

学 位 論 文 題 名

Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma

(CD133 細胞質発現は肝細胞癌における重要な予後因子である)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】

肝細胞癌の患者数は 2002 年の統計によると全世界で 626000 人で、皮膚を除く悪性腫瘍の 5.7%を占めている。手術等の治療を行っても高率で局所再発、転移を来し予後不良の疾患である。近年悪性腫瘍において腫瘍細胞の中に自己複製能と多分化能を持つ少数の癌幹細胞が存在するという cancer stem cell theory が提唱され、癌幹細胞は治療の本質的な標的と考えられ研究が進められている。癌幹細胞は乳癌、膵癌、肺癌、大腸癌など種々の癌において同定されている。CD133 は CD34 陽性の造血幹細胞から同定された幹細胞マーカーであるが、脳腫瘍など種々の癌幹細胞の同定にも用いられており、肝細胞癌においては CD133 陽性の腫瘍細胞が癌幹細胞の性質を有するという報告が見られる。そこで我々は肝細胞癌において癌幹細胞マーカーとされる CD133 を発現する腫瘍細胞を検索し、組織型、脈管侵襲などの臨床病理学的因子および再発、予後との関連について検討した。

【対象と方法】

2000 年から 2005 年の間に北海道大学病院第一外科で初回根治的肝切除を受けた肝細胞癌 136 例を対象とした。観察期間の中央値は 58.5 ヶ月、平均値は 60.1 ヶ月である。各肝細胞癌切除病理検体の、腫瘍部/非腫瘍部を含む代表的 1 切片を選択し、HE 染色で組織像を確認し CD133 の免疫組織化学染色を施行。切片の全視野を観察し、1 強拡大視野(x400)当たりの腫瘍細胞数に占める染色陽性細胞数を計測。細胞 1 個以上染色される場合染色陽性とした。さらに細胞内染色パターンを細胞質陽性、細胞膜陽性に分類し臨床病理学的因子との関連につき統計学的検討を行った。統計は χ^2 test, t test を用い、生存曲線は Kaplan-Meier 法を、比較は log rank test で行った。多変量解析には Cox 比例ハザードモデルを用いた。

【結果】

肝細胞癌 136 例中 30 例(22%)で CD133 陽性を示し、CD133 細胞質陽性群 22 例(16%)、CD133 細胞膜陽性群 20 例(15%)であった。CD133 陽性は AFP 高値($p=0.034$)、分化度が低分化であること($p=0.00003$)と有意に関連した。CD133 細胞膜陽性は遠隔再発($p=0.028$)、分化度が低分化であること($p=0.0007$)と、CD133 細胞質陽性は AFP 高値($p=0.009$)、分化度が低分化であること($p=0.00006$)と関連した。CD133 陽性は再発、生存には関与しなかったが、CD133 細胞質陽性群は陰性群に比べて予後不良であった($p=0.04$)。CD133 細胞膜発現は再発、生存との関連はなかった。stage3, 4A 症例では CD133 細胞質陽性群は単変量解析で有意に予後不良($p=0.0092$)で、多変量解析では $p=0.068$, Risk Ratio=2.604, 95%CI=0.931-7.299 であったが、単変量解析で有意であった腫瘍因子の AFP、腫瘍径、組織学的門脈侵襲、CD133 細胞質発現のうち最も有力な予後不良因子であった。

【考察】

本研究では肝細胞癌において CD133 陽性は AFP 高値、低分化腫瘍と関連が見られた。Song らは肝細胞癌 60 例の検討で CD133 陽性は再発、予後に関する独立した因子であるとしているが、Salnikov らの報告では肝細胞癌 12 例の検討において臨床病理学的因子との関連は認められない。従来報告と今回の結果の乖離の原因としては使用した抗体や染色法の違い、検体の質、対象とした症例の tumor grade や Stage の違いなどが考えられる。しかし臨床検体を用いた検討はまだ少数であり、CD133 陽性の臨床的意義についてはさらなる検討が必要である。

CD133 の染色パターンと予後に関しては細胞質全体に弥漫性に染色されるパターンが Gastrointestinal stromal tumor や正常網膜細胞に、核周囲に dot 状に染色されるパターンが神経膠芽腫や膵管癌、卵巣癌、骨髄性白血病に見られるという報告がある。染色パターンと予後についての検討がなされているのは卵巣癌で検討した 1 文献のみであり、本症例は肝細胞癌において CD133 細胞質発現パターンと予後との関連を示した初めての報告である。CD133 の細胞質発現に関しては、Maw らによると常染色体劣性網膜変性疾患では CD133 の frameshift mutation を認め、合成された蛋白は細胞表面に輸送されないとの報告がある。CD133 と同様に本来は膜発現する EGFR は肺の扁平上皮癌や前癌病変において細胞質発現が見られ、Golgi 装置から細胞膜への輸送が阻害されているか、膜にある EGFR が急速に分解されている過程を観察しているものとかんがえられている。CD133 の機能は明らかとされておらず、細胞質発現の意義も確立されていないが、膜発現している CD133 の急速分解の過程を見ている、細胞膜への輸送傷害がある、もしくは不完全に翻訳された蛋白が細胞質に留まっているなどの可能性が考えられさらなる研究が必要である。

肝細胞癌の再発形式には多中心性発生と、肝内転移があげられる。腫瘍径の小さい肝細胞癌の切除後再発は殆どが de novo 発癌の多中心性発生であり、大きな肝細胞癌に関しては血管侵襲が度々認められその再発には血行性転移がより多く関わっていると考えられる。Cancer stem cell theory から考えると血行性転移がより癌幹細胞に関連していると思われるが、本研究では AFP 値、低分化腫瘍、血管侵襲など腫瘍の悪性度がより高い、つまり Stage の高い腫瘍において CD133 細胞質陽性と予後に強い関連が見られており CD133 細胞質陽性は肝細胞癌における癌幹細胞のマーカーとして有用である可能性が考えられる。CD133 の細胞内局在と種々の腫瘍における癌幹細胞との関係についてはさらなる検索が必要である。

【結論】

肝細胞癌において CD133 発現は AFP 高値、低分化に関連が見られた。CD133 細胞質発現は肝細胞癌における予後不良因子であり、進行した stage が高い症例でその傾向を強く認めた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 浅 香 正 博
副 査 教 授 松 野 吉 宏
副 査 教 授 田 中 伸 哉
副 査 教 授 藤 堂 省

学 位 論 文 題 名

Cytoplasmic expression of CD133 is an important risk factor for overall survival in hepatocellular carcinoma

(CD133 細胞質発現は肝細胞癌における重要な予後因子である)

初回根治的肝切除を行った 136 例の病理検体の代表的一切片を用いて CD133 免疫染色を施行し腫瘍細胞の染色陽性率、パターンを検索。染色性陽性検体をさらに細胞膜陽性群、細胞質陽性群に分類し、臨床病理学的因子、再発、予後との関連を検討。30/136 例(22%)で CD133 陽性を示し、細胞質陽性群 22 例(16%)、細胞膜陽性群 20 例(15%)であった。CD133 陽性は AFP 高値($p=0.034$)、低分化($p=0.00003$)と有意に関連した。細胞膜陽性は遠隔再発($p=0.028$)、低分化($p=0.0007$)と、細胞質陽性は AFP 高値($p=0.009$)、低分化($p=0.00006$)と関連した。CD133 細胞質陽性群は陰性群に比べて予後不良であった($p=0.04$)。stage3, 4A 症例では CD133 細胞質陽性群は単変量解析で有意に予後不良($p=0.0092$)で、多変量解析では $p=0.068$, Risk Ratio=2.604, 95%CI=0.931-7.299 であったが、単変量解析で有意であった腫瘍因子の AFP、腫瘍径、組織学的門脈侵襲、CD133 細胞質発現のうち最も有力な予後不良因子であった。

公開発表後、まず松野教授から①本研究で CD133 の検出率は 20%であったがこれは肝臓に特異的なものであるか、アッセイによるものか、②臨床検体を用いた他の報告では蛍光染色を用いているが本研究と直接比較して遜色ないか、③CD133 の陽性感度が低いが今後どのように臨床応用したらよいかについて質問があった。それらに対し、①肝臓においては培養細胞を用いた場合 CD133 の分画は多いもので 40%程度であるが臨床検体では不詳であり、アッセイの違いによる結果とも考えられる。②凍結標本を用いて蛍光染色を行っているものの使用している抗体はほぼ同様のものであり結果の比較には大きな問題はないと思われる。③血管侵襲などで染色性に差が得られないか検討したが有意な染色性は得られなかったため、今後検体数を増やして検討したいと回答した。

また田中教授から、①肝細胞癌における CD133 の癌幹細胞としての位置づけ、②臨床検体における CD133 の特徴的な局在の有無、染色陽性率について、③脳腫瘍においては CD133 のプロモーター解析でメチル化が関連していると報告しているが肝細胞癌においてはどうかについて質問があった。これらに対して申請者は、①CD133 陰性細胞の中にも腫瘍形成能が見られ、CD90+CD44+など別のマーカーも候補とされ CD133 のみが癌幹細胞のマーカーではないと考えられる。②血管侵襲や肝内転移などを含む検体も検討しているが局在について特徴的な結果は得られなかった。陽性率が多いところでも 9%程度で

非常に少なかった。③2010年のHepatologyでHuH7細胞においてTGFβがDNA methyl transferasesを阻害してCD133の発現を増強させることが証明されていると回答した。

主査の浅香教授より、①CD133は幹細胞そのものというよりは幹細胞マーカーとして考えていいのか、②CD133陽性癌幹細胞に対する治療の位置づけは、③CD133の細胞質、細胞膜発現の意義、④CD133とAFPの関連は、⑤今後どのように臨床応用するか等の質問があり、これらに対しては①CD133は幹細胞のマーカーであると考えている、②培養細胞においてはAkt/PKB pathwayなどを通じて5FU等に耐性を示すことが示されているが薬剤によってその耐性活性が下がることが報告されている、③膜発現に関しては通常のCD133発現パターンであるが、細胞質発現については不完全に翻訳された蛋白が細胞質に留まっている、膜発現蛋白の急速分解過程を観察している可能性などのほかに神経細胞においてはCD133が一部細胞質にも見られているという報告があり、それがanti-apoptoticな働きをしている可能性も考えられる、④培養細胞においてはCD133陽性分画でAFP mRNA発現レベルが高いという報告がある、⑤FACSなど他のモダリティを用いて検出率を上げることで予後不良症例を分類し治療応用につなげたい等と回答した。また藤堂教授からは外科においてもbasic scienceに基づいた治療が必要であること、肝細胞癌に関してはEpCAM, AFPで分類した予後不良因子も報告されており今後さらに研究を進めていく必要があるとのコメントがあった。

本論文はCD133の細胞質発現が肝細胞癌の予後不良因子で、癌幹細胞マーカーとして有用である可能性を報告した論文であり、今後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。