

博士の学位論文審査結果の要旨

山本晋也

横浜市立大学大学院医学研究科 消化器・腫瘍外科学専攻

審査員

主査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 谷口 英樹

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 窪田 吉信

副査 横浜市立大学大学院医学研究科教授 藤内 祝

博士の学位論文審査結果の要旨

癌幹細胞マーカーCD133 と大腸癌肝転移に関する検討

近年癌幹細胞の概念の重要性が提唱されているが、その多くが原発巣における研究に基づくものであり、転移巣での癌幹細胞の位置付けについてはほとんど報告がみられない。本研究は、大腸癌肝転移巣検体を用いて、①原発巣と転移巣で癌幹細胞マーカー発現が同一であるか、②転移巣での癌幹細胞マーカー発現は予後規定因子になり得るかを明確にすることを目的とした。1998年から2008年までに当科で切除術を施行した大腸癌肝転移症例103例を対象とした。このうち44例は原発巣での評価も行った。CD44、CD133の免疫組織学的発現を検討した。また浸潤能、増殖能、抗癌剤耐性能を評価するためMIB-1、E-カドヘリン、ABC-G2の発現に関しても検討した。CD44の発現率は原発巣で41.4%、転移巣で58.7%であり、原発巣と転移巣で相関は認めなかった。同様にCD133の発現率は原発巣で53.6%、転移巣で44.6%であり、原発巣と転移巣で発現に相関は認めなかった。肝転移巣のCD133発現は独立予後良好因子であった。肝転移CD133陰性群は陽性群に比し有意にMIB-1 indexが高く、E-カドヘリン発現が低かった。原発巣と転移巣でCD133発現に相関は認めなかった。肝転移巣のCD133陰性は予後不良因子であり、増殖能や浸潤能に関連している可能性があると考えられた。

審査にあたり、以上の論文内容の説明がなされた後、以下の質疑応答が行われた。

まず、窪田副査より以下の質問がなされた。

- 1) 予後との関係ではなく、原発巣CD133発現と肝転移の頻度(例えばCD133発現が多い群が肝転移を起こしやすい)については検討したのか。
- 2) CD133陰性群が予後が悪いということだが、増殖能が高いという部分は理解できるが、浸潤能に関しては矛盾があるのではないか。CD133発現と肝転移頻度は無関係とのことだが、CD133陰性群で浸潤能が高いというのは矛盾するのではないのか。肝転移巣切除後からの再発は肝転移巣から転移をきたしているのか、あるいは原発巣から転移をきたしているのか。
- 3) 癌幹細胞が多いと一般的には予後が悪いといわれている。今回の結果は陰性

群が予後不良とのことだが、整合性はあるのか。

4) 今回の検討は肝転移巣切除後のあと化学療法が加わった症例か、それとも手術のみの症例なのか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1) 検討したが、特に CD133 発現が多いから肝転移をきたしやすいといったことは認めなかった。また過去の報告でも CD133 発現と肝転移の頻度は相関がなかったという報告があった。

2) 原発巣での発現と肝転移巣での発現では役割がことなる可能性がある。また肝転移頻度と浸潤能は相関しない可能性もある。

肝転移巣切除後からの再発は肝転移巣から転移をきたしているのか、あるいは原発巣から転移をきたしているのかについて特定するのは過去の報告でも困難であり、今回も特定をころみたが、方法がみあたらなかったため同定できていない。しかしある一定の割合で肝転移巣からの転移もあり、その部分で CD133 陰性群で浸潤能が高いという結果が影響している可能性がある。

3) 癌幹細胞が悪性度が高いとは限らず、報告でも少数ではあるが、癌幹細胞高発現群が予後がよいという報告もある。また今回の検討では転移巣での発現であり、原発巣での発現とは意味合いが異なる可能性もある。CD133 が癌幹細胞マーカーとしての役割ではなく、CD133 機能のうち、他の機能に関しての結果かもしれない。

4) 今回の検討は肝転移巣切除後、化学療法が施行されている症例や、手術単独群など様々である。それらの影響も今回の結果に反映している可能性がある。

次に藤内副査より以下の質問がなされた。

1) いろいろ癌幹細胞マーカーがあり、また同一癌幹細胞マーカーでも結果が逆になっている報告が存在する。今回のように CD133 発現が一般的な結果と逆になったことはどのように考察するのか。

2) CD133 原発巣と予後は示されたが、CD44 原発と予後についてはどうなのか。

3) 転移巣での発現に注目したことは新しいが、リンパ節転移に関してはどうか。

4) 原発巣手術後の治療はどのようなものか。

5) 今回の検討を臨床応用する場合、どのようなことが可能なのか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1) CD133 に関しては、今回は癌幹細胞マーカーとしての役割ではなく、違った機能について推察している。

つまり CD133 が腫瘍の悪性度に関するなんらかの制御を行っており、CD133 が陰

転化することでその制御が外れ、悪性度が高まったといった考察をしている。

2) CD44 原発巣発現と予後についても同様に相関は認められなかった。

3) ご指摘の通り、リンパ節転移に関する検討も行う必要があったと考える。原発巣-リンパ節転移、あるいは同じ転移巣でもリンパ節転移と肝転移巣でどのように異なるか検討すべきであったと考える。肝転移巣 103 例のうち原発巣手術において 74 例の症例でリンパ節転移を認めており、今後の課題としたい。

4) 原発巣手術後にはリンパ節転移あり、あるいは無でも高リスク群では術後に補助化学療法が追加される。内容は様々であり、新規薬剤が開発されたことや、主治医判断で同一レジメンではない。また肝転移巣が発見された場合に、肝転移手術前の術前化学療法が施行された症例もある。さらに肝転移巣術後の補助化学療法の有無もあり、治療内容は多岐にわたる。

5) 予後不良群で補助化学療法を加える、化学療法のレジメンを変更するなどの方法があるが、今回の検討だけではまだその段階ではないため、今後さらなる検討を加えていき、臨床応用できるよう努力したい。

次に、谷口主査より以下の質問がなされた。

1) CD133 発現を確認する方法について、先行研究ではどのようなものがあったのか。

2) 方法論に関してはプレゼンテーションでは簡単に触れられるのみであったが、この点は非常に重要であり、免疫染色法で陽性と判断する根拠はどのようなものか。染色強度を加味した場合や cut off を変更した場合、結果が異なる可能性があるのではないのか。

3) 陽性閾値を 10% にしているが、その設定はどのようにして行ったのか。免疫染色法では染色の“むら”などが存在し、陰性群の症例が陽性群に入る可能性も存在するのではないのか。判定方法に関しては、もっと慎重に、また定量化するなどの工夫が必要であったのではないのか。

4) 再発形式をみると有意差はないとのことだが、CD133 陰性群で肝転移が多いのではないのか。

5) 原発巣 CD133 発現と生命予後は相関しないとのことだが、CD133 発現と肝転移が生じる頻度との関係はどうか。

以上の質問に対し、以下の回答がなされた。

1) 免疫染色だけの研究もあるが、mRNA 定量を用いた研究も数多く存在する。

免疫染色の場合、cut off 値については 10% 以上を陽性とした先行研究が多いが、50% を cut off 値とした研究や染色強度と割合を総合的に判断している先行研究も存在する。

- 2) ご指摘の通り、今回は過去の報告に則り、先行研究において最も多く cut off 値として採用されていた 10%という値を用いた検討のみであった。ご指摘のように、染色強度を加味した場合や cut off 値を変更した場合、最終的な結論がかわっていた可能性がある。
- 3) 基本的には腫瘍の辺縁をカウントの対象とし、弱拡大で検鏡し、腫瘍の特徴をもっとも反映していると考えられる部分を強拡大で 1000 個カウントした。ご指摘の通り、免疫染色のみでは結果の信頼性が劣ると考えられる。定量化が必要であり、qPCR などを行う必要があったが、予後を検討できるために用いる以前の症例は凍結検体が保存されていないため、現実的には検討できなかった。しかし、凍結検体での検討は必要であるため、現在、当教室では凍結検体を保存するようにしており、今後の課題としたい。
- 4) ご指摘の通り、有意差は認められなかったが、CD133 陰性群の方が症例数が多い影響もあるが、CD133 陰性群で残肝再発が多い結果であった。そのことが今回の検討にどのように影響するかは定かではないが、重要なことであったと考える。
- 5) 原発巣 CD133 発現の検討 (2003-2004 年に教室で切除した全大腸癌原発巣手術症例の検討) は、その中で肝転移を来した症例は非常に少なく、検討として不十分ではあるが、原発巣 CD133 発現と肝転移再発頻度とは相関はなかった。

その他幾つかの本研究に関する質問がなされたが、いずれにおいても適切な回答がなされた。以上の審査の結果、本研究は大腸癌肝転移例の予後診断に関する癌幹細胞マーカー発現の有用性を示したものであり、博士（医学）の学位に値するものと判定された。