

# 博士論文

膵・消化管神経内分泌腫瘍(NEN)肝転移  
に対する超音波造影剤の有用性および  
NENにおけるmTORシグナル伝達経路関  
連タンパク発現の腫瘍学的意義

中 沢 祥 子

所属 外科学専攻 肝胆膵外科・人工臓器移植外科

指導教員 長谷川 潔 教授

申請者 中沢 祥子

0. 目次	2
1. 略語	5
2. 要旨	7
3. 序文	8
4. 研究①	12
4-1. 背景と目的	12
4-2. 造影超音波について	15
4-2-1. 造影超音波の歴史	15
4-2-2. ソナゾイド®	16
4-3. 対象と方法	19
4-3-1. 術前画像検査	21
4-3-2. B-mode IOUS ならびに CE-IOUS	21
4-3-3. 摘出標本における NEN 肝転移の診断	23
4-3-4. 統計学的解析	23
4-4. 結果	24
4-4-1. 患者背景と術前検査	24
4-4-2. 前期の B-mode IOUS における腫瘍の評価	26

4-4-3.	後期の B-mode IOUS ならびに CE-IOUS における腫瘍の評価	30
4-4-4.	初回肝切除後の OS および PFS	33
4-5.	考察	36
5.	研究②	43
5-1.	背景と目的	43
5-2.	対象と方法	50
5-2-1.	Tissue microarray (TMA) 作成	50
5-2-2.	mTOR シグナル伝達経路関連タンパク免疫組織化学染色と 評価	51
5-2-3.	Ki-67 指数の算出方法	54
5-2-4.	統計学的評価	54
5-3.	結果	55
5-3-1.	症例85人の病態と p-mTOR および p-RPS6 の染色結果の分 布	55
5-3-2.	膵 NEN 切除症例76人に関する予後解析	59
5-3-3.	膵 NEN 肝転移切除症例23人に関する予後解析	64
5-3-4.	原発巣と対応する肝転移巣を有する14人に関する比較解析	70

5-3-5.	再肝切除を施行した 5 人に関する比較解析	76
5-4.	考察	78
6.	結論	83
7.	参考文献	84
8.	謝辞	91

## 1. 略語

- neuroendocrine tumor/neoplasm, NET/NEN; 神経内分泌腫瘍
- mammalian target of rapamycin, mTOR; 哺乳類ラパマイシン標的タンパク
- death-domain associated protein/mental retardation syndrome X-linked protein;

DAXX/ATRX

- indocyanine green, ICG; インドシアニンググリーン
- ultrasonography , US; 超音波検査
- computed tomography, CT; コンピューター断層撮影
- gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine penta-acetic acid-enhanced magnetic

resonance imaging, EOB-MRI; Gd-EOB-DTPA造影 MRI

- intraoperative ultrasonography, IOUS; 術中超音波
- contrast enhanced intraoperative ultrasonography, CE-IOUS; 術中造影超音波
- overall survival, OS; 全生存期間

- progression-free survival, PFS; 無増悪生存期間

- phosphorylated mammalian target of rapamycin , p-mTOR; リン酸化 mTOR

- ribosomal protein S6 kinase, RPS6K; リボソーム S6 タンパクキナーゼ

- eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP1; 翻訳開始因子

#### 4E 結合タンパク質 1

●phosphorylated ribosomal protein S6, p-RPS6; リン酸化 S6 リボソームタンパク質

●eukaryotic translation initiation factor 4E, EIF4E; 翻訳開始因子 4E

## 2. 要旨

神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor/neoplasm, NET/NEN) は稀な腫瘍で、多発肝転移などを来す予後の悪い症例も存在し、NEN 肝転移は最も重要な予後因子の一つである。研究①では NEN 肝転移の外科切除について、術中造影超音波の有用性を評価した。超音波造影剤登場前は、術中超音波で同定できなかった腫瘍に対し盲目的解剖学的切除を施行したが、術中造影超音波により切除範囲を適切に判断することが可能となった。NEN 肝転移は再発しやすいため、繰り返し肝切除を受ける可能性があり、必要以上に残肝容量を減らさないためにCE-IOUSは有用であると考えられた。研究②では、NEN の mTOR シグナル伝達経路に関連するタンパク質の発現と臨床転帰について解析した。膵 NEN 肝転移巣において、p-RPS6 が発現していると予後不良となる傾向がみられ、肝転移切除後の転帰の予測におけるバイオマーカーとしての役割や肝転移治療戦略の検討に有用である可能性が示唆された。

### 3. 序文

本研究は神経内分泌腫瘍 (neuroendocrine tumor/ neoplasm; NET/NEN) に関する研究である。

NEN は神経内分泌分化を示す腫瘍の総称であり、稀少腫瘍であるとともに、全身臓器に発生して多彩な臨床症状を呈す。NEN は発生起源別に前腸 NEN (肺、胃、食道、十二指腸、膵臓)、中腸 NEN (空腸、回腸、虫垂、右側結腸)、後腸 NEN (左側結腸から直腸) の3つに分類可能であり、本邦においては膵・消化管 NEN の中でも、特に膵臓と直腸に多く、小腸は少ないとされる。一方欧米では、消化管 NEN は小腸に多く、直腸に少ないとされ、発生部位には人種差があると考えられている [1]。

第2回全国疫学調査 (2010年) の結果によると、年間人口10万人に3～5人の新規患者が発生し、その多くは膵臓と消化管に発生していた。有病患者数は人口10万人あたり消化管 NEN 6.42 人/年、膵 NEN 2.69 人/年で、2005年に比べそれぞれ約 1.8 倍、約 1.2 倍に増加している [1]。NEN は悪性腫瘍と比較して緩徐な進行を呈する症例が多いとされているが、一定の頻度で肝転移やリンパ節転移を来す。診断時に遠隔転移を伴っている頻度は膵 NEN で60～70%、消化管 NEN で80～90%との報告がある [2]。遠隔転移の部位としては

肝転移が最も頻度が高く、次いでリンパ節転移である [3]。肝転移を有する膵・消化管 NEN は切除不能な肝外病変がない場合に肝切除を中心とした集学的治療が推奨され、転移巣が肝臓に限局している場合、90%以上の減量手術が生命予後と QOL を改善するとの報告がある [4]。

しかし NEN 肝転移は外科切除を施行しても、その再発率は5年で80%以上と報告され、その多くは2年以内に再発している [5-9]。NEN 肝転移は最も重要な予後因子の一つであり、この肝転移をいかに治療し、制御していくかが予後の改善につながると期待される。NEN 肝転移に対しては積極的な肝切除が望まれる一方で、肝切除には肝不全という致命的な合併症が一定頻度で発生し、これを回避することが重要な命題である。このため、術前に ICG

(indocyanine green, インドシアニンググリーン) 検査を中心とした肝予備能評価を詳細に行い、さらに肝切除量を予測し比較することで手術適応を厳密に決定している。NEN 肝転移では多数の腫瘍を切除することが多いため、1個あたりの腫瘍に対して肝部分切除のような可及的に肝切除容量の少ない術式を選択する。また、膵・消化管 NEN の分子生物学的特徴はまだ不明な点が多いが、

mTOR (mammalian target of rapamycin: 哺乳類ラパマイシン標的タンパク) シグナル伝達経路の関与や DAXX/ATRAX (death-domain associated protein/mental

retardation syndrome X-linked protein) 遺伝子の変異などが報告されており、これらの発現や予後との関連がいくつか報告されている[10-18]。mTORはセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞増殖に重要な役割を演じるタンパク質の合成・翻訳に関わっている。mTORの発現や活性化については一般的な癌(大腸癌、肺癌、腎癌、乳癌など)において報告されており、mTORシグナル伝達経路は種々の癌の発生・進展に関わっている。NEN組織においてもmTORシグナル伝達経路の構成タンパク質が発現していることがわかってきたが、一般的な癌のもの比べると報告は少ない。さらにNEN原発巣と遠隔転移巣におけるmTORシグナル伝達経路に関与するタンパク質の発現を解析した報告も非常に少なく、遠隔転移を肝転移に限定して原発巣と比較した報告はない。NEN肝転移の治療としては、原発巣と肝転移巣の両方とも当院で切除することもあれば、原発巣は他院ですでに切除され、その後紹介されて異時性肝転移の切除を当院で行うこともあり、両病変が入手出来ないケースも多い。そこで、mTORシグナル伝達経路に関与するタンパク質の肝転移組織における発現程度と予後の関与が指摘できれば、原発巣の切除標本がなく肝転移巣の切除標本のみの症例でも、切除後の転帰の予測におけるバイオマーカーとしての役割や肝転移治療戦略の検討に有用ではないかと考えた。

NEN 肝転移をいかにコントロールするかという課題に対して、研究①では NEN 肝転移の外科切除からのアプローチ、研究②では病理因子からアプローチする研究を設定した。

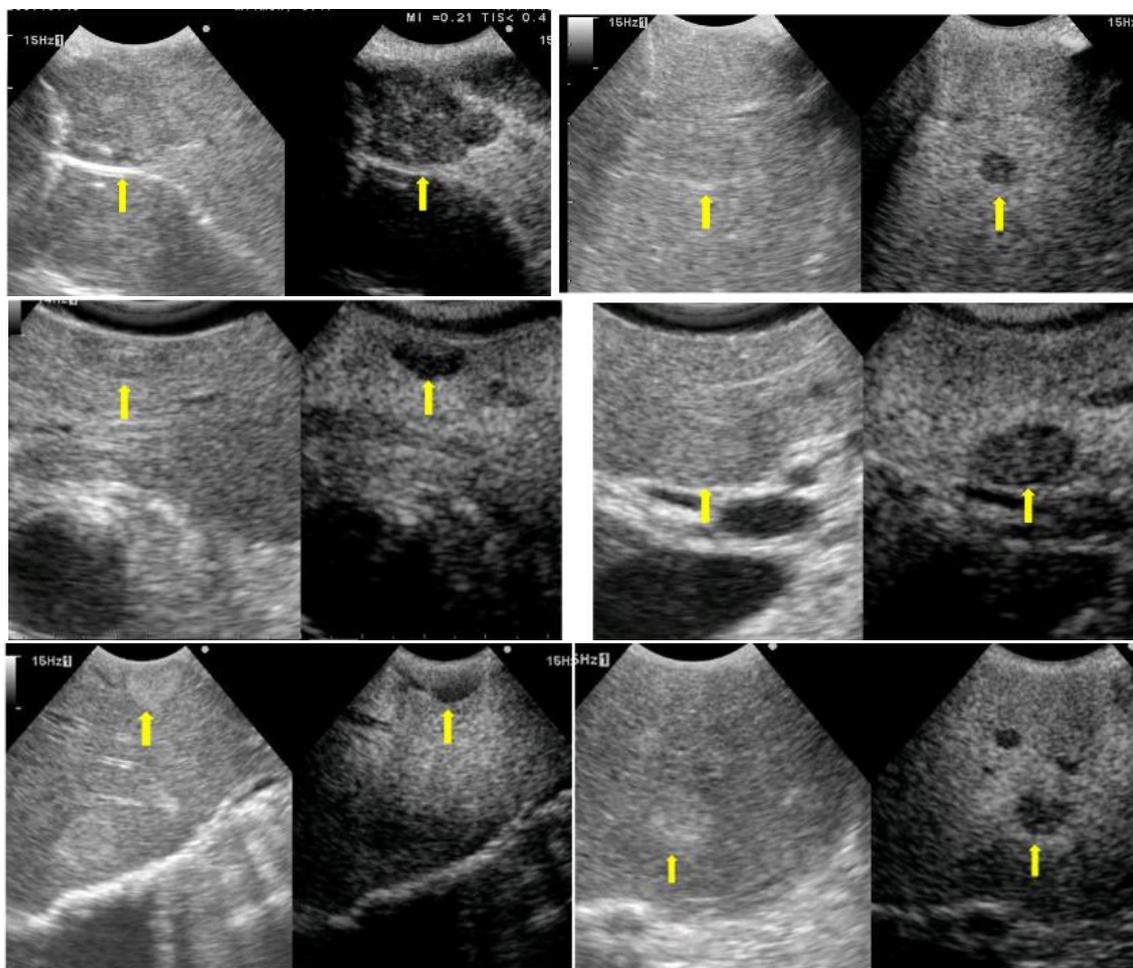
## 4. 研究①

### 4-1. 背景と目的

NEN 肝転移は外科切除を施行しても、その再発率は5年で80%以上と報告され、その多くは2年以内に再発しており[5-9]、NEN 肝転移は最も重要な予後因子の一つとなっている。この肝転移をいかに治療し、制御していくかが予後の改善につながると期待される。NEN 肝転移を術前に検出する手段としては、超音波検査 (ultrasonography, US)、造影コンピューター断層撮影 (computed tomography, CT)、Gd-EOB-DTPA 造影 MRI (gadolinium ethoxybenzyl diethylenetriamine penta-acetic acid-enhanced magnetic resonance imaging, EOB-MRI) の modality が確立されている。加えて、手術中に術中超音波 (intraoperative ultrasonography, IOUS) によりエコープローブを直接肝臓に当てて病変を観察することができ、体表に比べてより多くの情報が得られるため、多くの施設で施行されている。NEN 肝転移に対しては積極的な肝切除が望まれるが、安全な肝切除量の範囲内で行うことが重要である。そのために IOUS および術中造影超音波検査 (contrast enhanced intraoperative ultrasonography, CE-IIOUS) は最小限の肝切除で確実に病変を切除するために重要な役割を占めている。大腸癌など一般的な癌の肝転移に対する IOUS は有用であり、CE-IIOUS は

さらに有用であると報告されている[19-21]。一方で、NENの肝転移は大腸癌の肝転移と比較して従来のIOUS (B-mode IOUS)では肝転移病変が認識しにくく、切除に苦慮することが多かった。2007年に第2世代超音波造影剤(ソナゾイド®; GEヘルスケア、ノルウェー)が登場し保険適応となり、術中超音波造影剤を使用することで、クッパー相(後述)にて肝転移巣がより境界明瞭な腫瘍として描出されるようになり(図1)、腫瘍境界を詳細に確認しながら重要な脈管を温存することで肝部分切除を実施することも可能となった。研究①では、CE-IOUSを駆使することによる予後改善効果、肝転移巣の視認性改善効果、切除術式の変更頻度を後方視的に検討した。

図1. CE-IOUSにおけるクッパー相での NEN 肝転移描出の一例  
CE-IOUSの2画面写真。左側が B-mode、右側がクッパー相の描出。クッパー  
相にて肝転移病変の境界が明瞭となる(矢印は NEN 肝転移病変部)。



## 4-2. 造影超音波について

### 4-2-1. 造影超音波の歴史

超音波検査用の造影剤は、マイクロバブルが超音波を効率的に反射する性質を利用している。経静脈投与によるマイクロバブルの超音波造影剤の開発は1990年代から始まった。1999年に Levovist® が本邦で承認され市販された。

Levovist® はいわゆる第1世代超音波造影剤で、空気のマイクロバブル製剤である。心腔造影、末梢血管（動静脈）、体表臓器、肝臓、膵臓、腎臓、婦人科付属器など多くの領域に使われた[22]。しかし Levovist® は、シェルのない空気の微小気泡で、造影剤から信号を取り出すには強い音圧で送信し、マイクロバブルが崩壊するときに生ずる2次高調波（強い散乱信号、非線形成分）を受診して画像化する必要があったが、信号が強すぎるために基本波成分と非線形成分を分離して測定する必要があり、この非線形信号の画像化には高価な測定装置を要することと、マイクロバブルが崩壊するため一つの病変につき数秒間程度しか観察できない短所があったことから一般臨床医へ広く普及するには至らなかった。一般に普及している汎用装置でも測定可能な低音圧系の造影剤が必要であり、後述するソナゾイド®や SonoVue や Definity などの第2世代超音波造影剤の開発へとつながった。

#### 4-2-2. ソナゾイド®

ソナゾイド®は第1世代超音波造影剤の難点を改良し、開発された第2世代超音波造影剤である。ソナゾイド®はペルフルブタンガス(図2)を、リン脂質膜である水素添加卵黄ホスファチジルセリンナトリウムをシェルとして安定化させたマイクロバブルで、低音圧系造影剤に属し、バブルを破壊せずに共振させてバブルからの非線形信号を画像化する[23]。用法および用量は、ペルフルブタンマイクロバブルとして1バイアル(16 µL)を2 mLの注射用水で懸濁し、通常成人では、懸濁液として0.015 mL/kgを静脈内にボラスで投与し(マイクロバブル用量として0.12 µL/kg)、生理食塩水等でフラッシュして観察する。投与後は呼気中に排泄される。

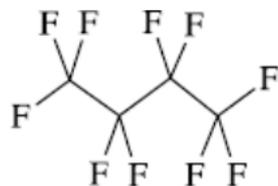
ソナゾイド®は静脈内に投与された後、類洞内皮のクッパー細胞に貪食され肝臓に長くとどまる性質があり、肝腫瘍性病変におけるソナゾイド®の造影効果は、投与直後から得られる血管相と投与後約10分から得られるクッパー相(肝実質の造影)がある。血管相の造影により肝腫瘍の血流を評価することで鑑別診断が行なわれ、クッパー相では高輝度な背景肝の中でクッパー細胞を有さない病変が低輝度領域として明瞭に抜けて見えることを利用して、肝腫瘍の検出が行なわれる[22](図1)。第1世代超音波造影剤と異なり超音波によるマ

マイクロバブルの崩壊が起こらず、しかもマイクロバブルで数時間程度までクッパー細胞にとどまるため、クッパー相の観察が繰り返し長時間行えることがソナゾイド®を用いた造影超音波の大きな特長である。

図 2. ペルフルブタンガス分子式、構造式および構造模式図

(1) ペルフルブタンガス 分子式：  $C_4F_{10}$

構造式：



(2) ソナゾイド分子構造模式図

ペルフルブタンガスを、リン脂質膜である水素添加卵黄ホスファチジルセリンナトリウムをシェルとして安定化させたマイクロバブルがソナゾイド®である。



#### 4-3. 対象と方法

1998年1月から2013年12月の間に東京大学医学部附属病院肝胆膵外科で膵・消化管 NEN の肝転移に対し手術を受け、組織学的に NEN と確定された、連続する35人、51手術を対象とした retrospective study である。既に原発巣の切除が済んでいた症例は 14 人、肝転移巣と同時に原発巣を切除した症例は 18 人、原発巣非切除の症例は 3 人であった。第 2 世代造影超音波登場前の 1998 年から 2006 年を前期群、2007 年から 2013 年を後期群と設定した。前期群においては B-mode IOUS のみが施行され、後期群においては B-mode IOUS および CE-IOUS が施行されていた。前期群および後期群の術前画像検査で指摘した肝転移个数、術前画像で指摘できていた病変が B-mode IOUS で検出できなかった手術数と病変个数、B-mode IOUS で新規病変を検出した (B-mode IOUS New) 手術数と个数、B-mode IOUS で検出できなかった病変が CE-IOUS で検出できた手術数と个数、術前画像で指摘できていた病変を B-mode IOUS と CE-IOUS の両方で検出した手術数と個数を抽出し、患者ごとに腫瘍全体の何%の切除になったのかを明らかにした。そして前期群と後期群において、初回肝切除日からの全生存期間 (Overall survival; OS) および無増悪生存期間 (Progression-Free survival; PFS) を比較解析した。

本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会により承認  
が得られている（審査番号：2158-(6), 課題名：肝胆膵領域悪性腫瘍および良性  
疾患の治療成績・長期予後に関する研究）。

#### 4-3-1. 術前画像検査

全ての患者に対し、術前腹部超音波検査を施行した。2010年までは ultrasound system Prosound  $\alpha$  7 (日立アロカメディカル, 東京) を使用し、2011年からは Ascendus (日立アロカメディカル, 東京) を使用した。2007年からは術前CE-USを追加している。また全ての症例に対し、術前に 64 列マルチスライスCT (Siemens) にて造影 CT を施行した。造影剤は2ml/kgに相当する量を静脈内投与し、造影剤投与35秒後に動脈相を、70秒後に門脈相を撮影した。

Gd-EOB-DTPA 造影MRI (EOB-MRI)は21手術 (42%) の術前に施行し、dynamic study および造影剤注入15分後の肝細胞相を撮影した。EOB-MRI は2008年に保険収載された肝特異性造影剤を使用するMRI検査で、肝腫瘍に対する感度が高いとされる[24-27]。全ての画像検査は切除前の6週間以内に実施した。放射線科医2名による読影と診断レポートの作成が行われた。

#### 4-3-2. B-mode IOUS ならびにCE-IOUS

開腹および肝授動後に B-mode IOUS を全肝に実施した。B-mode IOUS 中に同定されたすべての限局性肝病変は、単純性嚢胞または海綿状血管腫の明らかな所見を示さない限り、肝転移と診断された。B-mode IOUS にて全肝スクリーニングを施行後、超音波造影剤であるソナゾイド®を体重 1kg 当たり 0.12  $\mu$ L

のマイクロバブル用量で注入した。ソナゾイド®注入15分後（クッパー相）に系統的全肝スキャンを行った。クッパー相では、正常肝実質においてはクッパー細胞にソナゾイド®が取り込まれるため、正常肝実質は造影されて高輝度を呈しているが、腫瘍細胞においてはクッパー細胞が存在しないため造影されず（ソナゾイド®が腫瘍に取り込まれず）欠損影として描出される。術前造影CTで嚢胞または血管腫と診断された結節を除いて、CE-IOUS中に認められた低輝度肝結節は全て肝転移と考えられた。B-mode IOUSおよびCE-IOUSは、IOUSを実施した5年以上の経験のある外科医により実施された。

B-mode IOUSと比較したCE-IOUSによる肝転移巣の腫瘍境界の認識改善効果については、IOUSの経験を5年以上有する外科医により手術時に評価されており、再度後方視的に評価した。

#### 4-3-3. 摘出標本における NEN 肝転移の診断

対象患者で切除した全ての標本をホルマリンで固定し、連続切片化し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、シナプトフィジンおよびクロモグラニン A の免疫組織化学染色を行った。組織学的腫瘍グレード化のために、Ki-67 (M7240, MIB1; DakoCytomation, Denmark, 1:200) の免疫組織化学染色を行い、hot spot を10高倍率視野当たり計数した。病理診断報告書に記載された Ki-67 指数をデータとして抽出した。

#### 4-3-4. 統計学的解析

JMP®10.0 computer software (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) を用いて統計解析を行った。前期群および後期群の初回肝切除後の全生存期間(Overall survival; OS) および無増悪生存期間 (Progression-Free survival; PFS) は、Kaplan-Meire 法で生存曲線を描き、log rank testにより比較を行った。P 値が 0.05 未満で統計学的有意差ありとした。

#### 4-4. 結果

##### 4-4-1. 患者背景と術前検査

本研究において35人の患者（男性19人、女性16人）に対し、51手術が行われた（表1）。原発巣と肝転移巣の同時切除は18人、肝転移巣のみの切除は17人（そのうち、原発巣が既に切除済みの症例が14人）であった。前期では15人の患者に対し22手術が施行され、後期では24人の患者に対し29手術を施行した。

切除時の患者の年齢中央値は58歳（32～84歳）であった。前述のように、前期の間に15人の患者に対し22手術が実施され、術中診断は B-mode のみ施行した。後期の間は、24人の患者に対し29手術が実施され、術中超音波診断は B-mode とCE-IOUSを施行した。前期は10手術がその患者にとって初回肝切除であった。7手術はその患者にとって2回目の肝切除であり、5手術は3回目以上の肝切除の症例（3回目3手術、4回目1手術、5回目1手術）であった。同様に後期では、18手術が初回肝切除で、8手術が2回目の肝切除であった。3回目以上の肝切除の症例は3手術（3回目1手術、4回目2手術）でみられた。

再発に対する肝切除のために前期の間に重複している患者は4人、後期の間に重複している患者は4人、前期と後期に重複している患者は4人であった。

表 1. 患者背景

因子	全体	前期 (1998-2006)	後期 (2007-2013)
患者単位			
患者数	35	15	24*
性別(男/女)	19/16	9/6	10/10
年齢†	58(32-84)歳	56(32-74)歳	55(44-84)歳
手術単位			
手術数	51	22	29
初回肝切除	28	10	18
2回目肝切除	15	7	8
3回目以上の肝切除	8	5	3

単位のない数値は患者数 / 手術数で記載。

\* 4 人の患者は前期と後期の両時期に肝切除を受けた。

† 中央値 ( 範囲 ) で記載。

#### 4-4-2. 前期のB-mode IOUSにおける腫瘍の評価

CE-IOUSが利用できなかった前期に、術前 CT 画像で検出されず、B-mode IOUSで描出された新規病変 (B-mode IOUS New) は、22手術中 7手術 (27%) で見つかった。その7手術のうち、5手術は肝転移巣を完全切除し得たが、2手術は新規病変も含めて完全切除を施行すると残肝容量が不足するため、術式を減量手術に変更した。22手術中 3手術 (14%) において、術前 CT 画像で検出された腫瘍の一部をB-mode IOUSで同定できなかった (表 2)(図3)。この3手術で術中に同定できなかった腫瘍は合わせて8個で、これらの腫瘍は次に述べる盲目的解剖学的肝切除を実施した (図4)。

解剖学的肝切除は、ある門脈枝の栄養する領域を過不足なく切除することで、もともと肝細胞癌が経門脈的に肝内転移するという性質から、潜在的な門脈経由の肝内転移を系統的に一括切除する目的で普及してきた術式である。術中超音波ガイド下に担癌門脈を穿刺し色素を注入することで、担癌門脈域の肝表面境界を正確に同定する。この方法が当教室から初めて報告され、広く普及している [28] (図4)。

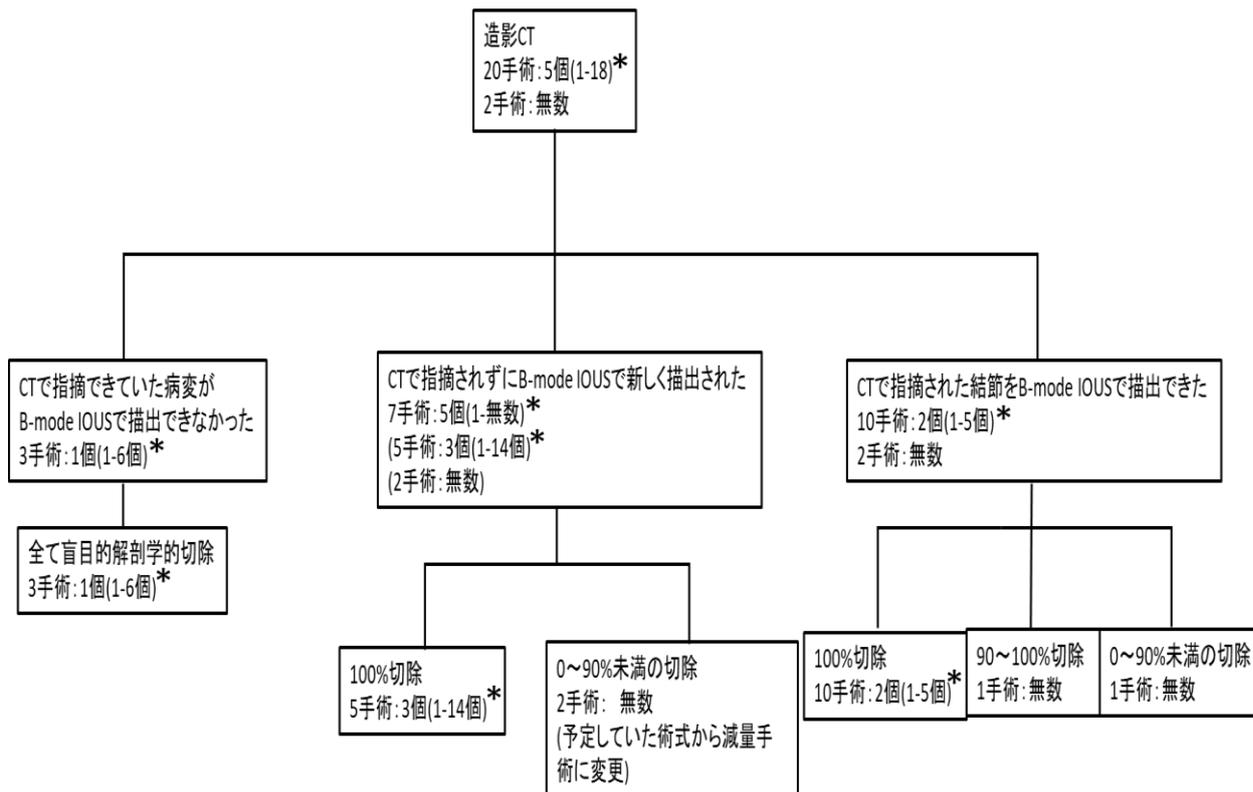
この技術を NEN 肝転移において術前 CT で指摘されていた腫瘍でB-mode IOUSにて同定できなかった腫瘍に対しても応用し、術前 CT 画像を参照

して、腫瘍が含まれるはずの支配門脈枝を IOUS ガイド下に門脈穿刺を行い、インジゴカルミンを約 5ml 注入し、肝表に出現した染色域の境界を電気メスでマーキングし、同領域を切除する解剖学的肝切除を行った。本研究ではこれを盲目的解剖学的切除と名付けた。

盲目的解剖学的切除例の術前 ICG 検査および肝切除量については、各々 ICG 5.9% に対し切除量 20.8%、ICG 11.3% に対し切除量 10%、ICG 13.4% に対し切除量 24% であり、安全な肝切除であると判断され、術後肝不全徴候は認めなかった。盲目的解剖学的切除を施行した 3 手術のうち 2 手術 (B-mode IOUS で検出できなかった病変個数は各手術 1 個ずつ) は、摘出検体に B-mode IOUS で検出できなかった病変を含み、NEN の診断が得られた。一方で、残りの 1 手術は、B-mode IOUS で検出できなかった病変 6 個を含むように切除したが、摘出標本ではそれら 6 個の病変は病理学的検索においても NEN は認められなかった。

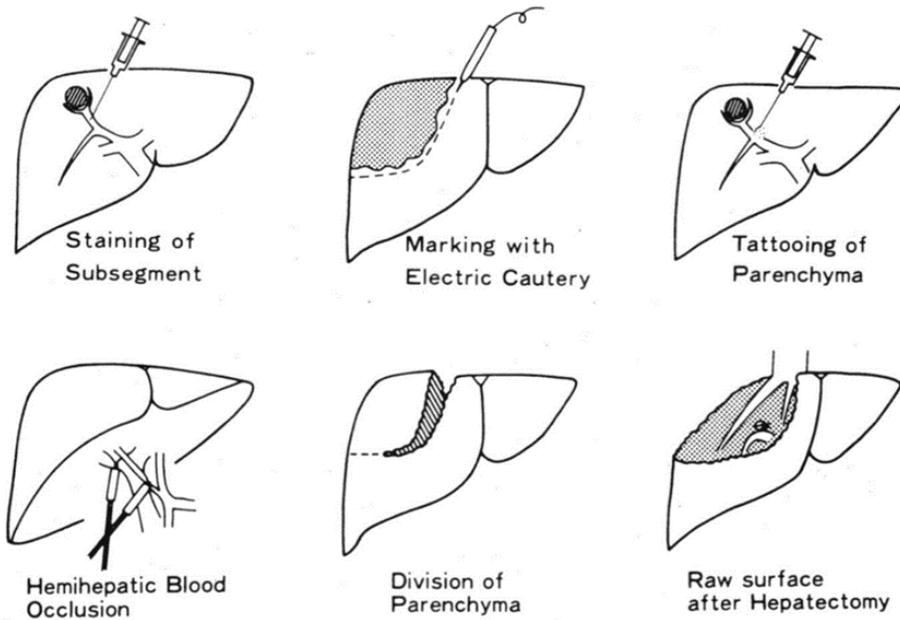
図3. 前期における術前画像および IOUS のフローチャート

術前 CT 画像で検出されず、B-mode IOUS で描出された新規病変 (B-mode IOUS New) は、22手術中 7手術で見つかった。その7手術のうち、5手術は肝転移巣を完全切除し得たが、2手術は新規病変も含めて完全切除を施行すると残肝容量が不足するため、術式を減量手術に変更した。22手術中 3手術において、術前 CT 画像で検出された腫瘍の一部を B-mode IOUS で同定できなかった (計 8個)。



\* 中央値 (範囲) で記載。

図4. IOUS 下の門脈区域枝のインジゴカルミン®注入の手法  
術中超音波ガイド下に担癌門脈を穿刺し色素を注入することで、担癌門脈域の  
肝表面境界を正確に同定することができる。図は[28](現; Journal of the  
American College of Surgeons) より許可を得て転載



#### 4-4-3. 後期における IOUS ならびにCE-IIOUSの腫瘍の評価

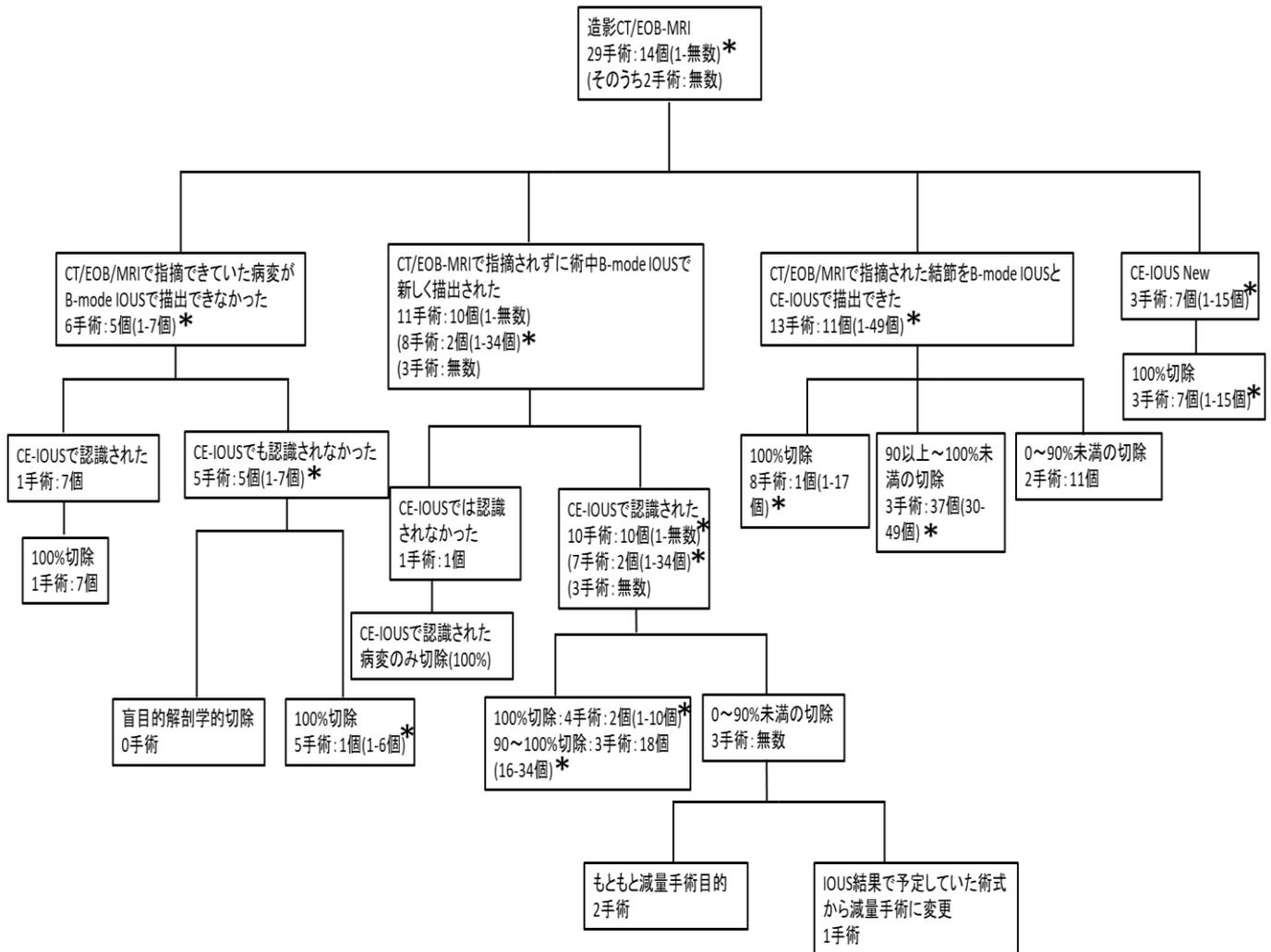
後期では術中に B-mode IOUS と CE-IIOUSの両方を施行した。 B-mode IOUS と CE-IIOUSの腫瘍境界の視認性の比較については、手術時に IOUS の経験を5年以上有する外科医により評価されており、再度後方視的に評価したところ、29手術中23手術において(79%)、 CE-IIOUS の方が、その手術の全ての肝転移病変について、より認識しやすい結果であった。

後期において新規病変の定義は以下の2つに設定した。術前画像で認識されず B-mode IOUS で初めて描出できた新規病変は B-mode IOUS New とし、術前画像でも B-mode IOUS でも認識されず CE-IIOUS で初めて描出できた新規病変は CE-IIOUS New と設定した。後期における術前画像検査での腫瘍個数と IOUS のフローチャートを図5に示す。後期で B-mode IOUS New は、29手術中11手術(38%)で見つかった。そのうち10手術での B-mode IOUS New 病変は全て CE-IIOUS でも描出でき、その中で4手術は100%の切除を施行し、3手術は90~100%切除、残り3手術は90%未満の切除となった。90%未満の切除の3手術中1手術は、当初完全切除を予定していたが、腫瘍数が増えたことで大量肝切除を避けるために、90%以上100%未満切除の減量手術に変更となった。またこの他、 B-mode IOUS New の11手術のうち2手術(2人)は、肝転移巣を完全切

除するために二期的肝切除を計画していた症例だったが、2人とも一期目の切除時に、新規病変が多く完全切除には至らなかった（切除量：90%以上100%未満）。この2人は二期的切除目も残肝量を考慮して、予定術式を減量手術に変更した（切除量：90%以上100%未満）。29手術のうち1手術では、B-mode IOUSとCE-IIOUSで別個に新規病変を指摘した。また術前画像で検出されていた病変がB-mode IOUSで指摘できなかった症例が29手術中6手術（21%）にあったが、CE-IIOUSでその病変が描出可能となった症例が1手術で認められ、完全切除をすることが可能となった。それ以外の5手術では、当該病変に対して盲目的解剖学的切除を行わず経過観察とした。これは、B-mode IOUSおよびCE-IIOUSの両方で同定できなかった病変は、CE-IIOUSが鋭敏な検査であることから術前画像の偽陽性と考え、不要な手術侵襲を加える可能性が高いと考えたからである。実際、CE-IIOUSで検出できなかった病変は、術後のfollow up中の画像検索で該当する箇所が肝転移として指摘を受けなかった（残肝の他の部位で肝再発という形式であった症例が4手術、無再発の症例が1手術であった）。

CE-IIOUS New の症例（29手術中3手術）は非解剖学的切除で完全切除し得た。

図5. 後期における術前造影CT/EOB-MRI画像および IOUS のフローチャート  
 後期においては、術前CT/EOB-MRIで指摘できていた病変がB-mode IOUSで描出できず、CE-IOUSでも描出できなかった症例は、術前画像の偽陽性と考えられたため、盲目的解剖学的切除は行われなかった。B-mode IOUSとCE-IOUSで検出できなかった2手術は、B-mode IOUS Newも見つかり、フローチャート上手術数が重複している。B-mode IOUSとCE-IOUSで検出されなかった5手術のうち1手術はCE-IOUS Newが見つかり、重複している。また、B-mode IOUS Newの1手術はCE-IOUS Newも見つかり重複している。



\* 中央値 ( 範囲 ) で記載。

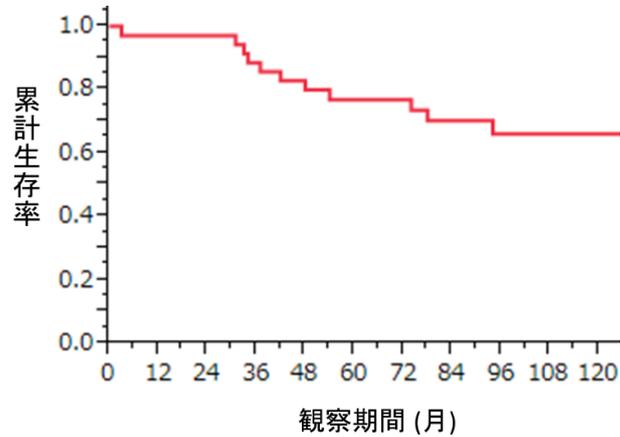
#### 4-4-4. 初回肝切除後の OS および PFS

初回肝切除後の OS の Kaplan-Meier 法による検討では、1年 OS 率は96%、3年 OS 率は89%、5年 OS 率は77%であった (図6-1)。一方 PFS の Kaplan-Meier 法による検討では、1年 PFS 率は43%、3年 PFS 率は30%、5年 PFS 率は18%であった (図6-2)。

前期と後期における初回肝切除後の OS と PFS について解析した。OS においては、前期 1年 OS 率93%、2年 OS 率93%、3年 OS 率87%、4年 OS 率73%、5年 OS 率73%であった。後期においては1年 OS 率 100%、2年 OS 率 100%、3年 OS 率90%、4年 OS 率85%、5年 OS 率79%であった。OS 中央値は 145 か月 vs 203 か月 (前期 vs 後期) であり、前期と後期で統計学的有意差は認めなかった ( $P=0.71$ )。PFS においては、前期 1年 PFS 率39%、2年 PFS 率30%、3年 PFS 率23%、4年 PFS 率23%、5年 PFS 率15%であり、後期 1年 PFS 率50%、2年 PFS 率40%、3年 PFS 率35%、4年 PFS 率30%、5年 PFS 率30%であった。PFS 中央値は10か月 vs 11 か月 (前期 vs 後期,  $P=0.98$ ) で有意差は認めなかった (図 7-1, 7-2)。この PFS 解析の際、前期群の再発した症例の中で、1人が再発までの期間が追えず解析からは除外した。

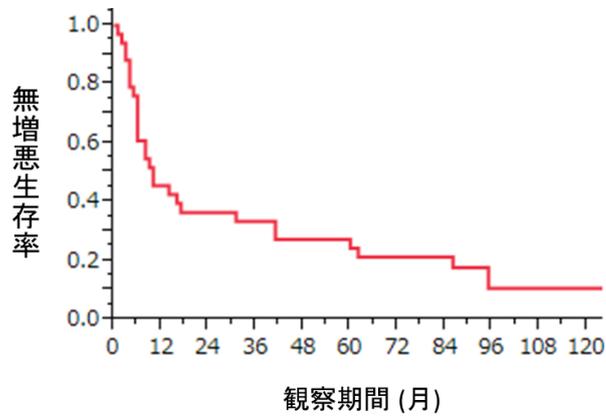
図 6. 全患者の初回肝切除日からの OS(1) およびPFS(2)の Kaplan-Meier 曲線  
 (1) 1年 OS 率96%、2年 OS 率96%、3年 OS 率89%、4年 OS 率80%、5年 OS 率77%。  
 (2) 1年 PFS 率43%、2年 PFS 率30%、3年 PFS 率30%、4年 PFS 率24%、5年 PFS 率18%であった。

(1)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
	35	34	34	31	28	24	24	20	16	14	12

(2)

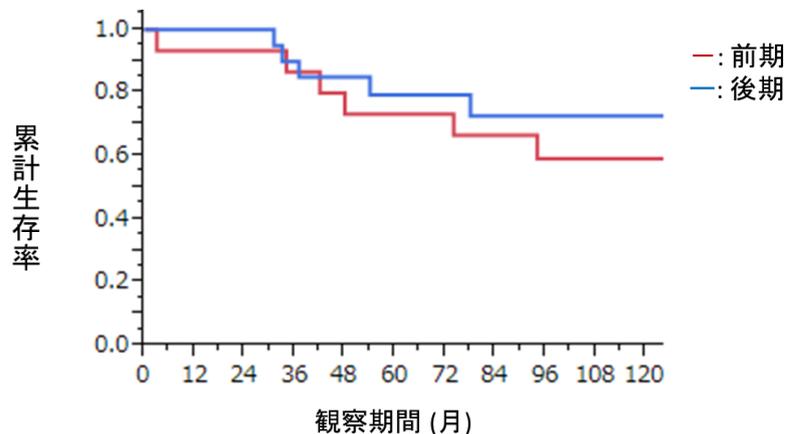


No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
	34	14	10	10	8	6	4	4	2	2	1

図7. 前期 vs 後期における初回肝切除日からの OS およびPFS の Kaplan-Meier 曲線

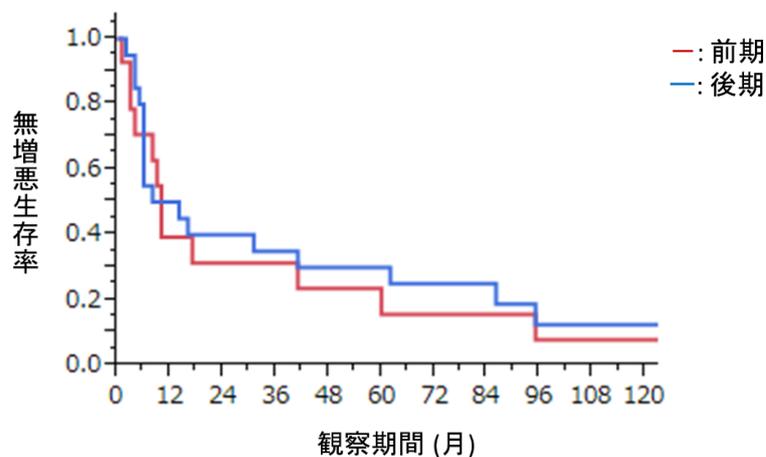
(1)OS の Kaplan-Meier 法の検討。前期と後期において OS に有意差は認めなかった (P=0.71)。 (2)PFSの Kaplan-Meier 法の検討。前期と後期において PFS に有意差は認めなかった (P=0.98)。

(1)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
前期	15	14	14	13	11	11	11	11	8	8	8
後期	20	20	20	18	17	13	12	10	8	6	4

(2)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
前期	14	5	4	4	3	2	2	2	1	1	1
後期	20	10	8	7	6	6	4	4	2	2	1

#### 4-5. 考察

NEN 肝転移に対する外科治療は R0 手術（肉眼的、顕微鏡的にも腫瘍を遺残することなく切除できた状態）を目指して行うが、R0 とならなくても 90% 以上の減量手術が生命予後と QOL を改善するとの報告があり [4, 29-32]、腫瘍減量効果が期待できる場合、積極的な肝切除が推奨される。

超音波検査において、NEN 肝転移は、高輝度腫瘍として描出される報告がある一方で [33]、低輝度腫瘍を呈することが多いとする報告 [34,35] もある。高輝度腫瘍や低輝度腫瘍以外に等輝度腫瘍として描出されることもあり、バラエティに富む。B-mode IOUS においても体表 US と同様に、NEN 肝転移の描出パターンは様々であるが、悪性腫瘍である大腸癌肝転移などと比較すると背景肝との境界は不明瞭であり、多くの症例で腫瘍の輪郭が不明瞭で見えづらく、肝切除の際に境界を見出すのに苦慮することが多い。ソナゾイド®を用いた CE-IOUS の肝転移病変の描出の有用性は、大腸癌ではすでに報告されているが [19-21, 23, 36]、NEN 肝転移においても、クッパー細胞が存在しない NEN 肝転移では腫瘍が低輝度領域となるため、極めてコントラストがついた明瞭な陰影欠損像として描出される（図1）。

本研究において後期群では CE-IOUS の肝転移巣の視認性改善効果を 79% に認め、腫瘍の存在位置を正確に把握することが可能となった。

前期群において、**B-mode IOUS**にて術前 **CT** で指摘されていた病変が描出できなかった場合は、その病変の領域を支配する門脈枝に色素を注入し、見えなかった腫瘍も切除するよう解剖学的系統切除を行っていた (100%) (図8)。

後期群においては、**B-mode IOUS** で認識できなかった病変が**CE-IOUS**でも描出できなかった症例を 6 手術に認め、そのうち 3 手術は 2 回目以上の再肝切除の症例であった。再肝切除では、肝表において前回手術後の癒着の影響が強く生じ、しばしば**B-mode IOUS** および**CE-IOUS**における視認性を低下させる。

**NEN** 肝転移病変における**CE-IOUS**の診断能については未だ報告はないが、大腸癌肝転移における**CE-IOUS**の診断能は、感度 97%、特異度 60%、陽性的中率 95%、陰性的中率 70%、正確度 93% と報告されており [21]、術前画像で肝転移と診断されていても**CE-IOUS**で陰性としたものは術後肝転移再発を認めなかったと報告されている [20]。我々は **NEN** 肝転移においてもこの結果を適用し、術前画像で **NEN** 肝転移として認識していたが**B-mode IOUS** および**CE-IOUS**で描出できなかった病変を認めた 5 手術では盲目的解剖学的切除は施行せずに、クッパー相で描出されている他の病変のみ切除し、その結果肝実質の温存ができたと考えられた。一方で、術前画像で指摘されていた病変が**B-mode IOUS**で認識されず、**CE-IOUS**にて病変が描出できた症例が 1 手術あり、肝転移 9 個を

完全に切除することができ、病理学的所見において全て NEN 肝転移の結果であった。この他、B-mode IOUS Newが見つかったもCE-IOUSで再現できなかった症例が1手術あり、その症例はクーパー相で欠損影として確認できた病変のみを肝転移と判断して切除した。

本研究では、前期群と後期群のPFSに差は認めなかった(図7-2)。本来CE-IOUSは肝転移を明瞭に描出することができるので、より微小な肝転移まで切除できるものと考えられる。NEN 肝転移はほぼ全ての患者で再発することを考慮すると、術前CTやMRIで捉えきれない微小な肝転移巣が常にあると言える。CE-IOUSを実施することでそれらの微小な肝転移巣をより多く切除することができ、次の再発、すなわち遺残した微小肝転移が造影CTやEOB-MRI画像で捉えられるまでの期間が長くなる、つまりPFSの延長が期待されるが、本研究においてはPFSの延長を認めなかった。原因として以下のことが考えられた。PFSに寄与しうる肝転移個数が多く(中央値9個)、CE-IOUSの有無の及ぼす影響が相対的に小さかったことが予想された。他にも腫瘍の悪性度などPFSに寄与する因子がいくつか考えられ、全体の症例数が少ないために前期群、後期群ではそれらの条件が整わず大きなバイアスになりうることも考えられた。またIOUSで同定できなかった肝転移が、CE-IOUSで認識できればPFS延長に

つながるが、その様な症例が少なかった(1例) ことも原因として考えられた。

今後症例数の蓄積により、CE-IOUSのPFSへの真の影響力が測れるものと考えられる。

本研究において、前期群で盲目的解剖学的切除を施行した症例は、3手術中2手術の症例でB-mode IOUSで指摘できなかつた病変を含めて切除できたが、残りの1手術ではB-mode IOUSで指摘できなかつた病変は病理でNENの存在は認められなかつた。この3手術は、実際の肝切除量が、ICG検査値から推定される切除許容量の範囲内であり、実際に術後肝不全徴候を認めなかつた。後期群において術前画像検査で認識されていた肝転移巣が、B-mode IOUSとCE-IOUSの両方で検出できなかつた病変は、肝転移病変と見なさず切除しなかつたが、術後のfollow up中の画像検索で該当する箇所が肝転移として指摘を受けなかつた(肝内の別の部位で再発を指摘された症例あり)。

本研究において、CE-IOUSを実施することにより、クッパー相で腫瘍境界が明瞭になり、腫瘍の存在位置を正確に把握することが可能となり、切除範囲を適切に判断することで、大量肝切除を回避することを含めた(図9)、肝切除を実施することが可能となった。NEN肝転移は再発しやすいため、繰り返し切除を受ける可能性があり、必要以上に残肝容量を減らさないためにCE-IOUS

は有用であると考えられた。

図 8. 盲目的解剖学的切除を行った症例

A:術前 CT 画像。肝転移巣を 2 個認める(a,b)。B: B-mode IOUSでは、A の CT 画像での a の病変 (矢印) しか検出されなかった。C: A の CT 画像で指摘された b の病変を切除すべく、b の病変を支配している門脈枝を染色。D:染色した領域が肝表に現れ (水色で囲った領域)、解剖学的切除を施行した。

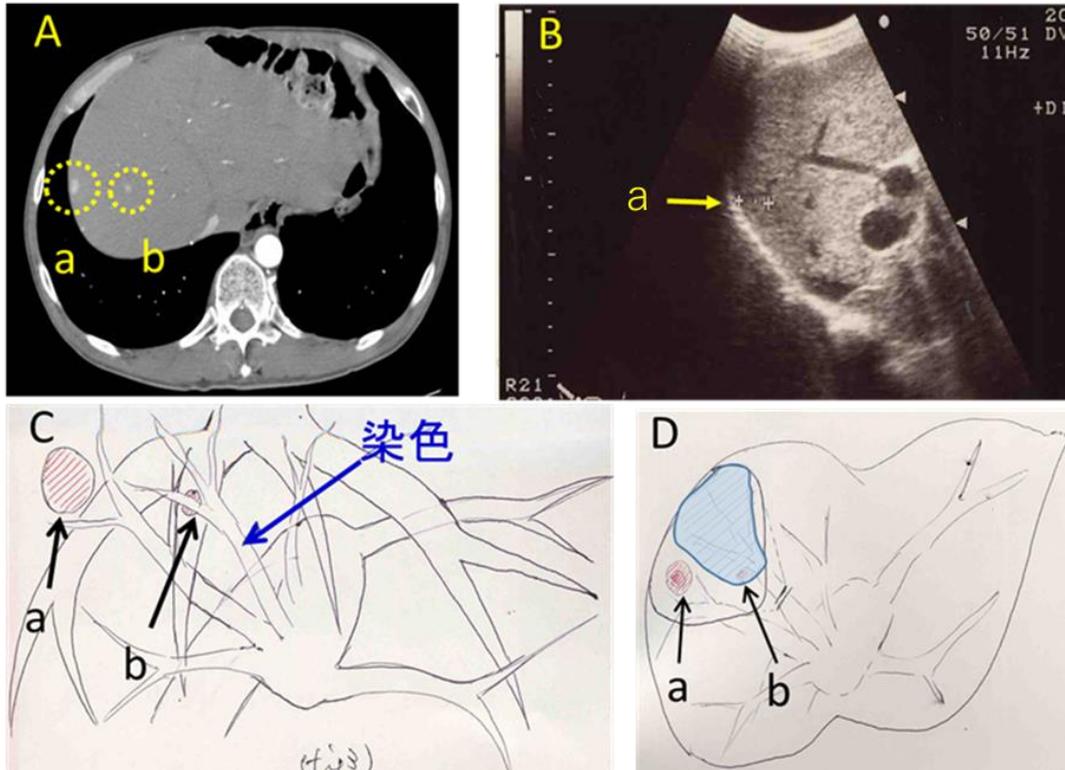
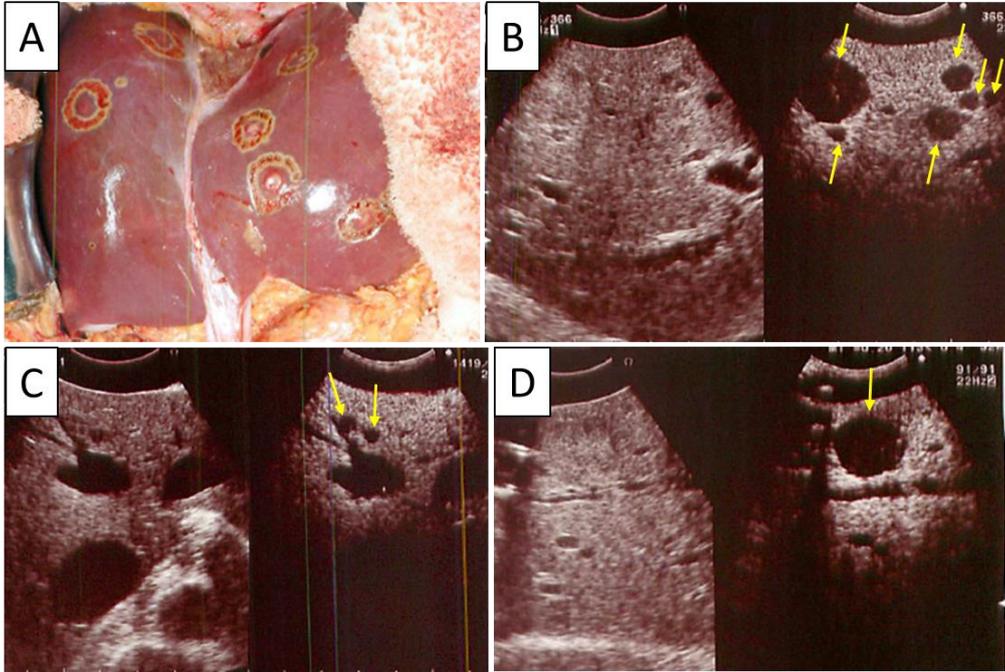


図9. 後期においてB-mode IOUS Newが無数検出され、予定術式から減量手術に変更となった症例

A: 術中写真(切除予定の腫瘍の離断ライン)。B-D: CE-IOUS(クッパー相)における腫瘍の欠損影(矢印)。



## 5. 研究②

### 5-1. 背景と目的

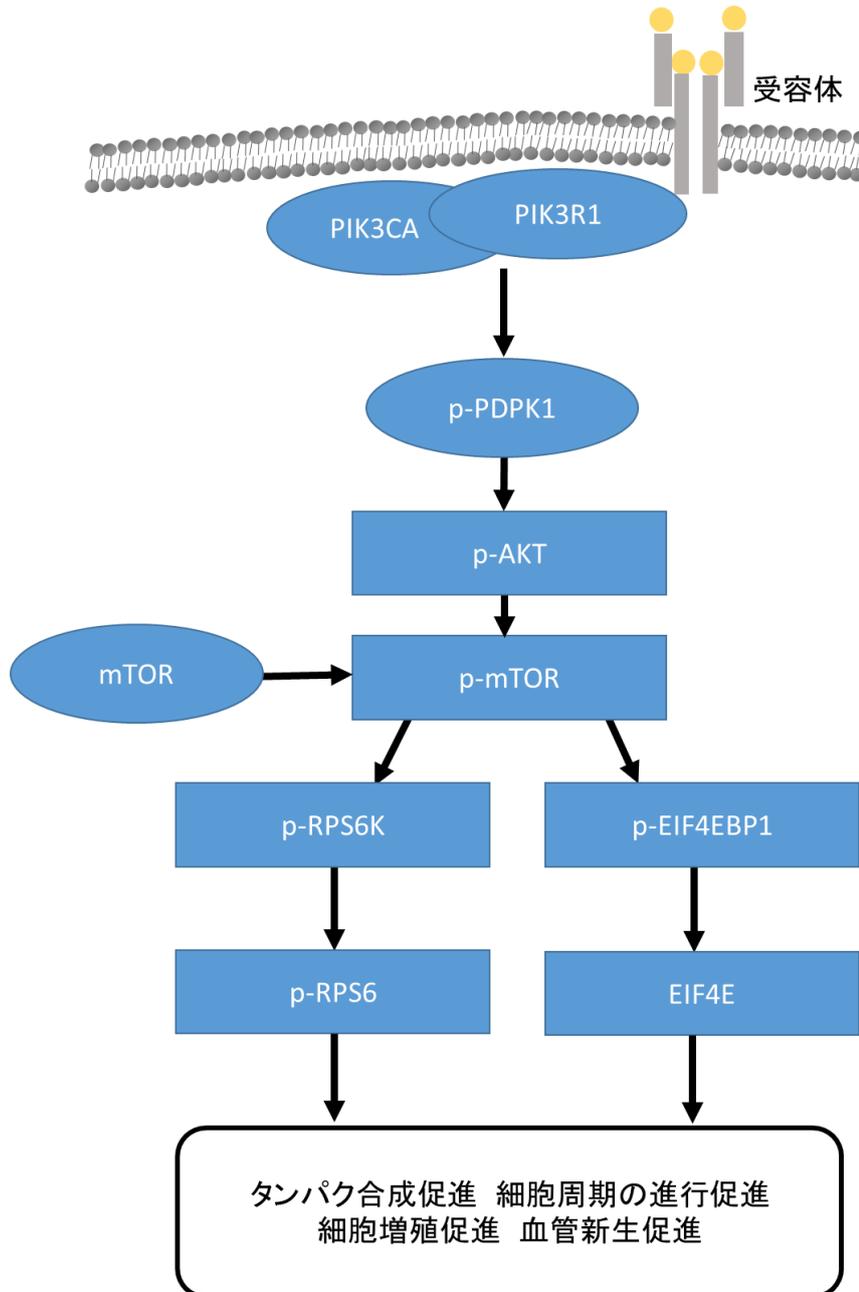
膵・消化管 NEN は非常に稀な疾患のため、分子生物学的特徴はまだ不明な点が多いが、mTOR (mammalian target of rapamycin: 哺乳類ラパマイシン標的タンパク) シグナル伝達経路の関与やDAXX/ATRXの変異などが報告されており、これらの発現や予後との関連がいくつか報告されている[10-18]。

mTOR は、酵母を用いた研究において、マクロライド系抗生物質ラパマイシンの標的分子として同定されたセリン・スレオニンキナーゼであり、細胞の分裂や成長、生存における調節因子としての役割を果たしている [17]。mTOR タンパク自体はセリン・スレオニンキナーゼ複合体であり、上流のシグナル伝達カスケードの活性化の作用を受けてリン酸化され、活性化体であるリン酸化 mTOR (phosphorylated mammalian target of rapamycin, p-mTOR) となる。さらに、p-mTOR がシグナル伝達経路下流のタンパク質であるリボソーム S6 タンパクキナーゼ (ribosomal protein S6 kinase, RPS6K) や翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 1 (eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1, 4EBP1) をリン酸化すると、それぞれリン酸化 S6 リボソームタンパク質 (phosphorylated ribosomal protein S6, p-RPS6) 、翻訳開始因子 4E (eukaryotic translation initiation

factor 4E, EIF4E) が活性化し、タンパク合成、細胞周期、細胞増殖、血管新生などが促進される (図 10)。

図10. mTOR シグナル伝達経路

上流のシグナル伝達カスケードが活性化されると、mTORがリン酸化され、リン酸化 mTOR (p-mTOR) となる。p-mTOR がさらに下流に伝達し、リボソーム S6 タンパクキナーゼ (RPS6K) や翻訳開始因子 4E 結合タンパク質 1 (4EBP1) がリン酸化されると、それぞれリン酸化 S6 リボソームタンパク質 (p-RPS6)、翻訳開始因子 4E (EIF4E) が活性化して、タンパク合成、細胞周期、細胞増殖、血管新生などが促進される。



mTOR の発現や活性化は大腸癌 [37]、肺癌 [38]、腎癌 [39]、乳癌 [40] など様々な癌種で報告されており、mTOR シグナル伝達経路は種々の癌の発生に関与している。NEN 組織を用いた研究においても、mTOR シグナル伝達経路の関連タンパク質の発現がいくつか検出され、mTOR シグナル伝達経路の構成タンパク質が NEN で発現していることがわかってきた。

また、NEN は人種により発生部位の頻度に差があることが示唆されており、欧米では小腸 NEN の頻度が多い一方で、本邦では膵臓（前腸）と直腸（後腸）に多く、小腸（中腸）は少ないとされる [1]。臓器間で NEN の予後が異なる報告があり [41, 42]、欧米からの報告では小腸 NEN に関連する報告が多い。欧米の報告では小腸 NEN において、同時性遠隔転移あるいは術後 follow up 中に肝転移が出現した症例において、p-RPS6 が発現していると全生存期間 (Overall Survival; OS) が不良であった [17]。加えて、Stage IV の中腸 NEN において、mTOR シグナル伝達経路の p-S6K (RPS6 をリン酸化するキナーゼ) が発現している症例では、疾患特異的生存曲線の生存期間が大幅に短縮されたと報告している [18]。膵 NEN においては、本邦から、同時性遠隔転移のない膵 NEN 24 例の p-mTOR の発現は OS や無再発生存期間 (Disease Free Survival; DFS) に相関し、術後肝再発を予測するバイオマーカーとして

有用であると報告しているものや[12]、p-mTORと p-RPS6 の発現は臨床病理学的因子との関連性を有すると指摘する報告がある [43]。一方で、膵 NEN においてp-mTORの発現は臨床病理学的因子との間に有意な相関関係は見つからなかったとする報告もあり、一定の見解は得られていない [44]。このように、mTOR シグナル伝達経路に関わるタンパク質の発現パターンと臨床転帰や臨床病理学的因子との関連性の報告は既報で有用な可能性があるとは報じられたが断定的でなく、また、NEN の遠隔転移を肝転移に限定してmTOR シグナル伝達経路の関連タンパク質の発現と臨床病理学的因子や臨床転帰と関係性を報告したものはない。NEN 肝転移の治療としては、原発巣と同時に肝転移巣を切除することもあれば、実臨床では原発巣や肝転移は既に他院で切除され、その後再発した肝転移の切除を施行するケースも多い。研究②においては、NEN の治療方針を決定するバイオマーカーは未だ存在せず、mTOR シグナル伝達経路に関与するタンパク質が肝転移組織でどの程度発現し、予後との関与が指摘できれば、原発巣の切除標本がなく肝転移巣の切除標本のみの症例でも、切除後の転帰の予測におけるバイオマーカーとしての役割や肝転移治療戦略の検討に有用ではないかと考えた。

また NEN の病理組織分類は、WHO 2019 分類により、組織像および増殖

能（核分裂像， Ki-67 指数）に基づいて行われる（表2）。WHO 2019 分類では、組織学的に神経内分泌パターンを示す腫瘍を高分化と称し、Ki-67 指数が<3%、3～20%、>20%の判定によりそれぞれ NET G1、NET G2、NET G3 と分類し、形態学的に低分化な神経内分泌腫瘍で Ki-67 指数が20%を超える腫瘍を神経内分泌癌NECと称している [1]。

表 2. WHO 2019 分類に基づく NEN の病理組織分類

WHO 2019 分類では、組織学的に神経内分泌パターンを示す腫瘍を高分化と称し、Ki-67 指数が<3%、3～20%、>20%の判定によりそれぞれ NET G1、NET G2、NET G3 と分類される。形態学的に低分化な神経内分泌腫瘍で Ki-67 指数が 20% を超える腫瘍を神経内分泌癌 NEC と称す [1]。

	分化度	グレード	核分裂像 Mitoses/2 mm <sup>3</sup>	Ki-67 指数
NET G1	高分化型	低	<2	<3%
NET G2		中	2～20	3～20%
NET G3		高	>20	>20%
NEC, small cell type (SCNEC)	低分化型	高	>20	>20%
NEC, large cell type (LCNEC)			>20	>20%
MiNEN	高分化型 or 低分化型	様々	様々	様々

## 5-2. 対象と方法

東京大学医学部附属病院肝胆膵外科にて外科的切除が施行された膵 NEN 症例および膵 NEN 肝転移症例（同時性、異時性含む）85 人における腫瘍部標本 114 検体を対象とした（1995 年 1 月～2013 年 12 月）。本研究では、膵原発巣組織と膵 NEN 肝転移巣組織の mTOR シグナル伝達経路に関与するタンパク質の発現と臨床転帰との関連を調べるべく、免疫組織化学染色法を用いて Ki-67 指数ならびに p-mTOR と p-RPS6 の発現と、臨床病理学的因子や臨床転帰を比較解析した。

本研究は、東京大学大学院医学系研究科・医学部の倫理委員会により承認が得られている（審査番号: 10347-(4), 課題名：消化管・膵神経内分泌腫瘍における Ki-67 測定ならびに mTOR pathway 関連タンパク質の発現解析）。

### 5-2-1. Tissue microarray (TMA) 作成

TMA とは Kallioniemi らが 1998 年に報告した方法で、1 枚のスライドガラス上に多数の組織を貼り付け、集約的に効率よく免疫染色や *in situ* hybridization などを実施し、同時に多数例の解析を実行しうる標本を指す [45]。本研究では、ホルマリン固定後パラフィン包埋された腫瘍標本を用い、腫瘍内の離れた 2 箇所から 2mm 径の針を用いてコアサンプルを取得し、得ら

れたコアは tissue microarrayer (Beecher Instruments Inc., Sun Prairie, WI) を用いて recipient に移動させた。1枚のスライドに24個の腫瘍組織(計48個)が均等になるように対角線上に再配置し、新しくパラフィンブロックを作成した。腫瘍サイズが小さい場合は TMA を作成せず、腫瘍の代表的一片を使用した。TMA パラフィンブロックおよび Whole 切片は各々4 $\mu$ mに薄切した。

#### 5-2-2. mTOR 関連タンパク免疫組織化学染色と評価

Ki-67 ( M7240, MIB1; DakoCytomation 社製, Denmark , 1:200), p-mTOR (Phospho-mTOR(Ser2448)(49F9); Cell Signaling technology 社製 , Danvers, MA, USA, 1:100) ならびに p-RPS6 (Phospho-S6 Ribosomal Protein(Ser240/244)(D68F8)XP; Cell signaling technology 社製 , Danvers, MA, USA, 1:100) の抗体を用いて免疫組織化学染色を施行した。

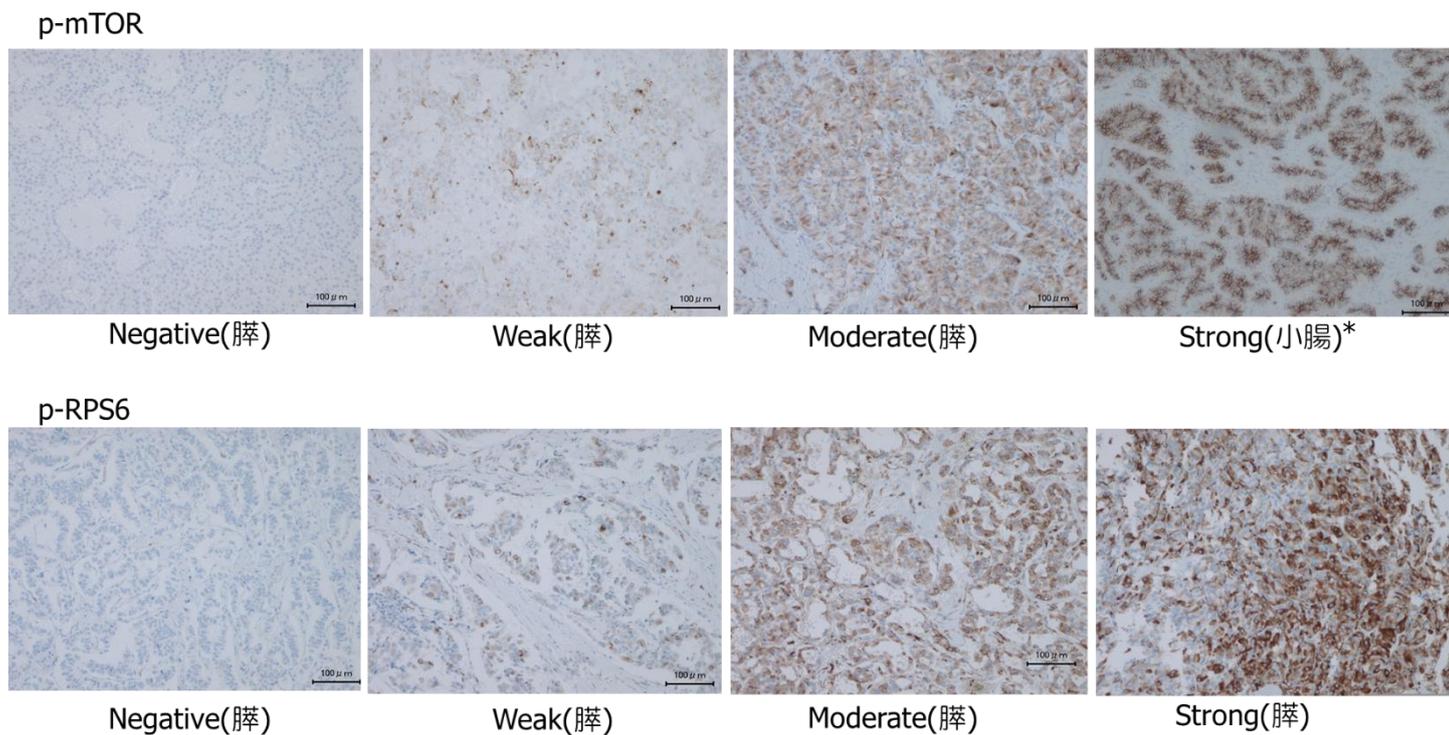
免疫組織化学染色は全自動免染システム装置 (VENTANA Benchmark ULTRA) を使用した。Ki-67 は、熱処理の賦活化にCC1バッファー ULTRA を使用し、95度で64分間行った。1次抗体の反応時間は32分間行い、検出はI-VIEW DABユニバーサルキットを使用し、hematoxylinによる後染色を実施した。p-mTOR および p-RPS6 の染色は、Ki-67 を染色した方法に、内因性ビオチン / アビジンブロッキング試薬によるブロッキング処理を追加して実施した。機

器、試薬は全てロシュ・ダイアグノスティックス社製を使用して実施した。大腸癌は腫瘍組織部でこれらのタンパク質の免疫組織化学染色にて陽性となることが知られており、陽性コントロールとして大腸癌の腫瘍組織を染色した。一次抗体を除き、希釈液のみで染色したものを、陰性コントロールとして使用した。

腫瘍組織における p-mTOR および p-RPS6 の染色は、半定量的免疫反応性スコアリング (IRS) システムを適用し、評価した [46]。

IRS ではカテゴリー A (染色強度) とカテゴリー B (免疫反応性細胞の割合) を乗算してスコアを算出した。カテゴリー A では、染色強度を 0 から 3 までの 4 段階に分類 (0;negative, 1; weak, 2; moderate, 3; strong) した (図 11)。カテゴリー B は、免疫反応性細胞の割合を 0 (なし)、1 (<10%)、2 (10-50%)、3 (51-80%)、および 4 (> 80%) とした。カテゴリー A と B を乗算すると、0 から 12 の範囲の IRS が得られ、発現と臨床病理学的因子との関係分析では、1 ~ 12 の IRS は positive と見なされ、IRS 0 は negative と見なした。染色強度および免疫反応性細胞の割合の評価は、著者と 5 年以上の経験のある病理医が協議して実施した。

図11. p-mTOR および p-RPS6 の染色強度の写真



\* 膵組織および膵 NEN 肝転移組織において p-mTOR Strong の症例がなかったため、小腸 NEN の Strong 症例を代用した。

### 5-2-3. Ki-67 指数の算出方法

Ki-67 指数はデジタル病理画像解析システム (Tissue Studio<sup>TM</sup>, ドイツ Definiens 社製) を使用して算出した。核の認識として、ヘマトキシリン染色の閾値; 0.1、免疫染色の閾値; 0.5、典型的な核のサイズ ; 40 に設定することで、良性組織、間質、および炎症細胞の含有は最小限に抑えられた。

### 5-2-4. 統計学的評価

JMP®10.0 computer software (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) を用いて統計解析を行った。WHO 2019 分類、Ki-67 指数、p-mTOR および p-RPS6 の発現と臨床病理学的因子との関係の有意性を Fisher の正確確率検定と  $\chi^2$  検定を用いて解析した。生存期間は、Kaplan-Meier 法で生存曲線を描き、log-rank test により比較を行った。予後因子解析は、Cox 比例ハザードモデルを用いて、ハザード比 (Hazard Ratio; HR) および 95% 信頼区間 (95% confidence interval: 95% CI) を計算した。全ての解析において、P 値 < 0.05 は統計的に有意であると見なした。

### 5-3. 結果

#### 5-3-1. 患者85人の病態と p-mTOR および p-RPS6 の染色結果の分布

患者は85人（男性41人、女性44人）で、全体の年齢中央値は55歳（21-84歳）、男女別の年齢中央値は男性56歳（21-77歳）、女性54歳（29-84歳）であった。85人のうち、2人は再膣切除を受けていた。85人の NEN 患者のうち、機能性 NEN は13人（男性6人、女性7人）、非機能性 NEN は72人（男性35人、女性37人）であった。機能性 NEN はインスリノーマ10人、ガストリノーマ2人、グルカゴノーマ1人であった。また85人中、MEN I型が3人、von Hippel Lindau病が3人存在した。85人のうち、経過中再発した患者が37人（44%）、無再発が48人（56%）であった。経過中に16人（19%）が亡くなった。術前薬物療法が入っていた患者は4人存在し、全員肝転移を伴う患者であった（同時性肝転移3人、異時性肝転移1人）。同時性肝転移の術前にストレプトゾシンの投与を受けた患者が2人、エベロリムスの内服を行った患者が1人存在し、異時性肝転移の術前にCDDP+5FUの投与を受けた患者が1人であった。

85人の臨床病理学的因子と結果を表3に示す。WHO 2019分類に関しては、原発巣と遠隔転移巣の両方を有する患者は原発組織を選出し、原発巣がなく遠隔転移巣のみの再切除を繰り返している患者は切除時期が古い検体を以降の解

析に使用することにした。

尚、85人の中に再肝切除を5回受けた患者(1人)において、異時性の肝転移巣間のWHO 2019分類が異なり、1回目の肝転移切除時のグレードはNET G1だったが、5回目の肝転移切除時のグレードはNET G3の結果となった。

114検体の内訳は、膵臓;78検体、肝転移巣;36検体であった。全114検体の臓器別の頻度および手術施行時の全染色結果を表4に示す。

これらをIRSに基づきNegative群(IRS:0)とPositive群(IRS:1~12)の2群にすると、p-mTORの染色結果の分布はNegative群64検体(56.1%)、Positive群50検体(43.9%)、p-RPS6の染色結果の分布はNegative群34検体(29.8%)、Positive群80検体(70.2%)という結果となった。

表 3. 85人における臨床病理学的因子の結果

因子	結果
患者数	85
性別(男性/女性)	41/44
年齢	55 (21-84)
機能性/ 非機能性	13/72
インスリノーマ	10
ガストリノーマ	2
グルカゴノーマ	1
MEN I 型	3
Von-Hippel Lindau病	3
リンパ節転移 (No/Yes)	33/21
同時性肝転移 (No/Yes)	68/17
WHO 2019 分類	
NET G1/G2	76/9
ENETS TNM staging ( I / II / III / IV )	32/16/9/28
再発 (No/Yes)	48/37
切除根治度 (R0/R1/R2)	71/0/14
予後 (生存/ 死亡)	69/16

\* 数値は n もしくは中央値 ( 範囲 ) で記載

表 4. 114 検体の臨床病理学的特徴および WHO 2019 分類、p-mTOR・p-RPS6 における免疫組織化学染色の結果  
 p-mTOR negative 群は64検体 (56.1%)、positive 群は50検体 (43.9%)、p-RPS6 negative 群は34検体 (29.8%)、positive 群は80検体 (70.2%) の分布となつた。

因子	結果	WHO 2019 分類 (G1/G2/G3)	p-mTOR 染色強度 (N/W/M/S)*	p-mTOR 発現 (negative/positive)	p-RPS6 染色強度 (N/W/M/S)*	p-RPS6発現 (negative/positive)
検体数	114	94/19/1	64/43/7/0	64/50	34/59/17/4	34/80
腫瘍サイズ(mm, mean±SD)						
膵臓	26.9±22.3	25.8±22.0/ 38.0±24.1/-		32.7±26.8/ 19.5±11.2		26.3±21.9/ 27.2±22.6
肝(転移)	27.8±25.1	31.3±29.2/ 21.3±15.3/ 25±0		32.3±22.6/ 22.3±27.7		32.5±34.0/ 25.8±20.6
臓器						
膵臓	78	71/7/-	44/31/3/-	44/34	23/44/10/1	23/55
肝(転移)	36	23/12/1	20/12/4/-	20/16	11/15/7/3	11/25

\* 数値は n もしくは mean ± SD で記載。  
 N; negative, W; weak, M; moderate, S; strong

### 5-3-2. 膵切除症例76人に関する予後解析

次に検体数が一番多かった膵臓76人（76検体）について OS および PFS を検討した。膵臓78検体中、再発の2検体は除外した。腫瘍サイズと WHO 2019 分類, p-mTOR および p-RPS6 発現との関連性についての解析では、WHO 2019分類においては、G2 群の方が G1 群と比較して腫瘍サイズが大きい傾向であった (G1 群 vs G2 群 ;  $26.4 \pm 22.0\text{mm}$  vs  $38.0 \pm 24.1\text{mm}$ ,  $P=0.07$ )。p-mTOR 発現および p-RPS6 発現における腫瘍サイズの比較は、p-mTOR negative 群 vs positive 群 ;  $32.7 \pm 26.8\text{mm}$  vs  $20.3 \pm 11.1\text{mm}$  ( $P=0.08$ )、p-RPS6 negative 群 vs positive 群 ;  $26.3 \pm 22.0\text{mm}$  vs  $28.0 \pm 22.7\text{mm}$  ( $P=0.97$ ) であり、有意差は認めなかった。Ki-67 指数と p-mTOR および p-RPS6 発現の相関関係について解析したところ、p-mTOR positive 群は negative 群よりも Ki-67 指数が高い傾向であり (p-mTOR negative 群 vs positive 群 ;  $1.19 \pm 2.13\%$  vs  $1.51 \pm 3.21\%$ ,  $P=0.14$ )、p-RPS6 positive 群は negative 群よりも有意に Ki-67 指数が高かった (p-RPS6 negative 群 vs positive 群 ;  $0.72 \pm 1.34\%$  vs  $1.58 \pm 2.98\%$ ,  $P=0.007$ )。同時性肝転移を伴う症例の Ki-67 指数の平均値は、同時性肝転移を伴っていない症例と比較して有意に高かった ( $2.1 \pm 1.8\%$  vs  $1.1 \pm 2.8\%$ ,  $P=0.003$ )。

次に OS と PFS について解析した。WHO 2019 分類において、G1 群は

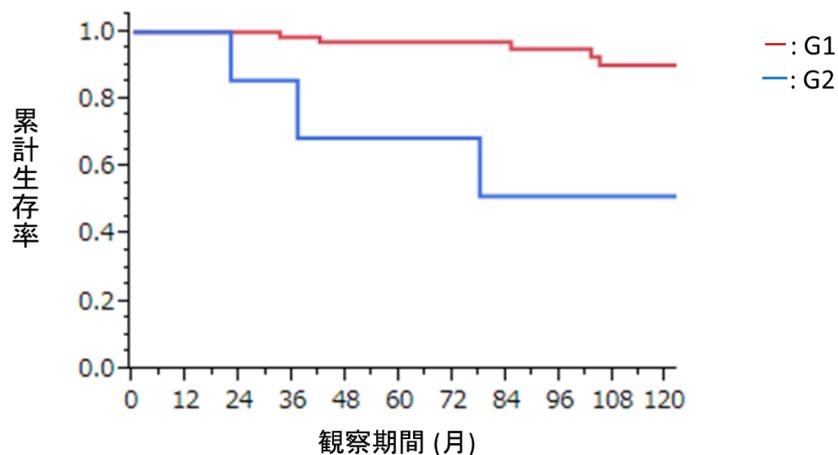
G2 群よりも OS が有意に延長した ( $P=0.008$ )( 図 12-1) 。 p-mTOR 発現と p-RPS6 発現に関しては、 negative 群と positive 群で、 OS において有意差は認めなかった ( 図12-2、図 12-3) 。 PFS においては、 WHO 2019 分類、 p-mTOR 発現および p-RPS6 発現において有意差を認めなかった。この76人を、同時性肝転移を伴わない60人 ( 全て R0 切除 ) に絞って OS 、 PFS をそれぞれ解析したが、 WHO 2019 分類、 p-mTOR 発現および p-RPS6 発現において有意差を認めなかった。

76人における OS と PFS に関する Cox 比例ハザード回帰分析を施行したところ、 OS では不良となる因子は指摘できなかったが、 PFS に関しては同時性肝転移の存在やリンパ節転移の存在が PFS 不良となる因子であった ( $P=0.001$ ,  $P=0.006$ ) ( 表5)。

図12. 臍 NEN76 人の WHO 2019 分類、 p-mTOR 発現、 p-RPS6 発現の違いによる OS の Kaplan-Meier 曲線

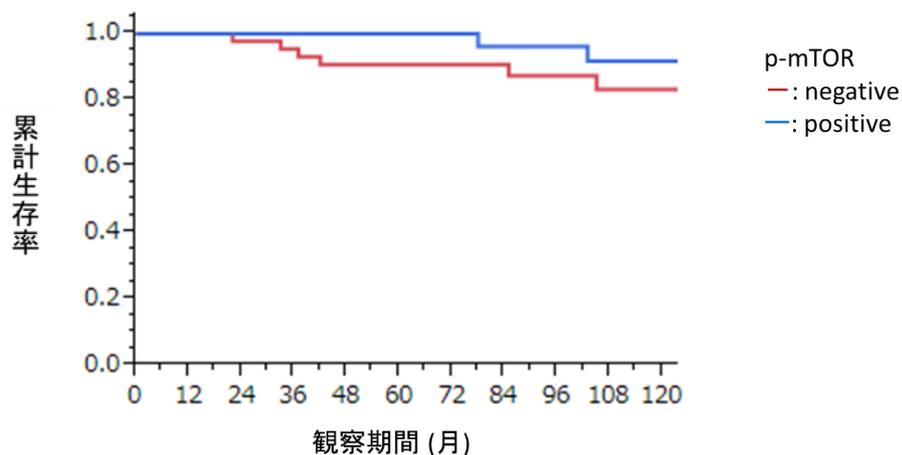
(1)WHO 2019分類における OS の Kaplan-Meier 法の検討。 G1 群では有意に OS が延長した(P=0.008)。 (2)p-mTOR 発現の違いによる OS の Kaplan-Meier 法の検討。 p-mTOR negative 群と positive 群において OS に有意な差は認めなかった (P=0.28)。 (3) p-RPS6 発現の違いによる OS の Kaplan-Meier 法の検討。 p-RPS6 negative 群と positive 群において OS に有意な差は認めなかった (P=0.70)。

(1)



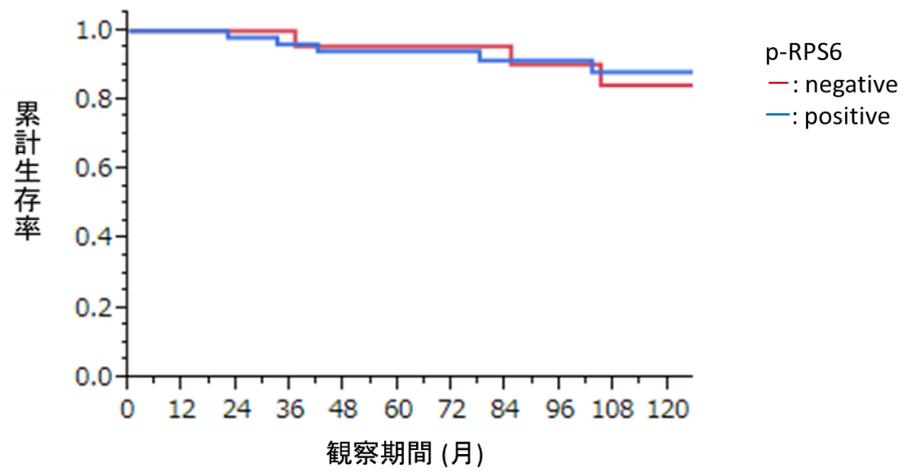
No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	(月)
G1 :	69	69	69	68	67	67	67	67	66	65	65	
G2 :	7	7	6	6	5	5	5	4	4	4	4	

(2)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	(月)
negative :	44	44	43	42	40	40	40	40	39	38	38	
positive :	32	32	32	32	32	32	32	31	31	30	30	

(3)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	(月)
negative	: 23	23	23	23	22	22	22	22	21	20	20	
positive	: 53	53	52	51	50	50	50	49	49	48	48	

表 5. 臍 NEN76 人における p-mTOR および p-RPS6 発現の違いによる OS, PFS の Cox 比例ハザード回帰分析の結果

OS 不良の因子は指摘できなかつた。PFS に関しては、同時性肝転移を伴う症例では、伴わない症例に対して HR 5.9(95%信頼区間; 2.1-16.7, P=0.001)であり、PFS 不良因子であった。リンパ節転移を認めた症例では、リンパ節転移を認めない症例に対して HR 3.8 (95% 信頼区間 ; 1.49-10.3, P=0.006) であり、PFS 不良因子であった。

	患者数	イベント数 (OS)	OS Multivariate HR	95%信頼区間	P 値	イベント数 (PFS)	PFS Multivariate HR	95%信頼区間	P 値
WHO 2019 分類					0.13				0.44
G1	69	7	1	Reference		25	1	Reference	
G2	7	3	4.00	0.63 to 31.9		3	0.60	0.13 to 2.11	
p-mTOR 発現					0.60				0.34
negative	44	7	1	Reference		18	1	Reference	
positive	32	3	0.61	0.08 to 3.57		10	0.63	0.23 to 1.61	
p-RPS6 発現					0.72				0.22
negative	23	4	1	Reference		10	1	Reference	
positive	53	6	0.74	0.14 to 4.20		18	0.53	0.19 to 1.49	
同時性肝転移					0.23				0.001
なし	60	3	1	Reference		13	1	Reference	
あり	16	7	3.45	0.41 to 23.1		15	5.89	2.10 to 16.7	
リンパ節転移					0.11				0.006
なし	32	3	1	Reference		8	1	Reference	
あり	18	5	3.65	0.76 to 20.7		15	3.80	1.49 to 10.3	

### 5-3-3. 腓 NEN 肝転移切除症例23人に関する予後解析

腓 NEN 肝転移切除を受けた23人から肝転移組織36検体が得られた。当教室において繰り返し肝切除を受けていた患者は23人中 5 人存在した。23人中 2 人は二次的な肝切除を受けた。23人 (23 検体) の初回肝切除日からの OS、PFS について、切除時期が古い検体を解析に使用することとし、WHO 2019 分類、p-mTOR 発現および p-RPS6 発現で解析した。OS においては、WHO 2019分類において、G1 群/G2群の分布はそれぞれ15人 / 8 人であった。OS 中央値は G1 群 vs G2 群 ; 145 か月 vs 78 か月であり、G1 群は OS が長い傾向であった(P=0.06)(図 13-1)。p-mTOR 発現における分布は、negative 群 / positive 群はそれぞれ12人 / 11 人であった。OS 中央値は、p-mTOR negative 群 vs positive 群において、94か月 vs 204 か月であり有意差を認めなかった (P=0.36) ( 図 14-1) 。 p-RPS6 発現における分布は、negative 群 / positive 群でそれぞれ 7 人 / 16 人であった。OS 中央値は、p-RPS6 negative 群 vs positive 群 において、275 か月 vs 127 か月であり p-RPS6 negative 群は OS が長い傾向であった(P=0.07)(図 15-1)。

PFS においては、再発した症例の中で、1 人が再発までの期間が追えず解析からは除外し、22人での解析となった。WHO 2019 分類において、G1 群 /

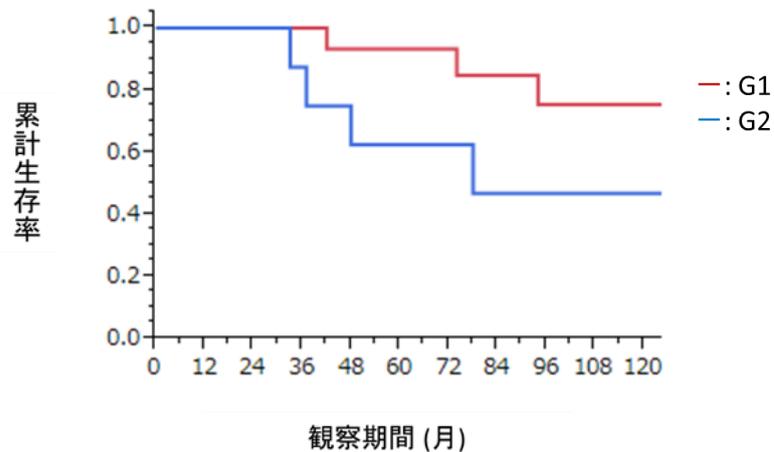
G2 群の分布はそれぞれ14人 / 8 人であった。その症例群の PFS 中央値は G1 群 vs G2 群 ; 41 か月 vs 16 か月であり、 G1 群において PFS が長くなる傾向にあった(P=0.28)(図 13-2) 。 p -mTOR 発現における22人の分布は、 negative 群 / positive 群はそれぞれ10人 / 12 人であった。 PFS 中央値は、 p-mTOR negative 群 vs positive 群において、 19か月 vs 44 か月であり有意差を認めなかった (P=0.15) ( 図 14-2) 。 p-RPS6 発現における22人の分布は、 negative 群 / positive 群でそれぞれ 6 人 / 16 人であった。 PFS 中央値は negative 群 vs positive 群において、 61 か月 vs 27.5 か月であり、 p-RPS6 negative 群で PFS が長い傾向であった (P=0.17) ( 図 15-2) 。 p-RPS6 の negative 群と positive 群における腫瘍個数中央値は、 negative 群 1 個(1個～無数, 無数症例 3 人 ) に対し、 positive 群 11 個(1個～無数, 無数症例 2 人 ) であった。 p-RPS6 negative 群では 1 年 PFS 率 83%、 2 年 PFS 率 83%、 3 年 PFS 率 83%、 4 年 PFS 率 67%、 5 年 PFS 率 60% であった。 p-RPS6 positive 群では 1 年 PFS 率 63%、 2 年 PFS 率 56%、 3 年 PFS 率 31%、 4 年 PFS 率 19%、 5 年 PFS 率 19% であった。

PFS に関する Cox 比例ハザード回帰分析では、 G2 群は G1 群に対して、 PFS 不良因子 (P=0.03) であった ( 表6)。

図 13. 臍 NEN 肝転移症例23人の肝転移巣における WHO 2019 分類による OS(1) およびPFS(2)の Kaplan-Meier 曲線

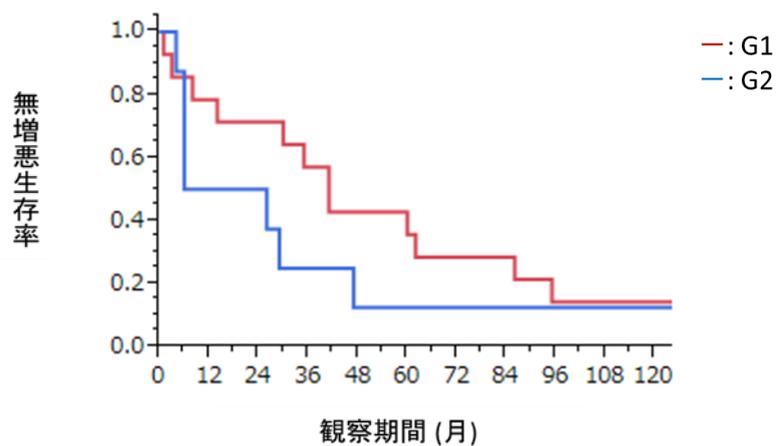
(1)WHO 2019分類における OS の Kaplan-Meier 法の検討。 G1 群は G2 群より OS が長い傾向であった (P=0.06)。(2) WHO 2019分類における PFS の Kaplan-Meier 法の検討。 G1 群は G2 群より PFS が長い傾向であった (P=0.28)。PFSにおいては、再発した症例の中で、1人が再発までの期間が追えず解析からは除外。

(1)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	(月)
G1 :	15	15	15	15	14	14	14	13	13	12	12	
G2 :	8	8	8	7	5	5	5	4	4	4	4	

(2)

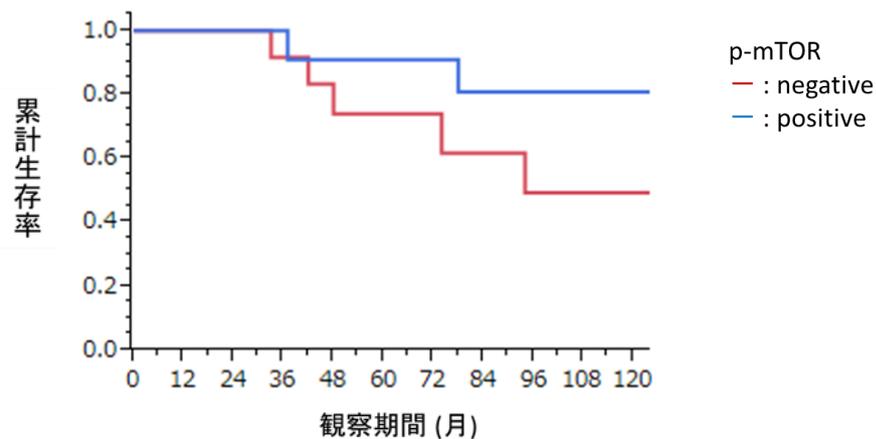


No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	(月)
G1 :	14	11	10	8	6	5	4	4	2	2	2	
G2 :	8	4	4	2	1	1	1	1	1	1	1	

図14. 腓 NEN 肝転移症例23人の肝転移巣における p-mTOR 発現の違いによる OS (1) および PFS (2) の Kaplan-Meier 曲線

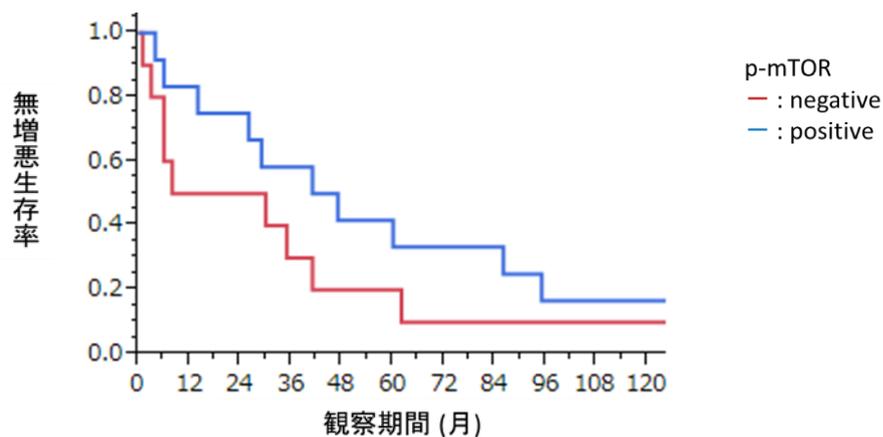
(1)p-mTOR 発現の違いにおける OS の Kaplan-Meier 法の検討。p-mTOR negative 群および positive 群において、OS に有意差を認めなかった (P=0.07)。  
 (2) p-mTOR 発現の違いにおける PFS の Kaplan-Meier 法の検討。p-mTOR negative 群および positive 群において、PFS に有意差を認めなかった (P=0.15)。PFS においては、再発した症例の中で、1 人が再発までの期間が追えず解析からは除外。

(1)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
negative	12	12	12	11	9	9	9	8	7	7	7
positive	11	11	11	11	10	10	10	9	9	8	8

(2)



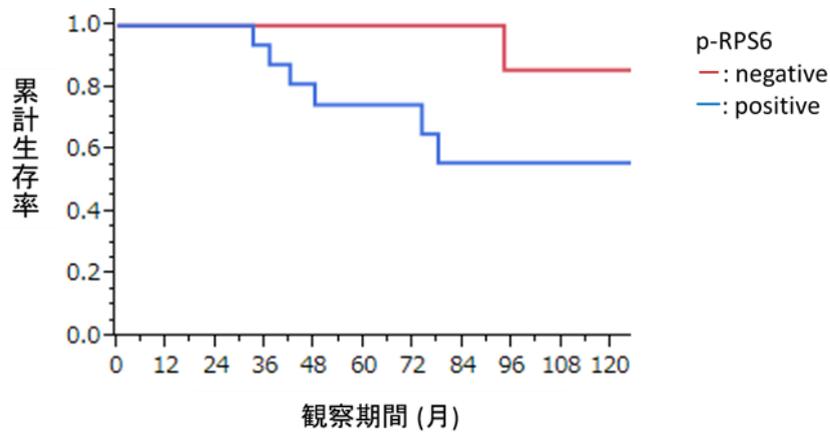
No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
negative	10	5	5	3	2	2	1	1	1	1	1
positive	12	10	9	7	5	4	4	4	2	2	2

図15. 膾 NEN 肝転移症例23人の肝転移巣における p-RPS6 発現の違いによる OS (1) および PFS (2) の Kaplan-Meier 曲線

(1)p-RPS6 発現の違いにおける OS の Kaplan-Meier 法の検討。p-RPS6 negative 群は positive 群より OS が長い傾向であった (P=0.07)。(2) p-RPS6 発現の違いにおける PFS の Kaplan-Meier 法の検討。p-RPS6 negative 群は positive 群よりも PFS が長い傾向であった (P=0.17)。

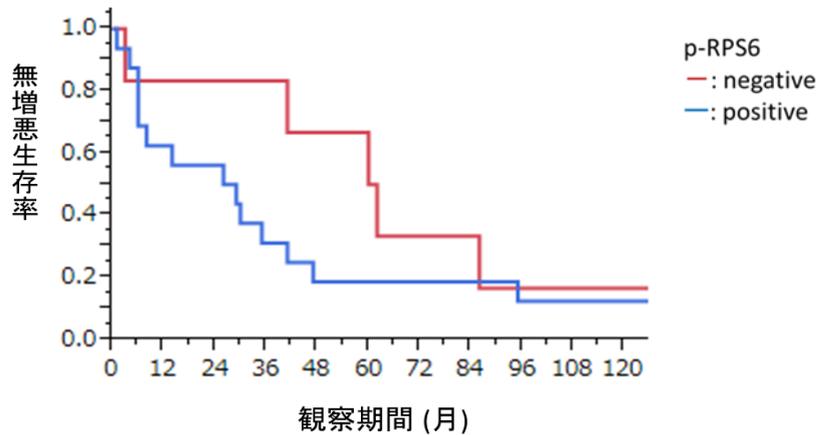
PFS においては、再発した症例の中で、1 人が再発までの期間が追えず解析からは除外。

(1)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
negative	7	7	7	7	7	7	7	7	6	6	6
positive	16	16	16	15	12	12	12	10	10	10	10

(2)



No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120 (月)
p-RPS6 negative	6	5	5	5	4	3	2	2	1	1	1
p-RPS6 positive	16	10	9	5	2	2	2	2	1	1	1

表 6. 臍 NEN 肝転移22人の肝転移巣における WHO 2019 分類 ,p-mTOR  
 および p-RPS6 発現による PFS の Cox 比例ハザード回帰分析の結果  
 G2 群は G1 群に対して、HR 9.27 (95% 信頼区間 ; 1.27-104.6, P=0.03) であり、  
 PFS 不良因子であった。

	患者数	イベント数	PFS Multivariate HR	95%信頼区間	P値
WHO 2019 分類					
G1	14	13	1	Reference	
G2	8	8	9.27	1.27 to 104.6	0.03
P-mTOR 発現					
negative	10	10	1	Reference	
positive	12	11	0.34	0.05 to 2.27	0.25
P-RPS6 発現					
negative	6	5	1	Reference	
positive	16	16	1.31	0.17 to 16.9	0.81

#### 5-3-4. 原発巣（膵臓）と対応する肝転移巣を有する14人に関する比較解析

原発巣の膵組織と対応する肝転移巣を有する症例は14人存在し、14人とも同時性肝転移の症例であった。原発巣および対応する肝転移巣の、WHO 2019 分類、p-mTOR 発現および p-RPS6 発現に関する検体数の分布は、原発巣 (G1 群 /G2 群 ; 11/3, p-mTOR negative/positive; 9/5 , p-RPS6 negative/ positive; 5/9) 、肝転移巣 (G1 群 /G2 群 ; 10/ 4, p-mTOR negative/ positive; 8/6 , p-RPS6 negative/ positive; 3/11) であった。

原発巣と対応する肝転移巣の Ki-67 指数の平均値は、原発巣:  $2.0 \pm 2.0\%$  、肝転移巣:  $2.0 \pm 1.9\%$  であり、原発巣の Ki-67 指数と肝転移巣の Ki-67 指数に関して、有意差は認めなかった ( $P=0.97$ ) が、原発巣の Ki-67 指数が高くなると肝転移巣の Ki-67 指数も有意に高くなった ( $P=0.0001$ )。Ki-67 指数の変動と p-mTOR の変動を評価したところ、相関はみられなかった ( $P=0.14$ )。同様に Ki-67 指数の変動と肝転移巣の p-RPS6 の変動を評価したところ、相関は見られなかった ( $P=0.30$ )。肝転移巣の Ki-67 指数が原発巣の Ki-67 指数よりも高い群(8人)と原発巣の Ki-67 指数が肝転移巣の Ki-67 指数より高い群(6人)で OS と PFS を比較すると、OS では統計学的な有意差は認めず ( $P=0.77$ )、PFS 中央値においては肝転移巣の Ki-67 指数が原発巣よりも高い群で短い傾向であ

った (6 か月 vs 26 か月,  $P=0.15$ )。この他、肝転移巣の Ki-67 指数が原発巣の Ki-67 指数より高い 8 人のうち、2 人は肝転移巣の Grade が原発巣の Grade より上昇していた。一方で原発巣の Ki-67 指数が肝転移巣の Ki-67 指数より高い 6 人のうち、1 人は原発巣の Grade が肝転移巣の Grade より上昇していた。

次に、14人の原発巣 ( 膵臓 ) と対応する肝転移巣の p-mTOR および p-RPS6 の発現 (IRS) の結果を図16および図17に示す (患者ナンバーは p-mTOR と p-RPS6 でそれぞれ対応している)。p-mTOR において原発巣と肝転移巣の IRS が同じ症例は 6 人、原発巣が肝転移巣より IRS が高い症例は 3 人、肝転移巣の方が原発巣より IRS が高い症例が 5 人であった。同様に、p-RPS6 においては原発巣と肝転移巣の IRS が同じ症例は 2 人、原発巣が肝転移巣より IRS が高い症例は 3 人、肝転移巣が原発巣より IRS が高い症例は 9 人であった。

p-mTOR、p-RPS6 の発現が、原発巣より肝転移巣で高い症例とそれ以外の症例に分けて OS と PFS を解析した。p-mTOR の発現が、原発巣より肝転移巣で高い症例は 5 人 (それ以外は 9 人)、p-RPS6 の発現が、原発巣より肝転移巣で高い症例は 9 人 (それ以外は 5 人) であった。p-mTOR 発現および p-RPS6 発現においてはともに、肝転移巣での発現が原発巣の発現より高くても OS と PFS に統計学的な有意差を認めなかった。しかし、p-RPS6 発現において

は肝転移巣での発現が原発巣の発現より高い群(9人)では、1年、2年、3年、4年、5年PFS率はそれぞれ56%、22%、11%、11%、11%であり、それ以外の群(5人；肝転移巣と原発巣の発現が同じ症例、もしくは原発巣の方が肝転移巣よりも発現が高い症例)は、1年、2年、3年、4年、5年PFS率はそれぞれ60%、60%、60%、40%、40%であり、肝転移巣の p-RPS6 発現が原発巣よりも高い群では、それ以外の群と比較してPFS中央値は14か月 vs 41か月であり、短い傾向であった (P=0.26) (図 18)。

図16. 原発巣（膵臓）と対応する肝転移巣の p-mTOR IRS の結果  
 p-mTOR において原発巣と肝転移巣の IRS が同じ症例は 6 人、原発巣が肝転移巣より IRS が高い症例は 3 人、肝転移巣の方が原発巣より IRS が高い症例が 5 人であった。

## IRS

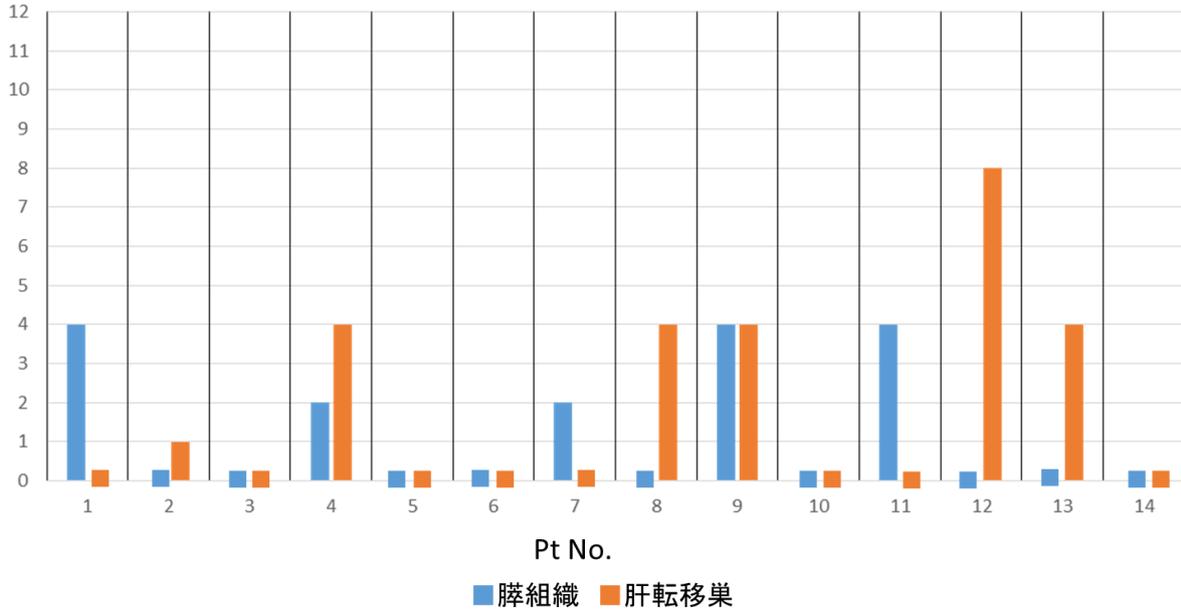


図17. 原発巣（膵臓）と対応する肝転移巣のp-RPS6 IRSの結果

p-RPS6 においては原発巣と肝転移巣の IRS が同じ症例は2人、原発巣が肝転移巣より IRS が高い症例は3人、肝転移巣が原発巣より IRS が高い症例は9人であった。

### IRS

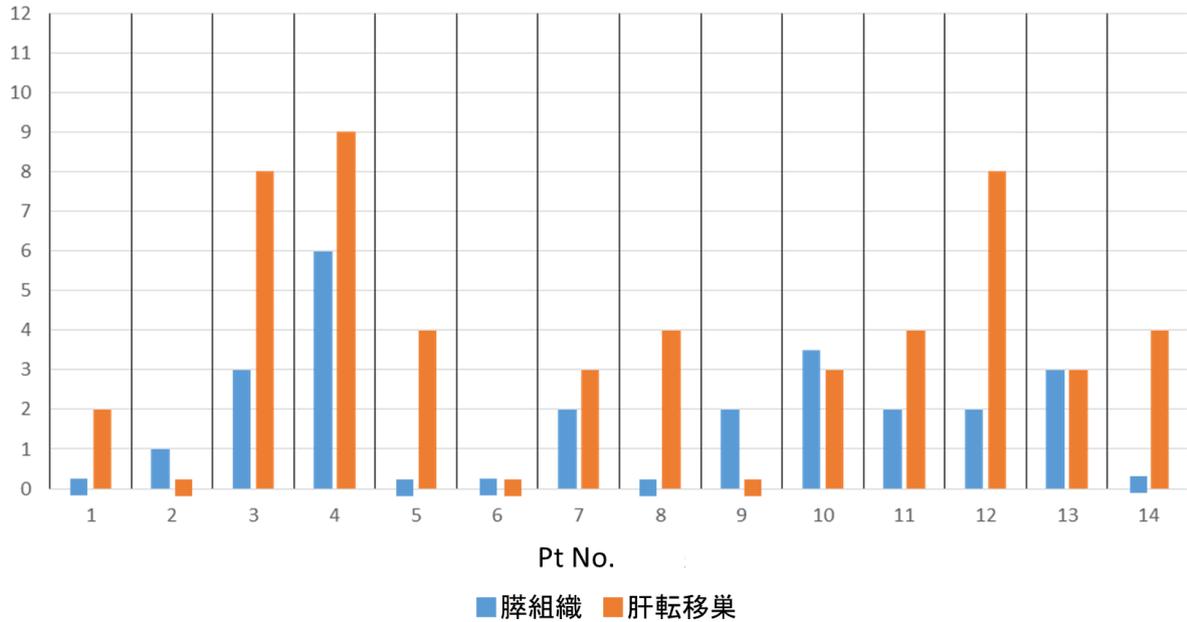
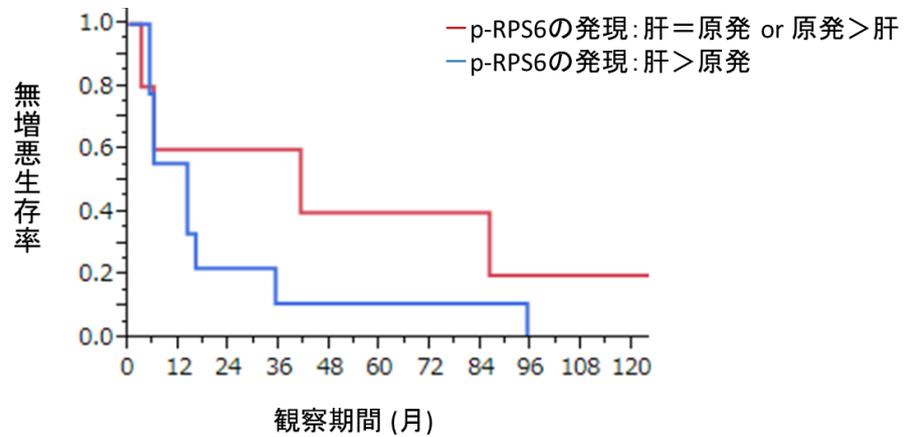


図18. 膵組織および対応する肝転移巣を有する14人における p-RPS6 発現比較別のPFSのKaplan-Meier曲線

膵 NEN における、原発巣と肝転移巣の p-RPS6 発現の比較。肝転移巣の発現が原発巣よりも高い症例群の方がPFSが短くなる傾向であった (P=0.27)。



	No. at risk	0	12	24	36	48	60	72	84	96	108	120	(月)
原発=肝転移 or 原発>肝転移	5	3	3	3	2	2	2	2	1	1	1		
肝転移>原発 :	9	5	2	1	1	1	1	1	1	1	1		

#### 5-3-5. 再肝切を施行した5人に関する比較解析

当教室で腓 NEN 肝転移に対し2回以上の再肝切除を施行した症例は5人存在し、16手術が施行された。経過中4人が亡くなった。5人の各検体における、WHO 2019 分類、p-mTOR および p-RPS6 発現と IRS の分布を表7に示した。

症例2は、切除回数が増えていくと、WHO 2019 分類の Grade も上がった。

Grade が上がると切除から再発までの期間が短くなるのではないかと思われたが、症例数が少ないため、本研究では傾向を見いだせなかった。また、同一人物内の異時性肝転移巣においては、それぞれ切除時期によって p-mTOR や p-RPS6 の発現が変動していた。この他、mTOR 阻害薬ではないが、症例2は2回目の切除後にストレプトゾシンの投与を受けていた。この症例についてはストレプトゾシンの投与が実施された直後の切除検体で、p-mTOR と p-RPS6 の発現が低下していた (表7)。

表 7. 各 5 人の WHO 2019 分類、p-mTOR 発現、p-RPS6 発現結果  
 症例 2 は、切除回数が増えていくと、WHO 2019 分類の Grade も上がった。  
 症例 2 の切除毎の PFS は、1 か月、2 か月、6 か月、4 か月、5 か月であった。  
 症例 2 は 2 回目の切除後にストレプトゾシンの投与を受けた。ストレプトゾシ  
 ンの投与が実施された直後の切除検体で、p-mTOR と p-RPS6 の発現が低下し  
 ていた。

	WHO 2019分類 (Ki-67指数)	p-mTOR IRS (N;0, W;1, M;2, S;3)	p-RPS6 IRS (N;0, W;1, M;2, S;3)	切除から再発までの 期間(月)
症例1	G1-G1-G1 (2.8-1.3-1.2)	1-4-0 (1-1-0)	0-0-0 (0-0-0)	60-33-64
症例2	G1-G2-G2-G2-G3 (0.1-5.1-6.6-9.4-21.3)	0-4-0-0-0 (0-1-0-0-0)	3-8-4-8-8 (1-2-1-2-2)	1-2-6-4-5
症例3	G1-G1-G1-G1 (2.9-1.4-1.7-1.6)	4-0-8-8 (1-0-2-2)	2-3-4-6 (1-1-1-2)	4-5-19-12
症例4	G1-G2 (2.5-4.0)	0-8 (0-2)	4-2 (1-1)	10-14
症例5	G2-G2 (3.2-5.0)	0-4 (0-1)	4-12 (1-3)	16-6

\* 上段は WHO 2019 分類もしくは IRS 結果を記載。下段は Ki-67 指数もしくは  
 染色強度(N;Negative=0, W;Weak=1, M;Moderate=2, S;Strong=3)の結果を記載。

#### 5-4. 考察

本研究では、NEN 組織における p-mTOR および p-RPS6 の発現を、免疫組織化学的手法を用いて検出し、その臨床病理学的意義を見出す目的で様々な因子と関連性を検討した。p-mTOR および p-RPS6 の陽性率は、それぞれ 43.9%、70.2% であり、既報と比較して p-mTOR は同等、p-RPS6 の陽性率は高値の結果となった [17, 41]。本研究では、膵 NEN の p-mTOR および p-RPS6 発現において、OS や PFS に関して統計学的に有意な結果は認められなかった。膵 NEN 76 人の PFS に関する多変量解析では、同時性肝転移有りの症例とリンパ節転移有りの症例は PFS 不良因子であった ( $P=0.001$ ,  $P=0.006$ )。本研究の結果は、既報の結果と一致していた [43]。この点から、本研究で構築した症例群の解析は、病態と予後の関連性において矛盾しない結果を導出していると考えられる。その中で、p-mTOR および p-RPS6 の発現性に関する臨床病理学的評価の結果に既報との差が生じた要因としては、症例数の少なさと発現解析の手法における制限が挙げられる。特に、後者は病変組織の一部を用いて発現性を評価する TMA 法を採用しており、本法の解析の結果が必ずしもその病変組織全体の発現性を反映しきれない可能性を有する。今後の研究における TMA の作成においては、病変全体の発現をより反映可能な方法の確立が必要となると考えられ

る。

本研究では、膵 NEN の肝転移巣組織を用いた解析を実施した。NEN の肝転移巣組織のみを用いた免疫組織化学的研究はこれまでに報告がなく、本研究が初めての実施例となった。その結果、G1 群は G2 群より OS が長い傾向であり ( $P=0.06$ )(図 13-1)、PFS も G1 群で長くなる傾向であった ( $P=0.28$ )(図 13-2)。これは、肝転移巣における NEN 細胞の増殖性が患者の予後に影響を与える因子と成り得ると示唆され、増殖性に富む細胞により構成された NEN が比較的早期に増悪していることを示唆している。また p-RPS6 positive 群は negative 群よりも OS および PFS が短くなる傾向であった ( $P=0.07, P=0.17$ )( 図 15-1, 図 15-2)。

これまでに NEN の遠隔転移を肝転移に限定して mTOR シグナル伝達経路に関与するタンパク質の発現と臨床転帰の関係性を報告したものはなく、本研究の結果は貴重な結果と考える。本研究において、膵 NEN の肝転移巣において p-RPS6 の発現が positive の場合は予後不良の傾向であることが示され、切除後の転帰の予測におけるバイオマーカーとしての役割や肝転移治療戦略の検討に有用ではないかと考えられた。

さらに、本研究では原発巣組織(膵臓)と対応する肝転移巣組織が得られ

た症例群(14人)を用いた解析を実施した。今まで、原発巣組織と対応する肝転移巣組織の Ki-67 指数の比較の報告は存在するが[47-49]、原発巣組織と対応する肝転移巣組織に限定して両者を同時に免疫染色組織化学的解析に供して比較した研究はなく、本研究が初めての実施例となった。結果として、p-mTOR および p-RPS6 の発現性が原発巣組織とそれに対応する肝転移巣組織との間で変動していることを見出した。肝転移巣の Ki-67 指数が原発巣の Ki-67 指数よりも高値だった症例群(8人)の PFS は、低値だった症例群に比べて短い傾向であった(P=0.15)。以上の結果から、NEN 細胞は必ずしも転移巣においても原発巣での性質を維持しているものではないことが示され、その性質の変動が NEN の病態に大きく影響するものであると示唆される。今後、多くの症例数を蓄積した解析を実施することにより、肝転移に伴う NEN 細胞の性質の変動が病態に及ぼす影響を解明することにつながると期待される。

NEN は増殖性に富む性質を有しており、比較的早期に肝臓などの他臓器に転移する。加えて、転移巣は全ての病変部位を完全に切除することが困難な場合があるほか、完全切除が達成された場合でも診断時に認められなかった小型の病変が早期増殖・進展する場合もあり、早期に再発を呈する傾向にある。本研究において、肝転移巣切除後に再発を呈したために再肝切除を繰り返し施行

した5人の全切除検体(16検体)に対して免疫組織化学的解析を実施し、p-mTORおよびp-RPS6の発現性を評価した。同一患者内の異なる時期の切除に由来する検体間でp-mTORおよびp-RPS6の発現性が異なり、腫瘍の進展に伴って発現性が変動していることが示された。ストレプトゾシン投与後の切除検体において、p-mTORとp-RPS6の発現低下がみられた結果については1例のみで説明ができないが、ストレプトゾシンの腫瘍抑制効果の機序がmTORシグナル伝達経路に依存することを示唆するものかもしれない。本研究はまだ症例数が少なく今後のさらなる追跡研究が必要である。以上の結果から、NENの進展・再発に伴って腫瘍細胞の性質は一定ではなく刻々と変化しており、その変化を追跡することは早期の再肝切除の実施など症例の予後の悪化を予見するものと考えられる。

本研究では、原発巣組織と共に肝転移巣組織や再肝切除組織を用いてNEN症例の免疫組織化学的解析を実施し、WHO 2019分類やmTORシグナル伝達経路に関連する活性化分子種(p-mTORおよびp-RPS6)の発現性をもつ臨床病理学的意義を検討した。腫瘍細胞の増殖性や当該分子種の発現変動がNEN症例の予後の悪化に影響することを示唆する結果を得た。原発巣や肝転移巣における種々の分子の発現変動がNENの病態に及ぼす効果をより深く理解するため

に、症例数を蓄積した研究の継続が必要であると考えられる。

## 6. 結論

本研究では、NENの肝転移の外科切除について、CE-IOUSの有用性について評価した。ソナゾイド®がなかった時代では、B-mode IOUSで認識できなかった腫瘍に対し、その支配領域の門脈枝に色素を注入して盲目的解剖学的切除を施行していた。CE-IOUSを実施することで、切除範囲を適切に判断することが可能となった。NEN肝転移は再発しやすいため、繰り返し切除を受ける可能性があり、必要以上に残肝容量を減らさないためにCE-IOUSは有用であると考えられた。

また、分子生物学的特徴にまだまだ不明な点が多いNEN組織におけるmTORシグナル伝達経路に関連するタンパク質の発現と臨床病理学的因子ならびに臨床転帰についての解析では、腓原発の肝転移巣組織を解析すると、肝転移巣においてmTORシグナル伝達経路を構成するタンパク質のp-RPS6が発現しているとOSおよびPFSが短くなる傾向となった。これは肝転移切除後の転帰の予測におけるバイオマーカーとしての役割や肝転移治療戦略の検討に有用である可能性が示唆された。今後も症例数を蓄積した研究の継続が必要であると考えられる。

## 7. 引用文献

1. 膵・消化管神経内分泌腫瘍(NEN)診療ガイドライン2019年第2版
2. Rossi RE, Burroughs AK, Caplin ME: Liver transplantation for unresectable neuroendocrine tumor liver metastases. *Ann Surg Oncol* 21; 2398—2405:2014
3. Kim SJ, Kim JW, Han SW, et al. Biological characteristics and treatment outcomes of metastatic or recurrent neuroendocrine tumors: tumor grade and metastatic site are important for treatment strategy. *BMC Cancer*. 2010; 10: 448.
4. Capurso G, Bettini R, Rinzivillo M, Boninsegna L, Delle Fave G, Falconi M. Role of resection of the primary pancreatic neuroendocrine tumour only in patients with unresectable metastatic liver disease: a systematic review. *Neuroendocrinology*. 2011;93(4):223-9. doi: 10.1159/000324770. Epub 2011 Feb 25. PMID: 21358176.
5. Cho CS, Labow DM, Tang L, Klimstra DS, Loeffler AG, Levenson GE, Fong Y, Jarnagin WR, D'Angelica MI, Weber SM, Blumgart LH, Dematteo RP. Histologic grade is correlated with outcome after resection of hepatic neuroendocrine neoplasms. *Cancer*. 2008 Jul 1;113(1):126-34. doi: 10.1002/cncr.23523. PMID: 18457323.
6. Sarmiento JM, Heywood G, Rubin J, Ilstrup DM, Nagorney DM, Que FG. Surgical treatment of neuroendocrine metastases to the liver: a plea for resection to increase survival. *J Am Coll Surg*. 2003 Jul;197(1):29-37. doi: 10.1016/S1072-7515(03)00230-8. PMID: 12831921.
7. Scigliano S, Lebtahi R, Maire F, Stievenart JL, Kianmanesh R, Sauvanet A, Vullierme MP, Couvelard A, Belghiti J, Ruzsniowski P, Le Guludec D. Clinical and imaging follow-up after exhaustive liver resection of endocrine metastases: a 15-year monocentric experience. *Endocr Relat Cancer*. 2009 Sep;16(3):977-90. doi: 10.1677/ERC-08-0247. Epub 2009 May 26. PMID: 19470616.
8. Mayo SC, de Jong MC, Pulitano C, Clary BM, Reddy SK, Gamblin TC, Celinksi SA, Kooby DA, Staley CA, Stokes JB, Chu CK, Ferrero A, Schulick RD, Choti MA, Mentha G, Strub J, Bauer TW, Adams RB, Aldrighetti L, Capussotti L, Pawlik TM. Surgical management of hepatic neuroendocrine tumor metastasis: results from an international multi-institutional analysis. *Ann Surg Oncol*. 2010 Dec;17(12):3129-36. doi: 10.1245/s10434-010-1154-5. Epub 2010 Jun 29. PMID: 20585879.

9. Saxena A, Chua TC, Sarkar A, Chu F, Liauw W, Zhao J, Morris DL. Progression and survival results after radical hepatic metastasectomy of indolent advanced neuroendocrine neoplasms (NENs) supports an aggressive surgical approach. *Surgery*. 2011 Feb;149(2):209-20. doi: 10.1016/j.surg.2010.06.008. Epub 2010 Aug 2. PMID: 20674950.
10. Jiao Y, Shi C, Edil BH, de Wilde RF, Klimstra DS, Maitra A, Schulick RD, Tang LH, Wolfgang CL, Choti MA, Velculescu VE, Diaz LA Jr, Vogelstein B, Kinzler KW, Hruban RH, Papadopoulos N. DAXX/ATRX, MEN1, and mTOR pathway genes are frequently altered in pancreatic neuroendocrine tumors. *Science*. 2011 Mar 4;331(6021):1199-203. doi: 10.1126/science.1200609. Epub 2011 Jan 20. PMID: 21252315; PMCID: PMC3144496.
11. Vandamme T, Beyens M, Boons G, Schepers A, Kamp K, Biermann K, Pauwels P, De Herder WW, Hofland LJ, Peeters M, Van Camp G, Op de Beeck K. Hotspot DAXX, PTCH2 and CYFIP2 mutations in pancreatic neuroendocrine neoplasms. *Endocr Relat Cancer*. 2019 Jan 1;26(1):1-12. doi: 10.1530/ERC-18-0120. PMID: 30021865.
12. Sato S, Tsuchikawa T, Nakamura T, Sato N, Tamoto E, Okamura K, Shichinohe T, Hirano S. Impact of the tumor microenvironment in predicting postoperative hepatic recurrence of pancreatic neuroendocrine tumors. *Oncol Rep*. 2014 Dec;32(6):2753-9. doi: 10.3892/or.2014.3530. Epub 2014 Oct 6. PMID: 25310565.
13. Sabatini DM. mTOR and cancer: insights into a complex relationship. *Nat Rev Cancer*. 2006 Sep;6(9):729-34. doi: 10.1038/nrc1974. Epub 2006 Aug 17. PMID: 16915295.
14. Hay N, Sonenberg N. Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev*. 2004 Aug 15;18(16):1926-45. doi: 10.1101/gad.1212704. PMID: 15314020.
15. Yao JC, Shah MH, Ito T, Bohas CL, Wolin EM, Van Cutsem E, Hobday TJ, Okusaka T, Capdevila J, de Vries EG, Tomassetti P, Pavel ME, Hoosen S, Haas T, Lincy J, Lebwohl D, Öberg K; RAD001 in Advanced Neuroendocrine Tumors, Third Trial (RADIANT-3) Study Group. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med*. 2011 Feb 10;364(6):514-23. doi: 10.1056/NEJMoa1009290. PMID: 21306238; PMCID: PMC4208619.
16. Pavel ME, Hainsworth JD, Baudin E, Peeters M, Hörsch D, Winkler RE,

- Klimovsky J, Lebwohl D, Jehl V, Wolin EM, Öberg K, Van Cutsem E, Yao JC; RADIANT-2 Study Group. Everolimus plus octreotide long-acting repeatable for the treatment of advanced neuroendocrine tumours associated with carcinoid syndrome (RADIANT-2): a randomised, placebo-controlled, phase 3 study. *Lancet*. 2011 Dec 10;378(9808):2005-2012. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61742-X. Epub 2011 Nov 25. PMID: 22119496.
17. Qian ZR, Ter-Minassian M, Chan JA, Imamura Y, Hooshmand SM, Kuchiba A, Morikawa T, Brais LK, Daskalova A, Heafield R, Lin X, Christiani DC, Fuchs CS, Ogino S, Kulke MH. Prognostic significance of MTOR pathway component expression in neuroendocrine tumors. *J Clin Oncol*. 2013 Sep 20;31(27):3418-25. doi:10.1200/JCO.2012.46.6946. Epub 2013 Aug 26. PMID: 23980085; PMCID: PMC3770868.
  18. Kasajima A, Pavel M, Darb-Esfahani S, Noske A, Stenzinger A, Sasano H, Dietel M, Denkert C, Röcken C, Wiedenmann B, Weichert W. mTOR expression and activity patterns in gastroenteropancreatic neuroendocrine tumours. *Endocr Relat Cancer*. 2011 Jan 13;18(1):181-92. doi: 10.1677/ERC-10-0126. PMID: 21159731.
  19. Arita J, Ono Y, Takahashi M, Inoue Y, Takahashi Y, Saiura A. Usefulness of contrast-enhanced intraoperative ultrasound in identifying disappearing liver metastases from colorectal carcinoma after chemotherapy. *Ann Surg Oncol*. 2014 Jun;21 Suppl 3:S390-7. doi: 10.1245/s10434-014-3576-y. Epub 2014 Feb 26. PMID: 24570378.
  20. Arita J, Ono Y, Takahashi M, Inoue Y, Takahashi Y, Matsueda K, Saiura A. Routine Preoperative Liver-specific Magnetic Resonance Imaging Does Not Exclude the Necessity of Contrast-enhanced Intraoperative Ultrasound in Hepatic Resection for Colorectal Liver Metastasis. *Ann Surg*. 2015 Dec;262(6):1086-91. doi: 10.1097/SLA.0000000000001085. PMID: 26010441.
  21. Takahashi M, Hasegawa K, Arita J, Hata S, Aoki T, Sakamoto Y, Sugawara Y, Kokudo N. Contrast-enhanced intraoperative ultrasonography using perfluorobutane microbubbles for the enumeration of colorectal liver metastases. *Br J Surg*. 2012 Sep;99(9):1271-7. doi: 10.1002/bjs.8844. Epub 2012 Jul 24. PMID: 22829436.
  22. The Japan society of ultrasonics in medicine 50th anniversary book, [ 超音波医学

- 会50周年記念誌出版事業委員会編] 東京：日本超音波医学会，2013.3-
23. Kiyoshi Maekawa, Masatoshi Kudo, Uezuri Toshinori, 超音波検査による質的診断, *Medical journal of Kinki University*. 35(1), 47-53, 2010-03-01
  24. Chung WS, Kim MJ, Chung YE, Kim YE, Park MS, Choi JY, Kim KW. Comparison of gadoteric acid-enhanced dynamic imaging and diffusion-weighted imaging for the preoperative evaluation of colorectal liver metastases. *J Magn Reson Imaging*. 2011 Aug;34(2):345-53. doi: 10.1002/jmri.22671. Epub 2011 Jun 23. PMID: 21702068.
  25. Donati OF, Hany TF, Reiner CS, von Schulthess GK, Marincek B, Seifert B, Weishaupt D. Value of retrospective fusion of PET and MR images in detection of hepatic metastases: comparison with 18F-FDG PET/CT and Gd-EOB-DTPA-enhanced MRI. *J Nucl Med*. 2010 May;51(5):692-9. doi: 10.2967/jnumed.109.068510. Epub 2010 Apr 15. PMID: 20395324.
  26. Löwenthal D, Zeile M, Lim WY, Wybranski C, Fischbach F, Wieners G, Pech M, Kropf S, Ricke J, Dudeck O. Detection and characterisation of focal liver lesions in colorectal carcinoma patients: comparison of diffusion-weighted and Gd-EOB-DTPA enhanced MR imaging. *Eur Radiol*. 2011 Apr;21(4):832-40. doi: 10.1007/s00330-010-1977-2. Epub 2010 Oct 2. PMID: 20886339.
  27. Niekel MC, Bipat S, Stoker J. Diagnostic imaging of colorectal liver metastases with CT, MR imaging, FDG PET, and/or FDG PET/CT: a meta-analysis of prospective studies including patients who have not previously undergone treatment. *Radiology*. 2010 Dec;257(3):674-84. doi: 10.1148/radiol.10100729. Epub 2010 Sep 9. PMID: 20829538.
  28. Makuuchi M, Hasegawa H, Yamazaki S. Ultrasonically guided subsegmentectomy. *Surg Gynecol Obstet*. 1985 Oct;161(4):346-50. PMID: 2996162.
  29. Capurso G, Rinzivillo M, Bettini R, Boninsegna L, Delle Fave G, Falconi M. Systematic review of resection of primary midgut carcinoid tumour in patients with unresectable liver metastases. *Br J Surg*. 2012 Nov;99(11):1480-6. doi: 10.1002/bjs.8842. Epub 2012 Sep 13. PMID: 22972490.
  30. Zhou B, Zhan C, Ding Y, Yan S, Zheng S. Role of palliative resection of the primary pancreatic neuroendocrine tumor in patients with unresectable metastatic liver disease: a systematic review and meta-analysis. *Onco Targets Ther*. 2018

Feb 23;11:975-982. doi: 10.2147/OTT.S158171. PMID: 29503572; PMCID: PMC5827741.

31. Partelli S, Cirocchi R, Rancoita PMV, Muffatti F, Andreasi V, Crippa S, Tamburrino D, Falconi M. A Systematic review and meta-analysis on the role of palliative primary resection for pancreatic neuroendocrine neoplasm with liver metastases. *HPB (Oxford)*. 2018 Mar;20(3):197-203. doi: 10.1016/j.hpb.2017.10.014. Epub 2017 Nov 29. PMID: 29196022.
32. Guo J, Zhang Q, Bi X, Zhou J, Li Z, Huang Z, Zhang Y, Li M, Chen X, Hu X, Yihebal C, Liang J, Liu J, Zhao J, Cai J, Zhao H. Systematic review of resecting primary tumor in MNETs patients with unresectable liver metastases. *Oncotarget*. 2017 Mar 7;8(10):17396-17405. doi: 10.18632/oncotarget.14156. PMID: 28030811; PMCID: PMC5370049.
33. Mörk H, Ignee A, Schuessler G, Ott M, Dietrich CF. Analysis of neuroendocrine tumour metastases in the liver using contrast enhanced ultrasonography. *Scand J Gastroenterol*. 2007 May;42(5):652-62. doi: 10.1080/00365520601021765. PMID: 17454888.
34. Hoeffel, C., Job, L., Ladam-Marcus, V. et al. Detection of Hepatic Metastases from Carcinoid Tumor: Prospective Evaluation of Contrast-Enhanced Ultrasonography. *Dig Dis Sci* 54, 2040–2046 (2009). <https://doi.org/10.1007/s10620-008-0570-x>
35. Dogeas E, Chong CCN, Weiss MJ, Ahuja N, Choti MA. Can echogenic appearance of neuroendocrine liver metastases on intraoperative ultrasonography predict tumor biology and prognosis? *HPB (Oxford)*. 2018 Mar;20(3):237-243. doi:10.1016/j.hpb.2017.08.029. Epub 2017 Nov 2. PMID: 29103839.
36. DeOliveira ML, Pawlik TM, Gleisner AL, Assumpcao L, Lopes-Filho GJ, Choti MA. Echogenic appearance of colorectal liver metastases on intraoperative ultrasonography is associated with survival after hepatic resection. *J Gastrointest Surg*. 2007 Aug;11(8):970-6; discussion 976. doi: 10.1007/s11605-007-0093-3. PMID: 17623266.
37. Tampellini M, Longo M, Cappia S, Bacillo E, Alabiso I, Volante M, Dogliotti L, Papotti M. Co-expression of EGF receptor, TGFalpha and S6 kinase is significantly associated with colorectal carcinomas with distant metastases at

- diagnosis. *Virchows Arch.* 2007 Mar;450(3):321-8. doi: 10.1007/s00428-007-0370-2. Epub 2007 Jan 30. PMID: 17265080.
38. Anagnostou VK, Bepler G, Syrigos KN, Tanoue L, Gettinger S, Homer RJ, Boffa D, Detterbeck F, Rimm DL. High expression of mammalian target of rapamycin is associated with better outcome for patients with early stage lung adenocarcinoma. *Clin Cancer Res.* 2009 Jun 15;15(12):4157-64. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0099. Epub 2009 Jun 9. PMID: 19509151.
  39. Campbell L, Jasani B, Edwards K, Gumbleton M, Griffiths DF. Combined expression of caveolin-1 and an activated AKT/mTOR pathway predicts reduced disease-free survival in clinically confined renal cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2008 Mar 11;98(5):931-40. doi: 10.1038/sj.bjc.6604243. Epub 2008 Feb 19. PMID: 18283322; PMCID: PMC2266860.
  40. Zhou X, Tan M, Stone Hawthorne V, Klos KS, Lan KH, Yang Y, Yang W, Smith TL, Shi D, Yu D. Activation of the Akt/mammalian target of rapamycin/4E-BP1 pathway by ErbB2 overexpression predicts tumor progression in breast cancers. *Clin Cancer Res.* 2004 Oct 15;10(20):6779-88. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-04-0112. PMID: 15501954.
  41. Plöckinger U, Wiedenmann B. Treatment of gastroenteropancreatic neuroendocrine tumors. *Virchows Arch.* 2007 Aug;451 Suppl 1:S71-80. doi: 10.1007/s00428-007-0446-z. Epub 2007 Aug 8. PMID: 17684765.
  42. Rindi G, Klöppel G, Couvelard A, Komminoth P, Körner M, Lopes JM, McNicol AM, Nilsson O, Perren A, Scarpa A, Scoazec JY, Wiedenmann B. TNM staging of midgut and hindgut (neuro) endocrine tumors: a consensus proposal including a grading system. *Virchows Arch.* 2007 Oct;451(4):757-62. doi: 10.1007/s00428-007-0452-1. Epub 2007 Aug 3. PMID: 17674042.
  43. Komori Y, Yada K, Ohta M, Uchida H, Iwashita Y, Fukuzawa K, Kashima K, Yokoyama S, Inomata M, Kitano S. Mammalian target of rapamycin signaling activation patterns in pancreatic neuroendocrine tumors. *J Hepatobiliary Pancreat Sci.* 2014 Apr;21(4):288-95. doi: 10.1002/jhbp.26. Epub 2013 Sep 3. PMID: 24002888.
  44. Zhou CF, Ji J, Yuan F, Shi M, Zhang J, Liu BY, Zhu ZG. mTOR activation in well differentiated pancreatic neuroendocrine tumors: a retrospective study on 34 cases.

Hepatogastroenterology. 2011 Nov-Dec;58(112):2140-3. doi: 10.5754/hge11212. PMID: 22024086.

45. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärklund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998 Jul;4(7):844-7. doi: 10.1038/nm0798-844. PMID: 9662379.
46. Darb-Esfahani S, Faggad A, Noske A, Weichert W, Buckendahl AC, Müller B, Budczies J, Röske A, Dietel M, Denkert C. Phospho-mTOR and phospho-4EBP1 in endometrial adenocarcinoma: association with stage and grade in vivo and link with response to rapamycin treatment in vitro. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2009 Jul;135(7):933-41. doi: 10.1007/s00432-008-0529-5. Epub 2008 Dec 24. PMID: 19107520.
47. Zen Y, Heaton N. Elevated Ki-67 labeling index in 'synchronous liver metastases' of well differentiated enteropancreatic neuroendocrine tumor. *Pathol Int*. 2013 Nov;63(11):532-8. doi: 10.1111/pin.12108. PMID: 24274715.
48. Richards-Taylor S, Tilley C, Jaynes E, Hu H, Armstrong T, Pearce NW, Plant R, Cave J. Clinically Significant Differences in Ki-67 Proliferation Index Between Primary and Metastases in Resected Pancreatic Neuroendocrine Tumors. *Pancreas*. 2017 Nov/Dec;46(10):1354-1358. doi: 10.1097/MPA.0000000000000933. PMID: 28984786.
49. Shi C, Gonzalez RS, Zhao Z, Koyama T, Cornish TC, Hande KR, Walker R, Sandler M, Berlin J, Liu EH. Liver metastases of small intestine neuroendocrine tumors: Ki-67 heterogeneity and World Health Organization grade discordance with primary tumors. *Am J Clin Pathol*. 2015 Mar;143(3):398-404. doi: 10.1309/AJCPQ55SKOCYFZHN. PMID: 25696798; PMCID: PMC4354931.

## 8. 謝辞

今回研究を遂行する機会および御指導、御鞭撻を賜りました、東京大学大学院医学系研究科肝胆膵外科学 長谷川 潔 教授に厚く御礼申し上げます。

また本研究の遂行および論文作成において、直接御指導をいただいた東京大学医学部肝胆膵外科 有田 淳一 准教授、稲垣 善則先生に深く感謝申し上げます。

以下の先生方にも多大なご協力を賜りましたことを記し、謹んで感謝申し上げます。

東京大学医学部附属病院病理部 田中 麻理子先生、国保旭中央病院遠隔病理診断センター、東京大学名誉教授（前人体病理学・病理診断学分野教授）深山正久先生、獨協医科大学第二外科 青木 琢教授、埼玉医科大学総合医療センター肝胆膵外科 別宮 好文教授、その他様々な面でご協力、ご助言頂きました、東京大学医学部肝胆膵外科の先生方に感謝申し上げます。