

## 博士論文

論文題目 術前補助化学放射線療法を施行した下部進行直腸癌  
手術症例における、腫瘍の粘液産生能および粘液関  
連蛋白発現の臨床学的意義

氏 名 金子 建介

## 目次

1. 要旨 .....	3
2. 序文 .....	4
3. 目的 .....	11
4. 方法 .....	12
4.1 対象 .....	12
4.2 病理組織学的評価 .....	13
4.3 免疫染色 .....	14
4.4 統計学的解析 .....	18
5. 結果 (1) 粘液産生能 .....	19
5.1 患者背景 .....	19
5.2 粘液量と臨床病理学的因子との関係 .....	21
5.3 粘液量と生存率との関係 .....	25
5.4 生存率の多変量解析 .....	28
5.5 小括 1 .....	30
6. 結果 (2) 粘液関連蛋白 .....	31

6.1	患者背景と粘液関連蛋白 (MUC1・MUC2・MUC5AC)	31
6.2	MUC1 と臨床病理学的因子との関係	33
6.3	MUC2 と臨床病理学的因子との関係	36
6.4	MUC5AC と臨床病理学的因子との関係	39
6.5	粘液量および各粘液関連蛋白発現の相関	42
6.6	MUC1 と生存率との関係	44
6.7	MUC2 と生存率との関係	47
6.8	MUC5AC と生存率との関係	50
6.9	生存率の多変量解析	53
6.10	粘液量および MUC5AC と無遠隔再発生存率の関係	55
6.11	小括 2	57
7.	考察	58
8.	結論	70
9.	謝辞	71
10.	引用文献	72

## 1. 要旨

下部進行直腸癌に対する術前補助化学放射線療法(CRT)において、粘液形質が治療成績に及ぼす影響に関する定見はなく、本研究ではそれらについて解析を行った。

下部進行直腸癌症例 130 例を対象に粘液産生能に関する解析を行ったところ、高粘液産生群で再発・遠隔転移再発が多かった。

また、術前 CRT にて完全寛解を得た 13 症例を除外した 117 症例において粘液関連蛋白に関する解析を行ったところ、MUC5AC 陽性群で再発・遠隔転移再発が多かった。

高粘液産生群および MUC5AC を発現する下部進行直腸癌症例では、遠隔転移再発の頻度が高く、より強力な術後補助化学療法および緊密なサーベイランスを考慮するべきと考えられた。

## 2. 序文

大腸癌は、欧米のみならず日本においても罹患率、死亡率の高い疾患である。その大腸癌の組織型において、細胞外に50%以上の粘液を有するものは粘液癌と定義されている。粘液癌は原発性大腸癌のうち4.2-14.8%を占めるとこれまでに報告されているが [1-5]、西欧の報告では11.8-14.8%、アジアの報告では4.2-6.4%と、アジアにおいて粘液癌の症例はより低頻度となっている。粘液癌と予後との関係については未だに議論がなされており、原発性大腸癌症例のうち粘液癌の群においてより予後不良であったとする報告が複数ある一方で [3-5]、そのような相関は認めないとする報告もまた複数ある [1, 2, 6]。

進行大腸癌に対する治療においては、根治的な外科的切除が第一選択となるが、病期や原発巣の占拠部位などの条件に応じて、治療戦略もまた変わりうる。そもそも直腸癌は他の結腸癌と比較して局所再発が多く、このためいかに局所再発を抑えるか、というのが治療の重要なポイントとなる。このため、特に下部進行直腸癌においては、通常の郭清を伴う原発巣の根治的な外科的切除に加えて、側方郭清および術前補助化学放射線療法 (Chemoradiotherapy: CRT) の適応についても考慮に入れて検討する必要がある。

下部進行直腸癌においては、局所再発を防ぐために様々な工夫が施されてきた中、近年では全直腸間膜切除 (Total Mesorectal Excision: TME) が標準的な外科術式として確立されている。これまでに複数の研究において、直腸癌に対して TME を施行することによって、術後の局所再発の頻度を抑えることができると報告されている [7-11]。

また、Kobayashi らの研究によると、下部直腸癌において側方リンパ節への転移を認める

割合が全体で 14.9%であったと報告されており、深達度別では、T1 において 5.4%、T2 において 8.2%、T3 において 16.5%、そして T4 において 37.2%と、深達度が上がるほど側方リンパ節転移の頻度も上昇することが報告されている [12]。また、通常の TME だけではなくこれをさらに拡大して側方リンパ節郭清を行うことで、局所再発を抑えられる可能性がある、複数の報告が示唆している [13, 14]。このような事情から、本邦における下部進行直腸癌の標準療法は、これまで TME+側方郭清とされてきた。

その一方で、近年では下部進行直腸癌に対する術前放射線療法 (Radiotherapy: RT) ないし術前 CRT の有用性を示す研究が相次いでなされた。それらによると、術前 RT ないし術前 CRT は局所再発の制御および肛門括約筋の温存に有用であったと報告されている [15-18]。これらの報告もあり、欧米では StageII および StageIII の下部進行直腸癌に対して、術前 CRT および TME を行うことが標準治療として確立されている。

また Wanatabe らは、根治切除術を施行された下部進行直腸癌症例において、術前 RT および側方郭清の術後成績の検討を行ったところ、術前 RT を受けていない群と比較して術前 RT を受けた群では無病生存率が有意に高く、術前 RT のみを施行した群と側方郭清のみの群との間では術後治療成績に差を認めなかったと報告している [19]。さらに Kim らは、下部進行直腸癌に対して TME+側方郭清と術前 CRT+TME の術後治療成績を比較したところ、前者において局所再発率が高かったと報告している [20]。術前 CRT と術後 CRT を比較した研究では、局所再発率・Grade3 以上の有害事象の発生率・長期有害事象の発生率のいずれも術前 CRT 群において有意に少なかったと報告されており、これもまた欧米に

において術前 CRT を標準療法とする根拠の一つとなっている [16]。

本邦においては、下部進行直腸癌に対する標準療法は側方郭清とされており、術前 CRT に関しては積極的に行われてきていない。この理由として、術前 CRT は前述のように局所再発を低下させるものの、全生存率においては改善が認められない点が挙げられる [21, 22]。一方、Nagawa らはランダム化比較試験で、術前に側方リンパ節転移を認めないと診断された下部進行直腸癌症例において、術前 RT 後における側方郭清の有無を比較した結果、両群間における無再発率・全生存率に有意差を認めず、側方郭清を施行しなかった群で排尿障害・性機能障害が有意に少なかったことを報告している [23]。側方郭清と比較して治療成績において差がなく、機能温存などの点において優位性があるならば、本邦においても術前 CRT は将来的により有望な選択肢となることが想定される。その際には、術前 CRT の効果および予後を予測する因子について明らかにしていくことが重要であると考えられる。

一方、癌の組織型の違いが術前 CRT の治療効果に及ぼす影響については、これまでのところ十分に明らかにされていない。一例として、Qiu らが、組織型が低分化でありかつ深達度が T4 である症例では、術前 CRT を行った際の CRT 病理学的奏効率およびダウンスレージングが乏しく、無病生存率が有意に低いと報告している [24]。

組織学的に粘液癌と診断された症例における術前 CRT への効果について調べた研究も、これまでに Shin らによるものと、Grillo-Ruggieri らによるものなどが報告されているが、十分とは言えない [25, 26]。双方とも、術前 CRT を施行された後に根治的外科的切除を施行

された下部進行直腸癌症例において、非粘液癌と粘液癌との間で比較を行っている。その結果、いずれの研究においても、術前 CRT 前後における腫瘍のダウンステージや腫瘍の縮小効果は、非粘液癌と比較して粘液癌が有意に劣るものの、全生存期間 (Overall Survival: OS) については両者の間に有意差を認めなかった。ただ、Shin らの報告では、非粘液癌と比較して粘液癌では、単変量解析における無病生存期間 (Disease Free Survival: DFS) および OS が有意に短く、多変量解析でも DFS が  $P=0.057$  と低い傾向を示した。これらの報告では対象となった症例全体に占める粘液癌症例の割合はそれぞれ 18.4%、6.3%であった。また、これらの報告のいずれにおいても局所再発および遠隔転移再発に関する記述はあるものの、Shin らは局所再発および遠隔転移再発に関する生存分析を行っておらず、Grillo-Ruggieri らは粘液癌症例のサンプルサイズが小さいことを理由に、粘液癌症例および非粘液癌症例の術後治療成績に有意差はなかったと報告している。

そこで今回、粘液が術前 CRT を施行した下部進行直腸癌症例の予後に与える影響について検討するにあたり、従来の粘液癌の診断基準のみにとらわれず、直腸癌組織における粘液産生量や粘液産生に関係する蛋白マーカーの発現に着目した。これまでの先行研究において、複数の粘液に関連する糖蛋白が同定されており、これらは MUC1、MUC2 などと命名され、正常細胞・腫瘍細胞を問わず、さまざまな体組織上において発現が確認されている。

そして、これら粘液関連蛋白の発現と大腸癌症例の予後との関係については、以下に示すような報告がなされている。Perez らの研究によると、大腸粘液癌に限定した比較において、

MUC1 陽性例は MUC1 陰性例と比較して無病生存率が有意に低い一方で、MUC2 陽性例は MUC2 陰性例と比較して全生存率が有意に低く、MUC5AC 陽性例と陰性例との間では予後に関して有意差を認めなかった [27]。一方、Kang らによると、StageII および III の大腸癌症例において、MUC2 陰性症例と比較して MUC2 陽性症例の全生存率が有意に高く、多変量解析においても同様であったと報告されている [28]。Li らによるメタアナリシスによると、MUC2 の発現と大腸癌の進行度および予後との間には有意な相関関係を認めず、MUC2 高発現は粘液癌の頻度および占拠部位が近位側となる頻度との相関を示すのみであった [29]。大腸癌と粘液との間にはさまざまな相互作用が働いていると考えられるが、これまでのところいずれの粘液関連蛋白の発現に関しても予後との関係において定見は得られていない。また、術前 CRT を施行された下部進行直腸癌手術症例における粘液関連蛋白の発現について検討した報告もこれまでのところない。

一方、他癌腫におけるこれらの粘液関連蛋白の発現と予後に関して、複数の研究において検討されている。MUC1 発現は肺癌・胆管癌・唾液腺癌・粘液性類表皮癌において予後不良因子として報告されており [30-33]、MUC2 発現は膵癌および卵巣癌において同様に予後不良因子として報告されている [34, 35]。一方、MUC5AC 発現は非小細胞肺癌において予後不良因子であったと報告されており、また血中 MUC5AC が陽性であった胆管癌症例において予後が不良であったと報告されているが [36, 37]、胃癌・膀胱癌では発現が低下している症例において予後が不良であったと報告されている [38, 39]。

以上のように、MUC1・MUC2 は多くの癌腫において予後不良因子であったと報告されて

いる。また、MUC2 は多くの大腸正常粘膜上において発現されているほか、大腸粘液癌における発現率は 66%と高率であったとも報告されている [27]。MUC5AC 発現の予後に及ぼす影響は、癌腫によって異なる。また、元々大腸の正常粘膜での発現はほとんど認められないが、大腸癌の一部では発現が認められ、特に粘液癌と印環細胞癌において高率に発現している(それぞれ 47%、25%)と報告されている [40]。以上の背景から、下部進行直腸癌と粘液発現に関する研究を行うに際して、粘液関連蛋白であるところの MUC1・MUC2・MUC5AC の検討も合わせて行うことが重要であると考えられた。

大腸粘液癌は一般的には予後が悪いとされるが、これに対する術前 CRT の局所制御効果については不明である。そもそも、直腸癌は他の結腸癌に比べ局所再発が多く、術前 CRT による局所制御効果を予測するマーカーの意義は大きい。一方、術前 CRT には遠隔制御効果がないため、術前 CRT の効果が低いと予測することが可能な症例については、むしろこれを行わずに最初から手術のみを行うという選択枝も考慮される。

もし直腸粘液癌に対する術前 CRT の効果が低いのであれば、これを施行せず手術治療のみを行う方が、最終的な術後成績が改善する可能性もあると考えられる。粘液形質を粘液産生量および粘液関連蛋白発現の双方の観点から解析することで、術前 CRT の効果や予後と粘液形質の相関を検討することが重要と考え、今回の研究を計画した。

本研究ではまず術前 CRT を経て根治切除術を施行された下部進行直腸癌において、切除標本中に含まれる腫瘍の粘液産生量に着目した。従来より、大腸粘液癌の診断基準は『大腸癌のうち細胞外粘液の占める面積が 50%以上であるもの』と定義されている。しかしな

がら、これまでの研究において粘液癌の予後への影響に関する報告が一定しなかったのは、細胞外粘液の占める面積が 50%以上の症例のみを対象とした検討が大半を占めたために、研究対象となる症例に限られ、粘液産生量が 50%未満ながら一定の粘液産生能を有する症例が一律に非粘液癌として扱われてきたことが一因と考えられた。

今回我々は、病変に対して粘液が占める割合を個々の症例ごとに評価し、この割合と術前 CRT の効果および予後との相関を解析することで、粘液形質が術前 CRT の治療効果に及ぼす影響をより多くの症例に対して現実的に検討することが可能ではないかと考えた。

また同時に、上記に掲げた MUC1・MUC2・MUC5AC の粘液関連蛋白についても検討を行った。粘液関連蛋白に対する免疫染色を行い、陽性を示す症例における臨床病理学的傾向ならびにその予後を解析した。

### 3. 目的

本邦において、下部進行直腸癌に対する局所再発の制御を目的とした治療の選択肢の一つとして、術前 CRT が注目されている。一方、一般的に大腸粘液癌は予後が悪いとされているが、下部進行直腸癌における粘液癌と術前 CRT の効果や予後との関係については不明である。このため、術前 CRT における治療効果および予後の予測因子として、粘液形質が担っている役割を解明することが一つの課題としてあげられる。これに対して、直腸癌組織における粘液産生量や粘液産生に関係する蛋白マーカーの発現に着目し、これを解析することによって以下の事項を明らかにすることを目的とした。

術前 CRT を施行した下部進行直腸癌において、

- 1) 粘液産生量が臨床病理学的因子および予後に与える影響について明らかにする。
- 2) 粘液関連蛋白 (MUC1・MUC2・MUC5AC) について 1)と同様に明らかにする。

## 4. 方法

### 4.1 対象

2003年1月から2012年12月までに東京大学医学部附属病院大腸肛門外科にて、術前CRTの後に根治的切除術を施行された下部進行直腸癌症例のうち、手術時点において遠隔転移を有さない130症例を対象とした。対象となった患者の全員に対して、術前に50.4Gyの放射線照射および、それと並行して化学療法を施行し、6-8週のちに原則として標準的な根治切除術を施行、4例に対しては局所切除術を施行した。

化学療法の内訳は、テガフル・ウラシル(UFT)＋レボホリナート(LV)療法が93例(71.5%)、UFT＋LV＋イリノテカン療法が23例(17.7%)、5-FU静注療法が8例(6.2%)、TS-1療法が6例(4.6%)であった。

術前に臨床病期が評価され、Clinical Stage II (cT3-4, cN0, cM0)およびClinical Stage III (cT1-4, cN+, cM0)の症例に対して術前CRTを施行した。また、CRTの前後においてバリウム注腸検査が施行され、治療前後における腫瘍の長径の変化から、縮小率を計算した。全ての症例は病理組織学的に評価され、臨床病期および病理組織学的病期をともにAmerican Joint Committee on Cancer 第7版にて定義されたTNM分類にもとづいて最終病期診断がなされた。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の下(審査番号:3252)、全ての患者に対して研究内容を提示し、同意書による同意を得た上で実施された。

## 4.2 病理組織学的評価

術前 CRT 施行前の生検検体を病理組織学的に評価し、腫瘍内に粘液成分が存在するかどうかについて評価を行った。腫瘍細胞に近接した間質に広く粘液成分を認めるものを、生検における粘液陽性と評価した。

切除検体に関しては、ホルマリン・パラフィン固定された組織片を 3 $\mu$ m 毎に薄切し、HE 染色ならびに PAS/AB 染色を施行し、粘液の占める面積を評価した。細胞外粘液は、粘液内に腫瘍細胞の有無を問わず粘膜下層以深に存在した全ての粘液と定義した。また、Dworak らの手法に倣い、粘液の面積の割合は、残存腫瘍細胞のみではなく腫瘍細胞がかつてそこに存在したと考えられる炎症性線維化領域を含めた病変を合算した領域をベースに評価を行った [41]。これを元に、細胞外粘液の面積割合に応じて、低粘液産生グループ (<5%)、中粘液産生グループ (5-25%)、高粘液産生グループ (>25%) の 3 群に症例を分けた。粘液量評価を行うに当たって、各症例ごとにスライドそれぞれ最低 5 枚ずつ、スライドの全視野を評価した。病理医による評価との一致率の検定を行い、 $\kappa$  係数=0.82 と十分な一致度を得た (図 1)。

図1 病理組織標本における粘液量の評価

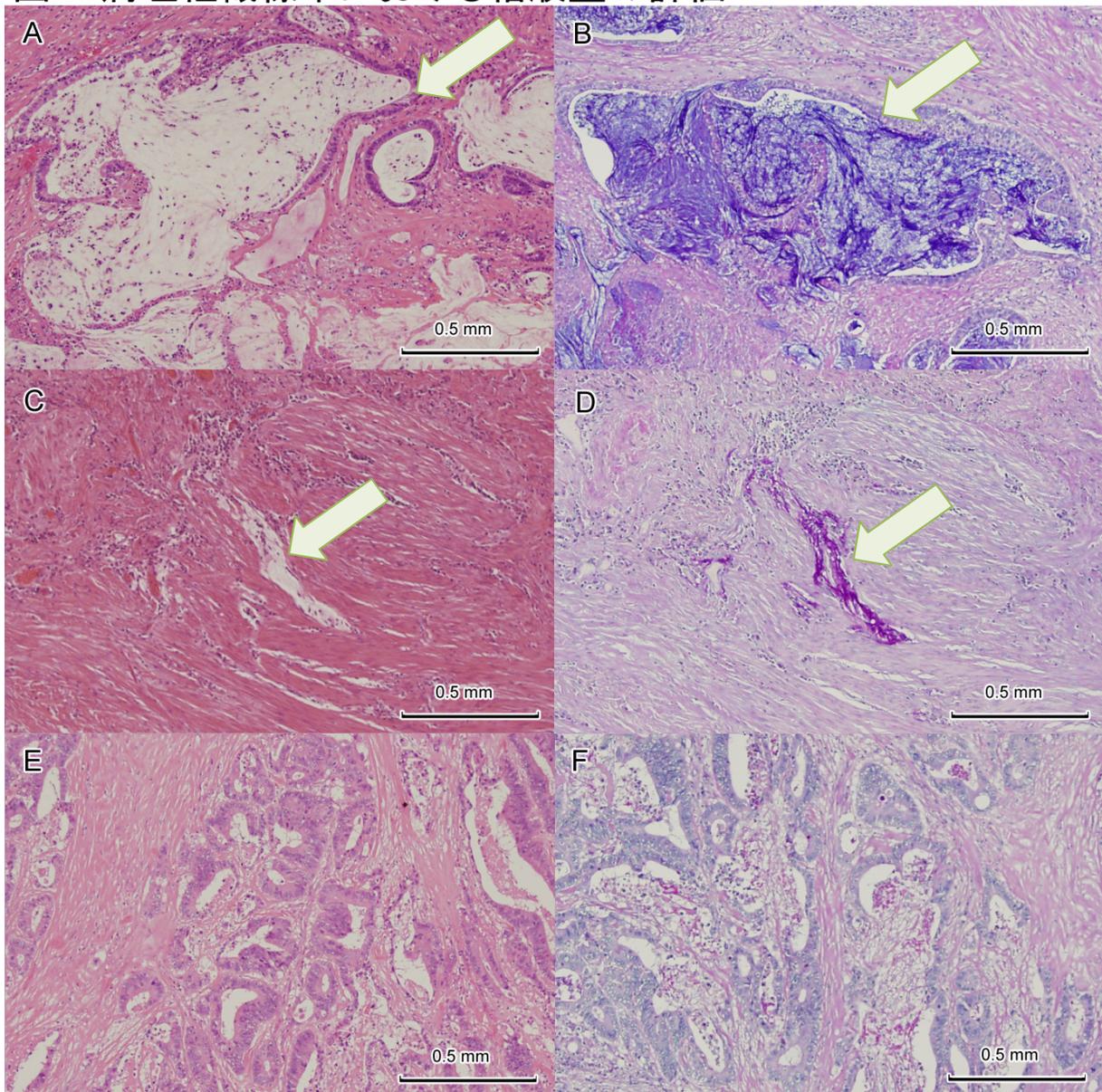


図 A・C・E はそれぞれ Hematoxylin Eosin (HE) 染色、図 B・D・F はそれぞれ Periodic Acid Schiff・Alcian Blue (PAS/AB) 染色を示す (40 倍)。粘液量が病変全体の 25% を超えるもの (図 A・B)、5-25% であるもの (図 C・D)、5% 未満であるもの (図 E・F) に分類した。図中の矢印は粘液の存在を示している。HE 染色では透明に、PAS/AB 染色では青紫色に染色されている。図 E において透明に見えている箇所において、同一標本に対して PAS/AB 染色を施した図 F においては青紫色に染色されておらず、粘液の存在を認めない。

#### 4.3 免疫染色

免疫染色を用いて、切除標本上の腫瘍細胞における MUC1・MUC2・MUC5AC の発現

を評価した。本研究の解析対象は術前 CRT の後にまで腫瘍細胞が残存している症例に限定して行い、術前 CRT を施行することによって病理組織学的に腫瘍細胞が消失したと認められる、病理学的奏効率 grade3 症例は除外した。

免疫染色に用いた抗体は、以下の 3 種類である。

抗 MUC1 抗体: Vector Lab 社より購入 (型番[VP-M655] マウスモノクローナル抗体 Anti-Muc-1 antibody [Clone: Ma695])

抗 MUC2 抗体: BD Pharmingen 社より購入 (型番[555926]: マウスモノクローナル抗体 Purified Mouse Anti-Human MUC2 [Clone: CCP58])

抗 MUC5AC 抗体: abcam 社より購入 (マウスモノクローナル抗体 Mucin 5AC antibody [Clone: CLH2])

これらはいずれも、1:100 の濃度において使用した。

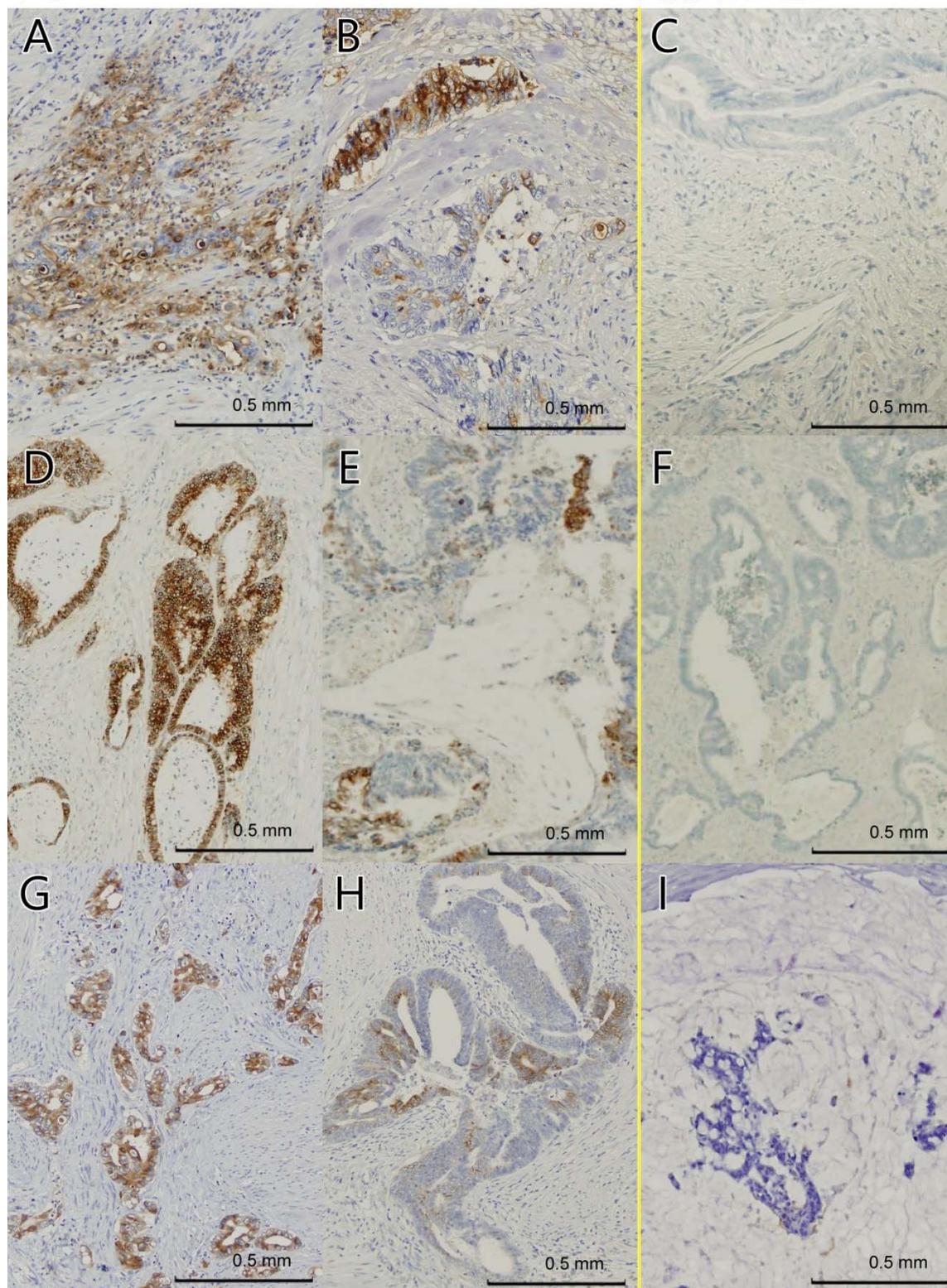
免疫染色法は、streptavidin-biotin-peroxidase complex 法にて、以下に示す手順によって行われた。

標本に対して、まずキシレンおよびエタノールを用いて脱パラフィンおよび脱水を行った。次いで、オートクレーブにて 120°C・5 分間の加熱を行い、抗原の賦活化を行った。その後、0.3% 過酸化水素水を添加したメタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼ活性の不活化を行った。さらに、標本に対して非特異的反応のブロッキングを行った後、上に示した一次抗体を用い、冷暗所にて一晩反応させた。翌日、標本に対して二次抗体が用いられ、次いでストレプトアビジン・ペルオキシダーゼ複合体との反応が行わ

れた。その後、3,3'-ジアミノベンジジン溶液にて茶色に染色された。最終的に、標本はマイヤー・リリーマイヤー混合ヘマトキシリン溶液にて薄く染色され、封入された。

これらの染色を行った標本につき、MUC1・MUC2・MUC5ACのいずれにおいても、染色された細胞が全体の10%以上を占めるものに関して陽性であると定義した(図2)。各症例につき、腫瘍細胞を含むスライドの全視野を評価した。

## 図2 MUC1・MUC2・MUC5ACの免疫染色



陽性細胞 $\geq$ 10% 陽性

陽性細胞 $<$ 10% 陰性

図A・B・CはMUC1、図D・E・FはMUC2、図G・H・IはMUC5ACの免疫染色をそれぞれ示す（40倍）。いずれの染色においても、染色された細胞が全体の10%以上を占めるものを陽性であると定義した。

#### 4.4 統計学的解析

統計学的解析においては、カテゴリカルデータの単変量解析には Pearson のカイ二乗検定、または標本数が少ない場合には Fisher の正確確率検定を用い、単変量解析にて  $P < 0.1$  となった因子を多変量解析にエントリーした。多変量解析には Logistic 回帰分析を用いた。

生存率の単変量解析には Kaplan-Meier 法および Log rank test を、生存率の多変量解析には Cox の比例ハザードモデルを用いた。独立した因子のうち、生存率の単変量解析にて  $P < 0.1$  となった因子を表に示し、そのうち  $P < 0.05$  となった因子を多変量解析にエントリーした。多変量解析には比例ハザードモデルを用いた。

いずれの解析においても、 $P < 0.05$  となるものを統計的に有意であるとした。

## 5. 結果 (1) 粘液産生能

### 5.1 患者背景

表 1 に示す計 130 名の患者のうち、粘液の面積が全病変の 50%以上を占める粘液癌と診断された症例は 4 例(3.1%)に留まった。一方、PAS/AB 染色によって粘液の面積が 25-50%と診断された症例は 18 例(13.8%)であった。また、粘液の面積が 5-25%の中粘液産生群は 26 例(20.0%)、5%未満の低粘液産生群は 82 例(63.1%)であった。

表 1. 患者背景		
n = 130		
Variable		range
年齢 (years) †	64 (中央値)	36–85
<b>性別</b>		
	<b>n</b>	<b>(%)</b>
男性	80	(61.5%)
女性	50	(38.5%)
<b>CRT 前 臨床病期</b>		
cStage II	93	(71.5%)
cStage III	37	(28.5%)
<b>深達度</b>		
ypT0, Tis, T1	28	(21.5%)
ypT2	40	(30.8%)
ypT3	54	(41.5%)
ypT4	8	(6.2%)
<b>リンパ節転移</b>		
ypN0	100	(76.9%)
ypN1	21	(16.2%)
ypN2	9	(6.9%)
<b>病理学的組織型</b>		
高分化腺癌	83	(63.8%)
中分化腺癌	43	(33.1%)
粘液癌	4	(3.1%)
<b>術式</b>		
低位前方切除術	79	(60.8%)
腹会陰式直腸切断術	37	(28.5%)
内肛門括約筋切除術	4	(3.1%)
ハルトマン手術	4	(3.1%)
局所切除	4	(3.1%)
骨盤内臓全摘術	2	(1.5%)
<b>粘液量</b>		
<5%	82	(63.1%)
5–25%	26	(20.0%)
>25%	22	(16.9%)
† 中央値および範囲		

## 5.2 粘液量と臨床病理学的因子との関係

臨床病理学的因子と粘液産生量との関連について表 2 に示す。全患者 130 例を粘液産生量に応じて 25%以下の群と 25%より大きい群とに分けた。粘液産生量の多い群は少ない群と比較して、切除検体における深達度が有意に深い(ypT3 および ypT4 多い)ことが示された( $p=0.010$ )。一方、粘液産生量の多い群では病理学的奏効率および腫瘍の縮小率に乏しい傾向を示したが、これらに関しては統計学的の有意差は認められなかった(それぞれ  $p=0.101$ 、 $P=0.181$ )。これら以外の因子においても、いずれも粘液産生量との関連において有意差を認めなかった。

表 2 粘液量と臨床病理学的因子との関係

Variable	標本の粘液量		P 値
	0-25% (n = 108)	>25% (n = 22)	
	n (%)	n (%)	
<b>年齢</b>			
<65	56 (51.9%)	16 (72.7%)	0.073
≥65	52 (48.1%)	6 (27.3%)	
<b>性別</b>			
男性	63 (58.3%)	17 (77.3%)	0.096
女性	45 (41.7%)	5 (22.7%)	
<b>CRT 前 臨床病期</b>			
cStage II	77 (71.3%)	16 (72.7%)	0.892
cStage III	31 (28.7%)	6 (27.3%)	
<b>深達度</b>			
ypT1, T2	62 (57.4%)	6 (27.3%)	0.010
ypT3, T4	46 (42.6%)	16 (72.7%)	
<b>リンパ節転移</b>			
なし	86 (79.6%)	14 (63.6%)	0.105
あり	22 (20.4%)	8 (36.4%)	
<b>リンパ管侵襲</b>			
なし	102 (94.4%)	21 (95.5%)	1.000 †
あり	6 (5.6%)	1 (4.5%)	
<b>静脈侵襲</b>			
なし	57 (52.8%)	8 (36.4%)	0.161
あり	51 (47.2%)	14 (63.6%)	
<b>CRT 奏効率</b>			
1a, 1b	58 (53.7%)	16 (72.7%)	0.101
2, 3	50 (46.3%)	6 (27.3%)	
<b>切除後の腫瘍径</b>			
≤3 cm	71 (65.7%)	12 (54.6%)	0.319
>3 cm	37 (34.3%)	10 (45.4%)	
<b>腫瘍縮小率</b>			
≤50%	62 (57.4%)	16 (72.7%)	0.181
>50%	46 (42.6%)	6 (27.3%)	

† Fisher の両側検定

臨床病理学的因子と粘液産生量との関連において、 $P < 0.1$  を示したのは深達度、年齢、性別の3因子であった(それぞれ  $P=0.010$ 、 $P=0.073$ 、 $P=0.096$ )。これらを対象に Logistic 回帰分析法を用いて多変量解析を行った(表 3)。

結果、粘液量 $>25\%$ は、深達度 ypT3 以上であることと独立して相関を認めた( $P=0.021$ )。

表 3 粘液産生と相関する臨床病理学的因子の単変量解析および多変量解析					
Variable		単変量	多変量解析		
		P 値	オッズ比	95% CI	P 値
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	0.010	3.24	1.01-8.96	<b>0.021</b>
年齢	<65 vs. $\geq 65$	0.073	0.38	0.13-1.05	0.062
性別	男性 vs. 女性	0.096	0.48	0.14-1.38	0.175

CI, 信頼区間

単変量解析にて  $p < 0.1$  であった因子のみ示した。

術前 CRT 前に行われた生検検体から検出された粘液と、摘出標本における粘液量の関係を解析した(表 4)。摘出標本において粘液量が 25%以下であった症例においては、CRT 前の生検からも粘液は検出されなかった。一方、高粘液産生群と診断された 22 例のうち CRT 前の生検検体からも粘液成分が検出されたのは 5 例であった(P<0.001)。

ただ、高粘液産生群 22 例のうち 17 例では CRT 前の生検において粘液成分が検出されておらず、粘液産生量を評価するためには摘出標本に対する診断が必要であると考えられた。実際、CRT 前の生検において粘液成分が検出されなかった高粘液産生群のうちの 14 例では、摘出標本において粘液は主に筋層以深に分布しており、CRT 前の生検でこれを検出することはそもそも困難であると考えられた。

表 4 術前 CRT 前生検検体から検出された粘液と切除後標本における粘液量の関係			
	粘液量		P 値
	0-25% (n = 108)	>25% (n = 22)	
	n (%)	n (%)	
<b>CRT 前生検における粘液</b>			
陰性	108 (100%)	17 (77.3%)	<b>&lt;0.001</b>
陽性	0 (0.0%)	5 (22.7%)	

### 5.3 粘液量と生存率との関係

130名の患者のうち、4例が観察中に死亡し、25例に再発(局所再発13例、遠隔転移19例)が認められた。粘液量が25%以下の108名に関しては、16例に再発が認められ、うち9例が局所再発、10例が遠隔転移再発であった。一方、粘液量が25%以上となる高粘液産生群の22名に関しては、9例に再発を認め、その全例に遠隔転移再発を、また4例に局所再発を認めた。

カプランマイヤー法にて解析したところ、図3Aに示すとおり、高粘液産生群において、粘液量が5%未満の低粘液産生群と比較して有意に無病生存率が低かった( $P=0.002$ )。さらに、高粘液産生群においては、低粘液産生群および5-25%の中粘液産生群双方と比較して、いずれに対しても有意に遠隔無再発生存率が低かった(それぞれ $P<0.001$ 、 $P=0.046$ )。一方、局所無再発生存率および全生存率においては、いずれの群間においても生存率に有意差を認めなかった。これらの結果をもとにすると、粘液量25%をカットオフラインに設定することが、予後を予測する上で有意義であると考えられた。高粘液産生群とそれ以外の2群に分けて解析を行ったところ、高粘液産生群において無病生存率および遠隔無再発生存率が有意に低かった(それぞれ、 $P=0.004$ 、 $P<0.001$ )。

粘液量が25%以下の低・中粘液産生群および25%を超える高粘液産生群に分けた場合、5年無病生存率は、低・中粘液産生群で82.2%であったのに対し、高粘液産生群では57.4%であった。5年局所無再発生存率・5年遠隔無再発生存率は、低・中粘液産生群ではそれぞれ89.4%・89.4%であったのに対し、高粘液産生群では80.4%・57.4%であった。

### 図3 粘液量と生存率の関係

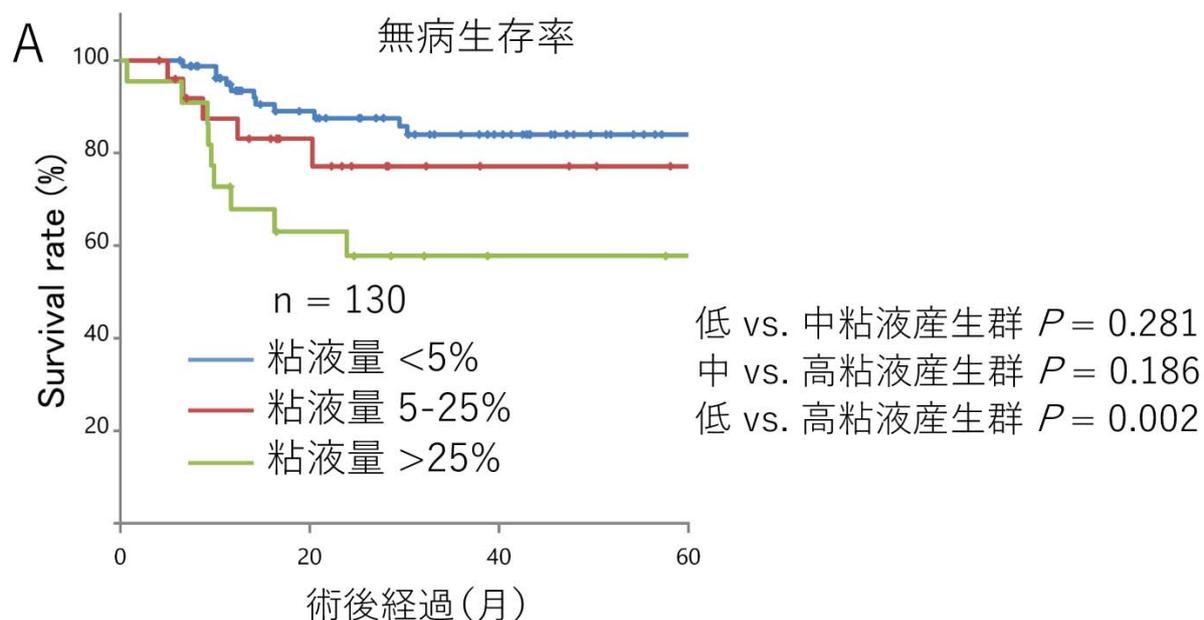


図 3A 低・中・高粘液産生群におけるそれぞれの無病生存率の生存曲線を示した。低 vs. 中および中 vs. 高粘液産生群における無病生存率に有意差を認めなかったが、低 vs. 高粘液産生群の比較では、高粘液産生群において有意に無病生存率が低かった ( $P=0.002$ )。生存率の検定は Log rank test を用いた。

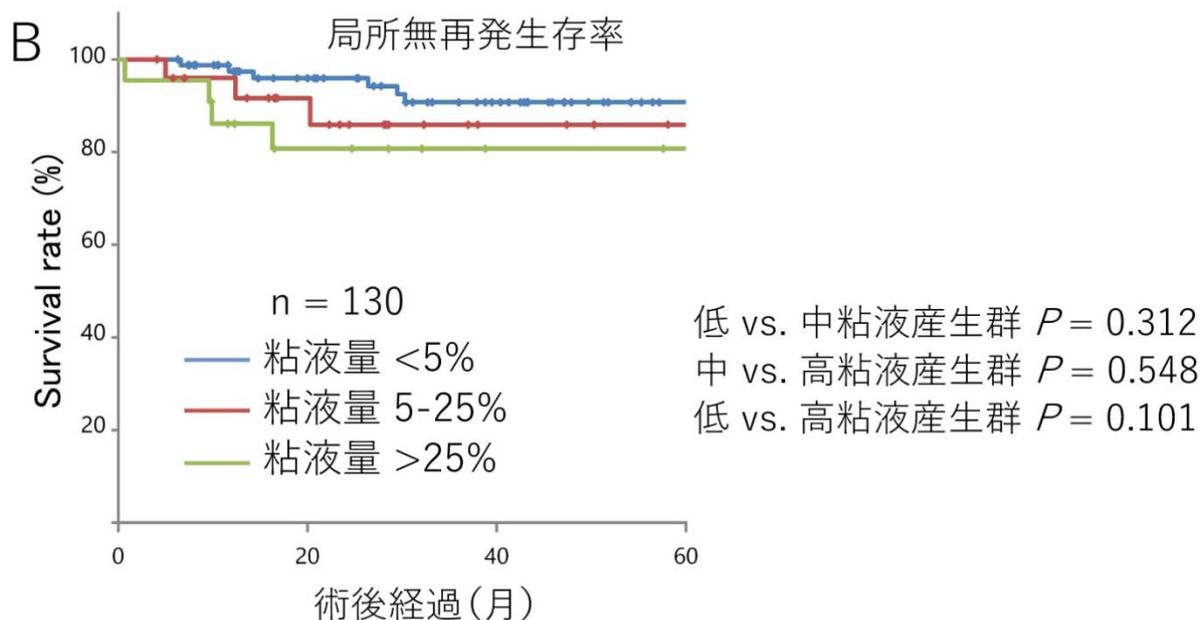


図 3B 高・中・低粘液産生群におけるそれぞれの局所無再発生存率の生存曲線を示した。いずれの群間においても、生存率に有意差を認めなかった。

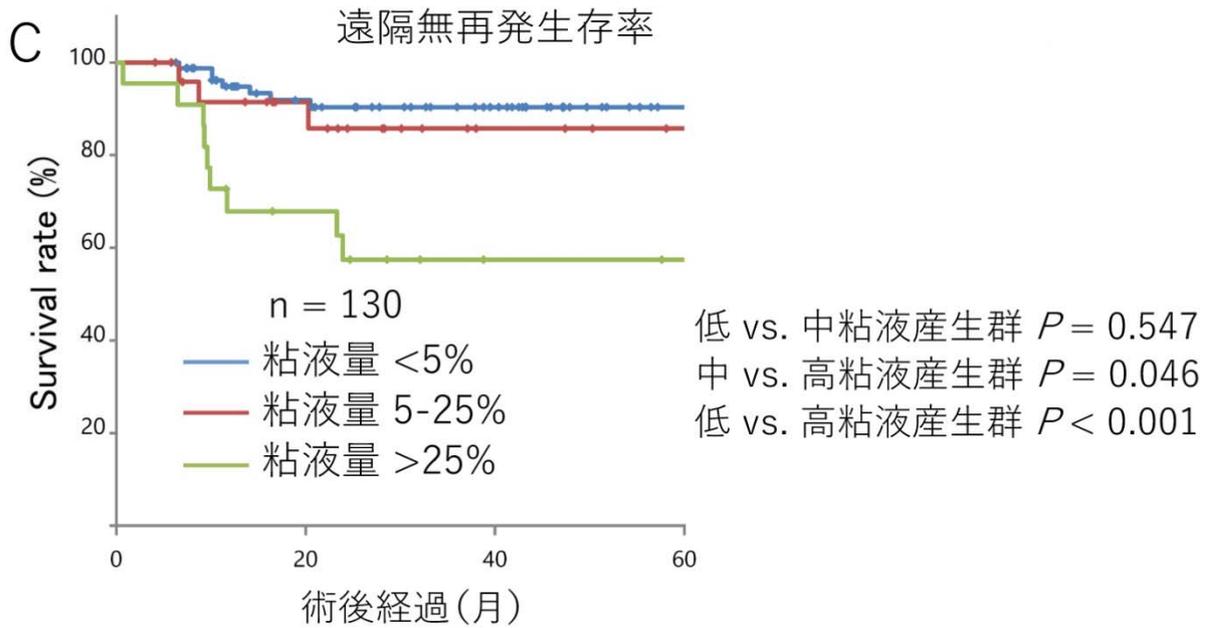


図 3C 低・中・高粘液産生群におけるそれぞれの遠隔無再発生存率の生存曲線を示した。低 vs. 中における無病生存率に有意差を認めなかったが、中 vs. 高および低 vs. 高粘液産生群の比較では、いずれも高粘液産生群において有意に無病生存率が低かった(それぞれ  $P=0.046$ ,  $P<0.001$ )。

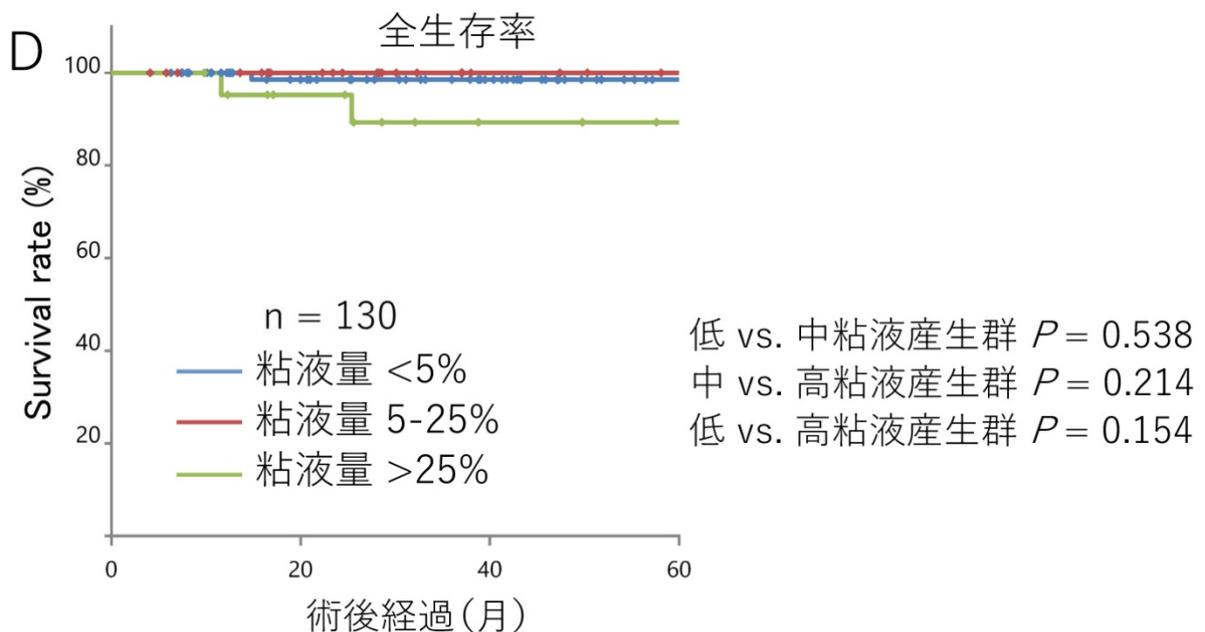


図 3D 高・中・低粘液産生群におけるそれぞれの全生存率の生存曲線を示した。いずれの群間においても、生存率に有意差を認めなかった。

#### 5.4 生存率の多変量解析

無病生存率・局所無再発生存率・遠隔無再発生存率・全生存率の単変量解析において、 $P<0.1$  となった因子を以下の表 5 に示す。これらのうち  $P<0.05$  となった因子を比例ハザードモデルによる多変量解析の対象とした。

無病生存率において、 $P<0.1$  となった因子は粘液量・深達度・CRT 奏効率・リンパ節転移・リンパ管侵襲・静脈侵襲の 6 因子であった(それぞれ  $P=0.004$ 、 $P=0.015$ 、 $P=0.035$ 、 $P=0.025$ 、 $P=0.089$ 、 $P=0.096$ )。これらのうち、唯一独立して有意に生存率が低くなる因子は粘液量 $>25\%$ であり、多変量解析における P 値は 0.041 であった。

局所無再発生存率においても同様に多変量解析を行ったところ、 $P<0.1$  となった因子は CRT 奏効率、リンパ節転移、深達度、リンパ管侵襲の 4 因子であった(それぞれ  $P=0.028$ 、 $P=0.078$ 、 $P=0.080$ 、 $P=0.096$ )。これらのうち CRT 奏効率のみが  $P<0.05$  を満たし、局所再発における独立した予後不良因子であると考えられた。

遠隔無再発生存率において、 $P<0.1$  となった因子は、粘液量、深達度、リンパ管侵襲、CRT 奏効率、静脈侵襲、リンパ節転移、の 6 因子であった(それぞれ  $P<0.001$ 、 $P=0.003$ 、 $P=0.024$ 、 $P=0.036$ 、 $P=0.024$ 、 $P=0.057$ )。多変量解析の結果、独立した予後不良因子は粘液量 $>25\%$ および深達度 ypT3 以深であった(それぞれ  $P=0.001$ 、 $P=0.046$ )。

全生存率において、 $P<0.1$  となった因子は、静脈侵襲、深達度、CRT 奏効率の 3 因子であった( $P=0.030$ 、 $P=0.036$ 、 $P=0.049$ )。いずれも独立した予後不良因子とは認められなかった。

表 5 生存率と相関する個々の因子の単変量解析および多変量解析

無病生存率						
		n=130	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
粘液量	≤25% vs. >25%	108 vs. 22	0.004	0.39	0.17–0.96	0.041
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	68 vs. 62	0.015	0.41	0.14–1.01	0.053
CRT 奏効率	grade 1a, 1b vs. 2, 3	74 vs. 56	0.035	0.52	0.18–1.26	0.152
リンパ節転移	なし vs. あり	100 vs. 30	0.025	0.55	0.23–1.37	0.192
リンパ管侵襲	なし vs. あり	123 vs. 7	0.089			
静脈侵襲	なし vs. あり	65 vs. 65	0.096			
局所無再発生存率						
		n=130	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
CRT 奏効率	grade 1a, 1b vs. 2, 3	74 vs. 56	0.028			
リンパ節転移	なし vs. あり	100 vs. 30	0.078			
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	68 vs. 62	0.080			
リンパ管侵襲	なし vs. あり	123 vs. 7	0.096			
遠隔無再発生存率						
		n=130	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
粘液量	≤25% vs. >25%	108 vs. 22	<0.001	0.17	0.06–0.48	0.001
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	68 vs. 62	0.003	0.26	0.05–0.98	0.046
リンパ管侵襲	なし vs. あり	123 vs. 7	0.024	0.20	0.05–1.00	0.050
CRT 奏効率	grade 1a, 1b vs. 2, 3	74 vs. 56	0.036	0.43	0.11–1.32	0.149
静脈侵襲	なし vs. あり	65 vs. 65	0.024	0.83	0.24–3.26	0.779
リンパ節転移	なし vs. あり	100 vs. 30	0.057			
全生存率						
		n=130	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
静脈侵襲	なし vs. あり	65 vs. 65	0.030			0.317
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	68 vs. 62	0.036			0.124
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2, 3	74 vs. 56	0.049			0.170

HR ハザード比, CI, 信頼区間

単変量解析にて p<0.1 であった因子のみ示した。

## 5.5 小括 1

術前 CRT を施行した下部進行直腸癌手術症例 130 例について粘液産生能の解析を行った結果、以下の結論を得た。

- 1) 粘液産生量が 25%を超える高粘液産生群において、腫瘍の深達度が有意に高い (P=0.010)。
- 2) 粘液産生量が 25%を超える高粘液産生群は、無病生存率および遠隔無再発生存率において独立して予後不良であった。
- 3) CRT 奏功率 Grade 1a, 1b であった症例は、局所無再発生存率において独立して予後不良であった。

無病生存率および遠隔無再発生存率の検討より、粘液産生量のカットオフ値を 5%に置いた場合と 25%に置いた場合とで比較した場合、25%を超えると有意に予後不良であった。カットオフ値を 25%に固定した場合、粘液産生の多寡は多変量解析においても、遠隔無再発生存率における独立した予後不良因子であった。

このことから、粘液産生量が 25%を超える高粘液産生群は、臨床的に再発、特に遠隔再発の高リスク群と考えられた。

## 6. 結果 (2) 粘液関連蛋白

### 6.1 患者背景と粘液関連蛋白 (MUC1・MUC2・MUC5AC)

表 6 に、先述の 130 症例のうち CRT にて病理組織学的完全寛解 (pCR) と診断された 13 例を除いた 117 例を示した。これらの症例のうち、粘液の面積が全病変の 50%以上を占める粘液癌と診断された症例は 4 例 (3.4%) であった。一方、粘液量が 25%を超える高粘液産生群の症例は 22 例 (18.8%) であった。

粘液関連蛋白である MUC1、MUC2、MUC5AC に関しては、陽性と認められたものはそれぞれ 23 例 (19.7%)、28 例 (23.9%)、24 例 (20.5%) であり、いずれも 20%前後と、ほぼ同様の割合を示した。

表 6 患者背景(完全寛解例を除外)

n = 117		
Variable	range	
年齢 †	64 (中央値)	36-85
<b>性別</b>		
	<b>n (%)</b>	
男性	73 (62.3%)	
女性	44 (37.6%)	
<b>深達度</b>		
ypT0, Tis, T1	15 (12.9%)	
ypT2	40 (34.1%)	
ypT3	54 (46.2%)	
ypT4	8 (6.8%)	
<b>リンパ節転移</b>		
ypN0	87 (74.3%)	
ypN1	21 (18.0%)	
ypN2	9 (7.7%)	
<b>主組織型</b>		
高分化腺癌	73 (62.4%)	
中分化腺癌	40 (34.2%)	
粘液癌	4 (3.4%)	
<b>術式</b>		
低位前方切除術	69 (59.0%)	
腹会陰式直腸切断術	36 (30.8%)	
内肛門括約筋切除術	3 (2.6%)	
ハルトマン手術	4 (3.4%)	
局所切除術	3 (2.6%)	
骨盤内臓全摘術	2 (1.7%)	
<b>粘液量</b>		
≤25%	95 (81.2%)	
>25%	22 (18.8%)	
<b>MUC1</b>		
陰性	94 (80.3%)	
陽性	23 (19.7%)	
<b>MUC2</b>		
陰性	89 (76.1%)	
陽性	28 (23.9%)	
<b>MUC5AC</b>		
陰性	93 (79.5%)	
陽性	24 (20.5%)	
† 中央値および範囲		

## 6.2 MUC1 と臨床病理学的因子との関係

臨床病理学的因子と MUC1 発現との関係について、表 7 に示した。

MUC1 陽性群は陰性群と比較して、切除検体における深達度が有意に深い(P=0.007)、  
静脈侵襲陽性例の割合が有意に高い(P=0.048)、病理学的奏効率が有意に低い  
(P=0.013)、腫瘍径が有意に大きい(P=0.006)といった特徴が認められた。また、粘液産生  
量が 25%を超える高粘液産生群の症例において、MUC1 陽性率も有意に高かった  
(P=0.029)。

表 7 臨床病理学的因子と MUC1 発現との関係			
Variable	MUC1		P 値
	陰性 (n=94)	陽性 (n=23)	
	n (%)	n (%)	
<b>年齢</b>			
≤65	52 (55.3%)	13 (56.5%)	0.917
>65	42 (44.7%)	10 (43.5%)	
<b>性別</b>			
男性	56 (59.6%)	17 (73.9%)	0.203
女性	38 (40.4%)	6 (26.1%)	
<b>深達度</b>			
ypT1, T2	50 (53.2%)	5 (21.7%)	0.007
ypT3, T4	44 (46.8%)	18 (78.3%)	
<b>リンパ節転移</b>			
なし	72 (76.6%)	15 (65.2%)	0.263
あり	22 (23.4%)	8 (34.8%)	
<b>リンパ管侵襲</b>			
なし	87 (92.6%)	23 (100.0%)	0.342 †
あり	7 (7.4%)	0 (0.0%)	
<b>静脈侵襲</b>			
なし	46 (48.9%)	6 (26.1%)	0.048
あり	48 (51.1%)	17 (73.9%)	
<b>CRT 奏効率</b>			
1a, 1b	54 (57.5%)	20 (85.7%)	0.008 †
2	40 (42.5%)	3 (14.3%)	
<b>切除後の腫瘍径</b>			
≤3 cm	62 (66.0%)	8 (34.8%)	0.006
>3 cm	32 (34.0%)	15 (65.2%)	
<b>腫瘍縮小率</b>			
≤50%	60 (63.8%)	15 (65.2%)	0.901
>50%	34 (36.2%)	8 (34.8%)	
<b>粘液量</b>			
≤25%	80 (85.1%)	15 (65.2%)	0.029
>25%	14 (14.9%)	8 (34.8%)	
†Fisher の両側検定			

臨床病理学的因子と MUC1 との関連において、 $P < 0.1$  を示したのは腫瘍径、深達度、CRT 奏効率、粘液量、静脈侵襲の 5 因子であった(それぞれ  $P=0.006$ 、 $P=0.007$ 、 $P=0.009$ 、 $P=0.029$ 、 $P=0.048$ )。これらを対象に Logistic 回帰分析法を用いて多変量解析を行った(表 8)。

結果、MUC1 陽性と独立して相関関係を認めた因子は、腫瘍径 $>3\text{cm}$  および CRT 奏効率 Grade 1a, 1b であった(それぞれ  $P=0.045$ 、 $P=0.032$ )。

表 8 MUC1 と相関する臨床病理学的因子の単変量解析および多変量解析					
Variable		単変量	多変量解析		
		P 値	オッズ比	95% CI	P 値
腫瘍径	$\leq 3\text{cm}$ vs. $> 3\text{cm}$	0.006	2.85	1.02-8.41	<b>0.045</b>
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	0.007	2.29	0.65-8.92	0.198
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	0.009	0.25	0.05-0.89	<b>0.032</b>
粘液量	$\leq 25\%$ vs. $> 25\%$	0.029	2.53	0.81-7.86	0.110
静脈侵襲	なし vs. あり	0.048	1.05	0.30-3.83	0.934

CI, 信頼区間

単変量解析にて  $p < 0.1$  であった因子のみ示した。

### 6.3 MUC2 と臨床病理学的因子との関係

臨床病理学的因子と MUC2 発現との関係について、表 9 に示した。

MUC2 陽性群は陰性群と比較して、CRT 前後における腫瘍の縮小率が有意に低かった ( $P=0.023$ )。深達度が深い・病理学的奏効率が低いなどの傾向を認めたが、有意差は認められなかった(それぞれ  $P=0.071$ 、 $P=0.073$ )。また、MUC2 発現は粘液量との間に強い相関関係を認めた ( $P<0.001$ )。

表 9 臨床病理学的因子と MUC2 発現との関係

Variable	MUC2		P 値
	陰性 (n=89)	陽性 (n=28)	
	n (%)	n (%)	
<b>年齢</b>			
<65	50 (56.2%)	15 (53.6%)	0.809
≥65	39 (43.8%)	13 (46.4%)	
<b>性別</b>			
男性	55 (61.8%)	18 (64.3%)	0.813
女性	34 (38.2%)	10 (35.7%)	
<b>深達度</b>			
ypT1, T2	46 (51.7%)	9 (32.1%)	0.071
ypT3, T4	43 (48.3%)	19 (67.9%)	
<b>リンパ節転移</b>			
なし	69 (77.5%)	18 (64.3%)	0.162
あり	20 (22.5%)	10 (35.7%)	
<b>リンパ管侵襲</b>			
なし	85 (95.5%)	25 (89.3%)	0.356 †
あり	4 (4.5%)	3 (10.7%)	
<b>静脈侵襲</b>			
なし	39 (43.8%)	13 (46.4%)	0.809
あり	50 (56.2%)	15 (53.6%)	
<b>CRT 奏効率</b>			
1a, 1b	52 (58.4%)	22 (78.6%)	0.054
2	37 (41.6%)	6 (21.4%)	
<b>切除後の腫瘍径</b>			
≤3 cm	55 (61.8%)	15 (53.6%)	0.439
>3 cm	34 (38.2%)	13 (46.4%)	
<b>腫瘍縮小率</b>			
≤50%	52 (58.4%)	23 (82.1%)	0.023
>50%	37 (41.6%)	5 (17.9%)	
<b>粘液量</b>			
≤25%	81 (91.0%)	14 (50.0%)	<0.001
>25%	8 (9.0%)	14 (50.0%)	
†Fisher の両側検定			

臨床病理学的因子と MUC2 との関連において、 $P < 0.1$  を示したのは粘液量、腫瘍縮小率、深達度、CRT 奏効率の 4 因子であった(それぞれ  $P < 0.001$ 、 $P = 0.023$ 、 $P = 0.071$ 、 $P = 0.073$ )。これらを対象に Logistic 回帰分析法を用いて多変量解析を行った(表 10)。MUC2 陽性と独立して相関関係を認めた因子は、粘液量 $>25\%$ であった( $P < 0.001$ )。

表 10 MUC2 と相関する臨床病理学的因子の単変量解析および多変量解析					
Variable		単変量	多変量解析		
		P 値	オッズ比	95% CI	P 値
粘液量	$\leq 25\%$ vs. $> 25\%$	$< 0.001$	9.76	3.36-30.9	<b><math>&lt; 0.001</math></b>
腫瘍縮小率	$\leq 50\%$ vs. $> 50\%$	0.023	0.37	0.09-1.18	0.095
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	0.054	0.53	0.15-1.60	0.263
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	0.071	1.27	0.45-3.61	0.653

CI, 信頼区間

単変量解析にて  $p < 0.1$  であった因子のみ示した。

#### 6.4 MUC5AC と臨床病理学的因子との関係

臨床病理学的因子と MUC5AC 発現との関係について、表 11 に示した。

MUC5AC 陽性群は陰性群と比較して有意に、年齢が低い( $P=0.009$ )、静脈侵襲症例の割合が高い( $P=0.002$ )、病理学的奏効率が低い( $P=0.001$ )、腫瘍径が大きい( $P=0.012$ )などの特徴が認められた。また、深達度が深い( $P=0.050$ )、腫瘍縮小率が低い( $P=0.084$ )傾向が認められたが、有意差を認めなかった。

また、MUC5AC 発現と粘液量との間には有意な相関関係を認めなかった( $P=0.145$ )。

表 11 臨床病理学的因子と MUC5AC 発現との関係

Variable	MUC5AC		P 値
	陰性 (n=93)	陽性 (n=24)	
	n (%)	n (%)	
<b>年齢</b>			
<65	46 (49.5%)	19 (79.2%)	0.009
≥65	47 (50.5%)	5 (20.8%)	
<b>性別</b>			
男性	57 (61.3%)	16 (66.7%)	0.628
女性	36 (38.7%)	8 (33.3%)	
<b>深達度</b>			
ypT1, T2	48 (51.6%)	7 (29.2%)	0.050
ypT3, T4	45 (48.4%)	17 (70.8%)	
<b>リンパ節転移</b>			
なし	70 (75.3%)	17 (70.8%)	0.657
あり	23 (24.7%)	7 (29.2%)	
<b>リンパ管侵襲</b>			
なし	88 (94.6%)	22 (91.7%)	0.631 †
あり	5 (5.4%)	2 (8.3%)	
<b>静脈侵襲</b>			
なし	48 (51.6%)	4 (16.7%)	0.002 †
あり	45 (48.4%)	20 (83.3%)	
<b>CRT 奏効率</b>			
1a, 1b	52 (55.9%)	22 (91.7%)	<0.001 †
2	41 (44.1%)	2 (8.3%)	
<b>切除後の腫瘍径</b>			
≤3 cm	61 (65.6%)	9 (37.5%)	0.012
>3 cm	32 (34.4%)	15 (62.5%)	
<b>腫瘍縮小率</b>			
≤50%	56 (60.2%)	19 (79.2%)	0.084
>50%	37 (39.8%)	5 (20.8%)	
<b>粘液量</b>			
≤25%	78 (83.9%)	17 (70.8%)	0.145
>25%	15 (16.1%)	7 (29.2%)	
† Fisher の両側検定			

臨床病理学的因子と MUC5AC との関連において、 $P < 0.1$  を示したのは CRT 奏効率、静脈侵襲、年齢、腫瘍径、深達度、腫瘍縮小率の 6 因子であり(それぞれ  $P=0.001$ 、 $P=0.002$ 、 $P=0.009$ 、 $P=0.012$ 、 $P=0.050$ 、 $P=0.084$ )、これらを対象に Logistic 回帰分析法を用いて多変量解析を行った(表 12)。

結果、MUC5AC 陽性と独立して相関関係を認めた因子は、CRT 奏効率 Grade 1a, 1b および年齢 <65 歳であった(それぞれ  $P=0.017$ 、 $P=0.020$ )。

Variable		単変量	多変量解析		
		P 値	オッズ比	95% CI	P 値
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	0.001	0.18	0.03-0.76	<b>0.017</b>
静脈侵襲	なし vs. あり	0.002	2.89	0.79-12.4	0.111
年齢	<65 vs. ≥65	0.009	0.28	0.08-0.82	<b>0.020</b>
腫瘍径	≤3cm vs. >3cm	0.012	2.59	0.89-7.94	0.081
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	0.050	1.10	0.32-3.83	0.879
腫瘍縮小率	≤50% vs. >50%	0.084	0.96	0.26-3.38	0.955

CI, 信頼区間

単変量解析にて  $p < 0.1$  であった因子のみ示した。

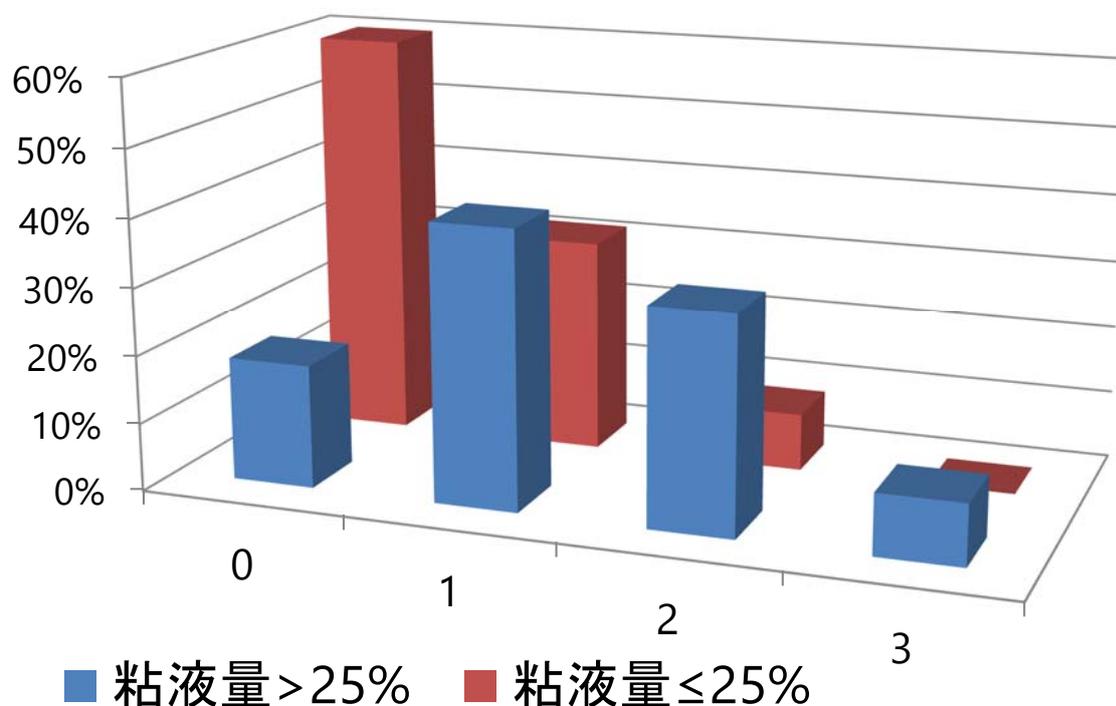
## 6.5 粘液量および各粘液関連蛋白発現の相関

粘液量および各粘液関連蛋白の発現との相関を表 13 に示した。粘液産生能の高い腫瘍は各 MUC 蛋白が陽性である頻度も高かったが、両者は必ずしも一致せず、高粘液産生であっても MUC1、MUC2、MUC5AC のいずれもが陰性である症例も存在した。次に粘液産生の少ない腫瘍、多い腫瘍それぞれにおいて MUC1、MUC2、MUC5AC の内いくつが陽性であったかを図 4 に示した。粘液量 $\leq$ 25%の群において、粘液関連蛋白を 1 つも発現していない症例は 57 例 (60%)、1 つ発現している症例が 30 例 (31.6%)、2 つ発現している症例が 8 例 (8.4%) であり、3 つとも発現している症例はなかった。一方、粘液量 $>$ 25%の群においては、全て陰性・1 つ発現・2 つ発現・3 つ発現がそれぞれ 4 例 (18.2%)、9 例 (40.9%)、7 例 (31.8%)、2 例 (9.1%) であった。高粘液産生群においては粘液関連蛋白の発現率が有意に高いことが示された ( $p<0.001$ )。

表 13 粘液量および粘液関連蛋白同士の相関関係

Variable	MUC1			MUC2			MUC5AC		
	陰性	陽性	P 値	陰性	陽性	P 値	陰性	陽性	P 値
<b>粘液量</b>									
≤25%	80 (85.1%)	15 (65.2%)	0.029	81 (91.0%)	14 (50.0%)	<0.001	78 (83.9%)	17 (70.8%)	0.145
>25%	14 (14.9%)	8 (34.8%)		8 (9.0%)	14 (50.0%)		15 (16.1%)	7 (29.2%)	
<b>MUC1</b>									
陰性				73 (82.0%)	21 (75.0%)	0.415	79 (85.0%)	15 (62.5%)	0.014
陽性				16 (18.0%)	7 (25.0%)		14 (15.0%)	9 (37.5%)	
<b>MUC2</b>									
陰性							70 (75.3%)	19 (79.2%)	0.690
陽性							23 (24.7%)	5 (20.8%)	

図4 粘液量と粘液関連蛋白の発現数の関係



粘液量≤25%の症例および粘液量>25%の症例それぞれにおいて、症例毎に発現している粘液関連蛋白の数を示した。

## 6.6 MUC1 と生存率との関係

術前 CRT 後に病理学的完全寛解を示さなかった 117 名の患者のうち、4 例が観察中に死亡し、23 例に再発(局所再発 12 例、遠隔転移 18 例)が認められた。MUC1 陽性群においては、観察期間中の死亡が 2 例、再発が 7 例(局所再発 4 例、遠隔転移 5 例)に認められた。

カプランマイヤー法にて、MUC1 陽性群および陰性群の生存分析を行った。その結果、MUC1 陽性群と陰性群との間では、無病生存率(P=0.131)、局所無再発生存率(P=0.193)、遠隔無再発生存率(P=0.366)、全生存率(P=0.127)のいずれにおいても予後に有意差を認めなかった(図 5)。

## 図5 MUC1発現と生存率との関係

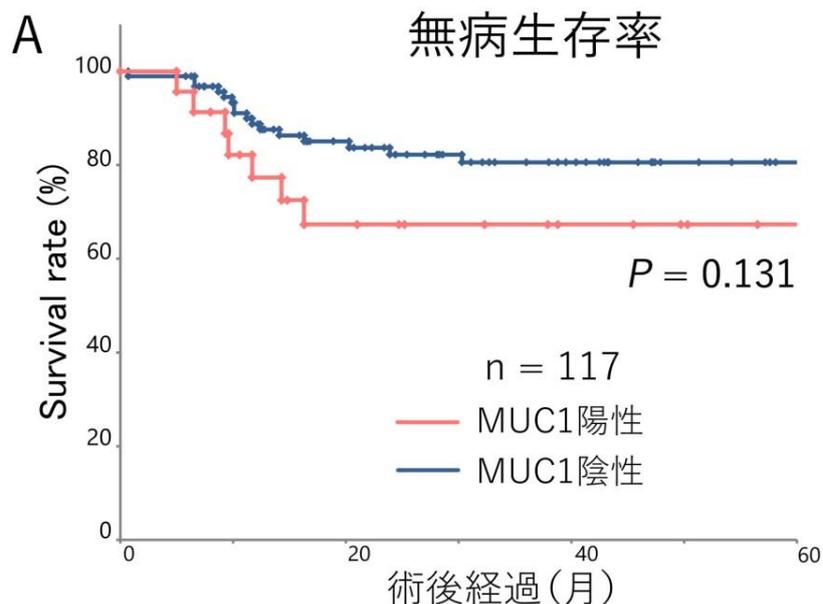


図 5A MUC1 陽性・陰性群におけるそれぞれの無病生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。生存率の検定は Log rank test により行った。

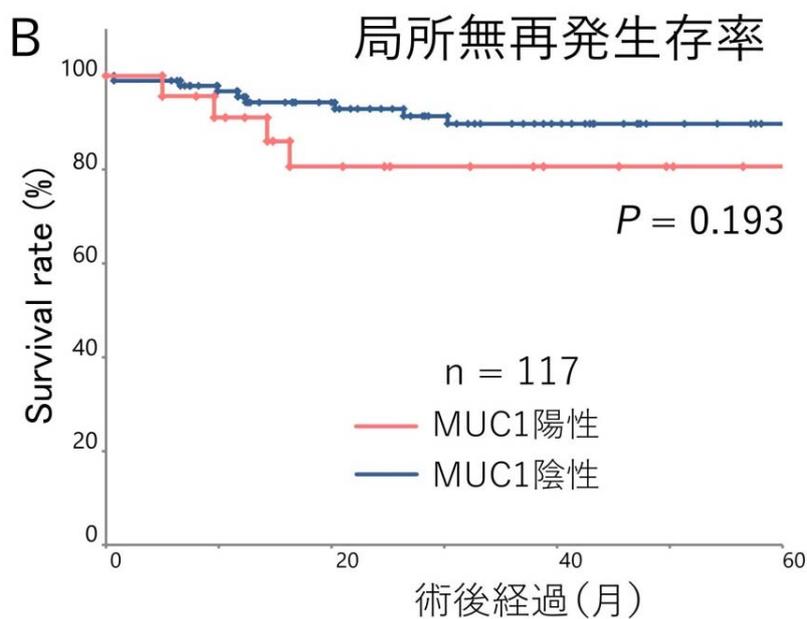


図 5B MUC1 陽性・陰性群におけるそれぞれの局所無再発生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。

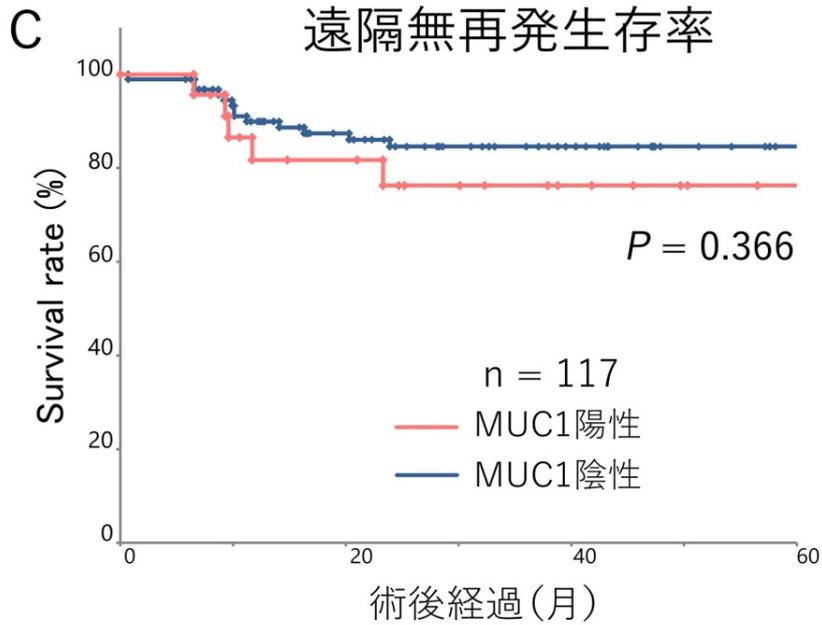


図 5C MUC1 陽性・陰性群におけるそれぞれの遠隔無再発生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。

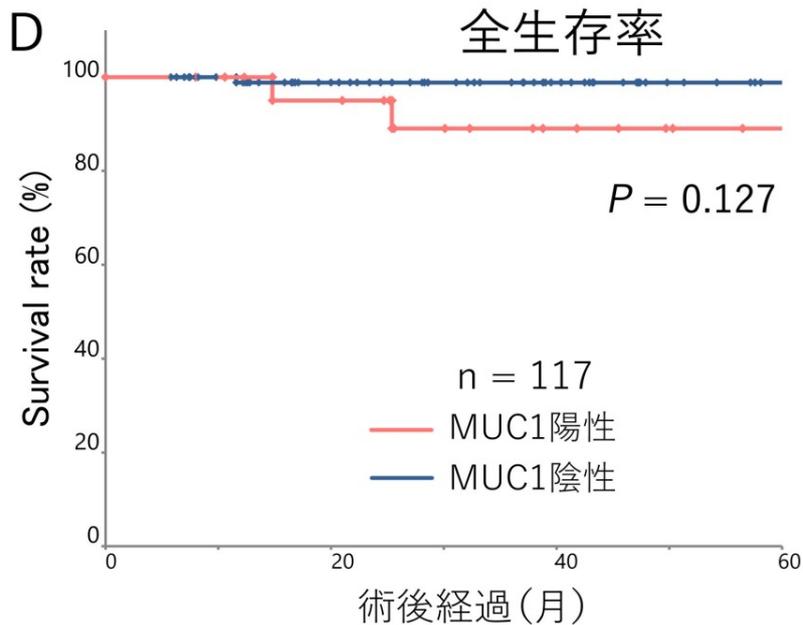


図 5D MUC1 陽性・陰性群におけるそれぞれの全生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。

## 6.7 MUC2 と生存率との関係

全 117 症例のうち、死亡 4 例、再発 23 例(局所再発 12 例、遠隔転移 18 例)であった。

MUC2 陽性群においては、死亡 1 例、再発 10 例(局所再発 5 例、遠隔転移 9 例)であった。

カプランマイヤー法にて、MUC2 陽性群および陰性群の生存分析を行った。

MUC2 陽性群では陰性群と比較して、無病生存率(P=0.010)および遠隔無再発生存率(P=0.004)が有意に低かった(図 6A・6C)。5 年無病生存率および 5 年遠隔無再発生存率は、MUC2 陽性群と陰性群において、それぞれ 62.9% vs. 83.0%および 66.2% vs. 88.4%となった。局所無再発生存率(P=0.119)および全生存率(P=0.952)においては、両群間に有意差を認めなかった(図 6B・6D)。

## 図6 MUC2発現と生存率との関係

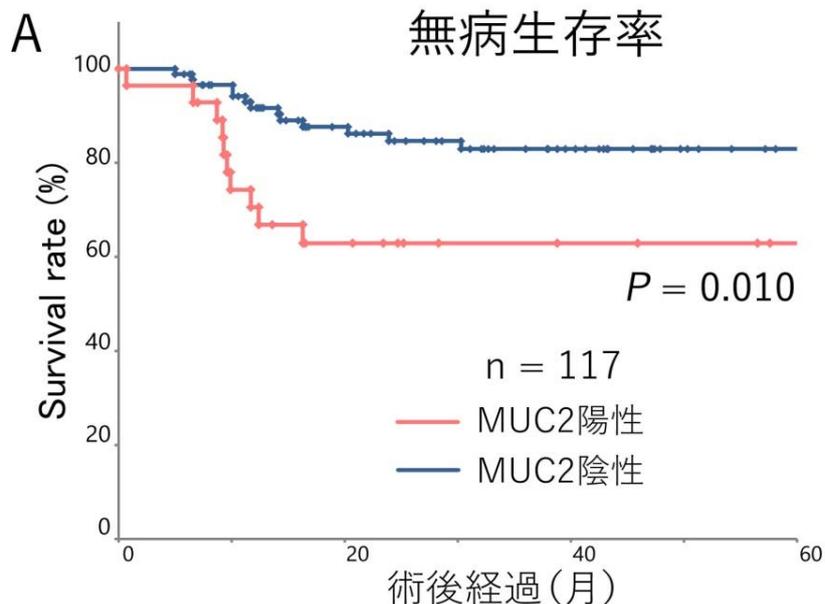


図 6A MUC2 陽性・陰性群におけるそれぞれの無病生存率の生存曲線を示した。両群間の比較では、MUC2 陽性群において有意に無病生存率が低かった( $P=0.010$ )。生存率の検定は Log rank test により行った。

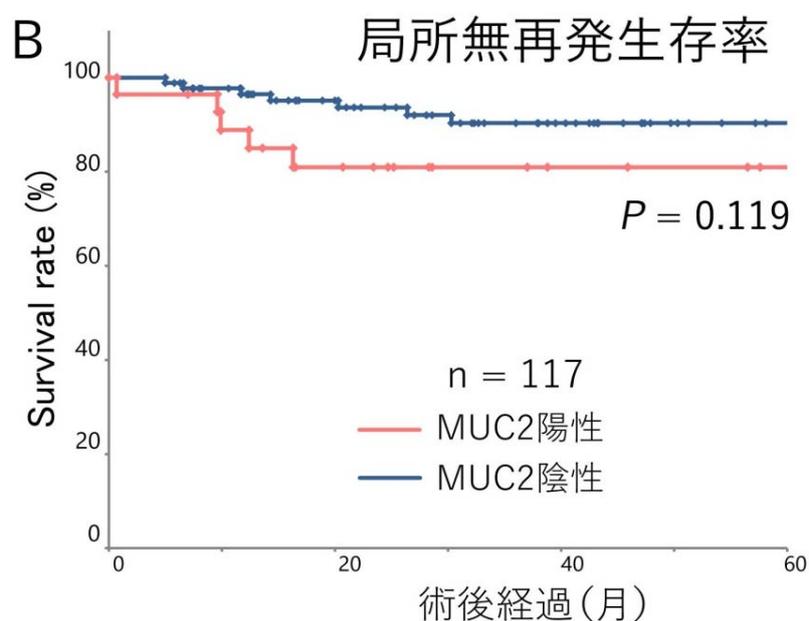


図 6B MUC2 陽性・陰性群におけるそれぞれの局所無再発生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。

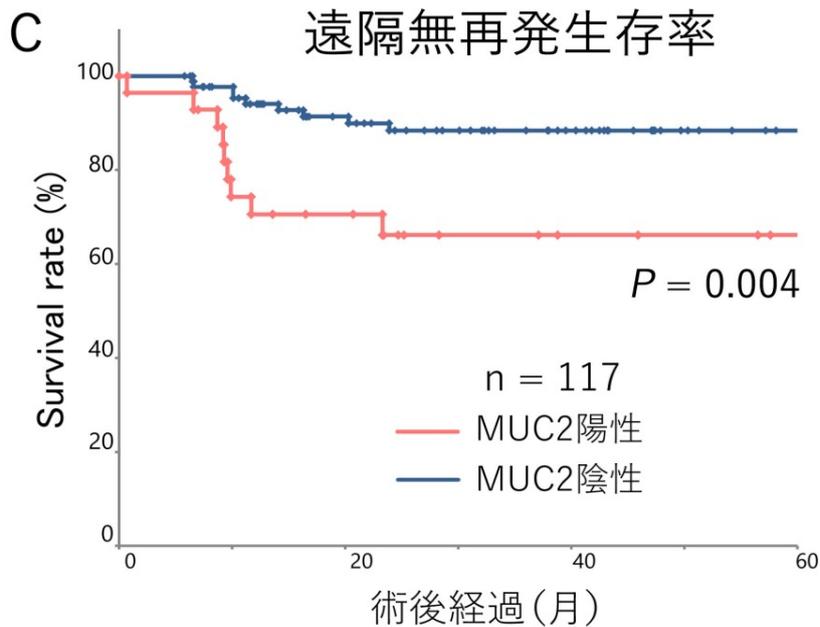


図 6C MUC2 陽性・陰性群におけるそれぞれの無病生存率の生存曲線を示した。両群間の比較では、MUC2 陽性群において有意に遠隔無再発生存率が低かった ( $P=0.004$ )。

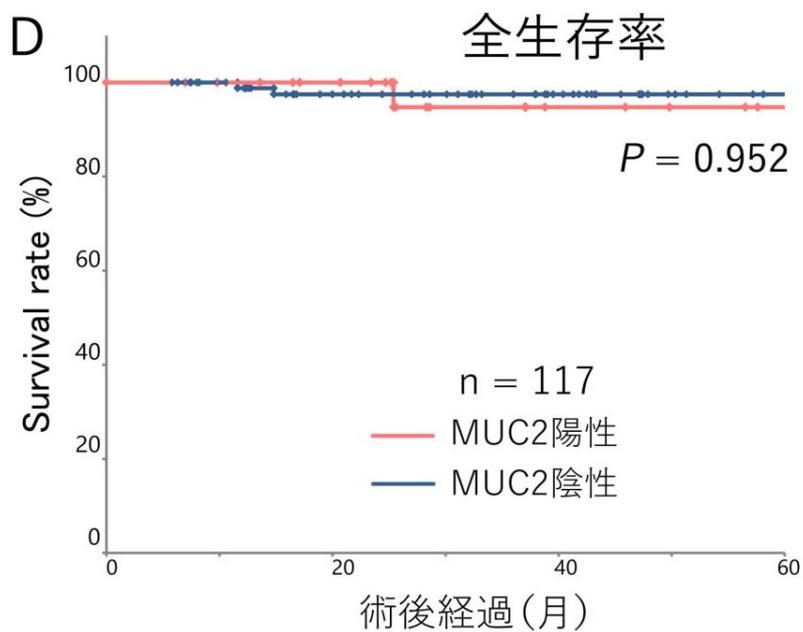


図 6D MUC2 陽性・陰性群におけるそれぞれの全生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。

## 6.8 MUC5AC と生存率との関係

全 117 症例のうち、死亡 4 例、再発 23 例(局所再発 12 例、遠隔転移 11 例)であった。MUC5AC 陽性群においては、死亡 2 例、再発 9 例(局所再発 5 例、遠隔転移 4 例)となった。

カプランマイヤー法にて、MUC5AC 陽性群および陰性群の生存分析を行った。

MUC5AC 陽性群では、陰性群と比較して無病生存率 ( $P=0.006$ )・局所無再発生存率 ( $P=0.038$ )・遠隔無再発生存率 ( $P<0.001$ ) が有意に低かった(図 7A・7B・7C)。5 年無病生存率・5 年局所無再発生存率・5 年遠隔無再発生存率は、MUC5AC 陽性群および陰性群で、それぞれ 57.5% vs. 82.8%、76.9% vs. 90.8%、57.5% vs. 89.1%であった。全生存率 ( $P=0.142$ ) は、両群間に有意差を認めなかった(図 7D)。

## 図7 MUC5AC発現と生存率との関係

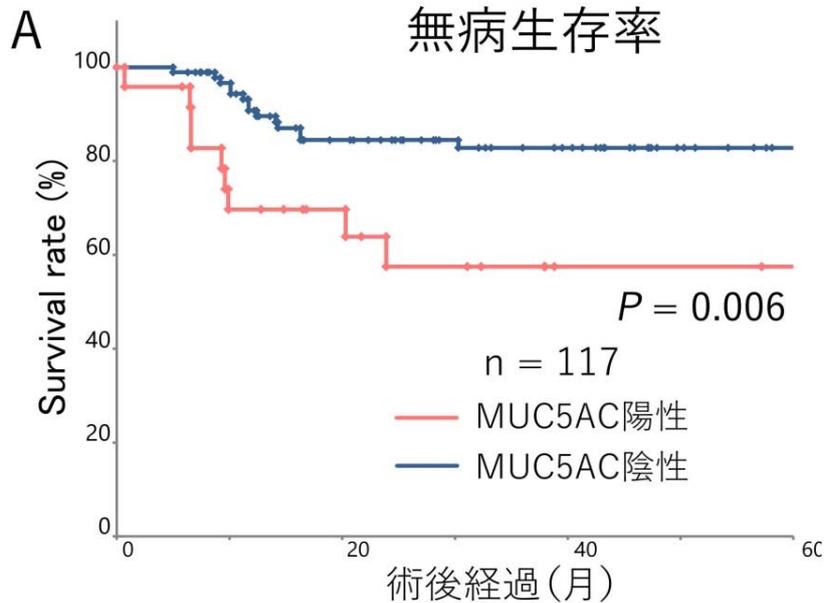


図 7A MUC5AC 陽性・陰性群におけるそれぞれの無病生存率の生存曲線を示した。両群間の比較では、MUC5AC 陽性群において有意に無病生存率が低かった ( $P=0.006$ )。生存率の検定は Log rank test により行った。

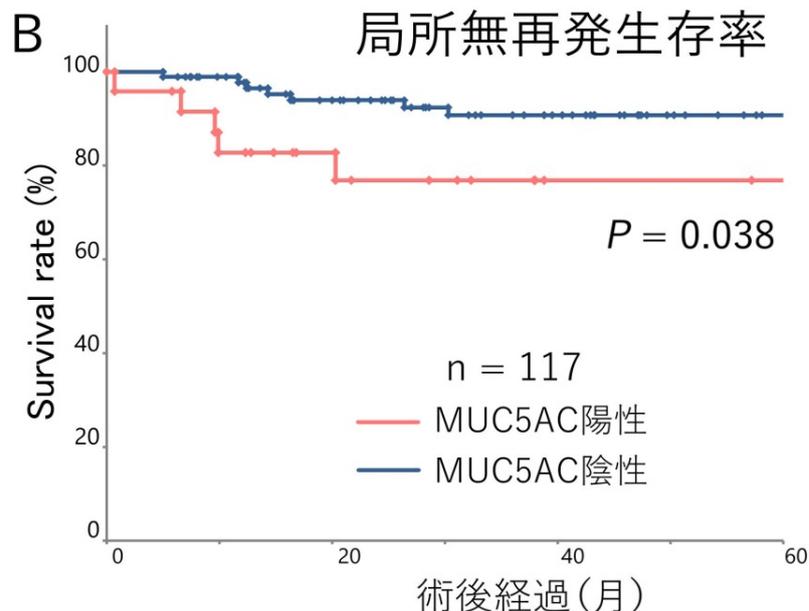


図 7B MUC5AC 陽性・陰性群におけるそれぞれの局所無再発生存率の生存曲線を示した。両群間の比較では、MUC5AC 陽性群において有意に局所無再発生存率が低かった ( $P=0.038$ )。

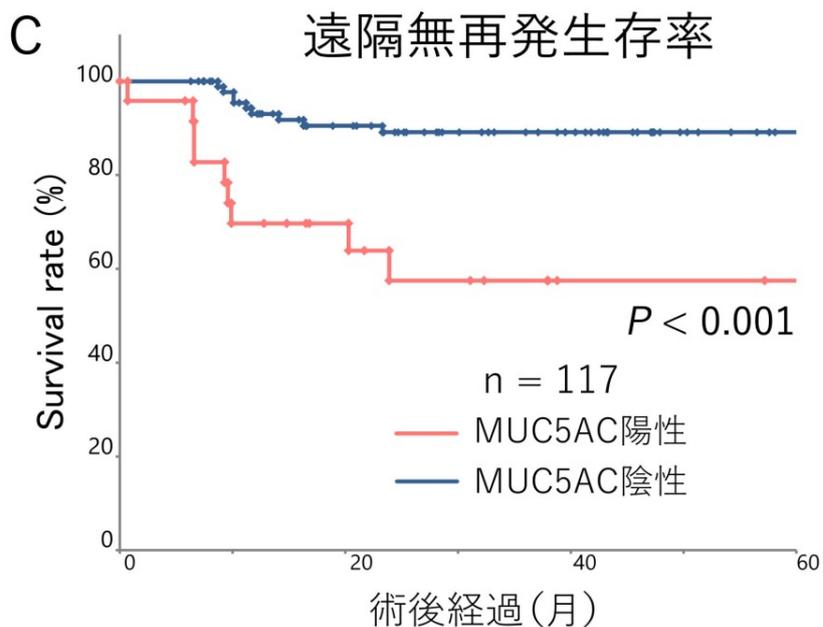


図 7C MUC5AC 陽性・陰性群におけるそれぞれの遠隔無再発生存率の生存曲線を示した。両群間の比較では、MUC5AC 陽性群において有意に遠隔無再発生存率が低かった ( $P < 0.001$ )。

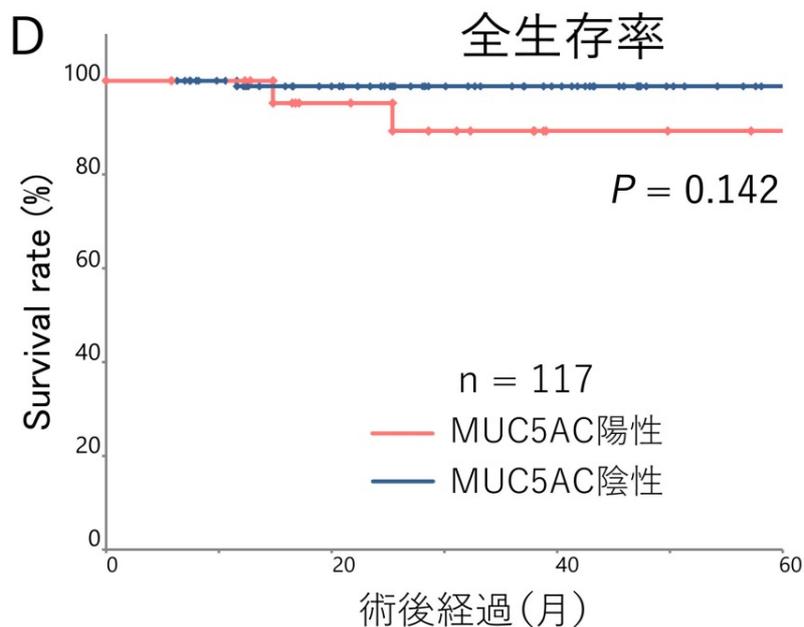


図 7D MUC5AC 陽性・陰性群におけるそれぞれの全生存率の生存曲線を示した。両群間において、生存率に有意差を認めなかった。

## 6.9 生存率の多変量解析

各生存率の単変量解析において  $P < 0.1$  となった因子を表 14 に示す。これらのうち  $P < 0.05$  となった因子を多変量解析の対象とした。

無病生存率において、 $P < 0.1$  となった因子は粘液量・MUC5AC 発現・MUC2 発現・深達度・リンパ節転移・CRT 奏効率の 6 因子であった(それぞれ  $P=0.005$ 、 $P=0.006$ 、 $P=0.010$ 、 $P=0.020$ 、 $P=0.033$ 、 $P=0.038$ )。唯一の独立した予後不良因子は MUC5AC 陽性であり、 $P=0.022$  であった。

局所無再発生存率において、 $P < 0.1$  となった因子は、CRT 奏効率・MUC5AC 発現・深達度・リンパ節転移の 4 因子であった(それぞれ  $P=0.031$ 、 $P=0.038$ 、 $P=0.089$ 、 $P=0.094$ )。これらのうち、局所再発における独立した予後不良因子は CRT 奏効率 Grade 1a, 1b であった ( $P=0.043$ )。

遠隔無再発生存率において、 $P < 0.1$  となった因子は、MUC5AC 発現・粘液量・MUC2 発現・深達度・リンパ管侵襲・静脈侵襲・CRT 奏効率・リンパ節転移の 8 因子であった(それぞれ  $P < 0.001$ 、 $P < 0.001$ 、 $P=0.004$ 、 $P=0.005$ 、 $P=0.032$ 、 $P=0.038$ 、 $P=0.054$ 、 $P=0.079$ )。多変量解析の結果、独立した予後不良因子は MUC5AC 陽性、粘液量  $> 25\%$  の二つであり、それぞれ  $P < 0.001$ 、 $P=0.046$  であった。ここでも、MUC5AC 陽性が、遠隔転移再発と最も強く関連している因子であると考えられた。

全生存率においては、単変量解析において  $P < 0.05$  となる因子が存在せず、独立した予後不良因子を認めなかった。

表 14 生存率と相関する MUC を含む諸因子の単変量解析および多変量解析

無病生存率						
		n = 117	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
粘液量	≤25% vs. >25%	95 vs. 22	0.005	1.88	0.69-5.04	0.214
MUC5AC	陰性 vs. 陽性	93 vs. 24	0.006	3.17	1.19-8.46	0.022
MUC2	陰性 vs. 陽性	89 vs. 28	0.010	2.19	0.75-6.39	0.152
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	55 vs. 62	0.020	1.98	0.79-5.65	0.149
リンパ節転移	なし vs. あり	87 vs. 30	0.033	1.82	0.74-4.26	0.183
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	74 vs. 43	0.038	0.52	0.14-1.53	0.247
局所無再発生存率						
		n = 117	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	74 vs. 43	0.031	0.17	0.01-0.95	0.043
MUC5AC	陰性 vs. 陽性	93 vs. 24	0.038	2.14	0.62-6.91	0.215
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	55 vs. 62	0.089			
リンパ節転移	なし vs. あり	87 vs. 30	0.094			
遠隔無再発生存率						
		n = 117	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
MUC5AC	陰性 vs. 陽性	93 vs. 24	<0.001	5.90	2.11-17.3	<0.001
粘液量	≤25% vs. >25%	95 vs. 22	<0.001	3.64	1.02-13.4	0.046
MUC2	陰性 vs. 陽性	89 vs. 28	0.004	2.54	0.68-9.68	0.166
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	55 vs. 62	0.005	2.78	0.73-13.9	0.139
リンパ管侵襲	なし vs. あり	110 vs. 7	0.032	3.99	0.83-15.1	0.079
静脈侵襲	なし vs. あり	52 vs. 65	0.038	1.27	0.38-5.09	0.707
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	74 vs. 43	0.054			
リンパ節転移	なし vs. あり	87 vs. 30	0.079			
全生存率						
		n = 117	単変量	多変量解析		
Variable		n	P 値	HR	95% CI	P 値
静脈侵襲	なし vs. あり	52 vs. 65	0.050			
深達度	ypT1, T2 vs. ypT3, T4	55 vs. 62	0.058			
CRT 奏効率	Grade 1a, 1b vs. 2	74 vs. 43	0.077			

HR, ハザード比; CI, 信頼区間

単変量解析にて p<0.1 であった因子のみ示した。

## 6.10 粘液量および MUC5AC と無遠隔再発生存率の関係

遠隔無再発生存率に影響を与える諸因子を多変量解析した結果、独立した予後不良因子として MUC5AC 陽性・粘液量>25%の 2 因子が挙げられた。ここで、それらの両方を満たさない群、片方のみを満たす群、双方を満たす群の 3 群に分けて遠隔無再発生存率を解析したところ、前二者と比較して後者において有意に遠隔無再発生存率が低かった(共に  $P<0.001$ 、図 8)。一方、MUC5AC 陽性・粘液量>25%のいずれにも該当しない群と、それらのうち片方に該当する群との間に、遠隔無再発生存率における有意差を認めなかった ( $P=0.095$ )。すなわち、MUC5AC 陽性・粘液量>25%の双方を満たすような症例では、7 例中 6 例に遠隔転移が出現、極めて予後不良であると考えられた。

図8 粘液量・MUC5ACと遠隔無再発生存率の関係

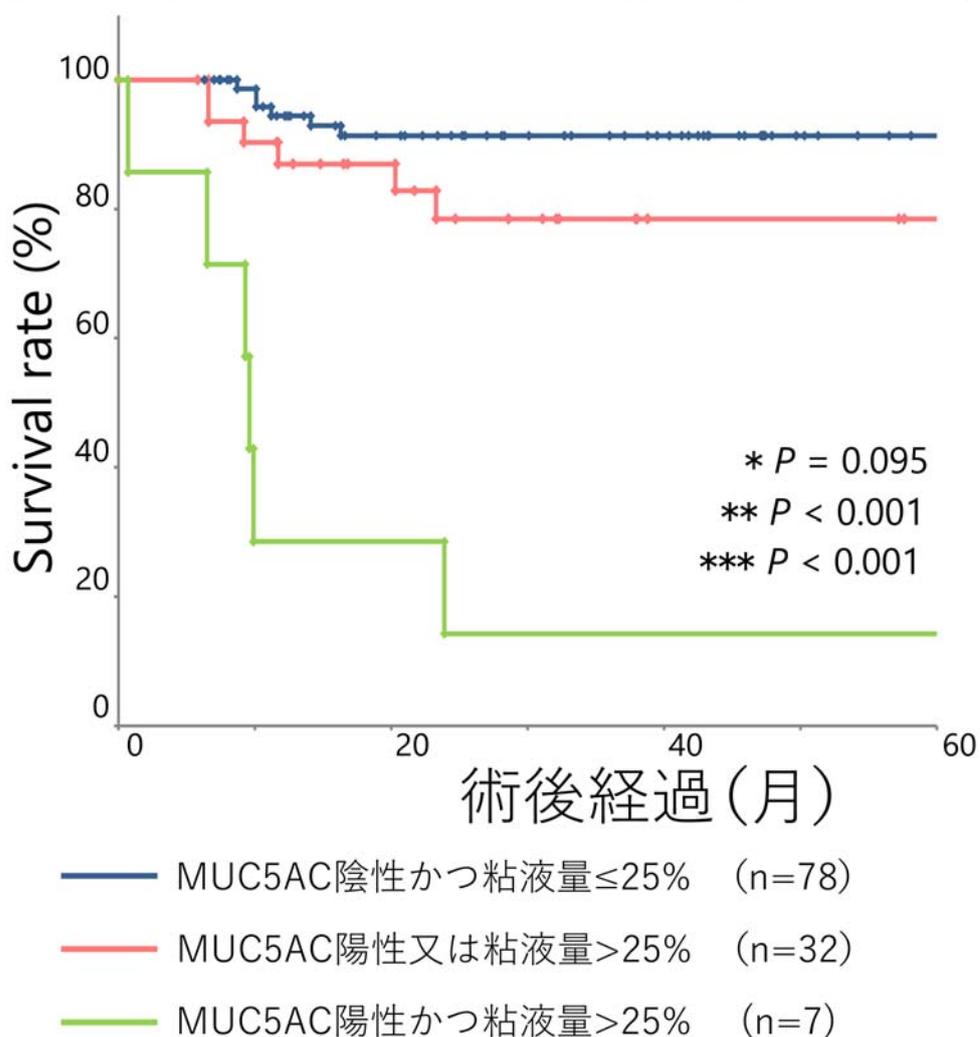


図8 粘液量およびMUC5ACの発現と、遠隔無再発生存率の関係を生存曲線にて示した。MUC5AC陽性・粘液量>25%の2因子の双方を満たさない群、片方のみを満たす群、双方を満たす群の3群において、前二者と比較して後者において有意に遠隔無再発生存率が低かったが(共に $P < 0.001$ )、双方を満たさない群と、片方みの群との間に有意差を認めなかった( $P = 0.095$ )。

\*: MUC5AC陰性かつ粘液量≤25%群 vs. MUC5AC陽性又は粘液量>25%群、

\*\* : MUC5AC陽性又は粘液量>25%群 vs. MUC5AC陽性かつ粘液量>25%群

\*\*\*: MUC5AC陰性かつ粘液量≤25%群 vs. MUC5AC陽性かつ粘液量>25%群

生存率の検定はLog rank testにより行った。

## 6.11 小括 2

術前 CRT 後に pCR (病理学的完全寛解) を示さなかった 117 症例において、

- 1) MUC1 および MUC5AC 陽性群において CRT 奏功率が低かった。これらの粘液関連蛋白発現は、術前 CRT の効果を減弱させる影響をもつ可能性が示唆された。
- 2) 粘液産生量が高いことと MUC2 陽性が強く相関した一方、それ以外の組み合わせにおいて粘液産生量と各粘液関連蛋白発現は必ずしも一致せず、個々の症例ごとに異なった。
- 3) MUC1 および MUC2 発現は予後と相関を認めなかったが、MUC5AC 発現および高粘液産生は、独立した遠隔転移再発の危険因子であった。この両者が共に陽性であった症例では極めて遠隔転移再発が多い、という結果となった。

## 7. 考察

粘液癌は、全大腸癌症例のうち 4.2-14.8%を占めると報告されている [1-5]。従前の報告によると、粘液癌は結腸よりも直腸に好発するとされていたが [1]、直腸のみを扱った本研究において粘液癌と診断された症例は 3.1%に過ぎなかった。一方、これまでの研究によると、粘液量が病変全体の面積の 50%に満たない範囲で粘液の存在を認めた症例の割合は 7.9-20.4%と報告されている [2, 42, 43]。

粘液の存在が癌の発育・進展にどのような影響を与えているのかは以前より議論の対象となっているが、ことに粘液に関連した複数の特異的なマーカーについて、大腸癌を含めたさまざまな癌種において研究がなされている。1975 年には、Goldenberg らが、大腸癌の粘液上に腫瘍に特異的な糖蛋白を免疫染色により同定したと報告している [44]。一方で、粘液の分子生物学的な様態は、高分子量であることや複雑な立体構造を持つことから、解析が困難であるとされてきた [45]。

そうした背景を持ちつつも、これまでに計 20 種類の粘液に関連する糖蛋白が同定されており、それらは膜結合型粘液および分泌型粘液として分類されている。膜結合型粘液としては、MUC1、MUC3A、MUC3B、MUC4、MUC11、MUC12、MUC13、MUC15、MUC16、MUC17、MUC20、および MUC21 が報告されており、分泌型粘液としては、MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6、MUC7、MUC8、MUC9、および MUC19 が報告されている [46]。腫瘍細胞における粘液の異常発現は、発育・分化・形質転換・接着・浸潤・免疫寛容などに関わっていると報告されている [47]。

膜結合型粘液は、レクチン・シグレック・セレクトイン・接着分子・バクテリアなどの生体にとって重要な分子のリガンドとして働いていることが知られている [48]。これらのうち MUC1 は、最も早くにクローニングによりそのゲノム配列が同定された粘液である [49]。その後、ヒトの膵臓腫瘍およびマウスからも同様に、MUC1 のゲノム配列が同定されたとする報告が相次いだ [50-52]。MUC1 は膜結合型粘液であり、長大な O-結合型糖鎖付加を持つことが特徴とされ、分子量に占める糖鎖の割合は 50-90%におよぶ。また、1000-2200 個分のアミノ酸にも相当する巨大な細胞外ドメインを持つ。アミノ酸の長さに相違が生じるのは、20 個のアミノ酸を含むタンデムリピート配列のバリエーションに由来すると言われている。

一方の分泌型粘液は、さらにゲル形成型粘液と非ゲル形成型粘液とに分類されるが、MUC2 および MUC5AC はともにゲル形成型粘液であると報告されている [53, 54]。これらゲル形成型粘液をコードする遺伝子群 (MUC2、MUC5AC、MUC5B、MUC6) は染色体 11p15 上に集まっており、それぞれが多くの部分で同様の配列を共有している [55]。ゲル形成型粘液のコア蛋白質は、通常 5,000 以上のアミノ酸によって構成され、それらが Dドメインと呼ばれる構造に介在されてオリゴマーを形成することによって複雑な構造を持っている [53]。MUC2 では、C 末端の D ドメインがジスルフィド結合二量体を構成し、N 末端の D ドメインがジスルフィド結合三量体を構成している [56, 57]。MUC5AC および MUC5B、MUC6 も同様に、末端の D ドメインを介してオリゴマーを形成していると考えられている [58]。

MUC2 は主に大腸・小腸および気道内に発現しており [59-62]、一方 MUC5AC は気道

内および胃に多く発現していると報告されている [63]。

正常な状態の細胞およびそこから産生される粘液は、生体において以下のような役割を果たしていると考えられる。

#### 1. 物理的バリアおよび環境維持

細胞外の粘液は、微生物や不溶性の物質に対する物理的な防御となっているほか、水分保持・電解質組成維持・高分子化合物のアクセス制限などの役割と担っている。例として、胃で分泌される粘液 (MUC5AC・MUC6) は、表層上皮に対する防御的な層を形成し、HCl に対する選択的な拡散バリアとして機能する [64-66]。

#### 2. 活動性分子の放出

この働きを示す一例として、trefoil factors (TFFs) と呼ばれる三つ葉模様状の蛋白が挙げられる [67]。この蛋白は、粘液を分泌する上皮細胞の大部分において発現されており、損傷を受けた上皮における創傷治癒や粘膜の回復に関わっている。[68-73]。この TFFs が関わっている特定の反応には、アポトーシスの防止、細胞運動の促進、分化の促進などが含まれ、前癌状態の細胞および癌細胞において共に発現している例を認めることから、癌化との関与を示唆する報告もある[74-77]。

一方、癌細胞、とくに腺癌においては、さまざまな種類の異常な形態および産生量を示す粘液が分泌されている。例えば MUC1 の異常発現は、大部分の上皮細胞由来の腺癌(乳癌・膵癌・卵巣癌・肺癌・消化器癌・前立腺癌・膀胱癌・子宮内膜癌)において見出されているほか [78]、血液悪性腫瘍の一部(多発性骨髄腫・Ki-1 陽性 B 細胞性リンパ腫・T 細胞性

リンパ腫・非ホジキン B 細胞性リンパ腫・骨髄性白血病)においても発現を認めるとする報告がある [79-81]。特に、乳癌における MUC1 陽性率は 90%超と高率である [82]。

異常な形態を示す粘液が産生されるのは、腫瘍細胞が形成される過程において、粘液のコア蛋白の発現に脱制御が生じたり、粘液形成に関わる酵素に異常が生じたりすることが原因と考えられている。このように、成長しつつある腫瘍細胞において、次々と新しい形態の粘液を産生する能力を獲得することは、ひいては浸潤や転移を起こす過程においても腫瘍細胞の生存を助ける方向に働くと推測される [47]。

粘液が腫瘍細胞に対して果たしている具体的な役割としては、以下のごとく複数の機序が考えられている。

#### 1. 微小環境の制御

腫瘍細胞は正常な上皮細胞と同様に、粘液の成長を阻害する因子からの防御および局所的な微小環境のコントロールのために活用できるものと考えられる [47]。

#### 2. 分化および増殖の制御

近年多くの研究において、細胞表面の粘液が分化や増殖の調整に関わっていると報告されている。例として、過剰発現した MUC1 は正常な MUC1 よりもグリコシル化が制限され、コア蛋白と細胞外マトリックスに存在するさまざまな受容体や物質と相互作用しやすい環境となっている。さらに MUC1 の細胞質尾部は、 $\beta$ -カテニンとの結合を通じて MAPK を介して核内で転写因子 TCF/LEF と複合体を形成し、標的遺伝子の転写を活性化する。異常発現した MUC1 は、この経路を活性化することが報告されている [83, 84]。

### 3. 腫瘍抑制

Velcichらは、MUC2欠損マウスの68%において、小腸・大腸における腺腫の多発傾向およびそれらの浸潤癌への進展が認められたと報告している [85]。また、MUC2をノックダウンした大腸癌細胞株において増殖能・浸潤能が増強したとする報告もある [86]。これらの事実は、MUC2には大腸癌に対して何らかの抑制的な働きをしていることを示唆しているが、それらの機序は現在のところ解明されていない。

### 4. 浸潤および転移

先述のとおり、腫瘍細胞上で過剰発現しているMUC1は、細胞外コア蛋白と細胞外マトリックスに存在するさまざまな受容体や物質と相互作用しやすい環境となっている。結果、MUC1の細胞外コア蛋白上のタンデムリピート構造が、内皮細胞上にあるICAM-1・E-selectin・Galectin-3と結合し、遊走能・浸潤能・転移能の獲得に寄与していると報告されている [87]。そして、Ajiokaらは、同様の機序が大腸癌においても起こりうると報告している [88]。

### 5. 免疫応答に対する影響

Chanらは、上皮細胞由来の腫瘍表面から採取された浮遊物中のMUC1が、Tリンパ球の増殖を停止させると報告している [89]。Hinodaらも同様に、異常発現した腫瘍細胞上では、CTLsを含むT細胞の活動が阻害されていると報告している [90]。

粘液量が腫瘍総面積の50%に満たなかったために粘液癌と診断されなかった症例の一部においてもある程度の粘液が産生されていると考えられるが、それらの臨床的な特徴はこれまでに十分検討されてきたとは言えない。ことに、術前CRTを施行された下部進行直腸

癌手術症例における検討は不十分であったと考えられる。

いくつかの先行研究において、術前 CRT にて pCR が得られた症例のうち、腫瘍細胞が消失して粘液湖だけが残存しているケースに関して報告されている [91-94]。これらによると、腫瘍細胞が消失して粘液湖だけが残存している症例は、pCR 症例のうち 16.1-34.2%であったとされ、いずれにおいても粘液成分を認めない通常の pCR 症例と比較してもその予後は同等であった。ゆえに、腫瘍細胞が含まれていない限り、術前 CRT 後の切除標本に含まれる粘液湖を残存病変の一部と見なすべきではないと結論づけられている。一方、本研究において術前 CRT 後に pCR となった症例は 13 例に認めたが、これらのうち粘液湖のみが残存している症例は認められなかった。術前 CRT にて pCR が得られてかつ粘液湖の残存を認めるケースに関しては、より多くの症例数を含めた検討が必要であると考えられる。

また、本研究において、粘液量が病変総面積の 5-50%を占めると診断された症例は 48 例 (34.0%) であり、従来の診断基準から粘液癌と診断される症例に加えて、これらの症例を検討に加えることによって、より多数の症例を評価の対象とすることが出来ると考えられた。

従前の研究によると、大腸の粘液癌は非粘液癌と比較して腫瘍径が大きい、深達度が深い、遠隔転移・リンパ節転移の頻度が高い、右側結腸に存在する割合が高い、と報告されている [2, 4, 5]。また、複数の先行研究において、直腸粘液癌症例は非粘液癌症例と比較して、CRT によって深達度のダウンスレージング、リンパ節転移のダウンスレージング、病理学的奏効率において劣るとの結果が報告されている [24-26, 95]。

本研究では、粘液の割合が 25%を超える高粘液産生群において、切除検体における深

達度が深いという結論が得られた。少なくとも全ての症例で、CRT 施行以前における臨床病期は cT3 ないし cT4 と診断されているため、この結果は粘液産生量が多い症例において CRT による深達度のダウンステージングが得られにくい可能性を示唆していると考えられる。その一方で、高粘液産生群と対照群を比較した場合、CRT の病理学的奏効率および注腸での腫瘍縮小率に関しては、両群間に有意差を認めなかった。

次いで、本研究では粘液産生能と予後との関係について評価を行った。これまでに多くの先行研究において、大腸粘液癌と予後との関係について研究が成されているが、それらは今なお議論の対象となっており定見は見出されていない。その一つの理由として、大腸粘液癌が比較的稀な組織型であることが原因と考えられる。また、病変総面積に占める粘液の割合が 50%に満たないケースにおいても解析がなされてきたが、これらに関しても粘液産生が予後に与える影響に関して有意差を示すことはできなかった [2, 42, 96]。

本研究においては、粘液産生能と局所無再発生存率との間に有意な相関関係を認めなかった一方、高粘液産生群は対照群と比較して、単変量解析・多変量解析ともに遠隔無再発生存率が有意に低いことが示された。

粘液量と臨床病理学的因子との関係の解析において、粘液量>25%であることと深達度が ypT3 以上であることが有意に相関したが、これら双方を因子として含む多変量解析を無病生存率ならびに遠隔無再発生存率について行ったところ、高粘液産生群が独立した予後不良因子であることが示され、高粘液産生群において遠隔再発の頻度が高いことは深達度が深いことによる影響から独立していると考えられた。

病変総面積に占める粘液の割合が 5%未満の低粘液産生群および、粘液の割合が 5-25%の中粘液産生群が示した遠隔無再発生存率の生存曲線は近接していた一方、粘液の割合が 25%を超える高粘液産生群では、低・中粘液産生群の双方と比較していずれに対しても有意に遠隔無再発生存率が低く、この結果から病変総面積に占める粘液の割合が 25%を超える症例において、遠隔転移再発のリスクが高いとの結論が得られた。局所再発に関しては、粘液産生量による影響は認められなかった一方、CRT 奏効率 Grade 1a, 1b の症例において局所無再発生存率が低かった。

一方で MUC1、MUC2、MUC5AC といった粘液関連蛋白と大腸癌との関係についても、これまでに様々な報告がされている。

大腸粘液癌において最も高率に発現しているのが MUC2 であると報告されており、大腸癌に関連した粘液関連蛋白の報告においても、MUC2 発現を解析した研究が一番多く認められる。MUC2 は、もともと多くの正常な大腸粘膜上皮細胞において陽性であるほか、大腸粘液癌においても比較的多くの割合で発現していると報告されており、非粘液癌と比較した場合においても、粘液癌の方が発現している頻度が高いと報告されている [28, 29, 97, 98]。Matsuda らは、通常の大腸癌において粘液関連蛋白が発現している割合に関して、MUC1 が 43%、MUC2 が 33%であったと報告している [99]。本研究における MUC1・MUC2・MUC5AC の陽性率はそれぞれ 19.7%、23.9%、20.5%であった。本研究においては、対象を術前 CRT 後の下部進行直腸癌症例に限定していることから、これらの結果を単純に比較することは不可能であると考えられる。

また Matsuda らは、MUC1 は深達度が pT1 であった症例よりも pT4 の症例で高頻度に陽性であり、また病期が Dukes A, B であった症例と比較して Dukes C, D においてより高頻度に陽性を示し、同様に肝転移を有する症例においても高頻度に陽性であったと報告している。一方、MUC2 においてはそのような関連を認めなかったとしている [99]。Lugli らは、MUC1 および MUC2 発現と DNA ミスマッチ修復遺伝子との関連について報告している。結果、遺伝性大腸癌において MUC1・MUC2 発現と臨床病理学的因子との間に何ら関連を認めなかったが、ミスマッチ修復遺伝子欠損のない症例においては、MUC1 発現はより高い深達度と、MUC2 非発現はより高い深達度・リンパ節転移の頻度・静脈侵襲の頻度・および全生存率の低さと相関したと報告している [100]。

本研究においては、MUC1 陽性群は陰性群と比較して、有意に深達度が高く、CRT 病理学的奏効率が低い、という特徴が認められた。MUC2 陽性群は陰性群と比較して、粘液産生量が 25%を超えることと有意に相関し、CRT 前後における腫瘍の縮小率が低かった。MUC5AC 陽性群は陰性群と比較して、年齢が高く、CRT 病理学的奏効率が低いという特徴が認められた。これらの事実は、粘液関連蛋白が発現している症例において、術前 CRT の治療効果が低下する可能性を示唆していると考えられた。

粘液関連蛋白の発現と予後との関係については、先述したとおり十分に検討されていない。Perez らは粘液癌同士の比較において、MUC1 陽性例は陰性例と比較して無病生存率が有意に低く、MUC2 陽性例は陰性例と比較して全生存率が有意に低いと報告した [27]。一方 Kang らは、Stage II・III の大腸癌症例において MUC2 陽性例の全生存率が有意に高

かったと報告している [28]。いずれの粘液関連蛋白の発現に関しても、大腸癌の予後との関係において定見は得られておらず、術前 CRT を行った直腸癌症例における粘液関連蛋白について検討した報告もこれまでにない。一方、本研究では術前 CRT を施行した下部直腸癌患者を対象として粘液関連蛋白の発現を解析し、MUC5AC 発現が無病生存率および遠隔無再発生存率において独立した予後不良因子であることを明らかにした点において意義があるものと考えられる。

まとめると、本研究において MUC1、MUC5AC 陽性症例では CRT 奏功率が低かったという事実は、これらの発現が CRT 前の効果予測因子として使える可能性があることを示唆していると考えられた。ただし、これらの粘液関連蛋白が陽性であっても CRT が奏効している症例も少なからずあり、この事実のみを以て CRT 施行の可否を問う判定基準とするのは困難であると考えられた。直腸癌に対する放射線照射をベースとした術前補助治療において、メタアナリシスによって治療効果予測因子であることが示された p53 や [101]、粘液との関連が指摘されている活動性分子である TFFs など [67]、すでに報告されている biomarker を組み合わせていくことで、より精度の高い CRT の効果予測を立てられる可能性があると考えられた。

MUC1 および MUC2 の発現自体が予後と関連しなかったという事実から、これらのマーカーが陽性であることと CRT 奏功率の grade ないし腫瘍縮小率が不良であることが関連したとしても、局所制御という本来の目的を果たす上での術前 CRT の効果は十分であると考えられた。

一方、MUC5AC 陽性の症例では術後の遠隔転移再発が多く、予後不良であった。そもそも MUC5AC は胃粘膜において多く発現しているマーカーであり、大腸の正常粘膜での発現は乏しいと報告されている [40, 102]。MUC1 も本来、大腸の正常粘膜における発現は乏しいとされるが、他方 MUC2 はもともと大腸の正常粘膜において発現が認められる粘液であると報告されている。本研究でも、正常上皮細胞が観察される全ての症例において、MUC1・MUC5AC は正常細胞で陰性であったが、MUC2 は全ての正常上皮細胞上に発現を認めた。これらは細胞の癌化に伴い、MUC1・MUC5AC は一部に発現が認められるようになり、他方 MUC2 は多くの癌細胞において発現が消失し、一部の細胞にのみ発現が残ったと考えられる。

Walsh らは、MUC5AC 陽性大腸癌において、CpG アイランドメチル化形質(CIMP)・*MLH-1* プロモータ領域のメチル化・*BRAF V600E* 変異・ミスマッチ修復欠損・低分化度・高い深達度を有する頻度が高い一方、p53 発現と負の相関関係にあり、この形質が通常の大腸癌で見られる adenocarcinoma sequence による発癌経路とは異なる、serrated neoplasia pathway に関連した腫瘍原性の獲得に関わっている可能性があるとして報告している [103]。BRAF 変異および CIMP は予後不良因子として報告されており [104, 105]、このような腫瘍原性の違いが、MUC5AC 陽性症例において遠隔再発の頻度が高い一つの要因となつたのではないかと考えられた。

今回、本研究では粘液産生能および粘液関連蛋白に着目して検討を行った。予後に影響を与える因子として粘液量>25%、MUC5AC 発現が認められたが、高粘液産生群は 22 例、

MUC5AC 陽性群は 24 例と、症例数に関しては術前 CRT を施行した粘液癌を対象とした先行研究と比較して大差のない水準にとどまった。今後もより多くの症例において研究を継続する必要があると考えられた。

また、今回の研究における粘液産生能および粘液関連蛋白の評価は、基本的に術後の切除標本を対象に行われた。CRT 前の生検検体から粘液成分を検出することで腫瘍における粘液産生能の評価が可能であるかを検討したが、多くの症例において予見は困難であった。症例ごとに術前 CRT の効果予測を行い、将来的な CRT の適応基準に役立てるといふ観点に立つならば、CRT 前に採取された生検検体を研究対象とする必要があり、この点は本研究における限界であると考えられた。一方、粘液関連蛋白の発現については、今後 CRT 前の生検検体を対象に研究を行うことで、術前 CRT の効果予測因子として解明されることが期待される。

本研究では、粘液形質を有する直腸癌では術前 CRT の効果が低いのではないかとの仮説のもとに行ったが、結果は予想とは異なり、粘液産生能の高い癌および粘液関連蛋白を多く発現している癌でも、術前 CRT により十分な局所制御が得られるということがわかった。

しかしながら、MUC5AC 陽性であること、および粘液産生量が 25%を超えることは、遠隔無再発生存率における独立した予後不良因子であった。これらの特徴を示す症例においてはより密にサーベイランスを行うことや、より強力な術後補助化学療法を導入することを検討する必要があると考えられた。

## 8. 結論

術前 CRT を施行した下部進行直腸癌症例において、粘液産生能の高い癌や粘液関連蛋白を発現している癌でも術前 CRT による十分な局所制御効果が得られており、これらの因子は術前 CRT の効果を減弱させるものではないと考えられた。一方、粘液産生量が 25%を超える症例および MUC5AC 陽性症例では遠隔転移再発の頻度が高く、双方を同時に満たす症例では特に高率に遠隔転移再発を認めており、これらの症例ではより密にサーベイランスを行うことや、より強力な術後補助化学療法を考慮するべきと考えられた。

本研究が発端となり、下部進行直腸癌に対して粘液形質を含めた様々なバイオマーカーの発現を考慮した治療選択が行われることを期待する。

## 9. 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 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。そして、腫瘍外科学・血管外科学 北山丈二准教授、須並英二先生、石原聡一郎先生、山口博紀先生、風間伸介先生、川合一茂先生、輸血医学 津野寛和先生には、実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。また、病理学 深山正久教授、森川鉄平先生には、病理所見の診断一致率の検定に携わって頂くとともに、多大な御指導を賜りました。

さらに、実際の実験に際しては、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。

## 10. 引用文献

1. Symonds DA, Vickery AL. Mucinous carcinoma of the colon and rectum. *Cancer* 1976; 37: 1891-1900.
2. Langner C, Harbaum L, Pollheimer MJ et al. Mucinous differentiation in colorectal cancer--indicator of poor prognosis? *Histopathology* 2012; 60: 1060-1072.
3. Kanemitsu Y, Kato T, Hirai T et al. Survival after curative resection for mucinous adenocarcinoma of the colorectum. *Dis Colon Rectum* 2003; 46: 160-167.
4. Numata M, Shiozawa M, Watanabe T et al. The clinicopathological features of colorectal mucinous adenocarcinoma and a therapeutic strategy for the disease. *World J Surg Oncol* 2012; 10: 109.
5. Nozoe T, Anai H, Nasu S, Sugimachi K. Clinicopathological characteristics of mucinous carcinoma of the colon and rectum. *J Surg Oncol* 2000; 75: 103-107.
6. Consorti F, Lorenzotti A, Midiri G, Di Paola M. Prognostic significance of mucinous carcinoma of colon and rectum: a prospective case-control study. *J Surg Oncol* 2000; 73: 70-74.
7. Aitken RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Br J Surg* 1996; 83: 214-216.
8. MacFarlane JK, Ryall RD, Heald RJ. Mesorectal excision for rectal cancer. *Lancet* 1993; 341: 457-460.
9. Heald RJ, Moran BJ, Ryall RD et al. Rectal cancer: the Basingstoke experience of total

mesorectal excision, 1978-1997. *Arch Surg* 1998; 133: 894-899.

10. Kneist W, Heintz A, Wolf HK, Junginger T. [Total excision of the mesorectum in cancer of the lower and middle rectum. Oncological and functional results]. *Chirurg* 2003; 74: 125-131.

11. Law WL, Chu KW. Anterior Resection for Rectal Cancer With Mesorectal Excision. *Annals of Surgery* 2004; 240: 260-268.

12. Kobayashi H, Mochizuki H, Kato T et al. Outcomes of surgery alone for lower rectal cancer with and without pelvic sidewall dissection. *Dis Colon Rectum* 2009; 52: 567-576.

13. Hojo K, Koyama Y, Moriya Y. Lymphatic spread and its prognostic value in patients with rectal cancer. *Am J Surg* 1982; 144: 350-354.

14. Moriya Y, Hojo K, Sawada T, Koyama Y. Significance of lateral node dissection for advanced rectal carcinoma at or below the peritoneal reflection. *Dis Colon Rectum* 1989; 32: 307-315.

15. Bosset JF, Collette L, Calais G et al. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *N Engl J Med* 2006; 355: 1114-1123.

16. Sauer R, Becker H, Hohenberger W et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *N Engl J Med* 2004; 351: 1731-1740.

17. Kapiteijn E, Marijnen CA, Nagtegaal ID et al. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *N Engl J Med* 2001; 345: 638-646.

18. Crane CH, Skibber JM, Feig BW et al. Response to preoperative chemoradiation increases the use of sphincter-preserving surgery in patients with locally advanced low rectal carcinoma. *Cancer* 2003; 97: 517-524.
19. Watanabe T, Tsurita G, Muto T et al. Extended lymphadenectomy and preoperative radiotherapy for lower rectal cancers. *Surgery* 2002; 132: 27-33.
20. Kim JC, Takahashi K, Yu CS et al. Comparative outcome between chemoradiotherapy and lateral pelvic lymph node dissection following total mesorectal excision in rectal cancer. *Ann Surg* 2007; 246: 754-762.
21. Folkesson J, Birgisson H, Pahlman L et al. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *J Clin Oncol* 2005; 23: 5644-5650.
22. Sauer R, Liersch T, Merkel S et al. Preoperative versus postoperative chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer: results of the German CAO/ARO/AIO-94 randomized phase III trial after a median follow-up of 11 years. *J Clin Oncol* 2012; 30: 1926-1933.
23. Nagawa H, Muto T, Sunouchi K et al. Randomized, controlled trial of lateral node dissection vs. nerve-preserving resection in patients with rectal cancer after preoperative radiotherapy. *Dis Colon Rectum* 2001; 44: 1274-1280.
24. Qiu HZ, Wu B, Xiao Y, Lin GL. Combination of differentiation and T stage can predict

unresponsiveness to neoadjuvant therapy for rectal cancer. *Colorectal Dis* 2011; 13: 1353-1360.

25. Shin US, Yu CS, Kim JH et al. Mucinous rectal cancer: effectiveness of preoperative chemoradiotherapy and prognosis. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 2232-2239.

26. Grillo-Ruggieri F, Mantello G, Berardi R et al. Mucinous rectal adenocarcinoma can be associated to tumor downstaging after preoperative chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum* 2007; 50: 1594-1603.

27. Perez RO, Bresciani BH, Bresciani C et al. Mucinous colorectal adenocarcinoma: influence of mucin expression (Muc1, 2 and 5) on clinico-pathological features and prognosis. *Int J Colorectal Dis* 2008; 23: 757-765.

28. Kang H, Min BS, Lee KY et al. Loss of E-cadherin and MUC2 expressions correlated with poor survival in patients with stages II and III colorectal carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2011; 18: 711-719.

29. Li L, Huang PL, Yu XJ, Bu XD. Clinicopathological Significance of Mucin 2 Immunohistochemical Expression in Colorectal Cancer: A Meta-Analysis. *Chin J Cancer Res* 2012; 24: 190-195.

30. Park SY, Roh SJ, Kim YN et al. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC and MUC6 in cholangiocarcinoma: prognostic impact. *Oncol Rep* 2009; 22: 649-657.

31. Liu S, Ruan M, Li S et al. Increased expression of MUC1 predicts poor survival in salivary gland mucoepidermoid carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg* 2014; 42: 1891-1896.

32. Lakshmanan I, Ponnusamy MP, Macha MA et al. Mucins in lung cancer: diagnostic, prognostic, and therapeutic implications. *J Thorac Oncol* 2015; 10: 19-27.
33. Rakha EA, Boyce RW, Abd El-Rehim D et al. Expression of mucins (MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5AC and MUC6) and their prognostic significance in human breast cancer. *Mod Pathol* 2005; 18: 1295-1304.
34. Takikita M, Altekruze S, Lynch CF et al. Associations between selected biomarkers and prognosis in a population-based pancreatic cancer tissue microarray. *Cancer Res* 2009; 69: 2950-2955.
35. He YF, Zhang MY, Wu X et al. High MUC2 expression in ovarian cancer is inversely associated with the M1/M2 ratio of tumor-associated macrophages and patient survival time. *PLoS One* 2013; 8: e79769.
36. Yu CJ, Shih JY, Lee YC et al. Sialyl Lewis antigens: association with MUC5AC protein and correlation with post-operative recurrence of non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 2005; 47: 59-67.
37. Matull WR, Andreola F, Loh A et al. MUC4 and MUC5AC are highly specific tumour-associated mucins in biliary tract cancer. *Br J Cancer* 2008; 98: 1675-1681.
38. Kim SM, Kwon CH, Shin N et al. Decreased Muc5AC expression is associated with poor prognosis in gastric cancer. *Int J Cancer* 2014; 134: 114-124.
39. Xiong L, Yang Z, Yang L et al. Expressive levels of MUC1 and MUC5AC and their

clinicopathologic significances in the benign and malignant lesions of gallbladder. *J Surg Oncol* 2012; 105: 97-103.

40. Bu XD, Li N, Tian XQ et al. Altered expression of MUC2 and MUC5AC in progression of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2010; 16: 4089-4094.

41. Dworak O, Keilholz L, Hoffmann A. Pathological features of rectal cancer after preoperative radiochemotherapy. *Int J Colorectal Dis* 1997; 12: 19-23.

42. Halvorsen TB, Seim E. Influence of mucinous components on survival in colorectal adenocarcinomas: a multivariate analysis. *J Clin Pathol* 1988; 41: 1068-1072.

43. Papadopoulos VN, Michalopoulos A, Netta S et al. Prognostic significance of mucinous component in colorectal carcinoma. *Tech Coloproctol* 2004; 8 Suppl 1: s123-125.

44. Goldenberg DM, Pegram CA, Vazquez JJ. Identification of a colon-specific antigen (CSA) in normal and neoplastic tissues. *J Immunol* 1975; 114: 1008-1013.

45. Carlstedt I, Sheehan JK, Corfield AP, Gallagher JT. Mucous glycoproteins: a gel of a problem. *Essays Biochem* 1985; 20: 40-76.

46. Imai Y, Yamagishi H, Fukuda K et al. Differential mucin phenotypes and their significance in a variation of colorectal carcinoma. *World J Gastroenterol* 2013; 19: 3957-3968.

47. Hollingsworth MA, Swanson BJ. Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* 2004; 4: 45-60.

48. Carraway KL, Ramsauer VP, Haq B, Carothers Carraway CA. Cell signaling through

membrane mucins. *Bioessays* 2003; 25: 66-71.

49. Gendler SJ, Burchell JM, Duhig T et al. Cloning of partial cDNA encoding differentiation and tumor-associated mucin glycoproteins expressed by human mammary epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84: 6060-6064.

50. Lan MS, Batra SK, Qi WN et al. Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *J Biol Chem* 1990; 265: 15294-15299.

51. Spicer AP, Parry G, Patton S, Gendler SJ. Molecular cloning and analysis of the mouse homologue of the tumor-associated mucin, MUC1, reveals conservation of potential O-glycosylation sites, transmembrane, and cytoplasmic domains and a loss of minisatellite-like polymorphism. *J Biol Chem* 1991; 266: 15099-15109.

52. Vos HL, de Vries Y, Hilkens J. The mouse episialin (Muc1) gene and its promoter: rapid evolution of the repetitive domain in the protein. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 181: 121-130.

53. Gum JR, Jr., Hicks JW, Toribara NW et al. Molecular cloning of human intestinal mucin (MUC2) cDNA. Identification of the amino terminus and overall sequence similarity to prepro-von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1994; 269: 2440-2446.

54. Escande F, Aubert JP, Porchet N, Buisine MP. Human mucin gene MUC5AC: organization of its 5'-region and central repetitive region. *Biochem J* 2001; 358: 763-772.

55. Pigny P, Guyonnet-Duperat V, Hill AS et al. Human mucin genes assigned to 11p15.5:

identification and organization of a cluster of genes. *Genomics* 1996; 38: 340-352.

56. Asker N, Axelsson MA, Olofsson SO, Hansson GC. Dimerization of the human MUC2 mucin in the endoplasmic reticulum is followed by a N-glycosylation-dependent transfer of the mono- and dimers to the Golgi apparatus. *J Biol Chem* 1998; 273: 18857-18863.

57. Godl K, Johansson ME, Lidell ME et al. The N terminus of the MUC2 mucin forms trimers that are held together within a trypsin-resistant core fragment. *J Biol Chem* 2002; 277: 47248-47256.

58. Asker N, Axelsson MA, Olofsson SO, Hansson GC. Human MUC5AC mucin dimerizes in the rough endoplasmic reticulum, similarly to the MUC2 mucin. *Biochem J* 1998; 335 ( Pt 2): 381-387.

59. Toribara NW, Gum JR, Jr., Culhane PJ et al. MUC-2 human small intestinal mucin gene structure. Repeated arrays and polymorphism. *J Clin Invest* 1991; 88: 1005-1013.

60. Gum JR, Byrd JC, Hicks JW et al. Molecular cloning of human intestinal mucin cDNAs. Sequence analysis and evidence for genetic polymorphism. *J Biol Chem* 1989; 264: 6480-6487.

61. Jany BH, Gallup MW, Yan PS et al. Human bronchus and intestine express the same mucin gene. *J Clin Invest* 1991; 87: 77-82.

62. Gum JR, Jr., Hicks JW, Toribara NW et al. The human MUC2 intestinal mucin has cysteine-rich subdomains located both upstream and downstream of its central repetitive region.

J Biol Chem 1992; 267: 21375-21383.

63. Meezaman D, Charles P, Daskal E et al. Cloning and analysis of cDNA encoding a major airway glycoprotein, human tracheobronchial mucin (MUC5). J Biol Chem 1994; 269: 12932-12939.

64. Nordman H, Davies JR, Lindell G, Carlstedt I. Human gastric mucins--a major population identified as MUC5. Biochem Soc Trans 1995; 23: 533S.

65. Ho SB, Robertson AM, Shekels LL et al. Expression cloning of gastric mucin complementary DNA and localization of mucin gene expression. Gastroenterology 1995; 109: 735-747.

66. Bhaskar KR, Garik P, Turner BS et al. Viscous fingering of HCl through gastric mucin. Nature 1992; 360: 458-461.

67. Sommer P, Blin N, Gott P. Tracing the evolutionary origin of the TFF-domain, an ancient motif at mucous surfaces. Gene 1999; 236: 133-136.

68. Hoffmann W, Jagla W. Cell type specific expression of secretory TFF peptides: colocalization with mucins and synthesis in the brain. Int Rev Cytol 2002; 213: 147-181.

69. Tomasetto C, Masson R, Linares JL et al. pS2/TFF1 interacts directly with the VWFC cysteine-rich domains of mucins. Gastroenterology 2000; 118: 70-80.

70. Thim L, Madsen F, Poulsen SS. Effect of trefoil factors on the viscoelastic properties of mucus gels. Eur J Clin Invest 2002; 32: 519-527.

71. Hoffmann W, Jagla W, Wiede A. Molecular medicine of TFF-peptides: from gut to brain. *Histol Histopathol* 2001; 16: 319-334.
72. Tran CP, Cook GA, Yeomans ND et al. Trefoil peptide TFF2 (spasmolytic polypeptide) potently accelerates healing and reduces inflammation in a rat model of colitis. *Gut* 1999; 44: 636-642.
73. Taupin D, Wu DC, Jeon WK et al. The trefoil gene family are coordinately expressed immediate-early genes: EGF receptor- and MAP kinase-dependent interregulation. *J Clin Invest* 1999; 103: R31-38.
74. Longman RJ, Douthwaite J, Sylvester PA et al. Coordinated localisation of mucins and trefoil peptides in the ulcer associated cell lineage and the gastrointestinal mucosa. *Gut* 2000; 47: 792-800.
75. Lalani EN, Williams R, Jayaram Y et al. Trefoil factor-2, human spasmolytic polypeptide, promotes branching morphogenesis in MCF-7 cells. *Lab Invest* 1999; 79: 537-546.
76. Wright NA, Hoffmann W, Otto WR et al. Rolling in the clover: trefoil factor family (TFF)-domain peptides, cell migration and cancer. *FEBS Lett* 1997; 408: 121-123.
77. Nogueira AM, Machado JC, Carneiro F et al. Patterns of expression of trefoil peptides and mucins in gastric polyps with and without malignant transformation. *J Pathol* 1999; 187: 541-548.
78. Price MR. High molecular weight epithelial mucins as markers in breast cancer. *Eur J*

Cancer Clin Oncol 1988; 24: 1799-1804.

79. Ohminami H, Yasukawa M, Fujita S. HLA class I-restricted lysis of leukemia cells by a CD8(+) cytotoxic T-lymphocyte clone specific for WT1 peptide. Blood 2000; 95: 286-293.

80. Noto H, Takahashi T, Makiguchi Y et al. Cytotoxic T lymphocytes derived from bone marrow mononuclear cells of multiple myeloma patients recognize an underglycosylated form of MUC1 mucin. Int Immunol 1997; 9: 791-798.

81. Takahashi T, Makiguchi Y, Hinoda Y et al. Expression of MUC1 on myeloma cells and induction of HLA-unrestricted CTL against MUC1 from a multiple myeloma patient. J Immunol 1994; 153: 2102-2109.

82. Singh R, Bandyopadhyay D. MUC1: a target molecule for cancer therapy. Cancer Biol Ther 2007; 6: 481-486.

83. Zrihan-Licht S, Baruch A, Elroy-Stein O et al. Tyrosine phosphorylation of the MUC1 breast cancer membrane proteins. Cytokine receptor-like molecules. FEBS Lett 1994; 356: 130-136.

84. Wen Y, Caffrey TC, Wheelock MJ et al. Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. J Biol Chem 2003; 278: 38029-38039.

85. Velcich A, Yang W, Heyer J et al. Colorectal cancer in mice genetically deficient in the mucin Muc2. Science 2002; 295: 1726-1729.

86. Bu X, Li L, Li N et al. Suppression of mucin 2 enhances the proliferation and invasion

of LS174T human colorectal cancer cells. *Cell Biol Int* 2011; 35: 1121-1129.

87. Horm TM, Schroeder JA. MUC1 and metastatic cancer: expression, function and therapeutic targeting. *Cell Adh Migr* 2013; 7: 187-198.

88. Ajioka Y, Allison LJ, Jass JR. Significance of MUC1 and MUC2 mucin expression in colorectal cancer. *J Clin Pathol* 1996; 49: 560-564.

89. Chan AK, Lockhart DC, von Bernstorff W et al. Soluble MUC1 secreted by human epithelial cancer cells mediates immune suppression by blocking T-cell activation. *Int J Cancer* 1999; 82: 721-726.

90. Hinoda Y, Takahashi T, Hayashi T et al. Enhancement of reactivity of anti-MUC1 core protein antibody and killing activity of anti-MUC1 cytotoxic T cells by deglycosylation of target tissues or cells. *J Gastroenterol* 1998; 33: 164-171.

91. Smith KD, Tan D, Das P et al. Clinical significance of acellular mucin in rectal adenocarcinoma patients with a pathologic complete response to preoperative chemoradiation. *Ann Surg* 2010; 251: 261-264.

92. Lim SB, Hong SM, Yu CS et al. Prevalence and clinical significance of acellular mucin in locally advanced rectal cancer patients showing pathologic complete response to preoperative chemoradiotherapy. *Am J Surg Pathol* 2013; 37: 47-52.

93. de Campos-Lobato LF, Dietz DW, Stocchi L et al. Clinical implications of acellular mucin pools in resected rectal cancer with pathological complete response to neoadjuvant

chemoradiation. *Colorectal Dis* 2012; 14: 62-67.

94. Bhatti AB, Akbar A, Khattak S et al. Impact of acellular mucin pools on survival in patients with complete pathological response to neoadjuvant treatment in rectal cancer. *Int J Surg* 2014; 12: 1123-1126.

95. Sengul N, Wexner SD, Woodhouse S et al. Effects of radiotherapy on different histopathological types of rectal carcinoma. *Colorectal Dis* 2006; 8: 283-288.

96. Lee DW, Han SW, Lee HJ et al. Prognostic implication of mucinous histology in colorectal cancer patients treated with adjuvant FOLFOX chemotherapy. *Br J Cancer* 2013; 108: 1978-1984.

97. Blank M, Klusmann E, Kruger-Krasagakes S et al. Expression of MUC2-mucin in colorectal adenomas and carcinomas of different histological types. *Int J Cancer* 1994; 59: 301-306.

98. Chiang JM, Yeh CY, Changchien CR et al. Mucinous adenocarcinoma showing different clinicopathological and molecular characteristics in relation to different colorectal cancer subgroups. *Int J Colorectal Dis* 2010; 25: 941-947.

99. Matsuda K, Masaki T, Watanabe T et al. Clinical significance of MUC1 and MUC2 mucin and p53 protein expression in colorectal carcinoma. *Jpn J Clin Oncol* 2000; 30: 89-94.

100. Lugli A, Zlobec I, Baker K et al. Prognostic significance of mucins in colorectal cancer with different DNA mismatch-repair status. *J Clin Pathol* 2007; 60: 534-539.

101. Chen MB, Wu XY, Yu R et al. P53 status as a predictive biomarker for patients receiving neoadjuvant radiation-based treatment: a meta-analysis in rectal cancer. *PLoS One* 2012; 7: e45388.
102. Byrd JC, Bresalier RS. Mucins and mucin binding proteins in colorectal cancer. *Cancer Metastasis Rev* 2004; 23: 77-99.
103. Walsh MD, Clendenning M, Williamson E et al. Expression of MUC2, MUC5AC, MUC5B, and MUC6 mucins in colorectal cancers and their association with the CpG island methylator phenotype. *Mod Pathol* 2013; 26: 1642-1656.
104. Juo YY, Johnston FM, Zhang DY et al. Prognostic value of CpG island methylator phenotype among colorectal cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *Ann Oncol* 2014; 25: 2314-2327.
105. Kalady MF, Dejulius KL, Sanchez JA et al. BRAF mutations in colorectal cancer are associated with distinct clinical characteristics and worse prognosis. *Dis Colon Rectum* 2012; 55: 128-133.