

大腸癌における線維性癌間質の形態的特徴に
着目した腫瘍先進部の解析 — その臨床応用と
筋線維芽細胞および periostin との関連に関する
研究

すえやま たかひろ

末山 貴浩

(外科系プライマリーケア学)

防衛医科大学校

平成29年度

論文の要旨

申請者 末山貴浩

研究論文題目

大腸癌における線維性癌間質の形態的特徴に着目した腫瘍先進部の解析

— その臨床応用と筋線維芽細胞および *periostin* との関連に関する研究

1 目的

大腸癌において、簇出などの腫瘍先進部の癌組織の病理学的所見が腫瘍の生物学的悪性度をよく反映することが知られている。一方、近年では癌間質が注目され、これが癌細胞と微小環境を構築し、腫瘍の浸潤・転移に影響を及ぼしていることが示されているが、腫瘍先進部に特異的に出現する癌間質の特徴は十分に解明されていない。我々の教室では大腸癌の腫瘍先進部における線維性癌間質の形態的特徴に基づき、成熟した間質 (Mature stroma)、未熟な間質 (Immature stroma)、その中間にあたる間質 (Intermediate stroma) に分類することが可能であることを報告してきたが、この所見の臨床応用と分子生物学的特徴については十分に明確ではない。本研究では、予後予測の観点から線維性癌間質の評価を大腸癌の治療選択の基準の一つとして用いる意義があるかどうかを明らかにし、さらに線維性癌間質の形態を規定する分子生物学的因子の探索を目的とした。

2 対象並びに方法

大腸癌治癒切除症例において予後転帰の観点から両極にある Stage II 症例 (予後良好症例) と N3 症例 (予後不良症例) を対象とし、切除標本における腫瘍先進部の線維性癌間質の形態を分類して再発との関連を検討した。また、原発巣の手術標本において抗 α -smooth muscle actin 抗体を用いた免疫組織化学染色にて

筋線維芽細胞を同定し、線維性癌間質の形態的所見との関連を検討した。さらに、事前に同意の得られた症例については、術中に原発巣より新鮮凍結標本を採取して periostin の mRNA およびタンパク質の発現を検討し、線維性癌間質との関連性を評価した。

3 結 果

1) Stage II 及び N3 大腸癌症例のいずれにおいても、線維性癌間質の成熟度に基づく予後の層別化が可能であり、線維性癌間質は再発に関する独立した危険因子であった。

2) 線維性癌間質の成熟度が低い症例群では筋線維芽細胞が有意に増殖していた。筋線維芽細胞の分布が疎らである focal type の症例に比較して分布が広範である diffuse type の症例は有意に予後不良であった（3年無再発生存率：各々84.4%、61.5%）。

3) 免疫組織化学染色法による periostin 発現の陽性率は、筋線維芽細胞 focal type の 28.9%に比較し、diffuse type は 88.6%と有意に高率であった。また、3年無再発生存率は periostin 陰性が 93.4%、periostin 陽性例は 55.1%と、陽性例で有意に予後不良であった。

4) 線維性癌間質と periostin の関連について、線維性癌間質の形態別に成熟度が低い症例において、periostin mRNA の発現が有意に増強していた。また、periostin タンパク質の発現においても同様の結果を得た。一方、同一腫瘍内における heterogeneity に注目して検討したところ、成熟度の高い部位に比較して低い部位で periostin mRNA およびタンパク質の発現が増強していた。

4 考 察

大腸癌における線維性癌間質の形態分類は、根治的切除を施行した進行大腸癌症例のうち、最も予後が不良な集団である N3 症例と、最も予後が良好な集団である Stage II 症例のいずれにおいても高い予後分別能を示し、いずれの集団においても既存の臨床病理学的因子を凌駕する独立した予後指標であった。線維性癌間質を評価することで、術後補助化学療法の適応や術後サーベイランス方法の個別化に寄与できる可能性があり、今後、大規模な多施設症例集積による前向き研究による検証を行う価値があると考えられた。また、本研究において線維性癌間質の形態的特徴は、筋線維芽細胞の分布と、筋線維芽細胞から分泌される periostin の発現と密接に相関していることが明らかとなった。未熟な間質を伴う腫瘍ほど転移・再発能が高いことの背景となっている可能性が示唆されると共に、大腸癌細胞が浸潤・転移能獲得する上での癌微小環境の重要性を示唆する所見であると考えられた。

5 結 論

線維性癌間質の形態的特徴に基づく分類は大腸癌の生物学的悪性度をよく反映しており、予後を適格に層別化することができることから、大腸癌症例における個別化治療に寄与しうる。筋線維芽細胞及び periostin が線維性癌間質の形態学的特徴に関連していると考えられた。

目次

第1章 緒言	1 頁
第2章 進行大腸癌における線維性癌間質の形態学的特徴の臨床病理学的意義	4 頁
第1節 Stage II 大腸癌における線維性癌間質の形態学的特徴の臨床病理学的意義	4 頁
第2節 N3 大腸癌における線維性癌間質の形態学的特徴の形態学的分類を用いた予後の層別化	11 頁
第3章 大腸癌における線維性癌間質と筋線維芽細胞の関連に関する検討	18 頁
第4章 大腸癌先進部における periostin の発現	24 頁
第1節 免疫組織化学染色による periostin の発現と筋線維芽細胞および線維性癌間質との関連	24 頁
第2節 periostin と線維性癌間質との関連	30 頁
第5章 総括	38 頁
第6章 結論	41 頁
謝辞	43 頁
図表	45 頁
引用文献	82 頁

第1章 緒言

本邦での大腸癌診療は、2005年に刊行された大腸癌治療ガイドラインによって標準治療が示され、治療の質の均霑化が図られている。しかしながら、解決すべき臨床的課題も多く、術後再発の抑制と生命予後の改善を目的とした術後補助化学療法の実施基準の確立も例外でない。

補助化学療法の主たる対象は Stage III 大腸癌である。この Stage III 大腸癌について、大腸癌治療ガイドラインでは術後補助化学療法を6か月間施行することが推奨されている。しかしながら本邦での大腸癌の治療成績は良好であり、大腸癌研究会による全国登録に基づくと、術後補助化学療法が確立されていなかった1990年代においても Stage III 大腸癌の再発率は30.8%と報告されている[1]。すなわち、補助化学療法を施行する約7割の症例で結果的には不必要な治療を行っていることになるが、これは副作用で患者が被る不利益や医療資源の観点からは看過できない問題である。

また、Stage III 大腸癌の補助化学療法において解決すべきもうひとつの臨床的問題がレジメンの選択基準の確立である。大腸癌の術後補助化学療法に使用可能な薬剤は、fluorouracil (5-FU) に代表されるフッ化ピリミジン系代謝拮抗剤であるが、近年では、白金製剤である oxaliplatin が使用可能となり、5-FU 系薬剤と併用することにより、5-FU 系薬剤単独より高い治療効果が得られることが示されている[2, 3]。しかしながら、oxaliplatin の副作用である末梢神経障害はほぼ全例に出現し、治療終了後も持続する症例も少なくない[4, 5]。このような高侵襲な治療を必要とする症例の選別において、再発リスクの評価は極めて重要である。

一方、前述の大腸癌研究会による全国集計データによると、Stage II 大腸癌の再発率は 13.3%である。比較的予後良好のこの集団において補助化学療法の有用性は示されていない。大腸癌治療ガイドラインでは、全ての Stage II 大腸癌に対して一律には補助化学療法を行わないと述べられ、具体的な適応症例について言及されていない[1]。海外のガイドラインでは Stage II 大腸癌の再発リスク因子が挙げられ、高リスク症例において術後補助化学療法を施行することが推奨されている[6, 7]。しかしながら、再発高リスク因子の内容はガイドラインごとに異なり、またいずれも高いエビデンスに基づいたものではない。

以上の大腸癌術後補助療法に関する臨床上的問題点を解決するためには、各 Stage における予後の層別化が肝要である。現行の大腸癌取扱い規約にある主組織型、深達度、腫瘍最大径、脈管侵襲等の既存の予後因子のみでは不十分であり、新たな悪性度指標が必要である。近年、腫瘍先進部の組織所見の重要性が認識されている。腫瘍先進部において観察される簇出 (budding) は、転移や再発に関連する因子としての重要性が認識され、大腸癌取扱い規約に記載されるに至った[8-11]。一方、最近では、癌細胞のみならずその周囲の微小環境を形成する間葉系組織の機能が重要であることが数々の基礎研究で示されている。

これまで腫瘍先進部における癌組織周囲に存在する線維性癌間質を形態的に分類する方法はなかったが、Ueno らは、先進部に特異的に出現する線維性間質成分を基準に、成熟した間質 (Mature stroma)、未熟な間質 (Immature stroma)、その中間にあたる間質 (Intermediate stroma) に分類できること、形態学的多様性が癌の生物学的悪性度と関連し予後分別能を有することを示している[12-16]。しかしながら、この様な線維性癌間質の形態学的多様性の分子生物学的背景は十分に研究されていない。

癌の微小環境を規定する重要な細胞のひとつが線維芽細胞 (fibroblast) である。これが筋線維芽細胞 (myofibroblast) に分化することで癌細胞の血管新生や浸潤・転移を促進する機能が高まることが報告されており、癌関連線維芽細胞 (cancer-associated fibroblasts: CAFs) とも呼ばれている[17, 18]。近年、筋線維芽細胞から分泌される periostin が注目され、これが癌の進展に関与し、予後因子となるとの報告がある[19, 20]。

本研究ではこれらの背景を踏まえ、進行大腸癌症例における線維性癌間質の形態学的特徴に関する臨床的意義を明らかにすることと、特に筋線維芽細胞と periostin に着眼して、線維性癌間質の形態学的特徴との関連を明らかにすることを目的とした。前者に関しては、大腸癌治癒切除症例の予後を最も規定するリンパ節転移程度を一定にした母集団を選択して検討することにより、本因子の予後分別能をより正確に評価した。

第2章 進行大腸癌における線維性癌間質の形態学的特徴の臨床病理学的意義

第1節 Stage II 大腸癌における線維性癌間質の形態学的特徴の臨床学的意義

1 背景・目的

Stage II 大腸癌はリンパ節転移を有さない進行癌であり、本邦の大腸癌登録によると根治的切除により 84.8%の5年全生存率（OS）が得られ、比較的予後良好な症例群である[1]。Stage II 大腸癌における最大の clinical question に、術後補助化学療法の適応が挙げられる。大腸癌 Stage II+III 症例の術後補助化学療法に関するランダム化比較試験である QUASAR 試験では 5-FU+Leucovorin を用いた術後補助化学療法施行群と手術単独群を比較しているが、化学療法施行群の無再発生存率（RFS）および OS がともに良好で、5年 OS に3~4%の上乗せ効果が認められたが、Stage II のみに対象を絞った副次的解析では生存率に有意差は認められなかった[21]。

また、QUASAR 試験以外にも pT3 pN0 症例を対象とし術後補助化学療法施行群と手術単独群を比較したランダム化比較試験が複数存在するが[22]、いずれの試験でも RFS、OS とともに有意差は認められず、メタアナリシスでも術後補助化学療法施行群の生存期間が若干良好な傾向を認めるのみで統計学的な有意差は得られていない[23, 24]。本邦においても Stage II 大腸癌における術後補助化学療法のランダム化比較試験である SACURA trial[25] が施行され、手術単独群に対する UFT 単剤内服群の優越性を検証したが、UFT を1年内服することによる予後の上乗せ効果は示されなかった[26]。

現在、本邦の大腸癌治療ガイドラインでは、Stage II 大腸癌に対してすべて一

律には補助化学療法を行わないよう勧められている[1]。一方、海外のガイドラインでは Stage II 大腸癌に再発高リスク因子を設定し、限られた症例において術後補助化学療法を施行することが推奨されている。再発高リスク因子としては、ASCO2005 ガイドラインでは郭清リンパ節個数 12 個未満、pT4、穿孔、低分化腺癌・印環細胞癌・粘液癌の各因子が[27]、ESMO ガイドラインでは T4、低分化腺癌または未分化癌、脈管侵襲、リンパ管侵襲、傍神経浸潤、初発症状が腸閉塞または腸穿孔、郭清リンパ節個数 12 個未満の各因子が挙げられている[28, 29]。また National Comprehensive Cancer Network (NCCN) 診療ガイドラインでは、リンパ節検索個数 12 個未満、低分化な組織型、脈管侵襲陽性、腸閉塞、神経周囲浸潤、穿孔、切除断端陽性といった因子が挙げられているが、いずれも高いエビデンスに基づいたものではない。

現状では予後不良なサブグループを抽出して選択的に補助化学療法を行う戦略は妥当と考えられるが、上述のごとく再発高リスク因子はガイドラインごとに異なる現状にある。そこで、本検討では Stage II 大腸癌における、最適な再発高リスク要因を明らかにすることを目的とし、各ガイドラインに挙げられている再発高リスク要因を含む既存の臨床病理学的因子に加え、新たな大腸癌の予後層別化因子である線維性癌間質の形態学的分類の予後への影響を検討した。

2 対象・方法

1) 症例

1998 から 2007 年の間、防衛医科大学校病院で D3 郭清を伴う根治切除術を施行した Stage II 大腸癌症例 490 例（結腸癌 381 例、直腸癌 109 例）を対象とした。患者背景の詳細を表 1 に示す。腫瘍占居部位の内訳は、結腸癌が 381 例、直腸癌が 109 例であった。

2) 方法

線維性癌間質の評価のために用いた病理標本は、日常病理診断のために作製された既存の hematoxylin-eosin 染色標本を使用した。漿膜下層を含んだ原発巣の全切片を観察し、腫瘍先進部の線維性癌間質を既報の方法に従い **Mature**、**Intermediate**、**Immature** の 3 群に分類した[12, 15, 16]。すなわち、先進部間質に極性を維持したきめ細かい collagen 線維を認めるものを **Mature**、明るい好酸性のヒアリン化を伴う幅の広い断片状の collagen 線維 (**keloid-like collagen**) が混在するものを **Intermediate**、**myxoid** な間質が対物 40 倍視野全体を占めるものを **Immature** と判定した（図 1）。複数の線維性癌間質が存在する症例では、最も成熟度の低い領域をその症例の線維性癌間質として判定した。

また、海外のガイドラインで示されている既存の再発高リスク要因を含む臨床病理学的因子に関しては診療録、病理報告書等を参照するとともに、簇出については、大腸癌取扱い規約（第 8 版）の基準に従って新たに評価した[30]。

なお、線維性癌間質および簇出の評価は、予後転帰を含むすべての臨床病理学的情報を **blind** にした状態で申請者（末山）が施行した。評価の再現性を検証

するため、無作為に抽出した症例の病理標本を申請者以外の評価者（上野）が独立して評価を行い、その評価者間の判定一致の程度を κ 係数により評価した。

3) 統計学的手法

線維性癌間質とその他の臨床病理学的因子との関連は、 χ^2 検定にて検討し、母集団が少なく期待値が 5 未満となる場合には Fisher の直接確率法を用いた。また、各病理学的因子における OS と RFS の検討については、OS の生存率曲線は全死亡を、RFS では再発および全死亡を event として Kaplan-Maier 法で算出し、log-rank test にて有意差を検定した。単変量解析にて RFS に有意な相関を示した因子に関しては Cox's proportional hazard model による多変量解析を行い、RFS に関する寄与度を検討した。P 値が 0.05 以下を有意とし、各統計計算は JMP pro11.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。 κ 係数に基づく一致率の解釈は、 <0.4 : 一致度不良 (poor)、 $0.4-0.6$: 中等度の一致 (moderate)、 $0.6-0.8$: 良好な一致 (substantial)、 $0.8>$: ほぼ完璧な一致 (almost perfect) とした[31, 32]。

3 結果

1) 線維性癌間質の評価の内訳および評価者間の一致率

対象症例における線維性癌間質の分類の内訳は、Mature が 263 例 (53.7%)、Intermediate が 173 例 (35.3%)、Immature が 54 例 (11.0%) であった。判定の再現性について κ 値を検討したところ、線維性癌間質の評価に関する κ 値は 0.69 であり、substantial と評価された。これは簇出の評価に関する κ 値 (0.65; substantial) をわずかながら上回るものであった。線維性癌間質の分類と相関を認めた病理学的因子は、腫瘍占居部位 ($P=0.011$)、壁深達度 ($P=0.001$)、静脈侵襲 ($P<$

0.0001)、リンパ管侵襲 ($P = 0.008$)、簇出 ($P < 0.0001$)、術前 CEA 値 ($P = 0.011$) であった (表 2)。

2) 線維性癌間質の形態学的分類別の予後

対象症例全体の 5 年 OS は 86.5%、5 年 RFS は 79.4%であった。線維性癌間質の分類別の OS および RFS に関する生存曲線を図 2 に示す。5 年 RFS は Mature 群では 89.7%、Intermediate 群では 73.7%、Immature 群では 47.2%であり、線維性癌間質の成熟度の低下に従って、有意に予後不良 ($P < 0.0001$) であった。OS に関しても、Mature 群、Intermediate 群、Immature 群での 5 年 OS 率各々 93.2%、83.3%、64.0%と、RFS と同様の結果であった ($P < 0.0001$) (図 2)。腫瘍占居部位別に検討した場合にも、結腸癌、直腸癌のいずれにおいて線維性癌間質分類による予後の層別化が可能であった (図 3)。

3) Stage II 大腸癌の再発リスク因子

線維性癌間質を含む臨床病理学的因子別の 5 年 RFS を 表 3 に示す。単変量解析においては、性別 ($P = 0.022$)、リンパ節検索個数 ($P = 0.0004$)、線維性癌間質 ($P < 0.0001$)、リンパ管侵襲 ($P = 0.046$)、静脈侵襲 ($P = 0.014$)、簇出 ($P = 0.011$) が 5 年 RFS に有意な相関を示した。上記 6 因子に関して Cox's proportional hazard model による多変量解析を施行したところ、線維性癌間質 : Intermediate/Immature ($P < 0.0001$)、リンパ節検索個数 : 12 個未満 ($P = 0.011$)、性別 : 男性 ($P = 0.045$) の 3 因子が独立した再発高リスク要因であった (表 4)。特に線維性癌間質のハザード比は 3.19 と最も高値であった。多変量解析で選択された 3 因子について再発高リスク要因の保有数別の予後を検討したところ、5 年 RFS は因子数 1 個

以下で 90.7%、因子数 2 個で 69.2%、因子数 3 個で 53.9%となり、高リスク要因の保有数が多いほど予後不良であった ($P < 0.0001$) (図 4)。

4) 線維性癌間質の分類と再発形式との関連

Stage II 大腸癌における初発時再発臓器・部位別の 5 年 RFS は、肝が 83.8%、肺が 82.9%、リンパ節が 84.5%、局所が 83.8%であった。再発臓器・部位別に線維性癌間質分類と再発の関連を検討したところ、線維性癌間質分類はすべての再発形式において再発リスクを有意に層別化した (全て $P < 0.0001$) (図 5)。

4 考察

根治切除可能な進行大腸癌の中では最も予後良好な集団である Stage II 大腸癌において、線維性癌間質の評価による予後の層別化が可能であった。線維性癌間質は大腸癌取扱い規約に掲載されている従来の臨床病理学的因子のいずれをも凌駕する再発のリスク要因であり、Immature 症例の 5 年 RFS は 47.2%と極めて不良であった。Stage II 大腸癌では術後補助化学療法の上乗せ効果が期待できないとされる報告が散見されるが[6, 7, 21-24]、線維性癌間質の分類による予後の層別により、リンパ節転移を有する Stage IIIa 症例よりも予後不良な集団を抽出可能であった。このような症例においては、術後補助化学療法の施行が妥当と考えられる。

また、RFS に関する多変量解析で選択された再発高リスク要因の保有数別に再発リスクの層別化が可能であったが、むしろ線維性癌間質単独の評価の方が予後を良好に分別できており、線維性癌間質の予後因子としての有用性の高さが窺われた。

今回の検討では、ASCO ガイドラインや ESMO ガイドラインで示されている再発高リスク要因の中でリンパ節検索個数 12 個未満が独立した再発リスク因子として選択されたが、その他の因子はいずれも選択されなかった。特に主組織型が低分化腺癌の場合、5 年 RFS は 90.9%と高分化・中分化腺癌よりも良好であった。この原因としては、マイクロサテライト不安定性 (microsatellite instability; MSI) との関連が考えられる。すなわち高度な MSI を有する大腸癌 (MSI high) は低分化腺癌が多いが、再発率が低く、予後良好とされており [33]、低分化腺癌と判定される Stage II 大腸癌に少なからず MSI high 症例が含まれているためと考えられた。また、術前腸閉塞や術前腸穿孔に関しては、本邦においてそれらを呈する症例数が少なく、再発リスク因子としての意義は乏しい可能性がある。

転移再発形式別の検討では、肝転移、肺転移、リンパ節転移、局所再発の全てにおいて線維性癌間質分類による再発の層別化が可能であった。線維性癌間質の分類は特定の再発形式のみに関連しているわけではなく、再発の臓器に関する特異性は認めなかった。

今回の検討では、Stage II 大腸癌において、線維性癌間質の形態分類により予後不良な集団を抽出することが可能であることが示された。このような症例では術後補助化学療法の施行が推奨されると考えられるがその妥当性に関しては、今後前向き研究で検証する必要がある。

5 小括

原発巣における線維性癌間質の形態学的分類は Stage II 大腸癌における再発リスクの層別化に有用であり、術後補助化学療法の適応基準として用いることができると考えられた。

第2節 N3大腸癌における線維性癌間質の形態学的分類を用いた予後の層別化

1 背景・目的

大腸癌研究会の2000年から2004年における全国登録によると、登録された初発大腸癌25,617例のうち42.9%にリンパ節転移が認められている。初発時転移臓器・部位の頻度を比較すると、肝(10.9%)、腹膜(4.5%)、肺(2.4%)であり、リンパ節は大腸癌における転移の最好発部位である[1]。

大腸癌のリンパ節の経路は主幹動脈の中枢側に向かうものが一般的であり、大腸癌取扱い規約では主幹動脈の根部のリンパ節(主リンパ節)を最中枢の領域リンパ節と規定し、腸管傍リンパ節や中間リンパ節と区別している[30]。さらに、腫瘍下縁が腹膜反転部より肛門側に位置する下部直腸癌においては、解剖学的に中枢側のみではなく内外腸骨動脈周囲や閉鎖腔などの側方向へのリンパ流が存在し[34, 35]、この領域リンパ節(側方リンパ節)への転移率が20.1%と少なからず認められる[1]。本邦では従来から積極的に側方リンパ節の郭清(側方郭清)を施行することにより局所再発の低減ならびに生命予後の改善に関する有用性が多数報告されており[36-40]、進行下部直腸癌においては、側方リンパ節も領域リンパ節とされている[30]。

大腸癌取扱い規約におけるN分類は、リンパ節転移個数と転移リンパ節部位によりN1~N3に分類されている。すなわち、病理学的に確認したリンパ節転移個数が3個以下をpN1、転移個数が4個以上の場合をpN2、リンパ節転移個数に関わらず主リンパ節または側方リンパ節に転移のあるものがpN3と規定されている[30]。

N3 大腸癌の頻度は全大腸癌の約 3.2%であり、遠隔転移を伴わないリンパ節転移陽性症例（Stage III）の約 8.0%と比較的まれであるが、5 年生存率は 60.6%と根治切除可能な大腸癌症例の中で最も予後不良である[1]。一般的には補助化学療法としては最も強力な 5-FU 系薬剤と oxaliplatin の併用が行われる集団であるが、新しい予後因子の臨床的意義を検討する上で重要な集団である。すなわち、これまで N3 症例は一律に化学療法を施行すべきと考えられてきた予後不良集団であるが、この集団においても予後層別化が可能となれば、補助化学療法の適応の観点からもリスクに応じたレジメンを選択することを可能とする因子の臨床的意義は高い。その観点から、本節では大腸癌 N3 症例において線維性癌間質の予後予測能を評価した。

2 対象・方法

1) 症例

1983 から 2009 年の間、防衛医科大学校病院で D3 郭清を伴う根治切除術を施行した N3 大腸癌症例 103 例（結腸癌 32 例、直腸癌 71 例）を対象とした。患者背景の詳細を表 5 に示す。N3 リンパ節転移の内訳は、主リンパ節転移のみが 40 例（38.8%）、側方リンパ節転移のみが 59 例（57.3%）、主リンパ節及び側方リンパ節の両方への転移が 4 例（3.9%）であった。このように、側方リンパ節転移症例の割合が高く、本検討症例の約 7 割が直腸及び肛門管を主占居部位とするものであった。

術後補助化学療法は、2000 年以前の症例では診療録が入手できず詳細不明であった 43 例を除くと、43 例（71.7%）に施行されており、そのレジメンのすべてが tegafur-uracil (UFT) +leucovorin (LV) もしくは 5-FU 系薬剤であった。術後補助化学療法非施行症例は 17 例（28.3%）であり、その理由は、年齢（5 例）、

患者の希望（5例）、併存疾患の存在（2例）、術後合併症の遷延（2例）等であった。

2) 方法

日常の病理診断用に作製された hematoxylin-eosin 染色標本を使用して検討を行った。第2章第1節での検討と同様に、漿膜下層を含む原発巣の全切片を観察し、腫瘍先進部の線維性癌間質を Mature、Intermediate、Immature の3群に分類した。

腫瘍径、肉眼型、腫瘍組織型、脈管侵襲等の大腸癌取扱い規約に定められている既存の因子に関しては病理診断報告等に記載されていたものを用い、簇出については大腸癌取扱い規約に基づく基準に従って新たに評価した[30]。

3) 統計学的手法

線維性癌間質とその他の臨床病理学的因子との関連は、 χ^2 検定にて検討し、母集団が少なく期待値が5未満となる場合には Fisher の直接確率法を用いた。また、各病理学的因子における OS と RFS の検討については、OS は全死亡を、RFS は再発および全死亡を event として Kaplan-Maier 法で算出し、log-rank test にて有意差を検定した。RFS に関しては、有意な再発危険因子を対象に Cox's proportional hazard model による多変量解析を行い、再発に関する独立性と寄与度を評価した。P 値が 0.05 以下を有意とし、各統計計算は JMP pro11.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

3 結果

1) 線維性癌間質の分類と臨床病理学的因子の関連

N3症例103例においてMatureが16例(15.5%)、Intermediateが48例(46.6%)、Immatureが39例(37.9%)と判定された。第2章第1節における対象母集団であるStage II大腸癌と比較するとImmatureの割合が著明に高率であった。

線維性癌間質と有意な相関を認めた臨床病理学的因子は、静脈侵襲($P = 0.006$)であった。その他の臨床病理学的因子との関連には統計学的有意差は認めなかった。(表6)

2) 線維性癌間質の分類別の予後

線維性癌間質の分類別のOSおよびRFSに関する生存曲線を図6に示す。5年RFSは、Mature群が86.7%、Intermediate群が27.2%、Immature群が10.3%であり、線維性癌間質の成熟度の低下に従って有意に予後不良であった($P < 0.0001$)。また、Immature群では1年RFSが56.4%と、Intermediate(67.8%)およびMature(100%)と比較して、早期に再発を来す症例が多かった。

一方、5年OSは、Matureが86.7%、Intermediateが37.0%、Immatureが22.0%であり、RFSと同様に線維性癌間質の分類により分別された($P = 0.0005$)。

3) N3大腸癌の再発危険因子

本検討の全対象症例中65例(63.1%)に再発を認めた。線維性癌間質を含む臨床病理学的因子別の5年RFSを表7に示す。単変量解析において、線維性癌間質($P < 0.0001$)、壁深達度($P = 0.007$)、静脈侵襲($P = 0.011$)、リンパ管侵襲($P = 0.001$)、簇出($P = 0.002$)リンパ節転移陽性個数($P = 0.008$)が再発と有意な相関を示した。上記6因子に関して、Cox's proportional hazard modelによる

多変量解析を施行したところ、線維性癌間質 (Intermediate/Immature)、リンパ節転移陽性個数 (≥ 12 個)、簇出 (G2,3) が独立した再発リスク因子であった (表 8)。線維性癌間質のハザード比は 8.93 (Mature vs. Intermediate/Immature) と最も高値であった。

4) 線維性癌間質の分類と再発形式の関連

N3 大腸癌における初発時再発臓器・部位別の 5 年 RFS は、肝が 63.8%、肺が 52.2%、リンパ節が 58.8%、局所が 58.3%であった。再発臓器・部位別に線維性癌間質の分類と再発の関連を検討したところ、肝、肺、リンパ節及び局所のいずれの再発形式においても線維性癌間質は再発率に関連し、Mature 症例に比較して Intermediate/Immature 症例で有意に高率であった (図 7)。第 2 章第 1 節の Stage II 大腸癌における検討と同様に、線維性癌間質の分類は特定の再発形式のみに関連しているわけではなく、再発の臓器・部位に関する特異性は認めなかった。

4 考察

本検討において、根治切除可能な大腸癌の中で最も予後不良とされる N3 大腸癌症例においても線維性癌間質分類による予後の層別化が可能であることが判明した。また、予後因子として広く認められている壁深達度、リンパ節転移個数、脈管侵襲、簇出等といった既存の臨床病理学的因子とともに多変量解析を用いて検討したところ、線維性癌間質の Intermediate/Immature はリンパ節転移陽性個数、簇出とともに独立した再発危険因子として選択され、RFS に関するハザード比は最も高かった。線維性癌間質の分類は既存の病理組織学的因子を凌駕する優れた予後指標因子であると考えられた。

線維性癌間質を用いた予後不良な集団の層別化に関しては、切除可能な肝転移を伴う Stage IV 大腸癌症例を対象とした Ueno らの検討においても示されており、線維性癌間質の分類別の 5 年全生存率は、Mature 58.9%、Intermediate 42.1%、Immature 26.7%であることが報告されている[15]。本研究では予後不良な症例群における線維性癌間質の評価の有用性を、N3 症例という従来の予後因子では均一な集団において改めて確認したこととなる。

リンパ節転移を有する Stage III 大腸癌においては、再発抑制および生命予後の改善を目的とした術後補助化学療法が推奨されている[1]。術後補助化学療法に用いられるレジメンとしては、経口薬である tegafur-uracil (UFT)+leucovorin (LV)、capecitabine (Cape)、tegafur-gimeracil-oteracil potassium (S-1)と点滴・静注薬を用いた 5-FU+l-leucovorin (l-LV)、FOLFOX、そして経口薬 (Cape) と点滴・静注薬 (oxaliplatin ; OX) を併用する CapeOX が挙げられる。海外において Stage III 大腸癌では oxaliplatin を基軸とした比較的強力なレジメン (FOLFOX または CapeOX) を用いることにより、oxaliplatin を含まない従来のレジメンに比較して、再発抑制及び生存期間に対する上乗せ効果が得られることがランダム化比較試験により示されている[2, 3, 5, 41-43]。一方で、oxaliplatin を使用するレジメンは Grade3 以上の末梢神経障害や下痢等の有害事象が高頻度に出現し、末梢神経障害については投薬終了後も持続する可能性があることから[5, 44]、その適応は慎重になされるべきと考えられている [1]。このような観点から、Stage III 大腸癌症例における再発リスクの絞り込みは、Stage II と同様に、副作用のリスク軽減及び医療経済の観点からも重要である。

本検討において、N3 大腸癌であっても、Mature 群では 5 年 RFS は 86.7%と良好であり、リンパ節転移を伴わない Stage II 症例とほぼ同等の治療成績であった [1]。Mature 群は N3 症例中の 15.5%のみと多くはないが、これらの症例では、

oxaliplatin を含まないレジメン選択の可能性が示唆された。一方で、Immature 群では 5 年 RFS が 10.3% と高率に再発を来していた。5 年 OS も 22.0% と Stage IV 大腸癌と同程度なほど不良であるため、術後補助化学療法は oxaliplatin を基軸とした強力なレジメンが妥当であると考えられた。検討対象期間の影響で oxaliplatin の使用症例がなく、今回の検討症例ではレジメン別の治療効果予測は評価不能であったが、今後は検討症例数を増やし、線維性癌間質の分類と化学療法の奏効率についてさらに検討する必要があると考えられた。

5 小括

原発巣の線維性癌間質の形態学的分類により N3 大腸癌症例においても再発リスクの層別化が可能であり、補助化学療法の適応選択に応用できる可能性が示唆された。

第3章 大腸癌における線維性癌間質と筋線維芽細胞の関連に関する検討

1 背景・目的

線維芽細胞は19世紀後半に同定された間質細胞で、細胞外マトリックスの蓄積、上皮分化や炎症の調節、創傷治癒に関与する[45, 46]。線維芽細胞が成長因子を分泌することで上皮細胞同士や間葉—上皮細胞間の接着を促し、ホメオスタシスを維持し、創傷の修復に重要な役割を担っているとされる[47, 48]。

一方、癌組織中に存在する線維芽細胞は腫瘍の浸潤・転移を促進させることが示されており、正常組織（非癌組織）と癌組織における fibroblasts の働きの違いは長年疑問とされてきた[17, 49, 50]。その疑問の解決の糸口として、癌組織における α -smooth-muscle actin (α -SMA) を発現マーカーとする筋線維芽細胞が注目されるようになった。筋線維芽細胞は活性化された線維芽細胞であり、癌間質に多様な影響を及ぼして腫瘍の浸潤・転移を惹起すると考えられている。また悪性腫瘍の増殖には癌細胞のみならず、癌間質も重要な役割を果たしていることを Kalluri らが報告し、desmoplastic reaction として認識されるようになった[17, 51, 52]。

癌組織の間質における筋線維芽細胞は、癌関連線維芽細胞(cancer-associated fibroblasts: CAFs)とも呼ばれ、乳癌領域においては間質の線維芽細胞の約80%が活性化した CAFs であるとの報告もある。皮膚や心筋等に存在する線維芽細胞とは異なり、 α -SMA を発現することが CAFs の特徴である[53-55]。大腸癌領域においても、Tsuji no らは筋線維芽細胞の個数が大腸癌の再発・予後と有意に相関することを報告している[56]。それ以後、筋線維芽細胞が大腸癌の予後因子として重要な役割を担っているという研究結果が相次いで報告され、近年では、癌

細胞を取り巻く筋線維芽細胞を標的とした治療戦略も注目されている[18, 57-63]。

このように癌の浸潤・転移のメカニズムに関わる癌微小環境(cancer microenvironment)を理解する上で、癌間質形成の key player となる筋線維芽細胞の機能解明は重要であるが、癌先進部の筋線維芽細胞に注目した研究は乏しい。第1章、第2章の検討結果から、大腸癌の腫瘍先進部では、各腫瘍に特異的な癌微小環境が構築され、この特性により腫瘍の浸潤・転移の程度が規定されるという仮説が成り立つ[17, 64]。我々は、これまでに腫瘍先進部における線維性癌間質の形態的特徴が大腸癌の予後をよく反映することを示してきたが、このような形態的特徴を示す背景には、筋線維芽細胞を主体とした癌微小環境の差が存在する可能性が考えられる。本章では、線維性癌間質の形態学的分類と筋線維芽細胞との関連を検討し、特徴的な線維性癌間質の形態が形成される要因として筋線維芽細胞が関与しているかを明らかにした。

2 対象・方法

1) 症例

2011年から2013年の間、防衛医科大学校病院でD3郭清を伴う根治切除術を施行したStage III大腸癌症例78例（結腸癌56例,直腸癌22例）を対象とした。対象症例の患者背景の詳細を表9に示す。

2) 方法

病理診断用として作成された既存のパラフィン包埋ブロックを使用して検討を行った。腫瘍の最大断面に含まれる代表的 1 断面を $4\mu\text{m}$ 厚に薄切し、マウス抗 α -SMA モノクローナル抗体 (clone1A4,dilution 1:2; R&D SYSTEMS, Minneapolis, USA) を用いた免疫組織化学染色を行った。まず、キシレンで脱パラフィン後、濃度勾配をつけたエタノール濃度を用いて、親水処理を行った。オートクレーブにて 121°C 15 分間の抗原賦活を施行し、5%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼを抑制した。非特異性反応の抑制には 10%ヤギ血清を使用した。抗 α -SMA 抗体を一次抗体とし、 4°C で一晩反応させた。二次抗体は Envision system anti-mouse (DAKO Cytomation) を使用し、室温で 2 時間反応させた。0.1%diaminobezidine (DAB) 溶液で 8 分間の発色を施した後に hematoxylin で核染色を施行した。

筋線維芽細胞は α -SMA で染色される細長い紡錘形の核を有する細胞として定義した (図 8 ; A)。抗 α -SMA 抗体で検出された筋線維芽細胞の発現の評価は腫瘍先進部における筋線維芽細胞の広がり (分布) と密度の 2 つの観点から行った。前者に関しては、腫瘍先進部領域の対物 20 倍視野にて抗 α -SMA 抗体で検出された筋線維芽細胞の存在領域が間質領域に占める割合が 50%以上のものを Diffuse type、50%未満のものを Focal type と判定した (図 8 ; B,C)。後者については、腫瘍先進部において筋線維芽細胞が密集する hot spot を 2 か所選定して、同部位の筋線維芽細胞の個数を対物 40 倍視野にて測定し、その平均値をもって評価した。筋線維芽細胞の密度の評価に関して、密度と再発有無についての ROC 曲線にて、感度- (1-特異度) が最大値となる筋線維芽細胞の個数を密度の cutoff 値として設定し、高密度群と低密度群の 2 群に分類した。得られた筋線維芽細

胞分布ならびに密度と線維性癌間質の形態学的分類との関連を検討した。また対物 40 倍視野における筋線維芽細胞の個数そのものでの比較も併せて検討した。

線維性癌間質の評価に関しては、第 2 章での検討と同様に、原発巣における漿膜下層を含む既存の hematoxylin-eosin 染色病理標本の全てを用いて腫瘍先進部を評価し、Mature、Intermediate、Immature の 3 つに分類した。

3) 統計学的手法

線維性癌間質と筋線維芽細胞との関連は、 χ^2 検定にて検討した。また、無再発生存率 (RFS) は再発および全死亡を event として Kaplan-Maier 法で算出し、log-rank test にて有意差を検定した。全ての検討において P 値が 0.05 以下を有意とした。各統計計算は JMP pro11.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

3 結果

Mature が 33 例 (42.3%)、Intermediate が 25 例 (32.1%)、Immature が 20 例 (25.6%) であった。筋線維芽細胞の分布は、Focal type が 38 例 (48.7%)、Diffuse type が 40 例 (51.3%) であった。また筋線維芽細胞の個数の密度については再発に関連する cutoff 値が 47 個であったため、46 個未満の症例を低密度群 (41 例、52.6%)、47 個以上の症例を高密度群 (37 例、47.4%) とした。

1) 筋線維芽細胞と臨床病理学的因子との関連

筋線維芽細胞分布と臨床病理学的因子との関連について検討したところ、既存の臨床病理学的因子と有意な相関は認められなかった (表 10)。

2) 線維性癌間質と筋線維芽細胞との関連

線維性癌間質と筋線維芽細胞の分布には有意な相関を認めた ($P < 0.0001$) (表 11 ; A)。すなわち Mature 群 (33 例) では、93.9%の症例が focal type であったのに対し、Immature 群では 20 例全例が diffuse type であった。

また、線維性癌間質と筋線維芽細胞の密度に関しても、成熟度の低下に従い筋線維芽細胞の密度が高度となり、高密度群の頻度は Mature 症例では 2/33 (6.1%) に対して Immature 症例では 19/20 (95.0%) と、Immature 症例で高密度群が有意に多く存在していた ($P < 0.0001$) (図 11 ; B)。筋線維芽細胞の個数そのものでの検討でも、Mature では中央値 8 個、Intermediate では中央値 55 個、Immature では中央値 72 個であり、線維性癌間質の成熟度が低下するに従って筋線維芽細胞の密度が有意に高くなる結果となった (図 9)。

3) 筋線維芽細胞と予後との関連

筋線維芽細胞の分布と RFS の関連について、筋線維芽細胞の分布が Diffuse type の 3 年 RFS (61.5%) は Focal type の 3 年 RFS (84.4%) と比較して有意に予後不良であった ($P = 0.016$) (図 10 ; A)。また、低密度群の 3 年 RFS が 83.2% であったのに対して、高密度群では 61.2% であり、筋線維芽細胞の密度が高い群で有意に予後不良であった ($P = 0.015$) (図 10 ; B)。

4 考察

Stage III 大腸癌症例において線維性癌間質の形態学的特徴は筋線維芽細胞の発現と有意な相関を有しており、筋線維芽細胞が癌間質の形態学的特徴や癌の悪性度に関与している可能性が示唆された。また、本検討では比較的主観的な指標である分布と、より客観的な指標である密度の両面から筋線維芽細胞の特徴を評価したが、いずれも予後と良く相関した。

近年、腫瘍先進部の癌微小環境において筋線維芽細胞が重要な役割を担っている可能性が報告されている[18, 58, 65, 66]。Ueno らは線維性癌間質の成熟度が低下するに従い簇出の程度が高度となり、癌間質内への T リンパ球の分布が減少し、筋線維芽細胞の分布が広範となることを報告している[16]。本検討においても筋線維芽細胞の分布および密度のいずれの評価においても線維性癌間質の成熟度の低下に従って筋線維芽細胞が有意に高度に存在していることが確認された。特に Immature 群では Ueno らの報告と同様に全例で筋線維芽細胞の分布が diffuse type であった。これは、線維性癌間質の形態学的特徴の形成、特に成熟度が低い間質の形成に筋線維芽細胞の増生が密接に関与していることを示す結果と考えられた。

このように本検討において線維性癌間質の形態的特徴と筋線維芽細胞の増生との強い相関が明らかとなったが、筋線維芽細胞がどのような機序で線維性癌間質に影響を及ぼしているのかという点については解明できていない。そこで、次章では、筋線維芽細胞から分泌され、大腸癌の予後に関連していると報告されている periostin に着目し、筋線維芽細胞と periostin との関連、periostin と線維性癌間質との関連を検討することで、筋線維芽細胞が線維性癌間質の形態学的特徴の形成に及ぼす機序の一端を探索することとした。

5 小括

筋線維芽細胞と線維性癌間質を含む各種臨床病理学的因子との関連について検討し、筋線維芽細胞は線維性癌間質の形態的特徴と有意な相関があることを明らかとした。すなわち、線維性癌間質の成熟度が低下するに従って、筋線維芽細胞の分布が広範囲となり密度が高度となった。

第4章 大腸癌腫瘍先進部における periostin の発現

第1節 免疫組織化学染色による periostin の発現と筋線維芽細胞および線維性癌間質との関連

1 背景・目的

悪性腫瘍における転移・浸潤能の獲得には、間質を含めた癌微小環境の構築の内容が重要とされていることはすでに述べてきたが、癌微小環境構築の key player である筋線維芽細胞から分泌される matricellular タンパク質、特に periostin が癌の生物学的悪性度と深く関連していることが最近明らかになってきた[20, 67]。periostin は osteoblast-specific factor 2 として 1993 年に同定され、骨髄における成長・変異、組織修復、間葉再構築、上皮間葉転換 (Epithelial-Mesenchymal Transition; EMT) に関与するとされている[19, 68]。これまで、膵癌、卵巣癌、前立腺癌、食道癌 (腺癌)、胃癌、乳癌、胆管癌等の固形癌腫において、CAFs をはじめとする間質細胞において periostin が発現しており、この程度がそれぞれの癌腫の悪性度と関連していることが示されている[69-76]。大腸癌領域においても periostin が上皮細胞に発現することが以前から知られていたが、最近では癌間質にも発現しており、癌間質における periostin の過剰発現が大腸癌の生物学的悪性度に関連することが報告されている[20, 77, 78]。

筋線維芽細胞から間質に分泌される periostin は間質の線維化を惹起すると報告されている[79](図 11;A)。大腸癌において、periostin は phosphoinositide 3-kinase (PI3K) / protein kinase B (AKT) シグナル伝達機構 を活性化させ、これにより転移能を促進させるとされている[69, 80] (図 11 ; B)。また、Ben らは、大腸癌症例における血清中の periostin 濃度の上昇は予後不良の指標になることを報告しており、濃度依存性に生物学的悪性度を惹起する可能性が示唆されている[81]。

近年、上皮性の癌細胞がより高い運動能を有する間葉系細胞の性質を有して高転移・浸潤能を獲得する現象である EMT が注目されている。Periostin は EMT にも関与し、癌細胞の migration を惹起したり、癌細胞の増殖を促進させるとの報告もある[79]。EMT は転移・浸潤のみならず、腫瘍増殖、血管新生、抗癌剤への抵抗性獲得といった癌の特性とも関連しており、この EMT を制御することが新しい癌治療戦略の 1 つとして重要であると考えられている。大腸癌における periostin の臨床病理学的特徴に関する検討はまだ僅かであり、その意義は十分に明らかにされておらず、特に periostin と線維性癌間質の形態学的特徴との関連を検討した報告はない。periostin が癌間質に及ぼす影響を明らかにすることは、癌微小環境の構築の機序や、EMT を含めた癌の浸潤・転移のメカニズムを解明する上で有意義と考えられる。

そこで本章では、免疫組織学的染色法を用いて大腸癌間質における periostin の発現を評価し、筋線維芽細胞および線維性癌間質との関連を検討するとともに、periostin の発現と大腸癌の生物学的悪性度との関連を評価した。

2 対象・方法

1) 対象

2011 年から 2013 年の間に防衛医科大学校病院で根治切除術を施行した Stage III 大腸癌症例 73 例（結腸 52 例、直腸 21 例）を対象とした（表 12）。

2) 方法

腫瘍組織の最大断面を含む代表的 1 切片（ホルマリン固定後パラフィン切片）を 4 μ m 厚に薄切し、50 倍希釈マウス抗 periostin モノクローナル抗体（clone2F7, 1

μ g/ml, LifeSpan BioSciences Inc, Seattle, USA) を用いた免疫組織化学染色を行った。手順は以下の通りである。キシレンで脱パラフィン後、濃度勾配をつけたエタノール濃度を用いて、親水処理を行った。オートクレーブにて 121°C, 15 分間の抗原賦活を施行し、5%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼを抑制した。非特異的反応の抑制には 10%ヤギ血清を使用した。抗 periostin 抗体を 150 倍希釈し、一次抗体とし、4°Cで一晩反応させた。二次抗体は Envision system anti-mouse (DAKO Cytomation) を使用し、室温で 2 時間反応させた。0.1% diaminobezidine (DAB) 溶液で 8 分間の発色を施した後に hematoxylin で核染色を施行した。

作製した標本を用いて腫瘍先進部における periostin の発現を評価した(図 12)。periostin の評価方法は、抗 periostin 抗体で染色される間質部が腫瘍先進部の間質全体に占める割合を評価し、50%を cutoff 値として、periostin 陽性群と陰性群の 2 群に分類した。periostin の発現と筋線維芽細胞および線維性癌間質の形態学的分類との関連を検討し、さらに periostin 発現と再発との関連についても検討した。

線維性間質の形態分類は第 2 章にならって、筋線維芽細胞の免疫組織化学染色および分布・密度分類、個数測定法は第 3 章にならってそれぞれ行った。

3) 統計学的手法

periostin と線維性癌間質の形態分類および筋線維芽細胞との関連は、 χ^2 検定にて検討した。RFS は、再発および全死亡を event として Kaplan-Maier 法で算出し、log-rank test にて有意差を検定した。P 値が 0.05 以下を有意とした。各統計計算は JMP pro11.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

3 結果

1) periostin と臨床病理学的因子との関連

periostin と既存の臨床病理学的因子との関連を検討した結果、相関する因子は認めなかった (表 13)。

2) periostin の発現と筋線維芽細胞との関連

筋線維芽細胞の分布の関連に関して、diffuse type (35 例) において periostin 陽性率は 88.6%であり、focal type (38 例) の 28.9%に比較して有意に高率であった ($P < 0.0001$) (表 14 ; A)。一方、筋線維芽細胞の密度についても、periostin 陽性率は低密度群 (14 例) の 34.1%と比べて高密度群 (28 例) で 87.5%と有意に高率であった。 ($P < 0.0001$) (表 14 ; B)。

periostin 発現と筋線維芽細胞個数との関連についても、periostin 陰性 (中央値 10 個) に比べ、periostin 陽性 (中央値 60 個) で有意に筋線維芽細胞の個数が多かった ($P < 0.0001$) (図 13)。

3) periostin の発現と線維性癌間質の分類との関連

Immature 群 (18 例) では全例 periostin が陽性であった。一方、Intermediate 群では 68.2%、Mature 群で 27.3%であり、線維性癌間質の成熟度が高くなるにしたがって periostin 陽性率は有意に低くなった ($P < 0.0001$) (表 15)。

4) periostin 発現と予後

periostin 陰性例の 3 年 RFS は 93.4%であったのに対し、periostin 陽性例では 55.1%と有意に予後不良であった ($P=0.007$) (図 14)。初発時再発臓器・部位別

に periostin 発現と再発の関連を検討したところ、肺転移以外の再発臓器・部位において有意な相関を認めた（肝転移； $P = 0.03$ 、リンパ節転移； $P = 0.02$ 、局所再発； $P = 0.02$ ）。肺転移に関しても相関する傾向を認めた（ $P = 0.07$ ）。

4 考察

培養細胞を用いて periostin を検討した Xu らは、筋線維芽細胞から periostin が分泌されており、大腸癌細胞株との共培養にて periostin が高発現するとともに癌細胞の細胞数増加や遊走能の獲得を認めたと報告している[20]。本検討では筋線維芽細胞の細胞数と periostin の発現が有意に相関し、腫瘍先進部の癌間質における periostin の発現は筋線維芽細胞の多寡に依存している可能性が示唆された。

また、periostin の発現が大腸癌の予後を反映するとの報告があるが[20, 82]、本検討においても periostin 陽性症例は再発率が高く予後不良な集団であった。periostin の発現は大腸癌の生物学的悪性度に影響を与え、より強力な転移能を獲得する原因となっている可能性があると考えられる。

本検討では、periostin の発現は他の既存の臨床病理学的因子と関連を有さず、線維性癌間質ならびに筋線維芽細胞とのみ有意な相関を認めた。これは、筋線維芽細胞に関連する因子が、一般臨床で汎用されている腫瘍悪性度因子とは別の機序で腫瘍悪性度を規定している可能性を示唆するものであり興味深い。

これまで、periostin の癌細胞浸潤・転移の促進による生物学的悪性度への関与を論じた報告は複数あるが[20, 80, 82]、線維性間質の形態学的特徴との関連に着目した報告はない。腫瘍先進部においても、線維性癌間質の形態学的特徴には heterogeneity がある。periostin の発現と線維性癌間質の形態との直接的な関連を

裏付けるためには、異なる形態学的特徴を示す癌間質部位での **periostin** の発現の差を検討する必要があると考えられる。

5 小括

periostin の発現は筋線維芽細胞分布が **focal type** に比較して、**diffuse type** で有意に高度であった。また線維性癌間質とも有意な相関を認め、線維性癌間質の成熟度が低下するに従って **periostin** 陽性率が高率であった。さらに、3年無再発生存率は、**periostin** 陰性例に比べ **periostin** 陽性例で有意に不良であった。

第2節 periostin と線維性癌間質との関連

1 背景・目的

大腸癌において periostin 発現の予後への影響を検討したこれまでの報告では、periostin は主に免疫組織化学染色法により評価されている[20]。本研究でも第4章第1節では免疫組織化学染色法において periostin を評価し、この発現の有無は線維性癌間質の形態分類、筋線維芽細胞の分布や密度、臨床的予後転帰と有意な関連があることを確認した。

大腸癌組織において癌組織が部位により不均一であるのと同様に、線維性癌間質の形態にも heterogeneity が存在するが、これは浸潤先進部に限局しても同様である。線維性癌間質の形態分類の判定に関しても、同一症例内で異なる線維性癌間質のタイプが浸潤先進部に混在している場合には、その症例における最も成熟度の低い部位の所見をもって判定したことは第2章で述べた通りである。本検討では、異なる線維性癌間質を有する症例において、各タイプの部位より癌間質標本を選択的に採取し、mRNA レベルまたはタンパク質のレベルで periostin 発現の差異の有無について検討し、periostin と線維性癌間質の形態との関連をより深く検討した。

2 対象・方法

1) 対象

2014年から2016年の間、防衛医科大学校病院で手術を施行した大腸癌41例（男性18例、女性23例）を対象とした。症例の内訳の詳細を表16に示す。本検討では術前補助化学療法を施行した症例は除外した。術前にすべての対象患

者に対し、防衛医科大学校倫理委員会に承認を得た文書により説明を行い、同意を取得した。

2) マニュアルダイセクション

手術標本の摘出直後に切り出しされた正常粘膜及び腫瘍部分を含む一断面分の標本を Tissue Tek OCT Compound™ (SAKURA Tek、Tokyo、Japan)を用いて包埋し、液体窒素で急速凍結を施行した後、-80℃に保存した。保存した標本から 10µm 厚の連続凍結切片を作製し、70%エタノールにて 3 分間固定を行った。RNase free 水で洗浄した後に hematoxylin 液で 30 秒染色を行い、切片を風乾した。顕鏡下にて 26G 注射針を用いて正常粘膜、腫瘍中央部癌組織、腫瘍先進部癌組織及び腫瘍先進部間質組織をそれぞれ選択的に採取した (図 15)。また、腫瘍先進部間質組織については、同一症例内に形態分類的に異なる線維性癌間質を有する場合は、連続した薄切標本を用いて hematoxylin-eosin (HE) 標本を作製し、HE 標本を参照して間質分類別に選択的にサンプルを採取した。それぞれの検体を mRNA 発現解析用(リアルタイム RT-PCR 法)、タンパク質発現解析用(western blotting 法および ELISA 法) に各々分割して保存した。リアルタイム RT-PCR 法では 1 症例につき 10 枚、western blotting 法および ELISA 法では 15 枚の連続凍結切片のプレパラートを用いた。

3) リアルタイム RT-PCR 法による periostin の発現検討

ア) total RNA の抽出及び cDNA 合成

マニュアルダイセクションで選択的に採取したサンプルについて NucleoSpin RNA™ (TAKARA Bio Inc.、Otsu、Japan)を用いて total RNA の抽出を行った。単

鎖 cDNA の合成には上述の方法で抽出した total RNA を鋳型として Prime Script RT-reagent KitTM (Takara Bio Inc.)を用いて行った。単鎖 cDNA の合成には前述の方法で抽出した total RNA を鋳型として Prime Script RT-reagent KitTM (Takara Bio Inc.)を用いた。

イ) リアルタイム RT-PCR

cDNA を鋳型として SYBR Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc.) を用いて periostin の mRNA 発現を半定量的に解析した。リアルタイム RT-PCR に用いたプライマー (Perfect Real Time Support SystemTM、Takara Bio Inc.) と反応条件は下記のとおりである。

periostin : (forward) 5'-AAATCCCATCACCATCTTCC-3'
(reverse) 5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'

PCR プロトコール : (初期変性) 95°C、30 秒。

(アニーリング・伸長) 95°C、5 秒 → 60°C、30 秒 (40 サイクル)

全ての反応は二重反復試験で施行し、平均値をもって結果とした。PCR 反応終了後、融解曲線分析にて増幅産物の特異性を確認した。mRNA の相対的発現量の評価は内因性標準遺伝子である glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

(GAPDH) により発現を補正し、Multiplate RQTM (Takara Bio Inc.)ソフトウェアを用いて $\Delta\Delta$ Ct 法にて行った。

4) ウエスタンブロッティング法による periostin の発現検討

マニュアルダイセクションで選択的に採取したサンプルに SDS-sample buffer を加え Bioruptor (BM Equipment Co., Ltd., Tokyo, Japan)で超音波処理し、12,000rpm で 10 分間遠心した後、100°Cで 10 分間インキュベートした。試料中のタンパク質を SDS-PAGE(10%アクリルアミドゲル)により分離し PVDF 膜に転写した。PVDF 膜を Block-Ace (DS Pharma Biomedical Co, Ltd, Osaka, Japan)と 2 時間室温でインキュベート後、マウス抗 periostin モノクローナル抗体 (clone 2F7, 1µg/ml, LifeSpan BioSciences Inc., Seattle, USA) もしくはマウス・モノクローナル GAPDH 抗体 (0.2 µg/ml, Abcam, Cambridge, UK) と 4°Cで一晩インキュベートした。一次抗体と反応後、0.1%の tween-20 を含む PBS(PBS-T)で 10 分間、3 回洗浄後、抗マウス HRP 抗体 (DAKO JAPAN, Tokyo, Japan)と室温で 2 時間反応させた。免疫反応性のバンドは、ECL 試薬 (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA)と反応させ、LAS4000 (GE Healthcare Japan, Tokyo, Japan)により検出した。タンパク質の発現変化は、Image J (<https://imagej.nih.gov/ij/>)で解析した。

5) ELISA 法による periostin タンパク質の定量

マニュアルダイセクションで選択的に採取したサンプルを TNCB バッファー (10mM Tris-HCl, 150mM NaCl, 10mM CaCl₂, 0.1% NP-40, pH7.5)で可溶化し、超音波処理を行った。タンパクライセートを 12000rpm で 10 分間遠心した後に、Nanodorop を用いて総タンパクを定量した。periostin の定量は、periostin ELISA キット (BI-20433, Biomedica, S.A., Vienna, Austria) を用いて行い、キットの推奨手順に従って行い、特異的に periostin と結合する抗 periostin 抗体がコーティングされた 96 well-plate でサンプルをインキュベートするサンドイッチ法で定量した。Positive control は、添付されている精製リコンビナント periostin を用いた。

発色強度は、iMark microplate reader (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて行った。Positive control の吸光度を標準曲線とし、サンプル中の periostin 濃度を決定した。

6) 統計学的手法

正常粘膜、腫瘍中央部、先進部癌部、先進部間質それぞれの mRNA 発現量についての評価はノンパラメトリック検定を用いて行い、発現量の差異の有意差が存在するものを発現増強（または発現減弱）とした。

線維性癌間質の形態分類別の mRNA 発現量の差異に関する検討には Mann-Whitney *U* 検定を使用した。さらに同一症例内の先進部間質部における異なる線維性癌間質成熟度の部位別の periostin の mRNA 発現量の差異の有無については Wilcoxon 符号順位検定を用いた。全ての解析で *P* 値が 0.05 以下を有意とし、各統計計算は JMP pro11.0 (SAS Institute, Cary, NC) を用いて行った。

3 結果

1) 局在別での periostin の発現

正常粘膜組織を control として、腫瘍中央部癌部、腫瘍先進部癌部、腫瘍先進部間質部における periostin mRNA 発現強度の比を求めた (図 16)。

periostin mRNA は癌部においては、腫瘍中央部に比較して腫瘍先進部で発現が増強している傾向を認めたが、腫瘍先進部間質部において最も強い発現を認めた (各々 $P < 0.0005$) (図 16)。

Western blotting 法により、periostin のタンパク質の発現量を、正常粘膜組織、腫瘍先進部癌部および腫瘍先進部間質部の間で比較したところ、正常粘膜組織

および腫瘍先進部癌部に比較して、腫瘍先進部間質部で periostin タンパク質の発現は強く、mRNA 発現と同様の結果であった (図 17)。

2) 線維性癌間質分類別の periostin の発現

腫瘍先進部間質組織について線維性癌間質の形態分類別に検討したところ、線維性癌間質の成熟度が低い間質を有する腫瘍ほど、腫瘍中央部癌部に対する腫瘍先進部間質部での periostin mRNA の発現は高度であった。特に、Mature 群では腫瘍中央部癌部に比較して腫瘍先進部間質部では中央値で 4.7 倍の増強のみであったのに対し、Immature 間質では、中央値で 57.8 倍の発現増強を認め、有意に periostin mRNA が高発現していた (図 18) (Mature vs. Immature; $P < 0.005$)。

同様に、ELISA 法による periostin のタンパク質発現に関しても、Mature 群に比較して Intermediate 群、Immature 群で periostin の有意な発現増強を認めた (Mature vs. Immature : $P < 0.01$) (図 19)。

3) 同一症例内における線維性癌間質の形態分類別の periostin の発現

同一症例内で Mature な間質と Immature な間質を有する 11 例を検討したところ、periostin mRNA の発現は全症例で Mature な間質に比較して、Immature な間質で高度であった (中央値 82.1 倍 (6–946 倍)、 $P < 0.0001$) (図 20)。

ELISA 法による periostin タンパク質の発現についても同様に、Mature な間質に比較して、Immature な間質において有意に発現が増強していた ($P < 0.05$) (図 21)。

4 考察

腫瘍内の部位別の検討にて、periostin は大腸癌組織の中で腫瘍先進部の線維性間質組織において最も強く発現していることが明らかとなった。これまで免疫組織学的染色法での検討にて同様の結果が報告されているが[20]、mRNA やタンパク質レベルで腫瘍先進部の癌間質における periostin 発現の増強を明らかにした意義は大きいと考える。

さらに線維性癌間質別での検討では、成熟度の低い群ほど、periostin mRNA の発現が有意に増強しており、Mature 群に比較して Immature 群では発現が 10 倍以上増強していた。ELISA 法によるタンパクレベルでの解析でも、Mature 群に比べ、Immature 群では 6 倍程度 periostin が高発現しており、成熟度の低い線維性癌間質では periostin が過剰発現していることが示された。この過剰発現の現象について確証を得るため、同一症例内に Mature および Immature の両方の間質を有する症例において、線維性癌間質分類別に periostin の発現の差異を検討した結果、やはり periostin の mRNA は Mature な部位に比べ Immature な部位では 80 倍程度、ELISA 法によるタンパク質発現でも Mature な部位に比較して Immature な部位では 4 倍程度高発現しており、periostin 発現が線維性癌間質の形態学的特徴に関連していることを裏付ける結果となった。

今回の検討により、線維性癌間質を形態学的に特徴づける要因として periostin が寄与している可能性が示された。Immature な間質が治癒切除後の再発に深く関連する因子であるとの臨床的な検討結果と併せ考えると、periostin は癌の転移・浸潤能を惹起する癌微小環境の形成に重要な役割を担っており、将来の新しい癌治療戦略の標的因子となる可能性を秘めている分子であると考えられた。

5 小括

periostin は大腸癌の腫瘍先進部の間質に高発現しており、筋線維芽細胞の増生が高度な部分で発現が高度であった。更に、腫瘍先進部の線維性癌間質の形態学的分類と強く相関していた。特に、成熟度の低い線維性癌間質において過剰発現していることが mRNA レベルおよびタンパク質レベルで確認されたことから、periostin 発現の多寡が線維性癌間質の形態学的特徴に関連していると考えられた。

第5章 総括

本研究では、大腸癌の個別化治療を目指して、腫瘍先進部における線維性癌間質の形態分類の臨床的意義について検証した。また、癌間質の形成に重要な役割を果たしている筋線維芽細胞および *periostin* に着目し、線維性癌間質の形態学的特徴を規定している因子について分子生物学的手法を用いて検討した。

まず、根治切除可能な進行大腸癌の中で最も予後良好とされる Stage II 大腸癌症例において、線維性癌間質の評価による予後の層別化が可能であった。線維性癌間質は大腸癌取扱い規約に掲載されている従来の臨床病理学的因子を凌駕する再発の高リスク要因であった。線維性癌間質の分類を用いることで、リンパ節転移を有する Stage IIIa 症例よりも予後不良な集団を抽出可能であり、このような症例においては、術後補助化学療法施行を検討すべきと考えられた。

また、根治切除可能な大腸癌の中で最も予後不良とされる N3 大腸癌症例を対象として同様の予後解析を行った。その結果、線維性癌間質の評価により再発リスクの層別化が可能であることが判明した。N3 大腸癌症例においても、術後補助化学療法が必須とされていない Stage II 大腸癌と同等の予後を示す集団やより強力な術後補助化学療法の適応となりうる予後不良な集団を抽出することが可能であった。

Stage II 症例、N3 症例共に、解剖学的な癌進展程度からは *homogenous* とみなされる集団であるが、このような母集団においても予後を効率的に分別することができる線維性癌間質の形態分類は、臨床的に価値のある病理学的指標になると考えられる

次に大腸癌の線維性癌間質の形態的分類を特徴づける因子の背景に、筋線維芽細胞を主体とした癌微小環境が存在すると考え、まず線維性癌間質の形態学的分類と筋線維芽細胞との相関を検討し、両者に密接な関連があることを明らかにした。

更に筋線維芽細胞から分泌される **periostin** に着目し、免疫組織学的染色法を用いた検討の結果、**periostin** の発現と線維性癌間質の分類および筋線維芽細胞の分布等に有意な相関を認めることを確認した。**periostin** 陽性症例は再発率が高く予後不良であったことから、**periostin** の発現が大腸癌の生物学的悪性度の増強に影響を与えている可能性が示唆された。

また mRNA レベルとタンパク質のレベルでも **periostin** が線維性癌間質の形態と密接に相関していることが示された。**periostin** は大腸癌組織の中で腫瘍先進部の間質組織において最も発現していることが mRNA およびタンパク質レベルで示されたが、特に **Immature** な間質を有する症例で有意に増強していることが判明した。同一症例内に **Mature** および **Immature** の両方の間質を有する症例での検討でも、**mature** な部位に比べ **Immature** な部位で **periostin** が高発現しており、**periostin** の発現が線維性癌間質の形態学的特徴に関連していることを裏付ける結果となった。今後は、**Stage** 別での検討を行うことで、個別化治療へ反映させていくことが期待される。また分子生物学的アプローチにより **periostin** 発現が線維性癌間質の形態学的特徴に及ぼす影響についてより詳細なメカニズムの解明が望まれる。

以上の検討結果より、大腸癌腫瘍先進部における線維性癌間質の形態分類は予後を的確に層別化でき、大腸癌症例における個別化治療の確立に寄与しうると考えられた。また、筋線維芽細胞及び **periostin** が線維性癌間質の形態学的特

徴に強く関連しており、これらが大腸癌の臨床転帰を規定する癌微小環境を形成する上で非常に重要な役割を担っている可能性が示唆された。

第6章 結論

大腸癌原発巣における腫瘍先進部の線維性癌間質に関して以下のことを明らかにした。

1) 原発巣の線維性癌間質の形態学的分類による評価により Stage II 大腸癌における再発リスクの層別化が可能であり、術後補助化学療法の適応基準として用いることができる可能性が窺われた。線維性癌間質は独立した再発の危険因子であり、そのハザード比は 2.63 と既存の予後因子のいずれより高値であった。

2) この分類は N3 大腸癌症例における再発リスクの層別化にも有用であり、治療選択に応用できる可能性が示唆された。線維性癌間質は独立した再発危険因子であり、そのオッズ比は 8.93 と極めて高値であった。

3) 腫瘍先進部における線維性癌間質にみられた筋線維芽細胞の分布と密度は既存の臨床病理学的因子との関連は乏しく、線維性癌間質の形態学的分類とのみ有意な相関を認めた。すなわち、線維性癌間質の成熟度が低下するに従って筋線維芽細胞の分布や密度は高度となった。

4) periostin 発現は筋線維芽細胞の分布・密度と有意な相関を示した。すなわち、筋線維芽細胞分布が広範囲な腫瘍で periostin 陽性率が有意に高かった。また線維性癌間質の形態学的分類とも有意な相関を認め、線維性癌間質の成熟度が低下するにしたがって有意に periostin 陽性率が高率であった。さらに、periostin 陽性例では陰性例に比べ無再発生存率は有意に不良であった。

5) periostin の mRNA およびタンパク質発現は大腸癌の腫瘍先進部の間質に高発現しており、腫瘍先進部の線維性癌間質の形態学的分類および筋線維芽細

胞の分布・密度と強く相関していた。特に、成熟度の低い線維性癌間質において過剰発現していることが確認され、periostin 発現の多寡が線維性癌間質の形態学的特徴に関連していることが裏付けられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導、ご校閲を賜りました防衛医科大学校外科学講座の上野秀樹教授に甚大なる感謝の意を表します。また、終始ご教示を頂きました防衛医科大学校外科学講座の梶原由規講師ならびに望月早月助教両氏に深く感謝いたしますとともに、ご協力を頂きました講座の諸先生方に感謝します。

本研究の主旨は、以下の学会において発表した。

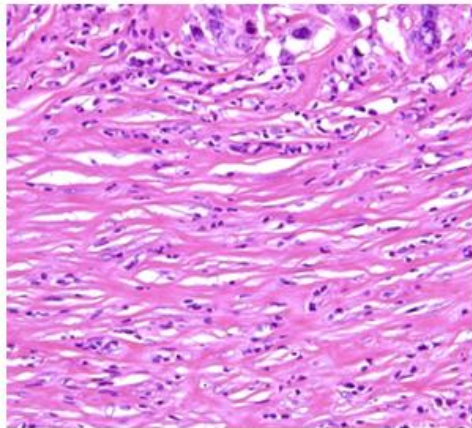
- ・ 第 69 回日本大腸肛門病学会学術集会（2014 年 11 月、横浜）
- ・ 第 69 回日本消化器外科学会総会（2014 年 7 月、郡山）
- ・ 第 52 回埼玉県医学会総会（2015 年 2 月、さいたま）
- ・ 第 115 回日本外科学会学術集会（2015 年 4 月、名古屋）
- ・ 第 70 回日本消化器外科学会総会（2015 年 7 月、浜松）
- ・ European Society of Coloproctology (ESCP) 10th Scientific and Annual meeting（2015 年 9 月、ダブリン）
- ・ 第 23 回 Japan Digestive Disease Week (JDDW)（2015 年 10 月、東京）
- ・ 第 70 回日本大腸肛門病学会学術集会（2015 年 11 月、名古屋）

- ・ 第 116 回日本外科学会学術集会（2016 年 4 月、大阪）
- ・ 第 71 回日本消化器外科学会総会（2016 年 7 月、徳島）
- ・ 第 24 回 Japan Digestive Disease Week (JDDW)（2016 年 11 月、神戸）
- ・ 第 71 回日本大腸肛門病学会学術集会（2016 年 11 月、伊勢）
- ・ 第 49 回日本結合組織学会学術集会（2017 年 6 月、津）
- ・ 第 72 回日本消化器外科学会総会（2017 年 7 月、金沢）

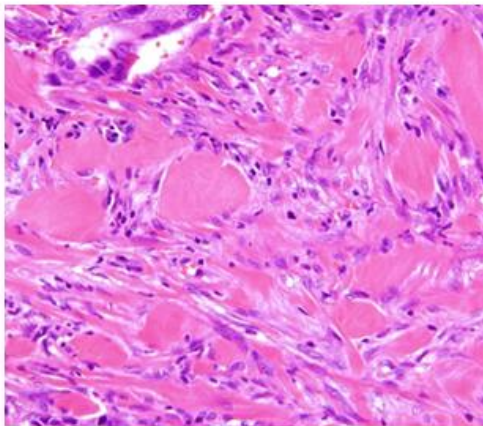
表 1. Stage II 大腸癌 490 例の患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)
性別	男性	302 (61.6)
	女性	188 (38.8)
年齢 (歳)		66.5 (26-96) ^a
腫瘍主占居部位	結腸	381 (77.8)
	直腸	109 (22.2)
壁深達度	pT3	442 (90.2)
	pT4a	23 (4.7)
	pT4b	25 (5.1)
リンパ節検索個数		22.7 (2-119) ^a
主組織型	高分化腺癌	222 (45.3)
	中分化腺癌	234 (47.8)
	その他	34 (6.9)
腫瘍肉眼型	1 型	33 (6.7)
	2 型	409 (83.5)
	3 型	32 (6.5)
	4 型	3 (0.6)
	5 型	13 (2.7)
腫瘍最大径 (mm)		56.0 (10-200) ^a
術前 CEA 値 (ng/ml)		8.5 (0.5-328) ^a
術前腸穿孔	あり	6 (1.2)
	なし	484 (98.8)
術前腸閉塞	あり	19 (3.9)
	なし	471 (96.1)

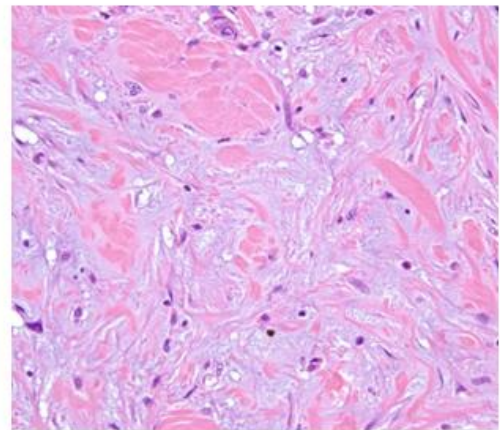
^a 平均値 (範囲)



A



B



C

写真はいずれも対物40倍

図1 線維性癌間質の形態学的分類

A : Mature

線維方向が一定できめ細かく長い成熟した膠原線維が極性を維持して多層性に配列する

B : Intermediate

間質に好酸性の断片化した幅の広い膠原線維(“keloid-like” collagen)が混在する

C : Immature

両染色あるいは好塩基性の細胞外基質が増量し、膠原線維が不規則に錯綜したmyxoid間質を認める

表 2. Stage II 症例における臨床病理学的因子と線維性癌間質との関連

因子	カテゴリー	症例数 (%)			P 値 ^a
		Mature	Intermediate	Immature	
性別	男性	159 (60.5)	108 (62.4)	35 (64.8)	N.S.
	女性	104 (39.5)	65 (37.6)	19 (35.2)	
年齢 (歳)	< 65	113 (42.7)	65 (37.6)	22 (40.7)	N.S.
	≥ 65	150 (57.3)	108 (62.4)	32 (59.3)	
腫瘍占居部位	結腸	218 (82.9)	126 (72.8)	37 (68.5)	<u>0.011</u>
	直腸	45 (17.1)	47 (27.2)	17 (31.5)	
壁深達度	pT3	245 (93.2)	155 (89.6)	42 (77.8)	<u>0.001</u>
	pT4	18 (6.8)	18 (10.4)	12 (22.2)	
リンパ節検索個数 (個)	< 12	59 (22.4)	53 (30.6)	17 (31.4)	N.S.
	≥ 12	204 (77.6)	120 (69.4)	37 (68.6)	
主組織型	高・中分化腺癌	247 (93.9)	157 (90.8)	52 (96.3)	N.S. ^c
	その他	16 (6.1)	16 (9.2)	2 (3.7)	
腫瘍肉眼型 (型)	1-2	238 (90.5)	155 (89.6)	49 (90.7)	N.S.
	3-5	25 (9.5)	18 (10.4)	5 (9.3)	
リンパ管侵襲	ly0/1	247 (93.9)	156 (90.2)	43 (76.2)	<u>0.008</u>
	ly2/3	16 (6.1)	17 (9.8)	11 (23.8)	
静脈侵襲	v0/1	222 (84.4)	106 (61.3)	32 (59.3)	<u><0.0001</u>
	v2/3	41 (15.6)	67 (38.7)	22 (40.7)	
簇出	G1	163 (62.0)	61 (35.3)	9 (16.7)	<u><0.0001</u>
	G2/3	100 (38.0)	112 (64.7)	45 (83.3)	
腫瘍最大径 (cm) ^{b1}	< 5	106 (41.7)	78 (47.0)	18 (36.0)	N.S.
	≥ 5	148 (58.3)	88 (53.0)	32 (64.0)	
術前 CEA 値 (ng/ml) ^{b2}	< 5.3	154 (76.2)	92 (64.3)	24 (57.1)	<u>0.011</u>
	≥ 5.3	48 (23.8)	51 (35.7)	18 (42.9)	

^a χ^2 test

^{b1} データ欠損を除く 470 例で検討、^{b2} データ欠損を除く 387 例で検討

^c Fisher の直接確率法による検定

N.S., no significant difference

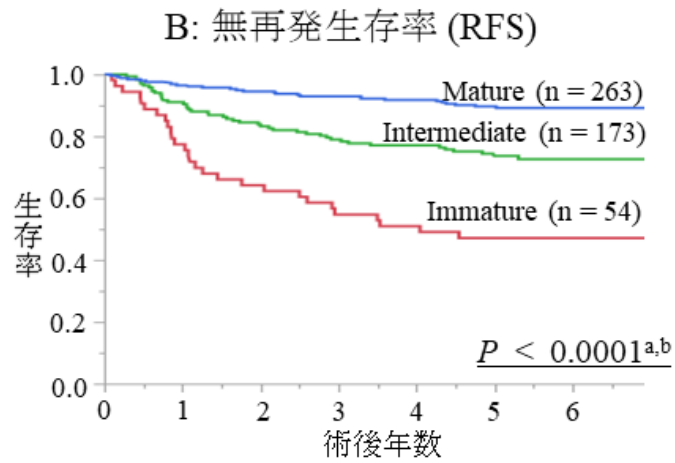
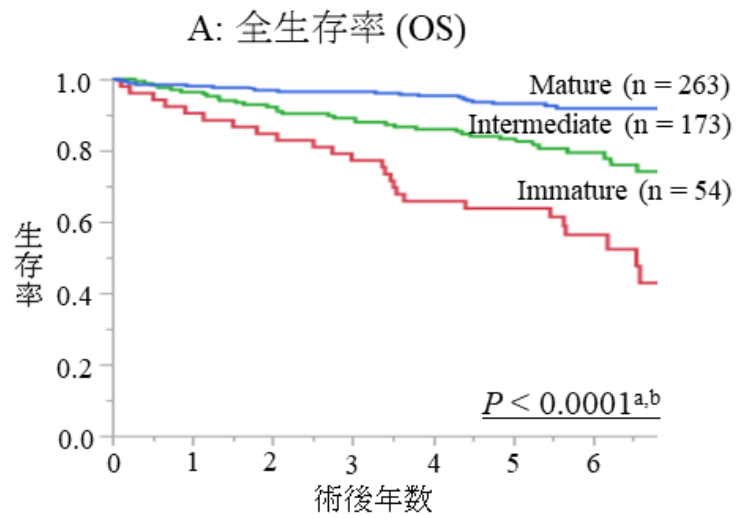


図2. Stage II大腸癌における線維性癌間質の分類別の生存率

^a log-rank test、^b Mature vs. Intermediate / Immature

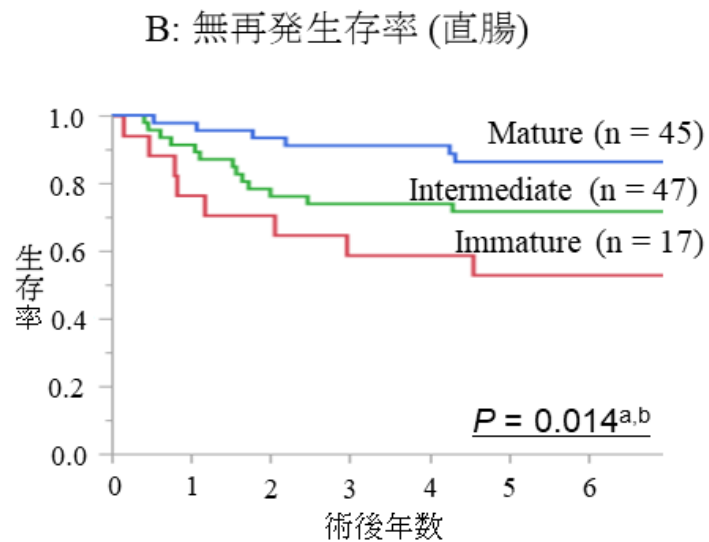
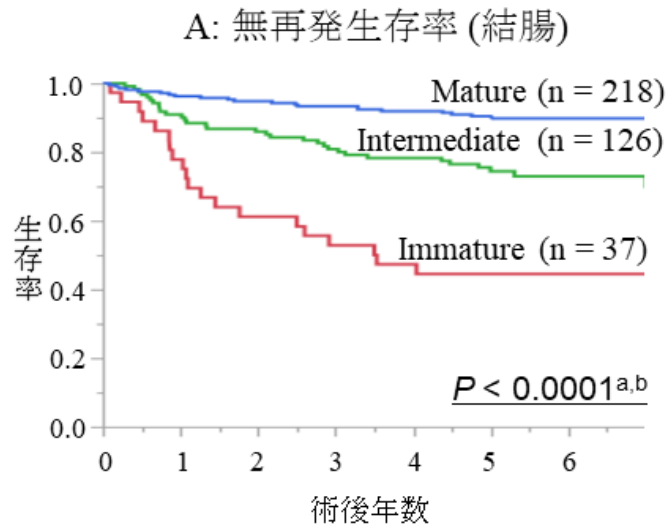


図3. Stage II大腸癌における腫瘍局在別生存率

^a log-rank test、^b Mature vs. Immature

表 3. Stage II 症例における臨床病理学的因子別の無再発生存率

因子	カテゴリー	症例数	5yr-RFS ^b		P 値 ^a
性別	男性	302	75.8%	<u>0.022</u>	
	女性	188	85.1%		
年齢 (歳)	< 65	200	83.2%	N.S.	
	≥ 65	290	76.7%		
腫瘍占居部位	結腸	381	80.8%	N.S.	
	直腸	109	74.7%		
壁深達度	pT3	442	80.3%	N.S.	
	pT4	48	73.4%		
リンパ節検索個数 (個)	< 12	129	69.2%	<u>0.0004</u>	
	≥ 12	361	83.0%		
主組織型	高・中分化腺癌	456	78.8%	N.S.	
	その他	34	90.9%		
腫瘍肉眼型 (型)	1-2	442	80.6%	N.S.	
	3-5	48	68.5%		
リンパ管侵襲	ly0/1	446	80.5%	<u>0.046</u>	
	ly2/3	44	67.9%		
静脈侵襲	v0/1	360	82.1%	<u>0.014</u>	
	v2/3	130	71.7%		
簇出	G1	233	84.7%	<u>0.011</u>	
	G2/3	257	74.7%		
腫瘍最大径 (cm)	< 5	202	77.1%	N.S.	
	≥ 5	268	84.0%		
術前腸穿孔	あり	6	66.7%	N.S.	
	なし	484	79.8%		
術前腸閉塞	あり	19	60.6%	N.S.	
	なし	471	80.0%		
線維性癌間質	Mature	263	89.7%	<u><0.0001</u>	
	Intermediate	173	73.7%		
	Immature	54	47.2%		

^alog-rank test ^b 5yr-RSF : 5 年無再発生存率

N.S., no significant difference

表 4. Stage II 症例における多変量解析による再発リスク因子

因子	カテゴリー	Hazard ratio	95% CI	P 値 ^a
線維性癌間質	Mature	1	2.01-5.18	<u>< 0.0001</u>
	Intermediate /Immature	3.19		
リンパ節検索個数 (個)	≥ 12	1	1.15-2.58	<u>0.009</u>
	< 12	1.73		
性別	女性	1	1.05-2.52	<u>0.027</u>
	男性	1.61		
リンパ管侵襲	ly0/1	1	0.72-2.33	N.S.
	ly2/3	1.34		
静脈侵襲	v0/1	1	0.79-1.84	N.S.
	v2/3	1.21		
簇出	G1	1	0.70-1.68	N.S.
	G2/3	1.08		

^a Cox's proportional hazard model

CI, confidence interval, N.S., no significant difference

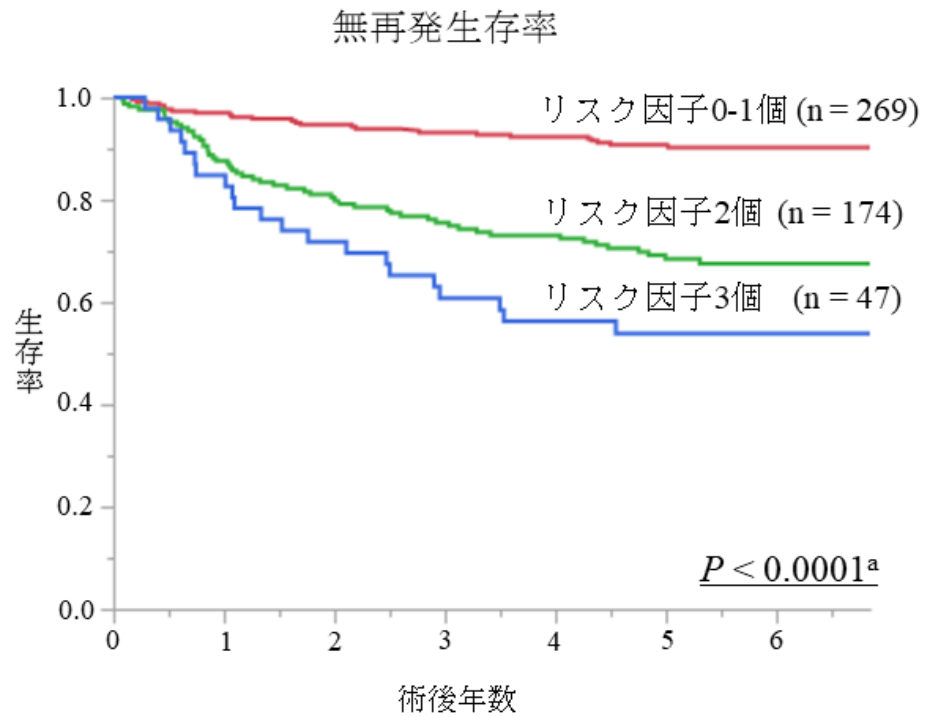


図4. 再発高リスク要因保有数別の無再発生存率

^alog-rank test

多変量解析にて選択された再発高リスク要因（線維性癌間質Intermediate / Immature、性別男性、リンパ節検索個数12個未満）に関し、該当する因子数で分類した。

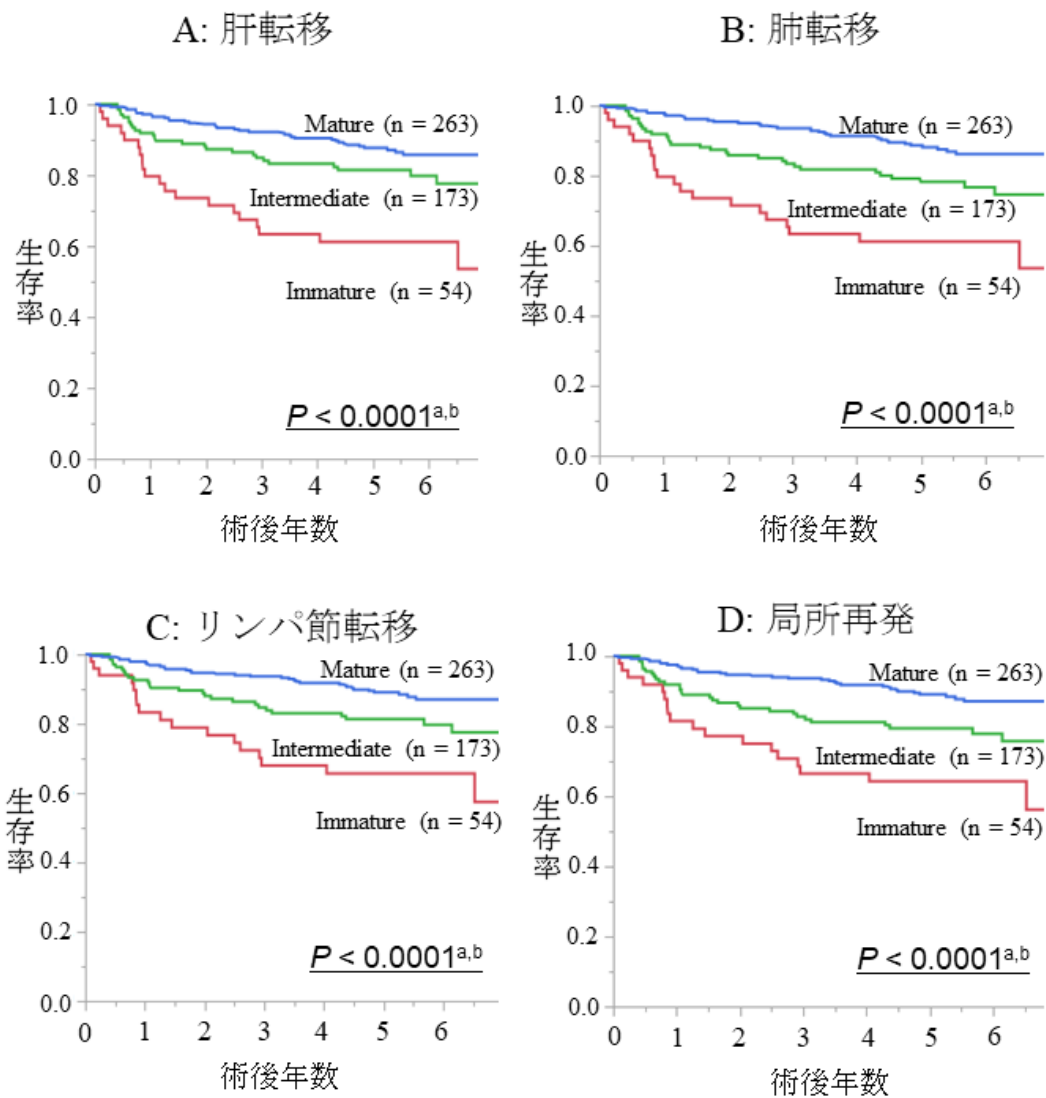


図5. Stage II大腸癌における線維性癌間質分類と再発形式別の無再発生存率の関連

^a log-rank test、^b Mature vs. Intermediate / Immature

表 5. N3 大腸癌 103 症例の患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)
性別	男性	59 (57.3)
	女性	44 (42.7)
年齢 (歳)		61.2 (25-86) ^a
腫瘍主占居部位	盲腸	9 (8.7)
	上行結腸	5 (4.9)
	横行結腸	3 (2.9)
	下行結腸	1 (1.0)
	S 状結腸	14 (13.6)
	直腸	63 (61.2)
	肛門管	8 (7.8)
壁深達度	pT2	7 (6.8)
	pT3	48 (46.6)
	pT4a	34 (33.0)
	pT4b	14 (13.6)
リンパ節検索個数		33.3 (6-90) ^a
リンパ節転移個数		7.0 (1-36) ^a
pN3 内訳	主リンパ節転移	40 (38.8)
	側方リンパ節転移	59 (57.3)
	主+側方リンパ節転移	4 (3.9)
主組織型	高分化腺癌	15 (14.6)
	中分化腺癌	64 (62.1)
	その他	24 (23.3)
腫瘍肉眼型	1 型	6 (5.8)
	2 型	72 (69.9)
	3 型	19 (18.5)
	4 型	3 (2.9)
	5 型	3 (2.9)
腫瘍最大径 (mm)		58.3 (20-170) ^a
術前 CEA 値 (ng/ml)		17.0 (0.5-422) ^a
術後補助化学療法	施行	43 (41.7)
	非施行	17 (16.5)
	不明	43 (41.7)

^a 平均値 (範囲)

表 6. N3 大腸癌における臨床病理学的因子と線維性癌間質の形態分類との関連

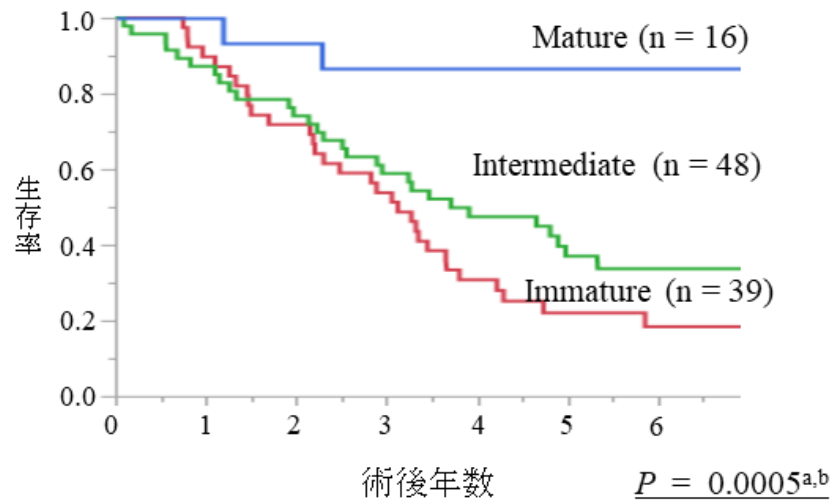
因子	カテゴリー	症例数 (%)			P 値 ^a
		Mature	Intermediate	Immature	
性別	男性	7 (36.8)	30 (62.5)	22 (56.4)	N.S.
	女性	9 (63.2)	18 (37.5)	17 (43.6)	
年齢 (歳)	< 60	5 (31.3)	19 (39.6)	21 (53.8)	N.S.
	≥ 60	11 (68.7)	29 (60.4)	18 (46.2)	
壁深達度	≥ T3	11 (68.8)	28 (58.3)	16 (41.0)	N.S.
	T4	5 (31.2)	20 (41.7)	23 (59.0)	
リンパ節転移個数	1-3 個	7 (36.8)	18 (37.5)	8 (20.5)	N.S.
	≥ 4 個	9 (63.2)	30 (62.5)	31 (79.5)	
pN3 内訳	主リンパ節	6 (37.5)	24 (50.2)	10 (25.6)	N.S.
	側方リンパ節	9 (56.2)	22 (45.8)	28 (71.8)	
	主+側方リンパ節	1 (6.3)	2 (4.2)	1 (2.6)	
主組織型	高・中分化腺癌	13 (81.3)	37 (77.1)	31 (88.6)	N.S.
	その他	3 (18.7)	11 (22.9)	8 (11.4)	
腫瘍肉眼型 (型)	1-2	11 (68.8)	36 (75.0)	31 (79.5)	N.S.
	3-5	5 (31.2)	12 (25.0)	8 (20.5)	
リンパ管侵襲	ly0,1	8 (50.0)	12 (25.0)	8 (11.4)	0.091
	ly2,3	8 (50.0)	36 (75.0)	31 (88.6)	
静脈侵襲	v0/1	13 (81.3)	19 (39.6)	15 (38.5)	<u>0.006</u>
	v2/3	3 (18.7)	29 (60.4)	24 (61.5)	
簇出	G1	6 (40.0)	12 (25.0)	6 (15.4)	N.S.
	G2/3	10 (60.0)	36 (75.0)	33 (84.6)	
腫瘍最大径 (mm) ^{b1}	< 50	8 (50.0)	17 (36.2)	16 (41.0)	N.S.
	≥ 50	8 (50.0)	30 (63.8)	23 (59.0)	
術前 CEA 値 (ng/ml) ^{b2}	< 10	11 (73.3)	35 (79.5)	27 (69.2)	N.S.
	≥ 10	4 (26.7)	9 (20.5)	12 (30.8)	

^a χ^2 test ; Mature vs. Intermediate/Immature

^{b1} データ欠損を除く 102 例で検討、^{b2} データ欠損を除く 98 例で検討

N.S., no significant difference

A: 全生存率 (OS)



B: 無再発生存率 (RFS)

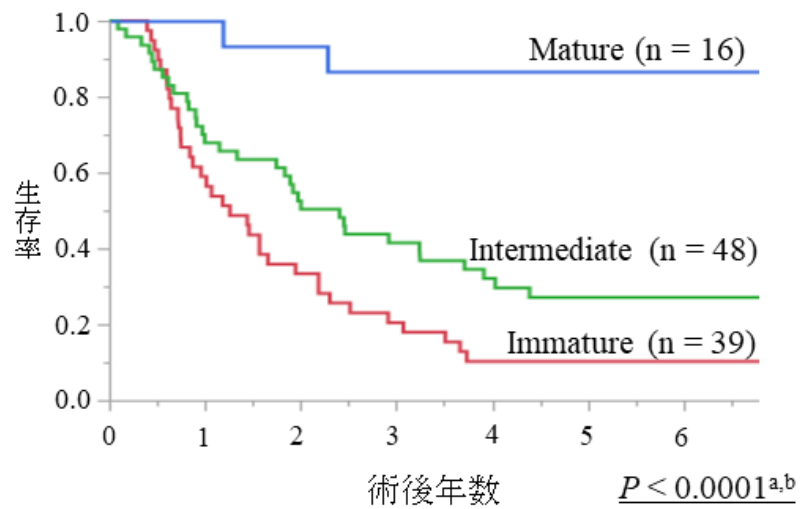


図6. N3大腸癌の線維性癌間質分類別の生存率

^a log-rank test、^b Mature vs. Intermediate / Immature

表 7. N3 大腸癌における臨床病理学的因子別の無再発生存率

因子	カテゴリー	症例数	5yr-RFS ^c	P 値 ^a
性別	男性	59	22.9%	N.S.
	女性	44	37.8%	
年齢 (歳)	< 60	45	35.4%	N.S.
	≥ 60	58	35.4%	
壁深達度	≤ pT3	55	38.4%	<u>0.007</u>
	pT4	48	18.8%	
リンパ節検索個数 (個)	< 12	8	12.5%	0.076
	≥ 12	95	30.7%	
リンパ節転移個数 (個)	1-3	33	49.6%	<u>0.008</u>
	≥ 4	70	19.4%	
主組織型	高・中分化腺癌	81	29.5%	N.S.
	その他	22	28.6%	
肉眼型 (型)	1-2	78	33.0%	N.S.
	3-5	25	18.3%	
リンパ管侵襲	ly0/1	28	50.8%	<u>0.001</u>
	ly2/3	75	21.1%	
静脈侵襲	v0/1	47	41.2%	<u>0.011</u>
	v2/3	56	19.7%	
簇出	G1	24	56.4%	<u>0.002</u>
	G2/3	79	21.1%	
腫瘍最大径 (mm) ^{b1}	< 50	41	25.3%	N.S.
	≥ 50	61	32.1%	
術前 CEA 値 (ng/ml) ^{b2}	< 10	73	32.2%	N.S.
	≥ 10	25	24.9%	
線維性癌間質	Mature	16	86.7%	<u><0.0001</u>
	Intermediate	48	27.2%	
	Immature	39	10.3%	

^a log-rank test

^{b1} データ欠損を除く 102 例で検討、^{b2} データ欠損を除く 98 例で検討

^c 5yr-RFS : 5 年無再発生存率

N.S., no significant difference

表 8. N3 大腸癌における多変量解析による再発リスク因子

因子	カテゴリー	Hazard ratio	95% CI ^a	P 値
線維性癌間質	Mature	1	2.74-54.93	<u><0.0001</u>
	Intermediate/Immature	8.93		
リンパ節転移個数 (個)	1-3	1	1.15-3.83	<u>0.015</u>
	≥ 4	2.05		
簇出	G1	1	1.05-4.42	<u>0.035</u>
	G2/3	2.05		
リンパ管侵襲	ly0/1	1	0.80-3.08	N.S.
	ly2/3	1.53		
静脈侵襲	v0/1	1	0.48-2.61	N.S.
	v2/3	1.48		
壁深達度	≤ pT3	1	0.84-2.34	N.S.
	pT4	1.40		

^a Cox's proportional hazard model

CI, confidence index, N.S., no significant difference

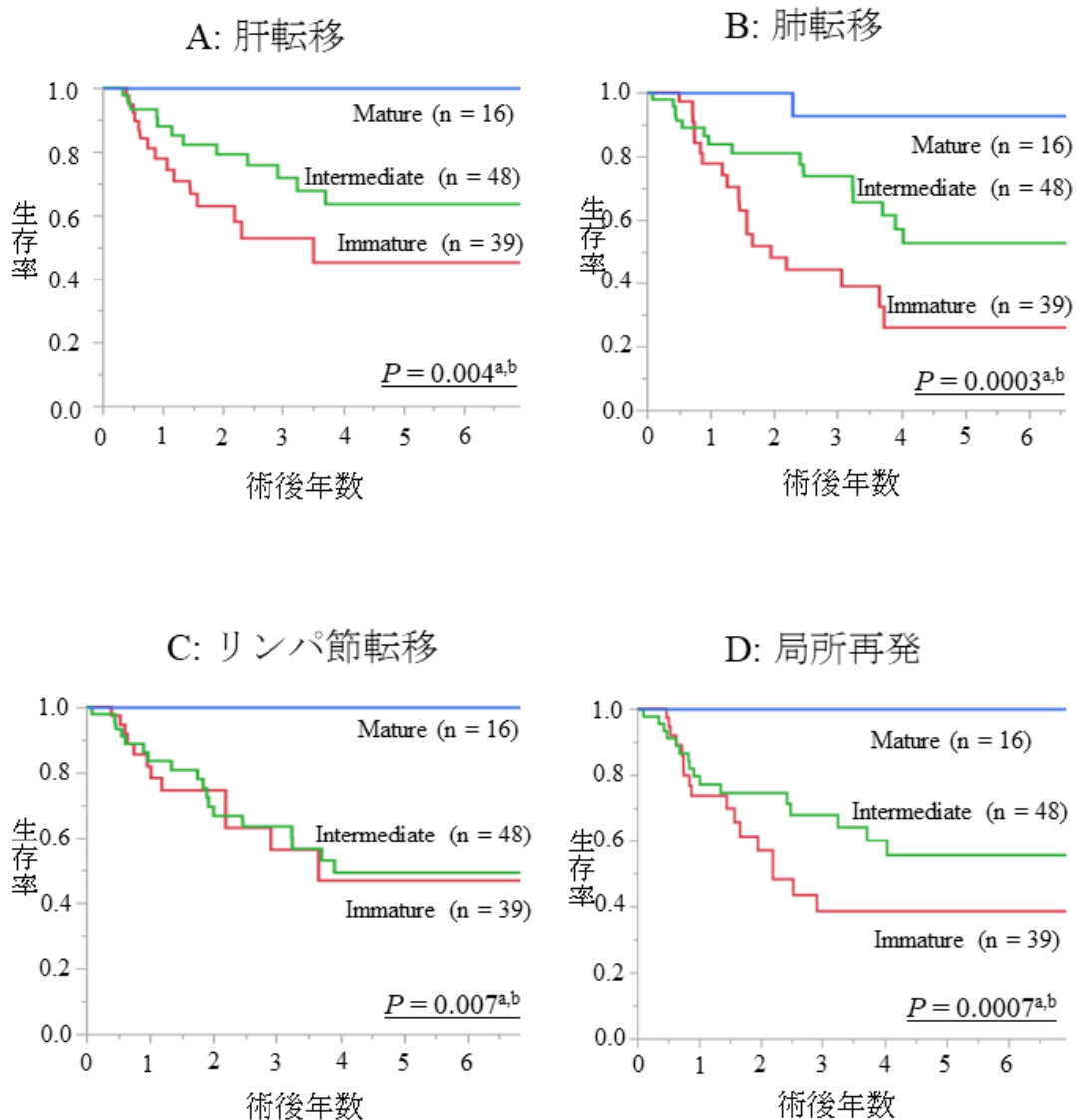


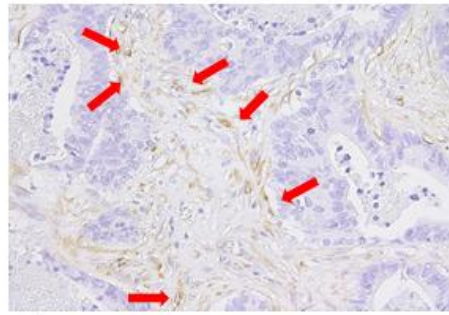
図7.N3大腸癌の再発形式別の無再発生存率

^a log-rank test、^b Mature vs. Intermediate / Immature

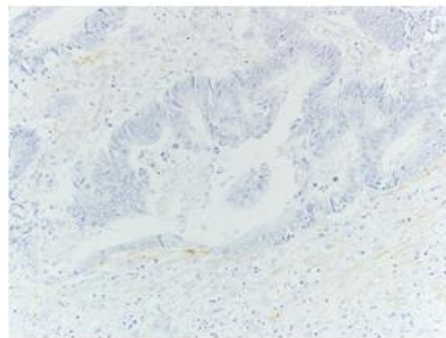
表 9. 線維性癌間質と線維芽細胞の関連に関する検討における患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)
性別	男性	54 (69.2)
	女性	24 (30.8)
年齢 (歳)		65.5 (28-87) ^a
腫瘍主占居部位	結腸	56 (71.8)
	直腸	22 (28.2)
壁深達度	pT3	53 (68.0)
	pT4a	19 (24.4)
	pT4b	6 (7.7)
リンパ節転移個数		2.4 (1-11) ^a
リンパ節検索個数		24.6 (1-69) ^a
主組織型	高分化腺癌	27 (34.6)
	中分化腺癌	48 (61.5)
	その他	3 (3.8)
腫瘍肉眼型	1 型	2 (2.5)
	2 型	73 (93.6)
	3 型	2 (2.5)
	4 型	0 (0.0)
	5 型	1 (1.3)
腫瘍最大径 (mm)		53.4(18-126) ^a
術前 CEA 値 (ng/ml)		10.8 (0.9-126) ^a

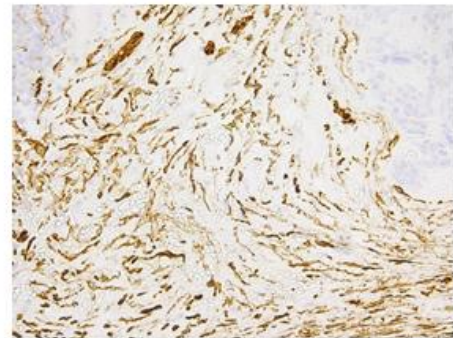
^a 平均値 (範囲)



A



B



C

写真はいずれも対物40倍

図8. 筋線維芽細胞の判定方法

A: 筋線維芽細胞の判定

α -SMAで染色される細長い紡錘形で核を有する細胞を筋線維芽細胞と判定した（赤矢印）。

B: 筋線維芽細胞focal type

α -SMAで染色される筋線維芽細胞はほとんど観察されない。
筋線維芽細胞の広がりに対物40倍視野で間質全体の50%未満を Focal typeとした。

C: 筋線維芽細胞diffuse type

α -SMAで染色される筋線維芽細胞が視野全体に広範に観察される。
筋線維芽細胞の広がりに対物40倍視野で間質全体の50%以上を Diffuse typeとした。

表 10. 筋線維芽細胞の分布と臨床病理学的因子との関連

因子	カテゴリー	症例数	diffuse type	focal type	P 値 ^a
性別	男性	54	26 (65.0)	28 (73.7)	N.S.
	女性	24	14 (35.0)	10 (26.3)	
年齢 (歳)	< 70	49	23 (57.5)	26 (68.4)	N.S.
	≥ 70	29	17 (42.5)	12 (31.6)	
腫瘍占居部位	結腸	56	27 (67.5)	29 (76.3)	N.S.
	直腸	22	13 (32.5)	9 (26.7)	
壁深達度	pT3	53	25 (62.5)	28 (73.7)	N.S.
	pT4	25	15 (37.5)	10 (26.3)	
リンパ節転移個数 (個)	1-3	57	28 (70.0)	29 (76.3)	N.S.
	≥ 4	21	12 (30.0)	9 (23.7)	
リンパ節検索個数 (個)	< 12	9	6 (15.0)	3 (7.9)	N.S.
	≥ 12	69	34 (85.0)	35 (92.1)	
主組織型	高・中分化腺癌	75	39 (97.5)	36 (94.7)	N.S. ^b
	その他	3	1 (2.5)	3 (5.3)	
リンパ管侵襲	ly0/1	58	29 (72.5)	29 (76.3)	N.S.
	ly2/3	20	11 (27.5)	9 (23.7)	
静脈侵襲	v0/1	26	16 (34.8)	10 (31.3)	N.S.
	v2/3	52	30 (65.2)	22 (68.7)	
簇出	G1	24	10 (25.0)	14 (36.8)	N.S.
	G2/3	54	30 (75.0)	24 (63.2)	
肉眼型 (型)	1-2	74	40 (100)	34 (97.4)	N.S.
	3-5	4	0 (0.0)	4 (2.6)	
腫瘍最大径 (mm)	< 50	33	17 (42.5)	16 (42.1)	N.S.
	≥ 50	45	23 (57.5)	22 (57.9)	
術前 CEA 値 (ng/ml)	< 5.3	43	21 (52.5)	22 (57.9)	N.S.
	≥ 5.3	35	19 (47.5)	16 (42.1)	

^a χ^2 test

^b Fisher の直接確率法による検定

N.S., no significant difference

表 11. 筋線維芽細胞と線維性癌間質との関連

A.筋線維芽細胞の分布と線維性癌間質との関連

因子	カテゴリー	総数	症例数 (%)		P 値 ^a
			Focal type	Diffuse type	
線維性癌間質	Mature	33	31 (93.9)	2 (6.1)	<u>≤0.0001</u>
	Intermediate	25	7 (28.0)	18 (72.0)	
	Immature	20	0 (0.0)	20 (100)	

^a χ^2 test

B.筋線維芽細胞の密度と線維性癌間質との関連

因子	カテゴリー	総数	症例数 (%)		P 値 ^a
			低密度群	高密度群	
線維性癌間質	Mature	33	31 (93.9)	2 (6.1)	<u>≤0.0001</u>
	Intermediate	25	9 (36.0)	16 (64.0)	
	Immature	20	1 (5.0)	19 (95.0)	

^a χ^2 test

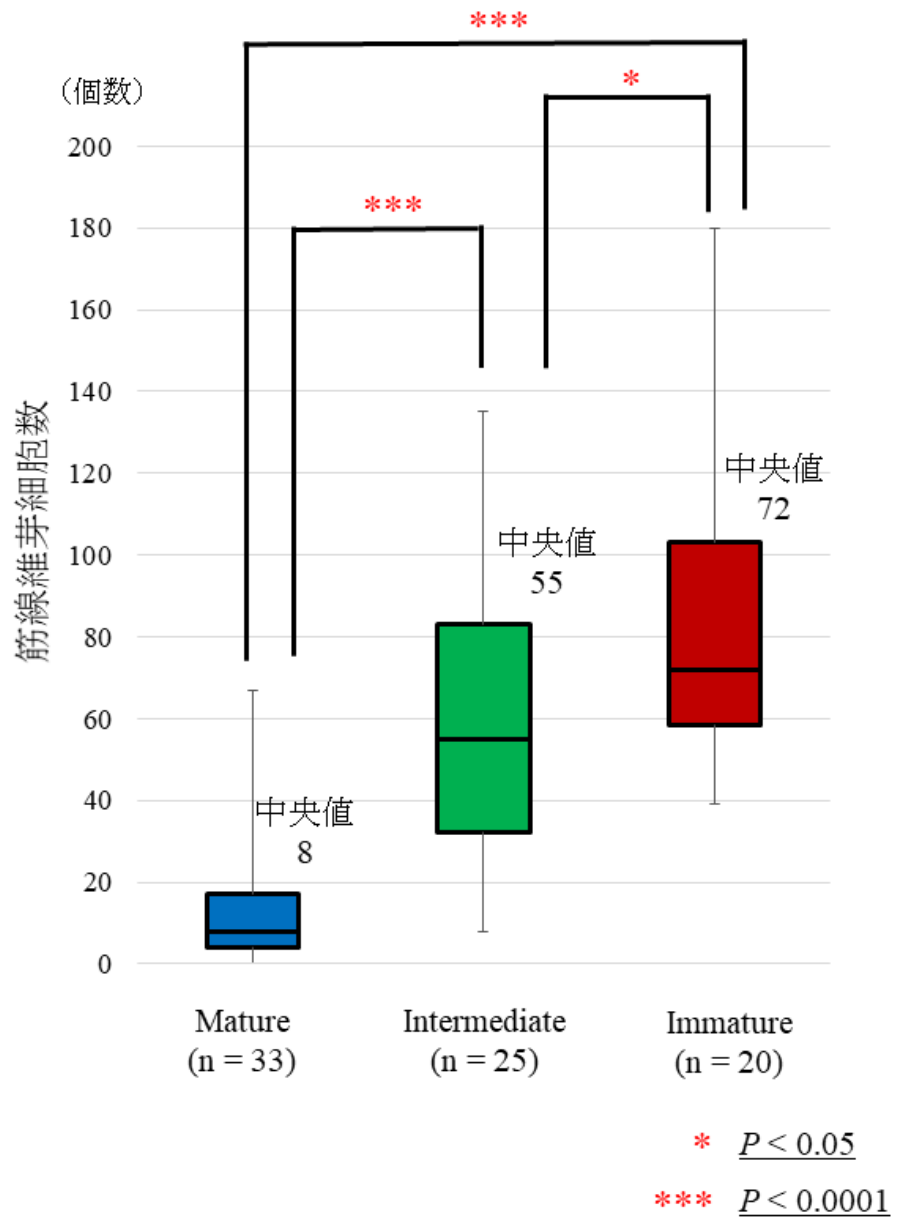


図9. 筋線維芽細胞の個数と線維性癌間質との関連

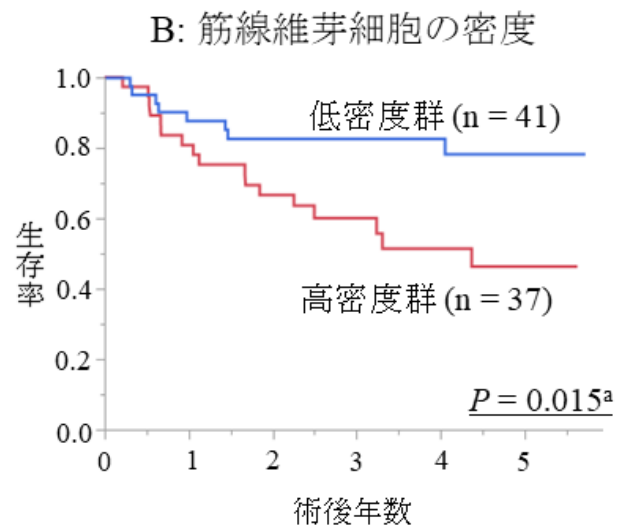
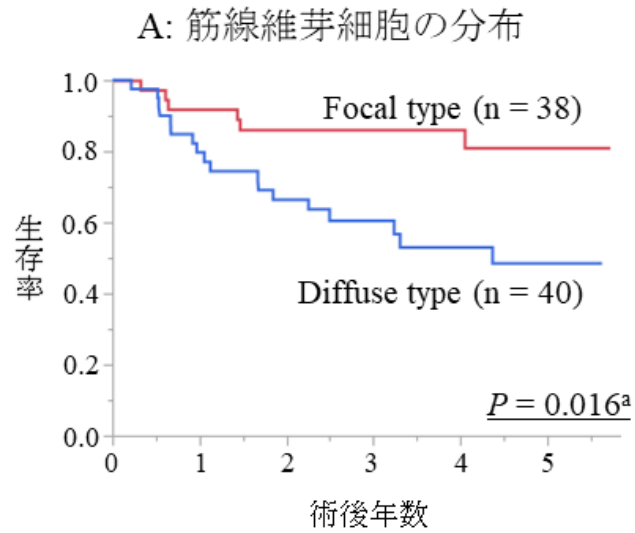
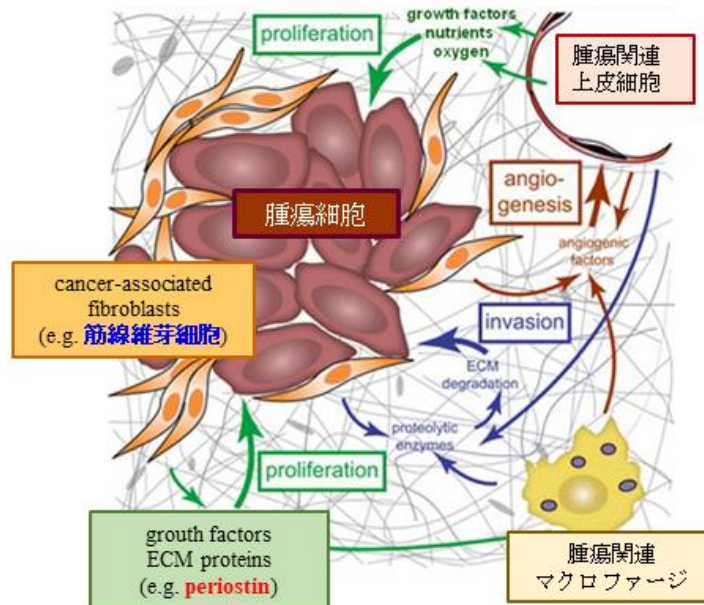


図10. 筋線維芽細胞の分布・密度と無再発生存率

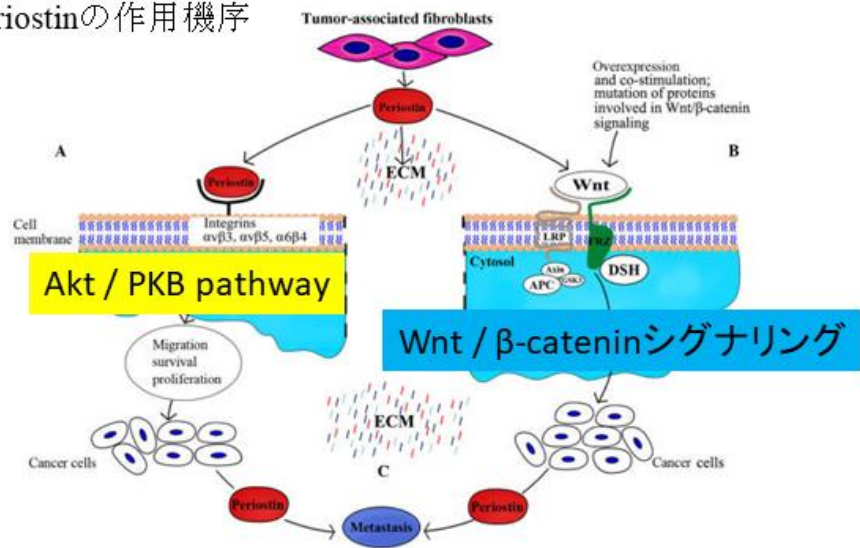
^a log-rank test

A : periostinの発現部位



Morra L et al, Virchows Arch 2011. 459: 465-475より引用・改変

B : periostinの作用機序



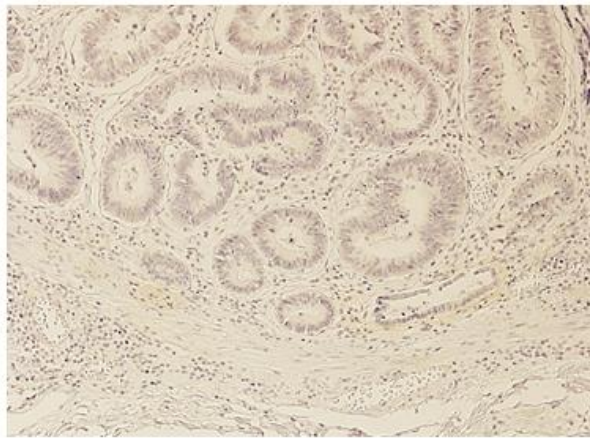
Moniuszko T. et al, Oncology letter. 2016. 12: 783-787より引用

図11. periostinの発現部位と機序

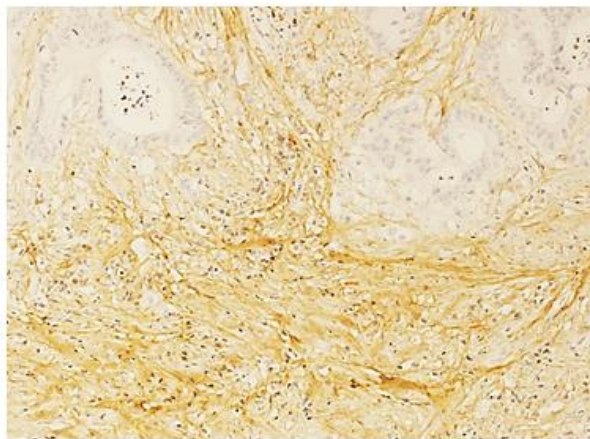
表 12. periostin と筋線維芽細胞との関連に関する検討における患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)
性別	男性	50 (68.5)
	女性	23 (31.5)
年齢 (歳)		65.1 (28-87) ^a
腫瘍主占居部位	結腸	52 (69.9)
	直腸	21 (30.1)
壁深達度	pT3	48 (65.7)
	pT4a	17 (23.3)
	pT4b	8 (11.0)
リンパ節転移個数		2.4 (1-11) ^a
リンパ節検索個数		24.6 (1-69) ^a
主組織型	高分化腺癌	26 (35.6)
	中分化腺癌	42 (57.5)
	その他	5 (6.8)
肉眼型 (型)	1	2 (2.7)
	2	65 (89.0)
	3	4 (5.5)
	4	0 (0.0)
	5	2 (2.7)
腫瘍最大径 (mm)		53.4 (18-126) ^a
術前 CEA 値 (ng/ml)		10.8 (0.9-256) ^a
術前 CA19-9 値 (U/ml)		13.5(0.4-1600) ^a

^a 平均値 (範囲)



A



B

写真はいずれも対物40倍

図12. periostinの免疫組織化学染色

A: periostin陰性例

B: periostin陽性例

抗periostin抗体で染色される間質の腫瘍先進部の間質全体に占める割合のcutoff値を50%とした。

表 13. Periostin の発現と臨床病理学的因子の関連

因子	カテゴリー	総数	症例数 (%)		P 値 ^a
			陽性	陰性	
性別	男性	50	28 (66.6)	22 (71.0)	N.S.
	女性	23	14 (33.4)	9 (29.0)	
年齢 (歳)	<70	47	25 (59.5)	22 (71.0)	N.S.
	≥70	26	17 (40.5)	9 (29.0)	
腫瘍占居部位	結腸	52	28 (66.6)	24 (77.4)	N.S.
	直腸	21	14 (33.4)	7 (22.6)	
壁深達度	≤ pT3	48	26 (61.9)	22 (71.0)	N.S.
	pT4	25	16 (38.1)	9 (29.0)	
リンパ節郭転移個数 (個)	1-3	54	31 (73.8)	23 (74.2)	N.S.
	≥4	19	11 (26.2)	8 (25.8)	
リンパ節検索個数 (個)	<12	8	4 (9.5)	4 (12.9)	N.S. ^b
	≥12	65	38 (90.5)	27 (87.1)	
主組織型	高・中分化腺癌	68	39 (92.9)	29 (93.5)	N.S. ^b
	低分化腺癌	5	3 (7.1)	2 (6.5)	
肉眼型 (型)	1-2	67	39 (92.9)	28 (90.3)	N.S. ^b
	3-5	6	3 (7.1)	3 (9.7)	
リンパ管侵襲	ly0/1	55	34 (81.0)	21 (67.7)	N.S.
	ly2/3	18	8 (19.0)	10 (32.3)	
静脈侵襲	v0/1	23	11 (26.2)	12 (38.7)	N.S.
	v2/3	50	31 (73.8)	19 (61.3)	
簇出	G1	24	13 (31.0)	11 (35.5)	N.S.
	G2/3	49	29 (69.0)	20 (64.5)	
腫瘍最大径 (mm)	<50	32	20 (47.6)	12 (67.7)	N.S.
	≥50	41	22 (52.4)	19 (32.3)	
術前 CEA 値 (ng/ml) ^c	<5	37	21 (50.0)	16 (33.3)	N.S.
	≥5	35	21 (50.0)	14 (66.7)	

^a χ^2 test

^b Fisher の直接確率法による検定

^c データ欠損を除く 72 例で検討

N.S., no significant difference

表 14. periostin と筋線維芽細胞の分布・密度との関連

A. periostin と筋線維芽細胞の分布との関連

因子	カテゴリー	総数	症例数 (%)		P 値 ^a
			陰性	陽性	
筋線維芽細胞の分布	Focal type	38	27 (71.1)	11 (28.9)	<u>≤ 0.0001</u>
	Diffuse type	35	4 (11.4)	31 (88.6)	

^a χ^2 test

B. periostin と筋線維芽細胞の密度との関連

因子	カテゴリー	総数	症例数 (%)		P 値 ^a
			陰性	陽性	
筋線維芽細胞の密度	低密度	41	27 (65.9)	14 (34.1)	<u>≤ 0.0001</u>
	高密度	32	4 (12.5)	28 (87.5)	

^a χ^2 test

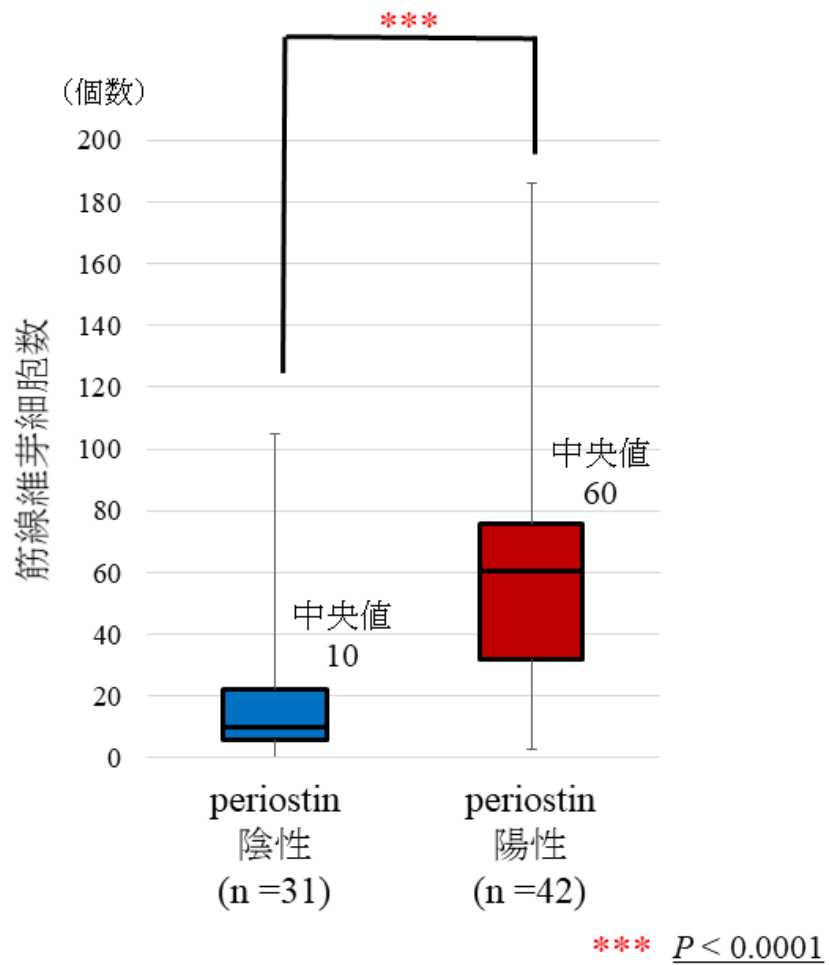


図13. 筋線維芽細胞の個数とperiostin発現との関連

表 15. periostin の発現と線維性癌間質の形態学的分類との関連

因子	カテゴリー	総数	症例数 (%)		P 値 ^a
			陰性	陽性	
線維性癌間質	Mature	33	24 (72.7)	9 (27.3)	<u>≤ 0.0001</u>
	Intermediate	22	7 (38.1)	15 (68.2)	
	Immature	18	0 (0.0)	18 (100)	

^a χ^2 test

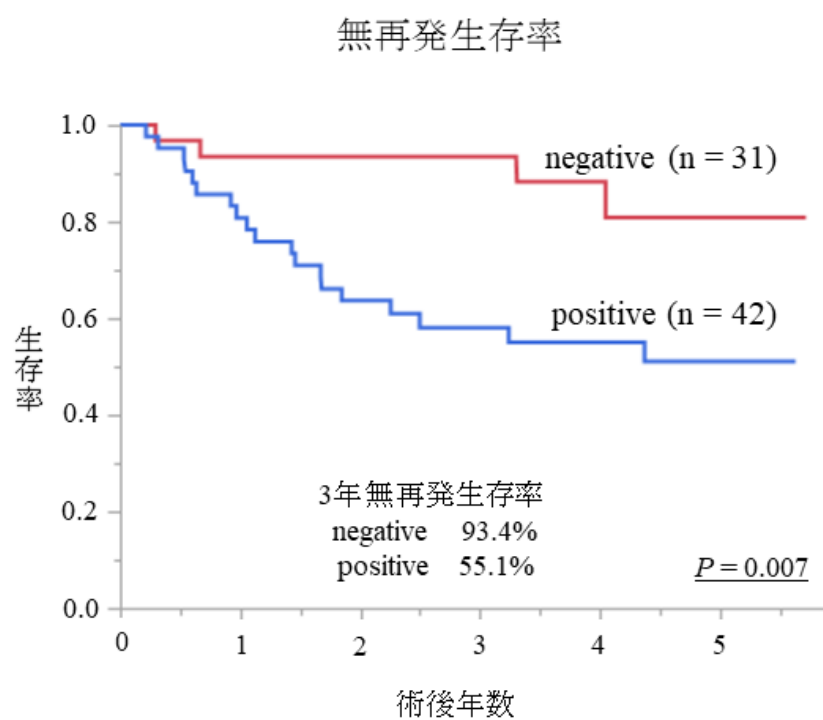


図14 : periostinと無再発生存曲線

表 16. periostin と線維性癌間質との関連に関する検討における患者背景

因子	カテゴリー	症例数 (%)
性別	男性	18 (43.9)
	女性	23 (56.1)
年齢 (歳)		71.0 (44-104) ^a
腫瘍主占居部位	盲腸	3 (7.3)
	上行結腸	6 (14.6)
	横行結腸	3 (7.3)
	下行結腸	3 (7.3)
	S 状結腸	7 (17.1)
	直腸/肛門管	19 (46.3)
	pStage	II
	III	21 (51.2)
	IV	4 (9.8)
壁深達度	pT3	28 (68.3)
	pT4a	9 (22.0)
	pT4b	4 (9.7)
主組織型	高分化腺癌	14 (34.1)
	中分化腺癌	26 (63.4)
	その他	1 (2.4)
腫瘍径 (mm)		46.1 (22-87) ^a

^a 平均値 (範囲)

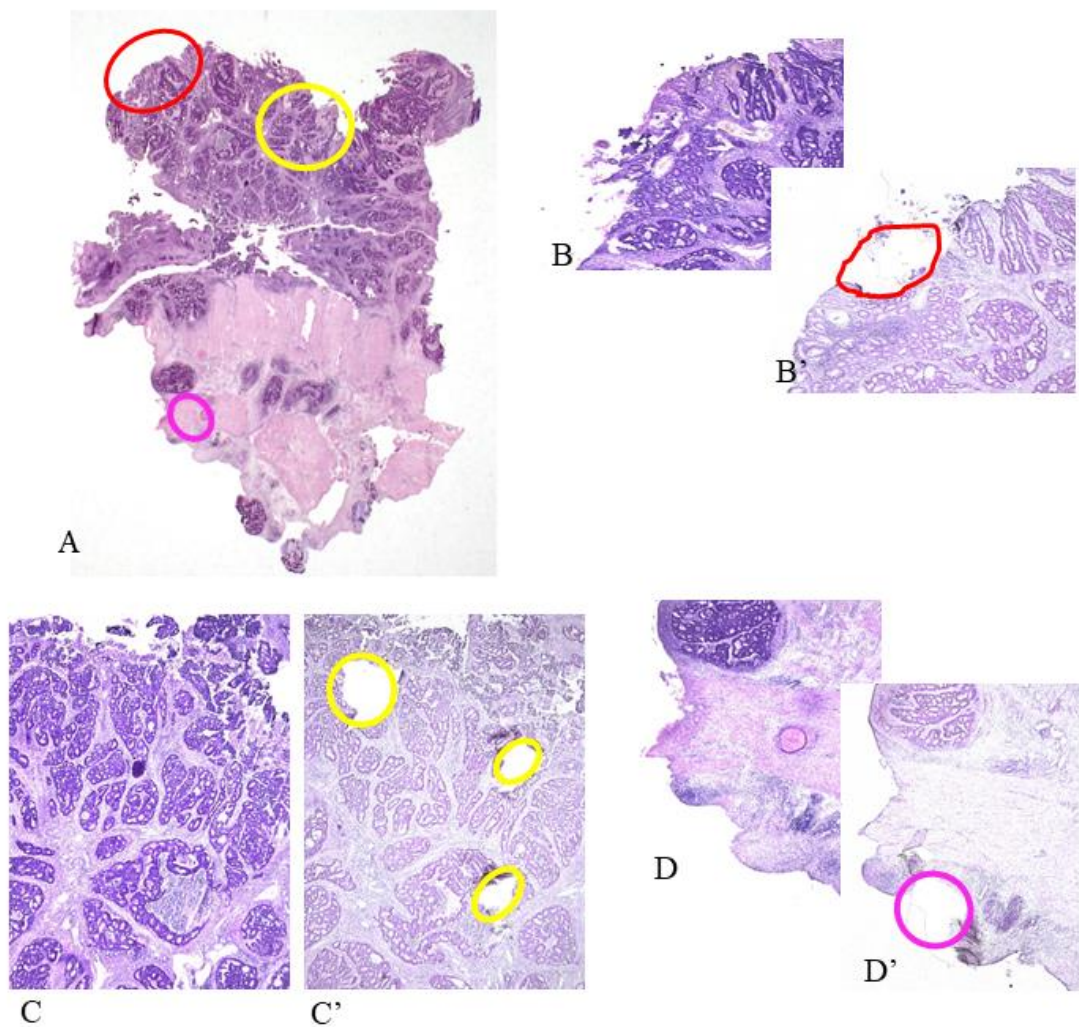


図15. マニュアルダイセクションを用いた組織採取の例

- A: 全体像（ルーペ像）、B: 正常粘膜（採取前）、B': 正常粘膜（採取後）
 C: 癌組織（採取前）、C': 癌組織（採取後）、
 D: 先進部間質（採取前）、D': 先進部間質（採取後）

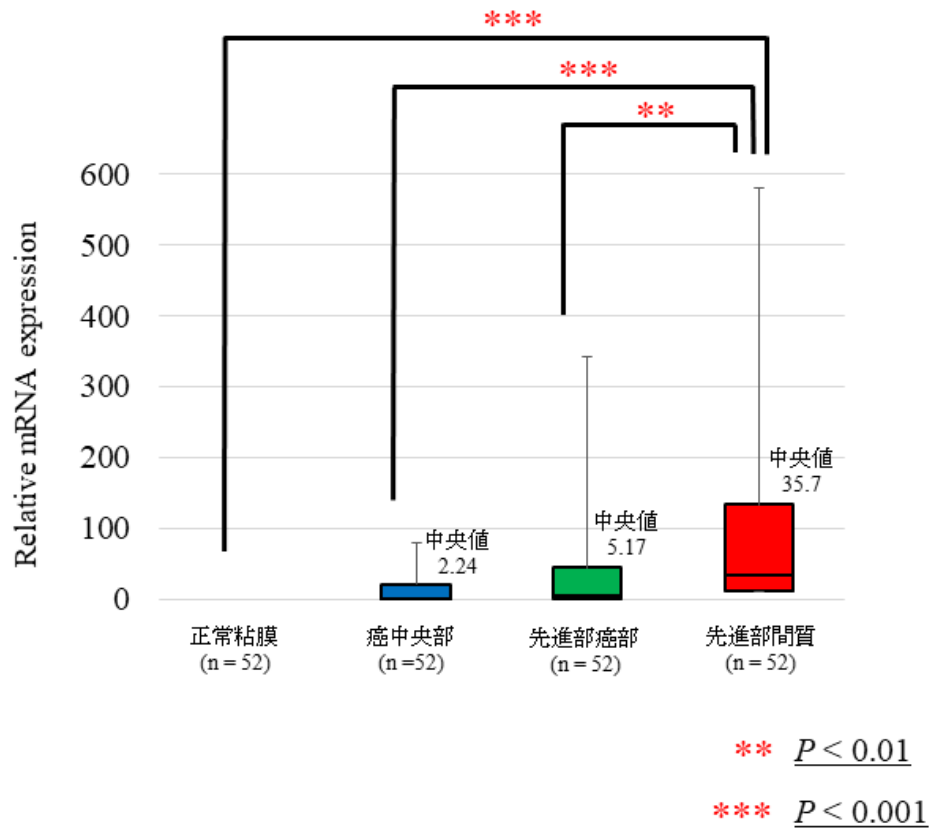


図16：組織局在別のperiostin mRNA発現

(正常粘膜を1とした相対値)

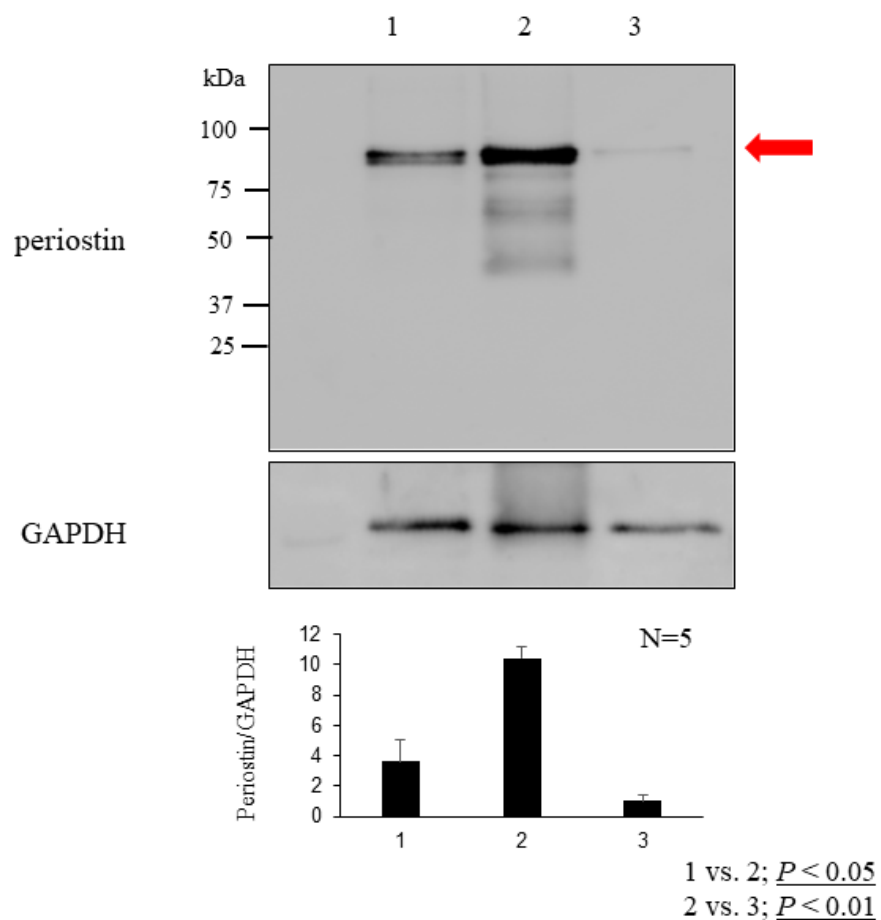


図17：ウェスタンブロッティング法による
組織局在別のperiostinタンパク質の発現

上段：periostinは約90 k Daのバンドとして検出（赤矢印）

下段：ウェスタンブロッティング法にて検出したバンドを
GAPDHで補正した相対値

1. 腫瘍先進部癌部
2. 腫瘍先進部間質部
3. 正常粘膜組織

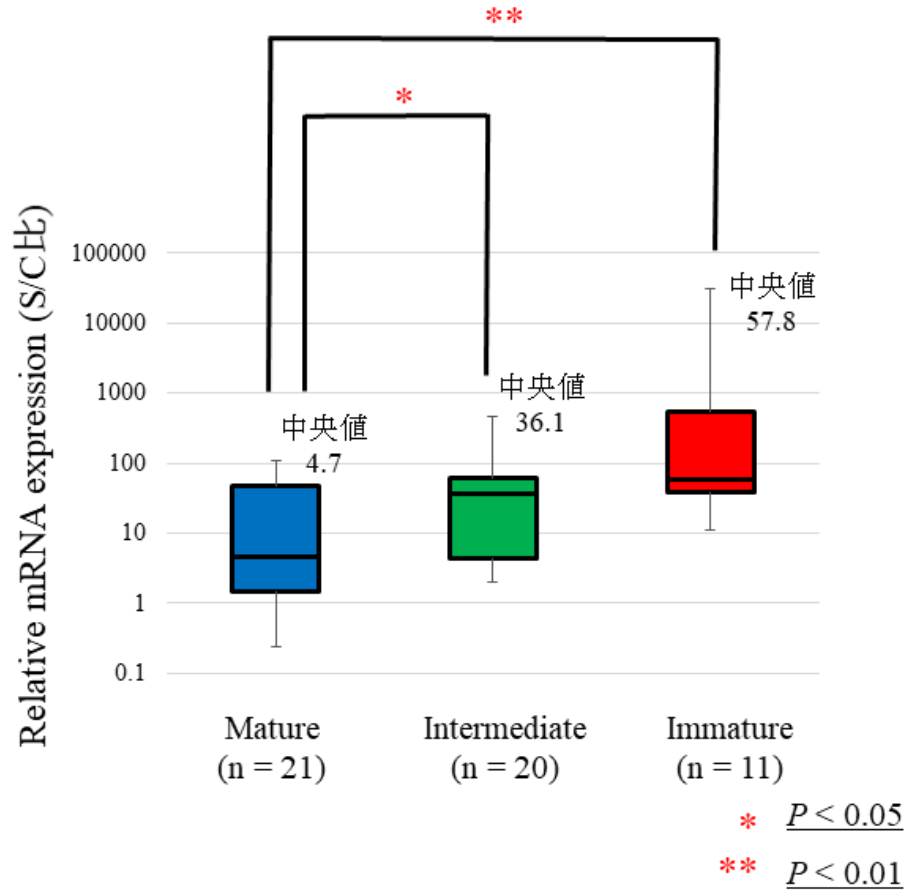


図18：線維性間質分類別のperiostin mRNAの発現

S/C比 = 腫瘍先進部間質部のperiostin mRNA発現量 / 腫瘍中央部のperiostin mRNA発現量

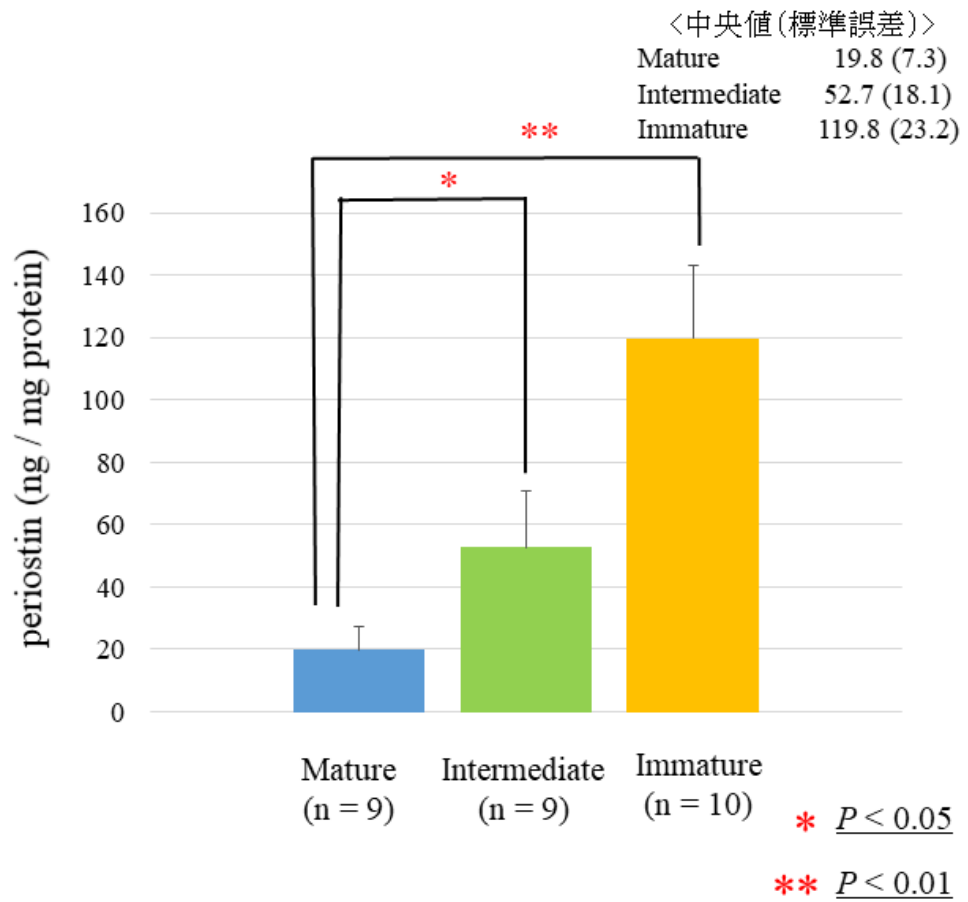


図19：線維性癌間質の形態学的分類別のperiostinタンパク質発現量（ELISA法）

	Median (range)
Mature	1
Immature	82.3 (6-946)

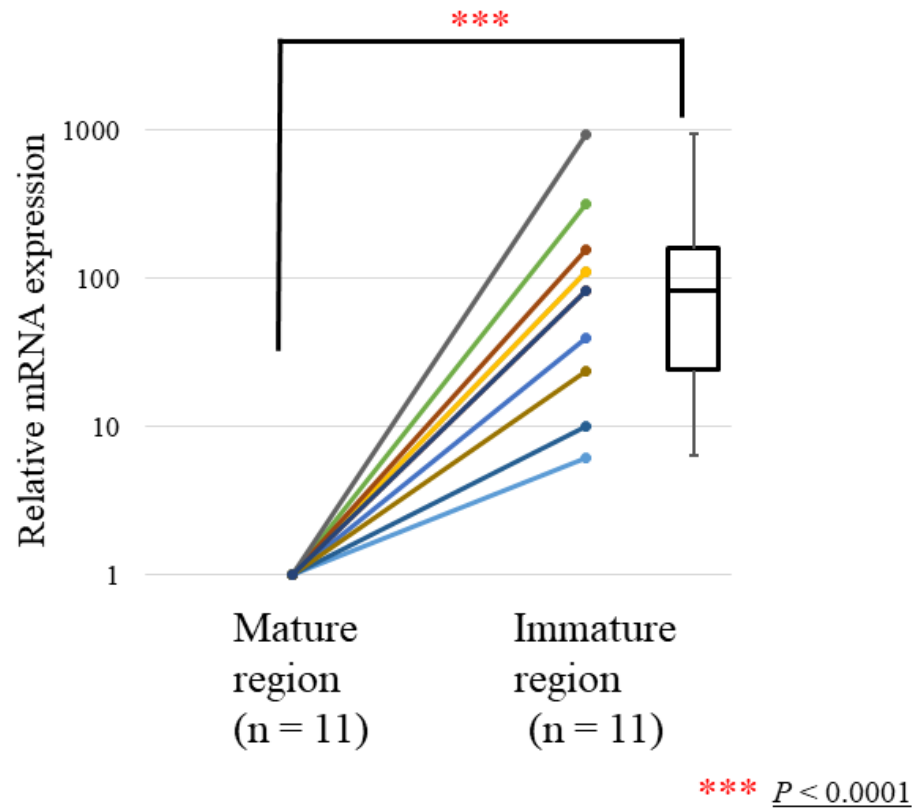


図20：同一症例内での形態の異なる間質における periostin mRNAの発現

(matureを1とした相対値)

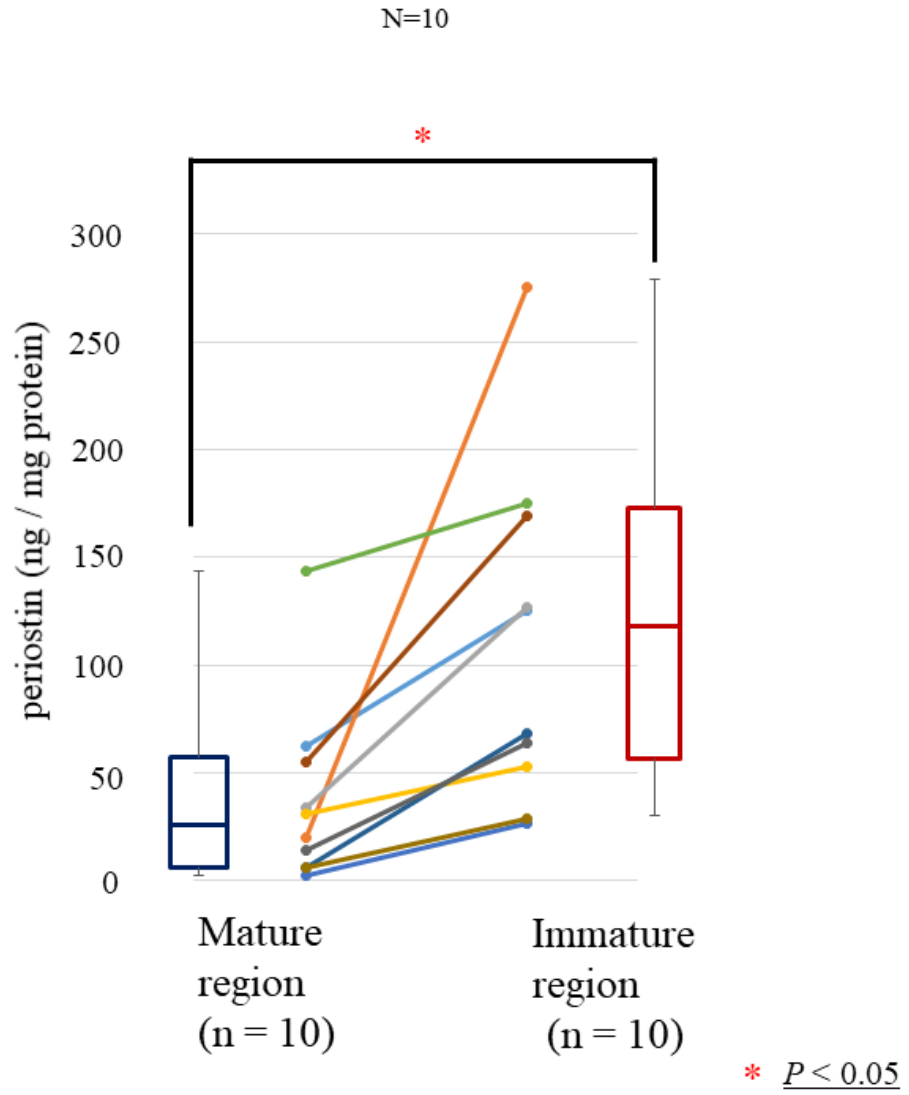


図21：同一症例内での形態の異なる間質における periostin タンパク質定量

引用文献

1. 大腸癌研究会編, 大腸癌ガイドライン 医師用 2016年版. 金原出版, 2016.
2. Kuebler, J.P., et al., Oxaliplatin combined with weekly bolus fluorouracil and leucovorin as surgical adjuvant chemotherapy for stage II and III colon cancer: results from NSABP C-07. *J Clin Oncol*, 2007. 25(16): p. 2198-204.
3. Andre, T., et al., Adjuvant fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin in Stage II to III colon cancer: Updated 10-year survival and outcomes according to BRAF mutation and mismatch repair status of the MOSAIC study. *J Clin Oncol*, 2015. 33(35): p. 4176-87.
4. Grothey, A., et al., Intravenous calcium and magnesium for oxaliplatin-induced sensory neurotoxicity in adjuvant colon cancer: NCCTG N04C7. *J Clin Oncol*, 2011. 29(4): p. 421-7.
5. Yothers, G., et al., Oxaliplatin as adjuvant therapy for colon cancer: updated results of NSABP C-07 trial, including survival and subset analyses. *J Clin Oncol*, 2011. 29(28): p. 3768-74.
6. O'Connell, M.J., et al., Relationship between tumor gene expression and recurrence in four independent studies of patients with stage II/III colon cancer treated with surgery alone or surgery plus adjuvant fluorouracil plus leucovorin. *J Clin Oncol*, 2010. 28(25): p. 3937-44.
7. Salazar, R., et al., Gene expression signature to improve prognosis prediction of stage II and III colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2011. 29(1): p. 17-24.
8. Hase, K., et al., Intraperitoneal exfoliated cancer cells in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 1998. 41(9): p. 1134-40.
9. Ueno, H., et al., Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, 2002. 40(2): p. 127-32.
10. Ueno, H., et al., Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology*, 2004. 127(2): p. 385-94.
11. Ueno, H., et al., Predictors of extrahepatic recurrence after resection of colorectal liver metastases. *Br J Surg*, 2004. 91(3): p. 327-33.
12. Ueno, H., et al., Histologic categorization of desmoplastic reaction: its relevance to the colorectal cancer microenvironment and prognosis. *Ann Surg Oncol*, 2015. 22(5): p. 1504-12.

13. Ueno, H., et al., Prognostic impact of histological categorisation of epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer. *Br J Cancer*, 2014. 111(11): p. 2082-90.
14. Ueno, H., et al., Prognostic value of poorly differentiated clusters in the primary tumor in patients undergoing hepatectomy for colorectal liver metastasis. *Surgery*, 2015. 157(5): p. 899-908.
15. Ueno, H., et al., Histologic categorization of fibrotic cancer stroma in the primary tumor is an independent prognostic index in resectable colorectal liver metastasis. *Am J Surg Pathol*, 2014. 38(10): p. 1380-6.
16. Ueno, H., et al., Histological categorisation of fibrotic cancer stroma in advanced rectal cancer. *Gut*, 2004. 53(4): p. 581-6.
17. Kalluri, R. and M. Zeisberg, Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2006. 6(5): p. 392-401.
18. Karagiannis, G.S., et al., Cancer-associated fibroblasts drive the progression of metastasis through both paracrine and mechanical pressure on cancer tissue. *Mol Cancer Res*, 2012. 10(11): p. 1403-18.
19. Conway, S.J., et al., The role of periostin in tissue remodeling across health and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2014. 71(7): p. 1279-88.
20. Xu, X., et al., Periostin expression in intra-tumoral stromal cells is prognostic and predictive for colorectal carcinoma via creating a cancer-supportive niche. *Oncotarget*, 2016. 7(1): p. 798-813.
21. Gray, R., et al., Adjuvant chemotherapy versus observation in patients with colorectal cancer: a randomised study. *Lancet*, 2007. 370(9604): p. 2020-9.
22. Efficacy of adjuvant fluorouracil and folinic acid in colon cancer. International Multicentre Pooled Analysis of Colon Cancer Trials (IMPACT) investigators. *Lancet*, 1995. 345(8955): p. 939-44.
23. Gill, S., et al., Pooled analysis of fluorouracil-based adjuvant therapy for stage II and III colon cancer: who benefits and by how much? *J Clin Oncol*, 2004. 22(10): p. 1797-806.
24. Figueredo, A., et al., Adjuvant therapy for stage II colon cancer: a systematic review from the Cancer Care Ontario Program in evidence-based care's gastrointestinal cancer disease site group. *J Clin Oncol*, 2004. 22(16): p. 3395-407.
25. Ishiguro, M., et al., Study protocol of the SACURA trial: a randomized phase III trial of efficacy and safety of UFT as adjuvant chemotherapy for stage II colon cancer. *BMC Cancer*, 2012. 12: p. 281.

26. Kajiwara, Y., et al., A randomised phase III trial of 1-year adjuvant chemotherapy with oral tegafur-uracil (UFT) vs. surgery alone in stage II colon cancer. American Society of Clinical Oncology (ASCO) 2016 annual meeting. 2016.06.04. Chicago (USA): JCO 34, abstract #3617.
27. Pectasides, D., et al., Randomized phase III clinical trial comparing the combination of capecitabine and oxaliplatin (CAPOX) with the combination of 5-fluorouracil, leucovorin and oxaliplatin (modified FOLFOX6) as adjuvant therapy in patients with operated high-risk stage II or stage III colorectal cancer. *BMC Cancer*, 2015. 15: p. 384.
28. Labianca, R., et al., Early colon cancer: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 2013. 24 Suppl 6: p. vi64-72.
29. Schmoll, H.J., et al., ESMO Consensus Guidelines for management of patients with colon and rectal cancer. a personalized approach to clinical decision making. *Ann Oncol*, 2012. 23(10): p. 2479-516.
30. 大腸癌研究会編, 大腸癌取扱い規約第 8 版. 金原出版, 2013.
31. Kundel, H.L. and M. Polansky, Measurement of observer agreement. *Radiology*, 2003. 228(2): p. 303-8.
32. Landis, J.R. and G.G. Koch, An application of hierarchical kappa-type statistics in the assessment of majority agreement among multiple observers. *Biometrics*, 1977. 33(2): p. 363-74.
33. Nazemalhosseini Mojarad, E., et al., Low level of microsatellite instability correlates with poor clinical prognosis in stage II colorectal cancer patients. *J Oncol*, 2016. 2016: p. 2196703.
34. Gilchrist, R.K. and V.C. David, Lymphatic spread of carcinoma of the rectum. *Ann Surg*, 1938. 108(4): p. 621-42.
35. Grinnell, R.S., The lymphatic and venous spread of carcinoma of the rectum. *Ann Surg*, 1942. 116(2): p. 200-16.
36. Ueno, H., et al., Potential prognostic benefit of lateral pelvic node dissection for rectal cancer located below the peritoneal reflection. *Ann Surg*, 2007. 245(1): p. 80-7.
37. Sugihara, K., et al., Indication and benefit of pelvic sidewall dissection for rectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 2006. 49(11): p. 1663-72.
38. Koyama, Y., Y. Moriya, and K. Hojo, Effects of extended systematic lymphadenectomy for adenocarcinoma of the rectum--significant improvement

of survival rate and decrease of local recurrence. *Jpn J Clin Oncol*, 1984. 14(4): p. 623-32.

39. Hojo, K., Y. Koyama, and Y. Moriya, Lymphatic spread and its prognostic value in patients with rectal cancer. *Am J Surg*, 1982. 144(3): p. 350-4.

40. Fujita, S., et al., Mesorectal Excision With or Without Lateral Lymph Node Dissection for Clinical Stage II/III Lower Rectal Cancer (JCOG0212): A Multicenter, Randomized Controlled, Noninferiority Trial. *Ann Surg*, 2017.266(2): p.201-7

41. Andre, T., et al., Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment for colon cancer. *N Engl J Med*, 2004. 350(23): p. 2343-51.

42. Andre, T., et al., Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol*, 2009. 27(19): p. 3109-16.

43. Haller, D.G., et al., Capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil and folinic acid as adjuvant therapy for stage III colon cancer. *J Clin Oncol*, 2011. 29(11): p. 1465-71.

44. Ramanathan, R.K., et al., Safety and toxicity analysis of oxaliplatin combined with fluorouracil or as a single agent in patients with previously treated advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2003. 21(15): p. 2904-11.

45. Muller, G.A. and H.P. Rodemann, Characterization of human renal fibroblasts in health and disease: I. Immunophenotyping of cultured tubular epithelial cells and fibroblasts derived from kidneys with histologically proven interstitial fibrosis. *Am J Kidney Dis*, 1991. 17(6): p. 680-3.

46. Castor, C.W., et al., Activation of lung connective tissue cells in vitro. *Am Rev Respir Dis*, 1979. 120(1): p. 101-6.

47. Parsonage, G., et al., A stromal address code defined by fibroblasts. *Trends Immunol*, 2005. 26(3): p. 150-6.

48. Tomasek, J.J., et al., Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2002. 3(5): p. 349-63.

49. Mueller, M.M. and N.E. Fusenig, Friends or foes - bipolar effects of the tumour stroma in cancer. *Nat Rev Cancer*, 2004. 4(11): p. 839-49.

50. Wiseman, B.S. and Z. Werb, Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science*, 2002. 296(5570): p. 1046-9.

51. Kalluri, R. and E.G. Neilson, Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest*, 2003. 112(12): p. 1776-84.

52. Kalluri, R., Basement membranes: structure, assembly and role in tumour angiogenesis. *Nat Rev Cancer*, 2003. 3(6): p. 422-33.
53. Barsky, S.H. and R. Gopalakrishna, Isolation of a myofibroblast growth factor from human breast carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun*, 1987. 149(3): p. 1125-31.
54. Sappino, A.P., et al., Smooth muscle differentiation in scleroderma fibroblastic cells. *Am J Pathol*, 1990. 137(3): p. 585-91.
55. Barsky, S.H., et al., Desmoplastic breast carcinoma as a source of human myofibroblasts. *Am J Pathol*, 1984. 115(3): p. 329-33.
56. Tsujino, T., et al., Stromal myofibroblasts predict disease recurrence for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2007. 13(7): p. 2082-90.
57. Pena, C., et al., STC1 expression by cancer-associated fibroblasts drives metastasis of colorectal cancer. *Cancer Res*, 2013. 73(4): p. 1287-97.
58. Takatsuna, M., et al., Myofibroblast distribution is associated with invasive growth types of colorectal cancer. *Oncol Rep*, 2016. 36(6): p. 3154-3160.
59. Yamaguchi, H. and R. Sakai, Direct Interaction between Carcinoma Cells and Cancer Associated Fibroblasts for the Regulation of Cancer Invasion. *Cancers (Basel)*, 2015. 7(4): p. 2054-62.
60. Yamaguchi, H., et al., Stromal fibroblasts mediate extracellular matrix remodeling and invasion of scirrhous gastric carcinoma cells. *PLoS One*, 2014. 9(1): p. e85485.
61. Karagiannis, G.S., et al., Proteomic signatures of the desmoplastic invasion front reveal collagen type XII as a marker of myofibroblastic differentiation during colorectal cancer metastasis. *Oncotarget*, 2012. 3(3): p. 267-85.
62. Karagiannis, G.S., M.P. Pavlou, and E.P. Diamandis, Cancer secretomics reveal pathophysiological pathways in cancer molecular oncology. *Mol Oncol*, 2010. 4(6): p. 496-510.
63. Torres, S., et al., Proteome profiling of cancer-associated fibroblasts identifies novel proinflammatory signatures and prognostic markers for colorectal cancer. *Clin Cancer Res*, 2013. 19(21): p. 6006-19.
64. Ostman, A. and M. Augsten, Cancer-associated fibroblasts and tumor growth--bystanders turning into key players. *Curr Opin Genet Dev*, 2009. 19(1): p. 67-73.

65. Calon, A., et al., Stromal gene expression defines poor-prognosis subtypes in colorectal cancer. *Nat Genet*, 2015. 47(4): p. 320-9.
66. Calon, A., D.V. Tauriello, and E. Batlle, TGF-beta in CAF-mediated tumor growth and metastasis. *Semin Cancer Biol*, 2014. 25: p. 15-22.
67. Kikuchi, Y., et al., Periostin is expressed in pericryptal fibroblasts and cancer-associated fibroblasts in the colon. *J Histochem Cytochem*, 2008. 56(8): p. 753-64.
68. Horiuchi, K., et al., Identification and characterization of a novel protein, periostin, with restricted expression to periosteum and periodontal ligament and increased expression by transforming growth factor beta. *J Bone Miner Res*, 1999. 14(7): p. 1239-49.
69. Moniuszko, T., et al., Role of periostin in esophageal, gastric and colon cancer. *Oncol Lett*, 2016. 12(2): p. 783-787.
70. Utispan, K., et al., Gene expression profiling of cholangiocarcinoma-derived fibroblast reveals alterations related to tumor progression and indicates periostin as a poor prognostic marker. *Mol Cancer*, 2010. 9: p. 13.
71. Ishihara, S., et al., Oncological Outcomes of Lateral Pelvic Lymph Node Metastasis in Rectal Cancer Treated With Preoperative Chemoradiotherapy. *Dis Colon Rectum*, 2017. 60(5): p. 469-476.
72. Kikuchi, Y., et al., The niche component periostin is produced by cancer-associated fibroblasts, supporting growth of gastric cancer through ERK activation. *Am J Pathol*, 2014. 184(3): p. 859-70.
73. Underwood, T.J., et al., Cancer-associated fibroblasts predict poor outcome and promote periostin-dependent invasion in oesophageal adenocarcinoma. *J Pathol*, 2015. 235(3): p. 466-77.
74. Tian, Y., et al., Overexpression of periostin in stroma positively associated with aggressive prostate cancer. *PLoS One*, 2015. 10(3): p. e0121502.
75. Ryner, L., et al., Upregulation of Periostin and Reactive Stroma Is Associated with Primary Chemoresistance and Predicts Clinical Outcomes in Epithelial Ovarian Cancer. *Clin Cancer Res*, 2015. 21(13): p. 2941-51.
76. Erkan, M., et al., Periostin creates a tumor-supportive microenvironment in the pancreas by sustaining fibrogenic stellate cell activity. *Gastroenterology*, 2007. 132(4): p. 1447-64.
77. Malanchi, I., et al., Interactions between cancer stem cells and their niche govern metastatic colonization. *Nature*, 2011. 481(7379): p. 85-9.

78. Chang, W., et al., Gene expression profiling-derived immunohistochemistry signature with high prognostic value in colorectal carcinoma. *Gut*, 2014. 63(9): p. 1457-67.
79. Morra, L. and H. Moch, Periostin expression and epithelial-mesenchymal transition in cancer: a review and an update. *Virchows Arch*, 2011. 459(5): p. 465-75.
80. Bao, S., et al., Periostin potently promotes metastatic growth of colon cancer by augmenting cell survival via the Akt/PKB pathway. *Cancer Cell*, 2004. 5(4): p. 329-39.
81. Ben, Q.W., et al., Circulating levels of periostin may help identify patients with more aggressive colorectal cancer. *Int J Oncol*, 2009. 34(3): p. 821-8.
82. Oh, H.J., et al., Overexpression of POSTN in Tumor Stroma Is a Poor Prognostic Indicator of Colorectal Cancer. *J Pathol Transl Med*, 2017. 51(3): p.306-13.