

【16】

| | |
|---------|--|
| 氏 名 | やま ぐち たけ し 山 口 岳 史 |
| 学位の種類 | 博士（医学） |
| 学位記番号 | 甲第660号 |
| 学位授与の日付 | 平成27年3月4日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第4条第1項 (腫瘍外科学) |
| 学位論文題目 | Clinical validation of the gastrointestinal NET grading system : Ki67 index criteria of the WHO 2010 classification is appropriate to predict metastasis or recurrence (消化管神経内分泌腫瘍の病理組織学的分類に関する臨床的検討： WHO2010の分類におけるKi67指数は転移や再発予測に有用である) |
| 論文審査委員 | (主査) 教授 正 和 信 英 (副査) 教授 平 石 秀 幸 教授 千 田 雅 之 |

論 文 内 容 の 要 旨

【背 景】

消化管の神経内分泌腫瘍（Neuroendocrine tumors : NETs）は、1907年にOberndorferによってカルチノイドと命名されて以後、その腫瘍の起源や悪性度について、多くの研究者によって研究されてきた。予後の検討、診断基準の変遷などを経て、2000年のWorld Health Organization（WHO）分類で論理的な学名が命名され、高分化型内分泌細胞腫瘍、高分化型内分泌癌、低分化型内分泌癌に分類された。2010年のWHO分類の改訂により、消化管の神経細胞から発生する腫瘍はneuroendocrine neoplasm（NEN）と総称され、neuroendocrine carcinoma（NEC）とneuroendocrine tumor（NET）に分けられた。NECは肺の小細胞癌や大細胞癌と類似したものを指し、NET は従来のカルチノイドあるいは非定型的カルチノイドを意味するものである。NETは核分裂像の数とKi67の発現指数でNET G1とNET G2のgradeに識別される。今回の改訂は増殖能を重視しておりシンプルで使いやすいが、Ki67指数の基準となる値に明確でない部分がある。NET G1がKi67指数2%以下である一方で、NET G2は3%超20%以下となっており、Ki67指数が2から3%までの数であった場合の扱いが明記されていない。

【目 的】

この研究の目的は、WHO2010の消化管NETのgrade分類を転移再発の有無で検討し、そのKi67指数を評価することであり、また特に前述の問題点であるKi67指数2から3%のgrade分類を検証する

ことである。

【対象と方法】

大学病院及び関連施設における2000年1月から2012年6月までの消化管NET症例を対象とした。多発例と虫垂原発例を除外した45症例のKi67指数やその他の転移再発の予測因子を検討した。各々の施設の倫理委員会の承認を受け、また全ての患者から告知に基づく同意を得た。

Ki67免疫組織化学にはLSAB-2 kit、MIB-1抗体を用いた。

Ki67指数の評価にはコンピューター画像解析装置WinROOF（三谷商事、日本）を用いた。WinROOFによりRGB分離画像を作成し、B（blue）imageでの“細胞分離”機能により、Ki67陽性腫瘍細胞数を計測した。非腫瘍細胞で陽性を示したものは用手的に除外した。またR（red）imageでの“円形分離”機能により腫瘍細胞数を計測した。WHOの定義に準じて、15から30倍の写真を用い、最も核のKi67標識率の高い領域における500から2000個の腫瘍細胞に占める陽性細胞の割合をKi67指数（%）とした。

統計学的解析は、統計解析ソフトのR（version2.15.0）を用い、Fisher's exact testもしくはWelch two sample t-testで各因子を評価した。Ki67指数については、receiver operating characteristic（ROC）曲線を用いてカットオフ値を検討した。全ての解析において $P < 0.05$ の場合に統計学的有意とした。

【結 果】

NET45例中、転移再発は7例に認めた。転移再発の内訳は、リンパ節が3例、肝が1例、リンパ節と肝が1例、肝と肺が1例、局所再発が1例であった。転移再発のある群をA群、無い群をB群とした。男女比、年齢、腫瘍占拠部位、深達度、切除方法の検討で有意差は認めなかった。転移のあった例の原発部位は十二指腸（10例中2例、20.0%）と直腸（29例中5例、17.2%）のみであった。

腫瘍最大径の平均の比較では有意差は無かったが、ROC曲線で分析すると、最大径20.5mm以上で有意に転移再発と関連した（感度33.3%、特異度100%、 $p=0.019$ ）。

Ki67指数の平均はA群で2.83%、B群で1.39%と、有意差は認めなかった。WHO分類に準じてそれぞれ2%、3%をカットオフ値としてG1、G2のgradeを分類したが、転移再発との相関は認めなかった。そこでROC曲線による分析を行い、最適なカットオフ値を検討した。その結果、Ki67指数2.8%で分けると、感度特異度が最大となった（感度42.9%、特異度86.8%）。この新たなカットオフ値でgradeを分類し直してもやはり統計学的有意差は認めなかったが、2%の場合（感度42.9%、特異度76.3%）よりも転移再発の予測因子として適していた。3%の場合、感度28.6%、特異度89.5%となるため、臨床的には、おおよそ3%でG1/G2を二別化すると転移との相関がより明らかになると考えられた。

また、十二指腸、直腸で転移再発を認めたため、それぞれの部位ごとに検討した。十二指腸では10例中2例に転移再発を認め、gradeや腫瘍最大径、深達度とは相関しなかった。G1でもG2と同様に転移を示し、粘膜下層以深で転移例がみられた。一方直腸では29例中5例で転移再発を認め、深達度とKi67指数において有意に相関した。十二指腸と異なり直腸ではG1/G2の二別化は転移予測に有効であった。

【考 察】

1907年にOberndorferは、カルチノーマに似た形態を示し良性の態度をとる疾患として、多発傾向のある粘膜下小腸腫瘍群にカルチノイドの名称を提唱した。しかしながら、長期予後の研究で、この腫瘍群の中に転移や死亡例などがみられ、悪性の経過を辿ることも明らかとなった。その後組織分類や染色法による診断が研究され、好銀細胞染色グリメリウス法で分泌顆粒が染色されることが明らかになり、またシナプトフィジン、クロモグラニンAに染まることから、神経内分泌細胞に由来することが示された。これらの研究により本疾患群の性質が明らかになるにつれて、カルチノイドという名称が不適切であるとの指摘もされるようになった。その本質は神経内分泌系の癌であるとして、NETsの名称が広く使われるようになり、WHO2000の分類にその概念が採用された。その後予後に関する研究が多くなされ、2010年にWHOの分類は改訂された。この新しい分類では、NENをNETとNECに分け、更にNETは核分裂像の数とKi67指数でG1とG2のgradeに識別される。

WHO2010の分類において、核分裂像の数は、高倍率視野（2mm²）で50視野以上を観察し、10視野あたりの平均の核分裂像を測定しなければならず、煩雑である。また測定者間誤差が大きいという報告もある。Ki67指数の方が客観的な評価に優れていると言えるが、その2から3%までの扱いが明記されていないことが問題であった。

本研究のROC曲線による分析から、Ki67指数2.8%で分けると最も良いという結果であり、おおよそ3%であった。このカットオフ値で分類したgradeは、特異度が高いことより転移再発予測の指標として有意義である。一方で感度は低く、生物学的な悪性度に関わらず、G1でも転移再発は起こっていた。

今回用いたWinROOFの様な画像解析装置による分析は未だ一般的ではないが、用手的カウントと高率に合致するためKi67指数の評価に適しているという報告もある。更に、志田らや藤盛らが報告しているように、いくつかの工夫を加えることで数値の客観化と簡便な計測が可能になる。今回もKi67免疫組織化学を評価する上での一つの支障は、リンパ球や組織球の一部にも陽性所見が見られることであった。形態診断を参考にし、腫瘍胞巣以外の陽性細胞は手動で計測上除外した。

他の予後因子に関して、文献的に転移は部位、腫瘍径、多発や深達度と関連するが、今回の検討では腫瘍最大径が相関した。また、肝転移のあるNETを対象にした研究から、血清でのEpithelial cell adhesion molecule (EpCAM) が発現したcirculating tumor cells (CTCs) の個数が、grade分類よりも良く予後と相関するとの報告もあるが、測定方法がまだ研究段階であり、報告の数も少ない。現段階ではWHO分類のgradeが予後や転移と相関する最も重要なNETの分類であると考えられる。

WHO2010の分類におけるKi67指数の数値基準を検証し、妥当性を示した報告は検索し得る限りではこれまでに無く、本論文が初めての報告である。今後は更に症例を増やした検討が望まれる。

【結 論】

ROC曲線を用いた分析により、Ki67指数2.8%が転移再発を予測するカットオフ値として適していることを示した。これはおおよそ3%であり、WHO基準のG2のKi67指数3%超という数値基準が妥当であることを示唆する結果を得た。現段階ではWHO2010の分類のgradeが予後や転移と相関する

最も重要なNETの分類であると考えられる。

論文審査の結果の要旨

【論文概要】

消化管の神経内分泌腫瘍は、癌に似た形態を示し良性の態度をとる疾患として、カルチノイドと呼称されてきた。しかしながら、この腫瘍群は悪性の経過も辿ることが明らかとなり、2000年のWHO分類の改訂によりカルチノイドの名称は用いられなくなった。2010年のWHO分類の改訂により、消化管の神経内分泌細胞から発生する腫瘍はneuroendocrine neoplasm (NEN) と総称され、neuroendocrine carcinoma (NEC) とneuroendocrine tumor (NET) に分けられた。NETは更に、核分裂像の数とKi67の発現指数でNET G1とNET G2のgradeに識別されるが、そのKi67指数の基準となる値に明確でない部分がある。NET G1がKi67指数2%以下である一方で、NET G2は3%超20%以下となっており、Ki67指数が2から3%までの数であった場合の扱いが明記されていない。これらを背景として、申請論文ではWHO2010の消化管NETのgrade分類を転移再発の有無で検討し、そのKi67指数を評価している。またKi67指数2から3%のgrade分類を検証している。2000年1月から2012年6月までの消化管NET症例を対象とし、多発例と虫垂原発例を除外した45症例を転移再発の有無で2群に分け、Ki67指数やその他の臨床病理学的因子を検討した。

結果、NET45例中、転移再発は7例に認めた。転移再発の有無と男女比、年齢、腫瘍占拠部位、深達度、切除方法の検討で有意差は認めなかった。腫瘍最大径の平均では有意差は無かったが、receiver operating characteristic (ROC) 曲線で分析すると、最大径20.5 mm以上で有意に転移再発と相関した ($p=0.019$)。Ki67指数の平均は2群間で有意差は認めなかった。WHO分類に準じてそれぞれ2%、3%をカットオフ値としてG1、G2のgradeを分類したが、転移再発との相関は認めなかった。そこでROC曲線による分析を行い、最適なカットオフ値を検討した。その結果、Ki67指数2.8%で分けると、感度特異度が最大となった(感度42.9%、特異度86.8%)。これはおおよそ3%であり、臨床的には3%でG1/G2を二別化することで転移再発との相関がより明らかになると結論づけている。

【研究方法の妥当性】

申請論文では、獨協医科大学病院及び関連施設での2000年1月から2012年6月までの豊富な症例を対象とし、標準的なMIB-1抗体を用いたKi67免疫組織化学を評価している。適切な対象群の設定と客観的な統計解析を行っており、本研究方法は妥当なものである。

【研究結果の新奇性・独創性】

従来カルチノイドと呼ばれてきた消化管神経内分泌腫瘍に対し、WHO2010のgrade分類が提唱された。この分類におけるKi67指数の数値基準を検証し、妥当性を示した報告はこれまでに無い。申請論文ではKi67指数2.8%が転移再発を予測するカットオフ値として適していることを示している。これはおおよそ3%であり、臨床的には3%でG1/G2を二別化することで転移再発との相関がより明らかになると結論づけている。この点において本研究は新奇性・独創性に優れた研究と評価できる。

【結論の妥当性】

申請論文では、多数の症例を、適切な設定の下、確立された実験手法と統計解析を用いて、転移再発とKi67指数やその他の臨床病理学的因子との検討を行っている。そこから導き出された結論は、論理的に矛盾するものではなく、また、関連領域における知見を踏まえても妥当なものである。

【当該分野における位置付け】

申請論文では、ROC曲線を用いた分析により、Ki67指数2.8%が転移再発を予測するカットオフ値として適していることを示している。これはおおよそ3%である。これは、今後の消化管NETの治療戦略を考える上で大いに役立つ大変意義深い研究と評価できる。

【申請者の研究能力】

申請者は、病理学や腫瘍外科学の理論を学び実践した上で、作業仮説を立て、実験計画を立案した後、適切に本研究を遂行し、貴重な知見を得ている。その研究成果は当該領域の国際誌への掲載もされており、申請者の研究能力は高いと評価できる。

【学位授与の可否】

本論文は独創的で質の高い研究内容を有しており、当該分野における貢献度も高い。よって、博士（医学）の学位授与に相応しいと判定した。

（主論文公表誌）

Diagnostic Pathology

8 : 65, 2013