

博士論文

低酸素下における CD133 陽性大腸癌細胞の

上皮間葉転換と転移能についての検討

岡田真誠

低酸素下における CD133 陽性大腸癌細胞の

上皮間葉転換と転移能についての検討

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 外科学専攻

指導教員 石原聡一郎教授

岡田真誠

目次

目次.....	1
略語一覧.....	2
要旨.....	3
序文.....	4
第1章 大腸癌細胞における低酸素下での転移能とCD133発現の関連性の検討	
1-1 背景と目的.....	9
1-2 方法.....	12
1-3 結果.....	22
1-4 考察.....	32
1-5 小括.....	40
第2章 大腸癌組織検体における原発巣と転移巣でのCD133の発現の比較	
2-1 背景と目的.....	41
2-2 方法.....	43
2-3 結果.....	46
2-4 考察.....	54
2-5 小括.....	58
結論.....	59
謝辞.....	61
引用文献.....	62

略語一覽

EMT: epithelial-mesenchymal transition

EpCAM: epithelial cell adhesion molecule

HIF: hypoxia-inducible factor

HRE: hypoxia-response element

MET: mesenchymal-epithelial transition

MFI: mean fluorescence intensity

PCI: peritoneal cancer index

VEGF: vascular endothelial growth factor

要旨

本研究では、低酸素下における上皮間葉転換と CD133 の発現との関連に着目し研究を行った。第一章では大腸癌細胞株を用いた解析を行い、低酸素下では CD133 (-) 細胞と比較して CD133 (+) 細胞で上皮間葉転換マーカータンパク質の発現がより誘導され、細胞遊走能も増加する一方、CD133 (-) 細胞では CD133 (+) 細胞と比較して細胞接着能がより増加することが明らかとなった。これらの結果から、CD133 (+) 細胞では肝転移を、CD133 (-) 細胞では腹膜播種を起しやすいのではないかと仮説を立て、この仮説を検証すべく第二章では大腸癌の臨床検体を用いた解析を行った。その結果、肝転移巣では原発巣より CD133 の発現率が高く、腹膜播種巣では原発巣より CD133 の発現率が低いことが明らかとなった。

序文

大腸癌の罹患者数は年々増加しており、全世界で新規罹患者数が年間 180 万人、死亡者数は年間 86 万人にのぼるとされている [1]。大腸癌により死亡に至る原因の大半は転移によるものであり、大腸癌が転移を形成するメカニズムの解明は臨床的に非常に重要と考えられる [2, 3]。癌の転移経路には一般的に、血行性転移、リンパ行性転移、および播種性転移がある [4]。日本において遠隔転移を有する大腸癌は大腸癌全体の約 17% を占め、そのうち肝転移が 55.8%、肺転移が 12.2%、腹膜播種が 22.9%と報告されており、肝臓や肺は血行性転移の頻度が高い臓器とされる [5, 6]。

癌細胞が転移能を獲得する契機の一つとして低酸素状態への暴露が挙げられる [7-9]。多くの固形癌は腫瘍が増殖する際に、血流不足による酸素供給量の低下によって、しばしば低酸素状態に陥ることが知られている。癌細胞は、自らが生き延びるために新たな血管網を形成し、また自らが生存に不利な環境から逃れるために細胞遊走能を獲得するが、これが血行性転移へとつながっていくと考えられている [10, 11]。低酸素条件下において、これらの機能を獲得するために誘導される重要な分子の一つが Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α である [7, 12, 13]。HIF-1 α は、正常酸素下では細胞質に局在し、ユビキチン化により速やかに分解される。しかし、低酸素下では HIF-1 β と二量体を形成して核内に移行し、様々な遺伝子の転写因子として作用す

るタンパク質である。HIF-1 α が発現に寄与するタンパク質には Vascular endothelial growth factor (VEGF) やグルコーストランスポーター1 といった分子が知られている。このような分子の発現を誘導することにより、低酸素環境下に置かれた癌細胞は血管新生の促進や細胞増殖、細胞の生存や細胞遊走能を獲得し、この働きによって癌細胞の浸潤や転移に重要な役割を果たすことが広く知られている [8, 14]。

また、癌細胞が転移能を獲得する契機に上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の誘導が挙げられる [15-17]。EMT は、上皮細胞がその細胞極性や周囲細胞との細胞間接着を失い、細胞遊走能および浸潤能を得ることで間葉系細胞へと変化することである [18, 19]。この EMT は、正常な生理学的プロセスであり、胚発生、器官形成や組織成長、組織修復などにおいても重要なプロセスである [18, 20]。一方、癌細胞の場合は EMT によって細胞間接着を喪失し細胞遊走能および浸潤能を獲得することにより、血行性転移などの遠隔転移が引き起こされることが報告されている [3, 21, 22]。EMT は、様々な因子によって誘導されるが、低酸素下で HIF-1 α が蓄積することによって、癌細胞の EMT が誘導されることが近年明らかとなり、注目されている [7, 23, 24]。我々はこれまで、大腸癌細胞において低酸素環境が EMT を誘導しうることに着目し報告してきた [25]。この報告では、低酸素状態で培養した大腸癌細胞で、上皮細胞マーカーである細胞接着分子 E-カドヘリンの発現が減少し、間葉細胞マーカーである細胞骨格タンパク質ビメンチンの発現が増加すること

を見出した。しかし、低酸素環境が大腸癌細胞に EMT 様の変化をもたらす機序については不明な点も多かった。

一方、我々は CD133 という細胞表面マーカーにも着目し解析を行ってきた。CD133 は 5 回膜貫通型糖タンパク質であり、コレステロールが豊富な細胞膜上のマイクロドメインである脂質ラフトに存在する [26]。CD133 は PI3K/AKT や p38MAPK などのシグナル経路を介して、細胞増殖の促進やアポトーシスの抑制など、様々な機能を有しているが、その機能については不明な点も多い [27]。近年、この CD133 が様々な固形癌において、癌幹細胞の指標となるマーカーの一つと考えられ注目されている [28, 29]。大腸癌においても、CD133 (+) 細胞群に癌幹細胞を認めたが CD133 (-) 細胞群には認めなかったという報告が 2007 年に発表され、現在では CD133 は大腸癌における代表的な癌幹細胞マーカーとされている [30, 31]。ここでいう癌幹細胞とは、自己複製能を有し、様々な細胞に分化する分化能をもつ幹細胞としての性質を持った癌細胞であり、造腫瘍能を示す細胞を指す [32]。我々もこれまで、大腸癌細胞株において CD133 (+) 細胞の方が CD133 (-) 細胞よりも細胞増殖能が高いことを報告してきた [33]。また、CD133 (-) 細胞で抗癌剤に対する抵抗性がより高いことも報告してきた [33]。さらに、肝転移を有する大腸癌患者の CD133 の発現と予後との関連を評価し、CD133 陰性群で予後が悪いことも報告してきた [34]。これらの結果から、CD133 は単なる癌幹細胞マーカーとしてだけでなく、細胞増殖や転移形成において

も重要な役割をもつのではないかと考えられ、そこから癌細胞の転移形成の際に重要な現象である EMT についても、重要な役割を担う可能性が考えられた (図 1)。

そこで、第一章では大腸癌細胞株を CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離し、それぞれの低酸素下における EMT の変化を検討することで、CD133 が癌細胞の転移形成にどのように関与するのかを明らかにすることとした。次いで第二章では、そこで得られた結果をもとに CD133 の転移への役割について仮説を立て、その仮説が臨床サンプルにおいても当てはまるか否かを、手術検体を用いて検証した。

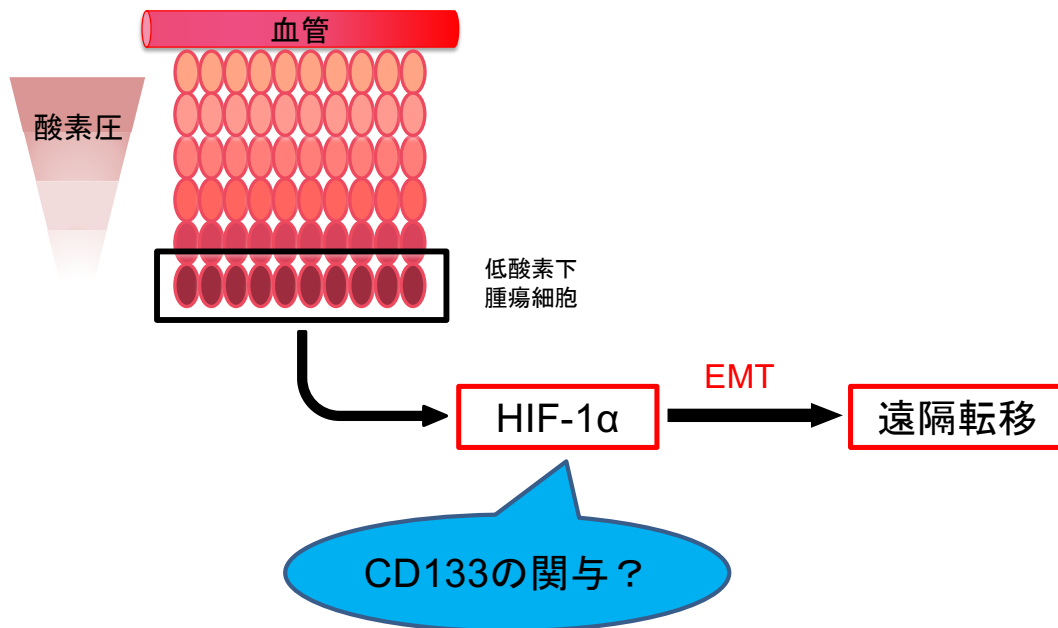


図 1: 低酸素環境下における上皮間葉転換 (EMT) の誘導
 EMT を誘導するシグナル伝達経路の一つが Hypoxia-inducible factor (HIF) 経路である。固形癌の中心部では低酸素環境を誘引として癌細胞の EMT が惹起され、癌細胞の浸潤・転移を促進する。

第 1 章

大腸癌細胞における低酸素下での転移能と

CD133 発現の関連性の検討

1-1 背景と目的

他の固形癌と同様、大腸癌においても腫瘍の増大とともに血液供給の不足が生じ、微小な低酸素環境状態が生じる [35]。この時に誘導される HIF-1 α によって癌細胞の浸潤や転移が誘導されるが、これまでの報告から HIF-1 α は大腸癌細胞における CD133 の発現率を増加させることが報告されており、HIF-1 α が CD133 を誘導することが示されている [36, 37]。反対に、Hashimoto らは膵臓癌細胞株において低酸素による HIF-1 α の発現によって、CD133 の発現が促進される可能性があることを報告している [38]。しかし、CD133 が HIF-1 α の発現にどのように作用するのか、そのメカニズムはまだ不明な点が多い。

また CD133 が EMT に及ぼす作用については、これまでいくつかの癌細胞株において、CD133 を過剰発現させた細胞では EMT 関連タンパク質の発現が増加し、逆に CD133 の発現をノックダウンした細胞では EMT 関連タンパク質の発現が減少することが報告されている [39-41]。これらの報告では、一般的な EMT 関連タンパク質として、細胞表面タンパク質である E-カドヘリンや N-カドヘリン、細胞内タンパク質であるビメンチンなどのタンパク質発現量の変化が評価されている (表 1) [42-44]。癌細胞

における EMT の誘導 に伴い、上皮系カドヘリンである E-カドヘリンの発現は減少し、間葉系カドヘリンである N-カドヘリンの発現が増加するカドヘリンスイッチ現象が起き、細胞骨格タンパク質であるビメンチンは増加することが知られている [45, 46]。しかし、これまで大腸癌細胞において CD133 の発現と EMT の誘導との関連や、CD133 の発現と転移能との関連を検討した報告は少なく、また他の癌種も含めて同一の癌細胞株を CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離し、それぞれの EMT 能を比較した報告はみられない。そこで本章では、大腸癌細胞株を CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離し、それぞれの低酸素下における HIF-1 α や EMT 関連タンパク質の発現量変化を比較することで、CD133 の発現と HIF-1 α および EMT の誘導との関連性を明らかにすることを目的とした。

表 1: 主な EMT マーカー

上皮細胞マーカー	間葉細胞マーカー
E-カドヘリン	N-カドヘリン
EpCAM	ビメンチン
ラミニン 1	核内の β -カテニン
デスマンプラキン	フィブロネクチン
ZO-1	Twist
オクルディン	Snail
	Slug
	ZEB1
	SOX1

EpCAM, epithelial cell adhesion molecule

文献 [44] より引用

1-2 方法

(1) 細胞株と試薬

ヒト大腸癌細胞である LoVo 細胞は Japanese Cancer Research Resource Bank より購入した。LoVo 細胞は結腸癌の左鎖骨上リンパ節転移巣由来の細胞株であり、TP53 野生型、KRAS (G13D;A14V) 変異型の細胞株である [47]。このような遺伝学的背景を有する LoVo 細胞は、高い転移能を有する細胞株として知られている [48]。また、大腸癌細胞における CD133 の発現率は一般的に低いが、LoVo 細胞においては、大腸癌細胞の中でも比較的 CD133 の発現が高いことがわかっている [33, 37]。これらの性質から、本実験に用いる大腸癌細胞株として LoVo 細胞を採用した。培養細胞は 10% 胎児ウシ血清添加 RPMI-1640 培養液 (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) に 1% 抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/ml penicillin G, 100 µg/ml streptomycin sulfate, 250 ng/ml amphotericin B; Gibco BRL, Grand Island, NY, USA) を加えた培地にて 37 °C で培養し、実験を行った。

低酸素環境の作製にはマルチガスインキュベーター (BIOLABO Multigas Incubator; JUJI FIELD, Japan) を用いた。正常酸素環境は二酸化炭素ガスのみを用いて 20% 酸素、5% 二酸化炭素、75% 窒素濃度となるように調節するのに対し、低酸素環境は二酸化炭素ガスと窒素ガスを用いて、1% 酸素、5% 二酸化炭素、94% 窒素濃度となるように調節した。

RPMI-1640 培養液は Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) より、胎児ウシ血

清と抗菌剤/抗真菌剤は Gibco BRL (Grand Island, NY, USA) より購入した。CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離するための試薬として、マウスモノクローナル抗体である Biotin 標識抗 CD133 抗体および抗 Biotin MicroBeads (130-091-895) は Miltenyi Biotec (Auburn, CA, USA) より購入した。フローサイトメトリーに用いる試薬として、PE 標識 HIF-1 α 抗体 (IC1935P) は R&D systems (Minneapolis, MN, USA) より購入し、PE 標識 CD324 (E-カドヘリン) 抗体 (562870)、PE 標識 CD325 (N-カドヘリン) 抗体 (561554)、PE 標識ビメンチン抗体 (562337)、PE 標識 CD29 (β 1 インテグリン) 抗体 (561795)は BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) より購入した。蛍光免疫染色に用いる試薬として、マウスモノクローナル抗体である抗 β -カテニン抗体 (610154) は BD Pharmingen より購入し、Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体 (1907294) は Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) より購入した。

(2) 磁気による細胞分離

LoVo 細胞を CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離する方法として、磁気細胞分離法を用いた (図 2)。まず、LoVo 細胞に Biotin 標識抗 CD133 抗体を反応させ、次いで抗 Biotin MicroBeads を反応させることで CD133 (+) 細胞を磁気標識した。磁気分離は MidiMACS Starting Kit (Miltenyi Biotec) を用いて、細胞を強磁場に設置したカラムに通すことで行った。これにより磁気標識された CD133 (+) 細胞はカラムに留

まり、磁気標識されていない CD133 (-) 細胞がカラムを通過することで、分離した CD133 (-) 細胞を回収し、その後、磁気を解除し CD133 (+) 細胞を回収した。

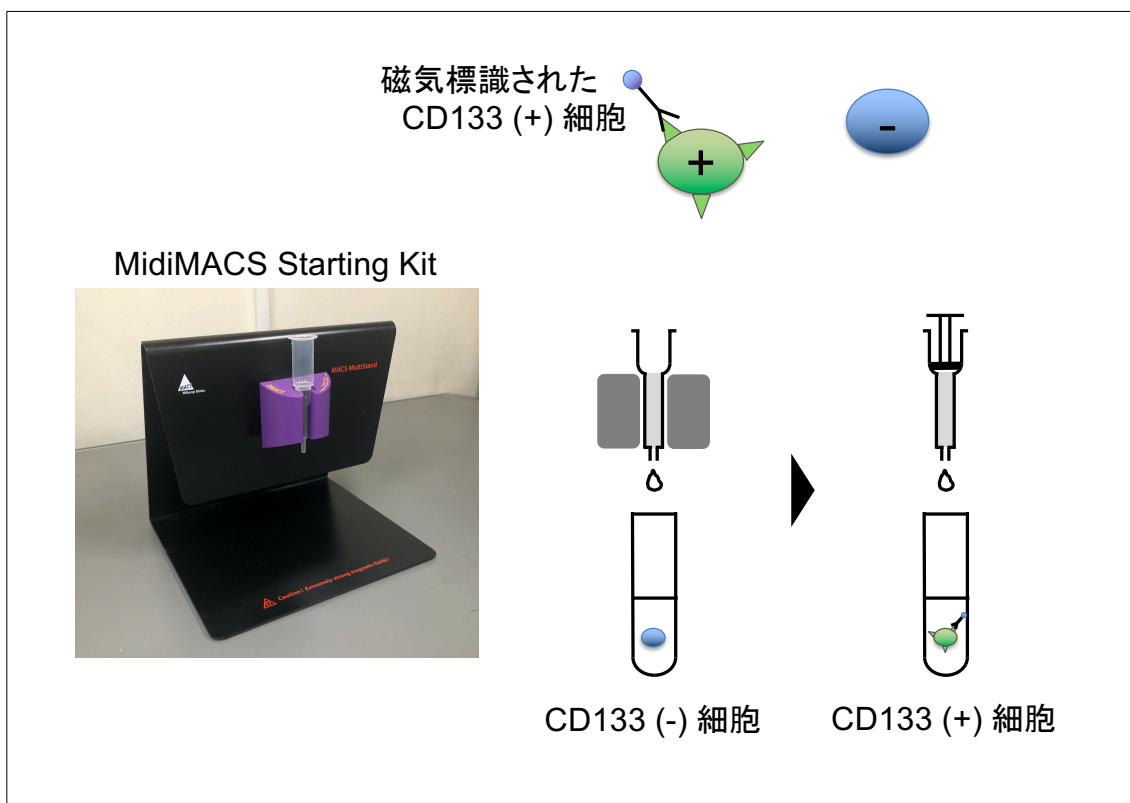


図 2: 磁気細胞分離法による CD133 (-) と CD133 (+) 細胞の分離

磁気標識された CD133 (+) 細胞は強磁場に設置されたカラムに留まり、CD133 (-) 細胞はカラムを通過する。磁場からカラムを取り外すことで、CD133 (+) 細胞の回収が可能となる。

(3) EMT 関連タンパク質発現量の評価 — フローサイトメトリー

HIF-1 α および EMT 関連タンパク質の発現はフローサイトメトリーを用いて解析を行った。細胞内タンパク質である HIF-1 α およびビメンチンの発現量の評価については、我々の既報に準じて解析を行った [49]。具体的には CD133 (-) と CD133 (+) に分離した細胞を 4% パラホルムアルデヒド (BD Pharmingen) にて固定した後、0.1% Tween 液 (BD Pharmingen) で膜透過処理を行った。細胞を PBS で洗浄後、PE 標識 HIF-1 α 抗体または PE 標識マウス Vimentin 抗体を加えて 30 分間、4 °C の冷暗所にて反応させた。また、細胞表面タンパク質である E-カドヘリン、N-カドヘリン、 β 1 インテグリンの発現量の評価については、分離した細胞にそれぞれ PE 標識マウス CD324 (E-カドヘリン) 抗体、PE 標識マウス CD325 (N-カドヘリン) 抗体、そして PE 標識 CD29 (β 1 インテグリン) 抗体を反応させた。解析は BD FACS Calibur flow cytometer (BD Pharmingen) を用いて行い、 1×10^4 個の細胞における各タンパク質の蛍光強度を算出し mean fluorescence intensity (MFI) として表記した。

(4) β -カテニンの核内移行の評価 — 蛍光免疫染色

癌細胞においては核内移行した β -カテニンが HIF-1 α と結合することで、HIF-1 α 標的遺伝子の転写を活性化し、EMT が誘導されると報告されている [50]。この β -カテニンの核内移行については、蛍光免疫染色を用いて評価した。24-well 培養プレ

ートの底にカバーガラスを置き、各細胞を正常酸素または低酸素環境下で 24 時間培養した。その後カバーガラスを取り出し、細胞を 4% パラホルムアルデヒドで固定後、1% Triton X-100 (Sigma Aldrich) で 10 分間の膜透過処理を行った。3% ウシ血清アルブミン (Miltenyi Biotec) 溶液で非特異的反応のブロッキングを行った後、500 倍希釈のマウス抗 β -カテニン抗体を反応させ、4°C で 12 時間培養した。PBS で洗浄後、最後に 500 倍希釈の Alexa Fluor 488 標識抗マウス IgG 抗体を室温で 1 時間反応させた。核の染色には DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を使用した。染色後の細胞は、BZ-8100 蛍光顕微鏡 (Keyence, Osaka, Japan) を用いて 400 倍で観察し撮影した。

(5) 細胞遊走能の評価 — Boyden Chamber Assay

CD133 (-) と CD133 (+) 細胞の細胞遊走能については、我々の既報に準じて Boyden Chamber Assay を用いて評価した (図 3) [25, 51]。具体的には、直径 8 μ m の孔を有するポリカーボネートのフィルター (Ieda Trading, Tokyo, Japan) を Collagen type I (Nitta Gelatin, Osaka, Japan) でコーティングした後、96-well マイクロプレートチャンバー (Ieda Trading) にセットした。細胞は 0.1% ウシ血清アルブミン添加 RPMI-1640 培養液にて懸濁し、上側チャンバーの各穴にそれぞれ、 5×10^5 cells/200 μ l ずつ分注した。濃度勾配に対する細胞遊走能を評価するため、下側チャ

ンバーには 5% 胎児ウシ血清添加 RPMI-1640 培養液を加えた。細胞は分注する前に正常酸素下または低酸素環境下で 24 時間培養し、チャンバー分注後にもそれぞれ同じ環境下でさらに 12 時間培養して遊走能を評価した。培養後フィルターを取り出し、上側に残る細胞を除去し 99% メタノール (Junsei Chemical, Tokyo, Japan) で固定後、ディフ・クイック染色液 (Sysmex, Kobe, Japan) で染色した。吸光度リーダーを用いて 595nm 波長におけるフィルターの吸光度を測定し、この数値を Migration index として遊走能を評価した。

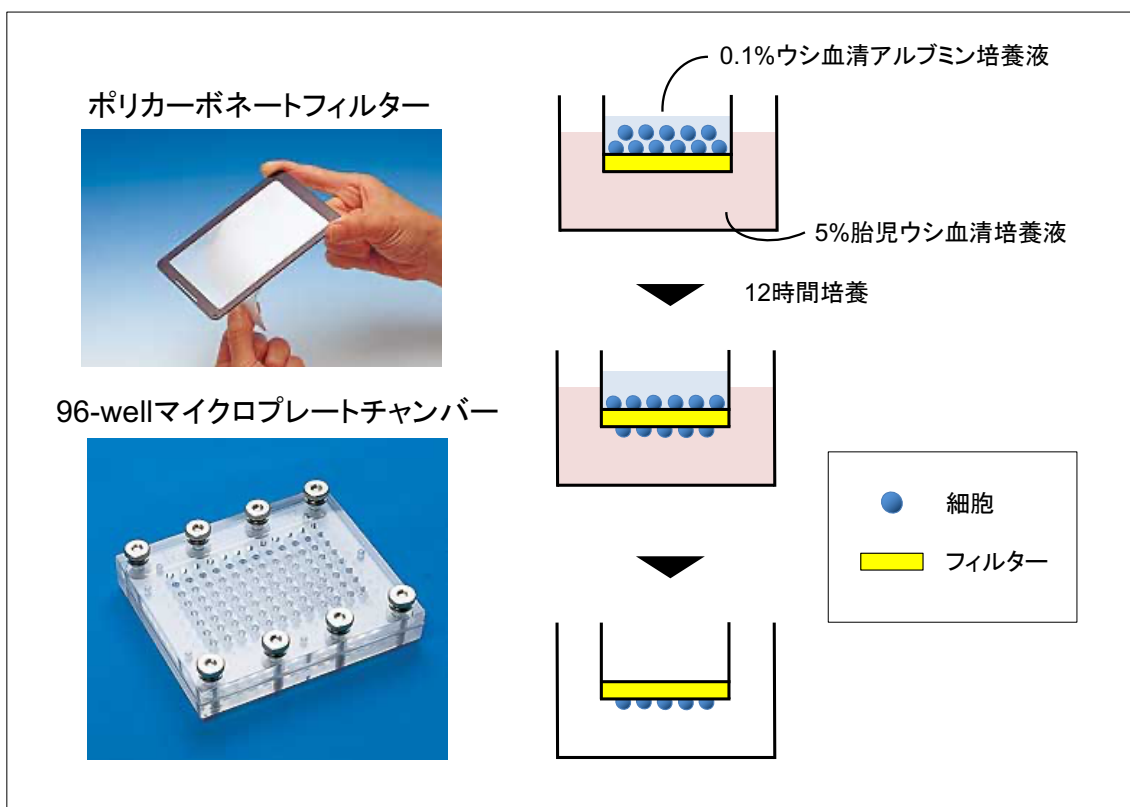


図 3: Boyden Chamber Assay による細胞遊走能の評価

細胞懸濁液を上側チャンバーに添加し培養することで、遊走細胞がポリカーボネートフィルター膜を通過し、底面に接着する。上側チャンバーに残った非遊走細胞を除去した後、遊走細胞を染色・定量する。

(6) 統計学的解析

統計学的有意差の検定において、2 群間比較には Student t 検定を行い、多群間比較には two-way ANOVA 後に post-hoc test を行うことで有意差のある群間を検出した。すべての解析は JMP Pro 14.0 software (SAS Institute, Cary, NC, USA) を用いて行い、 p 値が 0.05 未満の場合を統計学的有意とした。

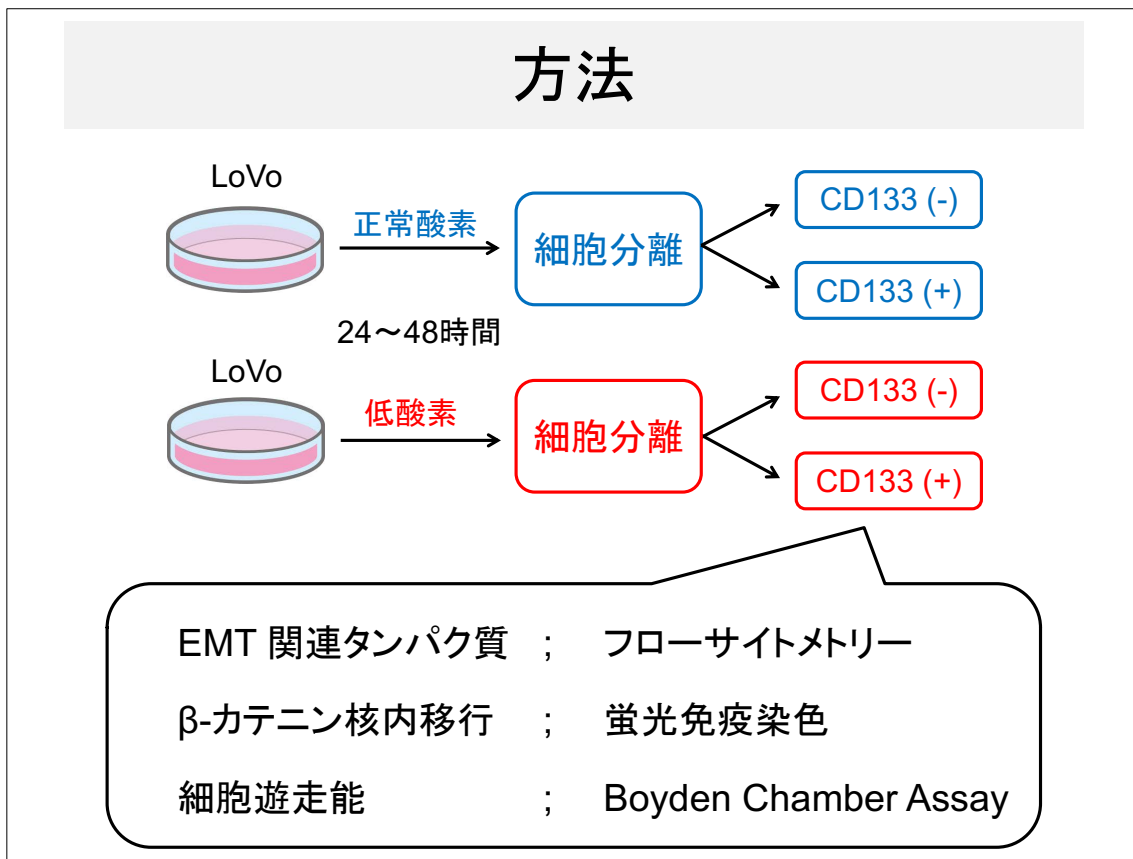


図 4: 実験方法の概略

EMT, epithelial-mesenchymal transition

1-3 結果

(1) 低酸素下における CD133 (-) と CD133 (+) 細胞の EMT 能の活性変化

まず、正常酸素下または低酸素下で 48 時間培養した LoVo 細胞を磁気細胞分離法によって CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離した。分離した細胞数をカウントし CD133 発現率を測定したところ、正常酸素下での CD133 発現率は 6.8%、低酸素下での CD133 発現率は 9.3%と、やや低酸素下で CD133 発現率が増加していた。また、分離直後の CD133 発現量を評価し純度を測定したところ、94.1%の純度で CD133 (+) 細胞の分離が可能であり、86.3%の純度で CD133 (-) 細胞の分離が可能であった (図 5)。CD133 (+) 細胞と CD133 (-) 細胞に分離後に正常酸素で培養すると、CD133 (+) 細胞が CD133 (-) 細胞に分化してしまい CD133 (+) 細胞の純度が下がってしまう [33]。したがって、分離していない LoVo 細胞をあらかじめ正常酸素や低酸素で培養した後に、細胞を分離する方法を採用した。

これらの細胞を用いて、HIF-1 α および EMT 関連タンパク質の発現量をフローサイトメトリーを用いて評価した (図 6)。低酸素下で HIF-1 α 発現量の増加を認めたが、CD133 (+) 細胞でより有意な増加がみられた。また、EMT 関連タンパク質である E-カドヘリンの発現量は低酸素下で減少したが、正常酸素下、低酸素下ともに CD133 (+) 細胞で有意に少なかった。N-カドヘリン、ビメンチンの発現量は低酸素下で増加し、正常酸素下、低酸素下ともに CD133 (+) 細胞で有意に多かった。これらの変化は EMT に特徴的な変化であり、低酸素環境にすることで CD133 (+) 細胞が CD133 (-)

細胞よりも EMT を誘導することが明らかとなった。

一方、 $\beta 1$ インテグリンの発現量も低酸素下で増加したが、正常酸素下、低酸素下ともに CD133 (-) 細胞で有意に多かった。この結果から、細胞外マトリックスや細胞間接着の際に重要なレセプターである $\beta 1$ インテグリンの発現量が多い CD133 (-) 細胞は、接着能が高い可能性が考えられた。

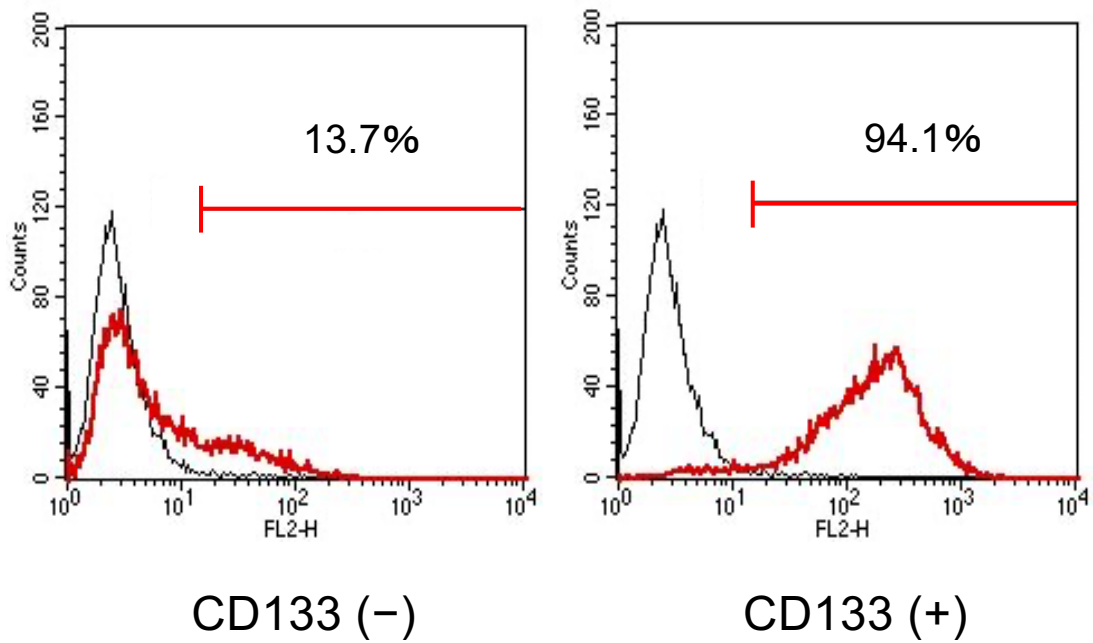


図 5: 細胞分離後の CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞の純度
 LoVo 細胞を磁気細胞分離法によって CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離した。
 分離直後の細胞の CD133 発現量をフローサイトメトリーを用いて評価した。

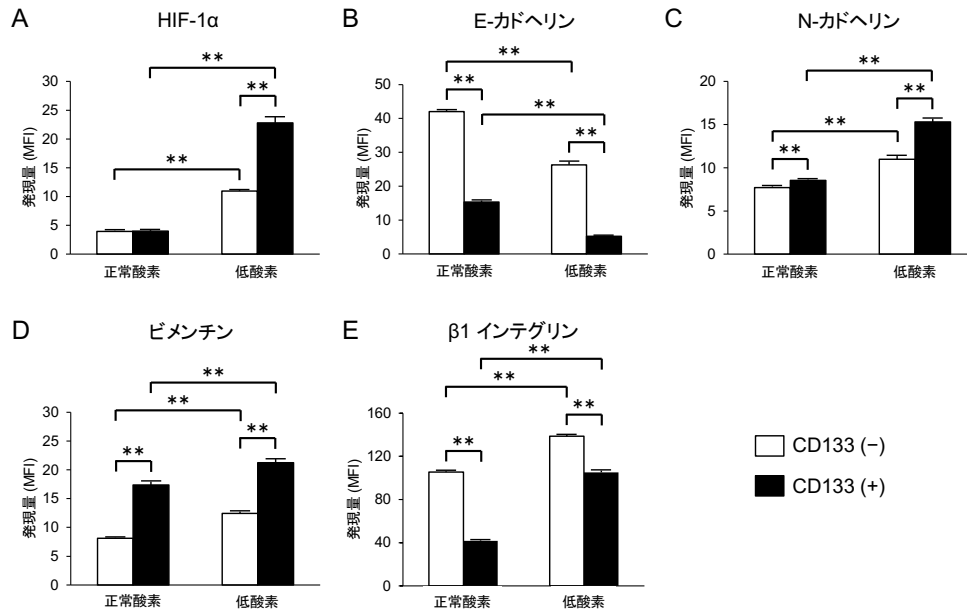


図 6: CD133 (-)、CD133 (+) 細胞における HIF-1 α および EMT 関連タンパク質発現量の変化

LoVo 細胞を正常酸素下または低酸素下で 48 時間培養後、CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離し HIF-1 α (A)、E-カドヘリン (B)、N-カドヘリン (C)、ビメンチン (D)、および β 1 インテグリン (E) の発現量をフローサイトメトリーを用いて評価した。HIF-1 α および各タンパク質発現量を平均値 \pm 標準偏差で示す。

(**; $p < 0.01$)

(2) 低酸素下における CD133 (-) と CD133 (+) 細胞の β -カテニン核内移行

正常酸素下または低酸素下で 24 時間培養した LoVo 細胞を磁気細胞分離法によって CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離し、それぞれの β -カテニンの核内移行を蛍光免疫染色を用いて評価した (図 7)。 β -カテニンの核内移行は低酸素下の CD133 (+) 細胞で観察することができた。この結果から、CD133 (+) 細胞が低酸素下で EMT を誘導する一因として、 β -カテニンの核内移行が寄与している可能性が考えられた。

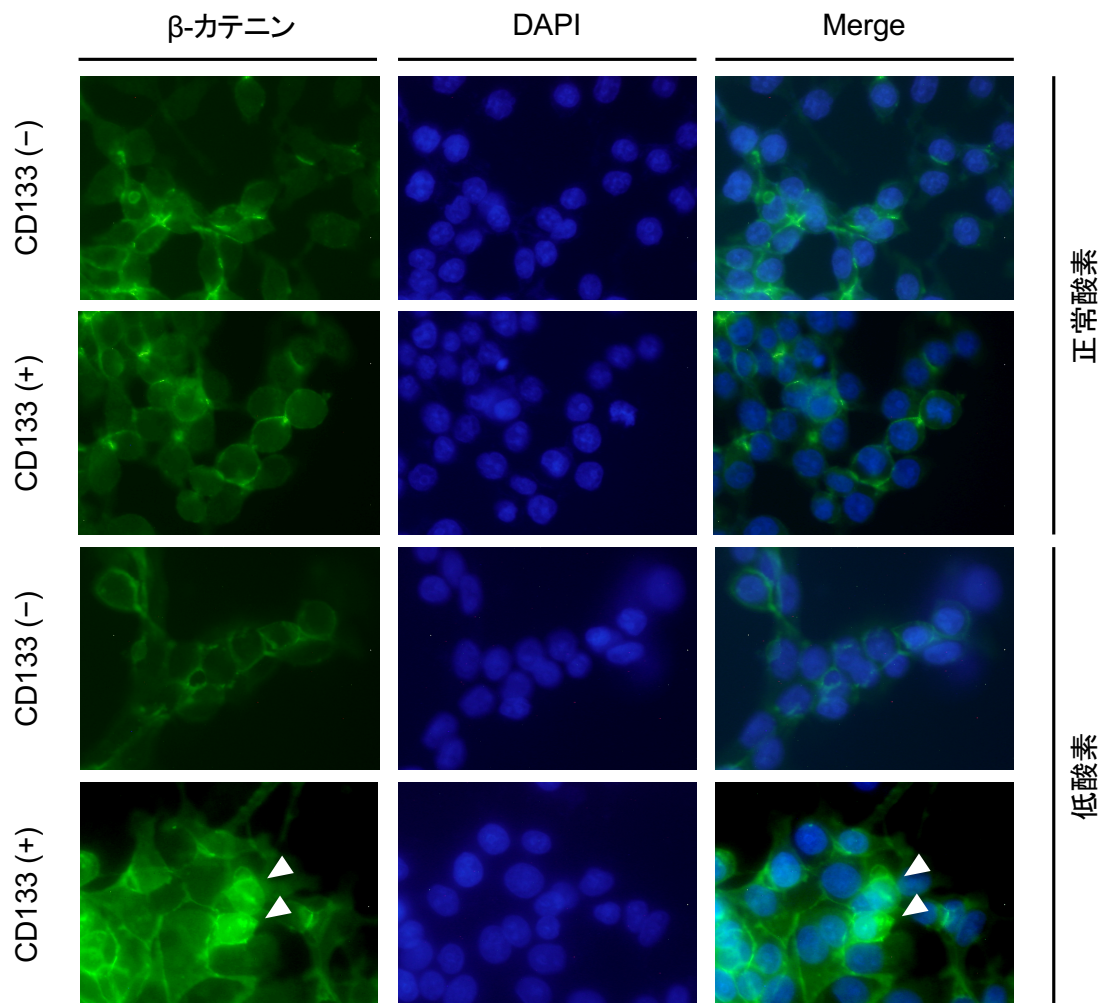


図 7: CD133 (-)、CD133 (+) 細胞における β-カテニンの核内移行
 LoVo 細胞を正常酸素下または低酸素下で 24 時間培養後、CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離し β-カテニンの局在を蛍光顕微鏡で評価した。低酸素下の CD133 (+) 細胞で、β-カテニンの核内移行がみられた (白三角)。

(3) 低酸素下における CD133 (-) と CD133 (+) 細胞の遊走能の変化

正常酸素下または低酸素下で 24 時間培養した LoVo 細胞を磁気細胞分離法によって CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に分離し、それぞれの細胞の正常酸素下または低酸素下での遊走能を Boyden Chamber Assay を用いて評価した (図 8)。CD133 (-) 細胞の遊走能は正常酸素下と低酸素下で有意差は認めなかった。一方、CD133 (+) 細胞では正常酸素下で CD133 (-) 細胞と同等の遊走能であったが、低酸素下では統計学的有意に遊走能が増加した。

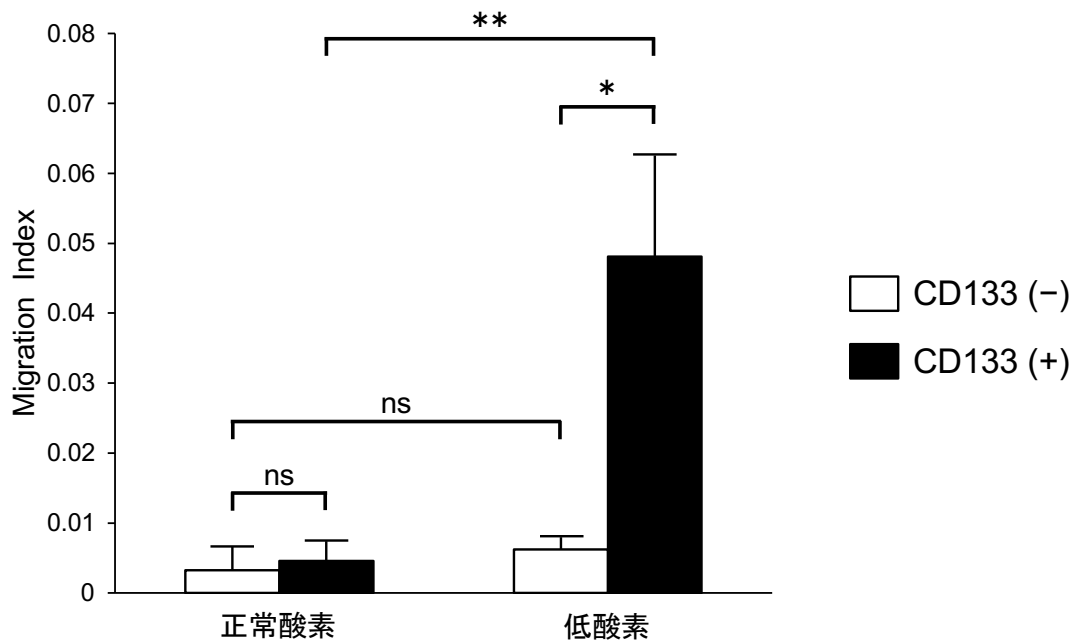


図 8: CD133 (-)、CD133 (+) 細胞における遊走能の変化
 LoVo 細胞を正常酸素下または低酸素下で 24 時間培養後、CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離しさらに 12 時間培養して遊走能を評価した。
 (*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$, ns; 有意差なし)

(4) 再酸素化での時間経過による E-カドヘリンの発現量の推移

低酸素下で減少した E-カドヘリン発現量の、再酸素化後の時間経過による推移をフローサイトメトリーにより評価した (図9)。分離した CD133 (-) 細胞および CD133 (+) 細胞を低酸素下で 24 時間培養した後、正常酸素下にて再酸素化を行った。低酸素下によって正常酸素時の 82% に減少した CD133 (-) 細胞の E-カドヘリン発現量は、再酸素化によって徐々に増加し 24 時間後には正常酸素時の発現量に回復した。CD133 (+) 細胞においては、低酸素下によって正常酸素時の 42% にまで E-カドヘリン発現量は減少したが、再酸素化 24 時間後には同じく正常酸素時の発現量に回復した。

これらの結果から、CD133 (+) 細胞は低酸素下での E-カドヘリン発現の減少量が多いが、再酸素化の際には速やかに E-カドヘリンの発現量が回復し、接着能も回復する可能性が考えられた。

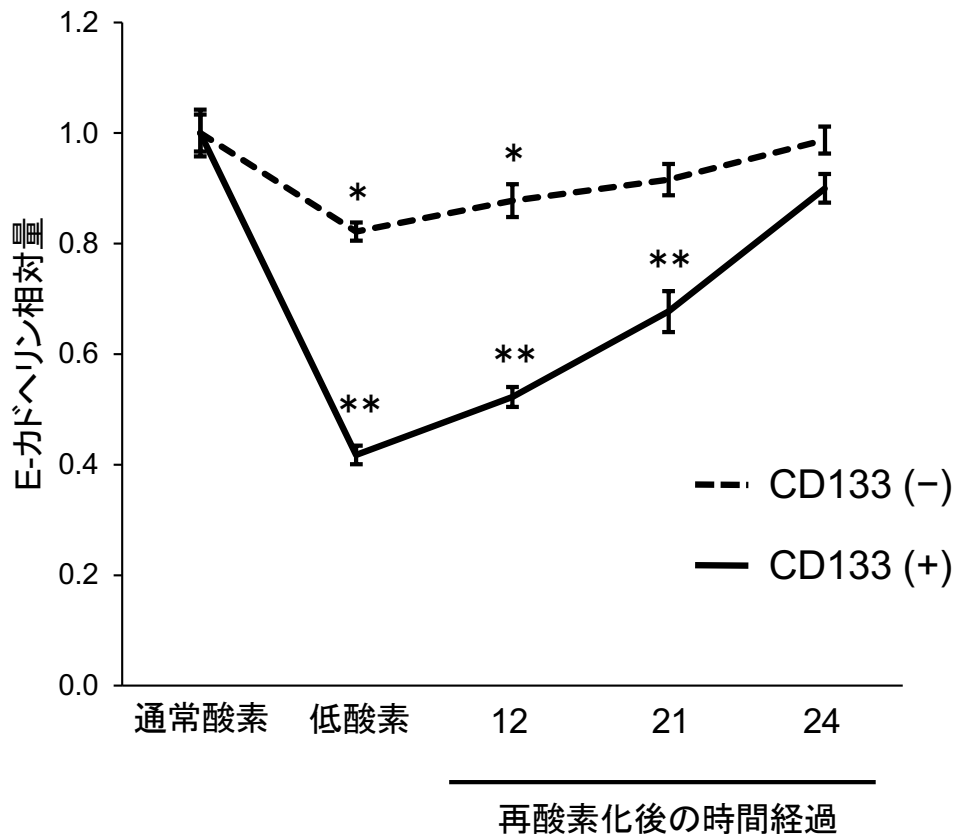


図 9: CD133 (-)、CD133 (+) 細胞における、再酸素化後の E-カドヘリン発現量の推移

分離した CD133 (-) 細胞および CD133 (+) 細胞を低酸素下で 24 時間培養後、正常酸素にて再酸素化し経過した時間ごとの E-カドヘリン発現量をフローサイトメトリーを用いて評価した。通常酸素下での E-カドヘリン発現量を 1 とし、各群での発現量の相対値を平均値 ± 標準偏差で示す。

(*; $p < 0.05$, **; $p < 0.01$)

1-4 考察

癌の幹細胞としての機能獲得のためには低酸素環境が必要であり、HIF シグナルの経路が癌幹細胞の増加に寄与していることが報告されている [52, 53]。大腸癌幹細胞マーカーの一つである CD133 と HIF-1 α の発現は相互に作用していると考えられており、Maeda らは膵臓癌細胞株を用いて、CD133 をノックダウンすることで HIF-1 α の発現が抑制されることを報告している [39]。また逆に神経膠腫細胞においては、低酸素下で HIF-1 α の発現が増加することによって、CD133 (+) 細胞の割合が増加することが示されている [54]。これらのことから CD133 と HIF-1 α の発現の間には、互いに促進し合う密接な相互作用があると考えられてきた。本研究では単一の大腸癌細胞株を CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離し、それぞれの低酸素下における HIF-1 α や EMT 関連タンパク質の発現を直接比較し検討した (図 6)。今回の実験においても、同一の大腸癌細胞株では CD133 (-) 細胞と比較して CD133 (+) 細胞において低酸素下で HIF-1 α の発現が高いことが示された。このことから大腸癌細胞株においても CD133 と HIF-1 α の間には正の相関関係があると考えられた。

今回の実験において (図 7)、 β -カテニンの核内移行は低酸素下の CD133 (+) 大腸癌細胞で観察され、また CD133 (-) 細胞と比較して CD133 (+) 細胞では、低酸素下で有意に EMT 関連タンパク質の発現が増加していた。低酸素下において HIF-1 α は、WNT シグナル経路の活性化を介して β -カテニンの核内移行を促進させると言われている [46, 55]。また癌細胞においては核内移行した β -カテニンが HIF-1 α と結

合することで、VEGF やエリスロポエチンのような HIF-1 α 標的遺伝子の転写を活性化し、EMT を誘導すると言われている [50, 56]。これらの報告を踏まえると、今回の結果から大腸癌細胞においては CD133 および HIF-1 α の発現を介した β -カテニンの核内移行を通じて、EMT 関連タンパクの発現亢進を誘導している可能性があると考えられた。

EMT の誘導によって癌細胞の浸潤能や遊走能が亢進されることが報告されている [16, 18, 22]。そこで我々は特に遊走能に注目し、大腸癌細胞を CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離して、それぞれの通常酸素および低酸素下における遊走能を比較検討することとした (図 8)。通常酸素下では CD133 (-) と CD133 (+) 細胞に遊走能の有意差は見られず、低酸素下でも CD133 (-) 細胞の遊走能の変化は見られなかったが、低酸素下の CD133 (+) 細胞のみ有意に遊走能の亢進を認めた。Ding らは CD133 の発現をノックダウンした膵臓癌細胞で遊走能が抑制されたことを報告しており、CD133 の発現が遊走能の促進に関与すると考えられている [57]。今回の結果において CD133 (+) 大腸癌細胞では EMT 関連タンパク質の発現が亢進し、かつ遊走能も亢進していたことから、大腸癌細胞株においても EMT の亢進が癌細胞の遊走能促進に寄与していると考えられた。ただし、CD133 (-) 細胞は低酸素下において EMT が誘導されていたにも関わらず遊走能は正常酸素時と変わらなかった。この理由としては、低酸素下における β -カテニンの核内移行が CD133 (-) 細胞では観察さ

れなかったことが可能性として考えられる。大腸癌細胞において β -カテニンの核内移行によって癌細胞の遊走能が亢進されることが報告されており、 β -カテニンの核内移行とそれによる標的遺伝子の転写が、遊走能により寄与している可能性が考えられた [58, 59]。

以上の結果から、大腸癌細胞において CD133 (+) 細胞は低酸素下で HIF-1 α の発現を亢進し、また β -カテニンの核内移行を介して EMT 変化を誘導することで細胞の遊走能を亢進するといった、一連のメカニズムが存在する可能性が示唆された (図 11)。

EMT および、この逆の現象である間葉上皮転換 (mesenchymal-epithelial transition: MET) も、癌の転移に非常に重要な役割を果たすと考えられている (図 10) [17, 22, 44]。EMT によって原発巣から転移巣への遠隔転移が誘導されるが、転移先臓器で癌細胞が MET により上皮細胞に戻ることで E-カドヘリンを再発現し、細胞間および周囲組織との接着を再確立し微小転移を形成すると考えられている [22, 60]。したがって、低酸素下で EMT 能を獲得した癌細胞が通常酸素下の遠隔臓器でコロニーを形成するためには、再酸素化された際に MET へと移行できるか否かも重要と考えられている [61]。しかし、CD133 (-) と CD133 (+) 細胞の MET 能を比較した報告はこれまでみられない。今回の実験において、CD133 (+) 大腸癌細胞は低酸素下で減少した E-カドヘリンの発現が、再酸素化されることで 24 時間後には通常酸素時の

発現レベルにまで回復した (図 9)。過去の報告では CD133 (+) 細胞から CD133 (-) 細胞が分化するが、その半減期は 30 日前後であること、また CD133 (-) 細胞から CD133 (+) 細胞は分化されないことが確認されており、この結果から細胞分離 24 時間後のそれぞれの細胞純度は分離直後とほぼ変化がないと考えられる [33]。以上のことから、CD133 (+) 大腸癌細胞は、低酸素下で高い EMT 能を有するだけでなく、再酸素化された際に MET によって上皮細胞へと変化する能力も有していると考えられ、転移先臓器での微小転移の形成をきたしやすいと考えられた。

一方、癌細胞と細胞外マトリックスとの接着を担う細胞接着分子として、インテグリンが知られている [62-64]。様々なシグナル経路によってインテグリンの機能は制御されるが、そのうちの一つに低酸素下における HIF-1 経路の関与が知られている [65, 66]。これまで大腸癌細胞株や乳癌細胞株などで、低酸素下で様々なインテグリンファミリー分子の転写が誘導されることが報告されている [67-69]。また最近の報告では、大腸癌細胞株や肝臓癌細胞株においてインテグリンの発現が CD133 の発現を誘導し、CD133 (+) 細胞の割合が増加することも報告されている [70, 71]。このように、様々なインテグリンファミリー分子の発現が CD133 の発現に寄与していることが示されているが、逆に CD133 の発現がインテグリンの発現にどのように関与しているかは明らかになっていない。当科では以前、同じ大腸癌細胞株 LoVo を CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞に分離した際、CD133 (-) 細胞でより $\beta 1$ インテグリンの発現が多く、

細胞接着能が高いことを報告している [33]。今回の実験においても、通常酸素下および低酸素下どちらの条件においても、CD133 (-) 細胞は CD133 (+) 細胞よりも $\beta 1$ インテグリンの発現が高かった (図 6)。このことから、同一の大腸癌細胞株の接着能を比較した場合、CD133 (+) 細胞よりも CD133 (-) 細胞のほうが $\beta 1$ インテグリンの発現が高く、より高い接着能を有していると考えられた。

本研究の限界として、まず第一にこの研究で使用した大腸癌細胞株は CD133 の発現が比較的高い LoVo 細胞 1 種類のみであり、他の大腸癌細胞株でも同様の結果が見られるかの検討が必要である。第二に、本研究は *in vitro* での検討のみであり、必ずしも *in vivo* でも同様の結果が得られるとは限らないことである。これについても、今後 *in vivo* での検討が必要である。第三に、EMT 関連タンパク質や転写因子の発現をウエスタンブロッティングで評価できていない点である。しかしながら分離操作によって得られる CD133 (+) 細胞は非常に少数であったため、ウエスタンブロッティングでタンパク質の発現を評価することができなかった。最後に、CD133 が HIF-1 α の発現に関与しているかどうかの検証ができていない点である。今後は CD133 陽性細胞で CD133 をノックダウンすることで、HIF-1 α や EMT 関連タンパク質の発現が減少することや、浸潤能が減弱することを示す必要があると考えられる。

以上のような限界は伴うものの、本研究から CD133 (+) 細胞は CD133 (-) 細胞より EMT 能および MET 能、遊走能が高く、一方で CD133 (-) 細胞は CD133 (+)

細胞よりも接着能が高い可能性が示された。

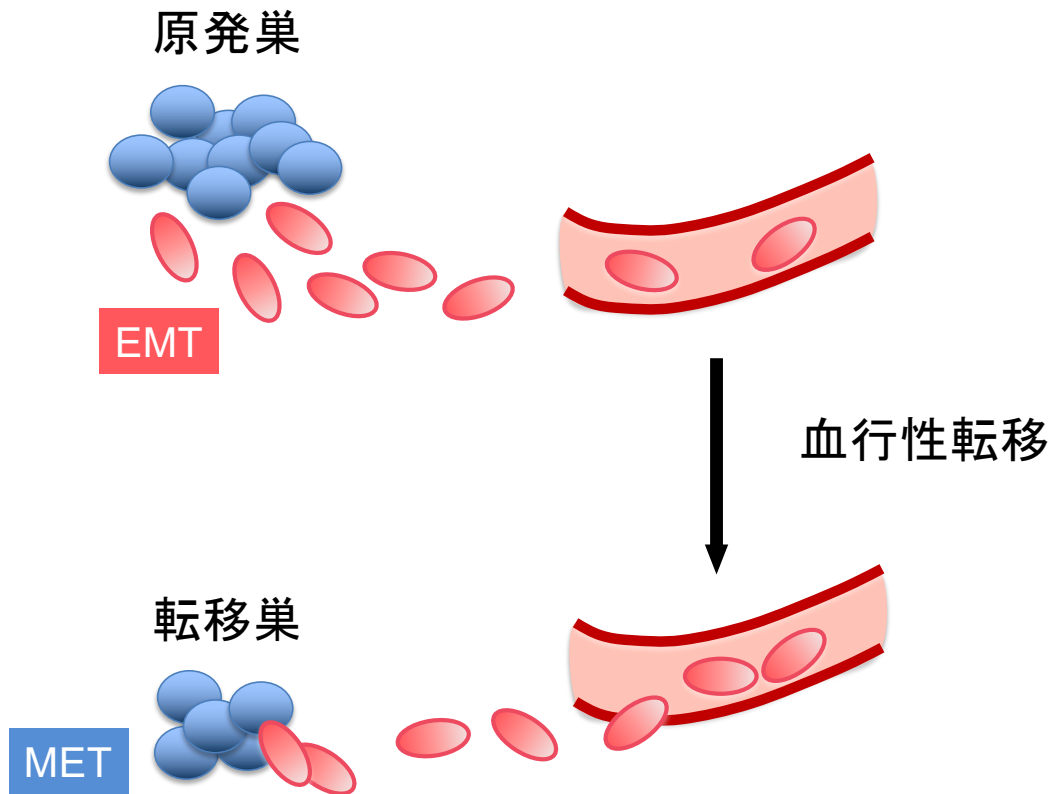


図 10: 血行性転移のプロセスにおける上皮間葉転換 (EMT) および間葉上皮転換 (MET) の役割

転移の初期段階には EMT が重要であり、間葉系細胞 (赤色) に変化することで癌細胞の遊走・浸潤・血管内侵入が可能となる。遠隔臓器で上皮系細胞 (青色) に戻ることは、遠隔転移の最後のステップであるコロニー形成に重要である。

低酸素環境

CD133 (+) 大腸癌

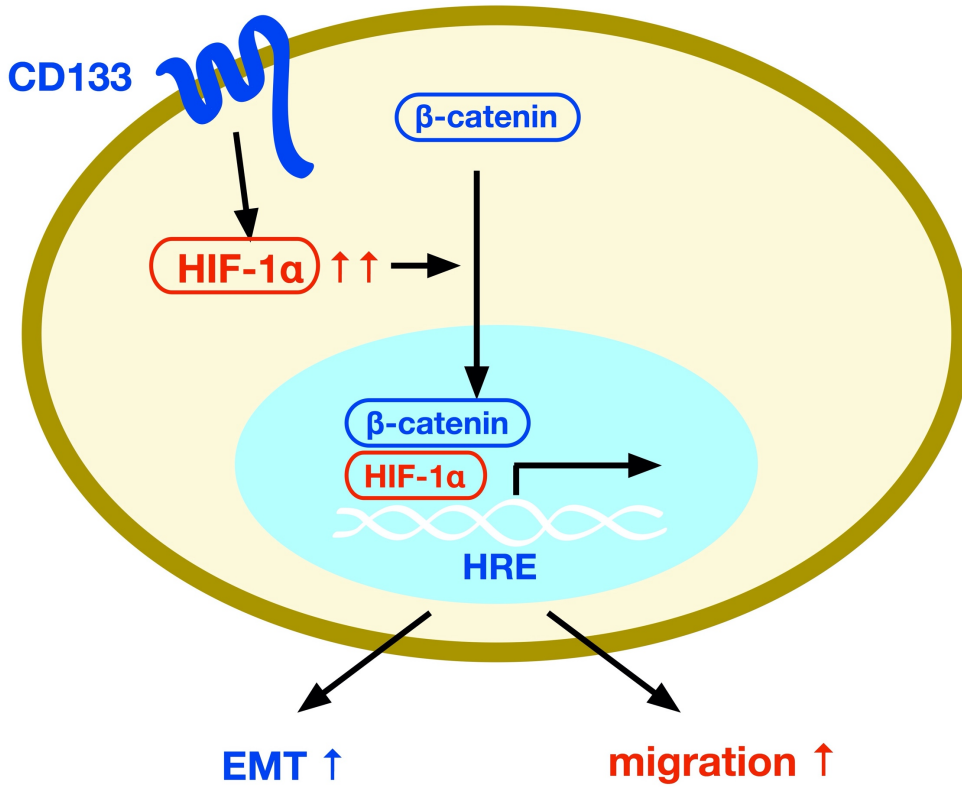


図 11: 本研究結果から推測される、低酸素下での大腸癌細胞における CD133 の役割

HRE, hypoxia-response element; EMT, epithelial-mesenchymal transition

1-5 小括

低酸素下において、CD133 (+) 細胞は CD133 (-) 細胞より HIF-1 α の発現が高く、EMT 関連タンパク質の発現も高かった。さらに低酸素下での CD133 (+) 細胞のみ、遊走能の亢進を認めた。一方、細胞間接着分子である β 1 インテグリンの発現は CD133 (+) 細胞と比較して CD133 (-) 細胞で有意に高かった。

第 2 章

大腸癌組織検体における原発巣と転移巣での CD133 の発現の比較

2-1 背景と目的

第一章において、CD133 (+) 細胞は CD133 (-) 細胞より EMT 能および遊走能が高く、一方で CD133 (-) 細胞は CD133 (+) 細胞よりも接着能が高い可能性を示した。EMT は器官形成や組織成長などの正常過程においても重要なプロセスであるが、癌細胞の場合、EMT によって浸潤や遠隔転移に関連した能力を獲得し、これにより血行性転移が引き起こされると考えられている [3, 21, 22]。

一方、接着能が非常に重要な役割を果たす転移形式として、播種性転移が挙げられる。播種性転移は臓器の表面に露出した癌細胞が原発巣からはがれ落ち、近接する腹膜などに接着することで起こる転移形式である [72]。腹膜表面への付着は、インテグリンや E-カドヘリンなどの細胞接着分子を介した癌細胞と細胞外マトリックスとの相互作用が関与している [72-74]。腹膜播種に最も重要な役割を果たすインテグリンの一つが $\beta 1$ インテグリンであり、胃癌や卵巣癌、膵癌において、高い腹膜播種能を有する癌細胞で $\beta 1$ インテグリンが過剰発現されていることが示されている [75-77]。大腸癌においても、*ex vivo* での $\beta 1$ インテグリンを阻害する実験で腹膜播種の発生が抑えられることが報告されており、 $\beta 1$ インテグリンを高発現している CD133 (-) 細胞は腹膜播種の形成に関与している可能性が考えられる [78]。

そこで我々は EMT 能の高い CD133 (+) 細胞については血行性転移である肝転移を起こしやすいが、 β 1 インテグリンや E-カドヘリンの発現が高く接着能の高い CD133 (-) 細胞については腹膜播種を起こしやすいのではないかという仮説を立てた。この仮説を検証すべく、実際の臨床検体を用いて原発巣と肝転移巣または播種巣の CD133 発現率と臨床病理学的因子を比較検討した。

2-2 方法

(1) 症例

肝転移症例については、1998年1月から2010年12月までの期間に東京大学医学部附属病院で根治切除を施行した大腸癌同時性肝転移症例を対象とした。腹膜播種症例については、1997年1月から2017年12月までの期間に東京大学医学部附属病院で外科切除を施行した大腸癌同時性腹膜播種症例を対象とした。いずれの群においても、術前に化学療法あるいは放射線療法を施行した症例は対象から除外した。何らかの化学療法あるいは放射線療法が介在している症例が大半であるため、異時性転移症例は本検討から除外した。

(2) 免疫染色

免疫染色は我々の既報に準じて解析を行った [34, 79]。具体的には、切除検体をホルマリン固定したパラフィン包埋組織ブロックから、3 μm の厚さで未染色標本を切り出した。まずエタノールを用いて脱パラフィン処理および脱水処理した後、10 mM クエン酸バッファー (pH=6.0) 処理と 120°C のオートクレーブによる 5 分間の加熱処理にて抗原賦活化を行い、0.3% 過酸化水素水含有メタノールを用いて内因性ペルオキシダーゼのブロックを行った。次いで、5% ウシ血清アルブミン溶液を用いて非特異的反応のブロッキングを行った後、100 倍に希釈したマウスモノクローナル抗体である抗 CD133 抗体 (130-090-422; Miltenyi Biotec) を反応させ、4°C にて 8 時間インキ

ュベートした。二次抗体反応はヒストファイン SAB-PO (M) キット (Nichirei, Tokyo, Japan) を用いて行った。発色は 50 mM tris-buffer に溶解した 2% DAB (3,30-diaminobenzidine tetrahydrochloride) に 10 分間反応させて行い、核の染色にはマイヤーヘマトキシリン (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を用いた。

CD133 の発現は ImageJ software (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて評価した。まず、免疫染色を行った検体を 40 倍から 200 倍の低倍率で観察し、CD133 が強く染色された部位を 10 視野選定した。次に 400 倍で選定した各視野を観察し、計 1000 個の癌細胞について評価を行った。これまでの既報と同様、原発の大腸癌組織において CD133 (+) 細胞が 5%以上認められた場合に CD133 陽性と定義した [34, 79]。判定は二人の評価者が臨床病理学的情報を伏せた状態で評価した。

(3) 統計学的解析

統計学的有意差の検定において、患者背景因子と CD133 の発現との関係性は、 χ^2 検定あるいは Fisher の正確検定で評価した。原発巣と転移巣における CD133 発現率の違いは、対応のある Student *t* 検定を用いて評価した。二人の評価者間の CD133 発現率の一致率は、相関係数を算出し評価した。すべての解析は JMP Pro 14.0 software (SAS Institute) を用いて行い、*p* 値が 0.05 未満の場合を統計学的有意

とした。

(4) 倫理

本研究は東京大学医学部附属病院の倫理委員会の承認を受けて施行した

[審査番号 3252-(8)]。

2-3 結果

(1) 切除検体に対する免疫染色

切除検体に対する免疫染色結果の代表例を図 12 に示す。CD133 の発現はこれまでの報告と同様に、癌組織の腺管内腔表面に認め正常組織には発現を認めなかった [80, 81]。二人の評価者における CD133 発現率の一致率を評価するため相関係数を算出したところ、大腸癌肝転移症例での原発巣に対する免疫染色では 0.722、大腸癌腹膜播種症例に対しては 0.775 であり、いずれも良好な一致率を得た。

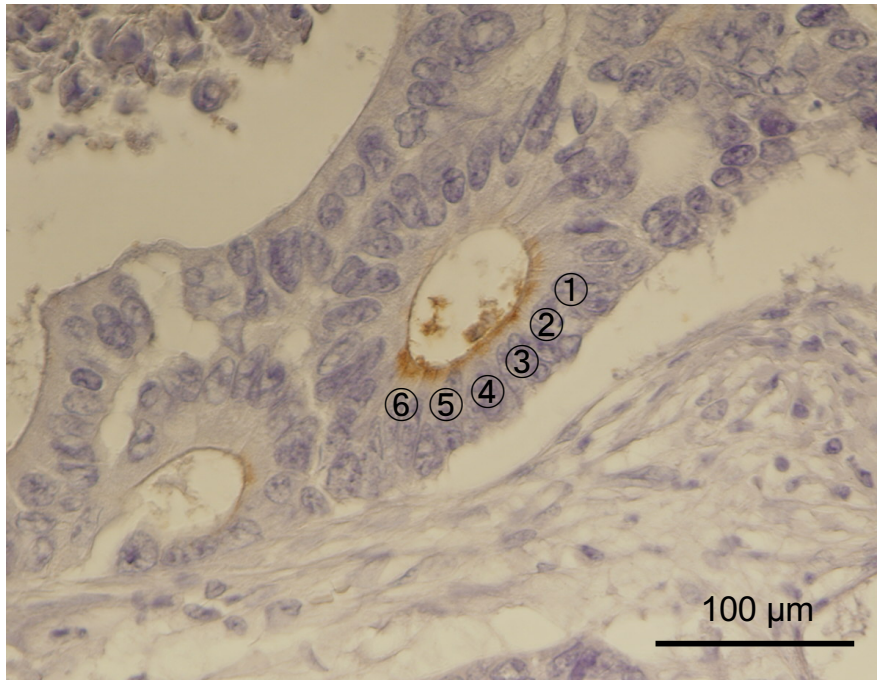


図 12: 切除検体における、CD133 染色の代表例
高倍率像 (400 倍) での画像にて免疫染色の評価を行った。CD133 の染色は図のように腺管内腔の細胞膜に認め、染色された癌細胞を陽性細胞 (①~⑥) とカウントした。

(2) 患者背景

大腸癌肝転移群は 84 症例、大腸癌腹膜播種群は 58 症例が該当した。両群で重複する症例は 1 症例であった。各群における臨床病理学的特徴を表 2 に示す。肝転移群と比較して、腹膜播種群は年齢が高く、女性や右側結腸で多く、分化度が低く深達度の進行した症例が多かった。肝転移群のうち 5 例 (6%) は二期的に肝切除を施行した症例であった。腹膜播種群ではすべての症例で一次的切除であった。

表 2: 患者背景

		大腸癌肝転移群 (N = 84)	大腸癌腹膜播種群 (N = 58)	<i>p</i> 値
年齢 (歳)				0.02
	中央値 (範囲)	60 (33-81)	66 (40-88)	
性別	男性	53 (63%)	26 (45%)	0.03
	女性	31 (37%)	32 (55%)	
原発部位	右側	16 (19%)	31 (53%)	<0.01
	左側	68 (81%)	27 (47%)	
組織型	高分化型腺癌	34 (40%)	20 (34%)	0.01
	中分化型腺癌	46 (55%)	26 (45%)	
	その他	4 (5%)	12 (21%)	
深達度	T1	0 (0%)	0 (0%)	<0.01
	T2	6 (7%)	0 (0%)	
	T3	48 (57%)	10 (17%)	
	T4	30 (36%)	30 (83%)	
リンパ節転移	なし	23 (27%)	13 (22%)	0.50
	あり	61 (73%)	45 (78%)	

(3) CD133 発現と臨床病理学的因子との関連

各群の大腸癌原発巣を CD133 陽性群と陰性群の二群に分け、どのような背景因子が CD133 の発現に関連しているのかを検討した (表 3)。CD133 陽性群は大腸癌肝転移群で 44 例 (52%)、大腸癌腹膜播種群で 33 例 (57%)であった。肝転移群においては、深達度やリンパ節転移など癌の進行度を表す因子を含め、CD133 の発現はいずれの因子とも関連しなかった。一方、腹膜播種群においては、高分化型腺癌で CD133 陽性の割合が高く、低分化型腺癌や粘液癌など悪性度の高い組織型で CD133 陰性の割合が高かった ($p = 0.04$)。腹膜播種群においても、CD133 の発現は癌の進行度を表す因子との関連は認めなかった。

表 3: CD133 の発現と臨床病理学的因子

	大腸癌肝転移群			大腸癌腹膜播種群		
	CD133 (-) N = 40	CD133 (+) N = 44	<i>p</i> 値	CD133 (-) N = 25	CD133 (+) N = 33	<i>p</i> 値
年齢 (歳)			0.45			0.26
中央値 (範囲)	59 (33-79)	61 (41-81)		68 (40-88)	64 (41-80)	
性別			0.73			0.67
男性	26 (65%)	27 (61%)		12 (48%)	14 (42%)	
女性	14 (35%)	17 (39%)		13 (52%)	19 (58%)	
原発巣部位			0.37			0.85
右側	6 (15%)	10 (23%)		13 (52%)	18 (55%)	
左側	34 (85%)	34 (77%)		12 (48%)	15 (45%)	
組織型			0.08			0.04
高分化型腺癌	14 (35%)	20 (45%)		6 (24%)	14 (42%)	
中分化型腺癌	22 (55%)	24 (55%)		10 (40%)	16 (48%)	
その他	4 (10%)	0 (0%)		9 (36%)	3 (12%)	
深達度			0.90			0.11
T2-3	26 (65%)	28 (64%)		2 (8%)	8 (24%)	
T4	14 (35%)	16 (36%)		23 (92%)	25 (76%)	
リンパ節転移			0.64			0.31
なし	10 (25%)	13 (30%)		4 (16%)	9 (27%)	
あり	30 (75%)	31 (70%)		21 (84%)	24 (73%)	
PCI						0.92
<10				17 (68%)	22 (67%)	
≥10				8 (32%)	11 (33%)	

PCI, peritoneal cancer index

(4) 大腸癌肝転移および大腸癌腹膜播種の原発巣・転移巣における CD133 の発現

大腸癌肝転移群および大腸癌腹膜播種群における、原発巣と転移巣それぞれの CD133 (+) 細胞率を図 13 に示す。大腸癌肝転移群については原発巣で中央値 5.3% (範囲: 0.4-41.9)、肝転移巣で 8.2% (範囲: 0.6-51.0)であり、肝転移巣で有意に CD133 の発現率が高かった ($p < 0.01$)。一方、大腸癌腹膜播種群については原発巣で中央値 6.2% (範囲: 0.8-30.7)、腹膜播種巣で 2.9% (範囲: 0.3-28.0)であり、腹膜播種巣で有意に CD133 の発現率が低かった ($p < 0.01$)。それぞれの原発巣の CD133 の発現率については有意差を認めなかった ($p = 0.42$)。

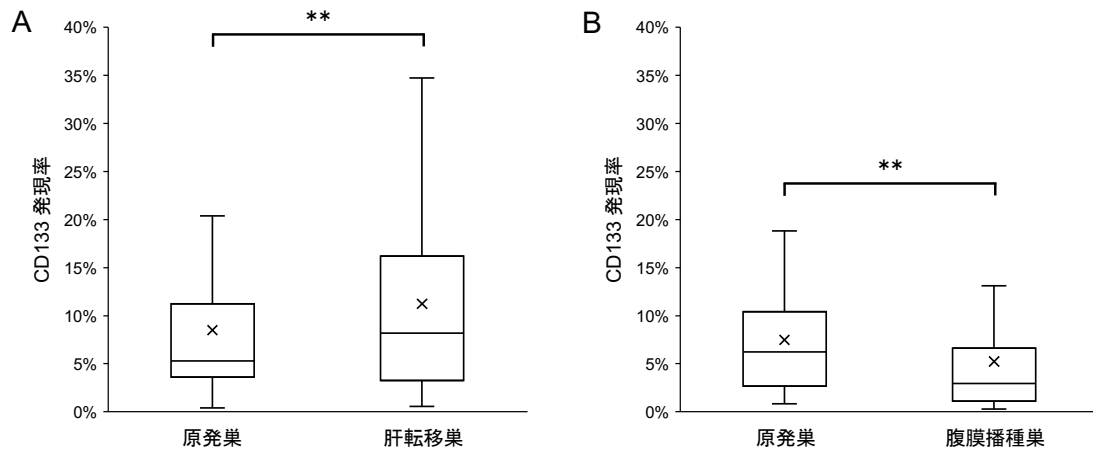


図 13: 原発巣および転移巣に対する CD133 発現率

大腸癌肝転移における原発巣と肝転移巣 (A)、および大腸癌腹膜播種における原発巣と腹膜播種巣 (B) での CD133 (+)細胞の割合。箱内の横線は CD133 発現率の中央値、×印は平均値をそれぞれ示す

(**; $p < 0.01$)

2-4 考察

第一章の結果から、CD133 (+) 細胞は肝転移を起こしやすく CD133 (-) 細胞は腹膜播種を起こしやすいのではないかと仮説を立て、実際の臨床検体を用いてこの仮説を検証した。表 2 において大腸癌肝転移群は大腸癌腹膜播種群と比較して、年齢が若く、男性で左側結腸に多かったが、これは大腸癌が肝転移を起こす危険因子とされている既報と一致する結果であった [82-84]。これまでに、CD133 (+) 細胞の発現率が 5% 以上の場合に陽性と定義して原発巣と肝転移巣における CD133 の発現を調べたところ、原発巣よりも肝転移巣の方が CD133 陽性の割合がわずかに高いことを示したが、具体的な CD133 (+) 細胞の発現率は評価できていなかった [34]。そこで今回、新たにコホートを調べ直し、原発巣と肝転移巣における CD133 (+) 細胞の発現率を比較した。その結果、肝転移巣における CD133 発現率は、原発巣よりも有意に高かった ($p < 0.01$)。これまでの報告では、ヒト肺癌細胞を用いたマウス肝転移モデルにおいて、CD133 (+) 細胞を注入したマウスの方が、CD133 (-) 肺癌細胞を注入したマウスと比較して肝転移をきたしやすいことが示されている [85]。また臨床検体を用いた解析においても、大腸癌原発巣と同時性肝転移巣それぞれの CD133 の mRNA 発現量は、原発巣よりも肝転移巣で有意に高いことが示されている [86]。以上の既報も踏まえて、本研究結果から大腸癌において CD133 (+) 細胞が肝転移に寄与しているものと考えられた。

しかしながら肝転移巣での癌細胞すべてが CD133 (+) 細胞であったわけで

はない。これについては、本研究で示したように CD133 (+) 細胞が転移先臓器で MET を起こすこと、あるいは我々が以前報告したように肝転移を形成した後に CD133 (+) 細胞が CD133 (-) 細胞へと分化することによって、CD133 (-) 細胞が増えることが可能性として考えられた [33]。これを裏付けるデータとして、Huang らは大腸癌肝転移巣における CD133 (+) 細胞の発現が、腫瘍の増大とともに減少することを示している [87]。

一方、腹膜播種についても CD133 (+) 細胞の発現率 5%をカットオフとして、CD133 陽性と陰性の二群に分けたところ、肝転移巣とは逆に腹膜播種巣では原発巣より CD133 陽性の割合が低いことがこれまでに示されていたが、こちらも具体的な CD133 (+) 細胞の発現率は評価できていなかった [79]。そこで今回、腹膜播種についても新たにコホートを調べ直し原発巣と腹膜播種巣における CD133 (+) 細胞の発現率を比較した結果、腹膜播種巣での CD133 発現率は、原発巣よりも有意に低かった ($p < 0.01$)。CD133 (+) 細胞と腹膜播種との関連については、卵巣癌細胞において CD133 (+) 細胞が腹膜中皮細胞に付着しやすく、卵巣癌患者の臨床検体を用いた解析でも CD133 (+) 細胞が腹膜播種をきたしやすいことが示されている [88]。一方で大腸癌に関しては、腹膜播種を有する大腸癌の CD133 発現は、肝転移を有する大腸癌と比較して低いといった報告もあり [89]、腹膜播種における CD133 の役割に関しては明らかでないことも多い。本研究の結果からも、大腸癌においては CD133 (-)

細胞が腹膜播種形成に寄与しているものと考えられた。

本研究の限界については、まず第一にこれらの検討が後方視的検討であり、対象とした症例は単一施設に限られていることである。第二に、大腸癌肝転移群と腹膜播種群で組織型や深達度などの患者背景が異なる点である。第三に、症例数がやや少ないため、本結果の正確性に関してはさらに症例数を増やした検証が望ましい点である。

以上のような限界は伴うものの、本研究から CD133 (+) 細胞は肝転移をきたしやすく、CD133 (-) 細胞は腹膜播種をきたしやすい可能性が示された (図 14)。

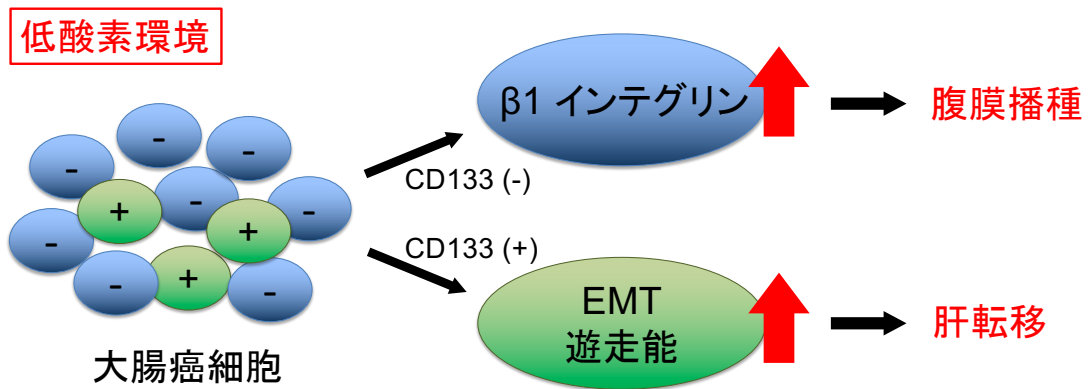


図 14: 本研究結果から推測される、大腸癌細胞の転移における CD133 の役割
EMT, epithelial-mesenchymal transition

2-5 小括

大腸癌肝転移症例において、肝転移巣の CD133 (+) 細胞の発現率は原発巣よりも高かった。一方で大腸癌腹膜播種症例においては、腹膜播種巣の CD133 (+) 細胞の発現率は原発巣よりも低かった。CD133 (+) 細胞は肝転移に、CD133 (-) 細胞は腹膜播種形成に寄与している可能性が考えられた。

結論

本研究では、低酸素環境下における上皮間葉転換 (EMT) と CD133 の発現との関連と、遠隔転移形成における CD133 の関与の検証を目的として、基礎研究と後方視的観察研究を行い、以下の結果を得た。

1. 低酸素下では CD133 (-) 細胞と比較して、CD133 (+) 細胞で EMT 関連タンパク質の発現が多く、遊走能も高かった。一方で CD133 (-) 細胞は CD133 (+) 細胞と比較して、細胞接着タンパク質である $\beta 1$ インテグリンの発現が多かった。
2. 遠隔転移を有する大腸癌において、肝転移巣は原発巣よりも CD133 発現率が高く、腹膜播種巣は原発巣よりも発現率が低かった。

以上より、CD133 (+) 細胞は低酸素下において CD133 (-) 細胞よりも上皮間葉転換がより誘導され遊走能も増加するため、肝転移などの血行性転移を起こしやすいこと、一方で CD133 (-) 細胞は CD133 (+) 細胞と比較して接着能が増加するために腹膜播種を起こしやすい可能性があると考えられた。

今後、CD133 が HIF-1 α を誘導するシグナルや遊走能を亢進させるシグナルを解明し、関与する遺伝子やタンパク質を発見することができれば、将来的には大腸癌肝転移に対する新しい予防法や治療法が開発される可能性がある。また、低酸素

環境下で選択的に CD133 の活性阻害をもつようなプロドラッグや、癌細胞特異的に酸素を運搬するような薬剤があれば、低酸素環境下での CD133 の血行性転移促進を阻害する、新たな肝転移予防法となるかもしれない。一方で、CD133 がなぜ細胞接着因子である $\beta 1$ インテグリンの発現が低いのか、そのシグナルや関連タンパク質などを解明することによって、将来的にはこちらは腹膜播種の新たな予防や治療法になるかもしれない。本研究結果は、そのような将来的展望を実現するための導入として位置づけられる。本研究が発端となり、CD133 の転移に関わるメカニズムがさらに解明され、大腸癌遠隔転移の予防や治療がさらに発展されることを期待する。

謝辞

本研究を進めるにあたって、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 石原聡一郎教授、ならびに故 渡邊聡明前教授には研究全般にわたり御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。また、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学 川合一茂准教授、ならびに園田洋史助教には、研究の概要をはじめ研究の進め方、具体的な実験方法およびデータの解釈、さらには論文の作成など、多岐に渡る詳細な御指導を頂き、深く感謝いたします。

また、実際の実験に際しましては、多くの先生方に多大なる御協力を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

1. Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin*; 68: 394-424. 2018.
2. Siegel RL, Miller KD, Fedewa SA, Ahnen DJ, Meester RGS, Barzi A, Jemal A. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA Cancer J Clin*; 67: 177-93. 2017.
3. Chaffer CL, Weinberg RA. A perspective on cancer cell metastasis. *Science*; 331: 1559-64. 2011.
4. Paduch R. The role of lymphangiogenesis and angiogenesis in tumor metastasis. *Cell Oncol (Dordr)*; 39: 397-410. 2016.
5. Japanese Classification of Colorectal, Appendiceal, and Anal Carcinoma: the 3d English Edition [Secondary Publication]. *J Anus Rectum Colon*; 3: 175-95. 2019.
6. Hashiguchi Y, Muro K, Saito Y, Ito Y, Ajioka Y, Hamaguchi T, Hasegawa K, Hotta K, Ishida H, Ishiguro M, Ishihara S, Kanemitsu Y, Kinugasa Y, Murofushi K, Nakajima TE, Oka S, Tanaka T, Taniguchi H, Tsuji A, Uehara K, Ueno H, Yamanaka T, Yamazaki K, Yoshida M, Yoshino T, Itabashi M, Sakamaki K, Sano K, Shimada Y, Tanaka S, Uetake H, Yamaguchi S, Yamaguchi N, Kobayashi H, Matsuda K, Kotake K, Sugihara K. Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum (JSCCR) guidelines 2019 for the treatment of colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*; 25: 1-42. 2020.
7. Gilkes DM, Semenza GL, Wirtz D. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*; 14: 430-9. 2014.
8. Wilson WR, Hay MP. Targeting hypoxia in cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 11: 393-410. 2011.
9. Rankin EB, Giaccia AJ. Hypoxic control of metastasis. *Science*; 352: 175-80. 2016.
10. Pennacchietti S, Michieli P, Galluzzo M, Mazzone M, Giordano S, Comoglio PM. Hypoxia promotes invasive growth by transcriptional activation of the met protooncogene. *Cancer Cell*; 3: 347-61. 2003.
11. Schito L. Hypoxia-Dependent Angiogenesis and Lymphangiogenesis in Cancer. *Adv Exp Med Biol*; 1136: 71-85. 2019.
12. Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via de novo protein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhancer at a site required for

- transcriptional activation. *Mol Cell Biol*; 12: 5447-54. 1992.
13. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) pathway. *Sci STKE*; 2007: cm8. 2007.
 14. Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*; 3: 721-32. 2003.
 15. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*; 166: 21-45. 2016.
 16. Mittal V. Epithelial Mesenchymal Transition in Tumor Metastasis. *Annu Rev Pathol*; 13: 395-412. 2018.
 17. Williams ED, Gao D, Redfern A, Thompson EW. Controversies around epithelial-mesenchymal plasticity in cancer metastasis. *Nat Rev Cancer*; 19: 716-32. 2019.
 18. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*; 139: 871-90. 2009.
 19. Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol*; 15: 178-96. 2014.
 20. Pérez-Pomares JM, Muñoz-Chápuli R. Epithelial-mesenchymal transitions: a mesodermal cell strategy for evolutive innovation in Metazoans. *Anat Rec*; 268: 343-51. 2002.
 21. Huber MA, Kraut N, Beug H. Molecular requirements for epithelial-mesenchymal transition during tumor progression. *Curr Opin Cell Biol*; 17: 548-58. 2005.
 22. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*; 2: 442-54. 2002.
 23. Jiang J, Tang YL, Liang XH. EMT: a new vision of hypoxia promoting cancer progression. *Cancer Biol Ther*; 11: 714-23. 2011.
 24. Tam SY, Wu VWC, Law HKW. Hypoxia-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancers: HIF-1 α and Beyond. *Front Oncol*; 10: 486. 2020.
 25. Hongo K, Tsuno NH, Kawai K, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, Muro K, Tada N, Nirei T, Sunami E, Takahashi K, Nagawa H, Kitayama J, Watanabe T. Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition. *J Surg Res*; 182: 75-84. 2013.
 26. Shmelkov SV, St Clair R, Lyden D, Rafii S. AC133/CD133/Prominin-1. *Int J Biochem Cell Biol*; 37: 715-9. 2005.
 27. Takenobu H, Shimosato O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A, Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification. *Oncogene*; 30: 97-105. 2011.
 28. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, Bruns CJ,

- Heeschen C. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*; 1: 313-23. 2007.
29. Eramo A, Lotti F, Sette G, Piloizzi E, Biffoni M, Di Virgilio A, Conticello C, Ruco L, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ*; 15: 504-14. 2008.
30. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Piloizzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*; 445: 111-5. 2007.
31. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*; 445: 106-10. 2007.
32. Bjerkvig R, Tysnes BB, Aboody KS, Najbauer J, Terzis AJ. Opinion: the origin of the cancer stem cell: current controversies and new insights. *Nat Rev Cancer*; 5: 899-904. 2005.
33. Hongo K, Tanaka J, Tsuno NH, Kawai K, Nishikawa T, Shuno Y, Sasaki K, Kaneko M, Hiyoshi M, Sunami E, Kitayama J, Takahashi K, Nagawa H. CD133(-) cells, derived from a single human colon cancer cell line, are more resistant to 5-fluorouracil (FU) than CD133(+) cells, dependent on the β 1-integrin signaling. *J Surg Res*; 175: 278-88. 2012.
34. Kishikawa J, Kazama S, Oba K, Hasegawa K, Anzai H, Harada Y, Abe H, Matsusaka K, Hongo K, Oba M, Yasuda K, Otani K, Nishikawa T, Tanaka T, Tanaka J, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Nozawa H, Yamaguchi H, Ishihara S, Sunami E, Ushiku T, Kitayama J, Fukayama M, Kokudo N, Watanabe T. CD133 Expression at the Metastatic Site Predicts Patients' Outcome in Colorectal Cancer with Synchronous Liver Metastasis. *Ann Surg Oncol*; 23: 1916-23. 2016.
35. Rasheed S, Harris AL, Tekkis PP, Turley H, Silver A, McDonald PJ, Talbot IC, Glynn-Jones R, Northover JM, Guenther T. Hypoxia-inducible factor-1alpha and -2alpha are expressed in most rectal cancers but only hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with prognosis. *Br J Cancer*; 100: 1666-73. 2009.
36. Zhang Q, Han Z, Zhu Y, Chen J, Li W. Role of hypoxia inducible factor-1 in cancer stem cells (Review). *Mol Med Rep*; 23:2021.
37. Matsumoto K, Arao T, Tanaka K, Kaneda H, Kudo K, Fujita Y, Tamura D, Aomatsu K, Tamura T, Yamada Y, Saijo N, Nishio K. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. *Cancer Res*; 69: 7160-4. 2009.
38. Hashimoto O, Shimizu K, Semba S, Chiba S, Ku Y, Yokozaki H, Hori Y. Hypoxia

- induces tumor aggressiveness and the expansion of CD133-positive cells in a hypoxia-inducible factor-1 α -dependent manner in pancreatic cancer cells. *Pathobiology*; 78: 181-92. 2011.
39. Maeda K, Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, Miyazaki Y, Tsukasa K, Hayashi T, Shinci H, Natsugoe S, Takao S. CD133 Modulate HIF-1 α Expression under Hypoxia in EMT Phenotype Pancreatic Cancer Stem-Like Cells. *Int J Mol Sci*; 172016.
 40. Chen YS, Wu MJ, Huang CY, Lin SC, Chuang TH, Yu CC, Lo JF. CD133/Src axis mediates tumor initiating property and epithelial-mesenchymal transition of head and neck cancer. *PLoS One*; 6: e28053. 2011.
 41. Li W, Cho MY, Lee S, Jang M, Park J, Park R. CRISPR-Cas9 mediated CD133 knockout inhibits colon cancer invasion through reduced epithelial-mesenchymal transition. *PLoS One*; 14: e0220860. 2019.
 42. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest*; 119: 1420-8. 2009.
 43. Zeisberg M, Neilson EG. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest*; 119: 1429-37. 2009.
 44. Banyard J, Bielenberg DR. The role of EMT and MET in cancer dissemination. *Connect Tissue Res*; 56: 403-13. 2015.
 45. Loh CY, Chai JY, Tang TF, Wong WF, Sethi G, Shanmugam MK, Chong PP, Looi CY. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. *Cells*; 82019.
 46. Vu T, Datta PK. Regulation of EMT in Colorectal Cancer: A Culprit in Metastasis. *Cancers (Basel)*; 92017.
 47. Ahmed D, Eide PW, Eilertsen IA, Danielsen SA, Eknæs M, Hektoen M, Lind GE, Lothe RA. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*; 2: e71. 2013.
 48. You S, Zhou J, Chen S, Zhou P, Lv J, Han X, Sun Y. PTCH1, a receptor of Hedgehog signaling pathway, is correlated with metastatic potential of colorectal cancer. *Ups J Med Sci*; 115: 169-75. 2010.
 49. Okuno T, Kawai K, Hata K, Muro K, Emoto S, Kaneko M, Sasaki K, Nishikawa T, Tanaka T, Nozawa H. SN-38 Acts as a Radiosensitizer for Colorectal Cancer by Inhibiting the Radiation-induced Up-regulation of HIF-1 α . *Anticancer Res*; 38: 3323-31. 2018.
 50. Valenta T, Hausmann G, Basler K. The many faces and functions of β -catenin. *Embo j*; 31: 2714-36. 2012.

51. Iida Y, N HT, Kishikawa J, Kaneko K, Murono K, Kawai K, Ikeda T, Ishihara S, Yamaguchi H, Sunami E, Kitayama J, Yatomi Y, Watanabe T. Lysophosphatidylserine stimulates chemotactic migration of colorectal cancer cells through GPR34 and PI3K/Akt pathway. *Anticancer Res*; 34: 5465-72. 2014.
52. Keith B, Simon MC. Hypoxia-inducible factors, stem cells, and cancer. *Cell*; 129: 465-72. 2007.
53. Vadde R, Vemula S, Jinka R, Merchant N, Bramhachari PV, Nagaraju GP. Role of hypoxia-inducible factors (HIF) in the maintenance of stemness and malignancy of colorectal cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*; 113: 22-27. 2017.
54. Soeda A, Park M, Lee D, Mintz A, Androutsellis-Theotokis A, McKay RD, Engh J, Iwama T, Kunisada T, Kassam AB, Pollack IF, Park DM. Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene*; 28: 3949-59. 2009.
55. Santoyo-Ramos P, Likhatcheva M, García-Zepeda EA, Castañeda-Patlán MC, Robles-Flores M. Hypoxia-inducible factors modulate the stemness and malignancy of colon cancer cells by playing opposite roles in canonical Wnt signaling. *PLoS One*; 9: e112580. 2014.
56. Archbold HC, Yang YX, Chen L, Cadigan KM. How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Physiol (Oxf)*; 204: 74-109. 2012.
57. Ding Q, Miyazaki Y, Tsukasa K, Matsubara S, Yoshimitsu M, Takao S. CD133 facilitates epithelial-mesenchymal transition through interaction with the ERK pathway in pancreatic cancer metastasis. *Mol Cancer*; 13: 15. 2014.
58. Orsulic S, Huber O, Aberle H, Arnold S, Kemler R. E-cadherin binding prevents beta-catenin nuclear localization and beta-catenin/LEF-1-mediated transactivation. *J Cell Sci*; 112 (Pt 8): 1237-45. 1999.
59. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer Metastasis Rev*; 28: 151-66. 2009.
60. Bukholm IK, Nesland JM, Børresen-Dale AL. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [seecomments]. *J Pathol*; 190: 15-9. 2000.
61. Manzo G. Similarities Between Embryo Development and Cancer Process Suggest New Strategies for Research and Therapy of Tumors: A New Point of View. *Front Cell Dev Biol*; 7: 20. 2019.
62. Giancotti FG, Ruoslahti E. Integrin signaling. *Science*; 285: 1028-32. 1999.
63. Cooper J, Giancotti FG. Integrin Signaling in Cancer: Mechanotransduction,

- Stemness, Epithelial Plasticity, and Therapeutic Resistance. *Cancer Cell*; 35: 347-67. 2019.
64. Cheah M, Andrews MR. Integrin Activation: Implications for Axon Regeneration. *Cells*; 72018.
 65. Ata R, Antonescu CN. Integrins and Cell Metabolism: An Intimate Relationship Impacting Cancer. *Int J Mol Sci*; 182017.
 66. Lokmic Z, Musyoka J, Hewitson TD, Darby IA. Hypoxia and hypoxia signaling in tissue repair and fibrosis. *Int Rev Cell Mol Biol*; 296: 139-85. 2012.
 67. Koike T, Kimura N, Miyazaki K, Yabuta T, Kumamoto K, Takenoshita S, Chen J, Kobayashi M, Hosokawa M, Taniguchi A, Kojima T, Ishida N, Kawakita M, Yamamoto H, Takematsu H, Suzuki A, Kozutsumi Y, Kannagi R. Hypoxia induces adhesion molecules on cancer cells: A missing link between Warburg effect and induction of selectin-ligand carbohydrates. *Proc Natl Acad Sci U S A*; 101: 8132-7. 2004.
 68. Ju JA, Godet I, Ye IC, Byun J, Jayatilaka H, Lee SJ, Xiang L, Samanta D, Lee MH, Wu PH, Wirtz D, Semenza GL, Gilkes DM. Hypoxia Selectively Enhances Integrin $\alpha(5)\beta(1)$ Receptor Expression in Breast Cancer to Promote Metastasis. *Mol Cancer Res*; 15: 723-34. 2017.
 69. Ryu MH, Park HM, Chung J, Lee CH, Park HR. Hypoxia-inducible factor-1alpha mediates oral squamous cell carcinoma invasion via upregulation of alpha5 integrin and fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun*; 393: 11-5. 2010.
 70. Wu X, Cai J, Zuo Z, Li J. Collagen facilitates the colorectal cancer stemness and metastasis through an integrin/PI3K/AKT/Snail signaling pathway. *Biomed Pharmacother*; 114: 108708. 2019.
 71. Chen WC, Chang YS, Hsu HP, Yen MC, Huang HL, Cho CY, Wang CY, Weng TY, Lai PT, Chen CS, Lin YJ, Lai MD. Therapeutics targeting CD90-integrin-AMPK-CD133 signal axis in liver cancer. *Oncotarget*; 6: 42923-37. 2015.
 72. Lemoine L, Sugarbaker P, Van der Speeten K. Pathophysiology of colorectal peritoneal carcinomatosis: Role of the peritoneum. *World J Gastroenterol*; 22: 7692-707. 2016.
 73. de Cuba EM, Kwakman R, van Egmond M, Bosch LJ, Bonjer HJ, Meijer GA, te Velde EA. Understanding molecular mechanisms in peritoneal dissemination of colorectal cancer : future possibilities for personalised treatment by use of biomarkers. *Virchows Arch*; 461: 231-43. 2012.
 74. Pretzsch E, Bösch F, Neumann J, Ganschow P, Bazhin A, Guba M, Werner J, Angele M. Mechanisms of Metastasis in Colorectal Cancer and Metastatic

- Organotropism: Hematogenous versus Peritoneal Spread. *J Oncol*; 2019: 7407190. 2019.
75. Nakashio T, Narita T, Akiyama S, Kasai Y, Kondo K, Ito K, Takagi H, Kannagi R. Adhesion molecules and TGF-beta1 are involved in the peritoneal dissemination of NUGC-4 human gastric cancer cells. *Int J Cancer*; 70: 612-8. 1997.
 76. Strobel T, Cannistra SA. Beta1-integrins partly mediate binding of ovarian cancer cells to peritoneal mesothelium in vitro. *Gynecol Oncol*; 73: 362-7. 1999.
 77. Hosono J, Narita T, Kimura N, Sato M, Nakashio T, Kasai Y, Nonami T, Nakao A, Takagi H, Kannagi R. Involvement of adhesion molecules in metastasis of SW1990, human pancreatic cancer cells. *J Surg Oncol*; 67: 77-84. 1998.
 78. Oosterling SJ, van der Bij GJ, Bögels M, ten Raa S, Post JA, Meijer GA, Beelen RH, van Egmond M. Anti-beta1 integrin antibody reduces surgery-induced adhesion of colon carcinoma cells to traumatized peritoneal surfaces. *Ann Surg*; 247: 85-94. 2008.
 79. Nagata H, Ishihara S, Kishikawa J, Sonoda H, Murono K, Emoto S, Kaneko M, Sasaki K, Otani K, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Hata K, Kawai K, Nozawa H. CD133 expression predicts post-operative recurrence in patients with colon cancer with peritoneal metastasis. *Int J Oncol*; 52: 721-32. 2018.
 80. Hongo K, Kazama S, Sunami E, Tsuno NH, Takahashi K, Nagawa H, Kitayama J. Immunohistochemical detection of CD133 is associated with tumor regression grade after chemoradiotherapy in rectal cancer. *Med Oncol*; 29: 2849-57. 2012.
 81. Harada Y, Kazama S, Morikawa T, Murono K, Yasuda K, Otani K, Nishikawa T, Tanaka T, Kiyomatsu T, Kawai K, Hata K, Nozawa H, Yamaguchi H, Ishihara S, Watanabe T. Leucine-rich repeat-containing G protein-coupled receptor 5 and CD133 expression is associated with tumor progression and resistance to preoperative chemoradiotherapy in low rectal cancer. *Oncol Lett*; 14: 7791-98. 2017.
 82. Manfredi S, Lepage C, Hatem C, Coatmeur O, Faivre J, Bouvier AM. Epidemiology and management of liver metastases from colorectal cancer. *Ann Surg*; 244: 254-9. 2006.
 83. Engstrand J, Nilsson H, Strömberg C, Jonas E, Freedman J. Colorectal cancer liver metastases - a population-based study on incidence, management and survival. *BMC Cancer*; 18: 78. 2018.
 84. Ravn S, Heide-Jørgensen U, Christiansen CF, Verwaal VJ, Hagemann-Madsen RH, Iversen LH. Overall risk and risk factors for metachronous peritoneal metastasis after colorectal cancer surgery: a nationwide cohort study. *BJS Open*;

- 4: 284-92. 2020.
85. Zhang H, Yang N, Sun B, Jiang Y, Hou C, Ji C, Zhang Y, Liu Y, Zuo P. CD133 positive cells isolated from A549 cell line exhibited high liver metastatic potential. *Neoplasma*; 61: 153-60. 2014.
 86. Jing F, Kim HJ, Kim CH, Kim YJ, Lee JH, Kim HR. Colon cancer stem cell markers CD44 and CD133 in patients with colorectal cancer and synchronous hepatic metastases. *Int J Oncol*; 46: 1582-8. 2015.
 87. Huang X, Sheng Y, Guan M. Co-expression of stem cell genes CD133 and CD44 in colorectal cancers with early liver metastasis. *Surg Oncol*; 21: 103-7. 2012.
 88. Mitsui H, Shibata K, Suzuki S, Umezumi T, Mizuno M, Kajiyama H, Kikkawa F. Functional interaction between peritoneal mesothelial cells and stem cells of ovarian yolk sac tumor (SC-OYST) in peritoneal dissemination. *Gynecol Oncol*; 124: 303-10. 2012.
 89. Neumann J, Löhrs L, Albertsmeier M, Reu S, Guba M, Werner J, Kirchner T, Angele M. Cancer Stem Cell Markers Are Associated With Distant Hematogenous Liver Metastases But Not With Peritoneal Carcinomatosis in Colorectal Cancer. *Cancer Invest*; 33: 354-60. 2015.