

学 位 論 文 題 名

Abnormal Expression of CD44 Variants in
the Exfoliated Cells in the Feces of the
Patients with Colorectal Cancer.

（大腸・直腸癌患者の糞便中から分離した細胞における
CD44 変異体の異常発現の検出に関する研究）

学位論文内容の要旨

【緒言】 CD44は細胞膜貫通性の糖蛋白であり、様々な細胞上に、様々な型で存在する。このCD44のバリエーションは、糖鎖付加による翻訳後修飾や変則的スプライシングにより生ずる。すなわち、CD44遺伝子は、10のstandard exonと10のvariant exon（exon6-15；variant exon 1-10）から構成されており、細胞外領域のvariant exonは変則的スプライシングを受ける。CD44分子の機能としてリンパ球ホーミング、T細胞活性化と情報伝達、細胞接着等における役割が知られているが、近年、CD44分子が癌の転移、進展に関与していることが明らかにされている。本研究では、大腸・直腸癌の非侵襲的な遺伝子診断の可能性を検討するため、大腸・直腸癌患者の手術前・手術後および健常人の糞便から細胞成分を分離し、これを材料としてCD44 mRNAの発現をRT-PCR Southern blot法を用いて検出することを試みた。

【対象および方法】 25人の大腸・直腸癌患者の原発巣切除前・切除後および15人の健常人の糞便5gから、Percol法によって細胞成分を分離した。分離した細胞からmRNAを抽出し、CD44 exon 6からCD44 exon 18までを含む領域が増幅されるプライマーを用いてRT-PCR法を行った。得られたPCR産物を1.2%アガロースゲルで電気泳動した後、Southern blot法にてナイロン膜にトランスファーし、CD44 standardおよびvariant（variant 6およびvariant 10）に対する特異的cDNAプローブを用いて各々の発現を検出した。5人の患者においては、腫瘍部および正常粘膜部においてCD44 standardとvariant 6に対するモノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検討を行った。

【結果】 CD44 standardおよびCD44 variant 6に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色による検討では、CD44 standardは大腸・直腸の正常粘膜、腫瘍組織の何れにおいても発現が認められ、正常粘膜においては増殖帯においてより強く発現していることが示され

た。一方、CD44 variant 6は、腫瘍組織において広範に強く発現が認められたが、正常粘膜においては、検出されないか、もしくは増殖帯に限定してわずかな発現を認めるのみであった。全体で25名の大腸・直腸癌患者の原発巣切除前および切除後の糞便、および、健常人15名の糞便を材料に、CD44 mRNAの発現を検討した。CD44 standardは、大腸・直腸癌患者の原発巣切除前、切除後ともに全ての患者において検出され、全ての健常人においても同様に検出された。CD44 variant 6は、大腸・直腸癌患者の原発巣切除前において17例（68％）に検出され、原発巣切除後においては3例（12％）にのみ検出された。原発巣切除前にCD44 variant 6が陽性であった患者17人中15人（88％）において、原発巣切除後にCD44 variant 6は陰性となった。CD44 variant 10は、大腸・直腸癌患者の原発巣切除前において15例（60％）に検出され、原発巣切除後においては7例（28％）に検出された。原発巣切除前にCD44 variant 10が陽性であった患者15人中12人（80％）において、原発巣切除後にCD44 variant 10は陰性となった。健常人においては、15人中1人（6.6％）において、CD44 variant 6およびvariant 10が検出された。

【考察】本研究によって、糞便から分離した細胞を材料として、CD44 mRNAの発現が検出可能であることが示された。免疫組織化学的検討においては、CD44 variantは、腫瘍組織において過剰発現を示しており、正常組織においては粘膜深層の増殖帯に局限してわずかに発現しているにすぎないことが示された。したがって、腫瘍組織中に広範に分布するCD44 variant陽性の癌細胞は、糞便中に容易に剥離するものと考えられる。大腸・直腸癌患者の原発巣切除前・切除後の糞便におけるCD44variantの検出の相違は主に、糞便中に含まれる癌細胞の有無によるものと考えられた。本研究は、便を材料とした大腸・直腸癌の非侵襲的な遺伝子診断の可能性を示唆している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 教 授 今 村 雅 寛

学 位 論 文 題 名

Abnormal Expression of CD44 Variants in the Exfoliated Cells in the Feces of the Patients with Colorectal Cancer.

(大腸・直腸癌患者の糞便中から分離した細胞における
CD44 変異体の異常発現の検出に関する研究)

CD44分子は癌の転移、進展に関与していることが明らかにされている。大腸・直腸癌の非侵襲的な分子診断の可能性を検討するため、大腸正常粘膜、大腸癌組織におけるCD44の発現と、大腸・直腸癌患者の手術前・手術後および健常人の糞便から細胞成分を分離し、これを材料としてCD44 mRNAの発現をRT-PCR Southern blot法を用いて検出することを試みた。CD44 standardおよびCD44 variant 6に対するモノクローナル抗体を用いた免疫染色による検討では、CD44 standardは大腸・直腸の正常粘膜、腫瘍組織の何れにおいても発現が認められ、正常粘膜においては増殖帯においてより強く発現していることが示された。一方、CD44 variant 6は、腫瘍組織において広範に強く発現が認められたが、正常粘膜においては、検出されないか、もしくは増殖帯に限定してわずかな発現を認めるのみであった。全体で25名の大腸・直腸癌患者の原発巣切除前および切除後の糞便、および、健常人15名の糞便を材料に、CD44 mRNAの発現を検討した。CD44 standardは、大腸・直腸癌患者の原発巣切除前、切除後ともに全ての患者において検出され、全ての健常人においても同様に検出された。CD44 variant 6は、大腸・直腸癌患者の原発巣切除前において17例（68％）に検出され、原発巣切除後においては3例（12％）にのみ検出された。原発巣切除前にCD44 variant 6が陽性であった患者17人中15人（88％）において、原発巣切除後にCD44 variant 6は陰性となった。CD44 variant 10は、大腸・直腸癌患者の原発巣切除前において15例（60％）に検出され、原発巣切除後においては7例（28％）に検出された。原発巣切除前にCD44 variant 10が陽性であった患者15人中12人（80％）において、原発巣切除後にCD44 variant 10は陰性となった。健常人においては、15人中1人（6.6

%)において、CD44 variant 6およびvariant 10が検出された。本研究は、便を材料とした大腸・直腸癌の非侵襲的な分子診断の可能性を示唆するものと考えられた。

公開発表にあたって、副査の第一外科藤堂教授から遺伝子診断の具体的な利用可能性についての質問があった。申請者は、より特異性の高い癌の診断、より感度の高い転移の診断、また、再発の予測、予後の予測にもとづく治療法の層別に利用される可能性がある」と答えた。次に、本研究を開始したきっかけについての質問があった。申請者は、癌の間接的な所見である便潜血反応との対比を示し、より癌に直接的な分子診断としての便中細胞を取りあげたこと、また、膀胱癌における尿中の細胞での同様の検討が行われている」と答えた。次いで、大腸腺腫でのCD44 variantの発現率について質問があった。申請者は、10mm以下の腺腫では9%、10mm以上の腺腫で45%、癌では70%の陽性率であると答えた。次いで、本検査法の所用時間、コストに関する質問があった。申請者は、所要時間、コスト共に一般化するには問題が残っていると答えた。次に、副査の加齢制御医学今村教授から、癌に対する特異性を向上させる方法についての質問があった。申請者は、単一の因子ではなく、複数の因子を組み合わせることにより、特異性を向上できる可能性がある」と答えた。次いで、臨床的な観点から大腸癌切除後の再発の診断への利用可能性についての質問があった。申請者は、便中の細胞は、局所再発に関して利用可能であるかもしれないが、大腸癌で頻度が高い肝転移、リンパ節転移などは血清中のマーカーの方が有用である可能性が高い」と答えた。最後に、主査の第三内科浅香教授から、大腸正常粘膜においてCD44 variant 6が増殖帯に限定して発現していることと、癌細胞では過剰発現している点を考慮し、CD44 variantは、細胞増殖に関与するのか、癌化に関与するのかについての質問があった。申請者は、扁平上皮においてはCD44 variantは正常組織で発現しているが、扁平上皮癌では発現していないことが報告されていることを例にあげ、正常組織と癌組織におけるCD44 variantの発現パターンは、それぞれの臓器によって異なっており、その発現、機能に関しては細胞の性質、状態、周囲の環境によって異なっていると考えられるが、未だ十分解明されていない」と答えた。次いで、現時点での便サンプルの処理は煩雑であり、特異度、感度からみると今後の検討の余地があるのではないかととの質問があった。申請者は、便を検体とした分子診断法は十分改良、検討の余地を持っているが、本研究は便中細胞を用いてmRNA Levelの検討が可能であることを示しており、今後新たな分野への応用が期待できると答えた。

本研究は、大腸・直腸癌の遺伝子診断の基礎的研究として重要な結果を含んでおり、大腸・直腸癌の早期診断の可能性を示唆するものであるため、審査員一同はこれらの結果を高く評価し、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものとした。