

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) 大腸癌研究会(編):大腸癌治療ガイドライン医師用  
2009年版, 金原出版, 東京, 2009
- 2) Dozois EJ, Privitera A, Holubar SD et al : High  
sacrectomy for locally recurrent rectal cancer ;  
can long-term survival be achieved? J Surg Oncol  
103 : 105-109, 2011
- 3) Moriya Y, Akasu T, Fujita S et al : Total pelvic  
excenteration with distal sacrectomy for fixed  
reccurent rectal cancer in the pelvis. Dis Colon  
Rectum 47 : 2047-2053, 2004
- 4) Kanemitsu Y, Hirai T, Komori K et al : Prediction  
of residual disease or distant metastasis after  
resection of locally recurrent rectal cancer. Dis  
Colon Rectum 53 : 779-789, 2010
- 5) Larsen SG, Wiig JN, Giercksky KE : Hydrone-  
phrosis as a prognostic factor in pelvic recurrence  
from rectal and colon carcinomas. Am J Surg  
190 : 55-60, 2005
- 6) Henry LR, Sigurdson E, Ross E et al : Hydrone-  
phrosis does not preclude curative resection of  
pelvic recurrences after colorectal surgery. Ann  
Surg Oncol 12 : 786-792, 2005

\*

\*

\*

## 臨床経験

# 超高齢者(85歳以上)大腸癌手術例における術後合併症に関する危険因子の検討\*

日高英二 石田文生 遠藤俊吾 田中淳一 工藤進英\*\*

### はじめに

日本人の平均寿命は、今や男性79.64歳、女性86.39歳<sup>1)</sup>と延長してきている。さらに大腸癌罹患率が上昇していることもあり<sup>2)</sup>、近年超高齢者(85歳以上)の大腸癌手術例もまれではなくなってきた。高齢者は若年者と比較して併存疾患が多く、機能的予備能が低下しており、周術期の合併症率が高いと報告されている<sup>3)</sup>。術後合併症発生の危険因子の同定は非常に重要であるにもかかわらず、特に超高齢者(85歳以上)大腸癌の術後合併症の危険因子に関する報告は少ない<sup>4)</sup>。そこで、超高齢者大腸癌手術の術後合併症の危険因子を明らかにすることを目的とし、当センターでの超高齢者の大腸癌手術例において、術後合併症の発生状況とその要因について検討した。

### I. 対象および方法

2001年4月(当院開院時)～2011年9月に当センターで大腸癌手術を受けた超高齢者71例を対象とした。術後合併症なし群(Group A:39例)と術後合併症あり群(Group B:32例)の2群に分け臨床病理学的因子、手術関連因子について比較・検討した。また栄養評価として小野寺式栄養指数(PNI)<sup>5)</sup>[表1]、手術リスク評価法として

表1. PNI

$$\text{PNI} = 10 \times \text{ALB} + 0.005 \times \text{TLC}$$

ALB: 血清アルブミン値 (g/dl)  
TLC: 末梢血総リンパ球数 (/ml)

estimation of physiologic ability and surgical stress (E-PASS)<sup>6)</sup>[表2]を用いて両群間での比較・検討を行った。

統計学的解析はStudent *t*検定、 $\chi^2$ 検定、Fisher直接検定を行い、多変量解析はロジスティック回帰分析を用いた。 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。統計解析ソフトはStatMate IV(ATMS社)を使用した。

### II. 結果

#### 1. 患者背景

男女比は29:42で女性が多く、平均年齢は87.6歳であった。超高齢者でも22.5%は県外から治療を受けにきており、術前 performance status (PS) は0～1が94.4%と大半を占めた。71.8%の症例に併存疾患を認め、腫瘍占居部位は右側結腸に多い傾向であった。術後合併症は全体で32例(45.1%)に発生した(表3)。

キーワード: 超高齢者, 大腸癌, 合併症

\* Causes of postoperative complication after resection for colorectal cancer in elderly patients

\*\* E. Hidaka (講師), F. Ishida (准教授), S. Endo (准教授), J. Tanaka (教授), S. Kudo (教授/センター長): 昭和大学横浜市北部病院消化器センター。

表2. E-PASS

1. 術前リスクスコア (PRS) =  $-0.0686 + 0.00345x_1 + 0.323x_2 + 0.205x_3 + 0.153x_4 + 0.148x_5 + 0.0666x_6$   
 $x_1$ : 年齢,  $x_2$ : 重症心疾患あり (1)・なし (0),  $x_3$ : 重症肺疾患あり (1)・なし (0),  $x_4$ : 糖尿病あり (1)・なし (0),  $x_5$ : performance status (PS) [0~4],  $x_6$ : 麻酔リスク (1~5)  
 重症心疾患の定義: New York Heart Association (NYHA) 分類3以上の心不全, または mechanical supportsを要するような重篤な不整脈  
 重症肺疾患の定義: % VC < 60%あるいは FEV<sub>1.0%</sub> < 50%のいかなる状態  
 糖尿病の定義: WHOの診断基準に基づく (空腹時血糖 140 mg/dl以上または 75g OGTT 2時間値 200 mg/dl以上)  
 PS: 日本癌治療学会固形がん化学療法直接効果判定基準に基づく  
 麻酔リスク: 米国麻酔学会重症度分類に基づく
2. 手術侵襲スコア (SSS) =  $-0.342 + 0.0139x_1 + 0.0392x_2 + 0.352x_3$   
 $x_1$ : 体重あたりの出血量 (g/kg),  $x_2$ : 手術時間 (時),  $x_3$ : 手術切開創の範囲 (0~2)  
 手術切開創の範囲  
 0: 胸腔鏡創または腹腔鏡創のみ (いわゆる補助手術も含む, 最大の創が10 cm以下)  
 1: 開胸あるいは開腹のいずれか一方のみ  
 2: 開胸および開腹
3. 総合リスクスコア (CRS) =  $-0.328 + 0.936 (PRS) + 0.976 (SSS)$

表3. 患者背景 (n = 71)

男/女	29/42
平均年齢(歳)	87.6 (85 ~ 97)
居住地	
県内	55 (77.5 %)
県外	16 (22.5 %)
PS	
0/1/2/3	37/30/3/1
併存疾患あり	51 (71.8 %)
腫瘍占居部位	
右側結腸	39 (55.0 %)
左側結腸	21 (29.5 %)
直腸	11 (15.5 %)
開腹/腹腔鏡	37/34
病期	
I / II / III / IV	17/32/17/5
合併症	32 (45.1 %)

2. 合併症の内訳

合併症の内訳は, surgical site infection (SSI) が11例ともっとも多く, せん妄8例, 縫合不全5例 (2例再手術), イレウス (麻痺性も含む) 5例 (1例に癒着剝離術施行), 肺炎1例, その他2例であった (表4). SSIと術後せん妄で合併症の59.3%を占めていた.

表4. 合併症 (n = 32)

SSI	11
せん妄	8
縫合不全 (腹腔内膿瘍も含む)	5
イレウス	5
肺炎	1
その他	2

3. 臨床病理学的因子, 手術関連因子の解析

臨床病理学的因子においては, Group B群において男性が有意に多く ( $p < 0.001$ ), また手術関連因子においては, Group B群では平均手術時間が長く ( $p < 0.001$ ), 平均出血量が多かった ( $p < 0.05$ ) [表5].

4. 栄養指数および E-PASS

PNIは, 両群間において差は認めなかった. E-PASSにおいては, Group B群で手術侵襲スコア (SSS) および総合リスクスコア (CRS) が有意に高かった ( $p < 0.05$ ) [表6].

5. 合併症の危険因子 (多変量解析)

単変量解析で有意差があった性別, 手術時間, 出血量, SSS, CRSを多変量解析すると, 性別 (男性) のみが合併症の独立した危険因子として残った (表7).

表5. 臨床病理学的・手術関連因子

	Group A (n = 39)	Group B (n = 32)	p 値
男：女	7：32	22：10	<0.001
平均年齢(歳)	87.5	87.8	NS
併存疾患あり	26 (66.7%)	25 (78.1%)	NS
腫瘍占居部位			
右：左：直腸	22：12：5	18：9：5	NS
病期			
I：II：III：IV	6：19：12：2	11：12：6：3	NS
術後在院日数(中央値)	12	23	<0.001
開腹：腹腔鏡	20：19	17：15	NS
定期：緊急	37：2	26：6	NS
平均手術時間(分)	153.2	211.2	<0.001
平均出血量(ml)	121.5	347.2	<0.05
リンパ節郭清			
D0/D1/D2/D3	1/1/22/15	0/4/20/8	NS

NS：有意差なし

表6. 栄養指数・E-PASS

	Group A (n = 37)	Group B (n = 29)	p 値
PNI	42.4	40.6	NS
E-PASS			
PRS	0.45	0.497	NS
SSS	-0.016	0.09	<0.05
CRS	0.09	0.22	<0.05

NS：有意差なし

表7. 術後合併症に影響する因子(多変量解析)

	オッズ比	95% CI 下限	95% CI 上限	p 値
性別(男性)	15.2	2.52	31.8	0.0007
手術時間	1.01	0.99	1.01	0.15
出血量	1.00	0.99	1.00	0.90
SSS	15.2	0.07	3407	0.32
CRS	0.25	0.006	9.94	0.46

### Ⅲ. 考 察

超高齢者の定義には明らかなものはないが、平均寿命などを考慮すると85歳以上が妥当であると考え、今回は85歳以上を超高齢者と定義し、超高齢者大腸癌について検討した。

超高齢者では術前PSの個人差が大きくなるた

め、どのような超高齢者集団での検討結果であるかが重要になってくる。当院は2001年に新興住宅街に建てられた都市型病院で、地域住民の平均年齢は38.3歳で、高齢者(65歳以上)人口率が12.1%と非常に若い住民が多い地域である。一方で住民の平均寿命は男女とも高く、高齢者は少ないが、その高齢者は元気で長生きしているとい

う地区である<sup>7)</sup>。また、都市型病院の特徴で、親が病気になったときに子供が住んでいる都市部の病院で治療を受けさせる傾向があり、当院でも85歳以上の超高齢者にもかかわらず、22.5%の症例が県外から来院して治療を受けている。このような背景があるため、当院で治療を受けている超高齢者の術前PSはほかの報告例と比較してきわめてよい状況である。今回はこのような母集団での検討結果であり、今までに報告されてきている論文<sup>4,8-12)</sup>の母集団とはやや状況が異なっていると思われた。

合併症に関しては、SSIや術後せん妄が多数を占め、高齢者大腸癌手術の術後合併症として報告されているものと同じであった<sup>4,8-11)</sup>。重篤な合併症は少ないものの、Group Bで在院期間が有意に延長しているため、これらの合併症が在院期間の延長の要因となっていると考えられた。

本検討では、超高齢者の術後合併症に関して男性、手術時間、出血量、E-PASSでのSSS・CRSが危険因子であった。病期やリンパ節郭清範囲は両群間に差がないことより、腹腔内の癒着などが手術時間の延長および出血量の増大に関与している可能性があると思われた。手術時間、出血量に差が出ることにより、それらを数値化したE-PASSにおけるSSS、CRSも差が出たと思われた。稲垣らは、高齢者大腸癌手術例に対するリスク評価法としてE-PASSが有用であり、CRS 0.5以上が術後合併症の発生に関する独立した因子であると報告している<sup>9)</sup>。稲垣らの検討では、腹腔鏡手術例が81例中2例のみで、ほとんどの症例は開腹手術例であった。SSSの算出法は腹腔鏡手術の侵襲度を低く設定しているため、腹腔鏡手術が半数を占めている当センターの検討では、SSSが必然的に低い値となっている。その結果CRSの値も低い傾向となるため、CRSはGroup Bのほうが有意に高いものの、Group BにおけるCRSの平均値は0.22であり、報告例の0.5よりも低い値となった。また猪狩らは、高齢者の消化器外科手術の術後合併症の危険因子はGlasgow coma score、白血球数、術中輸血例であると報告している<sup>9)</sup>。本検討でも単変量解析で出血量は危険因子の一つとなっており、報告例の術中輸血とも関連していると考えられる。

また木村らは、超高齢者大腸癌の術後合併症危

険因子は、多変量解析では術前の中枢・精神障害であると報告している<sup>9)</sup>。本検討では術前の中枢・精神障害を評価していないため、どの程度関与しているかははっきりしないが、術後合併症にせん妄が多いことを考えると、術後合併症回避のために、超高齢者では術前から精神状態を安定させるような術前管理が必要であると思われた。

高齢者の術後合併症の多数を占める術後せん妄に関して、侵襲の大きな手術、麻酔時間、手術時間、輸液量、出血量、輸血量、低血圧発生とその持続時間が危険因子であると報告されているが<sup>13)</sup>、本検討でも手術時間や出血量はせん妄などの合併症発生の危険因子の一つであり、手術侵襲の大きさが術後せん妄に影響している可能性もあると思われた。

本検討では、超高齢者大腸癌の術後合併症において、男性が独立した危険因子という結果であった。性別が高齢者の消化器癌術後合併症の危険因子であると報告しているものはない。胸部外科領域においては、超高齢者の肺切除後の合併症では男性が多く、さらに肺葉切除後の5年生存率で男性がわるいため、超高齢者の男性に対する肺葉切除の適応は厳格にすべきと報告している<sup>14)</sup>。またMcArdleらは、大腸癌3,200例の累積5年生存率では女性が有意に高かったと報告している<sup>15)</sup>。PSがよい超高齢者大腸癌例に対して、腹腔鏡手術のような低侵襲治療が行われている場合は、男性が術後合併症の独立した危険因子である可能性が示唆された。

超高齢者の大腸癌手術においては、手術をできるだけ短時間でを行い、さらに出血量をできるだけ抑えるように、正しい剝離層での剝離や適切なエネルギーデバイスの使用を心がけて手術を行うことが、術後合併症回避に必要であると思われた。また、男性の超高齢者においては合併症発生率が非常に高く、それを念頭においた術前からの慎重な管理が必要と考えられた。

#### おわりに

超高齢者大腸癌手術における術後合併症の危険因子を検討し、男性が独立した危険因子であった。超高齢者男性の大腸癌手術例では、特に嚴重に術前・術後管理を行うべきであろう。

◆ ◆ ◆ 文 献 ◆ ◆ ◆

- 1) 厚生労働省. <<http://www.mhlw.go.jp/toukei/saikin/hw/life/life10/01.html>> [Accessed November 15 2011]
- 2) 国立がん研究センターがん対策情報センターがん情報サービス. <<http://ganjoho.jp/professional/index.html>> [Accessed November 15 2011]
- 3) McNicol L, Story DA, Lesile K et al: Postoperative complications and mortality in older patients having non-cardiac surgery at three Melbourne teaching hospitals. *Med J Aust* 186: 447-452, 2007
- 4) 木村臣一, 岩垣博己, 松原長秀ほか: 多変量統計解析を用いた超高齢者(85歳以上)大腸癌患者の合併症危険因子と予後因子の検討. *日消外会誌* 34: 560-565, 2001
- 5) 小野寺時夫, 五関謙秀, 神前五郎ほか: Stage IV・V (Vは大腸癌) 消化器癌の非治癒切除・姑息手術に対する TPN 適応と限界. *日外会誌* 85: 1001-1005, 1984
- 6) Haga Y, Ikei S, Ogawa M: Estimation of physiologic ability and surgical stress (E-PASS) as a new prediction scoring system for postoperative morbidity and mortality following elective gastrointestinal surgery. *Surg Today* 29: 219-225, 1999
- 7) 横浜市統計ポータルサイト. <<http://www.city.yokohama.lg.jp/ex/stat/>> [Accessed November 15 2011]
- 8) 稲垣大輔, 長谷川慎一, 吉田達也ほか: 高齢者大腸癌に対する手術リスク評価法 estimation of physiologic ability and surgical stress の有用性. *日消外会誌* 43: 141-147, 2010
- 9) 猪狩公宏, 藍原有弘, 落合高德ほか: 80歳以上の高齢者に対する消化器外科手術のリスク評価. *臨外* 66: 651-657, 2011
- 10) 平田貴文, 久米修一, 久保田竜生: 高齢者大腸癌における手術症例の臨床的検討. *臨外* 66: 365-369, 2011
- 11) 河島秀昭, 檉山基矢, 石後岡正弘ほか: 85歳以上の大腸癌手術症例の検討. *北海道外科誌* 55: 28-31, 2010
- 12) 磯部秀樹, 高須直樹, 水谷正臣ほか: 80歳以上高齢者大腸癌の治療. *日老医誌* 44: 599-605, 2007
- 13) 越後谷雄一, 加藤浩克: 高齢者外科開腹手術患者の術後譫妄の要因. *麻酔* 56: 932-936, 2007
- 14) 富樫賢一, 小池輝元: 80歳以上の超高齢者肺癌に対する外科治療—特に性差による予後の差. *胸部外科* 61: 347-351, 2008
- 15) Mc Ardle CS, McMillan DC, Hole DJ: Male gender adversely affects survival following surgery for colorectal cancer. *Br J Surg* 90: 711-715, 2003

\*

\*

\*

## 直腸癌に対するロボット手術

勝野 秀稔\* 前田耕太郎\* 花井 恒一\* 本多 克行\*

## はじめに

当院では、2008年12月に4本のアームを兼ね備えた da Vinci S Surgical System<sup>®</sup>を導入し、上部消化管手術や前立腺手術を中心にこれまで323例のロボット手術を行ってきた。全世界では約2,000台のロボットが稼働しており、累計78万例の手術（2010年は27万例）が施行されている。2009年11月の薬事承認以来、本邦においても急速に導入が進み、2011年12月末の時点で、全国34施設に da Vinci S Surgical System<sup>®</sup>が納品されている。近年、消化器外科領域においては直腸癌手術を中心にロボット手術の症例数が増え、韓国などからの報告が散見される<sup>1)</sup>。従来の腹腔鏡手術では、比較的困難であった低位の骨盤操作が3次元の高解像度画像や7自由度の関節可動域などロボット手術のメリットを生かして今後本邦においても普及することが予見される。本稿では、これまで教室で行ってきた32例の大腸手術の経験を踏まえ、直腸癌に対する術式について、ロボット手術特有の注意点などを中心に紹介する。

\* Hidetoshi KATSUNO et al. 藤田保健衛生大学下部消化管外科

## key words

直腸癌, ロボット手術, da Vinci Surgical System

I. da Vinci Surgical System<sup>®</sup>について

術者が3次元映像の元に手術操作を行う「surgeon console」、鉗子や電気メスなどの手術器具が装着される4本アームの「patient cart」、助手用のモニターなど各種機器が装備される「vision cart」から構成される（図1）。その特徴や歴史的背景に関しては、他稿を参照されたい<sup>2)3)</sup>。

## II. ロボット手術導入に際して

da Vinci S Surgical System<sup>®</sup>が急速に導入される現状を鑑み、日本内視鏡外科学会はロボット手術を安全に普及させるために、その導入に際し、原則として諸条件を満たすことが望ましいと提言している（表1）。教室での導入時は、薬事未承認であったため、手術見学とトレーニングコースの受講を海外で行い、certificateを取得した。現状では、手術見学に関しては、ひきつづき韓国などの海外施設で行う必要があるが、トレーニングコースは国内で受講可能となっている。また、当院では導入時に、本手術に関して大学の倫理委員会における承認を得ており、患者に対しても海外での報告内容を中心に利点と欠点、合併症などについて十分に説明して、同意のもとに手術を行っている。

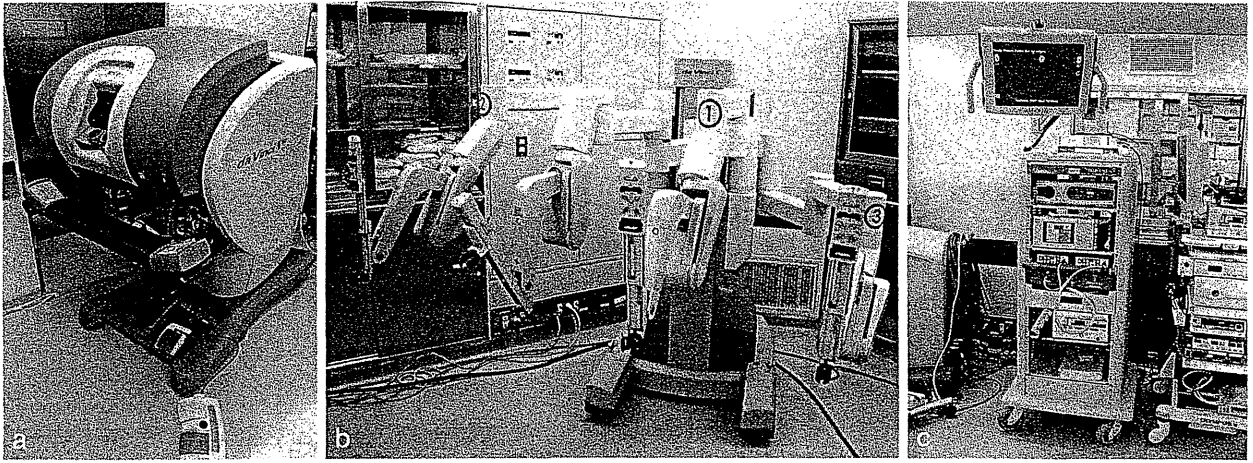


図1 da Vinci S Surgical System®

- a) Surgeon console.
- b) Patient cart.
- c) Vision cart.

表1 日本内視鏡外科学会の内視鏡手術支援ロボット手術導入に関する提言(案)

- 1) 術者と助手は、da Vinci Surgical System 製造販売業者および販売会社主導のトレーニングコースを受講し、内視鏡手術支援ロボット使用に関する certification を取得していること。
- 2) 術者は予定手術の関連専門学会が定める専門医(消化器外科学会専門医)を取得していること。
- 3) 術者は日本内視鏡外科学会が統括する技術認定取得医(消化器一般外科領域)であること。
- 4) 第1例目施行以前に、術者・助手・手術室看護師を含めた医療チームとして、十分な手術の臨床見学を行うこと。
- 5) ロボット手術導入において、当初は同手術の経験豊富な指導者を招聘し、その指導下に行うこと。
- 6) 本手術は臨床研究段階であり、実施に当たっては患者および関係者にその利点と起こり得る偶発症・合併症について具体的に説明し、十分な理解の上で同意を得ること。
- 7) 上記1)~6)の条件を満たした上で、各診療科依存型ではなく、各施設全体としての独自の導入ガイドラインを作成し、各施設の倫理委員会(あるいは臨床研究審査委員会)の承認を得て、安全な導入に努めること。

### III. 手術術式

#### 1. 術式の選択

これまでの海外の報告から直腸癌のロボット手術は totally robotic technique と hybrid technique に大別される。前者は内側アプローチによる中枢方向の郭清、血管処理および S 状結腸の授動を行う腹部操作と直腸を全周性に剝離し

て切離するまでの骨盤操作を da Vinci Surgical System® を使用したロボット手術で完遂する術式である。これに対して後者の hybrid technique とは、前半の腹部操作を従来の腹腔鏡手術で行い、後半の骨盤操作をロボット手術で行う方法である。hybrid technique は、全手術時間を短縮し、直腸の剝離に主眼をおいた術式であり、脾彎曲部の授動を高頻度に行う欧米の手術においては利点があると考えられる。教室では、3次元映像、鉗子の多関節機能や手ぶれ補正機能などのロボット手術の利点を腰内臓神経の剝離や血管処理などの腹部操作に対しても有益と考えており、totally robotic technique を採用している。しかしながら、totally robotic technique は広範囲の術野での操作をロボットアームの干渉を防いで、円滑に手術を遂行させなければならないため、ある程度熟練を要する。とくにポート位置を適切に決定しないと鉗子の可動域に制限が生じ、手術が中断されて、術者はかなりのストレスを感じるようになる。

#### 2. 体位および前処置

まず、手術室のレイアウトを図2に示す。点滴ルートやモニター装着の観点から、患者の左上肢は約90度外転させ、マジックベッドにより体幹を固定し、両下肢はレビテーター™で支持して水平大腿開脚位をとっている。



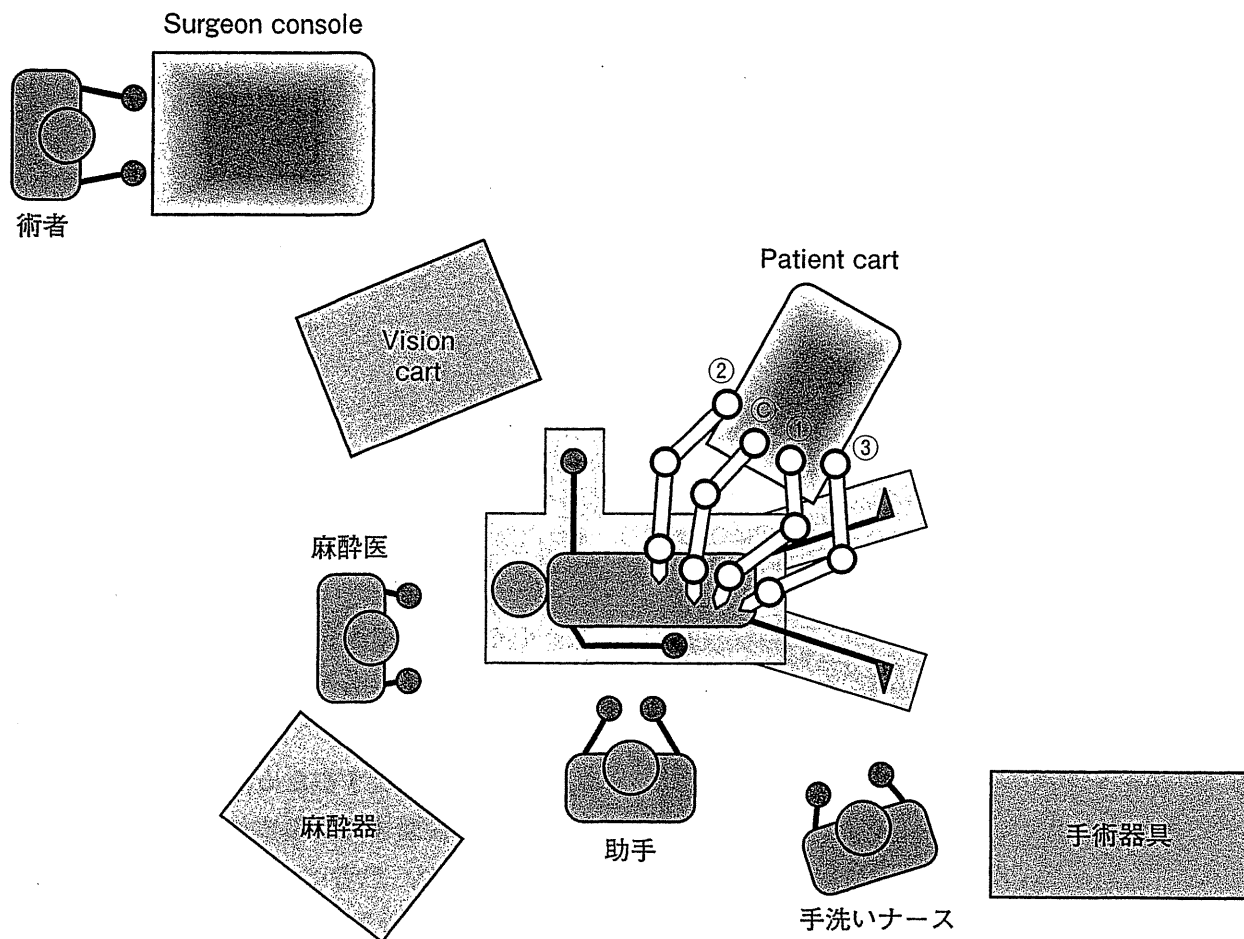


図2 手術室レイアウト

### 3. ポート位置の設定と術野の展開

中枢のリンパ節郭清からS状結腸授動までの腹部操作と直腸を剝離して会陰操作に移行するまでの骨盤操作に分けてポート位置を設定している(図3)。各ポート間の距離は、ロボットアームの干渉を防ぐために10 cm以上確保するように推奨されているが、体型によりその距離が確保できない場合は8 cm程度で施行している。術前にポート挿入部位を体表にマーキングしているが、気腹後に腹壁が伸展し予想よりもポート間距離を確保できることがある。また、恥骨上部のポート留置の際は、膀胱損傷に注意する必要がある。そのため教室では、23 Gのカテラン針でマーキング部位を試験穿刺して腹腔内から刺入部を確認して微調整を行ったのちに、実際のポートを留置している。

ポート挿入後に左側高位の Trendelenberg 体位をとり、腹腔鏡下に腸鉗子で小腸を右頭側へ圧排して術野を展開する。

### 4. ロボットの docking と鉗子の選択

Patient cartを患者の左尾側より docking し(図2)、ロボットアームには EndoWrist<sup>®</sup> 製の手術器具を装着する。教室では、1st arm に monopolar curved scissors, 2nd arm に maryland bipolar forceps を装着しており、主に術者の右手と左手の操作に使用している。3rd arm には fenestrated bipolar forceps を装着し、術野の展開、剝離操作でのカウンタートラクションや出血時の止血操作などに使用する。教室では3rd arm を右手側に持ってきている(図2)ため、術中はクラッチペダルを踏んで、1st arm と3rd arm の操作を切り替えているが、韓国の SH Kim<sup>4)</sup> のように、左手側に持ってきて2nd arm と3rd arm を使用することも可能である。右手側に3rd arm を持ってくると、両手で把持鉗子を使用でき、出血などの偶発症に対して確実に対処できる。

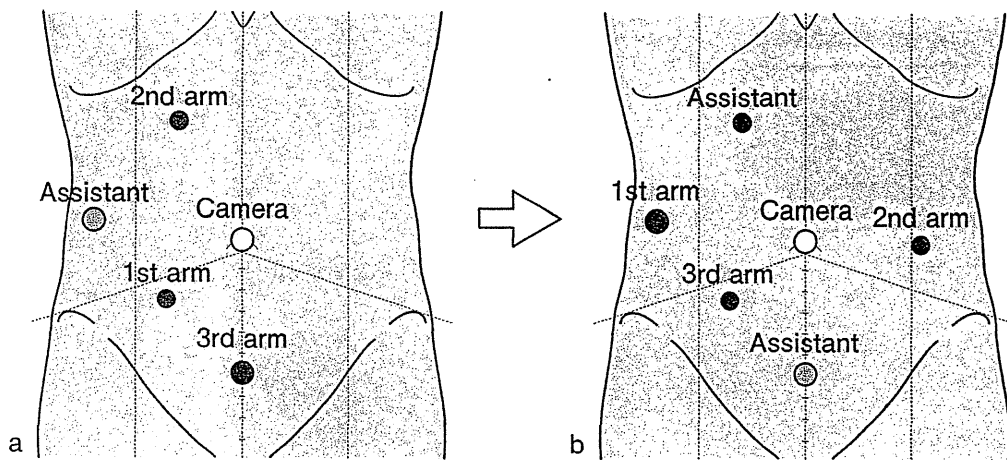


図3 ポート位置

- a) 腹部操作
- b) 骨盤操作

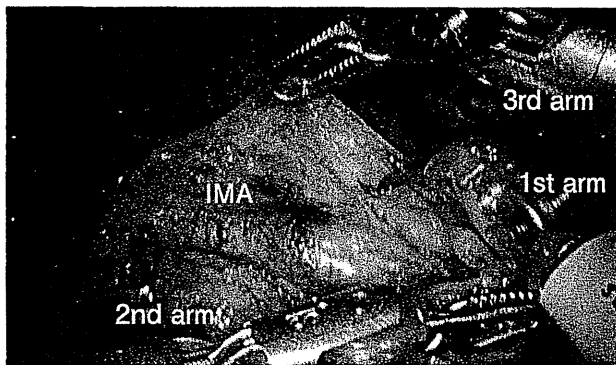


図4 下腸間膜動脈根部のリンパ節郭清

## 5. 腹部操作

肝臓や腹腔内を十分に観察したのち、腹腔鏡手術と同様に内側アプローチで操作を開始する。まず、3rd armで腸間膜を腹壁側へ挙上し、助手が尾側の直腸間膜を把持して切開部位を面として展開する。左右の腰内臓神経の分枝が下腸間膜動脈の根部付近で奥行き感をもって良好に観察できるため、これを温存し、尿管および性腺血管を背側に落として剝離操作を外側へと進める。下腸間膜動脈根部のリンパ節を郭清し、血管処理を行う(図4)。EndoWrist<sup>®</sup>製の血管クリップは薬事未承認のため、腹腔鏡手術用の血管クリップを助手が装填している。通常は下腸間膜静脈と左結腸動脈の処理まで施行するが、内括約筋切開術(ISR)の際は、最終的に会陰操作で直腸を切離して肛門より切除標本を摘出するため、S状結腸動脈の切離(mesenteric work)を追加しておく。ついで、外側からS状結腸を授動し、岬角

よりやや尾側まで直腸の剝離操作を行う。

## 6. 骨盤操作

骨盤操作へ移行するためにロボットアームを各ポートから脱着する。基本的に patient cart は移動させないが、患者ベッドを反時計方向に10~15°回転させ、骨盤操作用のポートへ再装着する(図3)。これにより、各ポートとロボットアームが自然体に接続され、そののちの操作でアーム同士の干渉頻度が少なくなる。骨盤操作では、背側から順に直腸を剝離していくが、口側腸管に綿テープなどをかけて助手がそれを頭側に牽引する。この操作によって術野に助手の鉗子が登場することなく、術者が3本の手を使用して骨盤操作が可能となる。3rd armには、double fenestrated bipolar forceps もしくは cadiere forceps を装着して視野展開をしている。直腸固有筋膜と下腹神経前筋膜の端々の層を尾側に向けて剝離していく(図5)。途中で1st armと3rd armが交差する場合や、鉗子の可動域が制限される場合は、それぞれの鉗子を付け替えることにより、改善される。これまで教室ではRbの直腸癌は側方郭清の不要なT1症例を適応にしており、直腸前壁側の操作においては、Denonviller筋膜と直腸固有筋膜の間を意識して剝離操作を行っている(図6)。直腸前側壁の剝離では、適切なカウンタートラックションによりneuro-vascular bundle(NVB)がtentingされていることが立体視される。これ

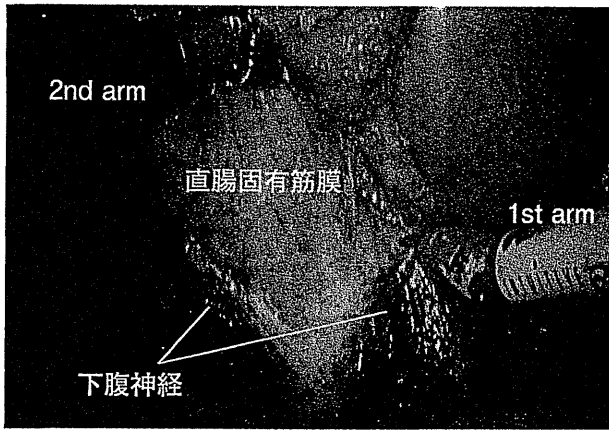


図5 直腸後壁の剥離

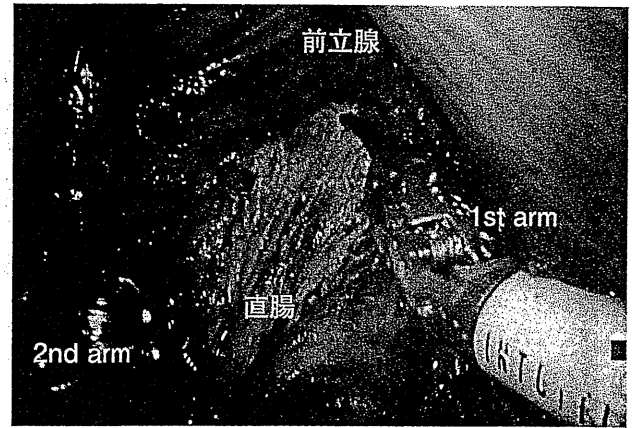


図6 直腸前壁の剥離

により、正しい層で剥離操作が行え、神経損傷や出血を予防できる (図7)。

腫瘍の局在により、total mesorectal excision (TME) もしくは、tumor-specific mesorectal excision (TSME) を行い、直腸の切離線を決定する。直腸間膜を切離する際も鉗子の多関節機能により、従来の腹腔鏡手術に比して、円滑で確実な操作が可能となった。

## 7. 吻合

直腸の剥離と間膜の処理が完了したら、開腹手術と同様に浮遊癌細胞の implantation を予防する目的で、肛門より2Lの蒸留水で腸管洗浄を行っている。Patient cartが患者の股間に位置していないため、腸管洗浄の際や、直腸診と術中内視鏡による腫瘍存在部位の確認が必要な場合も問題なく施行できる。

### a) Double stapling technique (DST)

DSTで吻合可能な症例はリニアステイプラーで直腸を切離し、最終的な剥離面の確認を3次元映像下に行い、ロボット操作を終了する。臍部の創を3~4cmに延長してwound retractorを装着、直腸を創外へ挙上する。標本摘出後、アンビルを装着して腹腔内へ戻し、通常の腹腔鏡手術と同様の手技で吻合操作を行う。

### b) Internal sphincteric resection (ISR)

ISRの場合は、洗浄後にpatient cartをundockさせて会陰操作に移る。ローンスターレトラクターを固定して、ロングオクトパスにE式開肛器を装着する<sup>5)</sup>。歯状線にフックをかけて

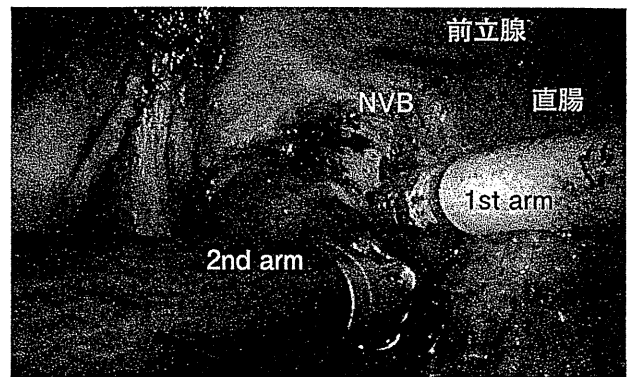


図7 直腸左前側壁の剥離

視野を展開して腫瘍下縁から十分な distal margin を確保して直腸の切離を開始する。巾着縫合で断端を閉鎖して、E式開肛器を広げさらに良好な視野を確保する。ロボット手術では、腹側からの剥離が十分なため、会陰操作での剥離をほとんど必要としない利点がある。一方で、断端の閉鎖を早い段階で適切に行わないと腸管内容により術野が汚染されるため注意が必要である。肛門側の切離が終わると、肛門から標本を引き出して (図8a)、リニアステイプラーで口側腸管を切離して摘出する。腹側から生理食塩水3Lで骨盤内を十分に洗浄後、Gambie縫合もしくは1層の全層縫合で経肛門的に吻合操作を行う (図8b)。そして、減圧のためにペンローズドレーンを肛門より留置する。いずれの術式においても左下腹部よりドレーンを仙骨前面に留置し、肛門縁から吻合部までの距離によって、適宜 diverting stoma を造設している。

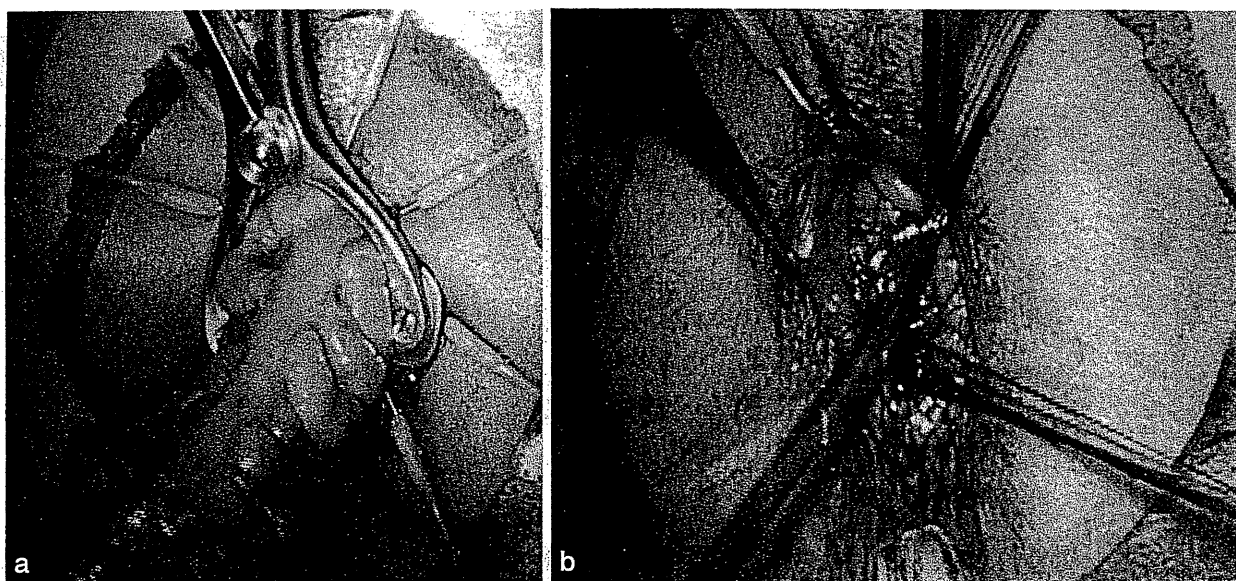


図8 ISRの会陰操作

- a) 肛門からの標本摘出。  
b) 手縫いによる吻合。

#### 文献

- 1) Kwak JM et al : Robotic vs laparoscopic resection of rectal cancer : short-term outcomes of a case-control study. Dis Colon Rectum 54 : 151-156, 2011
- 2) 勝野秀稔ほか : 大腸癌に対するロボット手術導入. 日消外会誌 43 : 1002-1006, 2010
- 3) 勝野秀稔ほか : Lower G.I./Colon and Rectum Cancer 大腸癌 大腸癌に対するロボット手術. 癌と化療 38 : 1790-1792, 2011
- 4) Choi DJ et al : Single-stage totally robotic dissection for rectal cancer surgery : technique and short-term outcome in 50 consecutive patients. Dis Colon Rectum 52 : 1824-1830, 2009
- 5) 前田耕太郎ほか : Intersphincteric resection (ISR) 手術の成績. 臨外 64 : 325-329, 2009

## 下部直腸癌に対する直腸局所切除術の治療成績

八岡 利昌\*<sup>1</sup> 西村 洋治\*<sup>1</sup> 坂本 裕彦\*<sup>1</sup> 田中 洋一\*<sup>1</sup> 黒住 昌史\*<sup>2</sup>[*Jpn J Cancer Chemother* 39(12): 2176-2178, November, 2012]

Long-Term Outcome of Local Excision for Lower Rectal Cancer: Toshimasa Yatsuoka\*<sup>1</sup>, Yoji Nishimura\*<sup>1</sup>, Hirohiko Sakamoto\*<sup>1</sup>, Yoichi Tanaka\*<sup>1</sup> and Masafumi Kurozumi\*<sup>2</sup> (\*<sup>1</sup>Division of Gastroenterological Surgery, and \*<sup>2</sup>Division of Pathology, Saitama Cancer Center)

## Summary

In many practical cases, we cannot perform further surgical treatment for patients with T1 lower rectal cancer after local excision due to the patient's desire to avoid abdominoperineal resection. We reviewed the outcome of 15 patients in which local excision was performed for T1 lower rectal cancer from 2001 to 2009. The cases were classified into 3 groups [SM1 (n=3), SM2 (n=11), and SM3 (n=1)] by dividing the submucosal layer equally. In the initial operation, the round margins of all resected specimens were negative for cancer cells. We performed only 1 additional bowel resection after initial local excision for the SM3 case. The specimen removed by ultra-low anterior resection revealed lymph node metastasis in the mesorectum. Among the SM2 cases, recurrence occurred in only 1 patient, and ultra-low anterior resection was performed after the diagnosis of recurrence. Even though patients who had cancer with SM2 invasion did not undergo further bowel resection due to having other cancers or comorbidities or because of personal preference, there have been no other recurrences. **Key words:** Lower rectal cancer, Local excision, Submucosal invasion

要旨 下部直腸癌に対して直腸局所切除術を施行した後、病理組織学的検査結果でリンパ節転移高リスク群の SM 癌と判明されても、肛門温存の観点から患者の意向で追加の腸管切除を施行しない症例もある。2001~2009年までに、当科で経験した下部直腸 SM 癌に対する直腸局所切除術 15 例の治療成績について臨床病理学的に検討した。粘膜下層を単純に三等分して SM 浸潤度を検討した結果、SM1 癌 3 例、SM2 癌 11 例、SM3 癌 1 例であり、全例切除標本で切除断端癌細胞陰性であった。追加腸管切除を行ったのは SM3 癌の 1 例のみで、超低位前方切除を施行した結果、251 番リンパ節に転移を認めた。追加腸管切除を行わない SM2 癌 9 例中で再発を来したものは 1 例であり、超低位前方切除術で救命し得た。残る症例は、他の癌や重篤な合併症などを理由に追加切除を受けなかったが、現時点で再発はみられていない。

## はじめに

下部直腸癌に対する直腸局所切除術症例においては、病理組織学的検査結果で SM 浸潤度 1,000  $\mu\text{m}$  以上や脈管侵襲陽性などのリンパ節転移高リスク群と判明しても、患者の意向により追加腸管切除を施行しない症例もある。

## I. 目的

SM 浸潤陽性下部直腸癌に対する直腸局所切除術の治療成績について、臨床病理学的に検討する。

## II. 対象

当科で経験した 2001~2009 年までの下部直腸癌 15 例を対象にした。内視鏡的粘膜切除術後の症例では SM 浸潤度の実測が難しい場合もあり、SM 浸潤度は粘膜下層を単純に三等分し、SM1, SM2, SM3 の 3 層に分けて検討した。

## III. 結果

SM1 癌 3 例、SM2 癌 11 例、SM3 癌 1 例で、すべて

\*<sup>1</sup> 埼玉県立がんセンター・消化器外科\*<sup>2</sup> 同 病理診断科

表 1 下部直腸癌に対する経肛門および経仙骨の直腸局所切除症例

症例	年齢	性別	術式	形態	最大径	組織型	深達度	ly	v	N	追加治療
1	73	M	経肛門的	IIa	18	mod	SM1	0	0	x	
2	84	F	経肛門的	Is	73	wel	SM1	0	0	x	
3	57	F	経肛門的	Is	25	mod	SM1	0	1	x	
4	58	M	経仙骨的	Is	10	wel	SM2	1	0	0	
5	52	F	経肛門的	IIa	14	mod	SM2	1	1	x	超低位前方切除（再発時）
6	70	M	経肛門的	Is	20	wel	SM2	0	0	x	
7	44	M	経仙骨的	Isp	13	mod	SM2	2	2	0	
8	68	M	経肛門的	IIa	65	wel	SM2	0	1	1	経仙骨的
9	18	M	経肛門的	IIa	35	wel	SM2	1	1	x	
10	60	F	経仙骨的	Is	25	wel	SM2	0	2	0	
11	56	M	経肛門的	Is+IIa	44	wel	SM2	0	1	x	経仙骨的
12	57	M	経仙骨的	Isp	20	wel	SM2	0	2	0	
13	58	M	経仙骨的	LST	23	wel	SM2	0	1	0	
14	61	M	経仙骨的	Isp	14	mod	SM2	0	0	0	
15	69	M	経肛門的	IIa	22	wel	SM3	1	0	1	超低位前方切除

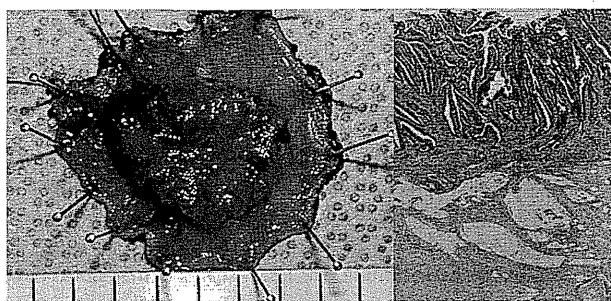


図 1 追加腸切除例の初回摘出標本および病理組織像

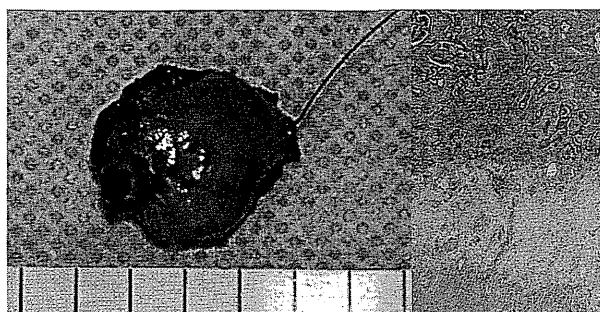


図 3 リンパ節再発症例の初回摘出標本および病理組織像

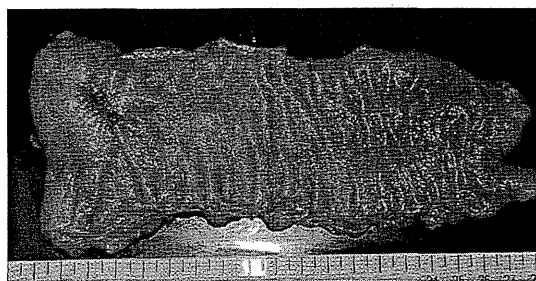


図 2 追加腸切除例の腸切除標本

中・高分化型腺癌であった（表 1）。全例において切除断端は癌細胞陰性であり、浸潤先進部の簇出は Grade 0/1 であった。11 例に脈管侵襲陽性を認めたため、所属リンパ節転移高リスク群として患者に対して十分な説明を行ったが、追加腸切除を行った症例は SM3 癌の 1 例のみであった（図 1）。本症例に対して 1 か月後に超低位前方切除術を施行した結果、251 番リンパ節に転移を認めた（図 2）。SM2 癌 11 例中 6 例に対してリンパ節のサンプリングを伴う経仙骨の直腸局所切除術を施行し、残る 5 例は経肛門の直腸局所切除術を施行した。追加腸管切除を行わなかった SM2 癌 9 例中再発を来したものは 1 例のみ



図 4 リンパ節再発症例の再発時 CT 検査および摘出標本

であり（図 3）、初回手術 6 か月に直腸間膜内リンパ節を認めたため、超低位前方切除術を施行し、現在も無再発生存中である（図 4）。残る 8 例は、他の癌や重篤な術前合併症などを理由に追加切除を受けなかったが、現時点で再発はみられていない（観察期間中央値 48 か月）。

## IV. 考 察

進行直腸癌に対しては total mesorectal excision (TME) を行うことで予後が改善することが欧米で報告されたが、下部直腸癌に対する超低位前方切除においては、double stapling technique (DST) 吻合あるいは経肛門吻合のいずれにおいても、ある程度の肛門機能低下は不可避である<sup>1)</sup>。一方、内視鏡的粘膜切除が開発され、早期直腸癌患者の一部は腸切除を回避できるようになったものの、下部直腸癌では手技的に切除困難を伴う症例があり、腸切除を余儀なくされることもある。その点、直腸局所切除は肛門温存が可能である上に機能低下が軽微であり、早期の下部直腸癌に対しては有用な術式である<sup>2,3)</sup>。また、内視鏡切除では腸穿孔や術後出血の可能性があり、直腸局所切除では腫瘍切除と欠損部の縫合閉鎖を直視下に確実に施行できる<sup>4)</sup>。さらに直腸局所切除は、全層切除を行うことにより詳細な病理検索が可能である。内視鏡的粘膜切除では、分割切除はもちろん、たとえ一括切除できたとしても直腸局所切除に比べると病理学的検索に限界がある。

欧米では直腸局所切除に放射線化学療法と組み合わせた治療がすでに開始されており、筋層に及ぶ腫瘍に対しても適応が拡大しているが、本邦ではリンパ節転移の危険がある SM 癌に対してはリンパ節郭清を伴う腸切除が推奨されている<sup>5)</sup>。ゆえに直腸局所切除の術式選択に当たっては、術前壁深達度診断とリンパ節転移診断が極めて重要である。画像診断技術が向上したとはいえ、注腸

造影、下部消化管内鏡検査、骨盤造影 CT および MRI 検査を組み合わせても、現時点での術前壁深達度診断とリンパ節転移診断は 90% 前後である。今後、さらに画像診断技術が発展して、術前壁深達度診断とリンパ節転移診断率が向上することによって、直腸局所切除がより正しく選択されると思われる。

## 結 語

直腸局所切除術は肛門温存が可能であり、侵襲が少なく、全層切除により詳細な病理検索が可能であるという利点があり、正しく選択されれば非常に有用な術式である。

## 文 献

- 1) Heald RJ, Husband EM and Ryall RD: The mesorectum in rectal cancer surgery—The clue to pelvic recurrence? *Br J Surg* 69(10): 613–616, 1982.
- 2) Mason AY: Transsphincteric approach to rectal lesion. *Surg Annu* 9: 171–194, 1977.
- 3) Mellgren A, Sirivongs P, Rothenberger DA, *et al*: Is local excision adequate therapy for early rectal cancer? *Dis Colon Rectum* 43(8): 1064–1071, 2000.
- 4) Tazi K, el Fassi J, Koutani A, *et al*: The York Manson approach in the treatment of prostatico-rectal fistulae. *Prog Urol* 11(6): 1335–1339, 2011.
- 5) Madbouly KM, Remzi FH, Erkek BA, *et al*: Recurrence after transanal excision of T1 rectal cancer: should we be concerned? *Dis Colon Rectum* 48(4): 711–720, 2005.

本論文の要旨は第 34 回日本癌局所療法研究会において発表した。



# Potential biological insights revealed by an integrated assessment of proteomic and transcriptomic data in human colorectal cancer

ICHIRO TAKEMASA<sup>1\*</sup>, NOBUYOSHI KITAKA<sup>1\*</sup>, TOSHIKI HITORA<sup>1</sup>, MAKOTO WATANABE<sup>2</sup>, EI-ICHI MATSUO<sup>2</sup>, TSUNEKAZU MIZUSHIMA<sup>1</sup>, MASATAKA IKEDA<sup>1</sup>, HIROHUMI YAMAMOTO<sup>1</sup>, MITSUGU SEKIMOTO<sup>1</sup>, OSAMU NISHIMURA<sup>2</sup>, YUICHIRO DOKI<sup>1</sup> and MASAKI MORI<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University; <sup>2</sup>Division of Disease Proteomics, Institute for Protein Research, Osaka University, 3-2 Yamadaoka, Suita, Osaka, Japan

Received July 20, 2011; Accepted September 1, 2011

DOI: 10.3892/ijo.2011.1244

**Abstract.** In the post-genomic era, the main aim of cancer research is organizing the large amount of data on gene expression and protein abundance into a meaningful biological context. Performing integrated analysis of genomic and proteomic data sets is a challenging task. To comprehensively assess the correlation between mRNA and protein expression, we focused on the gene set enrichment analysis, a recently described powerful analytical method. When the differentially expressed proteins in 12 colorectal cancer tissue samples were considered a collective set, they exhibited significant concordance with primary tumor gene expression data in 180 colorectal cancer tissue samples. We found that 53 upregulated proteins were significantly enriched in genes exhibiting elevated gene expression levels ( $P < 0.001$ ,  $ES = 0.53$ ), indicating a positive correlation between the proteomic and transcriptomic data. Similarly, 44 downregulated proteins were significantly enriched in genes exhibiting elevated gene expression levels ( $P < 0.001$ ,  $ES = -0.65$ ). Moreover, we applied gene set enrichment analysis to identify functional genetic pathways in CRC. A relatively large number of upregulated proteins were related to the two principal pathways; ECM receptor interaction was related to heparan sulfate proteoglycan 2 and vitronectin, and ribosome to RPL13, RPL27A, RPL4, RPS18, and RPS29. In conclusion, the integrated understanding of both genomic and proteomic data sets can lead to a better understanding of functional

inference at the physiological level and potential molecular targets in clinical settings.

## Introduction

The advent of genomic and proteomic technologies for the analysis of human tumor samples has now added an additional source of information to clinical cancer research (1). Genomic technologies have enabled rapid and sensitive screening for global and specific changes in gene expression that occur in hundreds of samples (2). Proteomic techniques based on mass-spectroscopy have enabled us to characterize and quantify thousands of proteins, which are closely related to the phenotype of an organism (3). Several previous studies have individually analyzed proteomic and transcriptomic data. Understanding the relevance and consistency of each data set individually is difficult and time-consuming. A major task in the post-genomic era is organizing this large amount of data on gene expression and protein abundance into a meaningful biological context.

We previously reported individual studies of mRNA and protein expression profile using DNA microarray and proteomics in colorectal cancer (CRC) (4,5). We believe that these studies should be expanded into a global integrated analysis of mRNA and protein expression profiles. However, a major limitation is that a less than perfect correlation often exists between mRNA and protein expression (6,7). Variations between the mRNA level of a gene and its corresponding protein abundance can be as high as 30-fold (8). Potential biological reasons for the lack of correlation between mRNA and protein expression levels are: i) translational regulation, ii) differences in protein *in vivo* half-lives, and iii) differences with respect to the experimental platforms (9,10). In addition, possible reasons for this poor correlation may include methodological constraints that might affect the comparison of mRNA and protein levels. Previous studies have reported that the Pearson correlation coefficient and Spearman rank coefficient for these data ranged from 0.47 to 0.76 in bacterial and mammalian cells (11-13).

To comprehensively assess the correlation between mRNA and protein expression in CRC, in this study, we focused on a recently described powerful analytical method known as the gene set enrichment analysis (GSEA) (14). GSEA determines

---

*Correspondence to:* Dr Ichiro Takemasa, Department of Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, 2-2 Yamadaoka E-2, Suita 565-0871, Osaka, Japan  
E-mail: itakemasa@gesurg.med.osaka-u.ac.jp

\*Contributed equally

*Abbreviations:* CRC, colorectal cancer; GSEA, gene set enrichment analysis; NBS, 2-nitrobenzenesulfonyl

*Key words:* transcriptomics, proteomics, correlation analysis, gene set enrichment analysis, colorectal cancer



whether members of a biological motif set ( $S$ ) tend to occur toward the top (or bottom) of the gene list ( $L$ ) by testing the coordinated over- or under-expression of gene sets using the Kolmogorov-Smirnov test over a weighted summation (14). We hypothesized that the GSEA approach, which was not controlled by different dynamic range, might be more suitable to evaluate the correlation between mRNA and protein levels than the traditional correlation coefficient analysis. Of note, GSEA revealed a relationship that had not been previously evaluated by traditional analysis.

We sought to identify potential biological regulatory pathways in humans in large sample size (180 CRCs data) using this GSEA application that is also known as the global analytical approach to evaluate regulatory gene sets associated with several biological mechanisms of cancer. We examined the relevance of these pathways in transcriptomic and proteomic analysis of upregulated proteins. Of note, several upregulated proteins have been found to be associated with genomic pathways playing an important role in carcinogenesis. In conclusion, the integrated analysis of genomic and proteomic data sets can lead to a better understanding of functional inference at the physiological level and of potential molecular targets in clinical settings through identification of pathways and molecular subnetworks that are implicated in human CRC tissues.

## Materials and methods

**Tissue samples.** CRC tissues and their adjacent normal colonic mucosal tissue counterparts used for 2-nitrobenzenesulfonyl (NBS) labeling were collected from 12 CRC patients who underwent surgical resection at Osaka University Hospital from 2003 to 2004 (clinicopathological features are described in Table I). For DNA microarray, samples of 180 CRC tissues and 40 normal colonic mucosal tissues were obtained from patients who underwent surgical resection at Osaka University Hospital from 2003 to 2006. After surgical resection, tissues were immediately stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  prior to analysis. None of the patients received chemotherapy or radiotherapy before surgery. Necrotic tissue was excluded from the study and none of the adenomas contained a cancerous component. All normal tissues were histopathologically confirmed as cancer-free. All patients gave written informed consent; this study was approved by the Institutional Review Board for human tissue use at the Graduate School of Medicine, Osaka University.

**Protein separation.** Frozen tissue samples were homogenized in 500 ml of lysis buffer A (50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/ml leupeptin, and 5 mg/ml aprotinin) on ice using a Sample Grinding kit (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK). Homogenates were centrifuged at  $100,000 \times g$  for 60 min and supernatants were collected as the cytosolic fraction (CF). Pellets were washed twice with lysis buffer A and homogenized in 500 ml of lysis buffer B (2% CHAPS, 9 M urea, 50 mM Tris-HCl at pH 8.0, 100 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM PMSF, 1 mg/ml leupeptin, and 5 mg/ml aprotinin); homogenates were centrifuged at  $100,000 \times g$  for 60 min. Supernatants were collected as 2% CHAPS-soluble fraction (CSF). These fractionated samples were precipitated using the 2D-Clean-Up kit (Bio-Rad,

Table I. Characteristics of 12 CRC samples for proteomics and 180 CRC samples for transcriptomics.

	12 CRC samples for proteomics	180 CRC samples for transcriptomics
Gender		
Male	8	111
Female	4	69
Age		
Median (range)	68 (61-78)	67 (30-90)
Location		
Cecum	0	16
A. Colon	3	23
T. Colon	0	10
D. Colon	1	10
S. Colon	6	54
Rectum	2	67
Tumor size (mm)		
Mean $\pm$ SD	4.4 $\pm$ 1.8	6.7 $\pm$ 9.9
Histological type		
Well	1	40
Mod	11	134
Por	0	4
Muc	0	2
Stage		
0/I	2	18
II	5	75
III	5	87
IV	0	0

Hercules, CA) and resuspended in 8 M urea and 5 mM EDTA. After centrifugation at  $100,000 \times g$  for 5 min, supernatants were collected and subjected to NBS reagent labeling. Protein concentration was determined using the BCA Protein Assay kit (Pierce, Rockford, IL) using BSA as a standard.

**NBS reagent labeling, peptide fractionation, and MS measurement.** NBS reagent labeling was performed according to the manufacturer's protocol ( $^{13}\text{C}$ NBS stable isotope labeling kit-N; Shimadzu Biotech, Kyoto, Japan). Normal and tumor tissue samples (100 mg each) were labeled with isotopically light and heavy NBS reagents, respectively. NBS-labeled samples were then mixed, reduced, alkylated, and digested by trypsin. NBS-labeled peptides were enriched from tryptic digests and fractionated using Phenyl-Sepharose, as previously described (15). The resulting seven fractions were combined into three fractions and subjected to reversed-phase liquid chromatography (LC-I0ADvp mHPLC system; Shimadzu), as previously described (16). Eluates were automatically deposited onto MALDI target plates by the LC spotting system (AccuSpot; Shimadzu). These samples were automatically analyzed by MALDI-TOF MS (AXIMA-CFR Plus; Shimadzu/Kratos, Manchester, UK) (16).

*Relative quantification and identification of differentially expressed proteins in HCC.* Relative quantification of each NBS-labeled peptide pair was performed using the NBS Analysis Software version 1.0 (Shimadzu), referring to a monoisotopic mass list from MASCOT Distiller version 1.1.2 (Matrix Science), as previously described (16). Peptide pair ratios >1.5 fold or <0.66 fold were set as threshold values. The threshold value for the occurrence was set to 60% of all CRC patient samples in which peptide pairs were detected. In this manner, candidate peptides were selected and further subjected to MS/MS analysis (AXIMAQIT-TOF; Shimadzu/Kratos) (16). Proteins were identified by the MASCOT MS/MS Ion Search algorithm (version 2.0; Matrix Science) using a mass list generated by the MASCOT Distiller. The MASCOT search parameters were: trypsin digestion allowing up to two missed cleavages, fixed modifications of <sup>12</sup>CNBS (or <sup>13</sup>CNBS) and carbamidomethyl (C), variable modifications of oxidation (M), peptide tolerance 0.3 Da, and MS/MS tolerance of 0.5 Da. Search results with P<0.05 were defined as positive identifications.

*Gene expression profiling.* Total RNA was purified from 180 CRC tissue samples using TRIzol reagent (Invitrogen, San Diego, CA), as previously described (17). Integrity of the RNA was assessed on the Agilent 2100 Bioanalyzer and RNA 6000 LabChip kits (Yokokawa Analytical Systems, Tokyo, Japan). Only high quality RNA with intact 18s and 28s RNA were used for subsequent analysis. Forty RNA extractions from different normal colonic mucosal tissues were mixed and used as control reference. Extracted RNA samples were amplified with T7 RNA polymerase using the Amino Allyl MessageAmp™ aRNA kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer's protocol. The quality of each Amino Allyl-aRNA sample was checked on the Agilent 2100 Bioanalyzer. Control and experimental aRNA samples (5 µg) were labeled with Cy3 and Cy5, respectively; these samples were then mixed, and hybridized on an oligonucleotide microarray covering 30,336 human probes (AceGene Human 30K; DNA Chip Research Inc. and Hitachi Software Engineering Co., Yokohama, Japan). Experimental protocol is available at <http://www.dna-chip.co.jp/thesis/AceGeneProtocol.pdf>. The microarrays were scanned on the ScanArray 4000 (GSI Lumonics, Billerica, MA). Signal values were calculated using the DNASIS Array Software (Hitachi Software Inc., Tokyo, Japan). Following background subtraction, data with low signal intensities were excluded from additional investigation. In each sample, the Cy5/Cy3 ratio values were log-transformed. Then, global equalization to remove a deviation of the signal intensity between whole Cy3- and Cy5-fluorescence was performed by subtracting the median of all log (Cy5/Cy3) values from each log (Cy5/Cy3) value. Genes with missing values in >20% samples were excluded from further analysis; 24,537 genes out of 30,336 were analyzed.

*Statistical integration of proteomics and transcriptomics.* To investigate the correlation between mRNA and protein levels for a set of differentially expressed proteins, we used the Spearman rank coefficient and GSEA, a computational method that determines whether an a priori defined set of genes shows statistically significant and concordant differences between

two biological states, as previously reported (14). In brief, using the gene expression profiles of the 180 CRC samples, the gene list *L* was ranked by calculating the mean expression level of each gene across all CRC samples. The differentially expressed proteins selected by NBS method were then mapped to their corresponding mRNAs and used as a test group set *S* against the ranked gene list *L* in GSEA analysis. Enrichment score (*ES*) of a test group set *S* characterizes whether the set *S* is randomly distributed across the list or falls mainly at the bottom or top of the list *L*. The null hypothesis that a test group set *S* randomly distributes across the ranked gene list *L* was tested with the Kolmogorov-Smirnov test, and the statistical significance value (nominal P-value) was estimated by 1000 random permutations of the phenotype labels. In this study, the test group set (differentially expressed proteins set) with a P<0.05 of *ES* was considered to be statistically significant correlation between mRNA and protein expression.

*Assessment of significantly regulated pathways in CRC.* KEGG database (<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) and GSEA 2.0.1 (a publicly available desktop application from the Broad Institute ([http://www.broad.mit.edu/gsea/software/software\\_index.html](http://www.broad.mit.edu/gsea/software/software_index.html)) (14) were employed to assess significantly regulated pathways in the 180 CRC gene expression data sets. In KEGG database, a test set size filter (min=15, max=500) was applied to 200 pathways. The enrichment score (*ES*) of a test set *S* and statistical significance value (nominal P-value) were estimated by permutations of the phenotype labels as described above. Test sets with a high significance (P<0.05) of *ES* were considered as potentially regulated pathways. We normalized the *ES* for each gene set to account for the size of the set, yielding a normalized enrichment score (*NES*). We then control the proportion of false positives by calculating the false discovery rate (FDR) (18) corresponding to each *NES*. FDR is the estimated probability that a set with a given *NES* represents a false positive finding; it is calculated by comparing the tails of observed and null distributions for *NES*.

## Results

*Proteomic profiling and identification of differentially expressed proteins in 12 CRC tissues.* The NBS method was used for profiling protein expression in a set of tumor and normal tissue samples from 12 CRC patients. After a series of experiments, ~2,600-3,000 peak pairs were observed in each analysis. After relative quantification of each peak pair in each sample, 320 pairs were found to have significant alterations in protein expression and occurred with significant frequency in patients. After these peaks were subjected to MS/MS analysis, 226 MS/MS spectra were obtained, and 156 search results were considered as positive identifications. In total, 128 proteins were confirmed as CRC-associated proteins. Of these, 71 proteins were upregulated and 57 proteins were downregulated in tumor tissue compared to those in normal tissue in CF and CSF analyses, respectively. Using UniProt Protein database (<http://www.uniprot.org/>) and matching Entrez Gene ID, we mapped these differentially expressed proteins to their corresponding mRNA counterparts. Finally, we focused on 53 upregulated and 44 downregulated proteins, for which mRNA expression was determined by cDNA microarray analysis (Tables II and III).

Table II. List of 53 upregulated proteins in CRC tissues and transcriptomic expression data.

Upregulated proteins in CRC tissues	Symbol	Entrez Gene ID	Average of 12 CRCs Log <sub>2</sub> T/N ratio - proteomics	Average of 180 CRCs Log <sub>2</sub> T/N ratio - transcriptomics
α1 acid glycoprotein	ORM1	5004	1.19	-0.29
β-tubulin	TUBB	203068	0.79	0.32
Apurinic endonuclease	APEX1	328	1.00	0.15
Calumenin	CALU	813	1.18	0.32
Chaperonin1	HSPD1	3329	1.10	0.50
Clathrin light polypeptide A	CLTA	1211	1.54	0.13
Complement factor H	CFH	3075	0.88	-0.85
Cysteine rich intestinal protein 1	CRIP1	1396	0.58	-0.30
Cytokeratin 18	KRT18	3875	1.46	0.31
Ezrin	EZR	7430	0.99	-0.38
F-box protein 40	FBXO40	51725	1.30	0.00
Fibrinogen γ	FGG	2266	0.97	-0.07
Galectin 1	LGALS1	3956	0.90	0.83
Glutathione peroxidase 1	GPX1	2876	0.67	0.36
Golgi complex-associated protein 1	ACBD3	64746	1.05	0.12
Heat shock 70 kD protein 9B	HSPA9	3313	1.10	-0.18
Heat shock protein 27	HSPB1	3315	1.14	0.23
Heparan sulfate proteoglycan 2	HSPG2	3339	0.98	0.06
High density lipoprotein-binding protein	HDLBP	3069	0.71	0.22
HLA-C	HLA-C	3107	0.73	-0.35
Hypothetical protein FLJ38663	C12orf65	91574	0.75	-0.38
Inorganic pyrophosphatase	PPA1	5464	1.24	0.67
Mitogen inducible gene 2 protein	FERMT2	10979	0.71	-0.19
Plastin 2	LCP1	3936	1.03	-0.09
Plectin 1	PLEC1	5339	0.84	-0.07
Proteasome subunit p58	PSMD3	5709	0.73	0.21
Pyruvate kinase 3	PKM2	5315	0.93	0.36
RAB22A	RAB22A	57403	0.78	0.11
RACK1	GNB2L1	10399	0.83	0.13
Radixin	RDX	5962	0.84	-0.27
RAN, member RAS oncogene family	RAN	5901	0.83	0.52
Reticulocalbin 1	RCN1	5954	1.32	0.63
Ribosomal protein L13	RPL13	6137	1.48	0.59
Ribosomal protein L27a	RPL27A	6157	0.95	0.20
Ribosomal protein L4	RPL4	6124	0.93	0.16
Ribosomal protein S18	RPS18	6222	1.25	0.26
Ribosomal protein S29	RPS29	6235	0.68	0.10
Ribosome binding protein 1	RRBP1	6238	0.80	0.08
S adenosylhomocysteine hydrolase	AHCY	191	1.22	0.77
S100 calcium binding protein A9	S100A9	6280	1.06	0.68
Solute carrier family 25, member 5	SLC25A5	292	0.84	-0.26
Solute carrier family 3, member 2	SLC3A2	6520	0.85	0.41
Splicing factor 3B, subunit 3	SF3B3	23450	1.24	0.34
Splicing factor, arginine/serine-rich 3 (SRp20)	SFRS3	6428	0.81	-0.13
Transgelin	TAGLN	6876	0.80	0.18
Transgelin 2	TAGLN2	8407	1.00	0.41
Triosephosphate isomerase 1	TPI1	7167	0.99	0.21
Ubiquitin-activating enzyme 1	UBE1	7317	0.90	0.24
U5 snRNP-specific protein, 116 kD	EFTUD2	9343	1.19	0.34
Vimentin	VIM	7431	0.97	-0.09
Vitronectin	VTN	7448	0.70	-0.02
XTP3 transactivated protein A	XTP3TPA	79077	1.06	0.18
Zyxin	ZYX	7791	1.03	0.63

*Spearman rank coefficient between mRNA and protein expression in CRC.* Fig. 1 illustrates our experimental design for correlation analysis. We initially investigated the extent to which expression data at the protein and mRNA levels were correlated in CRC using traditional correlation coefficient approach. The identified differentially expressed proteins, the expression ratios for these up-regulated and down-regulated proteins, and the expression ratios for each corresponding mRNA transcript are provided in Tables II and III. Fig. 2A and B show the expression ratios of uniquely identified proteins plotted against ratios of the products of the corresponding genes at the mRNA level. A nonparametric correlation analysis of the experimental data using Spearman rank correlation method gave a correlation coefficient of 0.36 for up-regulated proteins data, and a correlation coefficient of 0.28 for down-regulated proteins data. This indicates a poor correlation between mRNA and protein expression ratios.

*Evaluation of the correlation between mRNA and protein expression using GSEA.* Next, we integrated proteomic data and global transcriptomic data to examine the correlation between mRNA and protein levels using GSEA approach. We focused on the 53 up-regulated and 44 down-regulated proteins shown in Tables II and III. To map these differentially expressed proteins to their corresponding mRNA counterparts, we used the Entrez Gene ID and UniProt Protein database (<http://www.uniprot.org/>). Then, 24,537 genes after processing were ranked according to their magnitude of differential gene expression in 180 CRC tissues, obtained by microarray and analyzed using GSEA to examine the distribution of the 53 up-regulated proteins. We found that the 53 up-regulated proteins were significantly enriched in genes exhibiting elevated gene expression levels ( $P < 0.001$ , ES=0.53), indicating a positive correlation between proteomic and transcriptomic data (Fig. 3A). Similarly, the 44 down-regulated proteins were significantly enriched in genes exhibiting elevated gene expression levels ( $P < 0.001$ , ES -0.65), indicating a positive correlation between proteomic and transcriptomic data (Fig. 3B).

*Identification of characteristic genomic pathways and potential regulatory proteins associated with CRC tissues.* After

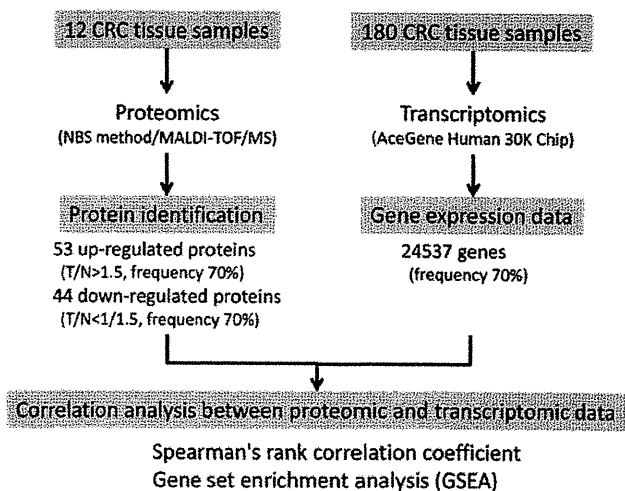


Figure 1. The schematic of our experimental design for correlation analysis. From NBS-based proteomics using 12 CRC tissues, expression data of 53 up-regulated and 44 down-regulated proteins were obtained. From DNA microarray using 180 CRC tissues, 24,536 gene expression profiles were obtained. We investigated the correlation between mRNA and protein levels for a set of differentially expressed proteins, using the Spearman rank coefficient and GSEA.

defining the differentially expressed proteins in 180 CRC tissues, the challenge was to objectively interpret potential biological mechanisms. We performed GSEA to identify functional genetic pathways (KEGG database; <http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>) that correlate with the entire ranked gene list from 180 CRC tissues, sorted by their magnitude of differential gene expression. Of the 200 gene sets that contained genes whose products were involved in specific metabolic and signaling pathways, 12 were significantly enriched with nominal  $P < 0.05$ , as shown in Table IV. Among the molecules within these 12 pathways in KEGG database, we found several up-regulated proteins obtained by NBS analysis. In particular, a relatively large number of up-regulated proteins were related to the principal two pathways; ECM receptor interaction was related to HSPG2 and VTN, and ribosome to RPL13, RPL27A, RPL4, RPS18, and RPS29.

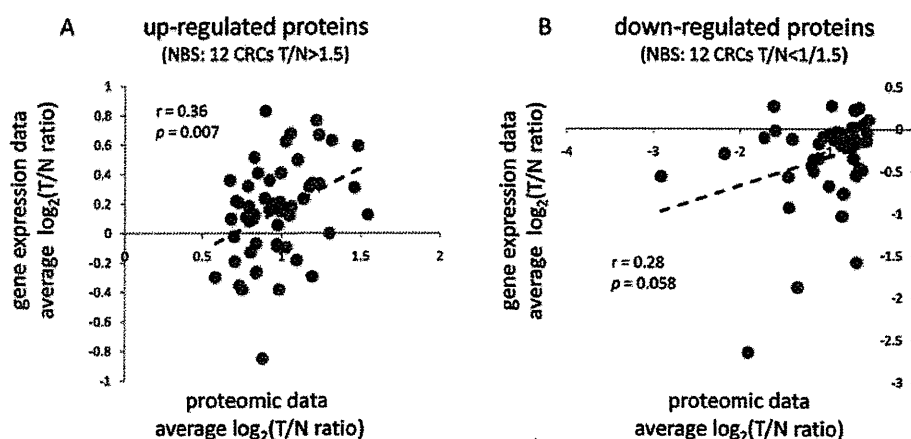


Figure 2. Correlation between mRNA and protein expression levels in CRC, using the Spearman rank coefficient. Expression values are plotted on a log scale. The dotted lines indicate the correlation trend. (A) mRNA-protein correlation for expression values of 53 upregulated proteins. (B) mRNA-protein correlation for expression values of 44 down-regulated proteins.