

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26462004

研究課題名(和文) 大腸癌におけるCD44variant9発現の意義と新規診断法の開発

研究課題名(英文) Expression of CD44 variant 9 in rectal cancer after treatment of neoadjuvant chemoradiotherapy

研究代表者

榎本 剛史 (Enomoto, Tsuyoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号：10628762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】直腸癌におけるCD44v9の発現を、術前化学放射線療法を受けた局所進行直腸癌20例を用いて検討。【方法】切除標本をCD44v9で免疫染色し、発現程度をscore化して検討【結果】発現scoreは、術前生検検体では0.6、治療後1.3。組織学的効果判定と発現scoreは、grade2/1a/0で0.3/1.6/2。再発群と非再発群におけるCD44v9発現scoreはでは明らかな差は認めず。【結語】CD44 v9は治療効果の低い腫瘍ほど高発現。ただし転移との関連は明らかにできず。

研究成果の概要(英文)：Introduction: CD44 variant 9 is important factor of cancer stem cell in colorectal cancer, however, its clinical role is uncertain.Aims: Objective of this study is to evaluate the immune-histochemical expression of CD44 variant 9 as stem cell marker in the colorectal cancer after treatment of neoadjuvant chemoradiotherapy (NCRT). Material and Methods: This study included 20 rectal specimens. All specimens were underwent NCRT. Clinical data were available for all case.Result: Average score of Expression of CD44 after NCRT is 0.93 (0-2.4). Expression score of CD44 variant 9 is in proportion to efficacy of pathological grade; grade2/ 1a/ 0 is 0.3/1.6/2, respectively. However, Expression score of relapse patient, non-relapse patient is 0.8 and 0.93, respectively. The correlation between relapse of tumor and expression of CD44 variant 9 is not significant.Conclusion: Expression of CD44 variant 9 might be associated with treatment effect of NCRT, however, no relation to prognosis.

研究分野：消化器外科学

キーワード：直腸癌 術前化学放射線療法 CD44variant 9 癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、2008年の我が国の統計において死亡数44,000人、罹患数が112,772人であり、死亡数・罹患数いずれも癌の上位3位以内を占めている重要な治療対象である。近年の大腸癌治療において、オキザリプラチンなどの新規抗癌剤、Cetuximabなどの分子標的治療薬の開発によって、切除不能・転移再発大腸癌の生存中央値は24か月にまで延長しているが、依然として大腸癌の根治を得るためには手術によって完全に切除する以外に方法はない。したがって完全切除可能な早期の段階での診断が、治療成績の向上に寄与すると考えられ、大腸癌に対する新規早期診断法の開発が極めて重要な課題である。

近年癌幹細胞は、癌組織を構成する細胞の供給源であり、癌の再発や転移に深く関与すると考えられている(図1:Yoshidaら BMC Cancer. 2012)。特徴として自己複製能、多分化能、腫瘍形成能を有し、抗癌剤、放射線治療などに対して耐性を示す。このため癌の再発や転移に深く関与すると考えられている。現在癌幹細胞に特異的な表面マーカーが同定されつつあり、大腸癌においてはCD44が有力視されている。CD44とは、膜貫通型糖タンパク質で、ヒアルロン酸をはじめとする細胞外マトリックスと結合する接着因子である。その機能は、リンパ球ホーミング、リンパ球活性化、細胞-細胞間接着および細胞基質間接着、細胞運動、癌細胞増殖・転移などに深く関与している。大腸癌では、CD44陽性癌細胞が免疫不全マウスにおいて腫瘍形成能力が高く、CD44陽性の癌細胞は癌幹細胞様の性質をもつことが基礎的に証明されている。このCD44は選択的スプライシングにより様々なバリエーションを形成するが、そのなかでもCD44variant9の発現が転移と高く相関することも実験的に報告されている(Kimura Y Oncotarget 2013)。大腸癌においては、基礎的研究で

CD44variant9の転移再発に関する意義は明らかにされつつあるが、臨床検体を用いた発現の解析、転移再発形式や、予後との関連は未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は、大腸癌におけるCD44variant9の発現を、術前化学放射線療法を受けた局所進行直腸癌および結腸直腸癌での手術検体を用いて検討する。

さらに臨床病理学的検討および転移再発形式を比較することで、発現の意義を明確にする。最終的には、予後を予測することが可能なバイオマーカーとして臨床応用することが目的である。

3. 研究の方法

筑波大学附属病院における大腸癌手術症例を対象とする。そのうち、腹膜翻転部以下にかかる下部直腸癌で、深達度cT3, cT4の症例かつ切除標本の外科的剥離面陰性確保が困難な症例を、定められたプロトコールに従って術前化学放射線療法を施行した(Figure 1)。

直腸癌化学放射線療法 プロトコール

* T3-T4 * 経口摂取可能 * 20歳以上80歳以下
* PS0-1 * 直腸癌の狭窄が強い場合人工肛門造設を先行
CRT

骨盤腔を越えたリンパ節転移のない症例

術前化学放射線療法
TS-1 : 80mg/m²/day 5日間投与2日間休薬
放射線治療: 2Gy/day 5日間照射2日間休止
(total 50Gy/25fr) 5週間

6~8週後

手術

4~8週後

術後補助化学療法
TS-1 : 80mg/m²/day 4週間投与2週間休薬
12ヶ月

Figure 1

手術により得られた組織検体を用いて、CD44variant9で免疫組織学的に染色を行い、癌組織内でのCD44 variant 9の発現の特徴

を検討した。

CD44 variant 9 の発現は、染色率と染色強度から発現の程度を 0～3 に数値化した。具体的には、癌組織中から 200 倍の視野で、生検検体では 1field を、手術検体では 10field を選択して平均を求め、発現の score とした。

次いで手術検体で得られた臨床病理学的項目と、癌組織内での CD44 variant 9 の発現を比較検討した。転移再発などの臨床経過と対比させることで、CD44 variant 9 発現の臨床的意義を明確にした (Figure 2, 3)。

CD44v9 scoring法

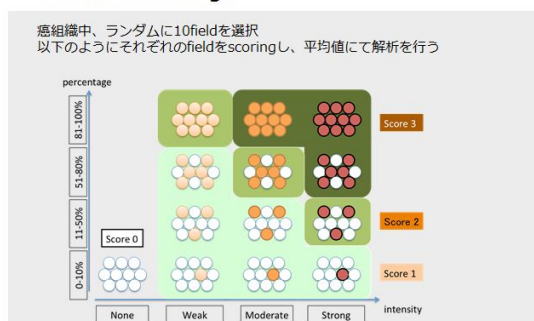


Figure 2

大腸癌におけるCD44v9発現score

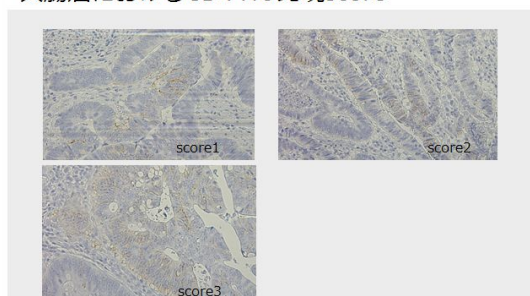


Figure 3

また、通常の大腸癌検体における CD44 variant 9 の発現は、われわれが開発した、同時に多数の組織検体を免疫染色する組織 array 法を用いておこなった。

4. 研究成果

2007 年 1 月～2016 年 12 月に当科で施行した局所進行直腸癌のうち、術前治療（放射線化学療法または化学療法）後に根治切除が行われた 20 例を対象、20 症例であった。臨床

病期は Stage IIIa が 12 例、Stage IIIb が 8 例であった。本研究における直腸癌に対する化学放射線療法の治療効果は、組織学的奏効率 50%、術前の down staging 率が 77%を示した。

本プロトコールによる術前化学放射線療法は高い奏効率にも関わらず、局所再発率が 26%、遠隔転移率が 48%であった。

同時期に施行された直腸癌で、化学放射線療法を施行していない症例における局所再発率も 13.6%と高値であり、そのうち 58%は遠隔再発を伴っていた。

これら直腸癌症例における術後局所再発を来す因子を臨床病理学的に検討したところ、tub1/2 以外の組織型、リンパ節転移例、脈管侵襲陽性症例などが、局所再発の危険因子であることを抽出した。局所再発を来した直腸癌症例のうち 70%は遠隔転移を伴っていることも臨床的に明らかになった。

術前化学放射線療法後に手術を受けた 20 症例における CD44v9 発現 score は、平均 0.93 (0-2.4) であった。発現程度は、0-1 (弱発現) が 12 例、1-2 (中等度発現) が 6 例、2-3 (強発現) が 2 例であった。

20 症例中 7 症例に関して、術前生検検体と治療後の原発巣の切除標本について、それぞれ CD44 variant 9 で免疫染色を施行。

CD44 variant 9 発現 score は、術前生検検体では 0.6 であったが、治療後には 1.3 と有意に上昇していた。

術前化学放射線療法における組織学的治療効果は、grade2 が 2 例、grade1a が 4 例、grade0 が 1 例であったが、CD44 variant 9 発現 score の平均は、それぞれ 0.3、1.6、2 であった。これより、術前治療効果が低いほど CD44 variant 9 発現 score が高いことが明らかになった (Figure 4)。

直腸癌術前放射線化学療法後 組織学的治療効果と発現程度

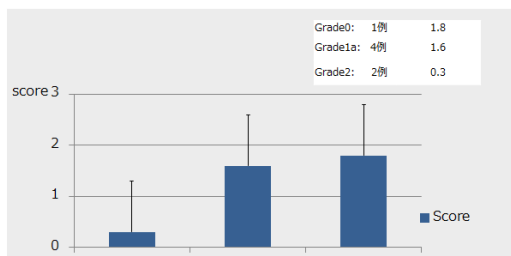


Figure 4

20 症例中、転移再発を有する症例は 8 例で、残りの 12 例は転移再発を認めていない。これらの CD44 variant 9 発現 score はそれぞれ、0.8 と 0.93 であり、有意差は認めなかった。

一方、術前治療歴のない大腸癌を抽出して組織 array を作製した。同期間に、筑波大学附属病院にて、原発性大腸癌の診断で外科的切除を行った患者 24 症例の検体を用いた。組織ブロックより癌病変の位置を検索し、その病変部、同一症例の正常部をくり抜き、パラフィンブロックに配置し組織アレイブロックを作成した。1 枚スライド上に 12 症例、計 24 スポットを配置した。組織 array を用いることで、網羅的な CD44 variant 9 の免疫染色を行った。

24 症例の臨床病期は、Stage I が 2 例、Stage II が 10 例、Stage IIIa が 4 例、Stage IIIb が 2 例、Stage IV が 6 例であった。この 24 例の CD44 variant 9 の発現 score は、平均 1.125 (0.1-3) であり、0-1 (弱発現) が 13 例、1-2 (中等度発現) が 8 例、2-3 (強発現) が 3 例であった。遠隔転移・再発群は 8 例、遠隔転移なし・非再発群は 16 例であり、CD44 variant 9 発現 score はそれぞれ、1.33 と 1.01 であり、有意差は認めなかった ($p=0.64$)。

臨床病理学的因子と、CD44 variant 9 発現 score との比較では、脈管侵襲において相関が認められる傾向があった。

本研究より、局所進行直腸癌における術前化学放射線療法では、治療効果が低い症例ほ

どの発現が高いことが示唆された。一方、臨床的病理学的因子および、転移再 CD44 variant 9 発と CD44 variant 9 発現における関連を示すことができなかった。

しかし、個々の症例に関して検討すると、CD44 variant 9 発現 score 2 以上の強発現を認めた症例は、いずれも短期間で多発転移を認める症例の割合が多いため、今後もさらなる症例を集積して、転移に関する発現の意義を明らかにしていきたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 4 件)

榎本剛史, 局所進行直腸癌に対する治療戦略, つくば cancer arena, 2016 年 9 月 10 日, 筑波大学 (茨城県つくば市)

榎本剛史, 当科における下部直腸癌根治切除後局所再発の検討, 第 116 回日本外科学会定期学術集会, 2016 年 4 月 14 日, 大阪国際会議場 (大阪府大阪市)

榎本剛史, 直腸癌における術前化学放射線施行症例における手術部位感染, 第 115 回日本外科学会定期学術集会, 2015 年 4 月 16 日~18 日, 名古屋国際会議場 (愛知県名古屋市)

榎本剛史, 局所進行直腸癌における術前治療前後での腫瘍組織中 CD44v9 の発現, 第 114 回日本外科学会定期学術集会, 2014 年 4 月 4 日, 国立京都国際会館 (京都府京都市)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 剛史 (ENOMOTO, Tsuyoshi)

筑波大学・医学医療系・講師

研究者番号: 10628762

(2)連携研究者

大河内 信弘 (OHKOHCHI, Nobuhiro)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 40213673

小田 竜也 (ODA, Tatsuya)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号 : 20282353

村田 聡一郎 (MURATA, Soichiro)

横浜市立大学・大学院医学研究科准教授

研究者番号 : 40436275

竹内 朋代 (TAKEUCHI, Tomoyo)

筑波大学・医学医療系・助教

研究者番号 : 50450333