

上部尿路上皮癌における tumor budding と  
ACTN4 異常発現の臨床病理学的意義に関する研究

かわむら かずき

河村 一樹

(泌尿器科学専攻)

防衛医科大学校

令和 4 年度

## 目 次

第1章 緒言	1 頁
第2章 上部尿路上皮癌における tumor budding の尿路外再発及び生命予後 予測因子としての重要性の検討	
第1節 背景と目的	2 頁
第2節 対象症例と方法	3 頁
第3節 結果	5 頁
第4節 小括	9 頁
第3章 上部尿路上皮癌における ACTN4 異常発現の臨床病理学的意義に 関する検討	
第1節 背景と目的	10 頁
第2節 対象症例、材料及び方法	11 頁
第3節 結果	16 頁
第4節 小括	21 頁
第4章 考察	22 頁
第5章 結論	28 頁

謝辞	29 頁
引用文献	30 頁
図表	42 頁

## 第1章 緒言

腎盂・尿管原発の尿路上皮癌（以下、上部尿路上皮癌）は、尿路上皮癌全体の約5%程度を占める[1]。本腫瘍は遠隔転移やリンパ節転移を有する症例を除き腎尿管全摘除術の適応となるが、約30%に術後の尿路外再発〔リンパ節転移、遠隔転移、及び局所（膀胱/対側上部尿路を除く）再発〕を認め、その際には多剤併用化学療法の効果も限定的であり、患者予後は極めて不良となる[2]。摘除検体の組織所見における従来の再発/予後予測因子として、組織学的深達度〔pathological (p) T stage〕、組織学的悪性度（tumor grade）、脈管侵襲が挙げられる[1]。しかしながら、腎盂領域で共に深達度 pT3 と診断される腎実質浸潤と腎盂脂肪組織浸潤を呈する腫瘍群間の患者予後の差[3, 4]や殆どの浸潤癌が high grade に分類される現在の grading system[5]の問題点が指摘されており、新規の再発/予後予測因子の検索が重要視されている。

本研究では、上部尿路上皮癌細胞の浸潤転移能に着目し、大腸癌を主体に様々な癌腫で独立した患者予後不良因子としてのエビデンスが蓄積されてきている tumor budding（簇出）の程度[6]及びその組織形態の分子基盤の1つとして、アクチン線維の束状化による腫瘍細胞の運動能亢進を介して、その浸潤・転移を促進するとされる  $\alpha$ -actinin4（ACTN4）の発現[7]について検討した。そして、これらの因子の発現亢進と従来の臨床病理学的因子との関連性を検討し、その予後予測能を明らかにすることで、新たな治療戦略の確立に資することを目的とした。

なお、本研究は防衛医科大学校倫理委員会の承認（承認番号 4007）を得ている。

## 第2章 上部尿路上皮癌における tumor budding の尿路外再発及び生命予後予測因子としての重要性の検討

### 第1節 背景と目的

Tumor budding とは、癌浸潤先進部における孤在性の癌細胞、または5個未満の癌細胞集塊から構成される組織所見[8-10]を指し（図1）、上皮間葉転換（epithelial-mesenchymal transition、EMT）との関連性が指摘されている[11-13]。Tumor budding は、大腸癌[11, 12, 14, 15-21]を初めとして、肺癌[22]、乳癌[23]、膵臓癌[24]、及び頭頸部癌[25]を含む様々な癌腫において、患者予後予測因子としての有用性が確立されつつある。一方で、尿路上皮癌における tumor budding の意義に関する報告は膀胱癌に関する僅かな報告のみで、かつ相反する結果を示している。Fukumoto ら[10]は経尿道的膀胱腫瘍切除術（transurethral resection of bladder tumor、TURBT）検体を使用し、tumor budding が pT1 膀胱癌のステージ進行を予見する因子であると報告した[10]。しかしながら、筋層浸潤性膀胱癌を対象とした別の研究では、tumor budding は有意な生命予後予測能を有さないと報告された[26]。更に、上部尿路上皮癌において tumor budding の臨床病理学的意義及び予後因子としての重要性を検討した研究報告は、我々の知りうる限りでは存在しない。

本章では、浸潤性上部尿路上皮癌の手術検体を用いて腫瘍毎の tumor budding の程度を評価し、種々の臨床病理学的因子との関連性、加えて無尿路外再発生存率及び全生存率を指標とした患者予後への影響について検討した。

## 第2節 対象症例と方法

### 第1項 対象症例

防衛医科大学校病院において1999年から2018年の間に腎尿管全摘除術、ないし尿管部分摘除術が施行された上部尿路上皮癌211症例（腎盂癌110症例、尿管癌101症例）のうち、非浸潤性癌のみで浸潤癌のない35症例（pTa28症例、pTis7症例）、患者の臨床情報が不十分な21症例、手術時に遠隔転移を伴う9症例、術前化学療法を施行された4症例、深達度pT4の3症例、及び同時に膀胱全摘除術が施行された4症例を除外した、pT1-3の浸潤性上部尿路上皮癌135症例を対象とした。腎盂癌と尿管癌が同一検体に併存する症例においては、組織学的深達度がより高い方の腫瘍のみを評価の対象とした。このような症例は23症例存在し、そのうち16症例で腎盂癌、7症例で尿管癌を主癌巣とした結果、73例の腎盂癌、62例の尿管癌が評価対象となった（図1）。臨床病理学的因子として年齢、性別、腫瘍側、手術方法（腎尿管全摘除術または尿管部分摘除術）、手術手技（開腹手術または腹腔鏡手術）、術後補助化学療法の有無、組織学的深達度、tumor grade、脈管侵襲、病理学的リンパ節転移の有無、切除断端への腫瘍露出の有無、腫瘍局在（腎盂または尿管）、随伴する腫瘍組織亜型の有無、及び腫瘍の肉眼所見（乳頭状または非乳

頭状)を検討した。本研究では、尿路外再発を「膀胱及び対側の上部尿路を除いた局所再発及び/またはリンパ節転移、及び/または遠隔転移」と定義した。当施設では拡大リンパ節郭清はルーチンでは施行されず、手術中にリンパ節腫大を認めた、あるいは術前画像診断で組織学的深達度の進行 (pT3 ないしは pT4) が疑われた 45 症例 (33%) に限り、限局的または拡大リンパ節郭清が施行されていた。術後補助化学療法に関しては、pT3 以上の組織学的進行度及び/または病理学的リンパ節転移陽性の症例を対象に担当医の判断で施行され、28 症例 (21%) に術後補助化学療法が施行されていた。局所再発及び遠隔転移に関しては、手術後 5 年間は 3~6 ヶ月毎、5 年以降は 6~12 ヶ月毎に画像診断による経過観察が行われた。

## 第 2 項 病理所見評価方法

各症例の hematoxylin-eosin (H&E) 染色標本について、2016 年 WHO 分類[27]に基づき、組織学的レビューを行った。Tumor grade は、2004 年/2016 年 WHO 分類に基づいて low あるいは high grade の 2 段階で評価した。組織学的深達度は the American Joint Committee on Cancer (AJCC) Staging Manual 8<sup>th</sup> edition に基づいて評価された[28]。過去の文献[8, 14]を参照し、tumor budding を腫瘍の浸潤先進部 (側方を除く浸潤深部) における孤在性の癌細胞または 5 個未満の癌細胞集塊と定義し、顕微鏡 200 倍視野下 (視野数 22) で 10 個以上の tumor budding が存在する場合は「high-grade tumor budding」、10 個未満の場合を「low-grade tumor

budding」と判定した。図2に high-grade tumor budding を伴う腫瘍の組織像を示す。

### 第3項 統計処理

統計解析には、JMP software (version 14、SAS、Tokyo、Japan) を用いた。

Tumor budding status と他の臨床病理学的因子の関連性の検討には、Pearson のカイ二乗検定、ないしは Fisher の正確検定を行った。無尿路外再発生存率と全生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、生存分布の比較には log-rank 検定を用いた。Cox 比例ハザードモデル分析を用いて、tumor budding status、及び他の臨床病理学的因子が、無尿路外再発生存期間と全生存期間に及ぼす影響について検討した。 $p$  値が 0.05 未満を示した場合に、統計学的有意差ありと判定した。

## 第3節 結果

### 第1項 臨床病理学的背景

患者年齢の範囲は 38 歳から 91 歳 (中央値 72 歳) であり、女性が 36 症例で男性が 99 症例であった。全症例が the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) performance status [29]における grade 2 以下であった。腫瘍側に関しては、75 症例が左側、60 症例が右側の腫瘍であった。11 症例が切除断端陽性と診断された。腫瘍の肉眼的所見は 102 症例が乳頭状、33 症例が非乳頭状であった。



130 症例が腎尿管全摘除術、5 症例が尿管部分摘除術を施行され、71 症例に対しては開腹手術、64 症例に対しては腹腔鏡下手術が行われた。

組織学的検討により全症例が尿路上皮癌であることが確認され、36 症例に随伴する腫瘍組織亜型を認めた。内訳は扁平上皮への分化が 24 症例、腺上皮への分化が 4 症例、扁平上皮及び腺上皮への分化が 4 症例、栄養膜細胞への分化、肉腫様亜型、扁平上皮への分化及び肉腫様亜型、リンパ上皮腫様亜型がそれぞれ 1 症例ずつであった。このうち 9 症例では腫瘍浸潤先進部に亜型成分が存在せず、残りの 27 症例において浸潤先進部の tumor budding status は、尿路上皮癌成分と組織亜型成分で一致していた。High-grade tumor budding は 135 症例中 41 症例 (30%) に認められ、そのうち 16 症例が腎盂癌、25 症例が尿管癌であった。

## 第 2 項 Tumor budding status と臨床病理学的因子との関連性

Tumor budding status と臨床病理学的因子との関連性を表 1 に記載した。組織学的深達度 (pT1 / pT2 / pT3) に関して、pT1 / pT2 / pT3 の深達度毎のそれぞれ 3%/17%/47%に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p < 0.0001$ )。検討症例の大部分は high grade 腫瘍であり、深達度 pT1 の 3 症例 (全体の 2.2%) のみが low grade と分類されその頻度が極めて少ないため、統計学的理由から tumor grade は解析から除外した。尿管侵襲に関して、尿管侵襲ありの症例群の 36 例 (62%)、尿管侵襲なしの症例群の 5 例 (6%) に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p < 0.0001$ )。病理学的リンパ節転

移に関して、陽性群の 10 症例（91%）、陰性または郭清なしの症例群の 31 例（25%）に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた（ $p < 0.0001$ ）。腫瘍局在（腎盂/尿管）に関して、腎盂癌症例の 16 症例（22%）、尿管癌症例の 25 症例（40%）に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた（ $p = 0.021$ ）。尿路上皮癌の腫瘍組織垂型の随伴に関して、随伴ありの症例群の 18 症例（50%）、随伴なしの症例群の 23 症例（23%）に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた（ $p = 0.003$ ）。腫瘍肉眼所見（乳頭状/非乳頭状）に関して、乳頭状の症例群の 20 例（20%）、非乳頭状の症例群の 21 例（63%）に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた（ $p < 0.0001$ ）。術後補助化学療法に関して、施行例の 17 症例（61%）、未施行例の 24 例（22%）に high-grade tumor budding を認め、統計学的に有意差を認めた（ $p < 0.0001$ ）。

年齢、性別、腫瘍側、手術方法、手術手技、及び切除断端への腫瘍露出の有無に関しては、high-grade tumor budding 症例群と low-grade tumor budding 症例群との間に統計学的な有意差を認めなかった。

### 第 3 項 無尿路外再発生存期間と全生存期間

手術後の経過観察期間の平均値は 67.4 ヶ月、中央値は 53.6 ヶ月、観察期間範囲は 0.4 ヶ月から 240.5 ヶ月であった。無尿路外再発生存期間に関して、135 症例中 44 症例（33%）に経過観察期間における尿路外再発が確認され、27 症例が high-

grade tumor budding 群、17 症例が low-grade tumor budding 群に含まれていた。5 年無尿路外再発生存率は high-grade tumor budding 群で 29%、low-grade tumor budding 群で 84%であった (表 2)。Tumor budding status で層別化した 135 症例の尿路外再発曲線を図 3a に示す。Log-rank 検定により high-grade tumor budding と尿路外再発のリスクとの間に有意な関連が認められた ( $p < 0.0001$ )。Cox 比例ハザードモデル分析の単変量解析では、組織学的深達度 [pT1-2 vs. pT3、pT1 vs. pT2-3 (それぞれ  $p = 0.002$  と  $0.015$ ) ]、脈管侵襲 ( $p < 0.0001$ )、病理学的リンパ節転移 (陽性 vs. 陰性またはリンパ節郭清なし、 $p < 0.0001$ )、腫瘍組織亜型の存在 ( $p = 0.021$ )、非乳頭状肉眼所見 ( $p = 0.012$ )、tumor budding ( $p < 0.0001$ ) が、無尿路外再発生存期間と有意に関連していた (表 2)。多変量解析において多重共線性を避けるため、組織学的深達度に関する pT1 vs. pT2-3 のサブグループは検討因子から除外された。多変量解析にて、脈管侵襲と high-grade tumor budding の 2 因子が無尿路外再発生存期間の独立したリスク因子であった (表 3；脈管侵襲、 $p = 0.039$ 、ハザード比 = 2.50；high-grade tumor budding、 $p = 0.014$ 、ハザード比 = 2.88)。尿路外再発の独立予測因子 (脈管侵襲、及び high-grade tumor budding) の数によって、135 症例を 3 群に層別化した結果、5 年無尿路外再発生存率は 3 群 (因子なし、1 因子、2 因子) でそれぞれ 90%、65%、27%であり、統計学的に有意差を認めた (図 4)。

全生存期間に関しては、135 症例中 55 症例 (41%) が経過観察期間にイベントを生じ、そのうち 25 症例が high-grade tumor budding 群、30 症例が low-grade

tumor budding 群に含まれていた。5年全生存率は high-grade tumor budding 群で 37%、low-grade tumor budding 群で 81%であった（表 4）。Tumor budding status で層別化した 135 例の全生存曲線を図 3b に示す。2 群の全生存期間には統計学的に有意な差が認められた（log-rank 検定、 $p < 0.0001$ ）。Cox 比例ハザードモデル分析の単変量解析では、組織学的深達度（pT1-2 vs. pT3、 $p = 0.024$ ）、脈管侵襲（ $p < 0.0001$ ）、病理学的リンパ節転移（ $p = 0.04$ ）の存在、及び high-grade tumor budding（ $p < 0.0001$ ）が、全生存期間の短縮と有意に関連していた（表 4）。多変量解析では、high-grade tumor budding のみが全生存期間の独立したリスク因子であった（表 5； $p = 0.024$ 、ハザード比 = 2.33）。

#### 第 4 節 小括

上部尿路上皮癌における high-grade tumor budding は、組織学的深達度、脈管侵襲、腫瘍組織亜型の随伴などの従来の臨床病理学的因子と有意に関連するとともに、同腫瘍患者における独立した再発及び予後予測因子であることが示された。

### 第3章 上部尿路上皮癌における ACTN4 異常発現の臨床病理学的意義に関する 検討

#### 第1節 背景と目的

ACTN4 は、アクチン細胞骨格蛋白質を束ねる非筋肉型の  $\alpha$ -Actinin のアイソフォームの一つで、細胞の運動能亢進に関与し、腫瘍細胞の浸潤・転移を促進する[7, 30]。腫瘍転移能の獲得には、上皮性癌細胞がその細胞極性や周囲細胞との接着機能を失い、遊走、浸潤能を得ることで間葉系様の細胞へと変化する過程である EMT が重要な因子の1つとされ[13]、ACTN4 はこの EMT にも関与することが示されつつある[31, 32]。大腸癌[33, 34]、乳癌[7, 35, 36]、肺癌[37, 38, 39, 40]、膵臓癌[41, 42]、卵巣癌[43, 44, 45]、唾液腺癌[46]、口腔舌癌[47]、及び前立腺癌[48]を含む種々の癌腫において、ACTN4 蛋白質の過剰発現あるいは *ACTN4* の増幅と癌の再発・転移との関連性が報告されている。*ACTN4* の増幅は、ACTN4 蛋白質の過剰発現の主たる機序とされる[39, 41, 44, 46]。尿路上皮癌に関する過去の報告では、膀胱癌細胞株及び膀胱癌手術標本における ACTN4 蛋白質の過剰発現が、癌の増殖活性・浸潤性の増加、及び癌の進行度 や tumor grade の上昇と関連することが報告されている[49, 50]。しかしながら、上部尿路上皮癌における ACTN4 異常発現の頻度及びその臨床病理学的意義や予後因子としての重要性を検討した研究報告は、我々の知りうる限りでは存在しない。

本章では、上部尿路上皮癌の手術検体を用い、免疫組織化学法による ACTN4 蛋白質の過剰発現及び fluorescence in situ hybridization (FISH) 法による *ACTN4* のコピー数異常を評価し、種々の臨床病理学的因子との関連性、加えて無尿路外再発生存率及び全生存率を指標とした患者予後への影響について検討した。

## 第2節 対象症例、材料及び方法

### 第1項 対象症例

防衛医科大学校病院において、1999年から2018年に上部尿路上皮癌に対して腎尿管全摘除術、ないし尿管部分摘除術を施行された上部尿路上皮癌211症例（腎盂癌110症例、尿管癌101症例）において、患者臨床情報が不十分な18症例、手術時に遠隔転移を伴う9症例、術前化学療法を施行された4症例、同時に膀胱全摘除術を施行された4症例、及び検体の保存状態により FISH 法で十分な *ACTN4* の発現情報を得られなかった8症例を除外した上部尿路上皮癌168症例を対象とした。腎盂癌と尿管癌が同一検体に併存する症例においては、組織学的深達度がより高い方の癌腫のみを評価の対象とした。このような症例は17症例存在し、そのうち13症例で腎盂癌、4症例で尿管癌を主癌巣とした結果、92の腎盂癌、76の尿管癌が評価の対象となった（図5）。臨床病理学的因子として年齢、性別、腫瘍側、手術方法（腎尿管全摘除術または尿管部分摘除術）、手術手技（開腹手術または腹腔鏡手術）、組織学的深達度、tumor grade、脈管侵襲、病理学的リンパ節転移の有無、切除断端への腫瘍露出の有無、腫瘍局在（腎盂または尿管）、随伴する

carcinoma in situ (CIS) の有無、随伴する腫瘍組織亜型の有無、及び腫瘍肉眼所見（乳頭状または非乳頭状）を検討した。尿路外再発の定義、及び遠隔転移を含めた経過観察方法は、第2章第2節の「対象症例と方法」で記載したものと同様であり、リンパ節郭清の適応基準により、41症例（24%）に限局的または拡大リンパ節郭清が施行されていた。

## 第2項 病理所見評価方法

各症例の H&E 染色標本について、2016年 WHO 基準[27]に基づき、組織学的レビューを行った。Tumor grade は、2004年/2016年の WHO 分類に基づいて low あるいは high grade の2段階で評価した。組織学的深達度は、AJCC Staging Manual 8<sup>th</sup> edition に基づいて評価された[28]。統計解析の際には、組織学的深達度を「pTa、pTis、pT1」及び「pT2-4」の2群に分類した。

## 第3項 免疫組織化学法

ACTN4 蛋白質の発現は、過去の文献[45]を参照し、免疫組織化学法を用いて検討した。検討対象病変を含むホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックから、4  $\mu$ m 厚の連続切片を作製し、これらを免疫組織化学法に用いた。

一次抗体は、ACTN4 の N 末端配列である合成ペプチド NQSYQYGPSSAGNGAGC に対して上昇させた一次抗体（Ab-2、マウスモノクローナル）を 500 倍希釈にて使用した。切片に対し、キシレンによる脱パラフィン処

理及び希釈系エタノールによる親水処理を行った。抗原賦活には、0.01M クエン酸緩衝液 (pH 6.0) に浸してオートクレーブ処理 (121°C、10 分間) を行った。抗原賦活処理後、緩徐に室温まで低下させた後、5 %過酸化水素を用いて 5 分間内因性ペルオキシダーゼの抑制を行った。

希釈一次抗体と 4°Cで一晩 (18~24 時間) 反応させた後、二次抗体 (Dako、Glostrup、Denmark) を滴下し、30 分間室温で反応させた。0.2 %の 3, 3'-diaminobenzidine 溶液で 5 分間の発色の後、ヘマトキシリンで核染色を施行した。陽性対象には、非腫瘍性の成熟胎盤組織 (絨毛膜絨毛) を使用し、陰性対象には、一次抗体を含まない切片を使用した。

#### 第 4 項 免疫組織化学法の評価

免疫組織化学法の評価は、壊死などによる変化や組織挫滅のない組織構築及び細胞形態の比較的保たれた領域にて行った。

ACTN4 蛋白質の発現は、細胞質及び／または細胞膜の免疫反応性を評価対象とした。過去の文献[45, 50]に基づいて、ACTN4 の発現強度を、血管内皮細胞の染色程度と比較して、陰性 (score 0)、軽度 (score 1)、中等度 (score 2)、高度 (score 3) の 4 段階に分けてスコアリングした。腫瘍細胞の 50%以上が score 2 及び score 3 の発現強度を示した場合の腫瘍における免疫反応性を ACTN4 蛋白質の過剰発現ありと定義した (図 6)。



本検討における免疫組織化学法の評価は、二人の観察者による独立判定により行われた。二人の観察者間で ACTN4 蛋白質の過剰発現の有無に関する判定結果が不一致であった 20 症例（12%）は、ディスカッション顕微鏡を用いた討議により合意判定を得て、その合意判定を最終結果として用いた。

## 第5項 FISH 法

*ACTN4* の増幅は、過去の文献[44]を参照し、FISH 法を用いて検討した。検討対象病変を含むホルマリン固定パラフィン包埋組織ブロックから、4 μm 厚の連続切片を作製し、これらを FISH 法に用いた。*ACTN4* SpectrumOrange/Chromosome 19 DNA probe (CEN19p) SpectrumGreen DNA probe (Abnova Corporation、Taipei City、Taiwan) を用いて、過去の文献に記載された手法[45]と同じ方法で FISH 法を行った。プローブと変性させた腫瘍組織の DNA の hybridization を行い（37°C、48 時間）、4,6-diamidino-2-phenylindone を用いて核の対比染色を行った。

## 第6項 FISH 法の評価

間期腫瘍細胞核 20 個における CEN19p と *ACTN4* の両プローブからの蛍光シグナルの数をカウントし、腫瘍細胞が *ACTN4* に対して局所的に免疫反応を示す場合は、*ACTN4* 免疫反応に対応する腫瘍細胞においてシグナル数のカウントを実施した。各腫瘍成分の腫瘍細胞核あたりの *ACTN4* の平均コピー数は、*ACTN4* シグナ

ルの総カウント数をカウントした核数で割ることにより算出し、*ACTN4* の平均コピー数が 4.0 以上の症例を「*ACTN4* のコピー数増加あり」と定義した。

*ACTN4*/CEN19p 比は、*ACTN4* シグナルの総カウント数を CEN19p シグナルの総カウント数で割ることにより算出した。*ACTN4*/CEN19p 比 が 2.0 以上の場合、「*ACTN4* の増幅が存在する」と定義した。陰性対象として、非腫瘍性の尿路上皮組織を使用した。

本検討における FISH 法の評価は、二人の観察者による独立判定により行った。二人の観察者間で *ACTN4* のコピー数増加及び増幅の有無に関する判定結果が不一致であった 12 症例（7%）は、さらに 40 核までカウントした上で二人の観察者間で討議を行い、統一した見解を得た。図 7 に FISH 解析の代表的画像を示す。

## 第 7 項 統計処理

統計解析には、JMP software (version 14、SAS、Tokyo、Japan) を用いた。*ACTN4* の蛋白質の過剰発現及び *ACTN4* の増幅に関する status と他の臨床病理学的因子の関連性の検討には、Pearson のカイ二乗検定、ないしは Fisher の正確検定を用いて分析した。無尿路外再発生存率と全生存率は Kaplan-Meier 法を用いて算出し、生存分布の比較には log-rank 検定を用いた。Cox 比例ハザードモデル分析を用いて、*ACTN4* の蛋白質の過剰発現と *ACTN4* の増幅に関する status 及び他の臨床病理学的因子が、無尿路外再発生存期間及び全生存期間に及ぼす影響について検討した。 $p$  値が 0.05 未満を示した場合に、統計学的有意差ありと判定した。

### 第3節 結果

#### 第1項 臨床病理学的背景

患者の年齢の範囲は38歳から91歳（中央値71歳）であり、女性が44症例で男性が124症例であった。全症例が ECOG performance status[29]における grade 2 以下であった。腫瘍側に関しては、89症例が左側、79症例が右側の腫瘍であった。15症例が切除断端陽性と診断された。CIS 及び腫瘍組織亜型の随伴を、それぞれ32症例、37症例で認めた。腫瘍の肉眼的所見は123症例が乳頭状、35症例が非乳頭状であった。163症例が腎尿管全摘除術で5症例が尿管部分摘除術を施行され、85症例に対しては開腹手術、83症例に対しては腹腔鏡下手術が行われた。

組織学的検討により、全症例が尿路上皮癌であることが確認された。ACTN4 蛋白質の過剰発現は168症例中49症例（29%）で認められ、そのうち腎盂癌は27症例、尿管癌は22症例であった。また、ACTN4 のコピー数増加と増幅はそれぞれ25症例（15%）、21症例（13%）で認められた。ACTN4 の増幅を認めた全21症例が同時に ACTN4 のコピー数増加を認めたため、上記の25症例を「ACTN4 のコピー数増加あり」としてまとめ、それ以外の143症例を「ACTN4 のコピー数増加なし」と定義した。ACTN4 のコピー数増加を示す25症例のうち、腎盂癌は8症例、尿管癌は17症例であった。

## 第2項 ACTN4 蛋白質の過剰発現と *ACTN4* のコピー数増加との関連性

*ACTN4* のコピー数増加を示す症例群において、ACTN4 蛋白質の過剰発現を示す症例は 19 症例 (76%)、示さない症例は 6 症例 (24%) であり、*ACTN4* のコピー数増加なしの症例群における ACTN4 蛋白質の過剰発現を示す症例は 30 症例 (21%)、示さない症例は 113 症例 (79%) で、統計学的に有意差を認めた ( $p < 0.0001$ )。

## 第3項 臨床病理学的因子と *ACTN4* status との関連性

臨床病理学的因子と *ACTN4* のコピー数に関する status との関連性を表 6 に記載した。非浸潤癌 (pTa 及び pTis) において、*ACTN4* のコピー数増加を示す症例は認めなかった。浸潤癌における組織学的深達度 (pT1 / pT2 / pT3 / pT4) に関して、pT1 / pT2 / pT3 / pT4 の深達度毎のそれぞれ 12%/17%/22%/67%に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p = 0.0062$ )。Tumor grade について、15 症例 (9%) が low grade と分類され、その全てで *ACTN4* のコピー数増加を示さなかった。*ACTN4* のコピー数増加を認める全症例が high grade であり、統計学的理由から tumor grade は解析から除外された。脈管侵襲に関して、脈管侵襲ありの症例群の 22 症例 (39%)、脈管侵襲なしの症例群の 3 例 (3%) に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p < 0.0001$ )。病理学的リンパ節転移に関して、陽性群の 4 症例 (40%)、陰性または郭清なしの症例群の 21 例 (13%) に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的

に有意差を認めた ( $p = 0.0065$ )。切除断端への腫瘍露出に関して、陽性群の 6 症例 (40%)、陰性群の 19 症例 (12%) に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p = 0.0042$ )。腫瘍局在 (腎盂/尿管) に関して、腎盂癌症例の 8 症例 (9%)、尿管癌症例の 17 症例 (22%) に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p = 0.013$ )。尿路上皮癌の腫瘍組織亜型の随伴に関して、随伴ありの症例群の 13 症例 (35%)、随伴なしの症例群の 12 症例 (9%) に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p < 0.0001$ )。腫瘍肉眼所見 (乳頭状/非乳頭状) に関して、乳頭状の症例群の 14 例 (11%)、非乳頭状の症例群の 11 例 (31%) に *ACTN4* のコピー数増加を認め、統計学的に有意差を認めた ( $p = 0.002$ )。

年齢、性別、腫瘍側、手術方法、手術手技、tumor grade 及び CIS の随伴状況に関しては、*ACTN4* コピー数の status に関する統計学的な有意差を認めなかった。

臨床病理学的因子と *ACTN4* 蛋白質の過剰発現との関連性については、上記の *ACTN4* コピー数の status との関連性と概ね類似した結果であり、表 7 として記載するにとどめる。

#### 第 4 項 無尿路外再発生存期間と全生存期間

手術後の経過観察期間の平均値は 77.3 ヶ月、中央値は 65.0 ヶ月、観察期間範囲は 0.4 ヶ月から 249.0 ヶ月であった。

無尿路外再発生存期間に関して、168 症例中 50 症例（30%）に経過観察期間における尿路外再発が確認され、18 症例が *ACTN4* のコピー数増加を示す症例群、32 症例がコピー数増加なしの症例群に含まれていた。5 年無尿路外再発生存率は *ACTN4* のコピー数増加を示す症例群で 27%、コピー数増加なしの症例群で 80% であった（表 8）。*ACTN4* のコピー数増加の有無で層別化した 168 症例の尿路外再発曲線を図 8a に示す。Log-rank 検定により、*ACTN4* のコピー数増加と尿路外再発のリスクとの間に有意な関連が認められた（図 8a； $p < 0.0001$ ）。Cox 比例ハザードモデル分析の単変量解析では、組織学的深達度（ $p < 0.0001$ ）、脈管侵襲（ $p < 0.0001$ ）、病理学的リンパ節転移（陽性 vs. 陰性／リンパ節郭清なし、 $p < 0.0001$ ）、切除断端陽性（ $p = 0.0015$ ）、腫瘍組織亜型の随伴（ $p < 0.0001$ ）、非乳頭状肉眼所見（ $p = 0.0001$ ）、*ACTN4* 蛋白質の過剰発現（ $p < 0.0001$ ）、*ACTN4* のコピー数増加（ $p < 0.0001$ ）が、無尿路外再発生存と有意に関連していた（表 8）。*ACTN4* 蛋白質の過剰発現の status は *ACTN4* のコピー数の status と強く相関しており、多変量解析においてこの 2 因子は別個のグループとして検討した。*ACTN4* のコピー数増加を含む解析では、組織学的深達度、脈管侵襲、病理学的リンパ節転移、腫瘍組織亜型の随伴、*ACTN4* のコピー数増加の 5 因子が、無尿路外再発生存期間の独立したリスク因子であった（表 9； $p = 0.034$ 、 $0.031$ 、 $0.033$ 、 $0.026$  及び  $0.038$ 、ハザード比 = 2.99、2.46、2.42、2.09 及び 2.16）。一方、*ACTN4* 蛋白質の過剰発現に関して、5 年無尿路外再発率は *ACTN4* 蛋白質の過剰発現を認める症例群で 40%、認めない症例群で 84% であった

(表 8)。ACTN4 蛋白質の過剰発現の有無で層別化した 168 症例の尿路外再発曲線を図 9a に示す。Log-rank 検定により ACTN4 蛋白質の過剰発現と尿路外再発のリスクとの間に有意な関連が認められた (図 9a;  $p < 0.0001$ )。ACTN4 蛋白質の過剰発現は、単変量解析では無尿路外再発期間に関連する有意な因子であったものの、多変量解析では無尿路外再発期間の独立したリスク因子とはならなかった (表 10;  $p = 0.089$ 、ハザード比 = 1.78)。

全生存期間に関しては、168 症例中 59 症例 (35%) が経過観察期間にイベントを生じ、17 症例が *ACTN4* のコピー数増加を示す症例群、42 症例が *ACTN4* のコピー数増加なしの症例群に含まれていた。5 年全生存率は *ACTN4* のコピー数増加を示す症例群で 35%、コピー数増加なしの症例群で 78%であった (表 11)。

*ACTN4* コピー数増加の有無で層別化した 168 症例の全生存曲線を図 8b に示す。

Log-rank 検定により、2 群の全生存期間には統計学的に有意差が認められた (図 8b;  $p < 0.0001$ )。Cox 比例ハザードモデル分析の単変量解析では、70 歳以上 ( $p = 0.009$ )、組織学的深達度 ( $p = 0.0002$ )、脈管侵襲 ( $p < 0.0001$ )、病理学的リンパ節転移 (陽性 vs. 陰性/リンパ節郭清なし、 $p = 0.0037$ )、切除断端陽性 ( $p = 0.0045$ )、腫瘍組織亜型の随伴 ( $p = 0.0081$ )、非乳頭状肉眼所見 ( $p = 0.0085$ )、ACTN4 蛋白質の過剰発現 ( $p < 0.0001$ )、*ACTN4* のコピー数増加あり ( $p < 0.0001$ ) は、全生存期間の短縮と有意に関連していた (表 11)。*ACTN4* のコピー数増加を含む多変量解析では、70 歳以上、脈管侵襲、*ACTN4* のコピー数増加ありの 3 因子が全生存期間の独立したリスク因子であった (表 12;  $p =$

0.031、0.010 及び 0.027、ハザード比 = 1.90、2.83 及び 2.17) 。一方、ACTN4 蛋白質に関して、5 年全生存率は ACTN4 蛋白質の過剰発現を認める症例群で 5%、認めない症例群で 82%であった。ACTN4 蛋白質の過剰発現の有無で層別化した 168 症例の全生存曲線を図 9b に示す。Log-rank 検定により、2 群の全生存期間には統計学的に有意差が認められた (図 9b ;  $p < 0.0001$ ) 。ACTN4 蛋白質の過剰発現は単変量解析では全生存期間に関連する有意な因子であったものの、多変量解析では全生存期間の独立したリスク因子とはならなかった (表 13 ;  $p = 0.35$ 、ハザード比 = 1.37) 。

#### 第 4 節 小括

上部尿路上皮癌における ACTN4 蛋白質の過剰発現や *ACTN4* のコピー数増加は、組織学的深達度、脈管侵襲、腫瘍組織亜型の随伴などの従来臨床病理学的因子と有意に関連し、特に *ACTN4* のコピー数増加は同腫瘍患者における独立した再発及び予後予測因子であることが示された。



## 第4章 考察

摘出術後に再発・転移を来たした上部尿路上皮癌は、抗癌剤などに対する治療抵抗性を示すことが多く、患者生命予後は一般的に極めて不良である[2]。同腫瘍における再発・生存予後の予測因子として組織学的深達度、脈管侵襲、tumor gradeなどが挙げられるが、他臓器の様々な癌腫において転移能との密接に関連が指摘されている腫瘍浸潤性という観点からは殆ど検討がなされてこなかった。本研究では、浸潤性に関連する腫瘍形態としての tumor budding と分子としての ACTN4 の異常発現という2つの因子に着目し、それらの上部尿路上皮癌における臨床病理学的意義及び同腫瘍患者における再発・生存予後予測能を検討することで、新たな知見を得ることができた。

本論文の第2章では、腫瘍浸潤性の組織学的 phenotype としての tumor budding について、浸潤先進部での high-grade tumor budding が浸潤性上部尿路上皮癌における無尿路外再発及び全生存期間に関連する独立したリスク因子であることを明らかにした。尿路上皮癌の tumor budding に関して検討した過去の報告は、膀胱癌における臨床病理学的意義と患者予後への影響を検討した2件のみである[10, 26]。

Fukumoto ら[10]は、組織学的深達度 pT1 と診断された膀胱癌 121 症例の TURBT 検体における tumor budding status を評価し、high tumor budding が5年無増悪生存率の低下と有意に関連することを示した。さらに high tumor budding がその後の病期進行と関連する独立した因子であることも示した[10]。しかしながら、この研究は TURBT 検体のみの評価を行っており、標本に筋層が含まれない症例におけ

る pT1 診断の understaging のリスクは避けられない。Küçük ら[26]は、筋層浸潤性膀胱癌に対して根治的膀胱全摘除術が施行された 60 症例を検討し、摘除検体における tumor budding status は腫瘍壊死、脈管侵襲、神経周囲浸潤と関連せず、無再発生存率や全生存率でみた患者予後への有意な影響はなかったと報告している。

この研究は摘除検体を用いて腫瘍全体を評価しているものの、対象症例数が少なく tumor budding の評価方法が先行研究の多くで使用されたものと異なっていた

(tumor budding の評価方法が、200 倍視野ではなく 400 倍視野で実施されていた)。膀胱及び上部尿路の尿路上皮癌における tumor budding の臨床病理学的意義の確立には、より大規模な症例群を対象とした統一組織評価基準下での研究が求められる。

本研究では high-grade tumor budding のほか、脈管侵襲が尿路外再発の独立した予測因子であることが示された。今回作成された尿路外再発のリスク層別化モデル(図 4)は、患者予後改善を目的とした積極的な術後補助化学療法の適応を検討するための重要な判断基準となりうる。免疫染色などが必要なく、H&E 染色のみで短時間に評価可能である tumor budding は、臨床導入が容易である点からも上部尿路上皮癌の新たな予後予測因子として、更なる追求の価値があると考えられる。

Tumor budding の組織像の背景に存在する分子生物学的機構の多くは未だ不明であるが、EMT はその候補の一つとされている[11-13]。膀胱原発の尿路上皮癌において、EMT の代表的なマーカーである E-cadherin の発現制御を介して細胞運動性や浸潤能に関与する、免疫グロブリン結合蛋白質 1 (IGBP1) [51]や、

COL4A1/COL13A1 [52]の発現異常が報告されており、特に後者は high-grade tumor budding を示す腫瘍に顕著であったとされる[52]。Tumor budding は、上皮系細胞がいくつかの中間表現型を経て間葉系形質を獲得する過程 (partial EMT) と深い関連性があるとされている[31]。一方で、大腸癌切除検体を用いた病理組織学的検討では、tumor budding status と EMT 関連蛋白質発現には関連性が低かったとの報告もあり[53]、さらなる研究が望まれる。そこで我々は、EMT との関連が近年指摘されている ACTN4 に着目し、腫瘍浸潤性の分子機構について検討を進めることとした。

アクチン結合蛋白質である ACTN4 は、非筋肉型の  $\alpha$ -アクチニンファミリーに属し、細胞の運動能亢進に重要な役割をもつアクチン束状化のダイナミックな変化に深く関わる[7, 31]。ACTN4 は細胞運動能のみならず EMT のプロセスにも関与し、ACTN4 蛋白質の過剰発現と *ACTN4* のコピー数増加は、種々の癌腫における腫瘍細胞の浸潤・転移能と関連することが明らかとなっている[7, 33-50]。本論文の第3章では、上部尿路上皮癌の検討症例のうち 29%に ACTN4 蛋白質の過剰発現、15%に *ACTN4* のコピー数増加を認め、いずれもより進行した組織学的深達度や脈管侵襲の存在など、種々の重要な組織学的因子と有意に関連していた。そのうち、*ACTN4* のコピー数増加は無尿路外再発生存期間及び全生存期間の独立したリスク因子であった。

Tumor budding に関するものと同様に、上部尿路上皮癌における ACTN4 の異常発現を検討した既報告はなく、膀胱原発の尿路上皮癌に関する報告が少数のみ存

在する[49, 50]。Koizumi ら[49]は膀胱癌細胞株を用いて、ACTN4 の mRNA 及び蛋白質の発現量が、増殖・浸潤活性の増加とともに上昇することを示した。また、ACTN4 のノックダウンにより膀胱癌細胞の浸潤能は抑制されるが、増殖活性に有意な変化はないことを報告した[49]。Yoshii ら[50]は、46 症例の根治的膀胱摘除術及び 49 症例の TURBT を併せた 95 症例の膀胱癌切除検体（非筋層浸潤性 53 症例、筋層浸潤性 42 症例）に対して抗 ACTN4 抗体を用いた免疫組織化学染色を行い、尿路上皮癌における ACTN4 蛋白質の高発現は、より進行した組織学的深達度及び tumor grade の上昇と関連するものの、独立した患者予後予測因子ではないことを示した。また、膀胱癌細胞株 T24、及び KU19-9 において ACTN4 を抑制すると、腫瘍細胞の浸潤能は有意に低下するが、増殖活性は逆に上昇することを報告した[50]。このように、尿路上皮癌における ACTN4 の分子機能には、従来提唱されている細胞浸潤性の上昇以外にも細胞増殖に負の影響を与える未知の機構が存在する可能性があり、その解明により同分子異常の臨床病理学的意義がさらに明確化することが期待される。

*ACTN4* のコピー数増加は、ACTN4 蛋白質発現の主たる機序の一つとされるが、他の分子生物学的機序についてのコンセンサスは得られていない。本研究において、ACTN4 蛋白質の過剰発現と *ACTN4* のコピー数増加には統計学的に有意な相関がみられたものの、ACTN4 蛋白質の過剰発現を認めた 49 症例のうち、*ACTN4* のコピー数増加を認めた症例は 19 症例（約 40%）のみであり、これは他の癌腫の報告における結果と類似していた[41, 45]。*ACTN4* のコピー数増加のみが

ACTN4 蛋白質の過剰発現の原因ではない可能性が示唆される。一方で、*ACTN4* のコピー数増加が検出されるも ACTN4 蛋白質の過剰発現を認めなかった症例は 6 症例存在した。そのうち 1 症例は完全な陰性であったが、残りの 5 症例は腫瘍面積の 50%未満の中等度～高度陽性像を示しており、この不一致には本研究における蛋白質過剰発現の定義が関与した可能性がある。また、免疫組織化学法で検出された ACTN4 蛋白質の過剰発現は独立した有意な患者予後予測因子とはならず、FISH 法で検出された *ACTN4* のコピー数増加のみが再発や生命予後の有意な予測因子であった点も、他癌腫の報告と類似している [41, 45]。臨床応用の観点からも真に臨床的意義を有する分子異常について検討を進める必要がある。

ACTN4 の異常発現による癌細胞の運動性、浸潤性及び転移能の亢進は、EMT の複数の進行プロセスと密接に関連していることが示されている [7, 31]。ACTN4 は Wnt/ $\beta$ -catenin [54, 55, 56]、及び NF-kappaB [57, 58, 59, 60, 61] を介した核内受容体シグナル伝達経路に影響を与えることが知られており、これらは EMT のプロセスにおいて中心的役割を担っている [31]。第 2 章の tumor budding に関する研究と第 3 章の ACTN4 に関する研究で重複対象となった浸潤性上部尿路上皮癌 125 症例における tumor budding status と *ACTN4* のコピー数増加及び tumor budding status と ACTN4 蛋白質の過剰発現との関連性を検討した結果、それぞれ統計学的に有意な相関を認めた (表 14:  $p = 0.0043$ 、及び  $p < 0.0001$ )。今回明らかになった上部尿路上皮癌の浸潤転移能に関わる因子の相互関係、またそれらの EMT プロセスへの関連性について、更なる検討が期待される。

本研究の限界について、第一に上部尿路上皮癌は稀な疾患であり、腫瘍の部位（腎盂ないし尿管）または組織学的深達度によって細分化した検討が困難であった。第二に免疫組織化学法、及び FISH 法に関する腫瘍内不均一性の問題があり、これらのバイアスを軽減するため組織マイクロアレイは使用せず、代表的な 1 切片全体での評価を実施するとともに、FISH 法の評価はシグナルが最も強く観察される領域で行った。最後に、全症例でのリンパ節郭清は施行されていないため、実際の「病理学的リンパ節転移陽性」の症例数は今回のデータより多い可能性があり、結果として病理学的リンパ節転移は臨床病理学的因子として過小評価されている可能性がある。

## 第5章 結論

本研究では腫瘍の浸潤転移能の観点から、形態変化としての tumor budding status 及びその分子基盤の1つとしての ACTN4 異常発現に関して、上部尿路上皮癌における臨床病理学的意義、及び同腫瘍患者における再発・生存予後予測能を検討した。結果として、この2因子はいずれも従来の臨床病理学的因子と有意な関連性を示し、かつ high-grade tumor budding と *ACTN4* のコピー数増加はそれぞれ再発及び生命予後の有用な予測因子であることが明らかとなった。今後はこれらの分子機構、特に EMT を軸とした相互関係性に関するさらなる研究が求められる。本研究の結果が、術後補助化学療法の積極的導入といった実臨床における重要な治療判断基準の1つとして、上部尿路上皮癌患者の予後改善への基盤となることを期待する。

## 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究に多大なる御指導を賜りました防衛医科大学校泌尿器科学講座教授、伊藤敬一先生に深く感謝致します。また、本研究遂行にあたり御指導を賜りました防衛医科大学校病態病理学講座教授、津田均先生、防衛医科大学校臨床検査医学講座教授、松熊晋先生、防衛医科大学校病態病理学講座准教授、佐藤仁哉先生ならびに防衛医科大学校病態病理学講座及び臨床検査医学講座助教、宮居弘輔先生、日本医科大学先端医学研究所生体機能制御学教授、本田一文先生に深く感謝致します。

また、本論文を作成するにあたり、大変有用な助言を頂きました防衛医科大学校外科学講座教授、上野秀樹先生、防衛医科大学校産科婦人科学講座教授、高野政志先生に深く感謝致します。



## 引用文献

1. Green DA, Rink M, Xylinas E, Martin SF, Stenzl A, Roupret M, Karakiewicz PI, Scherr DS, Shariat SF. Urothelial carcinoma of the bladder and the upper tract: disparate twins. *J Urol*. 2013;189(4):1214-21.
2. Margulis V, Shariat SF, Martin SF, Kamat AM, Richard Z, Kikuchi E, Lotan Y, Weizer A, Raman JD, WOOD CG. Outcomes of radical nephroureterectomy: a series from the Upper Tract Urothelial Carcinoma Collaboration. *Cancer*. 2009;115(6):1224-33.
3. Sassa N, Tsuzuki T, Fukatsu A, Majima T, Kimura T, Nishikimi T, Yoshino Y, Hattori R, Gotoh M. Is pT3 urothelial carcinoma of the renal pelvis a homogeneous disease entity? Proposal for a new subcategory of the pT3 classification. *Histopathology*. 2012; 61(4):620-8.
4. Roscigno M, Cha EK, Rink M, Seitz C, Novara G, Chromecki TF, Fritsche HM, Matsumoto K, Walton TJ, Carballido J, Filippo Da Pozzo L, Bertini R, Ficarra V, Otto W, Karakiewicz PI, Pycha A, Fajkovic H, Naspro R, Scherr DS, Montorsi F, Shariat SF. International validation of the prognostic value of subclassification for AJCC stage pT3 upper tract urothelial carcinoma of the renal pelvis. *BJU Int*. 2012;110(5):674-81.
5. Jimenez RE, Gheiler E, Oskanian P, Tiguert R, Sakr W, Wood DP Jr, Pontes JE, Grignon DJ. Grading the invasive component of urothelial carcinoma of the

- bladder and its relationship with progression-free survival. *Am J Surg Pathol.* 2000;24(7):980-7.
6. Alessandro Lugli, Richard Kirsch, Yoichi Ajioka, Fred Bosman, Gieri Cathomas, Heather Dawson, Hala El Zimaity, Jean-François Fléjou, Tine Plato Hansen, Arndt Hartmann, Sanjay Kakar, Cord Langner, Iris Nagtegaal, Giacomo Puppa, Robert Riddell, Ari Ristimäki, Kieran Sheahan, Thomas Smyrk, Kenichi Sugihara, Benoît Terris, Hideki Ueno, Michael Vieth, Inti Zlobec, Phil Quirke. Recommendations for reporting tumor budding in colorectal cancer based on the international Tumor Budding Consensus Conference(ITBCC) 2016. *Mod Pathol.* 2017;30(9):1299-311
7. Honda K, Yamada T, Endo R, Ino Y, Gotoh M, Tsuda H, Yamada Y, Chiba H, Hirohashi S. Actinin-4, a novel actin-bundling protein associated with cell motility and cancer invasion. *J Cell Biol.* 1998;140(6):1383–93.
8. Dawson H, Lugli A. Molecular and pathogenetic aspects of tumor budding in colorectal cancer. *Front Med.* 2015;2:11.
9. Ueno H, Mochizuki H, Hashiguchi Y, Shimazaki H, Aida S, Hase K, Matsukuma S, Kanai T, Kurihara H, Ozawa K, Yoshimura K, Bekku S. Risk factors for an adverse outcome in early invasive colorectal carcinoma. *Gastroenterology.* 2004;127(2):385-94.

10. Fukumoto K, Kikuchi E, Mikami S, Ogihara K, Matsumoto K, Miyajima A, Oya M. Tumor budding, a novel prognostic indicator for predicting stage progression in T1 bladder cancers. *Cancer Sci.* 2016;107(9):1338-44.
11. 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. *Int J Surg Pathol.* 2011;19(6):751-60.
12. Zlobec I, Lugli A. Epithelial mesenchymal transition and tumor budding in aggressive colorectal cancer: tumor budding as oncotarget. *Oncotarget.* 2010;1(7):651-61.
13. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009;119(6):1420-8.
14. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum.* 1993;36(7):627-35.
15. Zlobec I, Hädrich M, Dawson H, Koelzer VH, Borner M, Mallaev M, Schnüriger B, Inderbitzin D, Lugli A. Intratumoural budding (ITB) in preoperative biopsies predicts the presence of lymph node and distant metastasis in colon and rectal cancer patients. *Br J Cancer.* 2014;110(4):1008-13.

16. Betge J, Kornprat P, Pollheimer MJ, Lindtner RA, Schlemmer A, Rehak P, Vieth M, Langner C. Tumor budding is an independent predictor of outcome in AJCC/UICC stage II colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2012;19(12):3706-12.
17. Choi HJ, Park KJ, Shin JS, Roh MS, Kwon HC, Lee HS. Tumor budding as a prognostic marker in stage-III rectal carcinoma. *Int J Colorectal Dis.* 2007;22(8):863-8.
18. Park KJ, Choi HJ, Roh MS, Kwon HC, Kim C. Intensity of tumor budding and its prognostic implications in invasive colon carcinoma. *Dis Colon Rectum.* 2005;48(8):1597-602.
19. Nakadoi K, Oka S, Tanaka S, Hayashi N, Terasaki M, Arihiro K, Shimamoto F, Chayama K. Condition of muscularis mucosae is a risk factor for lymph node metastasis in T1 colorectal carcinoma. *Surg Endosc.* 2014;28(4):1269-76.
20. Tateishi Y, Nakanishi Y, Taniguchi H, Shimada T, Umemura S. Pathological prognostic factors predicting lymph node metastasis in submucosal invasive (T1) colorectal carcinoma. *Mod pathol.* 2010;23(8):1068-72.
21. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, O'Donoghue D, Sheahan K. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol.* 2009;33(1):134-41.

22. Kadota K, Yeh YC, Villena-Vargas J, Cherkassky L, Drill EN, Sima CS, Jones DR, Travis WD, Adusumilli PS. Tumor budding correlates with protumor immune microenvironment and is an independent prognostic factor for recurrence of stage I lung adenocarcinoma. *Chest*. 2015;148(3):711-21.
23. Salhia B, Trippel M, Pfaltz K, Cihoric N, Grogg A, Ladrach C, Zlobec I, Tapia C. High tumor budding stratifies breast cancer with metastatic properties. *Breast Cancer Res Treat*. 2015;150(2):363-71.
24. O'Connor K, Li-Chang HH, Kalloger SE, Peixoto RD, Webber DL, Owen DA, Driman DK, Kirsch R, Serra S, Scudamore CH, Renouf DJ, Schaeffer DF. Tumor budding is an independent adverse prognostic factor in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2015;39(4):472-8.
25. Angadi PV, Patil PV, Hallikeri K, Mallapur MD, Hallikerimath S, Kale AD. Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Surg Pathol*. 2015;23(2):102-10.
26. Küçük Ü, Ekmekçi S, Çakır E, Ekin Z, Ergani B, Ekin GR. Prognostic significance of tumor budding in muscle invasive urothelial carcinomas of the bladder. *Turk J Urol*. 2018;45(4):273-8.
27. Grignon DJ, Lloreta J, Al-Ahmadie H, et al. Infiltrating urothelial carcinoma. Urothelial tumours. In: Mock H, Humphrey PA, Ulbright TM, Reuter VE, editors.

WHO Classification of Tumours of the Urinary System and Male Genital Organs, IARC press, Lyon, France, 2016;81-98.

28. McKiernan JM, Hansel DE, Bochner BH, et al. Renal pelvis and ureter. In: Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, et al. editors. AJCC Cancer Staging Manual, 8<sup>th</sup> edn. Springer International Publishing, New York, 2017;749-55.
29. Oken MM, Creech RH, Tormey DC, Horton J, Davis TE, McFadden ET, Carbone PP. Toxicity and response criteria of the Eastern Cooperative Oncology Group. *Am J Clin Oncol.*1982;5(6):649–655.
30. Youssoufian H, McAfee M, Kwiatkowski DJ. Cloning and chromosomal localization of the human cytoskeletal alpha-actinin gene reveals linkage to the beta-spectrin gene. *Am J Hum Genet.* 1990;47(1):62–72.
31. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med.* 2016;5(5):51.
32. Tentler D, Lomert E, Novitskaya K, Barlev NA. Role of ACTN4 in Tumorigenesis, Metastasis, and EMT. *Cells.* 2019;8(11):1427.
33. Honda K, Yamada T, Hayashida Y, Idogawa M, Sato S, Hasegawa F, Ino Y, Ono M, Hirohashi S. Actinin-4 increases cell motility and promotes lymph node metastasis of colorectal cancer. *Gastroenterology.* 2005;128(1):51–62.

34. Fukumoto M, Kurisu S, Yamada T, Takenawa T.  $\alpha$ -Actinin-4 enhances colorectal cancer cell invasion by suppressing focal adhesion maturation. *PLoS One*. 2015;10(4):e0120616.
35. Procházková I, Lenčo J, Fučíková A, Dresler J, Čápková L, Hrstka R, Nenutil R, Bouchal P. Targeted proteomics driven verification of biomarker candidates associated with breast cancer aggressiveness. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*. 2017;1865(5):488–98.
36. Fang C, Li JJ, Deng T, Li BH, Geng PL, Zeng XT. Actinin-4 as a Diagnostic Biomarker in Serum of Breast Cancer Patients. *Med Sci Monit*. 2019;25:3298–302.
37. Yamagata N, Shyr Y, Yanagisawa K, Edgerton M, Dang TP, Gonzalez A, Nadaf S, Larsen P, Roberts JR, Nesbitt JC, Jensen R, Levy S, Moore JH, Minna JD, Carbone DP. A training–testing approach to the molecular classification of resected non-small cell lung cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(13):4695–704.
38. Wang MC, Chang YH, Wu CC, Tyan YC, Chang HC, Goan YG, Lai WW, Cheng PN, Liao PC. Alpha-actinin 4 is associated with cancer cell motility and is a potential biomarker in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*. 2015;10(2):286–301.
39. Noro R, Honda K, Tsuta K, Ishii G, Maeshima AM, Miura N, Furuta K, Shibata T, Tsuda H, Ochiai A, Sakuma T, Nishijima N, Gemma A, Asamura H, Nagai K,

- Yamada T. Distinct outcome of stage I lung adenocarcinoma with ACTN4 cell motility gene amplification. *Ann Oncol.* 2013;24(10):2594–600.
40. Noro R, Ishigame T, Walsh N, Shiraishi K, Robles AI, Ryan BM, Schetter AJ, Bowman ED, Welsh JA, Seike M, Gemma A, Skaug V, Mollerup S, Haugen A, Yokota J, Kohno T, Harris CC. A Two-Gene Prognostic Classifier for Early-Stage Lung Squamous Cell Carcinoma in Multiple Large-Scale and Geographically Diverse Cohorts. *J Thorac Oncol.* 2017;12(1):65–76.
41. Kikuchi S, Honda K, Tsuda H, Hiraoka N, Imoto I, Kosuge T, Umaki T, Onozato K, Shitashige M, Yamaguchi U, Omo M, Tsuchida A, Aoki T, Inazawa J, Hirohashi S, Yamada T. Expression and gene amplification of actinin-4 in invasive ductal carcinoma of the pancreas. *Clin Cancer Res.* 2008;14(17):5348–56.
42. Shoji H, Miura N, Ueno H, Honda K. Measurement of copy number of ACTN4 to optimize the therapeutic strategy for locally advanced pancreatic cancer. *Pancreatol.* 2018;18(6):624-9.
43. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Kita T, Takano M, Tamai S, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. Actinin-4 expression in ovarian cancer: A novel prognostic indicator independent of clinical stage and histological type. *Mod Pathol.* 2007;20(12):1278–85.
44. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Onozato K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Inazawa J, Yamada T, Matsubara O. Actinin-4 gene amplification in ovarian



- cancer: A candidate oncogene associated with poor patient prognosis and tumor chemoresistance. *Mod Pathol.* 2009;22(4):499–507.
45. Yamamoto S, Tsuda H, Honda K, Takano M, Tamai S, Imoto I, Tnazawa J, Yamada T, Matsubara O. ACTN4 gene amplification and actinin-4 protein overexpression drive tumor development and histological progression in a high-grade subset of ovarian clear-cell adenocarcinomas. *Histopathology.* 2012;60(7):1073–83.
46. Watabe Y, Mori T, Yoshimoto S, Nomura T, Shibahara T, Yamada T, Honda K. Copy number increase of ACTN4 is a prognostic indicator in salivary gland carcinoma. *Cancer Med.* 2014;3(3):613–22.
47. Kakuya T, Mori T, Yoshimoto S, Watabe Y, Miura N, Shoji H, Onidani K, Shibahara T, Honda K. Prognostic significance of gene amplification of ACTN4 in stage I and II oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2017;46(8):968–76.
48. Ishizawa Y, Uemura M, Narumi R, Tomiyama E, Koh Y, Matsushita M, Nakano K, Hayashi Y, Wang C, Kato T, Hatano K, Kawashima A, Ujike T, Fujita K, Imamura R, Adachi J, Tomonaga T, Nonomura N. The role of actinin-4 (ACTN4) in exosomes as a potential novel therapeutic target in castration-resistant prostate cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 2020;523(3):588-94.

49. Koizumi T, Nakatsuji H, Fukawa T, Avirmed S, Fukumori T, Takahashi M, Kanayama H. The role of actinin-4 in bladder cancer invasion. *Urology*. 2010;75(2):357–64.
50. Yoshii H, Ito K, Asano T, Horiguchi A, Hayakawa M, Asano T. Increased expression of  $\alpha$ -actinin-4 is associated with unfavorable pathological features and invasiveness of bladder cancer. *Oncol Rep*. 2013;30(3):1073-80.
51. Liu J, Cai M, Chen J, Liao Y, Mai S, Li Y, Huang X, Liu Y, Zhang J, Kung H, Zeng Y, Zhou F, Xie D.  $\alpha$ 4 contributes to bladder urothelial carcinoma cell invasion and/or metastasis via regulation of E-cadherin and is a predictor of outcome in bladder urothelial carcinoma patients. *Eur J Cancer*. 2014;50(4):840-51.
52. Miyake M, Hori S, Morizawa Y, Tatsumi Y, Toritsuka M, Ohnishi S, Shimada K, Furuya H, Khadka VS, Deng Y, Ohnishi K, Iida K, Gotoh D, Nakai Y, Inoue T, Anai S, Torimoto K, Aoki K, Tanaka N, Konishi N, Fujimoto K. Collagen type IV alpha 1 (COL4A1) and collagen type XIII alpha 1 (COL13A1) produced in cancer cells promote tumor budding at the invasion front in human urothelial carcinoma of the bladder. *Oncotarget*. 2017;8(22):36099-114.
53. 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. *Hum Pathol*. 2017;60:151-9.

54. Kourtidis A, Lu R, Pence LJ, Anastasiadis PZ. A central role for cadherin signaling in cancer. *Exp Cell Res.* 2017;358(1):78–85.
55. Wheelock MJ, Shintani Y, Maeda M, Fukumoto Y, Johnson KR. Cadherin switching. *J Cell Sci.* 2008;121(Pt 6):727–35.
56. Tam WL, Weinberg RA. The epigenetics of epithelial-mesenchymal plasticity in cancer. *Nat Med.* 2013;19(11):1438–49.
57. Ikenouchi J, Matsuda M, Furuse M, Tsukita S. Regulation of tight junctions during the epithelium-mesenchyme transition: Direct repression of the gene expression of claudins/occludin by Snail. *J Cell Sci.* 2003;116(Pt 10):1959–67.
58. Huber M.A, Azoitei N, Baumann B, Grünert S, Sommer A, Pehamberger H, Kraut N, Beug H, Wirth T. NF-kappaB is essential for epithelial-mesenchymal transition and metastasis in a model of breast cancer progression. *J Clin Invest.* 2004;114(4):569–81.
59. Tian B, Widen S.G, Yang J, Wood TG, Kudlicki A, Zhao Y, Brasier AR. The NFkappaB subunit RELA is a master transcriptional regulator of the committed epithelial-mesenchymal transition in airway epithelial cells. *J Biol Chem.* 2018;293(42):16528–45.

60. Pires BR, Mencialha AL, Ferreira GM, de Souza WF, Morgado-Diaz JA, Maia AM, Corrêa S, Abdelhay ES. NF-kappaB Is Involved in the Regulation of EMT Genes in Breast Cancer Cells. *PLoS One*. 2017;12(1):e0169622.
61. Huang Q, Li X, Huang Z, Yu F, Wang S, He Z, Lin J. ACTN4 Promotes the Proliferation, Migration, Metastasis of Osteosarcoma and Enhances its Invasive Ability through the NF-kappaB Pathway. *Pathol Oncol Res*. 2020;26(2):893-904.

## 図表

図 1. Tumor budding に関する研究における症例選定

防衛医科大学校病院において、1999年から2018年の間に腎尿管全摘除術ないしは尿管部分摘除術を施行された上部尿路上皮癌211症例（腎盂癌110症例、尿管癌101症例）

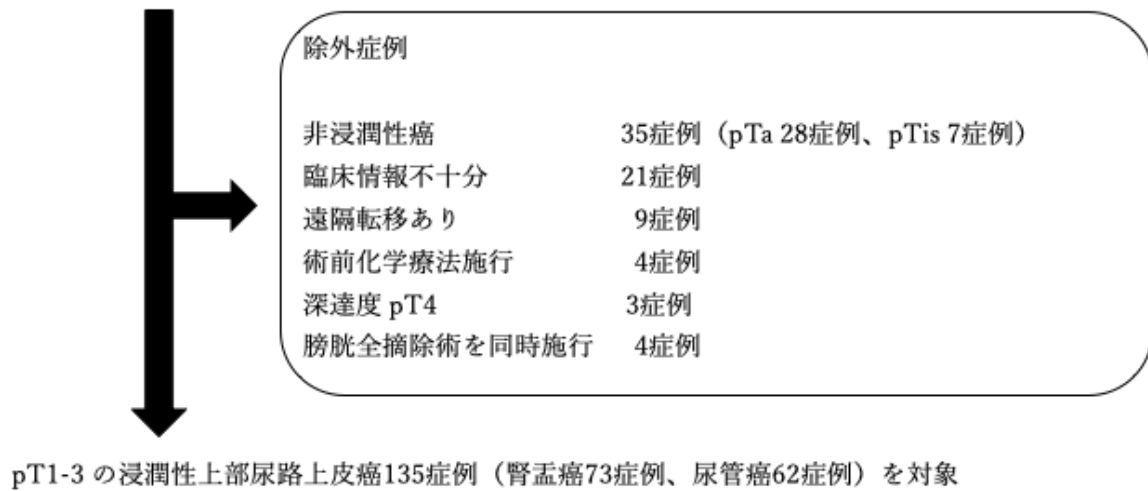
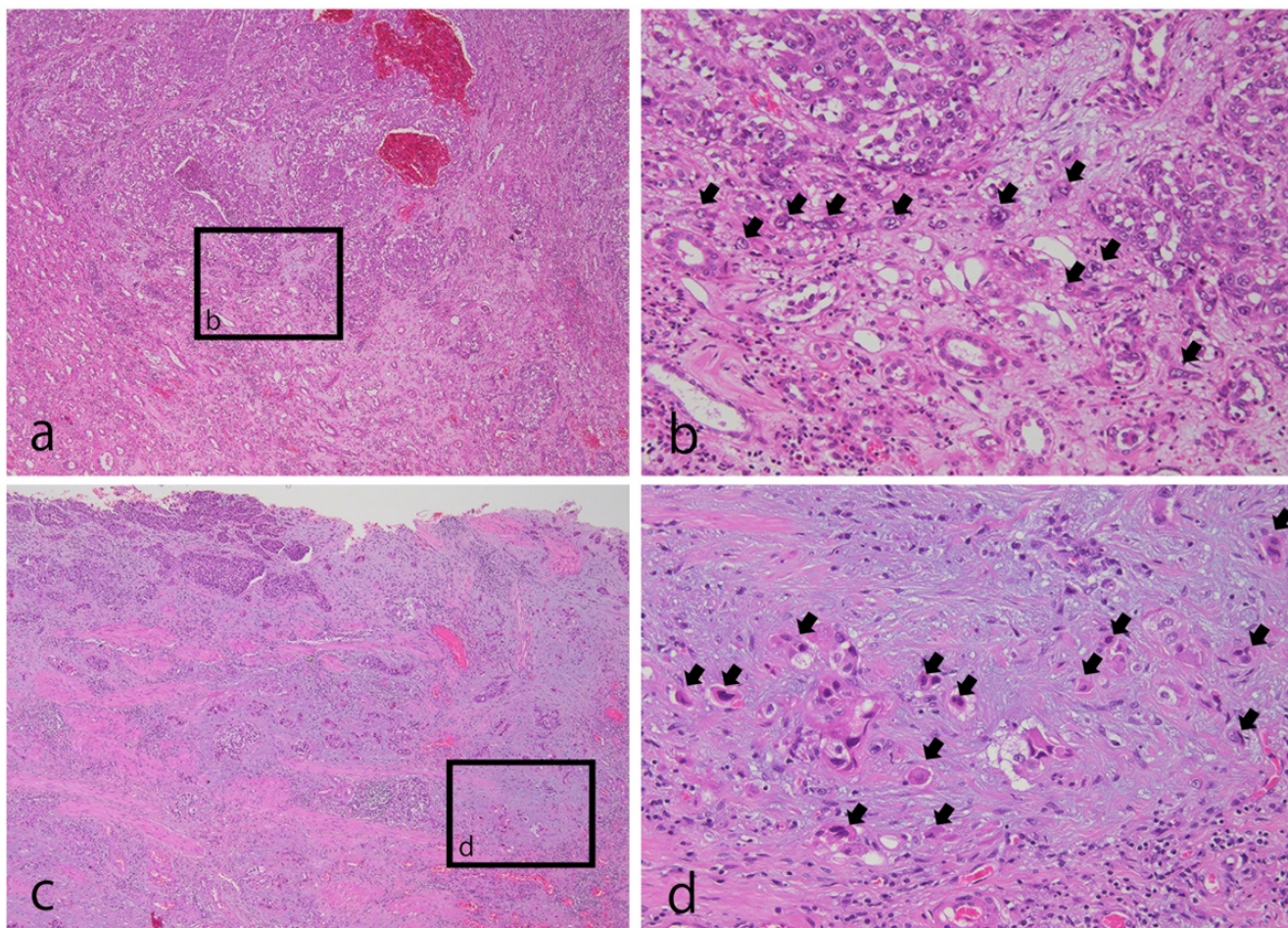


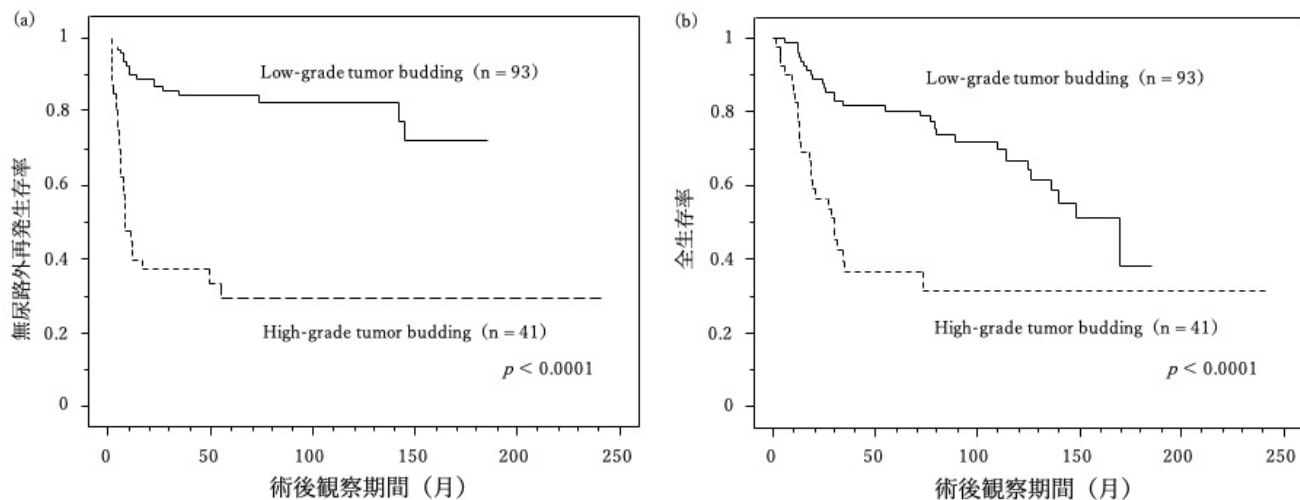
図 2. Tumor budding の病理組織学的所見



H&E 染色で、倍率は[a]と[c]が 40 倍、[b]と[d]が 200 倍。

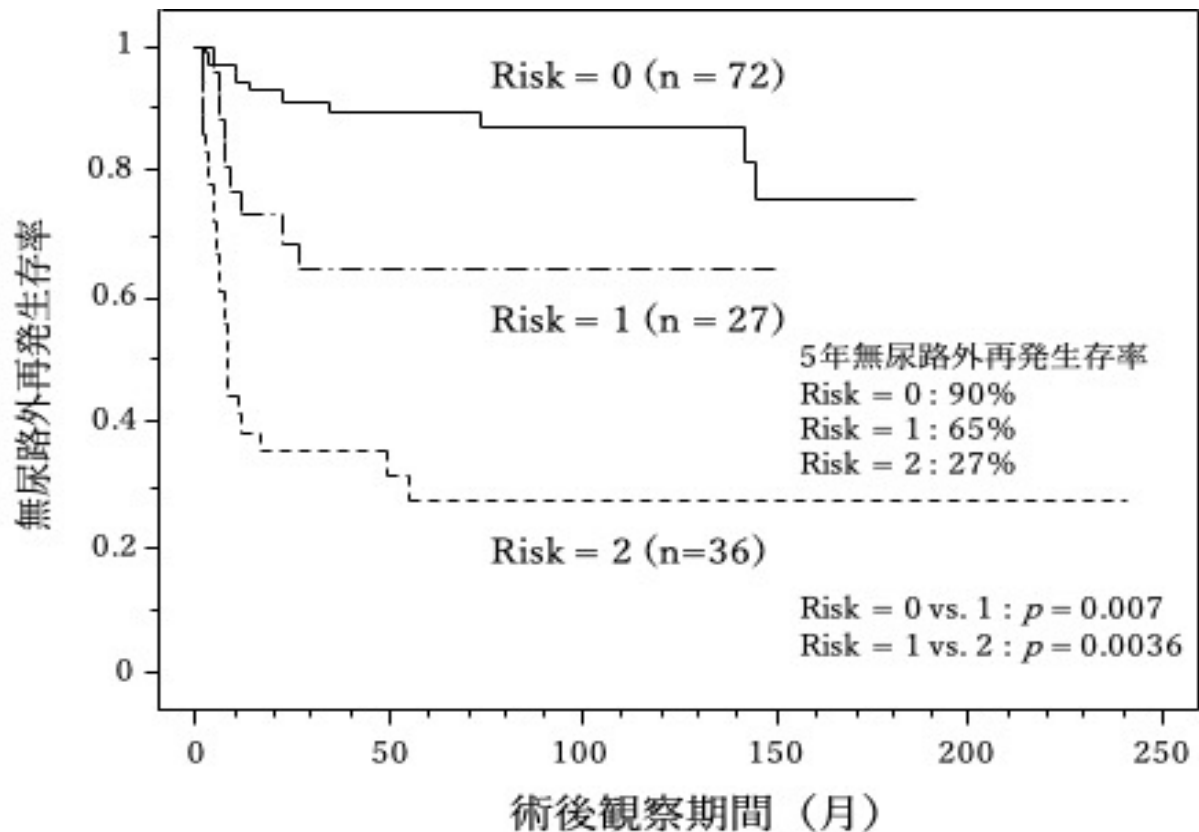
Tumor budding は、癌浸潤先進部における孤在性の癌細胞、または 5 個未満の癌細胞集塊から構成される小さな腫瘍巣と定義される。[a、c] 浸潤性の [a] 腎盂癌、及び [c] 尿管癌 の間質で確認された tumor budding (四角形部分)。[b、d] [b] 腎盂癌と[d] 尿管癌のそれぞれで 10 個以上の budding foci (矢印) が検出され、いずれも high-grade tumor budding の症例と考えられた。

図 3. Tumor budding status で層別化した全 135 症例の Kaplan-Meier 曲線



(a) 無尿路外再発生存率、(b) 全生存率。High-grade tumor budding の 41 症例については破線、low-grade tumor budding の 94 症例については実線で示した。無尿路外再発生存率と全生存率のそれぞれにおいて、2本の曲線は統計的に有意差を認めた[(a)、(b)ともに  $p < 0.0001$ ]。

図 4. 無尿路外再発生存に関するリスク因子の数による層別化



2つの予測因子（脈管侵襲と high-grade tumor budding）を用いたリスク層別化を行った。5年無尿路外再発生存率は、リスク因子がない症例群で90%、リスク因子が1つの症例群で65%、リスク因子が2つの症例群で27%であった。Kaplan-Meier 法による無尿路外再発生存曲線は、リスク因子がない症例群とリスク因子が1つの症例群の間、リスク因子1つの症例とリスク因子2つの症例群の間で、それぞれ統計学的に有意差を認めた（それぞれ、 $p = 0.007$ 、 $0.004$ ）。



図 5. ACTN4 に関する研究における症例選定

防衛医科大学校病院において、1999年から2018年の間に腎尿管全摘除術ないしは尿管部分摘除術を施行された上部尿路上皮癌211症例（腎盂癌110症例、尿管癌101症例）

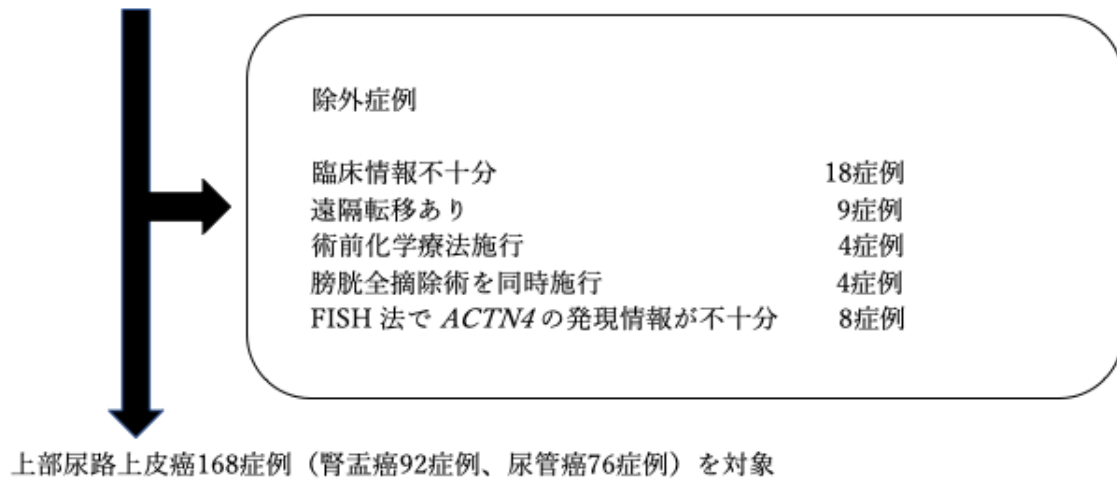
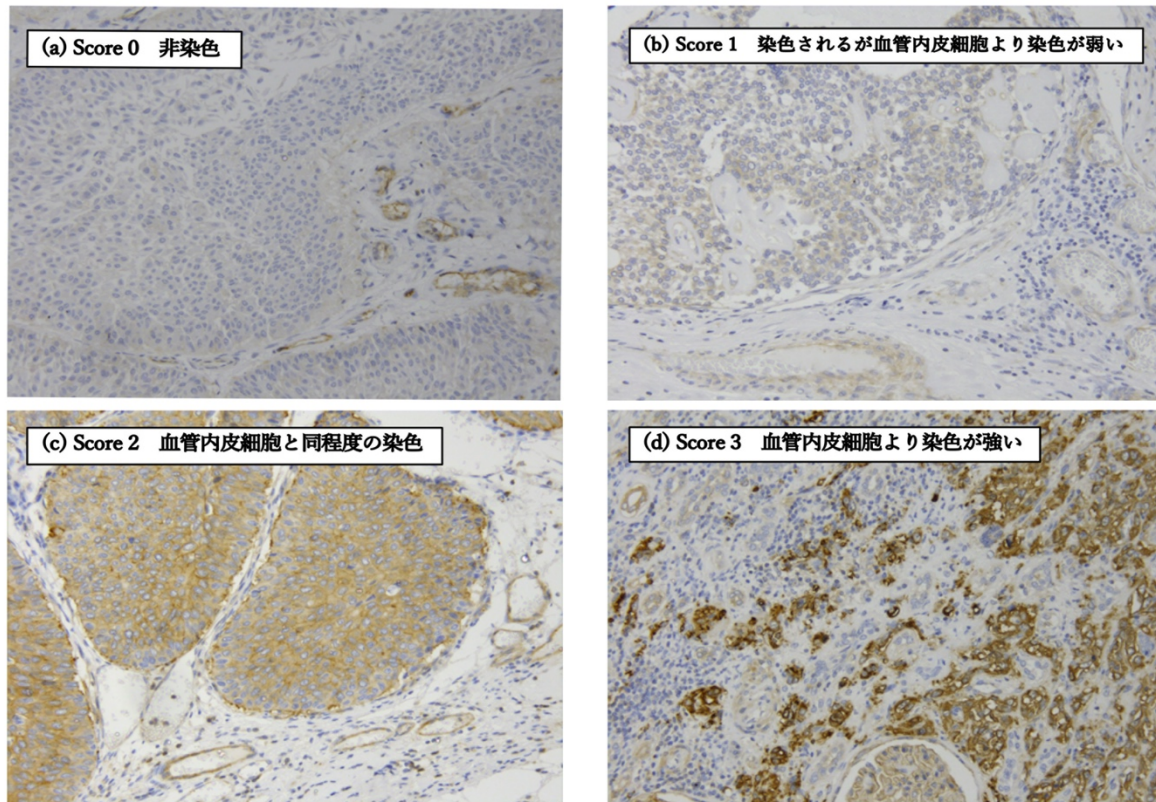
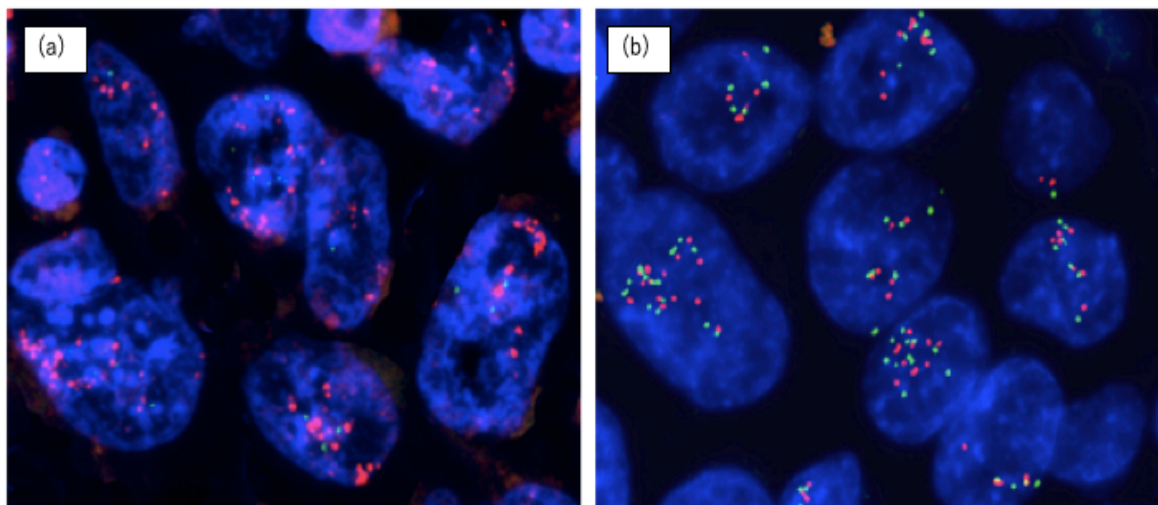


図 6. 免疫組織化学法による ACTN4 蛋白質発現の評価



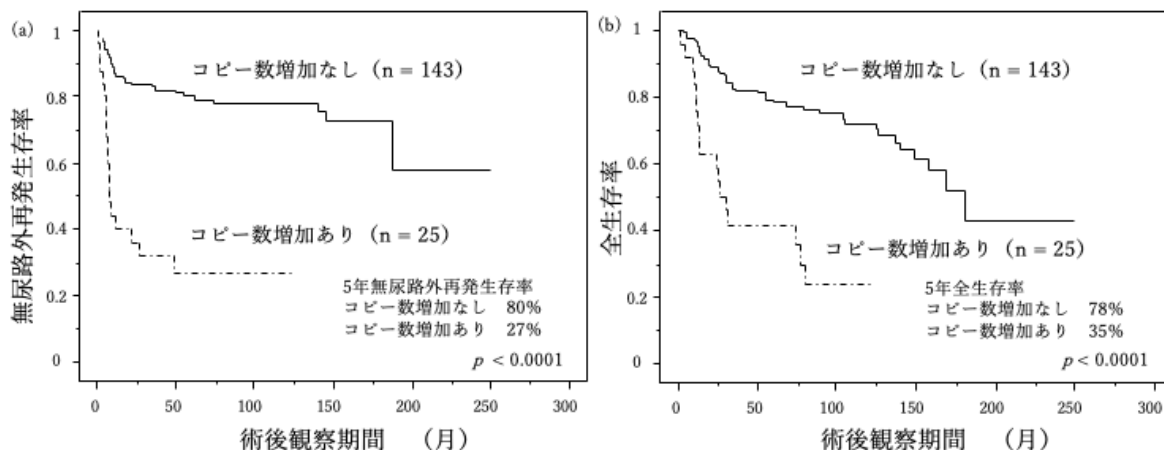
尿路上皮癌細胞の染色強度を、血管内皮細胞の染色程度と比較して4段階 (score 0～3) に分類した。(a) score 0：非染色。(b) score 1：染色されるが、血管内皮細胞より染色性が低い。(c) score 2：血管内皮細胞と同程度に染色される。(d) score 3：血管内皮細胞よりも染色性が強い。腫瘍細胞の50%以上が中等度 (score 2) 以上の免疫反応を示した場合の腫瘍における免疫反応性を ACTN4 蛋白質の過剰発現ありと定義した。

図7. FISH 法における *ACTN4* のコピー数異常

(a) *ACTN4* の増幅所見 (*ACTN4* 赤/CEN19p 緑の比が 2.0 以上)

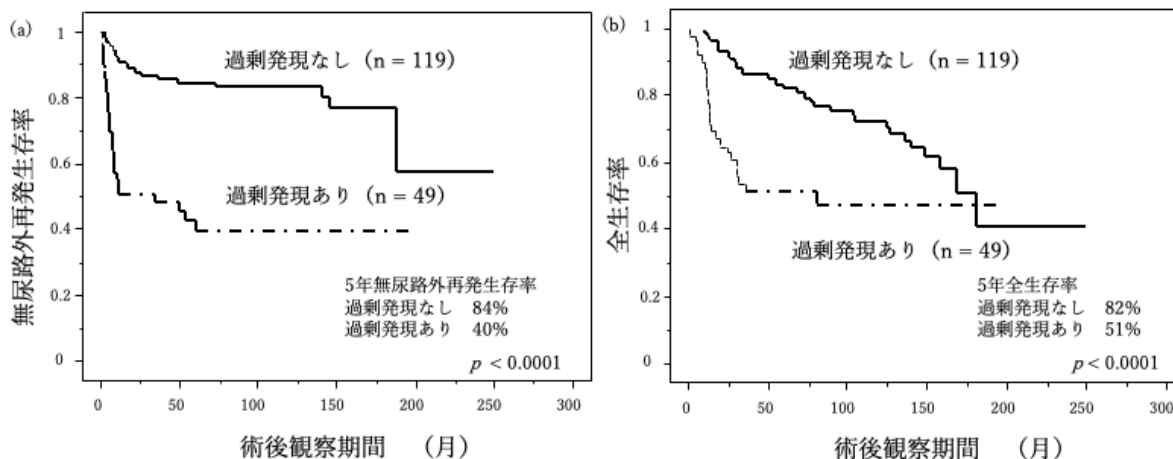
(b) *ACTN4* のコピー数増加 (*ACTN4* の平均コピー数が 4.0 以上)

図 8. *ACTN4* のコピー数増加の有無で層別化した全 168 症例の Kaplan-Meier 曲線



(a) 無尿路外再発生存率、(b) 全生存率。*ACTN4* のコピー数増加ありの 25 症例については破線で、*ACTN4* のコピー数増加なしの 143 症例については実線で示した。無尿路外再発生存率と全生存率のそれぞれにおいて、2本の曲線は統計学的に有意差を認めた[(a)、(b)ともに  $p < 0.0001$ ]。

図9. ACTN4 蛋白質の過剰発現の有無で層別化した全 168 症例の Kaplan-Meier 曲線



(a) 無尿路外再発生存率、(b) 全生存率。ACTN4 蛋白質の過剰発現ありの 49 症例については破線で、ACTN4 蛋白質の過剰発現なしの 119 症例については実線で示した。無尿路外再発生存率と全生存率のそれぞれにおいて、2本の曲線は統計学的に有意差を認めた[(a)、(b)ともに  $p < 0.0001$ ]。

表 1. 臨床病理学的因子と tumor budding の関連性

Variables	Tumor budding		<i>p</i> -value
	Low-grade (n = 94)	High-grade (n = 41)	
年齢			
70 歳以上	37	14	0.47
70 歳未満	57	27	
性別			
男性	66	33	0.21
女性	28	8	
腫瘍側			
右	45	15	0.22
左	49	26	
手術方法			
腎尿管全摘除術	89	41	0.13
尿管部分摘除術	5	0	
手術手技			
開腹	49	22	0.86
腹腔鏡下	45	19	
術後補助化学療法			
あり	11	17	< 0.0001
なし	83	24	
組織学的深達度			
T1	33	1	< 0.0001
T2	20	4	
T3	41	36	
組織学的悪性度			
High	91	41	0.55
Low	3	0	
脈管侵襲			
あり	22	36	< 0.0001
なし	72	5	
病理学的リンパ節転移			
陽性	1	10	< 0.0001
陰性	22	12	
郭清なし	71	19	
切除断端への腫瘍露出			
陽性	5	6	0.07
陰性	89	35	
腫瘍局在			
腎盂	57	16	0.021
尿管	37	25	
腫瘍組織垂型の随伴			
あり	18	18	0.003
なし	76	23	
腫瘍肉眼所見			
乳頭状	82	20	< 0.0001
非乳頭状	12	21	

表 2. pT1-3 の浸潤性上部尿路上皮癌症例の無尿路外再発生存に関する単変量解析

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value	5年無 尿路外再発 生存率 (%)
年齢			0.27	
70歳未満	1	Reference		74
70歳以上	1.43	0.76-2.70		64
性別			0.28	
男性	1	Reference		71
女性	1.41	0.76-2.62		59
腫瘍側			0.29	
右	1	Reference		72
左	1.40	0.75-2.58		65
手術方法			0.63	
尿管部分摘除術	1	Reference		67
腎尿管全摘除術	1.63	0.23-11.92		68
手術手技			0.63	
腹腔鏡下	1	Reference		73
開腹	1.15	0.64-2.11		64
術後補助化学療法			0.08	
なし	1	Reference		72
あり	1.78	0.93-3.41		53
組織学的深達度			0.002	
pT1 or 2	1	Reference		83
pT3	3.02	1.52-6.02		56
組織学的深達度			0.015	
pT1	1	Reference		86
pT2 or 3	3.16	1.25-8.06		62
脈管侵襲			< 0.0001	
なし	1	Reference		87
あり	5.24	2.67-10.31		43
病理学的リンパ節転移			< 0.0001	
なし / 郭清未施行	1	Reference		73
あり	5.08	2.41-10.75		14
切除断端の腫瘍露出			0.27	
陰性	1	Reference		70
陽性	1.69	0.66-4.31		47
腫瘍局在			0.051	
腎盂	1	Reference		76
尿管	1.82	0.99-3.33		58
腫瘍組織亜型の随伴			0.021	
なし	1	Reference		73
あり	2.07	1.11-3.83		55
腫瘍肉眼所見			0.012	
乳頭状	1	Reference		72
非乳頭状	2.22	1.20-4.11		57
Tumor budding			< 0.0001	
Low-grade	1	Reference		84
High-grade	6.49	3.50-12.05		29

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T.

表 3. pT1-3 の浸潤性上部尿路上皮癌症例の無尿路外再発生存に関する多変量解析

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value
組織学的深達度 pT3	1.19	0.54-2.60	0.67
脈管侵襲あり	2.50	1.05-5.99	0.039
病理学的リンパ節転移	1.85	0.80-4.29	0.15
腫瘍組織型の随伴	1.72	0.91-3.27	0.096
非乳頭状腫瘍所見	0.93	0.46-1.87	0.83
High-grade tumor budding	2.88	1.24-6.67	0.014

HR, hazard ratio; pT, CI, confidence interval; pathological T.



表 4. pT1-3 の浸潤性上部尿路上皮癌症例の全生存に関する単変量解析

Variables	HR	95% CI	p-value	5年 全生存率 (%)
年齢			0.34	
70歳未満	1	Reference		75
70歳以上	1.31	0.76-2.27		63
性別			0.54	
男性	1	Reference		64
女性	1.20	0.67-2.12		67
腫瘍側			0.71	
右	1	Reference		65
左	1.11	0.65-1.90		67
手術方法			0.47	
尿管部分摘除術	1	Reference		67
腎尿管全摘除術	1.69	0.41-7.04		0
手術手技			0.86	
腹腔鏡下	1	Reference		67
開腹	1.05	0.61-1.81		68
術後補助化学療法			0.45	
なし	1	Reference		70
あり	1.26	0.69-2.31		60
組織学的深達度			0.024	
pT1 or 2	1	Reference		78
pT3	1.91	1.09-3.36		60
組織学的深達度			0.073	
pT1	1	Reference		81
pT2 or 3	1.92	0.80-1.75		63
脈管侵襲			< 0.0001	
なし	1	Reference		82
あり	3.13	1.80-5.46		49
病理学的リンパ節転移			0.04	
なし / 郭清未施行	1	Reference		70
あり	2.46	1.04-5.81		41
切除断端への腫瘍露出			0.87	
陰性	1	Reference		68
陽性	1.08	0.39-3.02		61
腫瘍局在			0.14	
腎盂	1	Reference		74
尿管	1.49	0.88-2.54		60
腫瘍組織亜型の随伴			0.15	
なし	1	Reference		71
あり	1.55	0.85-2.82		59
腫瘍肉眼所見			0.36	
乳頭状	1	Reference		70
非乳頭状	1.34	0.72-2.47		54
Tumor budding			< 0.0001	
Low-grade	1	Reference		81
High-grade	3.65	2.10-6.33		37

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T.

表 5. pT1-3 の浸潤性上部尿路上皮癌症例の全生存に関する多変量解析

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value
組織学的深達度 pT3	1.04	0.54-2.00	0.91
脈管侵襲あり	1.91	0.99-4.03	0.089
病理学的リンパ節転移	1.08	0.40-2.56	0.97
High-grade tumor budding	2.33	1.12-4.88	0.024

HR, hazard ratio; pT, CI, confidence interval; pathological T.

表 6. 臨床病理学的因子と *ACTN4* のコピー数増加との関連性

Variables	<i>ACTN4</i> の コピー数増加		<i>p</i> -value
	なし (n = 143)	あり (n = 25)	
年齢			
70 歳以上	81	18	0.15
70 歳未満	62	7	
性別			
男性	107	17	0.47
女性	36	8	
腫瘍側			
左	81	8	0.29
右	62	17	
手術方法			
腎尿管全摘除術	139	24	0.74
尿管部分摘除術	4	1	
手術手技			
開腹	74	11	0.47
腹腔鏡下	69	14	
組織学的深達度			
Ta	34	0	0.0062
Tis	6	0	
T1	29	4	
T2	19	4	
T3	54	15	
T4	1	2	
組織学的悪性度			
High grade	128	25	0.09
Low grade	15	0	
脈管侵襲			
あり	34	22	< 0.0001
なし	109	3	
病理学的リンパ節転移			
陽性	6	4	0.0065
陰性	23	8	
郭清なし	114	13	
切除断端の腫瘍露出			
陽性	9	6	0.0042
陰性	134	19	
腫瘍局在			
腎盂	84	8	0.013
尿管	59	17	
CIS の随伴			
あり	25	7	0.22
なし	118	18	
腫瘍組織歪型の随伴			
あり	24	13	< 0.0001
なし	119	12	
腫瘍肉眼所見			
乳頭状	119	14	0.002
非乳頭状	24	11	
ACTN4 蛋白質の過剰発現			
あり	30	19	< 0.0001
なし	113	6	

ACTN4, actinin-4; CIS, carcinoma in situ.

表 7. 臨床病理学的因子と ACTN4 蛋白質の過剰発現との関連性

Variables	ACTN4 蛋白質の過剰発現		p-value
	なし (n = 119)	あり (n = 49)	
年齢			
70 歳以上	51	18	0.46
70 歳未満	68	31	
性別			
男性	88	36	0.95
女性	31	13	
腫瘍側			
左	66	32	0.24
右	53	17	
手術方法			
腎尿管全摘除術	114	49	0.15
尿管部分摘除術	5	0	
手術手技			
開腹	67	18	0.021
腹腔鏡下	52	31	
組織学的深達度			
Ta	33	1	< 0.0001
Tis	6	0	
T1	27	6	
T2	20	3	
T3	32	37	
T4	1	2	
組織学的悪性度			
High	105	48	0.045
Low	14	1	
脈管侵襲			
あり	21	35	< 0.0001
なし	98	14	
病理学的リンパ節転移			
陽性	4	6	0.0013
陰性	16	15	
郭清なし	99	28	
切除断端の腫瘍露出			
陽性	7	8	0.031
陰性	112	41	
腫瘍局在			
腎盂	65	27	0.95
尿管	54	22	
CIS の随伴			
あり	22	10	0.77
なし	97	39	
腫瘍組織亜型の随伴			
あり	18	19	0.0008
なし	101	30	
腫瘍肉眼所見			
乳頭状	106	27	< 0.0001
非乳頭状	13	22	

ACTN4, actinin-4; CIS, carcinoma in situ.

表 8. 上部尿路上皮癌症例の無尿路外再発生存に関する単変量解析

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value	5年無 尿路外再発 生存率 (%)
年齢			0.10	
70歳未満	1	Reference		79
70歳以上	1.64	0.90-2.99		67
性別			0.23	
男性	1	Reference		75
女性	1.44	0.79-2.62		64
腫瘍側			0.51	
右	1	Reference		75
左	1.28	0.72-2.30		71
手術方法			0.75	
尿管部分摘除術	1	Reference		72
腎尿管全摘除術	1.38	0.19-10.01		67
手術手技			0.84	
腹腔鏡下	1	Reference		75
開腹	1.05	0.60-1.85		70
組織学的深達度			< 0.0001	
pTa / Tis / T1	1	Reference		94
pT2 / T3 / T4	7.69	3.25-18.18		56
脈管侵襲			< 0.0001	
なし	1	Reference		90
あり	8.00	4.26-13.15		37
病理学的リンパ節転移			< 0.0001	
陰性 / 未郭清	1	Reference		77
陽性	7.19	3.42-15.15		0
切除断端の腫瘍露出			0.0015	
陰性	1	Reference		76
陽性	3.28	1.58-6.80		33
腫瘍局在			0.41	
腎盂	1	Reference		76
尿管	1.26	0.72-2.20		68
CISの随伴			0.46	
なし	1	Reference		71
あり	0.75	0.35-1.61		77
腫瘍組織亜型の随伴			< 0.0001	
なし	1	Reference		79
あり	3.36	1.88-5.98		48
腫瘍肉眼所見			0.0001	
乳頭状	1	Reference		77
非乳頭状	3.13	1.75-5.65		54
ACTN4のコピー数増加			< 0.0001	
なし	1	Reference		80
あり	5.81	3.12-10.53		27
ACTN4蛋白質の過剰発現			< 0.0001	
なし	1	Reference		84
あり	4.85	2.74-8.62		40

HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T; CIS, carcinoma in situ, ACTN4, actinin-

表 9. 上部尿路上皮癌症例の無尿路外再発生存に関する多変量解析

(ACTN4 のコピー数増加を含めた解析)

Variables	HR	95% CI	p-value
組織学的深達度 pT2 以上	2.99	1.09-8.26	0.034
脈管侵襲あり	2.42	1.08-5.43	0.033
病理学的リンパ節転移*	2.46	1.08-5.56	0.031
切除断端陽性	1.84	0.83-4.12	0.13
腫瘍組織亜型の随伴	2.09	1.09-4.01	0.026
非乳頭状肉眼所見	1.30	0.70-2.43	0.41
ACTN4 のコピー数増加	2.16	1.04-4.48	0.038

ACTN4, actinin-4; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T.

\*病理学的リンパ節転移陽性 vs. 病理学的リンパ節転移陰性 / 郭清未施行

表 10. 上部尿路上皮癌症例の無尿路外再発生存に関する多変量解析

(ACTN4 蛋白質の過剰発現を含めた解析)

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value
組織学的深達度 pT2 以上	2.68	0.97-7.35	0.056
脈管侵襲あり	2.67	1.22-5.95	0.014
病理学的リンパ節転移*	2.54	1.09-5.85	0.031
切除断端陽性	1.66	0.72-3.86	0.24
腫瘍組織亜型の随伴	2.38	1.29-4.41	0.0058
非乳頭状肉眼所見	1.12	0.60-2.11	0.71
ACTN4 蛋白質の過剰発現	1.78	0.91-3.47	0.089

ACTN4, actinin-4; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T.

\*病理学的リンパ節転移陽性 vs. 病理学的リンパ節転移陰性 / 郭清未施行

表 11. 上部尿路上皮癌症例の全生存に関する単変量解析

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value	5年 全生存率 (%)
年齢			0.009	
70歳未満	1	Reference		82
70歳以上	2.10	1.20-3.66		67
性別			0.66	
男性	1	Reference		74
女性	1.13	0.64-2.03		73
腫瘍側			0.71	
右	1	Reference		74
左	1.11	0.66-1.87		73
手術方法			0.95	
尿管部分摘除術	1	Reference		73
腎尿管全摘除術	1.07	0.15-7.77		67
手術手技			0.84	
腹腔鏡下	1	Reference		73
開腹	1.01	0.60-1.72		73
組織学的深達度			0.0002	
pTa / Tis / T1	1	Reference		90
pT2 / T3 / T4	3.17	1.74-5.81		61
脈管侵襲			<.0001	
なし	1	Reference		88
あり	4.67	2.74-7.94		43
病理学的リンパ節転移			0.0037	
陰性 / 未郭清	1	Reference		75
陽性	3.57	1.51-8.40		40
切除断端の腫瘍露出			0.0045	
陰性	1	Reference		77
陽性	2.86	1.39-5.98		37
腫瘍局在			0.13	
腎盂	1	Reference		77
尿管	1.49	0.89-2.549		68
CISの随伴			0.14	
なし	1	Reference		71
あり	0.55	0.25-1.29		81
腫瘍組織亜型の随伴			0.0081	
なし	1	Reference		78
あり	2.20	1.23-3.95		56
腫瘍肉眼所見			0.0085	
乳頭状	1	Reference		77
非乳頭状	2.19	1.22-3.95		57
ACTN4のコピー数増加			< 0.0001	
なし	1	Reference		79
あり	4.72	2.62-8.55		36
ACTN4蛋白質の過剰発現			< 0.0001	
なし	1	Reference		82
あり	2.96	1.73-5.10		52

ACTN4, actinin-4; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T; CIS, carcinoma in situ.



表 12. 上部尿路上皮癌症例の全生存に関する多変量解析

(ACTN4 のコピー数増加を含めた解析)

Variables	HR	95% CI	p-value
70 歳以上	1.90	1.06-3.40	0.031
組織学的深達度 pT2 以上	1.37	0.63-2.98	0.43
脈管侵襲あり	2.83	1.28-6.25	0.010
病理学的リンパ節転移*	1.11	0.40-3.07	0.84
切除断端陽性	1.55	0.69-3.50	0.29
腫瘍組織型の随伴	1.29	0.67-2.46	0.44
非乳頭状肉眼所見	1.01	0.53-1.93	0.96
ACTN4 のコピー数増加	2.17	1.09-4.26	0.027

ACTN4, actinin-4; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T.

\*病理学的リンパ節転移陽性 vs. 病理学的リンパ節転移陰性 / 郭清未施行

表 13. 上部尿路上皮癌症例の全生存に関する多変量解析

(ACTN4 蛋白質の過剰発現を含めた解析)

Variables	HR	95% CI	<i>p</i> -value
70 歳以上	1.95	1.08-3.51	0.026
組織学的深達度 pT2 以上	1.29	0.60-2.80	0.51
脈管侵襲あり	3.46	1.62-7.35	0.0012
病理学的リンパ節転移*	0.90	0.31-2.62	0.84
切除断端陽性	1.53	0.64-3.66	0.38
腫瘍組織亜型の随伴	1.41	0.75-2.67	0.28
非乳頭状肉眼所見	0.88	0.46-1.70	0.71
ACTN4 蛋白質の過剰発現	1.37	0.71-2.63	0.35

ACTN4, actinin-4; HR, hazard ratio; CI, confidence interval; pT, pathological T.

\*病理学的リンパ節転移陽性 vs. 病理学的リンパ節転移陰性 / 郭清未施行

表 14. 今回の 2 つ研究で重複する上部尿路上皮癌 125 症例における tumor budding と ACTN4 との関連性

Variables	Tumor budding		<i>p</i> -value
	Low-grade (n = 88)	High-grade (n = 37)	
<i>ACTN4</i> のコピー数増加			
なし	78	24	0.0043
あり	10	13	
ACTN4 蛋白質の過剰発現			
なし	69	10	< 0.0001
あり	19	27	

ACTN4, actinin-4; pT, pathological T;