

学位論文題名

Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong Prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients

(発現頻度・発現パターンから見た大腸癌における
癌幹細胞マーカー CD133の臨床的意義についての検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

近年全身化学療法の進歩等に伴い大腸癌の治療成績は向上しているが、再発・遠隔転移に対する成績はいまだ満足できるものではない。

近年腫瘍細胞は一様でなく腫瘍細胞内に自己複製能と腫瘍細胞産生能を持つ細胞集団の存在が報告され「癌幹細胞」と言われている。この細胞集団は自身が分裂・増殖すると同時に分化した腫瘍細胞を生み出し腫瘍塊を形成する。またこの細胞集団は化学療法・放射線療法に抵抗性を示し、遠隔転移や腫瘍再発の原因とされる。

CD133 は分子量 120kDa の 5 回膜貫通型の糖蛋白で、実際の発現機構は不明な部分が多いものの、神経系・血液系・上皮系の幹細胞に発現が確認され、幹細胞マーカーと言われていた。近年脳腫瘍・大腸癌・前立腺癌・膵癌等で、この CD133 を使用して癌幹細胞の同定に成功したとする報告が認められ、さらにその発現は、予後を含めた臨床病理学的事項と関連しているとする報告もある。大腸癌においても同様の報告があるが、いずれも発現頻度からの報告で発現パターン(細胞膜発現・細胞質発現)も加味した報告は認めていない。そこで今回当科の大腸癌臨床検体を使用して発現頻度と発現パターンから CD133 の臨床的意義について検討した。

【対象と方法】

2001 年 1 月から 2007 年 12 月までの初発大腸癌手術症例 175 例中、高/中分化腺癌・stage I-IV(TNM 分類)の 151 例を対象とした。stage 0(TNM 分類)・多発大腸癌・他臓器重複癌症例は除外した。

組織学的解析では二人の独立した病理専門医により腫瘍の特徴が最も反映されている切片が抽出され、CD133 抗体(rabbit anti-human polyclonal CD133; Abcam)を使用した免疫染色を施行後、その発現頻度・発現パターンが評価された。

臨床病理学的事項と CD133 発現に関する統計学的解析は χ^2 乗検定と Student's t-tests を使用。生存率・無再発生存率の算出は Kaplan-Meier 法を使用、logrank test により比較検定した。各因子は単変量・多変量解析(Cox 比例ハザードモデル)を施行。P<0.05 を統計学的有意差ありとした。

【結果】

1) 対象症例の背景：平均年齢は 67.1 才(33-89)、男性 89 例/女性 62 例。高分化腺癌 59 例、中分化腺癌 92 例。TNM 分類 stage I : 28 例、stage II : 45 例、stage III : 41 例、stage IV : 37 例(肝転移 : 26 例)。リンパ管侵襲陽性 : 113 例、静脈侵襲陽性 : 81 例であった。

2) フォローアップ：平均観察期間 41 ヶ月(3-98)。45 例(29.8%)が死亡。死因は原癌死 : 38 例、他癌死 : 4 例、他病死 : 3 例。stage I-III の 114 例中、27 例(23.7%)に再発が確認された。

3) CD133 発現の評価：CD133 の発現は、151 例中 138 例(91.4%)で腫瘍細胞の細胞膜または細胞質に確認された。全視野の 50%以上の腫瘍細胞に発現が認められる CD133 過剰発現陽性例は 41 例(27.2%)

であった。

4) CD133 過剰発現と臨床病理学的事項：CD133 過剰発現と年齢、性別、腫瘍径、腫瘍占居部位、組織型、TNM 分類、肝転移、リンパ管侵襲、静脈侵襲との間に関連を認めなかった。

5) CD133 過剰発現と予後・再発：CD133 過剰発現陽性例の 5 年生存率は 45.5%で陰性例の 74.3%に比較し有意に不良であった ($p=0.002$)。stage I-III の 114 例の無再発生存率は CD133 過剰発現陽性例 61.9%、陰性例 76.7%で統計学的有意差は認めなかった($p=0.08$)。

6) CD133 発現パターンの評価：細胞膜発現 136 例(90.1%)、細胞質発現 44 例 (29.1%)で、42 例(27.8%)で両者の発現を確認した。細胞膜発現のみを示す症例は 94 例(62.3%)であったが、細胞質発現のみを示す症例 は 2 例 (1.3%)だけであった。細胞膜発現が全視野の 50%以上の腫瘍細胞に認める細胞膜過剰発現陽性例は 25 例 (16.6%)に認められた。

7) CD133 発現パターンと臨床病理学的事項：細胞膜過剰発現は高分化腺癌に有意に多く($p=0.019$)、細胞質発現は、中分化腺癌($p=0.0002$)・リンパ節転移陽性($p=0.0009$)・ TNM stage (III + IV, $p=0.03$)・リンパ管侵襲陽性($p=0.0009$)例に有意に多く認められた。

8) 細胞膜過剰発現と予後・再発：細胞膜過剰発現陽性例は、陰性例に比較し生存率において有意に低率($p=0.0008$)であった。同様の傾向は無再発生存率にも見られたが有意差は認めなかった($p=0.12$)。

9) 細胞質発現と予後・再発：細胞質発現陽性例は、陰性例に比較し生存率において有意に不良($p=0.01$)で、さらに無再発生存率においても細胞質発現陽性例は有意に不良($p=0.004$)であった。

10) 生存に関する解析：単変量解析では、TNM 分類での T 因子、N 因子、M 因子、肝転移、TNM 分類 stage、リンパ管侵襲、静脈侵襲、細胞膜過剰発現、細胞質発現、CD133 過剰発現が有意な予後因子であった。腫瘍関連因子による多変量解析では TNM 分類 M 因子($p<0.05$)と細胞膜過剰発現($p=0.003$)・CD133 過剰発現($p=0.005$)は独立した予後規定因子となった。

11) 無再発生存に関する解析：単変量解析では、組織型、TNM 分類 N 因子、リンパ管侵襲、静脈侵襲、細胞質発現が有意な因子であった。腫瘍関連因子による多変量解析では細胞膜過剰発現が独立した予後規定因子($p=0.008$)であった。

12) CD133 発現と化学療法抵抗性：画像上計測可能な評価病変を有する stageIV・再発の 33 例を対象に化学療法の効果を検討した。効果判定は RECIST 評価基準に従った。CD133 過剰発現・細胞質発現症例では、病勢コントロール率 (CR+PR+SD) に統計学的有意差を認めなかったが、細胞膜過剰発現症例では、陽性例の 14.3%(1/7)に比し陰性例は 57.7% (15/26)で、陽性例は有意に病勢コントロール率が低率($p=0.04$)であった。

【考察】

CD133 は大腸癌の癌幹細胞マーカーとされる。しかしこれまでの報告では、癌幹細胞の特徴である自己複製能と腫瘍細胞産生能を持った細胞は CD133 陽性細胞 262 個中 1 個の割合と推測されている。また近年 CD133 陰性細胞の中にも癌幹細胞様の特徴を持つ細胞集団が存在するとの報告もあり、CD133 陽性細胞集団だけに癌幹細胞としての特徴を求めることは困難である。そこで今回あらためて大腸癌における CD133 発現の臨床的意義を発現頻度・発現パターンの両方から検討した。

今回の CD133 抗体(rabbit anti-human polyclonal CD133 ; Abcam)を使用した検討では、大腸癌における CD133 の発現率はこれまでの報告よりやや高率であったが、予後と関係している点はこれまでの報告と一致していた。CD133 の発現パターンは細胞膜発現と細胞質発現に 2 分されたが、これまでの報告では細胞膜にのみ発現を認めたとして評価されている報告が大半で、細胞質発現は今回の検討を含めて少数にとどまる。しかし膵癌・肝細胞癌・神経膠腫・卵巣癌などでは主に細胞質に発現したと報告されている。

このような免疫染色における細胞内での発現の局在性について検討されたマーカーとしては、CD24と HER-2がある。その報告の中では、局在性の原因として細胞内での標的蛋白の過剰産生や分配・退化障害、さらに一方が人工産物であったり交差反応の可能性も報告されている。

CD133 発現における細胞内の局在が、それぞれ異なった細胞機能を反映しているかは不明であるが、今回の検討ではそれぞれに臨床的意義が確認された。細胞膜過剰発現は予後や化学療法抵抗性と関連し、細胞質発現はリンパ節転移を含めた腫瘍進行度と関連した。CD133 過剰発現例では有意が予後不良なことからも、CD133 陽性細胞には癌幹細胞としての純粋な分化能等の他に、悪性度の指標となる浸潤能や遠隔臓器への転移増殖能といった特徴を併せ持っている可能性が示唆される。また今回の検討からは再発に至る要因としては細胞質発現での腫瘍進行度が主に影響し、再発後には細胞膜過剰発現での化学療

法抵抗性が影響し、CD133 陽性症例全体の予後不良の原因となっている可能性が示唆された。細胞膜⇄細胞質間での発現蛋白の移動が異なった表現型となる可能性を示唆する報告もあり、今後も検討が必要である。

【結論】

大腸癌において、免疫染色による CD133 の発現頻度・発現パターンを評価することは、再発・化学療法感受性・予後を予測するのに有用であった。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 松 野 吉 宏

副 査 教 授 田 中 伸 哉

副 査 教 授 藤 堂 省

副 査 准教授 神 山 俊 哉

学 位 論 文 題 名

Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong Prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients

(発現頻度・発現パターンから見た大腸癌における
癌幹細胞マーカー CD133の臨床的意義についての検討)

近年腫瘍内に自己複製能と腫瘍細胞産生能を持つ細胞集団「癌幹細胞」の存在が注目されている。この癌幹細胞は、自身が分裂・増殖すると同時に分化した腫瘍細胞を生み出すことで腫瘍塊を形成する。また化学療法・放射線療法に抵抗性を示し、遠隔転移や腫瘍再発の原因とされる。CD133は大腸癌における癌幹細胞マーカーとされ、発現頻度と予後を含む臨床病理学的事項との関連が報告されているが、発現パターン（膜発現・細胞質発現）も加味した報告は認めていない。

本研究では 2001 年 1 月から 2007 年 12 月までの初発大腸癌手術症例 175 例中、高/中分化腺癌・stage I-IV (TNM 分類) の 151 例を対象に、CD133 抗体 (rabbit anti-human polyclonal CD133; Abcam) を使用した免疫染色を施行、CD133 の発現頻度と発現パターンを解析し、その臨床的意義について検討した。

その結果、1) CD133 の発現頻度は 91.4% (133/151) で、発現パターンとしては膜発現と細胞質発現に 2 分された。2) 全視野の 50% 以上の腫瘍細胞に発現が認められる CD133 過剰発現群は 27.2% (41/151) で、各臨床病理学因子との間に関連を認めなかったが、生存率は有意に不良で、多変量解析にて独立した予後規定因子となった。3) 膜発現は 90.1% (136/151)、細胞質発現は 29.1% (44/151) に観察され、27.8% (42/151) の症例で両者の発現が混在した。

4) 膜発現が全視野の 50% 以上の腫瘍細胞に認める膜過剰発現群は 16.6% (25/151) で、高分化腺癌症例に多く発現。また有意に生存率が低率で、多変量解析の結果生存・再発の予後規定因子であった。さらに画像上計測可能な病変を有する stage IV・再発の 33 例で化学療法の効果を検討すると膜過剰発現群のみ、病勢コントロール率 (CR+PR+SD) が有意に低率であった。

5) 細胞質発現群は中分化腺癌症例に多く、リンパ節転移・TNM stage (III + IV)・リンパ管侵襲などの腫瘍進行度と有意に関連した。この細胞質発現群は陰性例に比較し生存率、無再発生存率において有意に不良であったが、多変量解析では独立した規定因子とはならなかった。

6) 大腸癌幹細胞は CD133 陽性細胞 262 個中 1 個の割合とされる。さらに CD133 陰性細胞にも癌幹細胞の特徴を持つ細胞集団が確認されたとの報告から、CD133 陽性細胞集団だけに癌幹細胞の特徴を求めることは困難である。7) 今回の検討で、再発に至る要因として細胞質発現での腫瘍進行度が主に関与し、再発後には膜過剰発現での化学療法抵抗性が関与し、それが CD133 陽性症例全体の予後不良の原因となっ

ている可能性が示唆された。8) CD133陽性細胞は癌幹細胞としての特徴の他に、細胞質発現細胞は腫瘍進行度に関する遊走能・浸潤能・リンパ節や遠隔臓器への転移増殖能を持ち、膜発現細胞にはABCトランスポーターやMDR1が優位に発現している可能性があった。

発表後、副査の田中教授から1) 対象症例を高・中分化腺癌とした理由、2) CD133発現の化学療法抵抗性の臨床応用の質問があり、申請者は1) 低分化腺癌や印環細胞癌・粘液癌などの特殊型では症例数が少ない割に腫瘍自体の悪性が非常に高いためCD133の解析に不向きと判断したこと、2) 対象症例の化学療法のレジメも同一ではなく、症例数も多くないので今後の検討課題と回答した。副査の神山准教授から遠隔転移巣でのCD133の発現状況の質問があり、申請者は原発巣と比較してCD133の発現頻度・パターンは多くの場合類似し、CD133陽性細胞が転移巣形成の主体となっている可能性があることと回答した。副査の藤堂教授から1) 大腸癌においてCD133以外に可能性のある癌幹細胞マーカーについて、2) 腫瘍細胞内でのCD133発現の局在性についての質問があった。申請者は1) これまでの報告からCD44、CD166、Lgr5、SOX2、OCT4などがあり、CD133と組み合わせることでより癌幹細胞を抽出できる可能性があること、2) 細胞質発現が腫瘍内の分化度の低い部分に多く発現したことを報告した。最後に主査の松野教授から1) 発癌過程におけるCD133の関与について、2) 実臨床において再発の高リスク群などを抽出できる可能性についての質問があった。申請者は、1) 腺腫と癌ではCD133の発現にかなりの差があることから、正常幹細胞→癌幹細胞の過程でCD133が何らかの関与をしている可能性があること、2) 臨床的にstageIIにおける再発のリスク要因についてエビデンスレベルの高いものが無い中、今回stage別の層別解析（特にstageII）でも、発現パターンから再発率に差を認めていることから、リスクファクターの1つに成り得ると回答した。いずれの質問にも妥当な回答をなした。

本研究により大腸癌においてCD133の発現頻度・発現パターンを評価することは、再発・化学療法感受性・予後を予測するのに有用であることが確認された。この論文は、CD133が大腸癌において癌幹細胞マーカーとしてだけでなく、その発現頻度・発現パターンがそれぞれ臨床的意義を持つ点を示唆したことで高く評価され、今後のさらなる症例の蓄積による検討とその臨床応用が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、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判定した。