

学位論文題名

Low levels of insulin-like growth factor type 1  
receptor expression at cancer cell membrane predict  
liver metastasis in Dukes' C human colorectal cancers.

(Dukes' C 大腸癌において膜表面の IGF-1R 発現レベルは  
肝転移と逆相関する)

学位論文内容の要旨

【目的と背景】

手術可能であった大腸癌の予後は、多くの場合、異時性の転移、特に肝臓への転移の有無に依存することが知られている。大腸癌の予後の改善を目指すには、転移予測に基づいたハイリスク群の選定とそうした症例に対する適切な術後補助化学療法の実施が重要である。Dukes' C 大腸癌症例に対する術後補助化学療法に関しては、全生存期間と無再発生存期間のどちらも延長させることが知られている。しかしながら、Dukes' C 症例の再発率は 40-50%程度といわれていることからわかるように、術後補助化学療法を本来必要としない症例に対してもこれまで術後化学療法は実施されてきたという背景もあり、術後補助化学療法の利用価値を高めるためには、適切なマーカーを用いた患者選択が必要である。大腸癌の細胞増殖、形質転換、アポトーシスの制御に関係している因子として最近注目されているものの一つに Insulin-like growth factor (IGF) がある。そのレセプターである Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) の過剰発現は、いくつかの大腸癌細胞株やヒト大腸癌組織中でも確認されている。我々は、大腸癌におけるこの IGF-1R 発現レベルを免疫組織化学的に評価することで、予後の予測が可能かどうかを検討することにした。

【方法と結果】

1992年7月から1998年12月までに国立がんセンター東病院にて外科的切除術を施行され完全治癒切除となった Dukes' C 大腸癌症例 161 例を対象とした。今回の検討では治療前後に化学療法あるいは放射線療法を受けた患者を除外し、また他の悪性腫瘍の既往歴を有する症例も除外した。いずれの症例に関しても少なくとも 5 年間は経過をフォローした。今回の検討には切除標本から取られたホルマリン固定サンプルを使用し、各症例についてもっとも腫瘍が浸潤しているブロックを用いた。免疫染色には抗 IGF-1R マウスモノクローナル抗体を用いた。IGF-1R の発現については、「細胞膜の発現だけを評価し、細胞質の染色は無視する」という方法で評価した。IGF-1R の発現レベルは、観察範囲内の癌細胞の 50%以上が“陽性”である場合を“diffuse positive pattern”、50%未満の場合を“focal positive pattern”と定義した。IGF-1R の発現レベルと予後との関係性を評価するにあた

り大腸癌の再発形式を考慮し、対象を「再発しなかった群」「肝臓に再発した群」「肝臓以外の臓器に再発した群」の3群に分けて予後検討を行った。

種々の臨床病理学的因子と IGF-1R 発現との関係を調べたところ、癌の再発、特に肝臓への再発に関して IGF-1R 発現が関わっていることがわかった。そこで IGF-1R 発現も含め、無再発生存期間に影響を及ぼす因子を特定するため、これらの臨床病理学的因子について単変量解析を行ったところ、腫瘍の深達度・リンパ管浸潤・脈管浸潤・IGF-1R 発現が予後に影響を与える因子であった。興味深いのは当初の我々の予想に反して、IGF-1R 発現が低い症例で肝転移しやすく、逆に発現レベルの高い症例において無再発生存期間が長いということであった。単変量解析にて無再発生存期間に影響を与えた因子に関して、さらに多変量解析を行ったところ IGF-1R 発現・腫瘍の深達度・リンパ管浸潤の3つがそれぞれ有意差を持って独立して予後に影響を与える因子であることがわかった。また、IGF-1R 発現と他の2つの因子をそれぞれ組み合わせて Kaplan-Meier にて評価したところ、高い特異度をもって肝転移の予知をすることが出来た。

#### 【考察】

免疫組織化学的手法を用いた IGF-1R 発現による予後検討としてはこれまでも3報 (Hakam A et al. *Hum Pathol* 1999;30:1128-33, Weber MM et al. *Cancer (Phila)* 2002;95:2086-95, Peters G et al. *Virchows Arch* 2003;443:139-45) 報告されているがいずれにおいても予後との関係は示されていない。予後を示すことが出来た我々の検討との違いは、1) 用いた抗体が異なる、2) 異なる評価方法を用いた、3) 肝転移に着目した、という3点によるものと思われた。以前の検討では、IGF-1R の細胞質内ドメインを認識する抗体を用いて細胞質の染色性を評価する方法をとっていたが、この方法ではリガンドと結合して細胞内に internalize したレセプターやレセプターの precursor なども評価してしまっている可能性があり、機能的なレセプターを評価するには不都合であった可能性がある。評価方法に関しては同じ膜貫通型レセプターである HER2 に関する検討でも膜表面の発現のみを評価することが重要であるという報告 (Tetu B et al. *Cancer (Phila)* 1994;73:2359-65) があるが、IGF-1R に関して同じような評価方法が重要であるとした報告は今回が初めてである。また、IGF システムが肝転移というイベントに重要であることは近年注目されているトピックであり、予後検討に関して肝転移とそれ以外の臓器への転移を分けて評価したことも IGF-1R 発現レベルの違いで予後の予測が出来たことにつながったと思われた。

IGF-1R 発現レベルが低い症例の方が肝転移しやすいというパラドキシカルな結果に関しては明確な答えはまだない。しかしながら、同様の結果が乳癌と前立腺癌においても4報 (Papa V et al. *Cancer Res* 1993;53:3736-40, Bonnetterre J et al. *Cancer Res* 1990;50:6931-5, Schnarr B et al. *Int J Cancer* 2000;89:506-13, Peyrat JP et al. *Breast Cancer Res Treat* 1992;22:59-67) 出されており、非常に興味深い。細胞表面のレセプターが多いことはまだレセプターがリン酸化されておらずシグナルが入っていないことを示しており、逆にレセプター発現が低い方はシグナルがアクティブになっていることを示している可能性がある。また、高分化な細胞ほどレセプターの発現が亢進するという報告もあり、予後に関してはそのことを反映しているのかも知れない。また、低酸素や低 pH、低グルコースといった微小環境のストレスが IGF-1R の発現と関係しているという報告が最近出されており、IGF-1R の発現レベルをみた今回の検討は腫瘍周辺の微小環境のストレスに対して腫瘍細胞が適

応するために IGF シグナルを要求するサインをみた可能性も示唆される。レセプターも含めた IGF システムの制御に関してはまだよくわかっていないことが多いが治療実験に関する報告も最近散見されるようになっており、今後ますます注目される分野と思われる。

**【結語】**

Dukes' C 大腸癌症例においては、原発巣における細胞膜での IGF-1R の発現レベルが低い症例では再発のリスク、とくに肝転移のリスクが高いことがわかった。

## 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊  
副 査 教 授 浅 香 正 博  
副 査 教 授 近 藤 哲

### 学 位 論 文 題 名

Low levels of insulin-like growth factor type 1 receptor expression at cancer cell membrane predict liver metastasis in Dukes' C human colorectal cancers.

(Dukes' C 大腸癌において膜表面の IGF-1R 発現レベルは  
肝転移と逆相関する)

手術可能であった大腸癌の予後は、多くの場合、異時性転移、特に肝転移の有無に依存することが知られており、転移予測に基づいたハイリスク群の選定とそうした症例に対する適切な術後補助化学療法の実施が重要である。大腸癌の細胞増殖、形質転換、アポトーシスの制御に関係している因子として注目されているものの一つに Insulin-like growth factor (IGF) がある。そのレセプターである Insulin-like growth factor type 1 receptor (IGF-1R) の過剰発現は、いくつかの大腸癌細胞株やヒト大腸癌組織中でも確認されている。今回申請者らの研究グループでは、大腸癌における IGF-1R 発現レベルを免疫組織化学的に評価することで予後予測が可能かどうかについて、1992年7月から1998年12月までに国立がんセンター東病院にて外科的切除術を施行され完全治癒切除となった Dukes' C 大腸癌症例 161 例を対象として検討した。免疫染色には抗 IGF-1R マウスモノクローナル抗体を用い、IGF-1R の発現については、「細胞膜の発現だけを評価し、細胞質の染色は無視する」という方法で評価した。IGF-1R 発現レベルは、観察範囲内の癌細胞の 50%以上が陽性である場合を“diffuse positive pattern”、50%未満の場合を“focal positive pattern”と定義した。IGF-1R 発現レベルと予後との関係性を評価するにあたり再発形式を考慮し、対象を「無再発群」「肝臓に再発した群」「肝臓以外の臓器に再発した群」の3群に分けて予後検討を行った。種々の臨床病理学的因子と IGF-1R 発現との関係を調べたところ、癌の再発、特に肝臓への再発に関して IGF-1R 発現が関わっていることがわかった。そこで IGF-1R 発現も含め無再発生存期間に影響を及ぼす因子を特定するため、これらの臨床病理学的因子について単変量解析を行ったところ、腫瘍の深達度・リンパ管浸潤・脈管浸潤・IGF-1R 発現が予後に影響を与える因子であった。興味深いのは当初の予想に反して、IGF-1R 発現が低い症例で肝転移しやすく、逆に発現レベルの高い症例において無再発生存期間が長いということであった。単変量解析にて無再発生存期間に影響を与えた因

子に関して、さらに多変量解析を行ったところ IGF-1R 発現・腫瘍の深達度・リンパ管浸潤の3つがそれぞれ独立して予後に影響を与える因子であった。また、IGF-1R 発現と他の2つの因子をそれぞれ組み合わせた場合、予後予測精度が増し、特に IGF-1R 発現とリンパ管浸潤を組み合わせて評価した場合、術後再発しない症例を抽出することが出来た。

口頭発表に際し副査の近藤教授より、膜表面の発現に注目した経緯、IGF 中和抗体を用いた実験系に関する質問、機能的 IGF-1R の評価に関する質問があった。これに対して申請者は、今回の検討を行うに先立ち様々な抗体を用いて染色態度を検討していく中で膜表面の発現レベルに違いがあることに気づいたこと、IGF 中和抗体はマウスを用いた大腸癌肝転移モデルを用いて検討したこと、機能的 IGF-1R を評価する目的で抗 pIGF-1R 抗体ならびに IGF-1R シグナルの下流にあるリン酸化 Akt に対する抗 pAkt 抗体を用いて検討してみたが評価できなかったことを回答した。次いで副査の浅香教授より、IGF の発現の有無について、血中 IGF 濃度と肝転移との関連について、IGF-1R 発現レベルの高い部位について、胆管上皮で IGF-1R 発現が高い理由についての質問があった。リガンドである IGF に関しては今回検討しなかったこと、血中 IGF 濃度と肝転移との間には相関は見られなかったこと、IGF-1R 発現は腫瘍以外には大腸管腔に面した癌周囲に認められる過形成変化を来した部位や正常胆管上皮において非常に高いこと、胆管上皮で発現が高い理由としては胆汁によるストレスなどが関係している可能性があることを回答した。さらに主査の秋田教授より、IGF-1R の染色強度の評価、転移巣での IGF-1R 発現の有無、今回の結果を受けてもう一度細胞株を用いた実験系に立ち返って検討をする必要があるか、IGF-1R の遺伝子変異や遺伝子増幅に関する報告はあるのか、という点につき質問があった。これに対して申請者は、染色強度との関連はないこと、転移巣では多くの症例で IGF-1R は高発現であり原発巣との関連性は見いだせなかったこと、IGF-1R 発現と肝転移が逆相関した意味合いを知るには IGF-1R 発現レベルを調節する因子を1つ1つ検討した上で *in vitro* における実験を設定していくことが必要であること、IGF-1R の遺伝子変異や遺伝子増幅についてはまだ報告がないことを回答した。

本研究は、免疫組織化学的手法を用いて IGF-1R 発現レベルを評価する際には膜表面の発現に注目することが重要であることを初めて示し、さらに IGF-1R 発現レベルの評価が予後予測に有用であることを示した点で高く評価された。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。