発大腸癌は予後因子とはならなかったが、無再発生存率では多発大腸癌は独立した予後不良因子であることがわかった (HR 1.52, 95%CI 1.02-2.18,  $p = 0.0392$ )。

#### 【考察】

多発大腸癌の予後についての報告はこれまでに 14 編報告されているが、再発についての解析は本研究を含め 2 編しかない。本研究において、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、その理由としては、複数の病変がそれぞれ再発する確率を合わせると単発の病変が再発する確率より高いという可能性が考えられる。全生存率において多発群と単発群で有意差を認めなかった原因は明らかではないが、フォローアップ期間が短いため十分に予後追跡できていないことが考えられた。

## 第 2 章 同時性多発大腸癌の分子学的解析

#### 【背景】

大腸癌の発癌経路は CIN 経路と MSI 経路に大別される。CIN 経路は染色体の欠失や転座などの染色体不安定性からなる発癌経路であり、MSI 経路はミスマッチ修復遺伝子の変異やエピジェネティックなメチル化による発癌経路である。多発大腸癌には MSI-H 病変が多いと報告されており、背景因子としてリンチ症候群や Field effect により *MLH1* メチル化を伴って発癌する可能性が指摘され

ている。しかしながら、既報は代表的な病変の解析がほとんどで同一症例内の病変間の分子遺伝学的解析の報告は少ない。Carcinogenesis という観点に加え、プレジジョンメディスンという観点からも同一症例内の病変間の分子遺伝学的解析が望まれる。

#### 【対象と方法】

東京大学腫瘍外科で手術を施行しホルマリン固定検体が入手可能であった 59 症例 (130 検体) の多発大腸癌患者の手術検体を用いて、DNA を抽出し MSI 検査、*KRAS*、*BRAF* のシークエンス解析を行い、p53 及び  $\beta$ -catenin の免疫染色による評価を行った。MSI-H の検体では、さらにミスマッチ修復遺伝子 (*MLH1*、*MSH2*、*MSH6*、*PMS2*) の免疫染色と *MLH1* のメチル化解析を行った。*KRAS* 変異、*BRAF* 変異、*MLH1* メチル化の解析ではコントロールとして細胞株由来の DNA を用いた。

#### 【結果】

多発大腸癌 59 症例における症例毎の解析では、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% で認められた。病変毎の解析では、MSI-H 病変は MSS 病変と比較すると、右側大腸、低分化・粘液癌、*BRAF* 変異に有意に多い結果となった (右側大腸,  $p = 0.0190$ ; 低分化・粘液癌,  $p = 0.0244$ ; *BRAF* 変異,  $p = 0.0060$ )。病変占拠部位と分子サブタイプの相関性の解析では、直腸から盲腸へと右側にいくにつれ MSI-H 病変及び *BRAF* 変異病変の頻度が有意に高くなった (MSI-H,  $p = 0.0034$ ; *BRAF* 変異;  $p = 0.0068$ )。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、*BRAF*、 $\beta$ -catenin であったが、各々の一致度は低かった (MSI-H,  $k$  値 = 0.3035,  $p = 0.0146$ ; *BRAF* 変異,  $k$  値 = 0.4230,  $p = 0.0010$ ;  $\beta$ -catenin 陽性,  $k$  値 = 0.3692,  $p = 0.0085$ )。また、*KRAS* と p53 では第一癌と第二癌の間に相関は認められなかった。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 の病変は 9 症例 12 病変でありその原因としては 7 症例 8 病変に *MLH1* メチル化が関与していた。MSI-H 症例のうち 1 症例は 2 病変とも *MLH1* 非メチル化かつ MSI-H でありリンチ症候群またはリンチ様症候群を疑う症例であった。

#### 【考察】

本研究では MSI、*KRAS*、*BRAF*、p53、 $\beta$ -catenin の分子サブタイプにおいて、同一症例内の第一癌と第二癌の  $k$  値が低く一致度は低いこと、及び MSI-H 病変では多くは *MLH1* メチル化病変であることを示した。特に、本研究においては多発大腸癌症例の全病変を対象とし、MSI 経路としての MSI 及びミスマッチ修復遺伝子と *MLH1* メチル化を調べることでより詳細に検討を行ったことに意義があると考えられる。これら分子サブタイプの解析結果からは、多発大腸癌の各病変は各々独立した経路で発癌している可能性が示唆される。また、*KRAS* と *BRAF* のサブタイプが同じ症例の病変間で異なる症例が半数近

くあることが示され、プレジジョンメディシンとしての分子標的薬の選択の際にも考慮する必要があり臨床的に意義のある結果と考える。

#### 【結論】

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あるものの、全生存率では予後因子とはならなかった。また、多発大腸癌の同一症例内の病変間の分子遺伝学的解析結果からは多くの分子サブタイプの一貫性は低く、*MLH1* メチル化の関与した症例が多いことが示唆された。各病変は分子遺伝学的に独立して発生している可能性が示唆され、分子標的薬選択の際には可能であれば再発巣の分子サブタイプを調べることを望ましいと考えられる。