

学位論文の全文の要約

**Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer**

(大腸癌の腫瘍再構築における CD44 variant2 の重要性と予後予測因子としての意義)

**Ozawa Mayumi**

**小澤 真由美**

Gastroenterological Surgery

Yokohama City University Graduate School of Medicine

横浜市立大学 大学院医学研究科 医科学専攻 消化器・腫瘍外科学

(Research Supervisor : Hideki Taniguchi, Professor )

(研究指導教員：谷口 英樹 教授 臓器再生医学)

(Doctoral Supervisor : Itaru Endo, Professor)

(指導教員：遠藤 格 教授)

## 学位論文全体の要約

### Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer

(大腸癌の腫瘍再構築における CD44 variant2 の重要性和と予後予測因子としての意義)

#### 【序論】

正常組織の発生、成長、修復には幹細胞の存在が欠かせないが、腫瘍の形成においてもがん幹細胞を頂点とした階層的な細胞社会が存在するという概念が提唱されている。腫瘍形成能はこれら少数のがん幹細胞のみが有するとされ、さらにはがん幹細胞は化学・放射線療法に耐性を示し、転移・再発など予後に関与するイベントを引き起こす特別ながん細胞であるとされる (Reya et al, 2001, Jessup et al, 1989)。しかし、固形腫瘍ではそのheterogeneityのため決定的なマーカーの同定が進んでいない。

大腸癌におけるがん幹細胞関連マーカーには CD24, CD29, CD44, CD133, CD166, epithelial cell adhesion molecule (EpCAM), Musashi-1, Aldehyde dehydrogenase-1 (ALDH1), さらには腸管幹細胞として同定された leucine-rich-repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5)などが報告されている (Todaro et al, 2010)。中でも CD133, CD44 は腫瘍形成能を有する細胞のマーカーとして注目されてきたが、大腸癌原発巣から得られた細胞の腫瘍形成能におけるマーカーとしての評価は十分ではなかった (Ricchi-Vitiani et al, 2007; O'Brien et al, 2007; Dalerba et al, 2007; Du et al, 2008)。本研究の目的は大腸癌原発巣から分離したがん細胞による腫瘍形成能の確認を行い、CD133, CD44 を含む大腸癌または大腸正常粘膜の幹細胞として報告された各マーカーの重要性を明らかにし、予後予測マーカーとしての価値を評価することである。

**【実験材料と方法】**外科的に切除された大腸癌 77 例を直ちに単細胞化しフローサイトメトリを施行した。CD133, CD44 発現により細胞を分離し、各分画を NOD/SCID マウスの皮下に移植し腫瘍形成アッセイを施行した。皮下癌移植片 (xenograft) の遺伝子発現解析から、腫瘍再構築における重要なマーカーを同定した。さらに大腸癌 167 例から作成された cDNA ライブラリ (Oshima et al, 2008)を用いて各マーカーの発現と予後予測因子としての重要性を評価した。

**【結果】**CD44<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>, CD133<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>の各細胞分画は未分離の総細胞よりも有意に高い腫瘍形成能を示したがマーカーによる差は認められなかった(表 1)。

表 1. 腫瘍形成アッセイ結果.

Cell fractions	The ratio of tumor formation with the indicated cell number injected					Cancer stem cell frequency (95%CI)	<i>p</i> -value
	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>		
Total cells		2/5(40%)	13/19(68%)	16/21(76%)	6/8(75%)	1/39318 (1/63691–1/24272)	
CD133 <sup>+</sup>	0/2(0%)	3/13(23%)	1/3(33%)			1/8940 (1/26657–1/2999)	0.022
CD133 <sup>-</sup>	0/1(0%)	0/1(0%)	3/16(19%)	2/3(66%)		1/64145 (1/165715–1/24829)	0.311
CD44 <sup>+</sup>	1/3(33%)	5/13(38%)	0/2(0%)			1/5111 (1/14317–1/1825)	<i>p</i> <0.001
CD44 <sup>-</sup>	0/4(0%)	1/5(20%)	2/13(15%)	0/2(0%)		1/108249 (1/392006–1/29892)	0.059
CD133 <sup>+</sup> CD44 <sup>+</sup>	1/4(25%)	4/8(50%)	1/2(50%)			1/3160 (1/9518–1/1050)	<i>p</i> <0.001
CD133 <sup>+</sup> CD44 <sup>-</sup>	0/6(0%)	0/4(0%)	0/2(0%)			–	–
CD133 <sup>-</sup> CD44 <sup>+</sup>	0/2(0%)	0/9(0%)	2/6(0%)			1/29317 (1/116179–1/7398)	0.703
CD133 <sup>-</sup> CD44 <sup>-</sup>	0/2(0%)	1/5(20%)	1/5(20%)	0/1(0%)		1/74794 (1/409064–1/13676)	0.338

限界希釈法にて大腸癌検体から得られた各分画細胞, 総細胞のがん幹細胞頻度を求めた. 得られた細胞についてはNOD/SCID マウスの皮下に移植した. 腫瘍形成については移植後 20 週まで毎週評価した. CI: confidence interval (信頼区間)

Xenograft における CD133, CD44, LGR5, Musashi-1, CD166, ALDH1, NANOG, BMI1, EphrinB2, EphrinB3 の発現は正常粘膜, 原発巣と比較し発現が上昇していたがいずれも有意差はなかった. CD44 については variant が存在し(Ohata et al, 2012; Al-Maghrabi et al, 2012), 特に CD44 variant 2 (CD44v2) は正常粘膜と比較し, 腫瘍と xenograft で発現が有意に上昇していた(図 1).

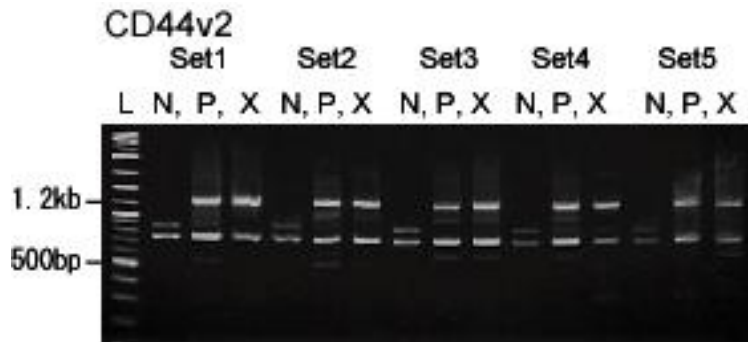


図 1. 正常粘膜, 原発巣, xenograft における CD44v2 の発現.

5 セット全てにおいて正常組織と比較し xenograft にて CD44v2 の発現が上昇している傾向にあった. CD44v2 に特徴的なバンドは 1.2Kb. L; Ladder, N; normal mucosa, P; Primary tumour, X; Xenograft (n=5)

cDNA ライブラリにおいて、Xenograft 解析で高発現傾向にあったマーカーの発現を検討したところ、CD133, CD44 (CD44 variant 2), LGR5, EphB2, Musashi-1 は正常組織に比較して腫瘍組織で有意に高発現であったが(図 2A), Bmi1 や NANOG ではその傾向を認めなかった。予後解析では CD44v2 高発現グループ (n=84、5-year overall survival (5-OS); 74%) は低発現グループ (n=83, 5-OS; 88%) と比較して有意に予後不良であった(図 2B)。単変量解析で有意差を認めたマーカーは CD44 のみであり、さらに多変量解析でも病期、術後補助化学療法と並んで独立した予後予測因子であった。

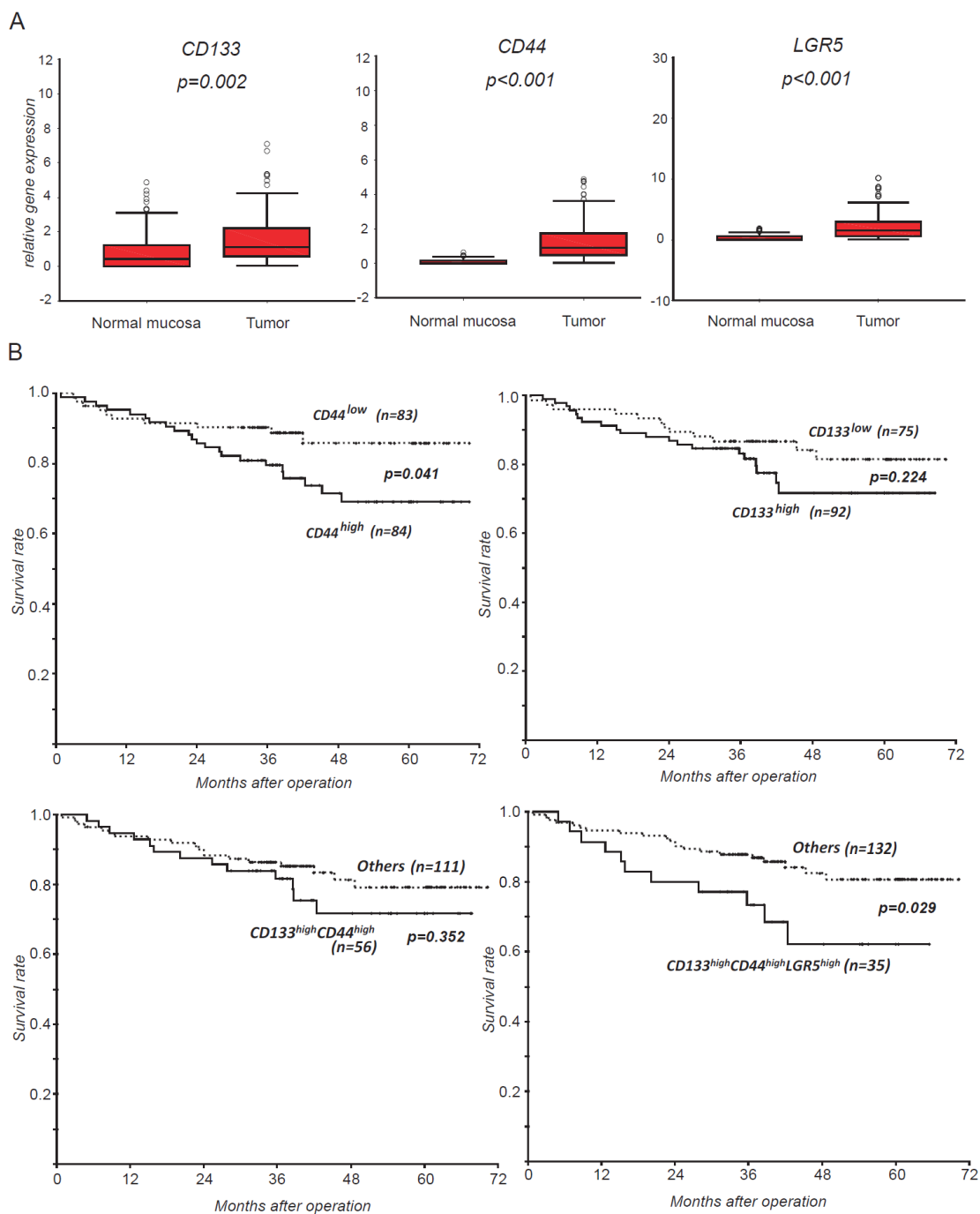


図 2. 正常組織，腫瘍組織における遺伝子発現解析と各マーカーにおける 5 年生存率 (n=167). CD133, CD44, LGR5 とともに xenograft にて有意に高発現であった ( $p=0.002$ ,  $p<0.001$ ,  $p<0.001$ ) (A). CD133, CD44, CD133/CD44, CD133/CD44/LGR5 の発現相違による全生存期間の Kaplan-Meier 解析 (B).

**【考察】**CD44, CD133 は原発巣におけるがん幹細胞関連マーカーであることが示唆された。なかでも CD44 variant 2 は腫瘍再構築の際に重要であることに加え、予後予測因子としての意義を認めた。今後、転移における役割や腫瘍再構築のメカニズムを含めさらに追及する必要性があると考えられる。

**【結語】**大腸癌において CD44 variant2 はがん幹細胞マーカーとして重要であり、予後予測因子として有用であると考えられた。

### 引用文献

Al-Maghrabi,J., Gomaa,W., Buhmeida,A., Al-Qahtani,M. Al-Ahwal M (2012) Decreased immunoexpression of standard form of CD44 is an independent favourable predictor of nodal metastasis in colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **32(8)**: 3455–3461.

Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, Liu R, Wang X, Cho RW, Hoey T, Gurney A, Huang EH, Simeone DM, Shelton AA, Parmiani G, Castelli C, Clarke MF (2007) Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104(24)**: 10158–10163.

Du L, Wang H, He L, Zhang J, Ni B, Wang X, Jin H, Cahuzac N, Mehrpour M, Lu Y, Chen Q (2008) CD44 is of functional importance for colorectal cancer stem cells. *Clin Cancer Res* **14(21)**: 6751–6760.

Jessup JM, Giavazzi R, Cambell D, Cleary KR, Morikawa K, Hostetter R, Atkinson EN, Fidler I J (1989) Metastatic potential of human coloectal carcinoma implanted into nude mice: prediction of clinical outcome in patients operated upon for cure. *Cancer Res* **49(24 Pt 1)**: 6906–6910.

O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE (2007) A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445(7123)**: 106–110.

Ohata H, Ishiguro T, Aihara Y, Sato A, Sakai H, Sekine S, Taniguchi H, Akasu T, Fujita S, Nakagama H, Okamoto K (2012) Induction of the stem-like cell regulator CD44 by Rho kinase inhibition contributes to the maintenance of colon cancer-initiating cells. *Cancer Res* **72(19)**: 5101–5110.

Oshima T, Akaike M, Yoshihara K, Shiozawa M, Yamamoto N, Sato T, Akihito N, Nagano Y, Fujii S, Kunisaki C, Wada N, Rino Y, Tanaka K, Masuda M, Imada T (2008) Overexpression of EphA4 gene and reduced expression of EphB2 gene correlates with liver metastasis in colorectal cancer. *Int J Oncol* **33**(3): 573–577.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL (2001) Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414**(6959): 105–111.

Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R (2007) Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445**(7123): 111–115.

Todaro M, Francipane MG, Medema JP, Stassi G (2010) Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology* **138**(6): 2151–2162



## 論文目録

### I : 主論文

Prognostic significance of CD44 variant 2 upregulation in colorectal cancer

Mayumi Ozawa, Yasushi Ichikawa, Yun-Wen Zheng, Takashi Oshima, Hidetoshi Miyata, Kenichi Nakazawa, Hong-Bin Guan, Manabu Shiozawa, Makoto Akaike, Kazuteru Watanabe, Mitsuyoshi Ota, Shoichi Fujii, Chikara Kunisaki, Takashi Ishikawa, Kuniya Tanaka, Hirotohi Akiyama, Itaru Endo, Hideki Taniguchi

British Journal of Cancer, in press