

論文要旨

CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer

膵臓癌において癌幹細胞マーカー、CD133 の発現はリンパ節転移と vascular endothelial growth factor-C の発現と相関する

前田 真一

【背景】

膵癌は早期から血行性およびリンパ行性転移をきたし、予後不良な疾患である。完全な治癒切除や放射線化学療法が著効した症例にも再発がしばしば認められる。申請者らは膵癌の悪性度について分子生物学的方法を用いて解析し、報告してきた。その結果、僅かな残存癌細胞からの再発と考えられる治療抵抗性の膵癌細胞は、いわゆる癌幹細胞 (cancer stem cells, CSCs) の特徴を備えていることが推測された。

CSCs は 1997 年初めて急性骨髄性白血病にて同定され、乳癌、大腸癌などの悪性腫瘍でも CSCs 理論が報告されてきた。その特徴として、腫瘍形成能、多分化能、自己複製能、化学療法や放射線への耐性などがある。固形癌の CSCs のマーカーとして、CD44, CD24 などが注目されてきた。これまで、頭頸部癌の CD44⁺細胞、乳癌の CD44⁺ CD24^{low} ESA⁺ 細胞、膵癌の CD44⁺ CD24⁺ ESA⁺ 細胞などが CSCs として報告されている。CD133 は最初ヒト胎仔肝や骨髄由来の CD34⁺造血系幹細胞のサブタイプ、あるいは前駆細胞に発現される 5 回細胞膜貫通型糖蛋白として同定された分子で、マウス Prominin-1 のホモログでもある。CD133 はヒトとマウス間ではアミノ酸組成が高度に保存されているが、生物学的機能は未だ不明である。2003 年に固形腫瘍では初めて脳腫瘍 (Glioma) で、CD133 が CSCs のマーカーになり得ると報告されて以来、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌でも同様の報告がみられている。しかし、CD133 の発現と臨床病理学的因子との関係に関する報告はみられていない。今回、膵頭部癌における CD133 の発現を免疫組織化学的に検討し、CD133 の発現と臨床病理学的因子、vascular endothelial growth factor (VEGF)-C の発現、および予後との関連について解析した。

【対象と方法】

- 1) 対象：1990 年から 2004 年の間に当科で膵頭部癌治癒切除（術前化学放射線療法施行例は除く）が施行された 80 例を対象とした。術後観察期間の中央値は 20 ヶ月 (6~168 ヶ月) であった。
- 2) 染色方法：Anti-CD133 goat polyclonal 抗体を用いた免疫染色を Streptavidin-biotin peroxidase 法で施行した。明確な陽性染色を示す癌細胞がみられる場合を CD133 陽性と判定した。連続切片を用いて VEGF-C, CXCR4, CD34, Ki-67, Cytokeratin (CK) AE1/AE3 の発現も同時に評価した。VEGF-C, CXCR4 では 10%以上の癌細胞が染色される場合を陽性と判断した。Microvessel density (MVD; 微小血管密度) は、200 倍の視野で腫瘍内の CD34 染色陽性となった血管密度を測定した。
- 3) 臨床病理学的因子との関連の統計学的分析は、 χ^2 検定を用いた。生命予後解析は Kaplan-Meier 法を用い、有意差検定は log-rank test で行った。予後因子は単変量、多

変量解析とともに、Cox 比例ハザードモデルを用いて検定を行った。いずれの検定も $P < 0.05$ を有意差ありと判定した。

【結果】

1. 正常膵管では発現は認めず、癌部で CD133 陽性細胞が認められた。発現部位としては、腺癌構造の辺縁部(間質に接した面)に局在し、細胞質の染色が特徴的であった。また連続切片で CD133 陽性細胞は上皮マーカーの CK 抗体では陰性であった。膵頭部癌の CD133 の発現は 60% (80 例中 48 例) に認められたが、一切片あたりの CD133 陽性細胞の割合は 15%以下であった。
2. 臨床病理学的因子および VEGF-C 発現との関連性を調べると、CD133 発現は分化度、リンパ管侵襲、リンパ節転移、VEGF-C の発現と高い相関性が認められた。
3. CD133 と CXCR4 の発現の関連性では、CXCR4 の発現は 85% の症例で陽性であったが、CD133 発現との有意な相関はみられなかった。また、CD133 陽性群で、CXCR4 発現とリンパ節転移との相関も認められなかった。
4. Ki-67 抗体を用いた染色では、CD133 陽性細胞は Ki-67 陽性と陰性の両者が認められた。
5. MVD に関しては、CD133 陽性群が CD133 陰性群よりも有意に高値であった。
6. 5 年生存率の解析では、CD133 陽性群が CD133 陰性群より有意に予後不良であった。さらに、CD133 陽性群の中で 5%以上の陽性群は 5%以下に比べ、有意に予後不良であった。一方、CD133 陽性群の中で CXCR4 発現の有無で予後の差は認められなかった。
7. 多変量解析では CD133 発現が独立予後因子であった。

【考察】

今回の研究では、CD133 陽性細胞は 60% の膵頭部癌症例にみられ、一切片当たりでの陽性細胞の発現率は 15%以下であった。大腸癌の 0.3-3% や肝臓癌の 1-3% などと同様な CD133 陽性細胞発現率であった。CD133 陽性細胞は、腺癌構造の間質に接した辺縁部の細胞質に局在するという特徴が認められた。この所見から辺縁部に幹細胞が定着し、増殖するとされるいわゆる "peripheral niche" を形成していることが推測された。また、CD133 陽性細胞は上皮マーカーには陰性であった。

今回の検討では、CD133 発現とリンパ節転移、VEGF-C 発現との相関が認められた。また、MVD は CD133 陽性群が陰性群より有意に高値であった。CD133 を発現する癌細胞では、VEGFR-3、LYVE-1 などのリンパ管新生関連マーカーの発現レベルが高いという報告や、CD133 陽性細胞は陰性細胞に比べ、vascularity が高いという報告がある。これらの報告を加味すると、CSCs と vascular niche の密接な関連が示唆され、血管およびリンパ管新生との関連も含めて、今後研究を展開する必要があると考えられた。

CD133 と CXCR4 との関連では、CD133+ CXCR4+ の癌細胞が癌の転移に関与する報告がみられたが、今回の研究では、CD133 陽性群で CXCR4 の発現と転移や予後との関連は認められなかった。また、Ki-67 の染色では、CD133 陽性細胞は Ki-67 陽性と陰性がみられ、今後、MIB-labeling index (LI) との関連を含めて解析する必要がある。

今回の検討から、膵臓癌の CD133 発現はリンパ性転移、VEGF-C 発現、予後に関連し、多変量解析から独立予後因子であった。CD133 の発現を検討することは、膵臓癌の悪性度の評価に有用であると考えられた。

論文審査の要旨

報告番号	医論第 1456 号	氏名	前田 真一
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	小宮 節郎	有馬 直道

CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer
(膵臓癌において癌幹細胞マーカー, CD133 の発現はリンパ節転移と vascular endothelial growth factor-C の発現と相関する)

British Journal of Cancer 98, 1389-1397, 2008

癌幹細胞(cancer stem cells, CSCs)は1997年に急性白血病で初めて同定された。その特徴として、腫瘍形成能、多分化能、自己複製能、放射線化学療法の耐性などが挙げられ、固形癌のCSCsのマーカーとしては、CD44, CD24などが注目されてきた。

一方、CD133は5回細胞膜貫通型糖蛋白であり、マウスProminin-1のホモログでもある。骨髄由来のCD34+造血系幹細胞のサブタイプ(血管内皮前駆細胞)のマーカーとして最初に認知されたが、その生物学的機能は未だ不明である。このCD133が固形腫瘍でCSCsのマーカーになることが2003年に初めて脳腫瘍(Glioma)で報告されて以来、前立腺癌、大腸癌、肝臓癌でも同様の報告が行われてきた。しかし、CD133の発現と臨床的検討に関する報告はみられていない。

申請者らは、80例の膵頭部癌切除症例においてCD133の発現を免疫組織化学的に検索し、CD133の発現と予後を含めた臨床病理学的因子との関連性を検討した。同時に、連続切片を用いて、VEGF-C, CXCR4, CD34, Ki-67, Cytokeratin (CK) の発現も検討した。CD133は陽性細胞が認められた場合を陽性と判定した。VEGF-C, CXCR4では陽性細胞が10%以上を陽性と判定した。また、CD34染色陽性となった血管を測定し、microvessel density(MVD)を解析した。

その結果、本研究では以下の知見を明らかにした。

1. CD133陽性細胞は正常膵管では認められず、癌部でのみ認められた。
2. 発現部位は腺癌構造の辺縁部(間質に接した面)に局在し、細胞質の染色が特徴的であった。CD133陽性細胞は上皮マーカーであるCKの発現は陰性であった。
3. CD133発現は膵頭部癌切除症例の60%に認められたが、一切片あたりのCD133陽性細胞の割合は15%以下であった。
4. CD133陽性細胞はKi-67陽性と陰性の両者が認められた。
5. CD133発現は分化度、リンパ管侵襲、リンパ節転移と相関がみられた。
6. CD133発現とVEGF-C発現には有意な相関が認められた。
7. MVDに関しては、CD133陽性群が陰性群よりも有意に高値であった。
8. 5年生存率は、CD133陽性群が有意に不良で、さらに陽性群の中で5%以上の陽性群は5%以下のものに比べ、有意に予後不良であった。
9. 多変量解析ではCD133発現が独立予後因子であった。

以上の結果より、CD133陽性細胞は腺癌構造の間質に接した辺縁部に局在し、CD133の発現はリンパ性転移、VEGF-C発現、予後と関連することが判明し、膵臓癌の悪性度を評価する上で、CD133発現の免疫組織化学的検索は有用であると結論された。

本研究でCD133陽性細胞が腺癌構造の間質に接した辺縁部に局在するということから、固形腫瘍におけるnicheに関する仮説をたてることができた。また、CD133発現がリンパ性転移、VEGF-C発現、MVDと相関性を示したことから、VEGFR-2などを介したperipheral niche systemが存在する可能性が示された。さらに、CD133陽性群では予後が悪いことを明らかにし、CD133を転移や予後診断のマーカーとして使用できる可能性を初めて示した点が非常に興味深い。今回の結果から、今後は、癌幹細胞のnicheに関する研究および癌幹細胞を標的とした治療に関する研究が進んでいくものと期待される。よって本研究は、学位論文として十分な価値を有するものと判定した。

試験（学力確認）の結果の要旨

報告番号	医論第 1456 号	氏名	前田 真一
審査委員	主査	丸山 征郎	
	副査	小宮 節郎	有馬 直道

主査および副査の3名は、平成20年5月1日、学位請求者 前田 真一 君に面接し、学位請求論文の内容について説明を求めると共に、関連事項について試問を行った。具体的には、以下のような質疑応答がなされ、いずれについても満足すべき回答を得ることができた。

質問1) CD133の生物学的機能はわかっていないのか？

(回答) CD133は5回細胞膜貫通型糖蛋白で、マウス Prominin-1 のホモログであるが、現在のところまで CD133 分子の生物学的機能は不明である。

質問2) CD133を強制発現したマウス、または CD133 のノックアウトマウスはあるか？

(回答) 今時点では少なくとも私が知る限り、CD133分子を強制発現するトランスジェニックマウスの作製や CD133 分子の発現を完全に抑制したノックアウトマウスの作製に関する報告はないと思われる。

質問3) 癌細胞株においては CD133 の発現はどうか？ CD133 を過剰に発現する細胞株、あるいは全く発現しない細胞株はあるのか？

(回答) 膵臓癌の細胞株6株について CD133 抗体を用いて FACS で解析した結果、CD133 を発現する細胞群は、0.1~60% までと細胞の種類により幅がみられた。しかし、一般的に CD133 陽性細胞の割合はきわめて低いという印象である。ただし、CD133 陽性率が完全に0%という細胞株はなかった。

質問4) 正常大腸粘膜で見られる幹細胞のように、正常膵管では発現はなかったか？

(回答) 今回の免疫染色では、正常膵管における CD133 の発現はみられなかった。免疫組織化学染色における抗体反応の感度の問題もあると考えられる。ただし存在したとしてもかなり低い割合だと予測される。

質問5) 膜蛋白であるが、細胞表面ではなく細胞質染色が際立っているが、この解釈は？

(回答) 用いた抗体が polyclonal であったため、それが認識する epitope が細胞質内 domain も認識する場合には細胞質も染色されると思われる。また、細胞質内にも分子として存在しているかもしれない。例えば、細胞表面には出ない truncated type の変異分子が細胞質に蓄積している可能性も考えられる。

質問6) 癌幹細胞は本来 G0 期にあると考えられているので、CD133(+)かつ Ki-67(-) が真の癌幹細胞ではないのか？

(回答) 癌幹細胞は休止期(G0期)にある細胞もあれば、分裂・増殖期にある細胞もあると考えられている。CD133(+)かつ Ki-67(-)という細胞が真の癌幹細胞か否かは非常に興味深いと考えられ、今後詳細に検討する必要があると思う。

質問7) CD133 陽性細胞が腺癌構造の辺縁部にみられているが、これは予測されていたか？

(回答) 正常の大腸幹細胞は陰窩底部、基底膜直上に存在するという特徴はあるが、膵臓癌における幹細胞の存在部位を組織学的に解析したケースがなかったため、予測はしていなかった。

質問8) 腺癌構造がくずれた組織型の poor の症例では発現部位はどのようであったか？

(回答) 本研究の対象例では80例中3例と poor の症例が少なかつたため、明確なことは言えないが、CD133 陽性細胞は間質に接した部分に存在していた。

質問 9) 組織型が poor の場合, CD133 発現の割合が高くなることはなかったか?

(回答) Poor の症例が 3 例と少ないため, 発現割合との検討はできていないが, 発現を陽性と陰性でわけた場合, 病理組織の分化度 (well, moderately, poor) との相関は認められた。

質問 10) CD133 陽性細胞率によって, 転移や予後の予測はできるのか?

(回答) 今回の検討で, CD133 陽性率が高いほど悪性度が高まるため, 転移や予後と相関する結果であった。

質問 11) 今回の症例の手術後の治療はどのようになっているのか?

(回答) 術前の放射線化学療法施行症例は除いてあるが, 術後の治療に関しては, 術後補助化学療法をおこなっている症例もある。補助療法が予後に影響することも考えられるが, 今後症例数が多数になった時点で解析する必要がある。

質問 12) CD133 陽性率が 5%以上は治療効果が期待できないと考えていいのか?

(回答) CD133 陽性細胞が多いほど, 転移 (血行性・リンパ行性) を来たしやすい。あるいは, 外科的治療切除後, micro で CSCs を含む残存腫瘍があれば, それだけ再発の可能性が高まるのではないかと考えている。悪性度が高いことは事実であるが, 腫瘍径や転移を含めた Stage も治療効果に左右すると考えられる。

質問 13) CD133 発現は, 予後不良の予測因子として考えていいのか?

(回答) 今回の検討では予後予測因子と考えている。Glioma で, <1% group と >1% group で著明な予後の差を認めたという論文 (*Clin Cancer Res, January, 2008*) もあり, CD133 発現は予後不良の因子と考えられる。

質問 14) CD133 が様々な癌で悪性度を示すということに関する説明は?

(回答) 脳腫瘍, 前立腺癌, 肝臓癌, 大腸癌などで様々な固形腫瘍で, 癌幹細胞は腫瘍内血管新生の促進や腫瘍周囲のニッチなどが関与しているのではないかと推測される。

質問 15) リンパ節転移巣での CD133 の発現はどうであったか?

(回答) 現在, 数例に行っているが, まだデータは解析できていない。今後行う予定である。

質問 16) CD133 が高発現している細胞株に, CD133 の抗体 (中和抗体) を添加した場合にどうなるのか?

(回答) ごく最近, ABCB5 に対する抗体が黒色腫幹細胞を特異的に攻撃する標的となり得るという論文が発表されている (*Nature, 17 Jan 2008*)。非常に興味深い内容であり, 今後検討していく価値があると思われる。

質問 17) 正常の幹細胞が骨髄から血液 (静脈) に流れ, リンパ管に流入していくという考え方が最近の *Cell (Vol 131, 842-844, 994-1008, 30 November 2007)* に掲載された。それによると, 造血幹細胞が Blood-Lymph-Peripheral tissue という回路を廻っているというものである。この考え方は, 今回の臨床病理学的な結果を証明できることになると思われるがどうか?

(回答) 今後検討していく価値があると思われる。

質問 18) 正常膵管の幹細胞が, β 細胞に分化しうる, という論文が最近報告されている (*Nature*)。それを利用して, 糖尿病の治療などに応用できると思われるがどうか?

(回答) 正常膵管の幹細胞の同定が可能になれば糖尿病の治療などに応用可能だと考えられ今後, 検討を要する課題と考える。

質問 19) 研究の展望に関する何かアイデアはあるか?

(回答) 現在, 膵臓癌の早期段階である IPMN (intraductal papillary-mucinous neoplasm) の微小浸潤癌を伴う症例で CD133 の発現を免疫組織化学的に検討中である。微小癌での癌幹細胞の同定により, 癌の発生を解明する重要な情報を得ることができると考えている。

以上の結果から, 3 名の審査委員は本人が大学院博士課程修了者と同等あるいはそれ以上の学力・識見を有しているものと認め, 博士 (医学) の学位を与えるに足る資格を有するものと認定した。