

# 論文内容の要旨

論文提出者氏名 中尾 龍太

論文題目 Histopathological and immunohistochemical characteristics of superficial squamous cell carcinoma forming droplet infiltration: indicator of lymph node metastasis of the esophagus.

## 論文内容の要旨

### 【背景】

近年、内視鏡技術、特に内視鏡的粘膜下層剥離術(ESD)の普及により、表在型食道扁平上皮癌(SSCC)は安全に一括で切除できるようになったが、壁深達度 MM(粘膜筋板に達する)では 10-20%、SM1(粘膜下層での浸潤距離 200 $\mu$ m 以下)では 20-50%にリンパ節転移があるとされ、原発巣の完全切除が達成できても追加治療が必要となることが少なくない。

以前我々は壁深達度 MM 食道 SSCC のリンパ節転移予測因子となる腫瘍浸潤様式として滴状浸潤 droplet infiltration(DI)を報告した。DI を上皮内病変からひと繋がりととなった主病巣からの連続性を欠く腫瘍細胞巣と定義し、その長径(DIs)、構成細胞数(DIn)および主病巣からの距離(DId)について検討した結果、リンパ節転移予測因子となる DI(DILFs)は DIs が 20 $\mu$ m 以下(DIsLF)、DIn が 4 個以下(DInLF)および DId が 200 $\mu$ m 以上(DIdLF)であることを特定した。言い換えると DILFs を有する SSCC は高いリンパ節転移能を有すると考えられ、リンパ節廓清を含む追加治療の必要性の指標となり得ることを明らかにした。しかし、DILFs を有する SSCC の特徴については不明であり、その特徴を明らかにできれば生検検体からでもリンパ節転移のリスクが予測できる可能性があり、今回我々は DILFs を有する SSCC の組織学的および免疫組織化学的特徴について検討した。

### 【対象と方法】

2006 年 6 月から 2013 年 11 月までに京都府立医科大学で ESD によって切除された食道 SSCC 全 191 患者 226 病変のうち、術前治療がなく、内視鏡的に一括切除され、壁深達度が MM(粘膜筋板に達する)、SM1(粘膜下層での浸潤距離 200 $\mu$ m 以下)および SM2(粘膜下層での浸潤距離 200 $\mu$ m を超える)であった 44 患者 45 病変(MM, 24 例; SM1, 11 例; SM2, 10 例)を対象とした。DILFs は DIs $\leq$ 20 $\mu$ m(DIsLF)、DIn $\leq$ 4 個(DInLF)および DId $\geq$ 200 $\mu$ m(DIdLF)であり、各病変をそれぞれ陽性群[DILF(+)]と陰性群[DILF(-)]とに分類した。

DILFs を有する SSCC の特徴については、病変の悪性度を最も反映すると考えられる浸潤最深部を対象とし、免疫組織化学的に Ki-67 で細胞増殖能を、cytokeratin(CK) 13、14、17 および 19 で細胞分化を検討した。Ki-67 について陽性細胞と陰性細胞とを拡大率 400 倍光顕下で合計 500 個以上計測し、陽性細胞数を全計測細胞数で除した値 [Ki-67 labeling index(LI)]で評価した。CK13、14、17 および 19 について各 CK の染色強度を non-stained/faint (score 0)、sporadic/weak (score 1)、patchy (score 2)、diffuse (score 3)の 4 段階で評価した。Ki-67 LI および各 CK 染色強度について DIs、DIn および DId それぞれの DILF(+ )群と DILF(-)群とで比較した。DILFs は本来壁深達度 MM で定義されたものであるため、壁深達度と他の因子との関連についても比較した。統計学的解析に Mann-Whitney の U 検定 (Statcel 3; The Publisher OMS Ltd., Saitama, Japan)を用い、有意水準を 5% ( $P < 0.05$ )とした。

## 【結果】

DIは45例中42例(93.3%)にあり、それぞれMMで24例中22例(91.7%)、SM1で11例中10例(90.9%)、SM2で10例10例(100%)にあった。DI数はMMで0-43(中央値7)、SM1で0-75(中央値19)、SM2で2-101(中央値21.5)で、MMに比べてSM1-2では有意に多かった( $P<0.01$ )。全体の45例中DisLF(+)群は19例、DInLF(+)群は23例、DIdLF(+)群は31例あり、MMのみの24例中DisLF(+)群は5例、DInLF(+)群は6例、DIdLF(+)群は14例あった。壁深達度が進むにつれてDisLF(+)群およびDInLF(+)群の頻度は上昇した(Dis:  $P=0.001$ , DIn:  $P<0.001$ )。

Ki-67 LIの中央値(範囲)はMMで24.8%(6.5%-81.4%)、SM1-2で37.6%(2.7%-93.7%)であり、MMに比べてSM1-2でやや高かったが有意ではなかった。45例全体ではDisLF(+)群およびDInLF(+)群はそれぞれの(-)群に比べてKi-67 LIが有意に高く(ともに $P<0.001$ )、MMのみの24例においてもDisLF(+)群およびDInLF(+)群はKi-67 LIが有意に高かった(Dis:  $P<0.01$ , DIn:  $P<0.05$ )。

CK13の染色強度はMMに比べてSM1-2で有意に低下した( $P<0.05$ )が、他3種のCKではMMとSM1-2とに有意な差はなかった。CK13では45例全体ではDisLF(+)群およびDInLF(+)群においてそれぞれの(-)群に比べて有意に低下し(Dis:  $P<0.01$ , DIn:  $P<0.001$ )、MMのみの24例においてもDisLF(+)群およびDInLF(+)群において有意に低下した(ともに $P<0.05$ )。しかしながら、他3種のCKではいずれも有意な差はなかった。

## 【考察】

滴状浸潤 droplet infiltration(DI)は腫瘍浸潤様式のひとつで、リンパ節転移予測因子として有用である。本研究において、リンパ節転移予測因子となるDI(DILFs)を有するSSCCは細胞増殖能が亢進しており、CK13の免疫組織化学的な発現低下がDILFs形成に密接に関与していることが明らかになった。

Ki-67 labeling index(LI)は腫瘍増殖能を評価するのに有用な指標であり、食道扁平上皮癌において高Ki-67 LI群は予後不良でリンパ節転移率が高く、また、SSCCに限定しても高Ki-67 LI群はリンパ節転移率が高いとされている。本研究において、壁深達度によってDILFsの頻度やKi-67 LIに差があることを考慮してもKi-67 LIはDisLF(+)群およびDInLF(+)群で有意に高かったため、DisLFおよびDInLFはリンパ節転移率の高い細胞増殖能亢進群を識別し得る腫瘍浸潤様式であることが示唆された。

Cytokeratin(CK)は上皮細胞の分化に関するよい指標であり、CK13の発現低下やCK14、17および19の発現亢進が口腔や食道重層扁平上皮粘膜の悪性転化と関連するとされている。本研究において、壁深達度によってDILFsの頻度やCK発現強度に差があることを考慮してもCK13はDisLF(+)群およびDInLF(+)群で有意に発現低下をしており、その一方で他3種は発現亢進が見られたもののDILF(+)群と(-)群とで有意な差はなかった。さらにこれら4種のCKは表層細胞型(CK13)および基底細胞型(CK14、17および19)に分類されるため、浸潤早期の扁平上皮癌では表層細胞型CKの発現異常が悪性転化と関連することが示唆された。

DisLFおよびDInLFは孤立した小さな腫瘍細胞巣の存在を反映しているが、DIdLFは腫瘍細胞巣の大きさに関わらずその広がりを反映している。以前の報告でDisLFおよびDInLFはリンパ節転移予測因子としてリンパ管侵襲よりも有用であったが、本研究でDisLFおよびDInLF、すなわち孤立した小さな腫瘍細胞巣を有するSSCCは細胞増殖能が亢進しており、表層細胞型CKであるCK13の発現低下がそれらの形成に密接に関与していることが示された。さらに、浸潤最深部での増殖能亢進やCK13発現低下はDILFsやリンパ管侵襲と同等となる独立した悪性度予測因子とみなせるため、微小な生検検体でDisLFやDInLFが明らかでない症例でもリンパ節転移予測因子となる可能性が示唆された。