

Stage IV 大腸癌先進部における
簇出およびメソテリン発現の
臨床的意義に関する研究

なが た けん
永 田 健

(消化器病学専攻)

防衛医科大学校

令和4年度

目 次

第 1 章 緒言	1 頁
第 2 章 Stage IV 大腸癌における簇出の予後因子および化学療法抵抗性 予測因子としての意義	5 頁
第 1 節 背景と目的	5 頁
第 2 節 対象と方法	5 頁
第 3 節 結果	8 頁
第 4 節 考察	10 頁
第 5 節 小括	11 頁
第 3 章 Stage IV 大腸癌における MSLN の予後因子および化学療法抵 抗性予測因子としての意義	12 頁
第 1 節 背景と目的	12 頁
第 2 節 対象と方法	13 頁
第 3 節 結果	17 頁
第 4 節 考察	19 頁
第 5 節 小括	20 頁

第4章	MSLN 強制発現大腸癌細胞株に対する抗体薬の抗腫瘍効果	21 頁
第1節	背景と目的	21 頁
第2節	対象と方法	21 頁
第3節	結果	26 頁
第4節	考察	29 頁
第5節	小括	31 頁
第5章	考察	32 頁
第6章	結論	34 頁
	謝辞	35 頁
	略語一覧	36 頁
	引用文献	38 頁
	図表	50 頁

第1章 緒言

令和2年(2020年)の人口動態統計月報年計(概数)によると死因順位の第1位は全死亡者の27.6%を占める悪性新生物であり、その次に位置する虚血性心疾患(15.0%)や老衰(9.6%)と比較して悪性新生物の占める割合は著しく高率である(1)。悪性新生物の中でも大腸癌の患者数は増加の一途をたどり、その死亡数は男性では肺癌、胃癌について第3位、女性では第1位となっている(1)。大腸癌は進行度によりStage 0からStage IVに分類され、遠隔転移を有するStage IV大腸癌は統計上全体の27.5%を占め、Stage IIに次いで多い(2)。Stage IV大腸癌は、癌の進展が腸管と領域リンパ節内にとどまるStage III以下と比較し治癒率は著しく低く、Stage IV大腸癌の治療成績の低迷は長年の懸案事項となっている。さらに、近年の新型コロナ感染流行による受診控えの傾向から、その割合は増加傾向にあると予測され、この集団を対象とした治療成績向上にむけた研究の必要性は益々高まっている。

切除不能進行再発大腸癌の治療に用いられる癌薬物療法は着実に進歩しており(2)、1990年代に切除不能と判断された症例の平均生存期間は約8か月とされたものが(3)、近年では30か月を越えるまでに延長した(4-6)。現在、薬物治療の適応となる患者に対する1次治療は、フッ化ピリミジンにオキサリプラチンもしくはイリノテカンを組み合わせる2剤併用療法もしくはその3剤を組み合わせる3剤併用療法が推奨され、それらのレジメンにさらに分子標的薬を加えられることが多い(2)。しかし薬物療法の効果は一様ではなく、薬物療法の腫瘍縮小効果により転移巣が治癒切除できた場合には確実な延命効果が期待できる(7)。一方で、縮小効果が認められなかった場合の予後は不良である。特に、切除可能

境界の遠隔転移巣への切離断端陰性確保を目的とした術前化学療法の有用性が認識され、広く実施されるようになったが(8)、この状況下で癌の増大を招いた場合、患者への不利益は計り知れない。抗癌剤効果予測法確立の成否が、今後の Stage IV 大腸癌の治療成績向上に向けての大きな試金石になると思われる。現在、RAS 遺伝子検査、BRAF^{V600E} 遺伝子検査、MSI (microsatellite instability) 検査が抗癌剤治療効果予測に利用されているが、その対象となる治療薬は限定的である(2)。また、網羅的遺伝子発現解析データを活用した研究が精力的に実施されているものの、精度の高い予測法は確立されていない。さらなる研究の発展が急務である。

大腸癌における腫瘍先進部の癌細胞の脱分化所見である簇出 (budding) は、腫瘍先進部間質に浸潤性に存在する単個または 5 個未満の癌細胞から構成される癌胞巣と定義され、budding の個数によって BD1 (軽度)、BD2 (中等度)、BD3 (高度) に分類することで、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(9-12)。分子病理学的な検討から、budding は浸潤転移を強力に誘導する上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition; EMT) の分子生物学的特性が組織形態に反映された所見であることが示唆されており、臨床的に Stage II/III 大腸癌症例では budding 高度症例において予後不良であることが報告されている(13-16)。また、抗癌剤抵抗性に関する研究から、EMT は 5-フルオロウラシル、オキサリプラチン、ゲムシタビンなどの消化器癌に使用される化学療法への抵抗性を増強させることが示されており(17-21)、budding の程度は予後予測のみならず化学療法抵抗性の予測因子としての意義も併せ持つ可能性がある。さらに、我々の教室において実施された DNA マイクロアレイを活用した遺伝子発現解析データから、大腸癌における budding と最も強く関連する遺伝子としてメソテリン

(Mesothelin, MSLN)が抽出された(22)。MSLN は Wnt シグナル経路活性化に関連する分子であり(23)、その発現は budding の程度と強く相関するとともに、強発現は Stage II/III 大腸癌における予後不良因子であることが示された(24)。また、MSLN 発現が抗癌剤抵抗性に影響するとの基礎的データ(25)、臨床的データ(26)共に存在する。budding は切除検体でのみ評価可能な指標であり、術前に把握することはできない。一方、MSLN は腫瘍内での発現が均一という特徴を有し(27)、内視鏡下生検検体で MSLN 発現を評価することで腫瘍全体の発現程度を推し量る事が可能である(28)。原発巣切除前にも評価可能なバイオマーカーとして、今後の応用が期待されている。

これまでの癌薬物治療では、細胞中の DNA や細胞内にある微小管を標的とする殺細胞性の抗癌剤が主に使用されてきた。一方、昨今では癌細胞の特定の分子をターゲットとした分子標的薬の開発が盛んに進められている。標的分子としての適否を決定する上で、癌の増殖や進展への関与、生命維持への影響、あるいは抗体薬によるターゲット分子へのアプローチの容易性が重要で、細胞表面に存在する増殖因子の受容体が標的として最適とされる。また、発現検索が可能であれば効果予測に利用できることが多い。大腸癌では血管新生因子に対する vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体、上皮増殖因子受容体に対する epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体が臨床応用されており、すでに Stage IV 大腸癌に対する主たる治療薬として頻用され予後改善に大きな役割を果たしている(4, 29-32)。今回注目した MSLN は、膜貫通タンパクとして細胞膜表面に存在し、かつ、浸潤転移能の亢進や抗癌剤抵抗性に関連することから治療ターゲットの候補となりうる。さらに、MSLN ノックアウトマウスにおいても正常な発育、生殖、血球数を示すことから、MSLN が正常な成長と生殖に必

須でないことが示唆され、治療標的分子としての MSLN の適性が重ねて示された(33)。MSLN に対する標的治療の開発がすすめば、予後不良とされる MSLN 発現症例への有用な治療オプションとなり、大腸癌治療成績の向上に寄与すると期待される。

本研究では、Stage IV 大腸癌を対象として原発巣における budding と、budding に関連する分子である MSLN について、これらの予後ならびに癌薬物療法の効果予測因子としての意義を明らかにすることを目的とした。また、実験的検討から MSLN 発現が癌細胞の生物学的悪性度に及ぼす影響を分析すると共に、抗 MSLN 抗体により MSLN 経路をブロックすることの意義について検討し、治療ターゲットとしての可能性について評価した。

第 2 章 Stage IV 大腸癌における簇出の予後因子および化学療法抵抗性予測因子としての意義

第 1 節 背景と目的

これまでの大腸癌における臨床的検討から、簇出 (budding) には Stage II および Stage III 症例における再発予測因子としての意義に加え、Stage III 症例における術後補助化学療法の効果予測因子としての有用性が示されている(16, 34-38)。一方、budding は大腸癌肝転移に対する肝切除後の再発を規定する独立した因子であるとの報告がなされているものの(14, 39)、Stage IV 大腸癌、特に非治癒切除症例における budding の臨床的意義に関する報告は少ない(15)。

第 2 章では、Stage IV 大腸癌における budding の予後ならびに化学療法抵抗性予測因子としての意義を明らかにすることを目的とした。原発巣切除が施行された Stage IV 大腸癌 362 例を対象とし、原発巣の budding を BD1 (軽度)、BD2 (中等度)、BD3 (高度) に分類して検討を行った。

第 2 節 対象と方法

1) 症例

2000 年 1 月から 2018 年 12 月の間、防衛医科大学校病院で初回治療として原発巣切除術を施行した Stage IV 大腸癌 362 症例を対象とした (図 1)。術前化学療法や術前放射線療法を施行した症例は除外した。さらに、DNA ミスマッチ修復 (mismatch repair; MMR) 機能は 2) 方法の項で示す手順で評価し、欠損した腫瘍 (deficient MMR; dMMR) を有する症例は除外した。術後の平均観察期間は 19.9 カ月であった。また、細分類の内訳は、Stage IVA 大腸癌 204 例、Stage IVB 大腸癌 158 例であり、それぞれ 97 例 (47.5%)、24 例 (15.2%) に癌の肉眼的遺残を

認めない遠隔転移巣切除（R0/R1 切除）が施行された。進行度は UICC TNM 分類第 7 版に基づき判定し、組織型や脈管侵襲などの病理組織学的所見については大腸癌取扱い規約第 9 版に基づき評価した。なお、リンパ管侵襲は軽度（Ly0, Ly1a）と高度（Ly1b, Ly1c）、静脈侵襲は軽度（V0, V1a）と高度（V1b, V1c）に分類した。本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認を受けて施行した（承認番号：2415）。

2) 方法

i. budding の評価

Hematoxylin Eosin（HE）染色された切片を用いて腫瘍先進部を観察し、単個または 5 個未満の構成細胞からなる癌胞巣である budding が最も高密度に存在する Hot spot を選択した。Hot spot において 20 倍対物レンズを用い 1 視野内の budding の個数を計測、International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) (34)の基準に従い、BD1 (0 - 4 個)、BD2 (5 - 9 個)、BD3 (10 個以上)に分類し、BD1+BD2 群と BD3 群の 2 群間で比較を行った (図 2)。budding の判定は、予後転帰を含む全ての臨床病理学的情報を伏せられた状態で申請者が施行した。

ii. DNA ミスマッチ修復機能の評価

本研究では、MMR 機能のスクリーニングとして MLH1 (Clone G168-15; BD Biosciences, San Jose, CA) および MSH2 (FE11; Invitrogen, Carlsbad, CA) の免疫組織化学染色を施行した。手順は以下の通りである。キシレンで脱パラフィン後、エタノール濃度を漸減し、親水処理を行った。オートクレーブにて 120°C 15 分

間の抗原賦活化の後、3%過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。非特異的反応の抑制にはスキムミルクを使用した。MLH1 抗体、MSH2 抗体はそれぞれ 50 倍、100 倍希釈して一次抗体とし、4°Cで一晩反応させた。二次抗体は Envision system anti-mouse (Dako, Grostrup, Denmark) を使用し、室温にて 2 時間反応させた。0.1%の DAB 溶液で 8 分間の発色の後、2 分間ヘマトキシリンで核染色を施行した。一次抗体を加えないものを陰性コントロール、正常の大腸粘膜を内因性陽性コントロールとして、MLH1 または MSH2 のどちらか 1 つでも陰性の症例を dMMR と評価した(40-42)。

iii. 治療成績の評価指標

原発巣切除後、転移巣に対する化学療法が施行された症例では、3 か月ごとに CT を撮影し、化学療法開始前の最も大型の転移巣の最大径を基準として、転移巣腫瘍径変化率 (Change of tumour size; CTS) を評価した。腫瘍縮小を認めた症例では最も縮小した時点での腫瘍径、増大を認めた症例では化学療法開始 3 か月後の腫瘍径を用い、CTS を算出した。CTS 高値の症例から順に並べグラフ化したウォーターフォールプロット解析を実施した。病勢進行

(Progressive disease; PD) の基準となる 20%以上の増大を cut-off 値として、20%以上増大を認めた症例の割合を比較検討した。また、治療開始時に切除不能転移性大腸癌と判断された症例のうち、化学療法が奏効して、転移巣切除が実施された症例の割合を conversion rate として評価した。

iv. 統計学的手法

統計的解析にあたっては、カテゴリカル変数についてはカイ 2 乗検定あるいは

はフィッシャーの正確検定を用いて行った。全生存 (Overall survival; OS) 期間は原発巣切除から全ての原因による死亡までの期間と定義した。生存解析については Cox 比例ハザードモデルを用いた。生存曲線は Kaplan–Meier 法によって計算し、ログランク検定によって解析した。各統計計算は JMP® pro14.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

第 3 節 結果

1) 臨床病理学的背景および budding との相関

原発巣切除時年齢の中央値は 67 歳 (28–91 歳) で男性 223 例、女性 139 例であった。腫瘍占居部位は右側大腸が 99 例、左側大腸が 263 例であった (表 1)。BD3 群では BD1+BD2 群と比較し、深達度 T4 症例 (67% vs 45%; $P < 0.001$)、低分化腺癌もしくは粘液癌症例 (19% vs 11%; $P = 0.041$)、静脈侵襲高度症例 (78% vs 68%; $P = 0.026$)、リンパ管侵襲高度症例 (49% vs 21%; $P < 0.001$)、リンパ節転移陽性症例 (91% vs 75%; $P < 0.001$)、遠隔転移 M1b 症例 (51% vs 37%; $P = 0.007$) の割合が有意に高かった。また、BD3 群で、遠隔転移巣切除により転移巣癌遺残度 R0/R1 が得られた症例の割合は低率であった (24% vs 42%; $P < 0.001$)。

2) budding 程度別の化学療法の効果

原発巣切除後、CT 画像により詳細に転移巣が評価できた 127 症例を対象として、budding 程度別にウォーターフォールプロット解析を実施した (図 3)。化学療法施行後において 20%以上増大を認めた症例の割合は BD3 群では 20% (13/66)、BD1+BD2 群では 10% (6/61) であり、BD3 群で高い傾向にあった ($P = 0.094$) (図 3a,b)。

オキサリプラチン が投与された症例における検討でも、20%以上増大を認め

た症例の割合は BD3 群で 21.7% (10/46)であり、BD1+BD2 群 の 4.7% (2/43)と比較して有意に高率であった ($P = 0.016$) (図 3c,d)。

3) budding 程度別の conversion rate

化学療法開始時に切除不能な転移巣を有し、全身化学療法を実施した 141 例を対象とした検討において、conversion rate は BD3 群で 18% (15/85)、BD1+BD2 群では 36% (20/56)であり、BD3 群では有意に低率であった ($P = 0.016$)。

4) budding の程度と予後との関連

Stage IV 大腸癌全症例の 5 年 OS 率は、30.3%であり、BD 程度別の OS の比較では、BD3 群 (5 年 OS 率: 18.4%) は BD1+BD2 群 (同: 40.5%) と比較して有意に予後不良であった ($P < 0.001$) (図 4a)。Cox 回帰分析に基づく単変量解析の結果、予後不良因子として、壁深達度 T4 ($P < 0.001$)、BD3 ($P < 0.001$)、リンパ節転移陽性 ($P = 0.033$)、遠隔転移 M1b ($P < 0.001$)、遠隔転移巣癌遺残 R2 ($P < 0.001$) が選択された。 P 値が 0.05 未満の変数を含む多変量解析により、BD3 の独立性が示された ($P = 0.009$; ハザード比 [Hazard ratio; HR] = 1.51; 95%信頼区間 [Confidence interval; CI] = 1.11 – 2.06) (表 2)。さらに、遠隔転移巣癌遺残程度別にサブグループ解析を行ったところ、R0/R1 症例において、BD3 群 (5 年 OS 率: 38%) は BD1+BD2 群 (同: 63%) と比較して有意に予後不良であり ($P = 0.028$) (図 4b)、BD3 が独立した予後不良因子であることが示された ($P = 0.026$; HR = 1.94; 95% CI = 1.08 – 3.43) (表 3)。また、R2 症例においても、BD3 群 (5 年 OS 率: 9.3%) は BD1+BD2 群 (同: 16.9%) と比較して有意に予後不良であるとともに ($P = 0.007$) (図 4b)、BD3 が独立した予後不良因子となり ($P = 0.028$; HR = 1.47; 95% CI = 1.04 – 2.09) (表 4)、遠隔転移巣癌遺残の有無にかかわらず、BD3 が強い予後

不良因子となることが示された。

第4節 考察

第2章では、Stage IV 大腸癌患者の解析から、BD3 症例では、BD1+BD2 症例と比較して OS が有意に不良であることが示された。これまでに Stage IV 大腸癌では、深達度、リンパ節転移、遠隔転移の3因子、すなわち TNM 分類の全ての因子が有意な予後予測因子となることが報告されているが(37, 38, 43-50)、本検討における OS を目的変数とした多変量解析では、BD3、遠隔転移巣癌遺残、深達度 T4 が、独立した予後不良因子であることが示された。また、サブグループ解析では、転移巣完全切除の如何にかかわらず、BD3 の予後不良因子としての有意性が示された。

これまでの分子病理学的研究から、budding は EMT に関連する形態上の表現型であることが示唆されている(17-19)。EMT は、上皮細胞が分子的变化に伴い上皮細胞としての形質を失い、間葉細胞の形質を獲得する現象である。EMT を起こした細胞は、高い浸潤能と転移能を示し、さらに、化学療法抵抗性を示すことが報告されている(20, 21)。また、当教室の検討から、原発巣と肝転移巣の budding の程度に関連が認められるとの結果が得られたことにより(51)、原発巣の budding を検索することで転移巣における budding の程度が予測可能であることが示唆されている。本検討において、原発巣 BD3 群における転移巣腫瘍径変化率は、原発巣 BD1+BD2 群に比べ 20%以上の増大を示す割合が有意に高く、また、conversion rate は、BD3 群において BD1+BD2 群より低率であった。これらのデータは budding の程度つまりは EMT の状況により抗癌剤の治療効果が異なった結果が反映されていると考えられ、原発巣のみの姑息的切除症例において BD3 症例の予後が不良となった一因になっていると推察できる。また、転移

巢を含めた治癒切除実施症例においても **BD3** 症例の予後は不良であった。治癒切除症例では切除後の再発が最大の予後因子となるが、**EMT** に関連する分子機能が亢進した細胞を多く含有することが想定される **BD3** 群では、**BD1+BD2** 群と比較して癌の浸潤能や転移能が高く、これにより再発率が上昇した、との解釈が可能であろう。

第5節 小括

Stage IV 大腸癌において、**budding** は独立した予後因子であり、転移巣切除の有無にかかわらず、予後の層別化が可能であった。**Stage IV** 大腸癌の化学療法施行症例では、**budding** の程度と化学療法抵抗性との関連が示唆された。

第3章 Stage IV 大腸癌における MSLN の予後因子および化学療法抵抗性予測因子としての意義

第1節 背景と目的

MSLNは40kDaのグリコシルホスファチジルイノシトール結合タンパク質で、ヒトの正常組織のうち腹膜を覆う中皮細胞で恒常的に発現しているが、生体内での生理機能は明らかにされていない。基礎研究から MSLN は抗癌剤抵抗性に関与する可能性が示唆されたことから、当教室はこれまでに Stage III 大腸癌患者を対象に検討を行い、原発巣の MSLN 高発現症例では、術後補助化学療法による再発予防効果が不十分であることを報告した(24)。しかし、Stage IV 大腸癌における MSLN 発現と予後ならびに化学療法抵抗性との関連についての検討はなされていない。

近年、生命予後を規定する転移臓器の治療を重視する観点から、Stage IV 大腸癌では原発巣の切除よりも転移巣の切除を先行することも多い(2, 52)。また、転移巣切除前の抗癌剤治療は広く実施されているが、効果の良し悪しとその後の経過に大きく影響することから、抗癌剤治療効果予測が危急の問題と認識されている。内視鏡生検組織は Stage IV 大腸癌において、治療開始前に入手可能な唯一の癌組織であり、これを用いた治療効果予測法が確立されれば、個別化治療の発展に資するところが大きい。我々は、大腸癌における MSLN 発現を検証し、生検検体と切除検体における腫瘍浸潤先進部との一致率は 87.4%と高率であることを確認している(28)。また、部位別の検索から、腫瘍周堤における MSLN 発現は腫瘍中央部、粘膜下層内水平先進部、漿膜下層内垂直先進部の発現と、有意な関連が確認された(27)。内視鏡下生検により MSLN 発現が評価できると解釈できる結果であり、MSLN 発現が Stage IV 大腸癌において化学療法抵抗性に

関連する場合、生検組織内の MSLN 発現を指標として、治療法を組み立てる戦略が成り立つ。

第 3 章では、Stage IV 大腸癌における MSLN 発現と予後ならびに化学療法抵抗性の関連を明らかにすることを目的とした。原発巣切除術が施行され、その後全身化学療法が行われた Stage IV 大腸癌 254 症例を対象とし、外科的切除標本の代表切片における MSLN 発現を評価した。化学療法の効果は画像により評価し、MSLN 発現との関連性について検討した。

第 2 節 対象と方法

1) 症例

2000 年 1 月から 2019 年 12 月の間、防衛医科大学校病院で Stage IV と診断された 458 症例を対象として後方視的に検討を行った。術前化学療法や術前放射線療法の実施症例、転移巣同時切除症例および dMMR 症例は除外し、転移巣に対する全身化学療法が実施された 254 例を研究対象とした (図 5)。壁深達度、リンパ節転移、腫瘍分化度、脈管侵襲、遠隔転移臓器などの所見については大腸癌取扱い規約第 9 版に基づき評価した(53)。なおリンパ管侵襲は軽度 (Ly0, Ly1a) と高度 (Ly1b, Ly1c) に、静脈侵襲も軽度 (V0, V1a) と高度 (V1b, V1c) に分類した。本研究は学内倫理委員会の承認を得て施行した (承認番号 2892)。

2) 方法

i. 免疫組織化学染色と評価

腫瘍の代表切片のパラフィンブロックを選択し、4 μ m に薄切した切片をシランコーティングされたスライドガラスにマウントして、キシレンで脱パラフィン後、エタノール濃度を次第に漸減し親水処理を行った。抗原賦活化は、市販の

試薬キット (415211; ニチレイバイオサイエンス, Tokyo, Japan) を使用して、pH9.0 の条件下にてオートクレーブ内で 121°C、15 分間の熱処理を施行後、3% 過酸化水素水を用いて内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。非特異反応の抑制にはスキムミルクを使用した。30 倍希釈した MSLN に対するマウスモノクローナル抗体 (clone 5B2; Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK) を一次抗体とし、4°C で一晩反応させた。二次抗体は Envision+system-HRP (Dako, Grostrup, Denmark) を使用し、室温で 2 時間反応後、0.1% diaminobenzidine (DAB) 溶液で 10 分間発色の後、2 分間ヘマトキシリンで核染色を施行した。なお、切除標本中に含まれる大腸漿膜面の腹膜中皮細胞を陽性コントロールとした。

免疫組織化学染色の評価は、予後転帰を含む全ての臨床病理学的情報を伏せられた状態で申請者が施行し、さらに、評価の再現性を検証するため、全ての病理標本を申請者とは別のひとりの評価者が独立して評価を行った。MSLN 発現は発現率を評価することとし、組織中に含まれる全癌細胞のうち MSLN 染色を認める癌細胞の割合を 5% 刻みで評価した。cut-off 値については、原発巣切除後に導入された全身化学療法施行後 3 か月時点での病勢進行（標的病変の 20% 以上の増大または新規病変出現）を目的変数とした receiver operating characteristic (ROC) 解析に基づいて 25% に設定し、MSLN 高発現群 ($\geq 25\%$) および MSLN 低発現群 ($< 25\%$) の 2 群に分類した。2 人の評価者間で陽性陰性の判断結果が一致しなかった場合、再評価後にコンセンサスを得ることとし、評価者間の判定の一致度を Landis と Koch の基準に従って κ 係数により評価した(54)。 κ 係数に基づく一致率の解釈は、poor (< 0.00)、slight (0.00-0.20)、fair (0.21-0.40)、moderate (0.41-0.60)、substantial (0.61-0.80)、almost perfect (0.81-1.000) とした。

MSLN の実際の免疫組織化学染色の病理像を図 6 に示す。MSLN の細胞内における染色様式として、細胞極性が保たれた癌細胞の管腔内側に染色性を示す

もの、癌細胞の極性が保たれておらず間質に面する細胞表面や細胞質内に染色性を示すもの、細胞集塊の外側に染色性を示すものなどが挙げられるものの、混在することも多く、先行研究(24) に倣い、区別せず陽性として扱った。

ii. DNA ミスマッチ修復機能の評価

本章では、MMR 機能のスクリーニングとして MLH1、MSH2、MSH6 および PMS2 の免疫組織化学染色を施行した。免疫組織化学染色の手法は上述手順と同様であるが、使用した一次抗体は、マウス抗 MLH1 モノクローナル抗体 (Clone G168-15; BD Biosciences, San Jose, CA, USA)、マウス抗 MSH2 モノクローナル抗体 (FE11; Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) マウス抗 MSH6 モノクローナル抗体 (clone PU29; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK)、マウス抗 PMS2 モノクローナル抗体(clone M0R4G; Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle, UK)であり、抗 MLH1 抗体、抗 MSH2 抗体、抗 MSH6 抗体および抗 PMS2 抗体はそれぞれ 50 倍、100 倍、100 倍、100 倍希釈して 4°Cで一晩反応させた。二次抗体は Envision+system-HRP(Dako) を使用し、室温にて 2 時間反応させた。0.1%の DAB 溶液で 8 分間の発色の後、2 分間ヘマトキシリンで核染色を施行した。一次抗体を加えないものを陰性コントロール、正常の大腸粘膜を内因性陽性コントロールとして、MLH1、MSH2、MSH6、PMS2 のいずれか 1 つでも陰性の症例を DNA ミスマッチ修復機能に異常のある dMMR と評価した。

iii. 治療成績の評価指標

原発巣切除後、転移巣に対する化学療法が施行された症例では、3 か月ごとに CT を撮影し、Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) 1.1 に従い、治療効果の評価を実施した。すなわち、腫瘍が画像上消失したものを完全奏効

(Complete response; CR)、標的病変の最大径の総和が 30%以上縮小した場合を部分奏効 (Partial response; PR)、3 か月経過時に 20%以上の増大もしくは新出病変が確認された場合、病勢進行 (Progressive disease; PD)、いずれにも当てはまらない場合を安定 (Stable disease; SD)と判定した。CR もしくは PR の症例の割合を客観的奏効率 (Objective response rate; ORR)、CR、PR もしくは SD の症例の割合を病勢コントロール率 (Disease control rate; DCR) と定義した。

また、原発巣切除後 CT 画像により詳細に転移巣が評価できた症例では、第 2 章と同様の方法を用い、化学療法開始前の最も大きな転移巣の最大径を基準として CTS を算出し、ウォーターフォールプロット解析を実施した。また、治療開始時に切除不能転移性大腸癌と判断された症例のうち、化学療法が奏効して、転移巣切除の実施された症例の割合を conversion rate として評価した。

iv. 統計学的手法

MSLN 発現とその他の臨床病理学的因子との関連は、カイ二乗検定またはフィッシャーの正確検定を用いて検討した。 P 値の調整には多重検定のボンフェローニ補正を用い、 $P < 0.0042$ を有意差ありとした。無増悪生存 (Progression-free survival; PFS) 期間は、原発巣切除後に化学療法を開始した時点から画像で PD と判断されるまでの期間と定義した。生存曲線は Kaplan-Meier 法によって計算し、ログランク検定によって解析した。各統計計算は JMP[®] pro14.0 (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、多重検定の際のボンフェローニ補正を除き、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

第3節 結果

1) 評価者間の一致率および免疫組織化学染色による MSLN 発現と臨床病理学的特徴との関連

本検討で定義した分類に基づくと、Stage IV 大腸癌 254 例のうち、41 例 (16.1%) が MSLN 高発現であり、213 例 (83.9%) が MSLN 低発現であった。2 人の評価者間での判定の一致率は 95.1% ($\kappa=0.83$, almost perfect) であった。免疫組織化学染色による MSLN 発現と他の臨床病理学的特徴との関連を表 5 に示す。MSLN 発現は遠隔転移巣癌遺残の有無との間に有意な関連を認めた ($P=0.005$ 、ボンフェローニ補正後 $P=0.022$)。MSLN 高発現群では有意差はないものの、BD3 症例が高率であった ($P=0.133$)。

2) 免疫組織化学染色による MSLN 発現と化学療法効果との関連

全身化学療法による大腸癌転移巣に対する治療効果を表 6 に示す。CR を達成した症例数は、MSLN 高発現群では皆無であったが、MSLN 低発現群で 5 例 (2.4%) 認めた。MSLN 高発現群の ORR は 22.0% であったが、MSLN 低発現群では 45.5% で MSLN 高発現群において治療効果が不良であった ($P=0.005$)。また、DCR についても高発現群および低発現群でそれぞれ 65.9%、85.9% であり、両群間に有意差を認めた ($P=0.002$) (表 6)。転移形式別に見ると、血行性転移症例では MSLN 高発現群の ORR は 23.7% (9/38)、低発現群では 47.4% (92/194) ($P=0.006$) であり、腹膜播種症例では MSLN 高発現群の ORR は 16.7% (2/12)、低発現群では 37.5% (12/32) ($P=0.189$) であった。血行性転移症例において MSLN 高発現群の ORR は有意に低率であった。

3) MSLN 発現程度別のウォーターフォールプロット解析

原発巣切除後、CT 画像により詳細に転移巣が評価できた 199 名に対し CTS を計測、ウォーターフォールプロット解析を行った (図 7)。全症例を対象とした検討では、20%以上増大した症例の割合は、MSLN 高発現群、低発現群でそれぞれ 31.0%、13.5%であり、高発現群で有意に高率であった ($P=0.028$) (図 7a)。オキサリプラチン使用症例に限った検討においても、20%以上増大した症例の割合は MSLN 高発現群で高い傾向にあった。(26.3% vs. 10.5%; $P=0.078$) (図 7b)。

4) MSLN 発現程度別 conversion rate

化学療法開始時の転移巣切除不能症例 187 例のうち、22 例が全身化学療法の腫瘍縮小効果により切除可能と判断され、転移病巣に対して手術が施行された。conversion rate は MSLN 高発現群で 0% (0/30)、MSLN 低発現群で 14.0% (22/157) であり、高発現群で有意に低率であった ($P=0.005$)。

5) MSLN 発現程度別 PFS および OS

PFS 期間中央値は、MSLN 高発現群で 6.5 カ月 (95% CI, 4.3-8.9 カ月)、MSLN 低発現群で 10.0 カ月 (95% CI, 8.9-12.2 カ月) であった (図 8a)。化学療法開始後 12 カ月時点での PFS 率は MSLN 高発現群で 20.0%、MSLN 低発現群で 44.1% であった ($P=0.012$)。OS 期間中央値は、MSLN 高発現群で 1.5 年 (95% CI, 1.1-2.8 年)、MSLN 低発現群で 2.6 年 (95% CI, 2.2-3.0 年) であった (図 8b)。3 年 OS 率は、MSLN 高発現群で 23.5%、MSLN 低発現群で 41.5% であった ($P=0.012$)。さらに、オキサリプラチン使用症例に限った検討 (図 8c, d) では、MSLN 高発現群で MSLN 低発現群に比較して PFS が有意に不良であった (12 ヶ月 PFS 率: 14.9% vs. 48.5%; $P=0.008$) が、OS は両群間で有意差を認めなかった (3 年 OS

率: 26.3% vs. 44.1%; $P = 0.111$)。

第4節 考察

第3章では、Stage IV 大腸癌を対象として、免疫組織化学染色の手法を用い、MSLN 発現と臨床病理学的因子および予後との関連について検討した。MSLN 発現は budding の程度と有意な関連がなかったが、その高発現は予後不良因子として選択された。また、化学療法による治療効果との関連について検討し、MSLN 高発現症例では PD となる割合が高率で、また、ORR の得られる割合が低率となり、結果として conversion rate がより低率に抑えられた。これらの結果は、MSLN を高発現する Stage IV 大腸癌が高い化学療法抵抗性を有していることを示唆すると考えられ、患者の不良な OS や PFS の一因となっていると考えられた。なお、本研究では MSLN 発現と budding との関連性は統計学的な有意レベルに達しなかった。これは対象を Stage IV 症例のうち原発巣切除実施かつ全身化学療法の施行できた症例に限ったことから、原発巣切除が適切ではないと考えられる周囲臓器への浸潤が高度な症例や化学療法の導入が急がれる多発遠隔転移症例、あるいは高度進行による全身状態悪化により既に全身化学療法が施行できる状態ではなかった症例が除外されていることが誘因になっていると考えている。すなわち、BD3 症例や MSLN 高発現症例は遠隔転移巣分類が進行するに従い割合が高くなることが本検討でも示されているが、BD3 かつ MSLN 高発現症例の割合が高く見積もられる高度進行症例が高頻度で除外されてしまう選択バイアスが発生したことにより MSLN 発現と budding との関連性が低下した可能性があるだろう。

MSLN 発現と抗癌剤に対する薬剤耐性との関連する分子生物学的背景である

が、MSLN が PI3K/Akt 経路の活性化により Bcl-2 および Mcl-1 を含む抗アポトーシス蛋白の発現を亢進させること(25)、PI3K/Akt 経路の活性化は EMT を惹起させる働きがあること(26)が報告されている。MSLN 発現程度の化学療法抵抗性予測因子としての意義を臨床データをもとに証明した今回の検討は、これらの基礎的知見を今後の臨床応用へ発展させるうえでの橋渡し研究としての役割を果たしておりその重要性は高い。

以上より、本研究により MSLN 高発現 Stage IV 大腸癌症例では、その腫瘍の化学療法抵抗性が高く、PFS および OS が不良であることが示された。生検に基づく MSLN 評価方法が確立されれば、Stage IV 大腸癌の手術先行／化学療法先行の別を決断する際の治療法選択にあたり重要な検査ツールとなる可能性がある。

第 5 節 小括

Stage IV 大腸癌における MSLN の高発現は化学療法抵抗性の予測因子であるとともに、予後不良因子であることが示された。

第4章 MSLN 強制発現大腸癌細胞株に対する抗体薬の抗腫瘍効果

第1節 背景と目的

第3章における検討で、Stage IV 大腸癌における MSLN の悪性度規定因子としての意義が示唆された。加えて諸家の基礎研究の結果から、膀胱癌細胞での MSLN 発現は細胞遊走能や浸潤能に影響を及ぼし、また、肺癌や悪性中皮腫での発現は EMT およびがん幹細胞性の獲得に関与していると考えられ(55, 56)、MSLN 発現と悪性度上昇の関連性は強いものと解釈できる。しかしながら、大腸癌細胞における検討は十分になされていない。

そこで、本章では MSLN 強制発現大腸癌細胞株を用いて大腸癌における MSLN 発現による悪性度の変容を明らかにするとともに、MSLN を標的とする高親和性モノクローナル抗体により MSLN の情報伝達の下流をブロックすることで得られる変化を明らかにして MSLN の機能の一端を解明することを目的とした。

第2節 対象と方法

1) 大腸癌細胞株および抗 MSLN 抗体

MSLN 発現を認めない大腸癌細胞株 DLD-1 と MSLN を強制発現させた ERC-DLD-1 (順天堂大学病理・腫瘍学講座梶野一徳医学博士のご厚意により譲渡) を使用した (図 9)。MSLN を標的とする高親和性モノクローナル IgG 抗体である 345A12 (抗 MSLN 抗体) は、MORPHOTEK INC (米国ペンシルベニア州エクストン) から入手した。

2) 細胞培養法

培養用培地として 10% ウシ胎児血清 (fetal bovine serum; FBS) および抗生剤 (100IU/ml ペニシリン、100 μ g/ml ストレプトマイシン) を含む RPMI1640 培地上で 37°C、5%CO₂ の条件下で培養した。

3) Western blotting

培養した DLD-1 および ERC-DLD-1 にそれぞれ 2 \times sodium dodecyl sulfate (SDS) -sample buffer および還元剤を加え、Bioruptor® (BM Equipment Co., Ltd., Tokyo, Japan) で超音波処理し、12,000 rpm 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- polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) (12.5% アクリルアミドゲル) により分離し polyvinylidene difluoride (PVDF) 膜に転写した。PVDF 膜を Block-Ace™ (DS Pharma Biomedical Co, Ltd, Osaka, Japan) と 2 時間室温で攪拌後、抗 MSLN 抗体 (0.2 μ g/ml, clone MN-1; Rockland, Pottstown, PA) および 抗 GAPDH 抗体 (0.2 μ g/ml, ab125247; Abcam, Cambridge, M, USA) とそれぞれ 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、horseradish peroxidase (HRP) 抗体 (DAKO, Grostrup, Denmark) 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。

4) 大腸癌細胞株における MSLN 強制発現の悪性度への影響

i. Proliferation assay

大腸癌細胞株 DLD-1 および ERC-DLD-1 の増殖能を 24 時間ごとに 5 日間

評価した。96well プレートに 3.0×10^3 個の癌細胞株を播種し、各評価のタイミングでは、生細胞数測定試薬である Cell Count Reagent SF (ナカライテスク, Kyoto, Japan) を 10 μ l/well で添加し発色させ、プレートリーダーを用いて 450nm 吸光度を測定し、増殖能を評価した。

ii. Migration assay

大腸癌細胞株 DLD-1 および ERC-DLD-1 の遊走能を 8.0 μ m Transparent PET membrane を用いた Migration assay により測定した。チャンバーの下層には 10% FBS を含む RPMI1640 を加え、上層には FBS を含まない RPMI1640 に 1.5×10^5 個の癌細胞株を懸濁した細胞溶液を加えた。24 時間培養した後にチャンバーを取り出し、membrane 下層に付着する細胞の固定・Diff-Quick 染色を行い光学顕微鏡で観察し、細胞数を評価した。

iii. Invasion assay

マトリゲルインベーションチャンバーを用いた invasion assay にて浸潤能を測定した。チャンバー下層には、10% FBS を含む RPMI1640 を加え、上層には FBS を含まない RPMI1640 に 1.5×10^5 個の癌細胞株を懸濁した細胞溶液を加えた。24 時間培養した後にチャンバーを取り出し、membrane 上層に残る細胞を除去し、membrane 下層に付着する細胞の固定・Diff-Quick 染色を行い光学顕微鏡で観察し、細胞数を評価した。

iv. Soft agar colony formation assay

DLD-1 および ERC-DLD-1 (1.0×10^4 個) を培養液に懸濁し、最終寒天濃度 0.36% の細胞-寒天混合懸濁液を作製した。0.75% 寒天培地を塗布した 6 ウェ

ルプレートに、作製した 0.36% の細胞-寒天混合懸濁液を播種し、培養した。1 週間培養後、コロニーを光学顕微鏡で観察し、コロニー形成数を計測することで、足場非依存性増殖の評価を行った。

5) MSLN 発現および非発現大腸癌細胞株に対する抗 MSLN 抗体の効果

i. 抗 MSLN 抗体の濃度設定

入手元から提示された至適濃度から、抗 MSLN 抗体の *in vitro* での ERC-DLD-1 増殖抑制に必要な最低限の最適な濃度設定を行った。96 ウェルプレートに 3.0×10^3 個の ERC-DLD-1 を播種し、48 時間培養した。培養液を吸引除去した後、培養液単独、IgG 50 μ g、100 μ g、抗 MSLN 抗体 50 μ g、100 μ g を加えた培養液をそれぞれ加え、48 時間培養した。その後 Cell Count Reagent SF を 10 μ l/well で添加し発色させ、プレートリーダーを用いて 450nm 吸光度を測定し、増殖能を評価した。

ii. Proliferation assay

96 ウェルプレートに 3.0×10^3 個の大腸癌細胞株 (DLD-1 もしくは ERC-DLD-1) を播種し、48 時間培養した。培養液を吸引除去した後、培養液単独、IgG を加えた培養液、抗 MSLN 抗体を加えた培養液をそれぞれ加え、48 時間培養した。その後 Cell Count Reagent SF を 10 μ l/well で添加し発色させ、プレートリーダーを用いて 450nm 吸光度を測定し、増殖能を評価した。

iii. Migration assay

8.0 μ m Transparent PET membrane を用いた Migration assay を行うにあたり、10% の FBS を含んだ培養液単独、IgG を追加した培養液、抗 MSLN 抗

体を追加した培養液をそれぞれ下層に満たした3種類のチャンバーを用意し、上層にはFBSを含まないRPMI1640に 1.5×10^5 個の癌細胞株（DLD-1もしくはERC-DLD-1）を懸濁した細胞溶液を加えた。24時間培養した後にチャンバーを取り出し、membrane下層に付着する細胞の固定・Diff-Quick染色を行い光学顕微鏡で観察し、遊走した細胞数の違いを評価した。

iv. Invasion assay

マトリゲルインベーションチャンバーを用いたinvasion assayを行うにあたり、10%のFBSを含んだ培養液単独、IgGを追加した培養液、抗MSLN抗体を追加した培養液をそれぞれ下層に満たした3種類のチャンバーを用意し、上層にはFBSを含まないRPMI1640に 1.5×10^5 個の癌細胞株（DLD-1もしくはERC-DLD-1）を懸濁した細胞溶液を加えた。24時間培養した後にチャンバーを取り出し、membrane下層に付着する細胞の固定・Diff-Quick染色を行い光学顕微鏡で観察し、遊走した細胞数の違いを評価した。

v. Soft agar colony formation assay

DLD-1もしくはERC-DLD-1（ 1.0×10^4 個）を培養液に懸濁した溶液を用意し、それぞれの細胞株について単独、もしくはIgGを加えたもの、抗MSLN抗体を加えたものの3種類の細胞懸濁液を調整、それぞれ最終寒天濃度0.36%の細胞-寒天混合懸濁液を作製した。0.75%寒天培地を塗布した6ウェルプレートに、作製した3種類の0.36%の細胞-寒天混合懸濁液を播種し、培養した。1週間培養後、コロニーを光学顕微鏡で観察し、3種類間でのコロニー形成数の違いについて評価し、足場非依存性増殖能の比較を行った。

6) マウス皮下移植モデルにおける抗 MSLN 抗体の抗腫瘍効果に関する検討

大腸癌細胞株 (DLD-1 または ERC-DLD-1: それぞれ 5.0×10^5 個) を、BALB/cSlc-nu/nu マウス (female, 5–6 週齢, Japan, SLC, Hamamatsu, Japan) の背部皮下に注入し、抗 MSLN 抗体 (200 mg/kg) を移植後 7 日目から 2 日毎に腹腔内投与、腫瘍の長径と短径を 2 日ごとに計測して *in vivo* における抗 MSLN 抗体の抗腫瘍効果を評価した。腫瘍体積は下記計算式を用いて算出した。

$$\text{腫瘍体積 (mm}^3\text{)} = [(\text{長径}) \times (\text{短径})^2] \div 2$$

動物実験における全ての手順は、防衛医科大学校動物実験倫理委員会の承認を受け、当校における実験動物の管理と使用に関するガイドラインに従って実施した。

7) 統計的解析

In vitro の実験は Proliferation assay、Migration assay、Invasion assay では 5 回ずつ実施し、Soft agar formation assay では各々 5 か所のデータを取りその比較には、スチューデント *t* 検定を使用した。マウスを用いた *in vivo* 実験ではそれぞれの群で 4 匹ずつ使用しその比較にはスチューデント *t* 検定を使用した。統計学的解析は JMP® Pro 14 ソフトウェア (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用い、 $P < 0.05$ を有意差ありとした。

第 3 節 結果

1) 大腸癌細胞株における MSLN 強制発現の悪性度への影響

i. Proliferation assay

3 日、4 日、5 日間培養した際の吸光度は、DLD-1 群より ERC-DLD-1 群で高値であり、ERC-DLD-1 群で有意に増殖能が高いことが示された (それぞ

れ、 $P = 0.0001$ 、 $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$) (図 10)。

ii. Migration assay

0.5 mm^2 の領域を対物レンズ 40 倍で無作為に 5 視野ずつ観察し、細胞数の平均を算出した。DLD-1 で 23.0 個、ERC-DLD-1 で 35.2 個と、ERC-DLD-1 で高値であり、遊走能の高いことが示された ($P < 0.0001$) (図 11)。

iii. Invasion assay

0.5 mm^2 の領域を対物レンズ 40 倍で無作為に 5 視野ずつ観察し、マトリゲル内に浸潤した細胞数の平均を算出した。DLD-1 で 21.4 個、ERC-DLD-1 で 35.9 個と、ERC-DLD-1 で高値であり、浸潤能の高いことが示された ($P < 0.0001$) (図 12)。

iv. Soft agar colony formation assay

MSLN 強制発現させた ERC-DLD-1 では、DLD-1 と比較して有意にコロニー形成数が増加し、足場非依存性増殖が促進されることを確認した (ERC-DLD-1: 76.1 個、DLD-1: 59.3 個; $P = 0.0056$) (図 13)。

2) MSLN 発現および非発現大腸癌細胞株に対する抗 MSLN 抗体の効果

i. 抗 MSLN 抗体の濃度設定

抗 MSLN 抗体 $50 \mu\text{g}$ 添加群では、Control 群と比較して、吸光度は有意に低下していたが ($P = 0.0040$)、同量の IgG 添加群とは有意差を認めなかった。抗 MSLN 抗体 $100 \mu\text{g}$ 添加した場合、Control 群、IgG 添加群それぞれと比較して吸光度は有意に低下していた (それぞれ $P < 0.0001$ 、 $P < 0.0001$)。この結果

から、以降の実験では $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で抗 MSLN 抗体を使用した。

ii. Proliferation assay

DLD-1 株では抗 MSLN 抗体投与群と Control 群との間で吸光度に有意差を認めなかった。しかし、ERC-DLD-1 株では抗 MSLN 抗体を投与することで、Control 群より吸光度が減弱し、有意に増殖が抑制された ($P < 0.0001$) (図 14)。

iii. Migration assay

遊走した細胞数を計測したところ、DLD-1 株では抗 MSLN 抗体投与群と Control 群との間で有意差を認めなかった。しかし、ERC-DLD-1 株では、抗 MSLN 抗体を投与することで、Control 群と比較して遊走する細胞数が有意に抑制された ($P = 0.0107$) (図 15)。

iv. Invasion assay

浸潤した細胞数を計測したところ、DLD-1 株では抗 MSLN 抗体投与群と Control 群との間で有意差を認めなかった。しかし、ERC-DLD-1 株では、抗 MSLN 抗体を投与することで、Control 群と比較して浸潤する細胞数が有意に抑制された ($P = 0.0050$) (図 16)。

v. Soft agar colony formation assay

DLD-1 株では、Control、抗 MSLN 抗体投与の各群におけるコロニー形成数に有意差を認めなかった。しかし、ERC-DLD-1 株では、有意差を認めないものの、抗 MSLN 抗体を投与することでコロニー形成が抑制される傾向

を認めた ($P = 0.0832$) (図 17)。

3) マウスを用いた皮下移植モデルにおける各細胞株に対する抗 MSLN 抗体の抗腫瘍効果に関する検討

図 18 に各細胞株の腫瘍体積の推移をグラフ化し、抗 MSLN 抗体の増殖抑制効果の比較を行った。17 日目の時点で、DLD-1 の場合、投与を行わない Control 群の平均腫瘍体積 (\pm 標準誤差 [Standard error of the mean; SEM]) は $322.0 (\pm 28.0) \text{ mm}^3$ ($n = 4$)、抗 MSLN 抗体投与を行った抗 MSLN 抗体投与群の平均腫瘍体積 (\pm SEM) は $367.6 (\pm 68.2) \text{ mm}^3$ ($n = 4$) であり差は認めなかった。一方、ERC-DLD-1 の場合、Control 群の平均腫瘍体積 (\pm SEM) は $430.1 (\pm 47.8) \text{ mm}^3$ ($n = 4$)、抗 MSLN 抗体投与群の平均腫瘍体積 (\pm SEM) は $139.1 (\pm 35.3) \text{ mm}^3$ ($n = 4$) であり、MSLN 発現細胞株において、抗 MSLN 抗体の抗腫瘍効果が認められた ($P < 0.0001$) (図 18)。

MSLN 強発現細胞株である ERC-DLD-1 を移植したマウスを義死させた後に皮下移植片を摘出し、抗 MSLN 抗体で免疫組織化学染色を行った組織像を示す (図 19)。抗 MSLN 抗体投与群では、腫瘍内の MSLN 発現の減弱を認めたが、Control 群では MSLN の強発現が確認された。

第 4 節 考察

これまでの肺癌・悪性中皮腫(33)、膵癌(55, 56)、乳癌(57)における基礎検討から、MSLN 発現は EMT を誘発することで、浸潤能・転移能を強化させることが示唆されている。さらに、MSLN の過剰発現は STAT3 の活性化を引き起こすことで Cyclin E/CDK2 複合体を形成、あるいは、NF- κ B を活性化するとともに IL-6 の産生を増加させ、癌細胞の増殖を促すことが確認されている(58, 59)。また、

MSLN の下流に位置する Akt、ERK1/2、JNK 経路は、マトリックスメタロプロテアーゼ 7 (MMP-7) の発現を増加させ、細胞の移動能と浸潤能を促進することが報告されている(60)。一方、抗体療法に関する基礎研究では、モノクローナル抗体の投与により細胞接着の崩壊がすすみ、抗体容量依存性の細胞毒性を示すことや(61)、MSLN と CA125 との相互作用を阻害し、浸潤や転移を抑制することが示されている(62)。しかし、大腸癌において同様の基礎的な検討はなされていない。

今回の大腸癌細胞株を用いた検討でも、MSLN 発現が増殖能、浸潤能、遊走能、さらには足場非依存性増殖を促進させることが示された。第 3 章の臨床検討において、MSLN 高発現症例では、深達度が深く、播種病変の割合が高いことが示されているが、このような MSLN 発現細胞の分子生物学的特徴が背景に存在した結果と考えられる。また、MSLN 強発現株では抗 MSLN 抗体の投与が増殖、遊走、浸潤の抑制に働くことが示された。大腸癌においても他癌と同様に MSLN を起点とした悪性度を司る分子メカニズムが存在し、それをブロックすることで悪性度抑制効果が得られたと推察される。また、本研究のマウスを用いた皮下移植モデルでは、MSLN 強発現株に対して抗 MSLN 抗体を投与した結果、MSLN 発現細胞割合が低下した。抗 MSLN 抗体が MSLN 発現細胞に対し選択的に抗腫瘍効果を発揮し増殖抑制したことで、腫瘍全体の MSLN 発現細胞の割合が低下し、腫瘍体積増大が抑えられた可能性が示唆される。

MSLN が抗アポトーシス作用、あるいは癌幹細胞性獲得との関連を示すとの報告が散見される。抗アポトーシス作用と癌幹細胞性獲得は、ともに抗癌剤治療抵抗性に直接影響する分子メカニズムとして注目する必要がある。具体的には、

MSLN が Akt、ERK1/2、JNK シグナル伝達経路を活性化し、Bim、Bad、Bax などのプロアポトーシスファミリーのタンパク発現を抑制することで、アポトーシスを抑制し、Bcl-x1/Bcl-2 を刺激して細胞死を回避することが報告されている(63)。膵臓癌細胞株では CD44、c-MET、ALDH1 などの癌幹細胞マーカー発現に関与しているとの報告もある(55, 62)。今後、MSLN 発現大腸癌細胞株を用い、抗癌剤治療抵抗性のメカニズムについて研究を発展させる必要がある。また現在、大腸癌の臨床では複数の抗癌剤が単剤療法や併用療法で使用されているが、それら薬剤における抗 MSLN 抗体薬併用の上乘せ効果に関する検討は、臨床での利用方法や利用価値を見極める上で重要であろう。

第5節 小括

MSLN の発現が増殖能、浸潤能、遊走能および足場非依存性増殖に影響を及ぼしている可能性が示唆された。さらに、MSLN を標的とする高親和性モノクローナル IgG 抗体である 345A12 投与により悪性度が抑制されることから、抗体療法が MSLN 発現大腸癌の治療に有用である可能性が示唆された。

第5章 考察

Stage IV 大腸癌に対する治療は着実に進化してきた。しかし、抗癌剤治療効果予測と標的治療の充実によるさらなる治療成績の向上が求められている。MSLN は抗癌剤治療抵抗性予測のバイオマーカーとなるだけでなく、機能的に悪性度上昇や抗癌剤治療抵抗性に関与していると推測でき、標的としての注目度は高い。また、すでに他癌では MSLN をターゲットとした標的治療の試験が開始されており、2020 年 Hassan らは、MSLN を発現する高度進行再発悪性腫瘍（悪性中皮腫、卵巣癌、膵癌など）を対象とし、抗 MSLN 抗体を含む抗体薬物複合体の効果に関する第 1 相試験の結果を報告した(64)。標準治療に抵抗性を示す固形癌 148 症例が登録されているが、治療により 1 症例が CR、11 症例が PR、66 症例が SD を達成しており高い抗腫瘍活性も証明された。また、この報告のなかで、MSLN 標的療法的主要有害事象は、倦怠感、吐気・嘔吐、下痢、食欲不振、末梢感覚神経障害、角膜障害であり、薬剤に関連した死亡例は存在せず、良好な忍容性が示された。この結果をもとに Hassan らは今後、MSLN 発現を認めるがん腫を幅広く対象とした第 2 相臨床試験を計画している。

大腸癌の特殊性として悪性中皮腫や膵癌と違い、MSLN 発現細胞割合が比較的少なく、25%を cut-off 値と設定した場合の陽性患者割合は 20%程度と低率である点があげられる(24)。しかし、これは無治療患者のデータであることに留意する必要がある。抗癌剤の長期投与で抗癌剤の効果は一般的に低下するが、そのような状況では治療抵抗性を獲得した癌細胞の割合が増大しており、MSLN 発現細胞の密度が上昇している可能性がある。今後、抗癌剤投与期間に

よる MSLN 発現細胞割合の変化について確認する必要がある。

また、一般的に Stage IV 大腸癌の中でもとりわけ遠隔転移形式として腹膜播種を有する症例の予後は不良とされる(65-67)。本研究の Stage IV 大腸癌の臨床データから T4 症例は予後が不良であることが示された。免疫組織化学染色の結果から T4 症例や腹膜播種症例では MSLN 陽性率の高いことが示されており、MSLN 発現大腸癌に対する有効な治療戦略の開発が難局打開の糸口となる。大腸癌では原発巣内の発現が一様であるだけでなく、原発巣と転移巣の MSLN 発現程度に正の相関があることが確認されている(68, 69)ことから、生検組織の検索により原発巣および転移巣における MSLN 発現を予測する方法を構築できる可能性は高い。今後は、大腸癌における MSLN 発現が悪性度上昇をもたらす具体的な制御機構の解明に向けたさらなる基礎研究が進み、抗 MSLN 抗体が、その制御機構のどの経路をブロックすることで、MSLN 発現大腸癌細胞が有するとされる抗アポトーシス作用や癌幹細胞性を抑制しているかを証明する必要がある。そして、そのような基礎的な裏付けに基づいて臨床応用される際にも、抗 MSLN 抗体療法適応判断基準となる大腸癌における MSLN 発現程度の評価法や基準設定といった解決しなければならない課題は存在するが、抗 MSLN 抗体療法が MSLN 発現大腸癌に対して良好な治療効果をもたらすことが証明されれば、既存の治療では制御の難しいこれらの大腸癌予後不良群の治療成績を飛躍的に改善させる可能性がある。MSLN をターゲットとした Stage IV 大腸癌への臨床応用を目指した研究のさらなる発展に期待したい。

第 6 章 結論

Stage IV 大腸癌における budding および MSLN 発現に関して以下のことを明らかにした。

- 1) Stage IV 大腸癌における budding の程度は、化学療法抵抗性と強く関連するとともに、独立した予後不良因子であることが示された。
- 2) Stage IV 大腸癌における MSLN 高発現は、化学療法抵抗性と強く関連するとともに、予後不良因子であることが示された。
- 3) 大腸癌細胞株における MSLN 発現は増殖能、浸潤能、遊走能および足場非依存性増殖能の増強に影響を及ぼしている可能性が示唆されるとともに、MSLN 発現細胞株では抗 MSLN 抗体により悪性度が抑制されることが示された。

謝辞

稿を終えるにあたり、本研究実施の機会を与えていただき、御指導、御高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。終始にわたり御教示をいただきました防衛医科大学校外科学講座の神藤英二准教授に深謝致します。また、貴重な MSLN 強制発現大腸癌細胞株を提供いただいた順天堂大学人体病理病態学講座梶野一徳准教授に厚く御礼申し上げます。最後に、御協力いただきました講座の諸先生方に感謝申し上げます。

本研究の主旨は、以下の学会において発表した。

- ・ 第 118 回 日本外科学会定期学術集会 (2018 年 4 月、東京)
- ・ 第 119 回 日本外科学会定期学術集会 (2019 年 4 月、大阪)
- ・ 第 74 回 日本大腸肛門病学会学術集会 (2019 年 10 月、東京)
- ・ 第 27 回 日本消化器関連学会週間 (JDDW) (2019 年 11 月、神戸)
- ・ 第 81 回 日本臨床外科学会総会 (2019 年 11 月、高知)
- ・ 第 28 回 日本消化器関連学会週間 (JDDW) (2020 年 11 月、神戸)
- ・ 第 45 回 日本外科系連合学会学術集会 (2020 年 12 月、久留米)
- ・ 第 76 回 日本消化器外科学会総会 (2021 年 7 月、京都)
- ・ 第 76 回 日本大腸肛門病学会学術集会 (2021 年 10 月、広島)

本研究の主旨は、以下の論文として発表した。

- Original article: Ken Nagata, Eiji Shinto, Masato Yamadera, Takehiro Shiraishi, Yoshiki Kajiwara, Koichi Okamoto, Satsuki Mochizuki, Kazuo Hase, Yoji Kishi, Hideki Ueno: Prognostic and predictive values of tumour budding in stage IV colorectal cancer. BJS Open. 2020 Aug;4(4):693-703
- Original article: Ken Nagata, Eiji Shinto, Takehiro Shiraishi, Masato Yamadera, Yoshiki Kajiwara, Satsuki Mochizuki, Koichi Okamoto, Takahiro Einama, Yoji Kishi, Hideki Ueno: Mesothelin Expression is Correlated with Chemoresistance in Stage IV Colorectal Cancer. Ann Surg Oncol. 2021 Dec ;28(13):8579-8586

略語一覧 (アルファベット順)

CI	confidence intervals
CR	complete response
CST	change of tumor size
DCR	disease control rate
dMMR	deficient mismatch repair
EGFR	epidermal growth factor receptor
EMT	epithelial-mesenchymal transition
FBS	fetal bovine serum
GAPDH	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HR	hazard ratio
HE	hematoxylin-eosin
ITBCC	International Budding Consensus Conference
MMR	mismatch repair
MSI	microsatellite instability
MSLN	mesothelin
MSS	microsatellite stable
ORR	objective response rate
PD	progressive disease
PFS	progression-free survival
pMMR	proficient mismatch repair
PR	partial response
ROC	receiver operating characteristic
SD	stable disease

引用文献

1. 国民衛生の動向 Vol.68 No.9 2021/2022: 厚生 の 指標.
2. 大腸癌研究会編. 大腸癌治療ガイドライン 医師用 2022年版. 金原出版.
3. Simmonds PC. Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer: systematic review and meta-analysis. Colorectal Cancer Collaborative Group. BMJ (Clinical research ed). 2000;321(7260):531-5.
4. Yamada Y, Takahari D, Matsumoto H, Baba H, Nakamura M, Yoshida K, Yoshida M, Iwamoto S, Shimada K, Komatsu Y, Sasaki Y, Satoh T, Takahashi K, Mishima H, Muro K, Watanabe M, Sakata Y, Morita S, Shimada Y, Sugihara K. Leucovorin, fluorouracil, and oxaliplatin plus bevacizumab versus S-1 and oxaliplatin plus bevacizumab in patients with metastatic colorectal cancer (SOFT): an open-label, non-inferiority, randomised phase 3 trial. The Lancet Oncology. 2013;14(13):1278-86.
5. Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D, Chiara S, Carlomagno C, Boni C, Allegrini G, Boni L, Falcone A. Initial therapy with FOLFOXIRI and bevacizumab for metastatic colorectal cancer. The New England journal of medicine. 2014;371(17):1609-18.
6. Yamazaki K, Nagase M, Tamagawa H, Ueda S, Tamura T, Murata K, Eguchi Nakajima T, Baba E, Tsuda M, Moriwaki T, Esaki T, Tsuji Y, Muro K, Taira K, Denda T, Funai S, Shinozaki K, Yamashita H, Sugimoto N, Okuno T, Nishina T, Umeki M, Kurimoto T, Takayama T, Tsuji A, Yoshida M, Hosokawa A, Shibata Y, Suyama K, Okabe M, Suzuki K, Seki N, Kawakami K, Sato M, Fujikawa K, Hirashima T, Shimura

T, Taku K, Otsuji T, Tamura F, Shinozaki E, Nakashima K, Hara H, Tsushima T, Ando M, Morita S, Boku N, Hyodo I. Randomized phase III study of bevacizumab plus FOLFIRI and bevacizumab plus mFOLFOX6 as first-line treatment for patients with metastatic colorectal cancer (WJOG4407G). *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology*. 2016;27(8):1539-46.

7. Tomasello G, Petrelli F, Ghidini M, Russo A, Passalacqua R, Barni S. FOLFOXIRI Plus Bevacizumab as Conversion Therapy for Patients With Initially Unresectable Metastatic Colorectal Cancer: A Systematic Review and Pooled Analysis. *JAMA oncology*. 2017;3(7):e170278.

8. She WH, Cheung TT, Ma KW, Tsang SHY, Dai WC, Chan ACY, Lo CM. Relevance of chemotherapy and margin status in colorectal liver metastasis. *Langenbeck's archives of surgery*. 2021;406(8):2725-37.

9. Shinto E, Jass JR, Tsuda H, Sato T, Ueno H, Hase K, Mochizuki H, Matsubara O. Differential prognostic significance of morphologic invasive markers in colorectal cancer: tumor budding and cytoplasmic podia. *Diseases of the colon and rectum*. 2006;49(9):1422-30.

10. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*. 2002;40(2):127-32.

11. Ueno H, Price AB, Wilkinson KH, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. A new prognostic staging system for rectal cancer. *Annals of surgery*. 2004;240(5):832-9.

12. Sy J, Fung CL, Dent OF, Chapuis PH, Bokey L, Chan C. Tumor budding and survival after potentially curative resection of node-positive colon cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 2010;53(3):301-7.

13. Yamada N, Sugai T, Eizuka M, Tsuchida K, Sugimoto R, Mue Y, Suzuki M, Osakabe M, Uesugi N, Ishida K, Otsuka K, Matsumoto T. Tumor budding at the invasive front of colorectal cancer may not be associated with the epithelial-mesenchymal transition. *Human pathology*. 2017;60:151-9.
14. Bronsert P, Enderle-Ammour K, Bader M, Timme S, Kuehs M, Csanadi A, Kayser G, Kohler I, Bausch D, Hoepfner J, Hopt UT, Keck T, Stickeler E, Passlick B, Schilling O, Reiss CP, Vashist Y, Brabletz T, Berger J, Lotz J, Olesch J, Werner M, Wellner UF. Cancer cell invasion and EMT marker expression: a three-dimensional study of the human cancer-host interface. *The Journal of pathology*. 2014;234(3):410-22.
15. Kevans D, Wang LM, Sheahan K, Hyland J, O'Donoghue D, Mulcahy H, O'Sullivan J. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) protein expression in a cohort of stage II colorectal cancer patients with characterized tumor budding and mismatch repair protein status. *International journal of surgical pathology*. 2011;19(6):751-60.
16. Yamadera M, Shinto E, Kajiwara Y, Mochizuki S, Okamoto K, Hase K, Yamamoto J, Ueno H. Differential Survival Benefits of 5-Fluorouracil-Based Adjuvant Chemotherapy for Patients With Microsatellite-Stable Stage III Colorectal Cancer According to the Tumor Budding Status: A Retrospective Analysis. *Diseases of the colon and rectum*. 2019;62(11):1311-25.
17. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *Journal of clinical medicine*. 2016;5(5).
18. Zlobec I, Lugli A. Invasive front of colorectal cancer: dynamic interface of pro-/anti-tumor factors. *World journal of gastroenterology*. 2009;15(47):5898-906.

19. Trinh A, Lädach C, Dawson HE, Ten Hoorn S, Kuppen PJK, Reimers MS, Koopman M, Punt CJA, Lugli A, Vermeulen L, Zlobec I. Tumour budding is associated with the mesenchymal colon cancer subtype and RAS/RAF mutations: a study of 1320 colorectal cancers with Consensus Molecular Subgroup (CMS) data. *British journal of cancer*. 2018;119(10):1244-51.
20. Zheng HC. The molecular mechanisms of chemoresistance in cancers. *Oncotarget*. 2017;8(35):59950-64.
21. Mikula-Pietrasik J, Uruski P, Tykarski A, Książek K. The peritoneal "soil" for a cancerous "seed": a comprehensive review of the pathogenesis of intraperitoneal cancer metastases. *Cellular and molecular life sciences : CMLS*. 2018;75(3):509-25.
22. Shinto E, Yoshida Y, Kajiwara Y, Okamoto K, Mochizuki S, Yamadera M, Shiraishi T, Nagata K, Tsuda H, Hase K, Kishi Y, Ueno H. Clinical Significance of a Gene Signature Generated from Tumor Budding Grade in Colon Cancer. *Annals of surgical oncology*. 2020;27(10):4044-54.
23. Prieve MG, Moon RT. Stromelysin-1 and mesothelin are differentially regulated by Wnt-5a and Wnt-1 in C57mg mouse mammary epithelial cells. *BMC developmental biology*. 2003;3:2.
24. Shiraishi T, Shinto E, Mochizuki S, Tsuda H, Kajiwara Y, Okamoto K, Einama T, Hase K, Ueno H. Mesothelin expression has prognostic value in stage II/III colorectal cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2019;474(3):297-307.
25. Chang MC, Chen CA, Hsieh CY, Lee CN, Su YN, Hu YH, Cheng WF. Mesothelin inhibits paclitaxel-induced apoptosis through the PI3K pathway. *The Biochemical journal*. 2009;424(3):449-58.

26. Xu W, Yang Z, Lu N. A new role for the PI3K/Akt signaling pathway in the epithelial-mesenchymal transition. *Cell adhesion & migration*. 2015;9(4):317-24.
27. Shiraishi T, Shinto E, Nearchou IP, Tsuda H, Kajiwara Y, Einama T, Caie PD, Kishi Y, Ueno H. Prognostic significance of mesothelin expression in colorectal cancer disclosed by area-specific four-point tissue microarrays. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2020;477(3):409-20.
28. Shiraishi T, Shinto E, Yamadera M, Nagata K, Tsuda H, Mochizuki S, Kajiwara Y, Okamoto K, Einama T, Kishi Y, Ueno H. Significance of mesothelin expression in preoperative endoscopic biopsy specimens for colorectal cancer prognosis. *Oncotarget*. 2020;11(43):3807-17.
29. Saltz LB, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Cassidy J. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2013-9.
30. Cassidy J, Clarke S, Díaz-Rubio E, Scheithauer W, Figer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzén F, Saltz L. Randomized phase III study of capecitabine plus oxaliplatin compared with fluorouracil/folinic acid plus oxaliplatin as first-line therapy for metastatic colorectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2008;26(12):2006-12.
31. Douillard JY, Siena S, Cassidy J, Tabernero J, Burkes R, Barugel M, Humblet Y, Bodoky G, Cunningham D, Jassem J, Rivera F, Kocáková I, Ruff P, Błasińska-Morawiec M, Šmakal M, Canon JL, Rother M, Oliner KS, Wolf M, Gansert J.

Randomized, phase III trial of panitumumab with infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(31):4697-705.

32. Van Cutsem E, Köhne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pintér T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;360(14):1408-17.

33. He X, Wang L, Riedel H, Wang K, Yang Y, Dinu CZ, Rojanasakul Y. Mesothelin promotes epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenicity of human lung cancer and mesothelioma cells. *Molecular cancer*. 2017;16(1):63.

34. Lugli A, Kirsch R, Ajioka Y, Bosman F, Cathomas G, Dawson H, El Zimaity H, Fléjou JF, Hansen TP, Hartmann A, Kakar S, Langner C, Nagtegaal I, Puppa G, Riddell R, Ristimäki A, Sheahan K, Smyrk T, Sugihara K, Terris B, Ueno H, Vieth M, Zlobec I, Quirke P. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the International Tumor Budding Consensus Conference (ITBCC) 2016. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*. 2017;30(9):1299-311.

35. Piessevaux H, Buyse M, De Roock W, Prenen H, Schlichting M, Van Cutsem E, Tejpar S. Radiological tumor size decrease at week 6 is a potent predictor of outcome in chemorefractory metastatic colorectal cancer treated with cetuximab (BOND trial).

Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology.

2009;20(8):1375-82.

36. Hashiguchi Y, Muro K, Saito Y, Ito Y, Ajioka Y, Hamaguchi T, Hasegawa K, Hotta K, Ishida H, Ishiguro M, Ishihara S, Kanemitsu Y, Kinugasa Y, Murofushi K, Nakajima TE, Oka S, Tanaka T, Taniguchi H, Tsuji A, Uehara K, Ueno H, Yamanaka T, Yamazaki K, Yoshida M, Yoshino T, Itabashi M, Sakamaki K, Sano K, Shimada Y, Tanaka S, Uetake H, Yamaguchi S, Yamaguchi N, Kobayashi H, Matsuda K, Kotake K, Sugihara K. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. International journal of clinical oncology. 2020;25(1):1-42.

37. Limmer S, Oevermann E, Killaitis C, Kujath P, Hoffmann M, Bruch HP. Sequential surgical resection of hepatic and pulmonary metastases from colorectal cancer. Langenbeck's archives of surgery. 2010;395(8):1129-38.

38. Ueno H, Mochizuki H, Hatsuse K, Hase K, Yamamoto T. Indicators for treatment strategies of colorectal liver metastases. Annals of surgery. 2000;231(1):59-66.

39. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Hatsuse K, Fujimoto H, Hase K. Predictors of extrahepatic recurrence after resection of colorectal liver metastases. The British journal of surgery. 2004;91(3):327-33.

40. Christensen M, Katballe N, Wikman F, Primdahl H, Sørensen FB, Laurberg S, Ørntoft TF. Antibody-based screening for hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma compared with microsatellite analysis and sequencing. Cancer. 2002;95(11):2422-30.

41. Piñol V, Castells A, Andreu M, Castellví-Bel S, Alenda C, Llor X, Xicola RM, Rodríguez-Moranta F, Payá A, Jover R, Bessa X. Accuracy of revised Bethesda

guidelines, microsatellite instability, and immunohistochemistry for the identification of patients with hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Jama*. 2005;293(16):1986-94.

42. Marcus VA, Madlensky L, Gryfe R, Kim H, So K, Millar A, Temple LK, Hsieh E, Hiruki T, Narod S, Bapat BV, Gallinger S, Redston M. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. *The American journal of surgical pathology*. 1999;23(10):1248-55.

43. Miyoshi N, Ohue M, Shingai T, Noura S, Sugimura K, Akita H, Gotoh K, Motoori M, Takahashi H, Kishi K, Okami J, Marubashi S, Fujiwara Y, Higashiyama M, Yano M. Clinicopathological characteristics and prognosis of stage IV colorectal cancer. *Molecular and clinical oncology*. 2015;3(5):1093-8.

44. Miyoshi N, Ohue M, Yasui M, Noura S, Shingai T, Sugimura K, Akita H, Gotoh K, Marubashi S, Takahashi H, Okami J, Fujiwara Y, Higashiyama M, Yano M. Novel prognostic prediction models for patients with stage IV colorectal cancer after concurrent curative resection. *ESMO open*. 2016;1(3):e000052.

45. Yun HR, Lee WY, Lee WS, Cho YB, Yun SH, Chun HK. The prognostic factors of stage IV colorectal cancer and assessment of proper treatment according to the patient's status. *International journal of colorectal disease*. 2007;22(11):1301-10.

46. Sudo M, Furuya S, Shimizu H, Nakata Y, Iino H, Shiraishi K, Akaike H, Hosomura N, Kawaguchi Y, Amemiya H, Kawaida H, Inoue S, Kono H, Ichikawa D. Long-term outcomes after surgical resection in patients with stage IV colorectal cancer: a retrospective study of 129 patients at a single institution. *World journal of surgical oncology*. 2019;17(1):56.

47. Nozawa H, Takiyama H, Hasegawa K, Kawai K, Hata K, Tanaka T, Nishikawa T, Sasaki K, Kaneko M, Muroto K, Emoto S, Sonoda H, Nakajima J. Adjuvant

chemotherapy improves prognosis of resectable stage IV colorectal cancer: a comparative study using inverse probability of treatment weighting. *Therapeutic advances in medical oncology*. 2019;11:1758835919838960.

48. Kim MS, Park EJ, Kang J, Min BS, Lee KY, Kim NK, Baik SH. Prognostic factors predicting survival in incurable stage IV colorectal cancer patients who underwent palliative primary tumor resection. Retrospective cohort study. *International journal of surgery (London, England)*. 2018;49:10-5.

49. Chew MH, Teo JY, Kabir T, Koh PK, Eu KW, Tang CL. Stage IV colorectal cancers: an analysis of factors predicting outcome and survival in 728 cases. *Journal of gastrointestinal surgery : official journal of the Society for Surgery of the Alimentary Tract*. 2012;16(3):603-12.

50. Liu N, Yang Z, Liu X, Niu Y. Lymph node status in different molecular subtype of breast cancer: triple negative tumours are more likely lymph node negative. *Oncotarget*. 2017;8(33):55534-43.

51. Yonemura K, Kajiwara Y, Ao T, Mochizuki S, Shinto E, Okamoto K, Hase K, Ueno H. Prognostic Value of Poorly Differentiated Clusters in Liver Metastatic Lesions of Colorectal Carcinoma. *The American journal of surgical pathology*. 2019;43(10):1341-8.

52. Kanemitsu Y, Shitara K, Mizusawa J, Hamaguchi T, Shida D, Komori K, Ikeda S, Ojima H, Ike H, Shiomi A, Watanabe J, Takii Y, Yamaguchi T, Katsumata K, Ito M, Okuda J, Hyakudomi R, Shimada Y, Katayama H, Fukuda H. Primary Tumor Resection Plus Chemotherapy Versus Chemotherapy Alone for Colorectal Cancer Patients With Asymptomatic, Synchronous Unresectable Metastases (JCOG1007; iPACS): A

- Randomized Clinical Trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2021;39(10):1098-107.
53. 大腸癌研究会編. 大腸癌取扱い規約 第9版. 金原出版. 2018.
54. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics*. 1977;33(1):159-74.
55. Bharadwaj U, Marin-Muller C, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin confers pancreatic cancer cell resistance to TNF- α -induced apoptosis through Akt/PI3K/NF- κ B activation and IL-6/Mcl-1 overexpression. *Molecular cancer*. 2011;10:106.
56. Matsuzawa F, Kamachi H, Mizukami T, Einama T, Kawamata F, Fujii Y, Fukai M, Kobayashi N, Hatanaka Y, Taketomi A. Mesothelin blockage by Amatuximab suppresses cell invasiveness, enhances gemcitabine sensitivity and regulates cancer cell stemness in mesothelin-positive pancreatic cancer cells. *BMC cancer*. 2021;21(1):200.
57. Uehara N, Matsuoka Y, Tsubura A. Mesothelin promotes anchorage-independent growth and prevents anoikis via extracellular signal-regulated kinase signaling pathway in human breast cancer cells. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(2):186-93.
58. Bharadwaj U, Li M, Chen C, Yao Q. Mesothelin-induced pancreatic cancer cell proliferation involves alteration of cyclin E via activation of signal transducer and activator of transcription protein 3. *Molecular cancer research : MCR*. 2008;6(11):1755-65.
59. Yang X, Huang M, Zhang Q, Chen J, Li J, Han Q, Zhang L, Li J, Liu S, Ma Y, Li L, Yang L, Zou S, Han B. Metformin Antagonizes Ovarian Cancer Cells Malignancy Through MSLN Mediated IL-6/STAT3 Signaling. *Cell transplantation*. 2021;30:9636897211027819.

60. Chang MC, Chen CA, Chen PJ, Chiang YC, Chen YL, Mao TL, Lin HW, Lin Chiang WH, Cheng WF. Mesothelin enhances invasion of ovarian cancer by inducing MMP-7 through MAPK/ERK and JNK pathways. *The Biochemical journal*. 2012;442(2):293-302.
61. Hassan R, Ebel W, Routhier EL, Patel R, Kline JB, Zhang J, Chao Q, Jacob S, Turchin H, Gibbs L, Phillips MD, Mudali S, Iacobuzio-Donahue C, Jaffee EM, Moreno M, Pastan I, Sass PM, Nicolaides NC, Grasso L. Preclinical evaluation of MORAb-009, a chimeric antibody targeting tumor-associated mesothelin. *Cancer immunity*. 2007;7:20.
62. Fujii Y, Kamachi H, Matsuzawa F, Mizukami T, Kobayashi N, Fukai M, Taketomi A. Early administration of amatuximab, a chimeric high-affinity anti-mesothelin monoclonal antibody, suppresses liver metastasis of mesothelin-expressing pancreatic cancer cells and enhances gemcitabine sensitivity in a xenograft mouse model. *Investigational new drugs*. 2021;39(5):1256-66.
63. Tang Z, Qian M, Ho M. The role of mesothelin in tumor progression and targeted therapy. *Anti-cancer agents in medicinal chemistry*. 2013;13(2):276-80.
64. Hassan R, Blumenschein GR, Jr., Moore KN, Santin AD, Kindler HL, Nemunaitis JJ, Seward SM, Thomas A, Kim SK, Rajagopalan P, Walter AO, Laurent D, Childs BH, Sarapa N, Elbi C, Bendell JC. First-in-Human, Multicenter, Phase I Dose-Escalation and Expansion Study of Anti-Mesothelin Antibody-Drug Conjugate Anetumab Ravtansine in Advanced or Metastatic Solid Tumors. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2020;38(16):1824-35.

65. Kawai K, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Miyata H, Sugihara K, Watanabe T. Nomograms for predicting the prognosis of stage IV colorectal cancer after curative resection: a multicenter retrospective study. *European journal of surgical oncology : the journal of the European Society of Surgical Oncology and the British Association of Surgical Oncology*. 2015;41(4):457-65.
66. Shida D, Kobayashi H, Kameyama M, Hase K, Maeda K, Suto T, Itabashi M, Funahashi K, Koyama F, Ozawa H, Noura S, Ishida H, Kanemitsu Y, Kotake K, Sugihara K. Factors affecting R0 resection of colorectal cancer with synchronous peritoneal metastases: a multicenter prospective observational study by the Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. *International journal of clinical oncology*. 2020;25(2):330-7.
67. Arakawa K, Kawai K, Ishihara S, Hata K, Nozawa H, Oba K, Sugihara K, Watanabe T. Prognostic Significance of Peritoneal Metastasis in Stage IV Colorectal Cancer Patients With R0 Resection: A Multicenter, Retrospective Study. *Diseases of the colon and rectum*. 2017;60(10):1041-9.
68. Pastan I, Hassan R. Discovery of mesothelin and exploiting it as a target for immunotherapy. *Cancer research*. 2014;74(11):2907-12.
69. Inoue S, Tsunoda T, Riku M, Ito H, Inoko A, Murakami H, Ebi M, Ogasawara N, Pastan I, Kasugai K, Kasai K, Ikeda H, Inaguma S. Diffuse mesothelin expression leads to worse prognosis through enhanced cellular proliferation in colorectal cancer. *Oncology letters*. 2020;19(3):1741-50.

図表

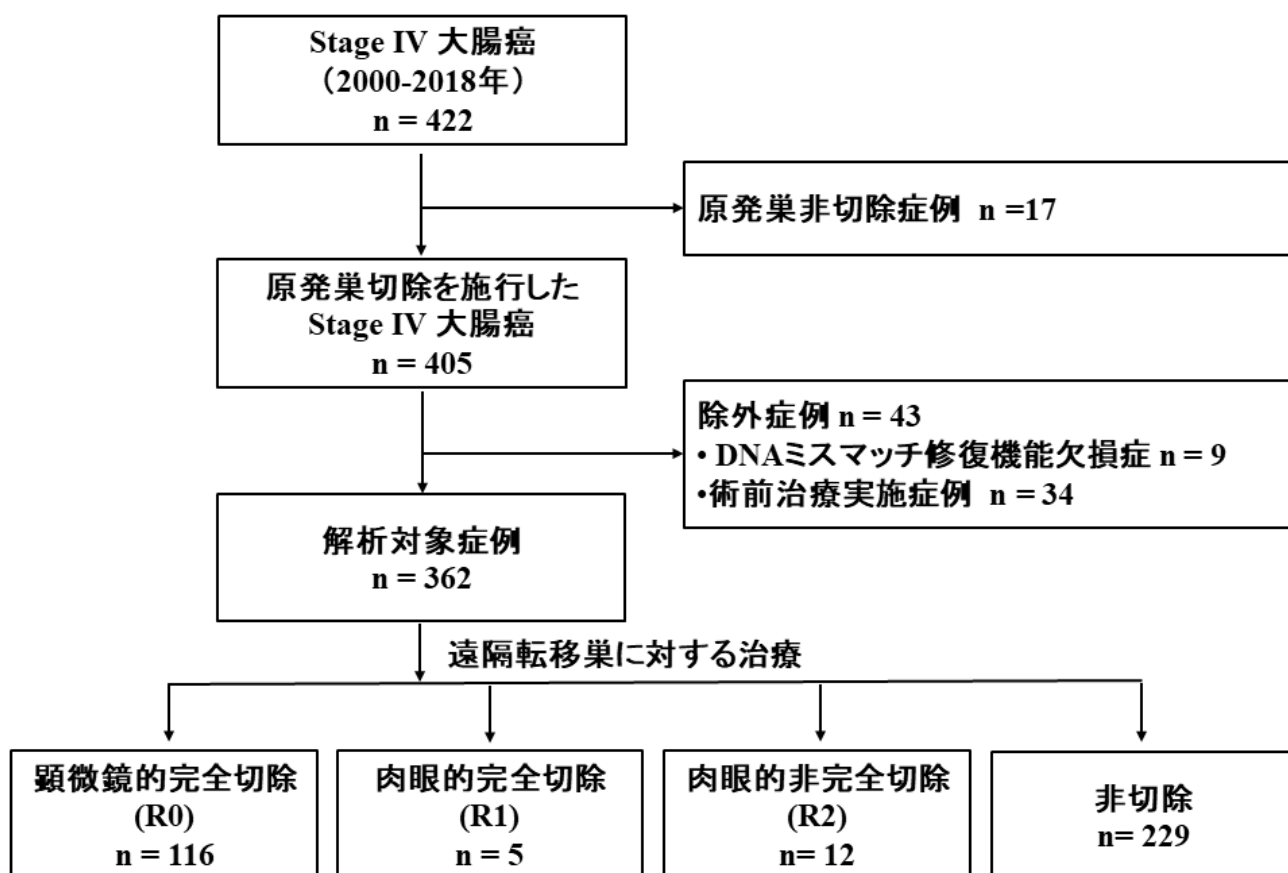


図 1 第 2 章における対象症例の選別に関するフローチャート

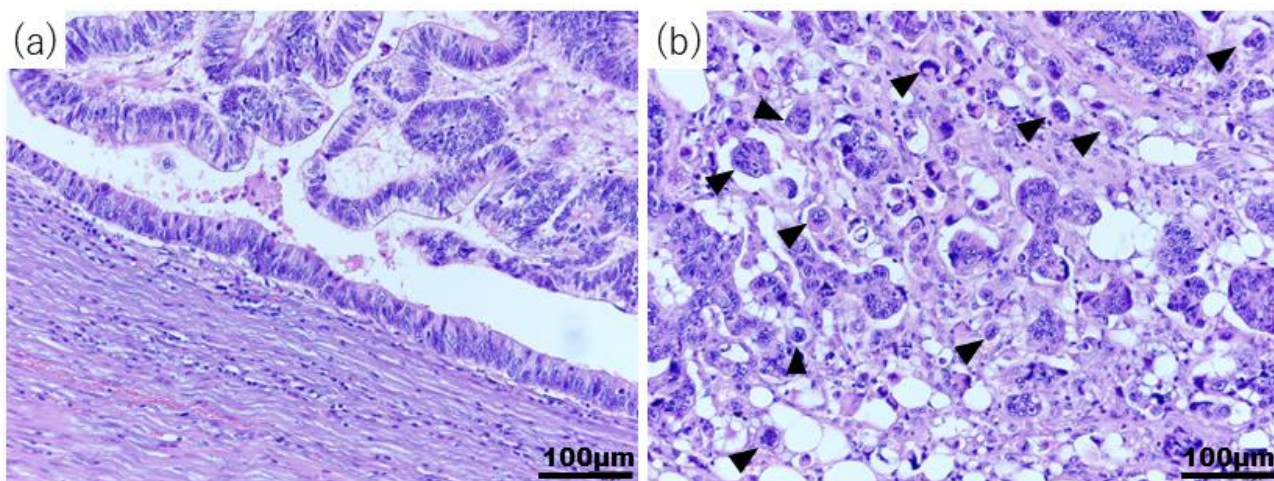
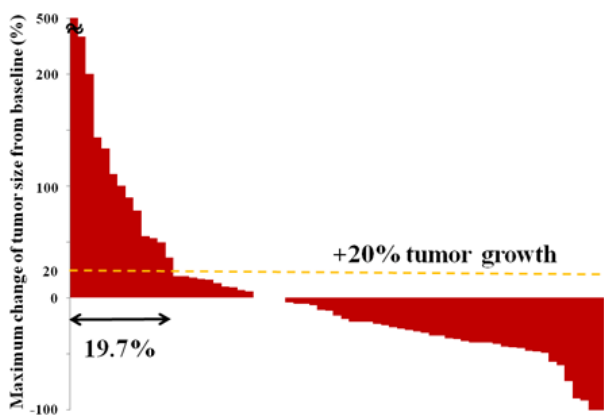


図 2 大腸癌発育先進部における budding (BD) の組織像

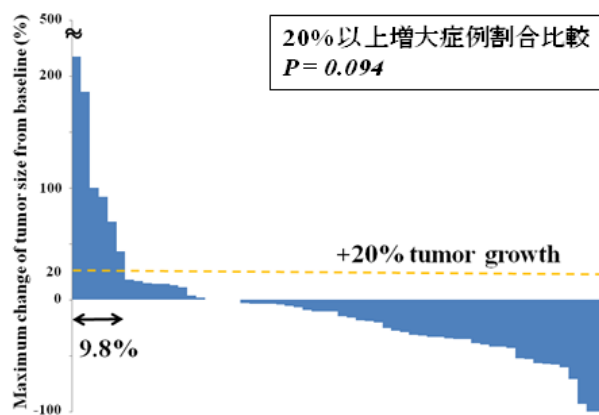
budding 病巣が認められず BD1 と判定した症例 (a) と、budding 病巣 (矢印) が多数観察され BD3 と判定した症例 (b) の大腸癌発育先進部の Hematoxylin Eosin (HE) 染色像 (対物 20 倍) を示す。

化学療法施行全症例

a BD3

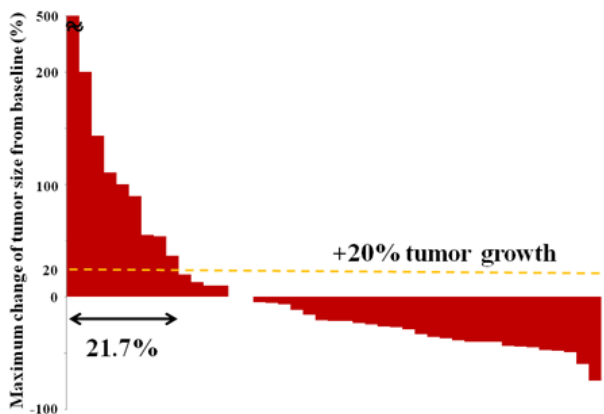


b BD1 + BD2



オキサリプラチン併用化学療法施行全症例

c BD3



d BD1 + BD2

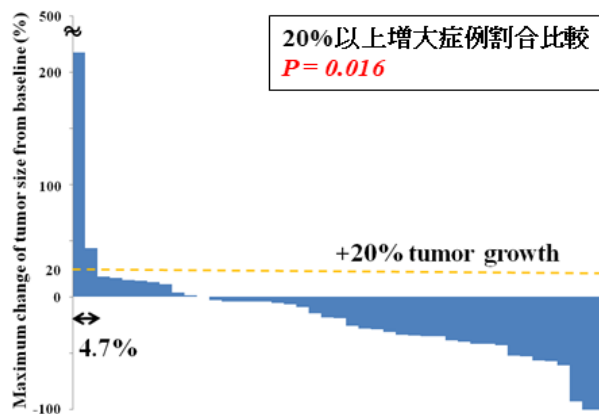
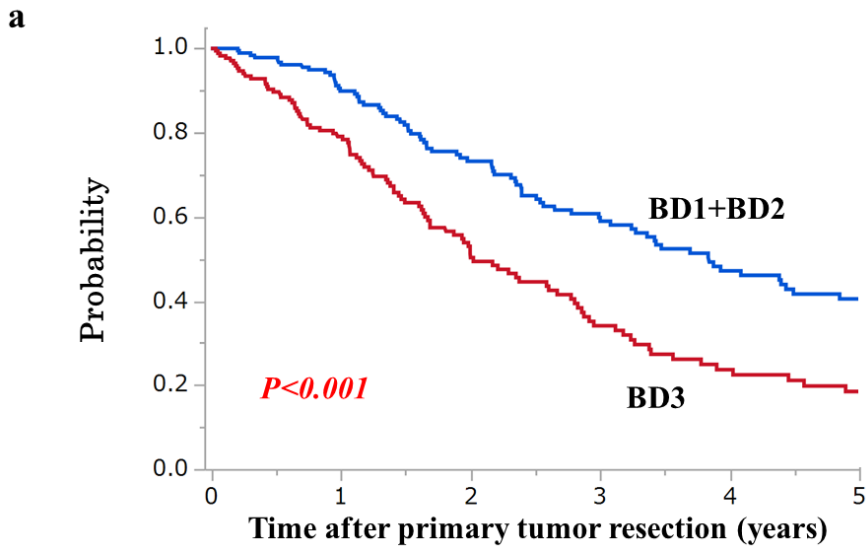


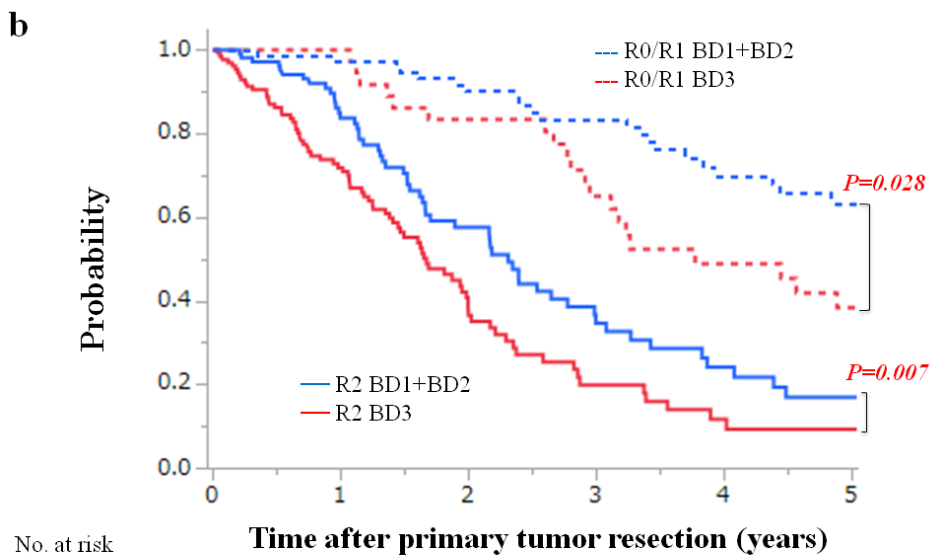
図 3 budding 程度および治療内容別のウォーターフォールプロット解析

上段は、化学療法施行全症例を対象として、転移巣腫瘍径変化率の分布を腫瘍の budding 程度別に示した (a,b)。また、オキサリプラチン併用化学療法施行症例に限った検討結果を下段に示した (c,d)。なお、最大腫瘍径 20%増加のレベルに点線による補助線を付し、腫瘍径が 20%以上増大した症例を矢印で示した。



No. at risk

BD1+BD2	187	140	94	68	45	35
BD3	175	112	60	32	20	14



No. at risk

R0/R1 BD1+BD2	79	72	59	49	35	28
R0/R1 BD3	42	38	31	22	15	11
R2 BD1+BD2	108	69	36	20	11	8
R2 BD3	133	75	29	11	6	4

図 4 Stage IV 大腸癌における budding の程度別全生存率曲線

Stage IV 大腸癌における全生存率の比較から BD3 群は BD1+BD2 群と比較して有意に予後不良であった(a)。さらに、遠隔転移巣遺残度により分類された R0/R1、R2 の各症例群においても、BD3 群は BD1+BD2 群に比べ有意に予後不良であった(b)。

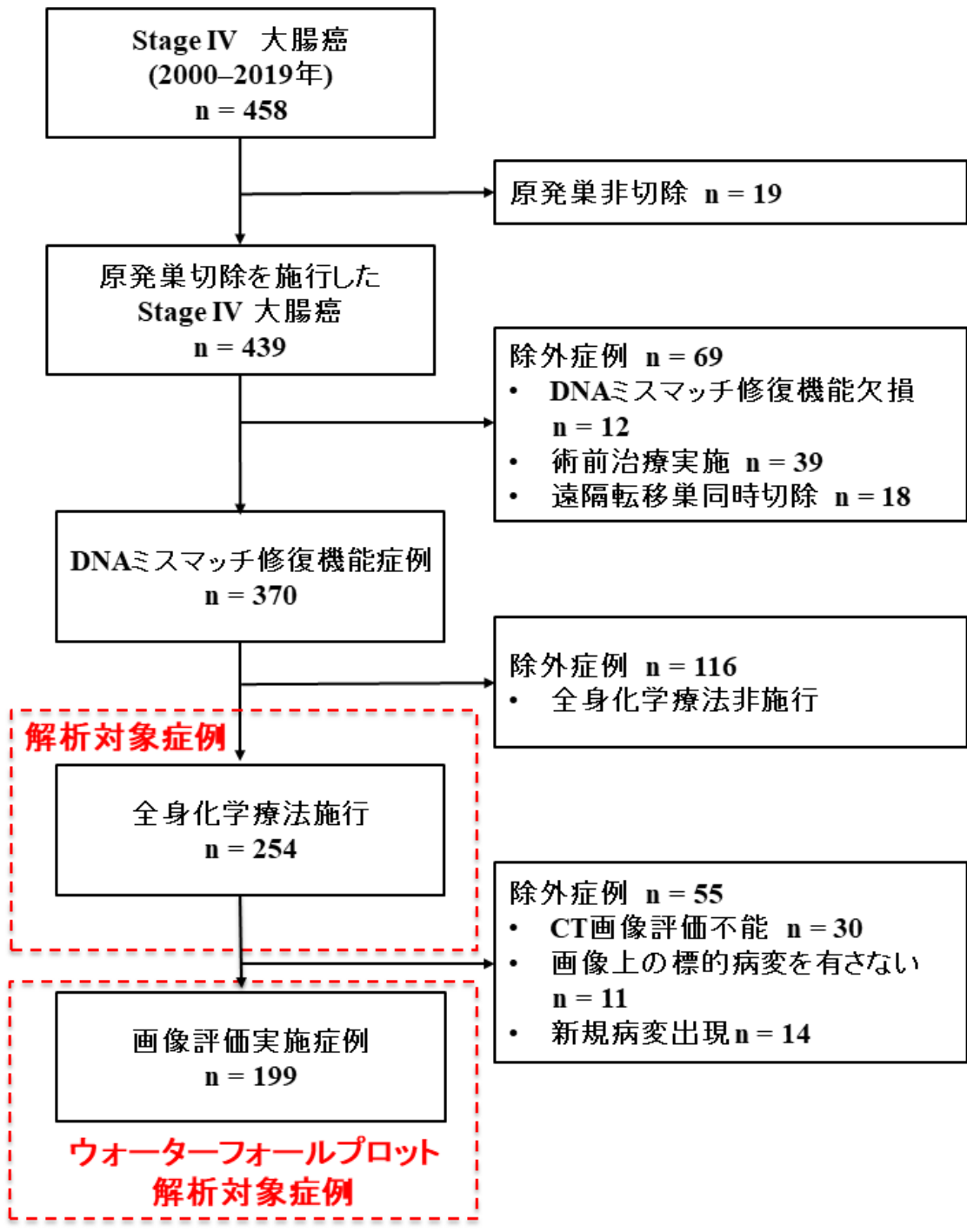


図 5 第 3 章における対象症例の選別に関するフローチャート

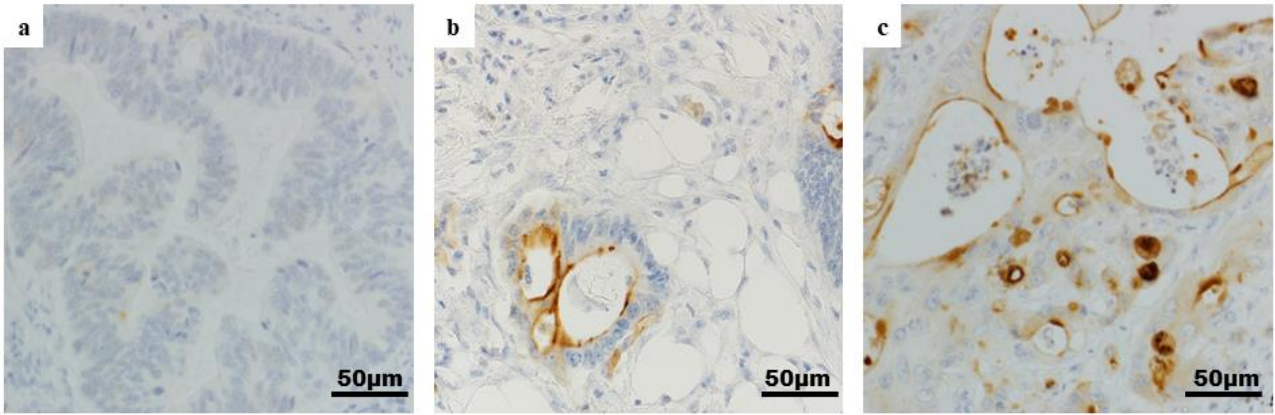
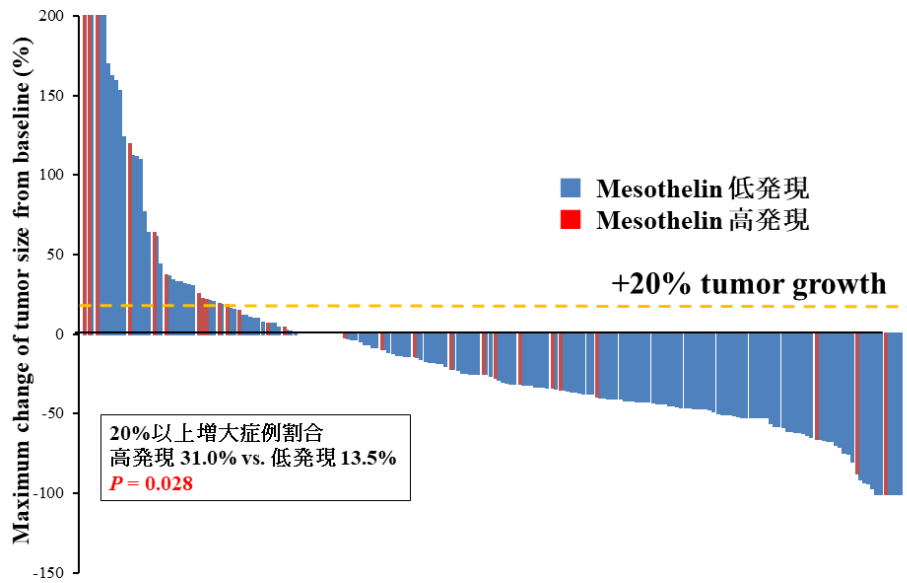


図 6 大腸癌組織における Mesothelin 免疫組織化学染色像

- (a) 癌細胞に染色性を示さない Mesothelin 低発現症例 (対物 40 倍)
- (b) 細胞極性が保たれた癌細胞の管腔内側に染色性を示す Mesothelin 高発現症例 (対物 40 倍)
- (c) 細胞質内にびまん性または顆粒様に染色を伴う Mesothelin 高発現症例 (対物 40 倍)

a 化学療法施行全症例



b オキサリプラチン併用化学療法施行症例

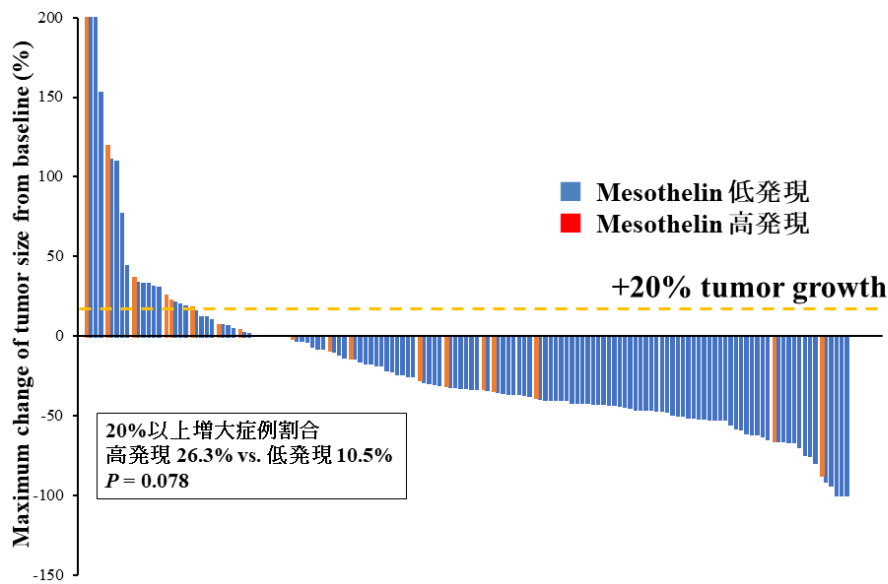


図 7 Mesothelin 発現別のウォーターフォールプロット解析

原発巣切除後に全身化学療法を受けた全症例 (a) とそのうちオキサリプラチン併用全身化学療法を受けた症例 (b) を対象として、Mesothelin 高発現と低発現を区別した遠隔転移巣腫瘍径変化率の分布を示す。なお、最大腫瘍径 20%増加のレベルに点線による補助線を示した。

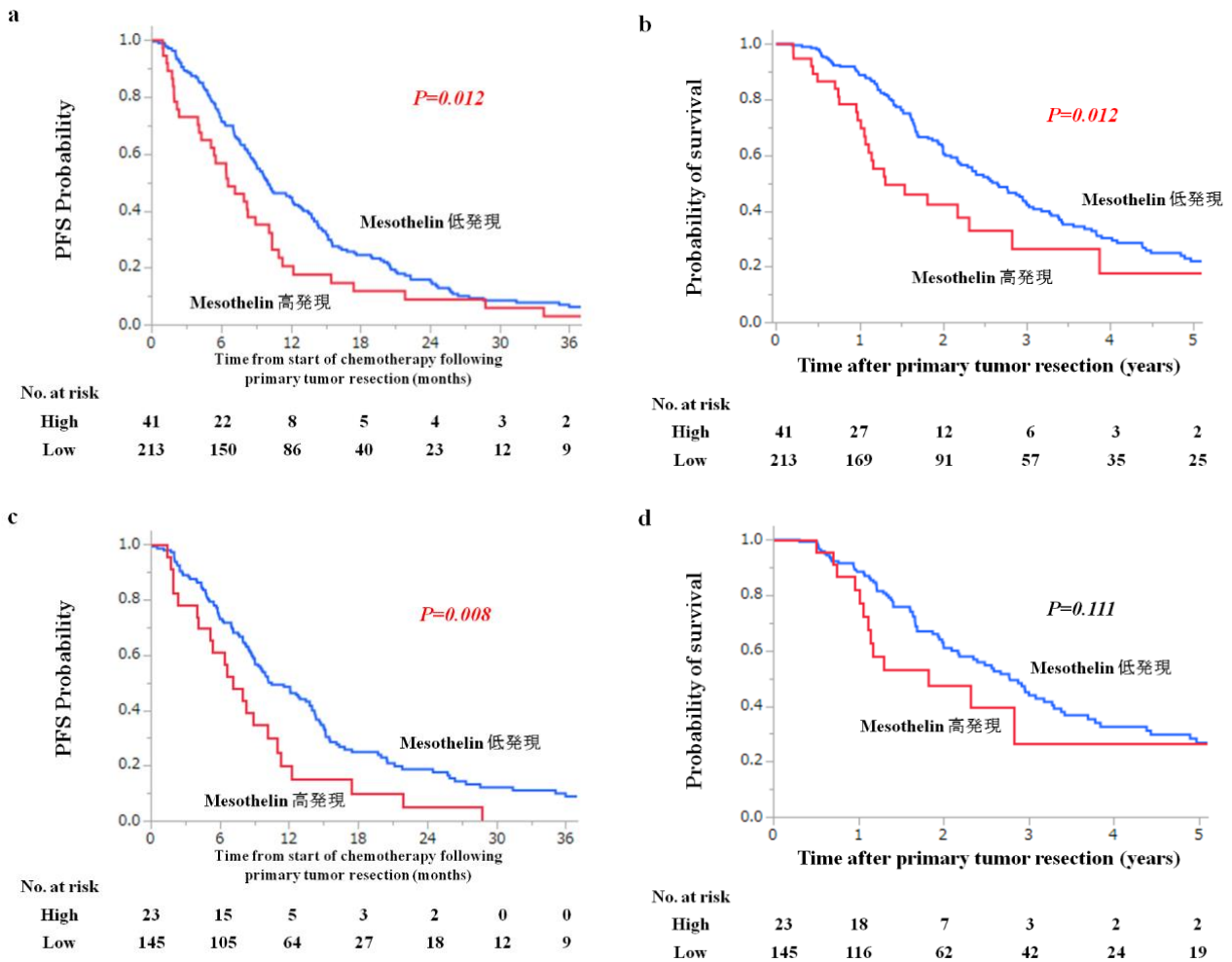


図 8 Mesothelin 発現程度別生存率曲線

原発巣切除後に全身化学療法を受けた全症例を対象とした無増悪生存率（PFS）曲線（a）、および全生存率（OS）曲線（b）、そのうちオキサリプラチン併用全身化学療法を受けた症例を対象とした PFS 曲線（c）、OS 曲線（d）を Mesothelin 発現別に示す。オキサリプラチン併用例における OS の比較を除き、Mesothelin 高発現患者の生存率が有意に低いことが示された。

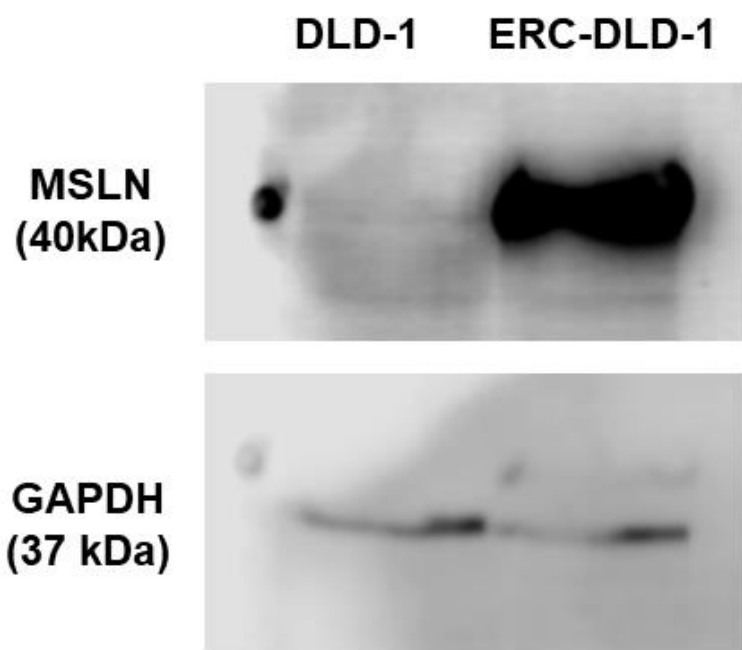


図9 大腸癌細胞株における Western blot 法による Mesothelin 発現の評価

Mesothelin 非発現大腸癌細胞株 (DLD-1) において Mesothelin のタンパク質発現が確認できないが、強制発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) においては、その発現が確認された。

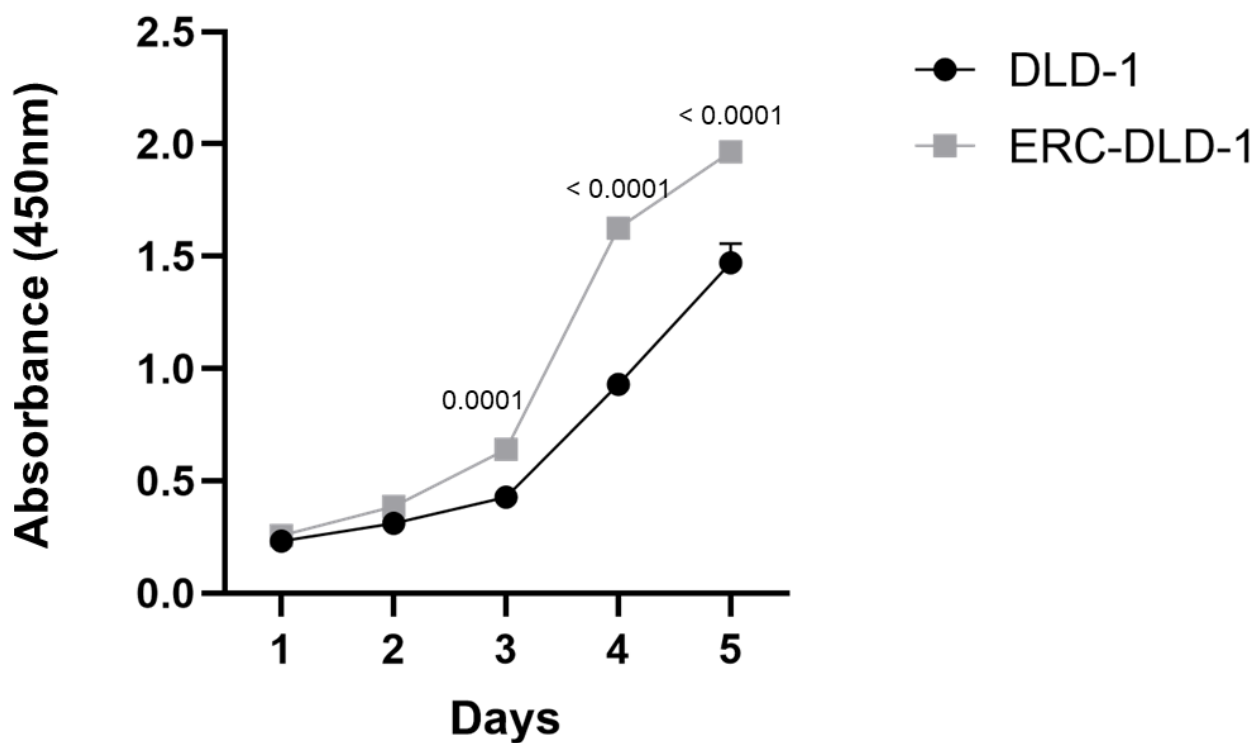


図 10 Mesothelin 発現別大腸癌細胞株の Proliferation assay

生細胞数測定試薬添加による発色後の吸光度により増殖能を比較した。3日経過以降、Mesothelin 発現大腸癌細胞株（ERC-DLD-1）の吸光度が非発現細胞株（DLD-1）と比較して有意に高値であった（3日経過時、 $P = 0.0001$ ；4日経過時、 $P < 0.0001$ ；5日経過時、 $P < 0.0001$ ）。

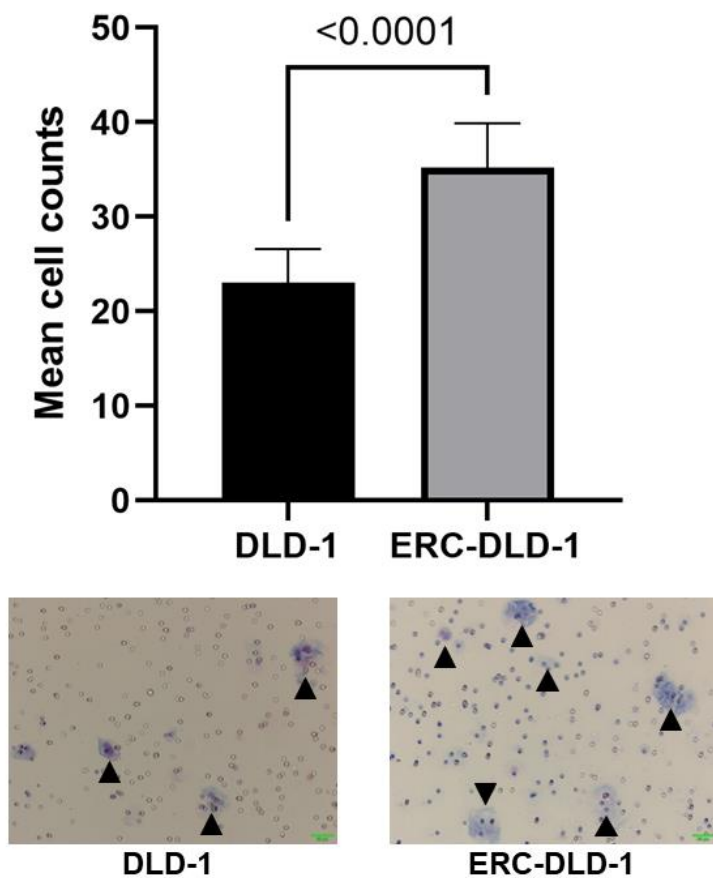


図 11 Mesothelin 発現別大腸癌細胞株の Migration assay

上段に 24 時間培養後に観察された平均遊走細胞数を、下段にその顕微鏡写真を示す (▲は遊走細胞)。Mesothelin 発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) では非発現細胞株 (DLD-1) に比べ有意に高値であった ($P < 0.0001$)。

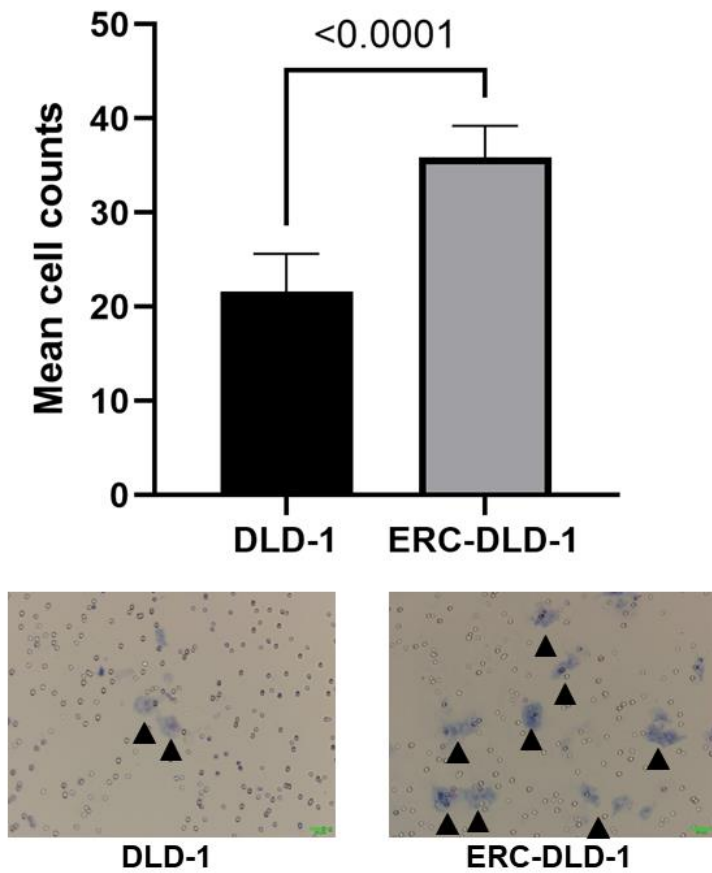


図 12 Mesothelin 発現別大腸癌細胞株の Invasion assay

上段に 24 時間培養後に観察された平均浸潤細胞数、下段にその顕微鏡写真を示す (▲は浸潤細胞)。Mesothelin 発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) では非発現細胞株 (DLD-1) に比べ有意に高値であった ($P < 0.0001$)。

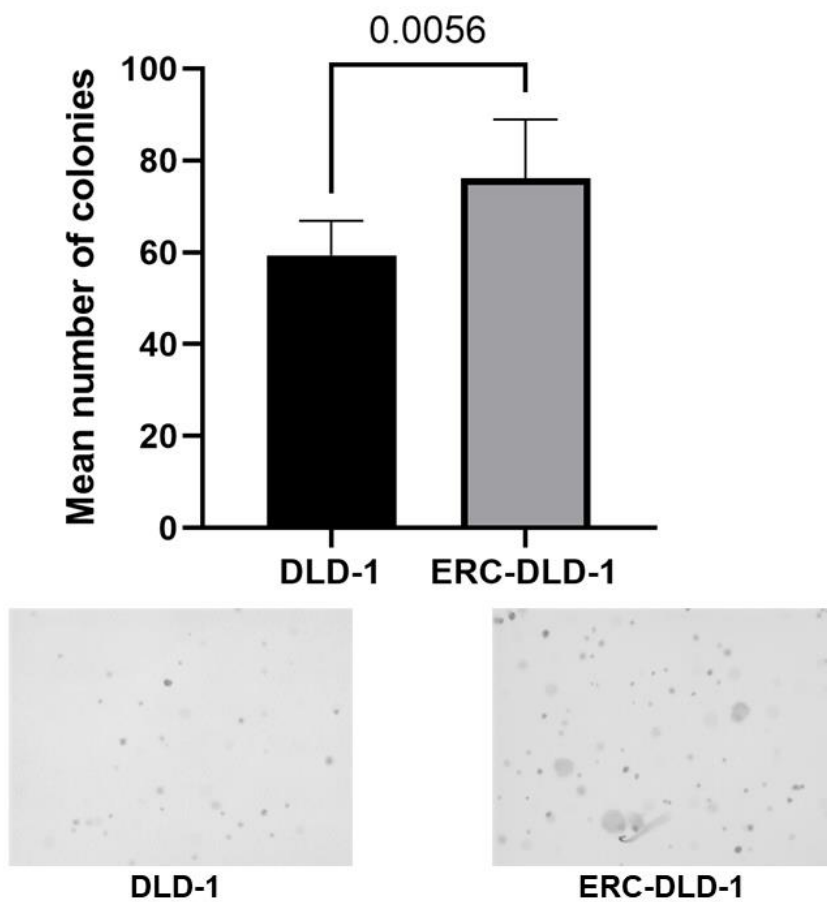


図 13 Mesothelin 発現別大腸癌細胞株の Soft agar colony formation assay

1 週間培養後に観察された平均コロニー数の比較、下段にその顕微鏡写真を示す。

Mesothelin 発現大腸癌細胞株（ERC-DLD-1）では非発現細胞株（DLD-1）に比べ有意に高値であった（ $P = 0.0056$ ）。

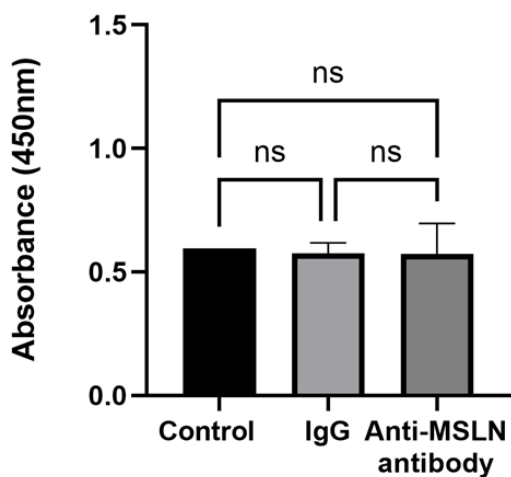
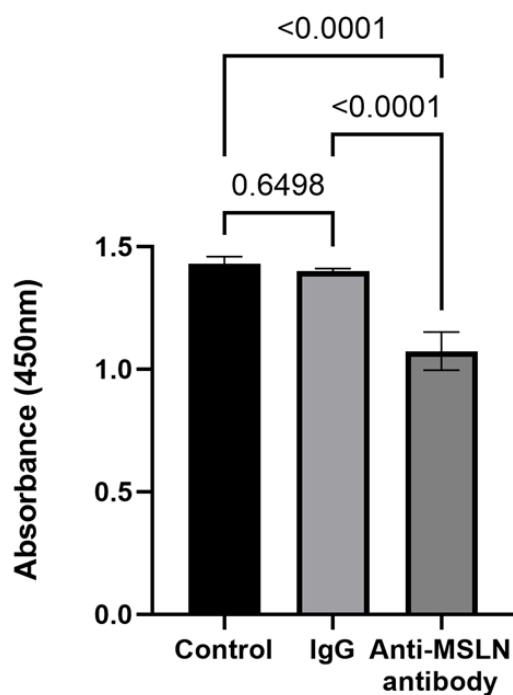
a**b**

図 14 抗 Mesothelin 抗体の増殖能に対する影響

生細胞数測定試薬添加により発色させた際の大腸癌細胞株の吸光度を示す。Mesothelin 非発現大腸癌細胞株 (DLD-1) では、抗 Mesothelin 抗体の使用の有無で吸光度に差は認めないものの (a)、発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) では、抗 Mesothelin 抗体の使用により、Control や IgG 投与と比較して、吸光度が有意に低値となった (b)。

MSLN, mesothelin; ns, not significant

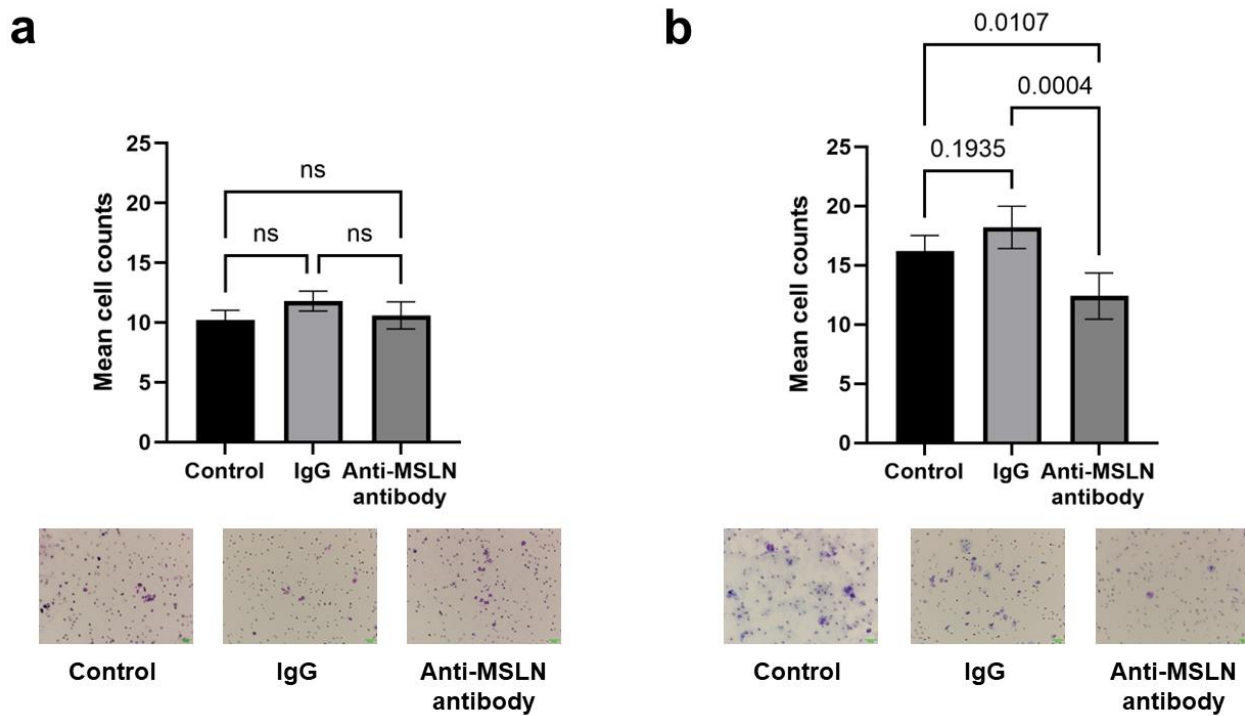


図 15 抗 Mesothelin 抗体の遊走能に対する影響

上段に 24 時間培養後に観察された平均遊走細胞数の比較、下段にその顕微鏡写真を示す。Mesothelin 非発現大腸癌細胞株 (DLD-1) では、遊走した細胞数に差は認めないものの (a)、発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) では、抗 Mesothelin 抗体投与群では、Control 群や IgG 投与群と比較して、遊走した細胞数が有意に低値となった (b)。

MSLN, mesothelin; ns, not significant

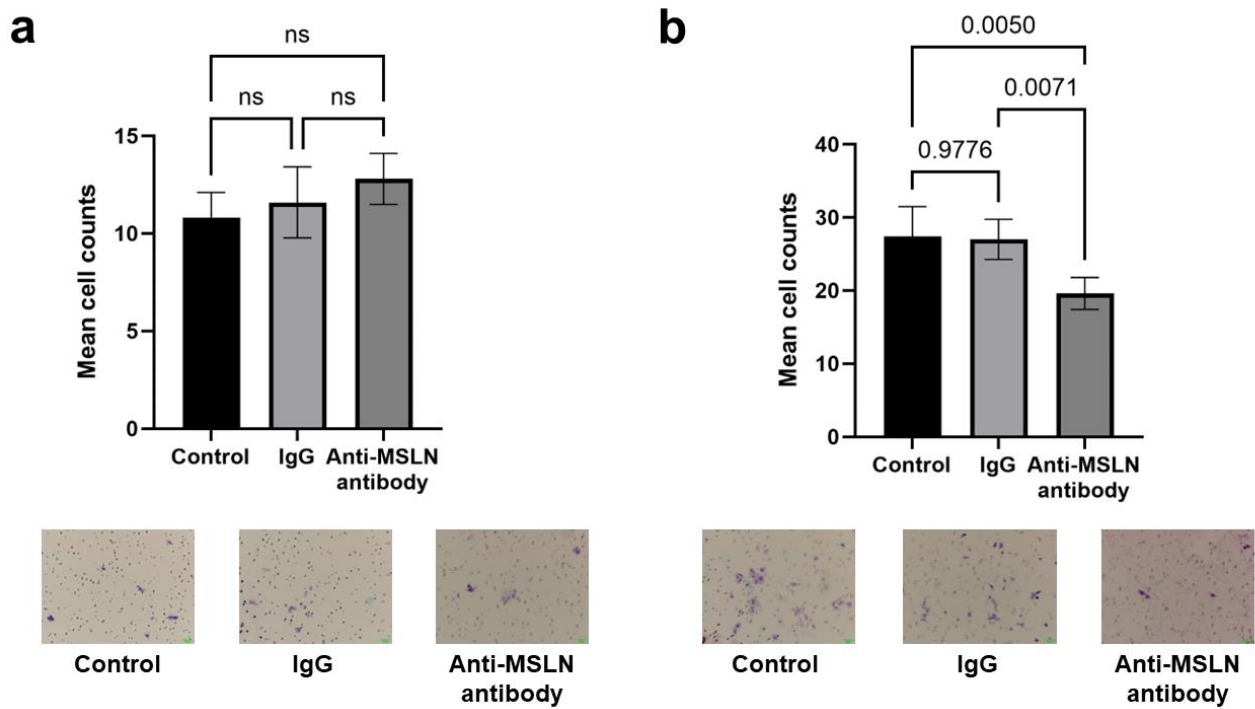
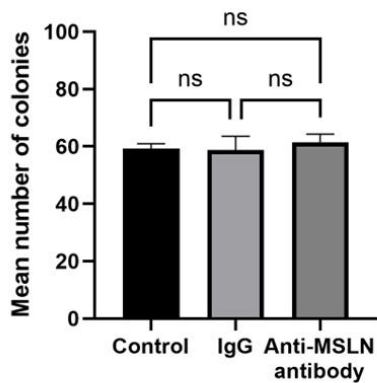
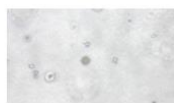
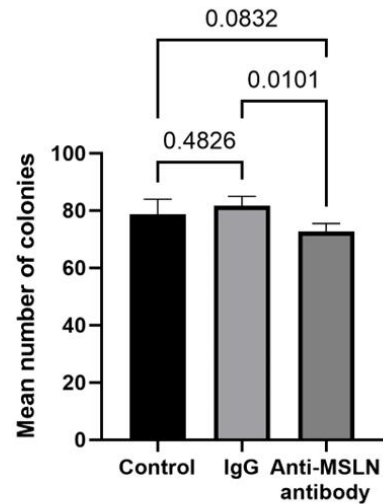
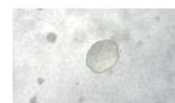
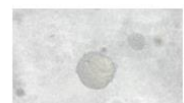


図 16 抗 Mesothelin 抗体の浸潤能に対する影響

上段に 24 時間培養後に観察された平均浸潤細胞数の比較、下段にその顕微鏡写真を示す。Mesothelin 非発現大腸癌細胞株 (DLD-1) では、遊走した細胞数に差は認めないものの (a)、発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) では、抗 Mesothelin 抗体投与群では、Control 群や IgG 投与群と比較して、浸潤した細胞数が有意に低値となった (b)。

MSLN, mesothelin; ns, not significant

a**Control****IgG****Anti-MSLN
antibody****b****Control****IgG****Anti-MSLN
antibody****図 17 抗 Mesothelin 抗体の足場非依存性増殖能に対する影響**

上段に 1 週間培養後に観察された平均コロニー数の比較、下段にその顕微鏡写真を示す。Mesothelin 非発現大腸癌細胞株 (DLD-1) では、形成されたコロニー数に差は認めないものの (a)、発現大腸癌細胞株 (ERC-DLD-1) では、抗 Mesothelin 抗体投与群では、Control 群や IgG 投与群と比較して、形成されたコロニー数が低値となる傾向を示した (b)。

MSLN, mesothelin; ns, not significant

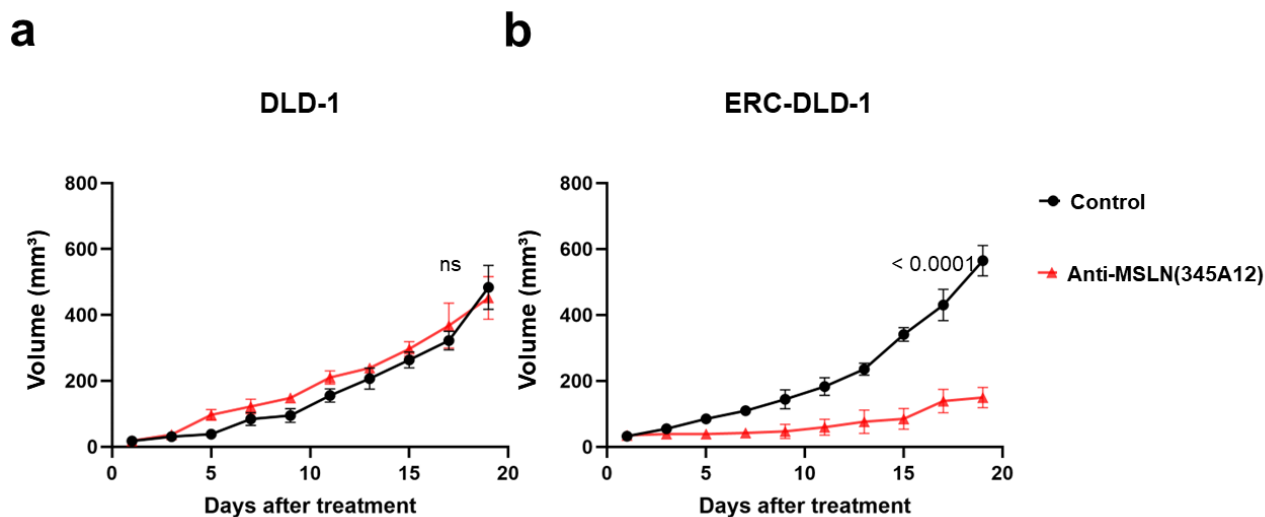


図 18 マウス皮下移植モデルにおける抗 Mesothelin 抗体の抗腫瘍効果

Mesothelin 発現 (ERC-DLD-1) もしくは非発現 (DLD-1) 細胞株を移植した際のマウス皮下腫瘍体積の推移を、抗 Mesothelin 抗体の使用の有無の間で比較した。Mesothelin 非発現細胞株では、抗体投与の有無で差は認められないが (a)、Mesothelin 発現細胞株は抗体投与により、増大が抑制された (b) (治療開始後 17 日での評価, $P < 0.0001$)。

MSLN, mesothelin; ns, not significant

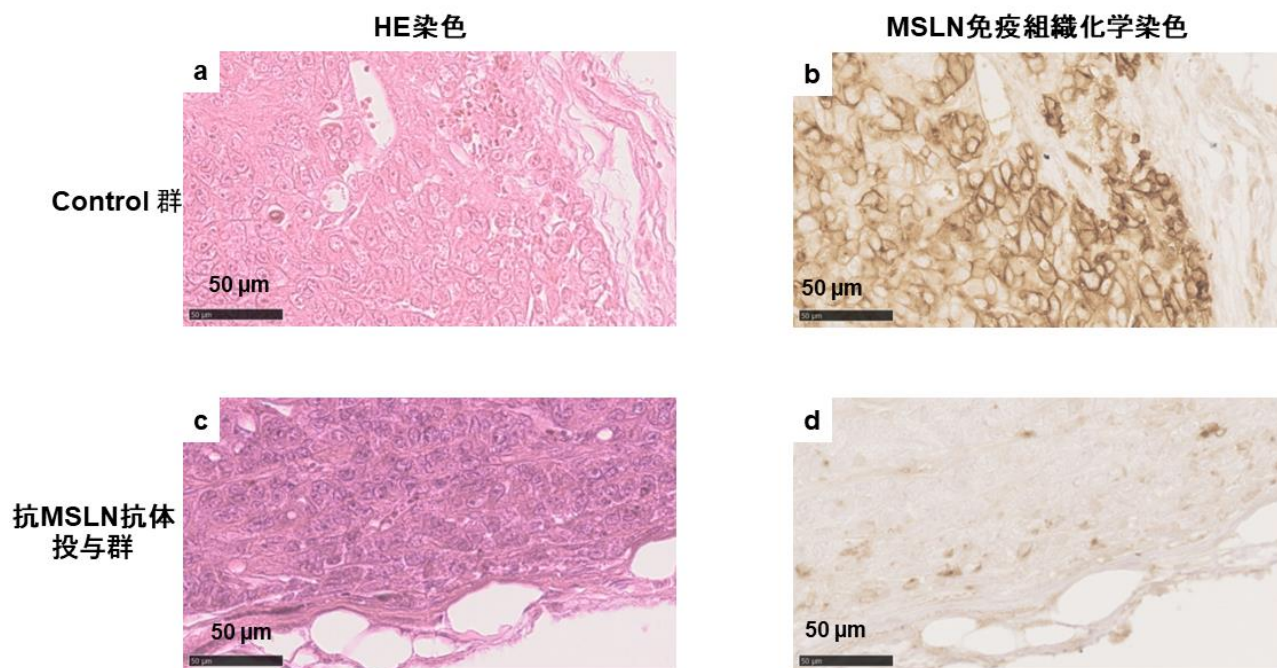


図 19 Mesothelin 発現大腸癌細胞株マウス皮下移植片の Mesothelin 免疫組織化学染色像

—抗 Mesothelin 抗体投与の有無間での比較—

抗 Mesothelin 抗体の投与の有無別に、Mesothelin 発現細胞株（ERC-DLD-1）のマウス皮下移植片の Hematoxylin Eosin（HE）染色像（a, c）および Mesothelin に対する免疫組織化学染色像（b, d）を示す（対物 40 倍視野）。抗 Mesothelin 抗体の投与を行った移植片では、腫瘍細胞内の Mesothelin 発現の減弱を認めた。

MSLN; mesothelin

表 1. Stage IV 大腸癌患者における臨床病理学的特徴

		BD 分類別症例数			P-value
		症例数 (%)	(%)		
			BD1+BD2	BD3	
		n = 362	n = 187	n = 175	
年齢	中央値 (範囲)	67 (28-91)	67 (28-91)	66 (28-87)	0.403
性別	男性	223 (62)	112 (60)	111 (63)	0.489
	女性	139 (38)	75 (40)	64 (37)	
占居部位	右側大腸	99 (28)	31 (17)	68 (39)	< 0.001
	左側大腸	263 (72)	156 (83)	107 (61)	
壁深達度	T1-3	160 (44)	102 (55)	58 (33)	< 0.001
	T4	202 (56)	85 (45)	117 (67)	
組織型	高分化/中分化	308 (85)	166 (89)	142 (81)	0.041
	低分化/粘液癌	54 (15)	21 (11)	33 (19)	
静脈侵襲	軽度	98 (27)	60 (32)	38 (22)	0.026
	高度	264 (73)	127 (68)	137 (78)	
リンパ管侵襲	軽度	238 (66)	148 (79)	90 (51)	< 0.001
	高度	124 (34)	39 (21)	85 (49)	
budding	BD1+BD2	187 (52)	-	-	-
	BD3	175 (48)	-	-	-
リンパ節転移	陰性	63 (17)	47 (25)	16 (9)	< 0.001
	陽性	299 (83)	140 (75)	159 (91)	
遠隔転移分類	M1a	204 (56)	118 (63)	86 (49)	0.007
	M1b	158 (44)	69 (37)	89 (51)	
転移巣癌遺残度	R0/R1	121 (33)	79 (42)	42 (24)	< 0.001
	R2 ^a	241 (67)	108 (58)	133 (76)	
全身化学療法	施行	285 (79)	146 (78)	139 (79)	0.753
	非施行	77 (21)	41 (22)	36 (21)	

表 2. Stage IV 大腸癌の全生存 (OS) 期間に関する臨床病理学的因子の単変量解析及び多変量解析

因子		単変量解析		多変量解析	
		Hazard Ratio (95% CI)	P 値	Hazard Ratio (95% CI)	P 値
年齢	<70yr	1		-	-
	≥70yr	1.27 (0.94 – 1.71)	0.111		
占居部位	左側大腸	1		-	-
	右側大腸	1.19 (0.86 – 1.63)	0.290		
壁深達度	T1-3	1		1	
	T4	1.86 (1.38 – 2.53)	< 0.001	1.39 (1.02 – 1.92)	0.036
組織型	高分化/中分化	1			
	低分化/粘液癌	1.38 (0.91 – 2.02)	0.107	-	-
静脈侵襲	軽度	1			
	高度	1.66 (0.89 – 3.53)	0.123	-	-
リンパ管侵襲	軽度	1			
	高度	1.23 (0.90 – 1.65)	0.182	-	-
budding	BD1+BD2	1		1	
	BD3	1.90 (1.42 – 2.55)	< 0.001	1.51 (1.11 – 2.06)	0.009
リンパ節転移	陰性	1		1	
	陽性	1.53 (1.05 – 2.30)	0.033	1.08 (0.72 – 1.65)	0.723
遠隔転移分類	M1a	1		1	
	M1b	2.36 (1.76 – 3.17)	< 0.001	1.30 (0.94 – 1.80)	0.111
転移巣癌遺残度	R0/R1	1		1	
	R2 ^a	4.29 (3.06 – 6.12)	< 0.001	3.50 (2.38 – 5.14)	< 0.001
全身化学療法	施行	1		-	-
	非施行	1.08 (0.71 – 1.58)	0.712		

^a転移巣非切除を含む。

CI, Confidence interval

表 3. R0/R1 切除 Stage IV 大腸癌の全生存(OS)期間に関する臨床病理学的因子の単変量及び多変量解析

R0/R1 切除症例 (n = 121)		単変量解析		多変量解析	
因子		Hazard Ratio (95% CI)	P 値	Hazard Ratio (95% CI)	P 値
年齢	<70yr	1		-	-
	≥70yr	1.74 (0.96 – 3.10)	0.057		
占居部位	左側大腸	1		-	-
	右側大腸	0.63 (0.27 – 1.27)	0.223		
壁深達度	T1-3	1			
	T4	1.22 (0.69 – 2.15)	0.493	-	-
組織型	高分化/中分化	1			
	低分化/粘液癌	1.11 (0.38 – 2.56)	0.823	-	-
静脈侵襲	軽度	1			
	高度	1.20 (0.64 – 2.36)	0.583	-	-
リンパ管侵襲	軽度	1			
	高度	1.06 (0.54 – 1.96)	0.862	-	-
budding	BD1+BD2	1		1	
	BD3	1.87 (1.05 – 3.30)	0.028	1.94 (1.08 – 3.43)	0.026
リンパ節転移	陰性	1		-	
	陽性	1.26 (0.67 – 2.52)	0.492	-	-
遠隔転移分類	M1a	1		1	
	M1b	2.43 (1.20 – 4.60)	0.007	2.54 (1.25 – 4.83)	0.012
全身化学療法	施行	1		-	-
	非施行	0.63 (0.24 – 1.38)	0.288		

CI, Confidence interval

表 4. R2 切除症例 Stage IV 大腸癌の全生存(OS)期間に関する臨床病理学的因子の単変量及び多変量解析

R2 切除症例 (n = 121)		単変量解析		多変量解析	
		Hazard Ratio (95% CI)	P 値	Hazard Ratio (95% CI)	P 値
年齢	<70yr	1		-	-
	≥70yr	1.14 (0.79 – 1.61)	0.481		
占居部位	左側大腸	1		-	-
	右側大腸	1.38 (0.96 – 1.97)	0.076		
壁深達度	T1-3	1		1	
	T4	1.74 (1.21 – 2.55)	0.003	1.70 (1.18 – 2.51)	0.004
組織型	高分化/中分化	1			
	低分化/粘液癌	1.28 (0.81 – 1.96)	0.266	-	-
静脈侵襲	軽度	1			
	高度	1.23 (0.83 – 1.85)	0.312	-	-
リンパ管侵襲	軽度	1			
	高度	1.04 (0.73 – 1.46)	0.827	-	-
budding	BD1+BD2	1		1	
	BD3	1.59 (1.13 – 2.25)	0.007	1.47 (1.04 – 2.09)	0.028
リンパ節転移	陰性	1		-	
	陽性	1.14 (0.71 – 1.94)	0.609	-	-
遠隔転移分類	M1a	1		-	
	M1b	1.16 (0.83 – 1.63)	0.377	-	-
全身化学療法	施行	1		1	
	非施行	2.01 (1.24 – 3.14)	0.003	2.18 (1.34 – 3.42)	0.002

転移巣非切除を含む。

CI, Confidence interval

表 5. Stage IV 大腸癌患者における Mesothelin 発現と臨床病理学因子との関係

		症例数 n = 254 (%)	Mesothelin 発現別症例数(%)		P 値
			高発現 n = 41	低発現 n = 213	
年齢	中央値 (範囲)	66 (28-88)	62 (37-83)	66 (28-88)	0.292
占居部位	右側結腸	73 (29)	15 (37)	58 (27)	0.413
	左側結腸	181 (71)	26 (63)	155 (73)	
壁深達度	pT1	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0.255
	pT2	2 (1)	0 (0)	2 (1)	
	pT3	101 (40)	11 (27)	90 (42)	
	pT4a	108 (42)	22 (54)	86 (40)	
	pT4b	43 (17)	8 (19)	35 (17)	
組織型	高分化/中分化	218 (86)	36 (88)	182 (85)	0.692
	低分化/粘液癌	36 (14)	5 (12)	31 (15)	
静脈侵襲	軽度	65 (26)	13 (32)	52 (24)	0.336
	高度	189 (74)	28 (68)	161 (76)	
リンパ管侵襲	軽度	158 (62)	25 (61)	133 (62)	0.860
	高度	96 (38)	16 (39)	80 (38)	
Budding	BD1+BD2	120 (47)	105 (49)	15 (37)	0.133
	BD3	134 (53)	108 (51)	26 (63)	
リンパ節転移	陰性	28 (11)	3 (7)	25 (11)	0.408
	陽性	226 (89)	38 (93)	188 (89)	
遠隔転移分類	M1a	130 (51)	13 (32)	117 (55)	0.014
	M1b	80 (32)	16 (39)	64 (30)	
	M1c	44 (17)	12 (29)	32 (15)	
遠隔転移形式	血行性	232 (91)	38 (93)	194 (91)	0.733
	リンパ行性	48 (19)	7 (17)	41 (19)	
	播種性	44 (17)	12 (29)	32 (15)	
転移巣癌遺残度	R0/R1	53 (21)	2 (5)	51 (24)	0.002
	R2 ^a	201 (79)	39 (95)	162 (76)	
全身化学療法	Oxaliplatin 併用	168 (66)	23 (56)	145 (68)	0.138
	Oxaliplatin 非使用	86 (34)	18 (44)	68 (32)	

^a 転移巣非切除を含む。

表 6. Stage IV 大腸癌における Mesothelin 発現別の全身化学療法治療効果の比較

	Mesothelin 高発現 (n = 41)	Mesothelin 低発現 (n = 213)	P 値
	n (%)	n (%)	
治療有効性			
Objective response rate (ORR ^a)	9 (22.0)	97 (45.5)	< 0.001
Disease control rate (DCR ^b)	27 (65.9)	183 (85.9)	0.002
最良総合効果			
Complete response (CR)	0 (0.0)	5 (2.4)	
Partial response (PR)	9 (22.0)	92 (43.2)	
Stable disease (SD)	18 (43.9)	86 (40.4)	
Progressive disease (PD)	14 (34.2)	30 (14.1)	

^a CR もしくは PR いずれかの症例の割合。

^b CR、 PR もしくは SD いずれかの症例の割合。