

SSA/P 由来早期大腸癌の分子病理学的検討

中村 隆人

新潟大学医歯学総合研究科消化器内科学分野

(指導：寺井崇二教授)

**Molecular Pathologic Study of Early Colorectal carcinoma Arising
from SSA/P**

Takahito Nakamura

Division of Gastroenterology,

Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Shuji TERAJ)

キーワード：SSA/P、鋸歯状ポリープ、大腸癌、癌化機序、遺伝子変異

別冊請求先：〒 951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757

新潟大学大学院医歯学総合研究科 消化器内科学

中村 隆人

Reprint request to: Takahito Nakamura

Division of Gastroenterology, Niigata University Graduate School of Medical and
Dental Sciences

要旨

SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp)は鋸歯状管腔構造を特徴とする大腸の上皮性増殖性病変のひとつであり、MSI-H (microsatellite instability-high : マイクロサテライト不安定)大腸癌の前駆病変として位置づけられるようになってきた (serrated neoplasia pathway: SNP)。SNP では、*BRAF* 変異を initial mutation として、CpG island methylation の蓄積 (CpG island methylation phenotype: CIMP)、ミスマッチ修復遺伝子 *MLH1* の methylation による機能不全、MSI-H を経て大腸癌が発生・生長すると考えられているが、病理組織学的に SSA/P に由来することが確認された大腸癌 (SSA/P 由来癌) を対象として、これら遺伝子異常の網羅的解析を行った研究はない。本研究では、外科切除および内視鏡的切除 SSA/P 内早期癌 (SSA/P 由来癌) 37 例を対象に、SSA/P 由来癌が実際に SNP で起きるとされている遺伝子変異を伴っているのか、遺伝子変異のパターンに多様性があるのかどうか、について検討した。対照は、発生部位と深達度をマッチングさせた腺腫内癌 (腺腫由来癌) 37 例とした。パラフィンブロックから 3 μ m 切片で HE 染色、*MLH1* 蛋白に対する免疫染色を行い、10 μ m 切片から DNA を抽出し、*BRAF*、*KRAS*、*p53* の遺伝子変異の有無、CIMP と MSI の解析を行った。免疫染色では、SSA/P 由来癌では腺腫由来癌に比べ有意に *MLH1* 蛋白の喪失が認められた (81.1% vs 0%: $p < 0.001$)。遺伝子解析では、SSA/P 由来癌は *BRAF* 変異率 (78.1%)、CIMP+ 頻度 (94.6%)、MSI-H 頻度 (83.8%) が高く、腺腫由来癌とは有意差があった ($P < 0.001$)。一方、SSA/P 由来癌の *KRAS* 変異率 (3.1%)、*p53* 変異率 (9.4%) は腺腫由来癌に比べ有意に低かった ($P < 0.001$)。SSA/P 由来癌 32 例の遺伝子解析結果を層別化すると、SSA/P 由来癌は、A 群 [*BRAF*+, *KRAS*-, CIMP+, MSI-H, *p53*-] : 56.3% (18/32)、B 群 [*BRAF*+, *KRAS*-, CIMP+, MSS, *p53*+ or -] : 15.6% (5/32)、C 群 [*BRAF*-, *KRAS*-, CIMP+, MSI-H, *p53*-] : 18.8% (6/32)、その他 : 9.3% (3/32) の 4 群に大別された。これらのことから、SSA/P 由来癌では、半数以上で SNP で想定されている遺伝子異常を示す (A 群) ことが遺伝子変異の観点からも直接検証されたが、遺伝子変異には多様性があり、MSI-H の代わりに *p53* 異常が癌化に関与するものや、*BRAF* 変異が必ずしも initial mutation ではないものも存在すると考えられた。SSA/P 由来癌で共通してみられる遺伝子異常は CIMP+ であり、SSA/P を起点とする SNP は、CIMP+ で特徴付けられる大腸癌の発生経路と考えられた。

緒言

SSA/P (sessile serrated adenoma/polyp)は、2000 年以降に新たに確立された病理学的疾患単位であり、鋸歯状管腔構造を特徴とする大腸の上皮性増殖性病変のひとつである。従来、鋸歯状管腔構造を呈する大腸上皮性増殖性病変は過形成性ポリープ¹⁾ (hyperplastic polyp : 以下 HP) と呼ばれ、非腫瘍性で癌化のポテンシャルはないと考えられてきた²⁾³⁾。しかし、1990 年に Longacre および Fenoglio-Preiser⁴⁾ により HP と同様に鋸歯状管腔構造を呈する腺腫 (鋸歯状腺腫) (serrated adenoma : 以下 SA) の概念が提唱され、更に 1996 年に Torlakovic ら⁵⁾ により、腫瘍性細胞異型を示さないが腺管構造の異常と増殖帯位置異常を伴う HP を SSA (sessile serrated adenoma)として HP から分離することが提唱されて以降、鋸歯状管腔構造を呈する病変の病理診断や生物学的性格に対しての再検討が行われるようになった。現在、WHO 腫瘍分類⁶⁾ では、鋸歯状管腔構造を呈する大腸上皮性増殖性病変は鋸歯状ポリープ (serrated polyp) と総称され、1) Hyperplastic polyp (HP)、2) Sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P)、3) Traditional serrated adenoma (TSA)に 3 つに亜分類されている。SSA/P が Torlakovic らの SSA に、TSA が Fenoglio-Preiser らの SA にほぼ相当する。

こうした病理学的疾患単位の再編成を背景として、SSA/P は、右側大腸に好発すること⁷⁾⁸⁾、胃型粘液形質を発現していること⁸⁾⁹⁾、ミスマッチ修復遺伝子関連蛋白の発現消失があること¹⁰⁾、*BRAF* 遺伝子変異頻度が高いこと¹²⁾¹³⁾、が明らかになった。これらは、ミスマッチ修復遺伝子異常により発生するマイクロサテライト不安定 (microsatellite instability high: MSI-H) 大腸癌と共通した所見であり、SSA/P は MSI-H 大腸癌の前駆病変として注目され、従来の adenoma-carcinoma sequence¹⁴⁾¹⁵⁾ (腺腫の癌化経路) とは異なる発癌経路 (serrated neoplasia pathway: 以下 SNP) の起点として位置づけられるようになってきた。Adenoma-carcinoma sequence では、大腸癌は腺腫を起点として、*APC*、*KRAS*、*p53* 等の遺伝子の段階的変異により発生・生長すると考えられているが¹⁶⁾、SNP では、大腸癌は HP もしくは SSA/P を起点として、*BRAF* 遺伝子変異、CpG island methylation の蓄積 (CpG island methylator phenotype : CIMP)、ミスマッチ修復遺伝子の一つである *MLH1* の機能不全による MSI-H、により発生・生長すると考えられている⁶⁾¹³⁾。

SNP は SSA/P と MSI-H 大腸癌との臨床病理学および分子病理学的特徴の共通性から想定されたものであったが、少数例ながら病理組織学的に SSA/P 内に発生した大腸癌 (SSA/P 内癌、すなわち SSA/P に由来する大腸癌) が報告されるようになり¹⁷⁾⁻²⁶⁾、その存在は確実なものとなっている。しかし、これまでに SSA/P 内に発生した癌そのものを対象とした遺伝子検索は限られており¹⁷⁾²¹⁾²²⁾、SNP で想定されている遺伝子変異の網羅的検索は行われていない。すな

わち、SSA/P を発生起点とする大腸癌が、実際に SNP で起きるとされている遺伝子変異を伴っているのか、遺伝子変異のパターンに多様性があるのかどうか、については明確にはされていない。本研究では、これらのことを明らかにするため、SSA/P に由来する早期大腸癌（SSA/P 内癌）を対象として、*BRAF*、*KRAS*、*p53*、*CIMP*、*MSI* の遺伝子解析および *MLH1* 蛋白の免疫組織学的検索を行った。

対象と方法

1. 対象

1997 年～2014 年までに新潟大学臨床病理学分野（旧第一病理学教室）で病理診断された、外科切除および内視鏡的切除早期大腸癌 5,108 例から抽出された SSA/P 内癌 37 例（pTis (M) 癌 28 例、pT1 (SM) 癌 9 例）を検討対象とした（図 1）。家族性大腸腺腫症、遺伝性非ポリポーシス大腸癌症例、炎症性腸疾患合併例は対象から除外した。対照は、発生部位と深達度をマッチングさせた管状腺腫内癌（以下腺腫内癌）37 例とした。SSA/P 内癌、腺腫内癌は、それぞれ癌部が SSA/P もしくは腺腫に半周以上囲まれているものとし、SSA/P 内癌と腺腫内癌の癌部をそれぞれ SSA/P 由来癌、腺腫由来癌と定義した。腺腫、癌の診断は大腸癌取扱い規約第 8 版²⁷⁾ に準じ、SSA/P の診断は WHO の診断基準⁶⁾ に準じた。

図 1

2. 方法

対象例のパラフィンブロックから 3μm 厚切片 2 枚、10μm 厚切片 10 枚、3μm 厚切片 1 枚の連続切片を作成した。1 枚目と最後の 3μm 切片にはヘマトキシリン・エオジン染色（HE 染色）を、2 枚目の 3μm 切片には *MLH1* 蛋白に対する免疫染色を施行し、10μm 切片は DNA 抽出に用いた。

組織学的検索

1 枚目の HE 染色標本を用いて、SSA/P 内癌と腺腫内癌それぞれの癌部のマッピング（マーカーペンによる領域分け）を行った。また、後述する DNA 抽出の際に、異なる病理診断領域の DNA が混在しないことを担保するため、最後の切片の HE 染色標本を検鏡して、1 枚目の HE 染色標本でマッピングした各領域にずれがないことを確認した。

免疫組織学的検索

ミスマッチ修復遺伝子の一つである *MLH1* の蛋白発現状態を検索するため、抗 *MLH1* モノクローナル抗体（clone G168-15, 1:50; BD Biosciences, Pharmingen, San Diego, CA, USA）

を用い、MAX-PO (ニチレイバイオサイエンス社) 法にて免疫染色 (以下 MLH1 染色) を行った。MLH1 染色の評価は、核染色性が正常大腸陰窩と比べ明らかに消失もしくは減弱しているものを発現喪失とした²⁸⁾。

遺伝子検索

10 μ m 未染切片を用い、マッピングされた癌領域から、顕微鏡観察下のマニュアル操作でマイクロダイセクションを行い、DNA アイソレータ PS キット (和光純薬工業) で DNA を抽出した²⁹⁾。陰性コントロールは同一切片の正常大腸粘膜とした。

KRAS (exon 2)、BRAF (exon 15)、p53 (exon 5 から 8) を、AmpliAq® Gold DNA Polymerase (Applied Biosystems)を用いて PCR にて増幅した。それぞれのエクソンの増幅に用いたプライマーを表 1 に示す。PCR 産物は、3%アガロースゲルで電気泳動し、増幅を確認の後、ExoSAP-IT®(USB®,USA)で精製し、これをテンプレートとして ABI PRISM® BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kits (Applied Biosystems, USA)を用いてサイクルシーケンス反応を行い、反応産物を NucleoSEQ (MACHEY-NAGEL, Germany)で精製した後、Genetic Analyser 3500 (Applied Biosystems, USA)を用いてシーケンス解析を行った。いずれのサンプルも、sense、antisense の配列を決定することで各遺伝子エクソンの変異を確定した。

表 1

MSI (microsatellite instability)解析は National Cancer Institute が推奨する BAT25、BAT26、D2S123、D5S346、D17S2505 の 5 つのマイクロサテライトマーカーパネルを用いた既報³⁰⁾ の手法で行った。2 個以上のマーカーで不安定性が確認されるものを MSI-H、1 個以下のマーカーのみで不安定性が確認されたものを MSS (MSI stable)と定義した³⁰⁾。

CIMP (CpG island methylator phenotype) 解析は、8 つの CIMP マーカー (CACNA1G, IGF2, NEUROG1, RUNX3, SOCS1, MLH1, CDKN2A, CRABP1)とリファレンス遺伝子 ALU を用いて行った³¹⁾。プライマーは既報のものを使用した³²⁾。DNA を EpiTect Bisulfite Kit (Qiagen, Hilden, Germany) でビスルファイト処理した。DNA methylation レベルは EpiTect MethyLight PCR kit (Qiagen)を用いた定量 PCR で測定した³²⁾。8 つのマーカー中 6 つ以上で PMR (percentage of methylated reference)>4 を呈するものを CIMP+と定義した^{31) 33)}。

3. 統計解析

連続変数には Mann-Whitney U test を用いた。免疫染色発現の比較には Fisher's exact test または chi-square test を用いた。P 値<0.05 を統計的有意とみなした。全ての統計は IBM SPSS 22 を用いた。

結果

1. 検討症例の臨床病理学的特徴

SSA/P内癌の31/37例(83.8%)は右側結腸に発生しており、9/37例(24.3%)がpT1(SM)癌であった。発生部位と深達度をマッチングさせた腺腫内癌との間には、平均年齢で有意差があったが(77.0歳 vs 70.0歳、 $P<0.05$)、性別、平均腫瘍径、癌組織型には有意差はなかった。癌組織型はSSA/P内癌、腺腫内癌ともに全て分化型腺癌(管状腺癌高分化・中分化)であった(表2)。

表 2

2. MLH1 蛋白発現

SSA/P内癌の癌部(SSA/P由来癌)では、粘膜内部、SM浸潤部ともに30/37例(81.1%)でMLH1蛋白の発現は喪失していた(図2)。一方、腺腫内癌の癌部(腺腫由来癌)ではMLH1発現喪失はなく、SSA/P由来癌とは有意差を認めた($P<0.01$)。後述するMSI解析との対比では、SSA/P由来癌におけるMLH1蛋白喪失とMSI-Hとの一致率は97.3%(36/37例)であった。1/37例では、MSI解析ではMSI-Hであったが、MLH1の蛋白発現喪失は認めなかった。

図 2

3. 遺伝子解析

SSA/P由来癌と腺腫由来癌の*BRAF*, *KRAS*, *p53* 遺伝子変異、MSI解析、CIMP解析の結果を表に示す。SSA/P由来癌の5/37例では、癌部が極めて小さく、*BRAF*, *KRAS*, *p53* 遺伝子については十分な精度での解析が得られなかった。

SSA/P由来癌の*BRAF*変異率(78.1%、25/32)、CIMP+頻度(94.6%、35/37)、MSI-H頻度(83.8%、31/37)、は、腺腫由来癌に比べ有意に高かった(全て $P<0.001$)。腺腫由来癌では、*BRAF*変異、MSI-Hはなく、CIMP-Hも2.7%(1/37)にみられたのみであった。一方、SSA/P由来癌の*KRAS*変異率(3.1%、1/32)、*p53*変異率(9.4%、3/32)は腺腫由来癌に比べ有意に低かった($P<0.001$) (表3)。

表 3

SSA/P由来癌32例の遺伝子解析結果を層別化した。SSA/P由来癌は、A群 [*BRAF*+, *KRAS*-, CIMP+, MSI-H, *p53*-]: 56.3%(18/32)、B群 [*BRAF*+, *KRAS*-, CIMP+, MSS, *p53*+ or -]: 15.6%(5/32)、C群 [*BRAF*-, *KRAS*-, CIMP+, MSI-H, *p53*-]: 18.8%(6/32)、その他: 9.3%(3/32)の4群に大別された(図3)。

図 3

考察

近年、大腸癌には、病理組織学および分子生物学的に多様な発生機序があることが明らかにされてきた³⁴⁾。その中で、鋸歯状ポリープを前駆病変とする SNP (serrated neoplasia pathway)は、HP もしくは SSA/P を起点として、*BRAF* 遺伝子変異、CpG island methylation の蓄積 (CpG island methylator phenotype: CIMP)、CIMP によるミスマッチ修復遺伝子 *MLH1* のメチレーション、*MLH1* の機能不全に起因する MSI-H (microsatellite instability-high、マイクロサテライト不安定)、を経て発生・生長すると考えられており⁶⁾¹³⁾、全大腸癌の 20-30% を占めると推定されている³⁵⁾。病理組織学的にも、SSA/P に由来したことが確定できる病変 (SSA/P 内癌) も報告されており¹⁷⁾⁻²⁶⁾、SNP の存在は確実なものと言える。しかし、SSA/P 内癌の報告症例数は意外と少なく 10~20 例程度にとどまっており¹⁷⁾⁻²⁶⁾、SNP で想定されている遺伝子変異の網羅的検索についても行われてはいない。

本研究では、SSA/P に由来したことが確実な SSA/P 内癌 37 例の癌部を対象として、SNP で想定されている主要な遺伝子異常を網羅的に検索したと同時に、SNP とは全く異なる大腸癌の発生機序である adenoma-carcinoma sequence^{14) 15)}に関連していると考えられている *KRAS*, *p53* 遺伝子異常¹⁶⁾ についても検索した。その結果、*BRAF* 変異、CIMP+, MSI-H、*MLH1* 遺伝子の methylation により生ずる *MLH1* 蛋白の発現喪失、の頻度は 78.1% (*BRAF* 変異率)~CIMP+ (94.6%)と高く、いずれも対照とした腺腫由来癌とは有意差があった ($p < 0.001$)。他方、SSA/P 由来癌の *KRAS*, *p53* 変異率は 3.1%、9.4%と低く、腺腫由来癌 (それぞれ 35.1% と 64.9%) とは有意差があった ($P < 0.001$)。SNP は、SSA/P と MSI-H 大腸癌との臨床病理学および分子病理学的特徴の共通性から想定されたものであるが、本研究は SSA/P が SNP の起点となることと、SNP が adenoma-carcinoma sequence とは明らかに異なる大腸癌の発生機序であることを、遺伝子変異の観点からも直接検証したものであると考えられる。

他方、個々の症例の遺伝子解析結果の層別化から、SNP に関連する遺伝子異常には多様性が存在することも明らかとなった。SNP で想定される *BRAF* 変異、CIMP+, MSI-H の全てを認めた SSA/P 由来癌 (図 3 の A 群) は 56.3%に過ぎなかった。SNP では、*BRAF* 変異を持つ SSA/P に CpG island methylation が蓄積され (CIMP+)、その結果 *MLH1* の methylation が引き起こされ MSI-H 癌が発生するとされている^{6) 13)}。しかし、本研究の SSA/P 由来癌の 15.6%では *BRAF* 変異と CIMP+はみられるものの (図 3 の B 群) MSI-H はなかった (MSS: microsatellite instability stable)。また、18.8%では CIMP+, MSI-H であったものの、*BRAF* 変異は認められなかった (図 3 の C 群)。B 群は、SSA/P 由来癌の中で唯一 *p53* 遺伝子異常が存在していたことから、CIMP+であっても MSI-H に移行しないものでは、MSI-H の代わりに *p53* 異常が癌

の発生や生長に関連している可能性が示唆される。また、C群のように *BRAF* 変異陰性の SSA/P 由来癌が存在したことからは、*BRAF* 変異は必ずしも SNP に必須な遺伝子異常ではないことも想定される。*BRAF* 変異と CIMP+との分子生物学的因果関係は未だ不明であり、HP でも *BRAF* 変異が高頻度に出現していること^{36) 37)}を考慮すると、*BRAF* 変異は必ずしも SSA/P の癌化についての initial mutation とは言い切れず、単なる副現象である可能性も示唆される。他方、A群～C群までの多様性の中で、唯一共通した遺伝子異常は CIMP+であった。このことから、SSA/P を起点とする SNP は、CIMP+で特徴付けられる大腸癌の発生経路と考えられる。今後、より多数例の解析によりこのことを裏付ける必要があると同時に、CIMP+の分子生物学的機序を明らかにすることが、SSA/P を起点とする SNP の全容を解明するための課題と考えられた。

結論

SSA/P 由来癌の *BRAF*、*KRAS*、*p53*、CIMP、MSI の遺伝子解析および MLH1 蛋白の免疫組織学的検索結果から、SSA/P が SNP の前駆病変として重要な役割を果たしていることを直接検証した。しかし SSA/P 由来癌の遺伝子解析結果から、SNP に関連する遺伝子異常には多様性があり、MSI-H を介さず *p53* 遺伝子異常で癌化する経路や *BRAF* 変異が関与しない経路があることも推定された。一方で、CIMP+は SSA/P 由来癌にほぼ共通して認められることから、CIMP+が SSA/P を起点とする SNP を特徴付けるものと考えられた。

謝辞

稿を終えるにあたり、ご指導頂きました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器内科学分野 寺井崇二教授、同分子・診断病理学分野 味岡洋一教授に深謝いたします。また、遺伝子解析、標本作製、免疫染色、などで協力いただきました新潟大学医学部臨床病理学分野職員(佐藤彩子、小林和恵、山口尚之)に深謝いたします。

文献

- 1) Morson BC, Dawson IMP, Day DW, Jass JR, Price AB and Williams GT: Morson & Dawson's Gastrointestinal Pathology, 3rd ed, Blackwell Scientific Publication, London, pp563-596, 1990.
- 2) Goldman H, Ming SC and Hickok DF: Nature and significance of hyperplastic polyp of the human colon. Arch Pathol 89: 349-354, 1970.

- 3) Fenoglio CM and Pascal RR: Colorectal adenomas and cancer. Pathologic relationships. *Cancer* 50: 2601-2608, 1982.
- 4) Longacre TA and Fenoglio-Preiser CM: Mixed hyperplastic adenomatous polyp /serrated adenomas. A distinct form of colorectal neoplasia. *Am J Surg Pathol* 14: 524-537, 1990.
- 5) Torlakovic E and Snover DC: Serrated adenomatous polyposis in humans. *Gastroenterology* 110: 748-755, 1996.
- 6) Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND ed. : WHO Classification of Tumours of the Digestive System. International Agency for Research on Cancer: Lyon, 2010.
- 7) Torlakovic E, Skovlund E, Snover DC, Torlakovic G and Nesland JM: Morphologic reappraisal of serrated colorectal polyps. *Am J Surg Pathol* 27: 65-81, 2003.
- 8) Higuchi T, Sugihara K and Jass JR: Demographic and pathological characteristics of serrated polyps of colorectum. *Histopathology* 47: 32-40, 2005.
- 9) Owens SR, Chiosea SI and Kuan S-F: Selective expression of gastric mucin MUC6 in colonic sessile serrated adenoma but not in hyperplastic polyp aids morphological diagnosis of serrated polyps. *Modern Pathol* 21: 660-669, 2008.
- 10) Goldstein, N.S., et al., Hyperplastic-like colon polyps that preceded microsatellite-unstable adenocarcinomas. *Am J Clin Pathol*, 119: 778-796, 2003.
- 11) Higuchi T and Jass JR: My approach to serrated polyps of the colorectum. *J Clin Pathol* 57: 682-686, 2004.
- 12) Kambara T, Simms LA, Whitehall VLJ, Spring KJ, Wynter CV, Walsh MD, Barker MA, Arnold S, McGivern A, Matsubara N, Tanaka N, Higuchi T, Young J, Jass JR and Legett BA: BRAF mutations is associated with DNA methylation in serrated polyps and cancer of the colorectum. *Gut* 53: 1137-1144, 2004.
- 13) O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amoroso M and Farrar FA: Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 30: 1491-1501, 2003.
- 14) Morson BC: Precancerous and early malignant lesions of the large intestine. *Br J Surg* 55: 725-731, 1968.
- 15) Muto T, Bussey HJR and Morson BC: The evolution of cancer of the colon and rectum.

- Cancer 36: 2251-2270, 1975.
- 16) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM and Bos JL: Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 319: 525-532, 1988.
 - 17) Goldstein NS: Small Colonic Microsatellite Unstable Adenocarcinomas and High-Grade Epithelial Dysplasias in Sessile Serrated Adenoma Polypectomy Specimens. *Am J of Clin Pathol*, 125: 132-145, 2006.
 - 18) Sheridan TB, Fenton H, Lewin MR, Burkart AL, Iacobuzio-Donahue CA, Frankel WL and Montgomery E: Sessile serrated adenomas with low- and high-grade dysplasia and early carcinomas: an immunohistochemical study of serrated lesions "caught in the act". *Am J Clin Pathol* 126: 564-671, 2006.
 - 19) Oono Y, Fu K, Nakamura H, Iriguchi Y, Yamamura A, Tomino Y, Oda J, Mizutani M, Takayanagi S, Kishi D, Shinohara T, Yamada K, Matumoto J, Imamura K: Progression of a sessile serrated adenoma to an early invasive cancer within 8 months. *Dig Dis Sci* 54: 906-909, 2009.
 - 20) Lash RH, Genta RM, and Shuler CM: Sessile serrated adenomas: prevalence of dysplasia and carcinoma in 2139 patients. *J Clin Pathol* 63: 681-686, 2010.
 - 21) Fujita K, Yamamoto H, Matsumoto T, Hirahashi M, Gushima M, Kishimoto J, Nishiyama K, Taguchi T, Yao T, Oda Y: Sessile serrated adenoma with early neoplastic progression: a clinicopathologic and molecular study. *Am J Surg Pathol* 35: 295-304, 2011.
 - 22) Patil DT, Shadrach BL, Rybicki LA, Leach BH and Pai RK: Proximal colon cancers and the serrated pathway: a systematic analysis of precursor histology and BRAF mutation status. *Mod Pathol* 25: 1423-1431, 2012.
 - 23) Xu S, Wang L, Yang G, Li L, Wang J, Xu C, Ge C: Clinicopathological observations of colorectal serrated lesions associated with invasive carcinoma and high-grade intraepithelial neoplasm. *Exp Ther Med* 6: 1113-1120, 2013.
 - 24) Ban S, Mitomi H, Horiguchi H, Sato H and Shimizu M: Adenocarcinoma arising in small sessile serrated adenoma/polyp (SSA/P) of the colon: clinicopathological study of eight lesions. *Pathol Int* 64: 123-132, 2014.
 - 25) Nanda KS, Tutticci N, Burgess N, Sonson R, McLeod D and Bourke MJ: Caught in the act: endoscopic characterization of sessile serrated adenomas with dysplasia.

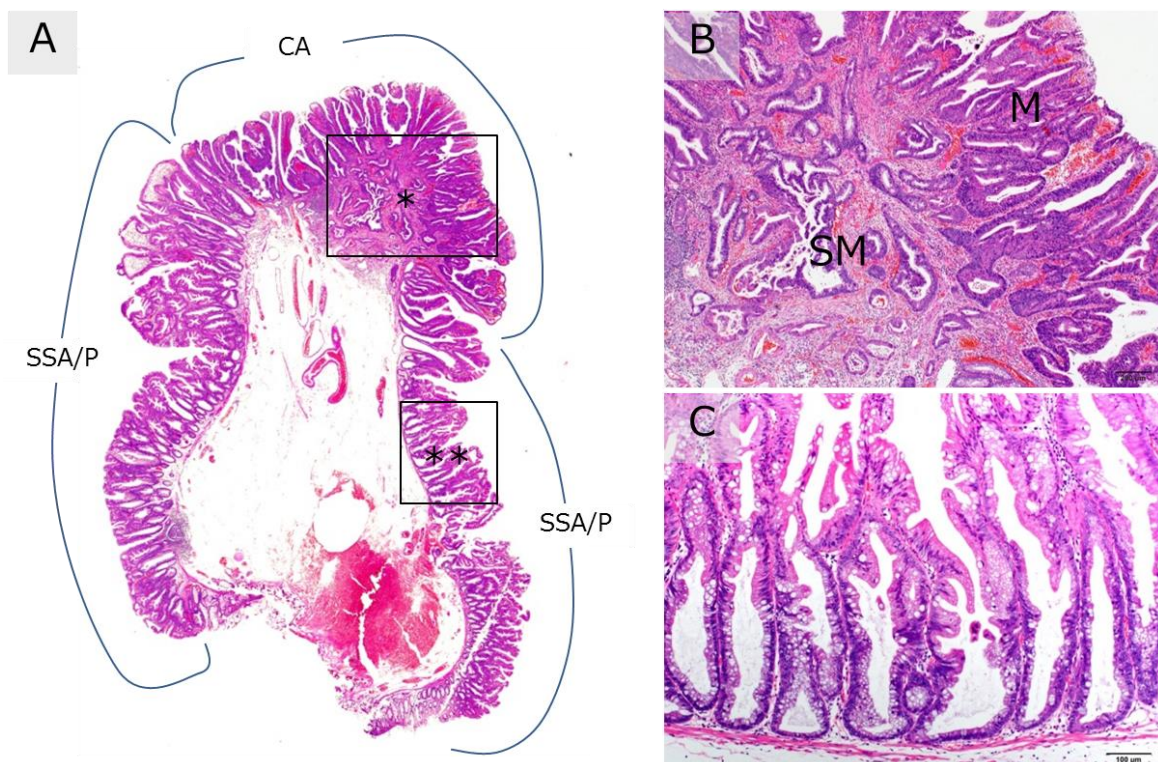
- Gastrointest Endosc 79: 864-870, 2014.
- 26) Wada R, Minamoto T and Inayoshi T: Pathological features of the sessile serrated adenoma/polyp with special references of its carcinogenesis. *Med Mol Morphol* 47: 123-129, 2014.
 - 27) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約、第8版、金原出版、東京、2013.
 - 28) Landau MS, Kuan SF, Chiosea S and Pai RK: BRAF-mutated microsatellite stable colorectal carcinoma: an aggressive adenocarcinoma with reduced CDX2 and increased cytokeratin 7 immunohistochemical expression. *Hum Pathol* 45: 1704-1712, 2014.
 - 29) Yamada S, Ajioka Y, Watanabe H, Hashidate H, Takaku H, Kazama S, Yokoyama J, Nishikura K, Fujiwara T, Asakura H: Heterogeneity of *p53* mutation status in intramucosal carcinoma of the colorectum. *Jpn J Cancer Res* 92: 161-166, 2001.
 - 30) Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN and Srivastava S: A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 58: 5428-5457, 1998.
 - 31) Ogino S, Kawasaki T, Kirkner GJ, Kraft P, Loda M and Fuchs CS: Evaluation of markers for CpG island methylator phenotype (CIMP) in colorectal cancer by a large population-based sample. *J Mol Diagn* 9: 305-314, 2007.
 - 32) Weisenberger DJ, Siegmund KD, Campan M, Young J, Long TI, Faasse MA, Kang GH, Widschwendter M, Weener D, Buchanan D, Koh H, Simms L, Barker M, Leggett B, Levine J, Kim M, French AJ, Thibodeau SN, Jass JR, Haile R and Laird PW: CpG island methylator phenotype underlies sporadic microsatellite instability and is tightly associated with BRAF mutation in colorectal cancer. *Nat Genet* 38: 787-793, 2006.
 - 33) Widschwendter M, Siegmund KD, Muller HM, Fiegl H, Marth C, Muller-Holzner E, Jones PA and Laird PW: Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen. *Cancer Res* 64: 3807-3813, 2004.
 - 34) Jass JR: Classification of colorectal cancer based on correlation of clinical, morphological and molecular features. *Histopathology* 50: 113-130, 2007.
 - 35) Snover, D.C: Update on the serrated pathway to colorectal carcinoma. *Hum Pathol*

42: 1-10, 2011.

- 36) O'Brien MJ, Yang S, Mack C, Xu H, Huang CS, Mulcahy E, Amorosino M and Farraye FA: Comparison of microsatellite instability, CpG island methylation phenotype, BRAF and KRAS status in serrated polyps and traditional adenomas indicates separate pathways to distinct colorectal carcinoma end points. *Am J Surg Pathol* 30: 1491-1501, 2006.
- 37) Kim YH, Kakar S, Cun L, Deng G and Kim YS: Distinct CpG island methylation profiles and BRAF mutation status in serrated and adenomatous colorectal polyps. *Int J Cancer* 123: 2587-2593, 2008.

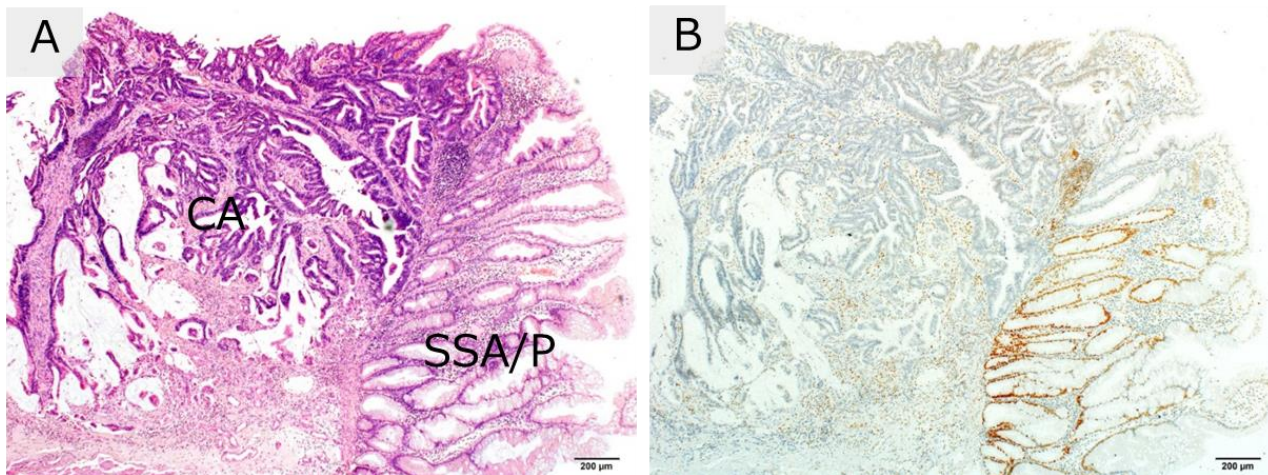
図表

図1 SSA/P 内癌



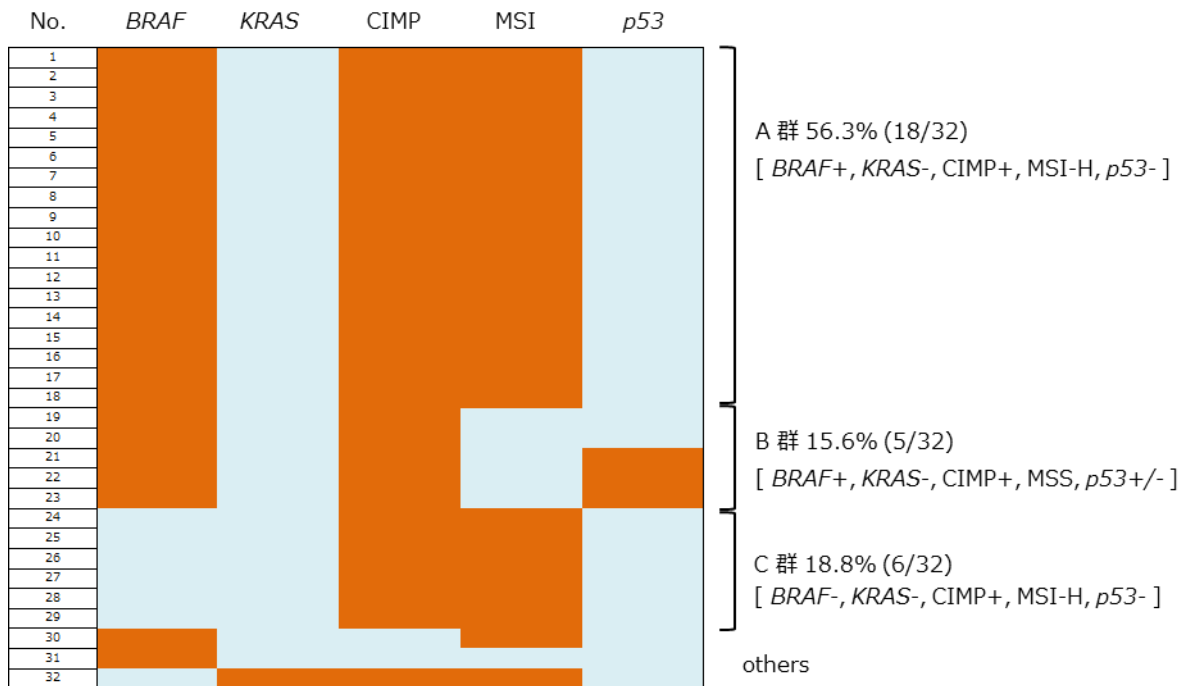
A: pT1 SSA/P 内癌のルーペ像。癌部 (CA)は SSA/P に囲まれて存在する。B: A の*部分。管状腺癌高分化～中分化 (tub1, tub2)が粘膜下層 (SM) に浸潤している。粘膜内癌部 (M) は脱落せずに残存している。C: A の**部分。癌部を取り囲む SSA/P。鋸歯状管腔構造を呈することでは過形成性ポリープに類似するが、分岐や腺管深部の拡張などの構造異常を示す。

図2 SSA/P 内癌の MLH1 免疫染色



A: pT1 SSA/P 内癌。B: A の MLH1 免疫染色。SSA/P 部分は染色陽性（核が茶色に発色）で MLH1 蛋白が発現していることが分かるが、癌部は染色陰性で、蛋白発現は消失している。

図3 SSA/P 由来癌の遺伝子解析結果の層別化



各症例で *BRAF*, *KRAS*, *p53* 遺伝子変異があるもの、CIMP+, MSI-H は赤色で示した。

表 1 PCR プライマーの塩基配列

遺伝子	Exon	Forward primer(5'-3')	Reverse primer (5'-3')	Product size (bp)
<i>p53</i>	5-1	GACTTTCAACTCTGTCTCCTTC	TGACTGCTTGTAGATGGCCA	157
	5-2	CCTGTGCAGCTGTGGGTTGATT	CAGCTGCTCACCATCGCTATCT	147
	6-1	CCAGGCCTCTGATTCTCACTGAT	GCTCATAGGGCACCACCACACTAT	138
	6-2	TCTGGCCCCTCCTCAGCATCTTAT	TCCAGAGACCCCAGTTGCAAA	140
	7-1	TGGCCTCATCTTGGGCTGTGTTA	CCAGTGTGATGATGGTGAGGA	132
	7-2	ACTGTACCACCATCCACTAC	AGTGTGCAGGGTGGCAAG	129
	8-1	ACTGCCTCTTGCTTCTCTTTTC	AGGCTCCCCTTTCTTGCGGAGATT	138
	8-2	ACGGAACAGCTTTGAGGTGCGT	TTGGTCTCCTCCACCGCTTCTT	159
<i>KRAS</i>	2	GCCTGCTGAAAATGACTGAA	AGAATGGTCATGCACCAGTAA	167
<i>BRAF</i>	15	TGTTTTCTTTACTTACTACCTCA	AATCAGTGGAAAAATAGCCTCAA	176

表2 検討症例の臨床病理学的特徴

	SSA/P内癌 (n=37)	腺腫内癌 (n=37)	P値
発生部位：右側大腸 (%)	31 (83.8)	31 (83.8)	-
深達度：pT1 (%)	9 (24.3%)	9 (24.3%)	
年齢：平均 (範囲)	77.0 (40-87)	70.0 (45-86)	<0.05
性別：男性 (%)	15 (40.5%)	24 (64.9%)	n.s.
腫瘍径 (mm)：平均 (範囲)	13.3 (3-30)	16.5 (4-60)	n.s.
癌の組織型	全例 tub1 / tub2	全例 tub1 / tub2	n.s.

pT1: SM浸潤癌, tub1: 管状腺癌高分化、tub2: 管状腺癌中分化、n.s. : 有意差なし

表 3 SSA/P 由来癌と腺腫由来癌の遺伝子解析結果

遺伝子解析項目	SSA/P由来癌	腺腫由来癌	P値
<i>BRAF</i> 変異 (%)	25/32 (78.1%)	0/37 (0%)	<0.001
<i>KRAS</i> 変異 (%)	1/32 (3.1%)	13/37 (35.1%)	<0.001
<i>p53</i> 変異 (%)	3/32 (9.4%)	24/37 (64.9%)	<0.001
CIMP+ (%)	35/37 (94.6%)	1/37 (2.7%)	<0.001
MSI-H (%)	31/37 (83.8%)	0/37 (0%)	<0.001

CIMP: CpG island methylator phenotype, MSI-H: microsatellite instability-high