

論文の内容の要旨

論文題目 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

氏名 岡田 真誠

【序文】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。癌細胞が転移能を獲得する契機の 1 つとして低酸素状態への暴露が挙げられ、癌細胞は低酸素環境から逃れるため細胞遊走能を獲得し血行性転移へとつながっていく。こ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。また、癌細胞が転移能を獲得する別の契機として上皮間葉転換 (epithelial-mesenchymal transition: EMT) の誘導が挙げられる。EMT は、上皮細胞が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生理学的現象であり、癌細胞の場合は EMT によって血行性転移などの遠隔転移が引き起こされることが知られている。しかし、低酸素環境が大腸癌細胞に EMT 変化をもたらす機序については不明な点も多い。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 は大腸癌をはじめとした様々な固形癌の幹細胞マーカーの 1 つと考えられているが、これまでの研究結果から 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と考えられている。したがって、第 1 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 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 2 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。

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

【背景と目的】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。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 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 EMT の誘導との関連性を明らかにすることを目的とした。

【実験方法】ヒト大腸癌細胞である LoVo 細胞を CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞とに分離する

方法として、磁気細胞分離法を用いた。正常酸素下および低酸素下での CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞の 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した。また、各細胞の EMT の誘導を示す 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。正常酸素下および低酸素下での CD133 (-) 細胞と CD133 (+) 細胞の細胞遊走能については、Boyden Chamber Assay を用いて評価した。

【結果】 磁気細胞分離法によって、LoVo 細胞は 94.1%の純度で CD133 (+) 細胞の分離が、86.3%の純度で CD133 (-) 細胞の分離が可能であった。CD133 (-) 細胞、CD133 (+) 細胞ともに低酸素下で 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。一方、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 β 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。 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。また、細胞遊走能については CD133 (-) 細胞は正常酸素下と低酸素下で有意差は認めなかったが、CD133 (+) 細胞では低酸素下において有意に遊走能が増加した。低酸素下で 24 時間培養すると CD133 (-) 細胞は正常酸素時の 82%に、CD133 (+) 細胞は正常酸素時の 42%にまで E-カドヘリン発現量は減少したが、再酸素化によって CD133 (+) 細胞は速やかに E-カドヘリンの発現量が回復し、最酸素化 24 時間後にはどちらも正常酸素時の発現量に回復した。

【考察】 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。一方、大腸癌細胞において CD133 (+) 細胞よりも CD133 (-) 細胞のほうが β 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。

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

【背景と目的】 第 1 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。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。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。そこで 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。

【方法】 大腸癌同時性肝転移症例、および大腸癌同時性腹膜播種症例の原発巣および転移巣の CD133 の発現率を、免疫染色を用いて評価した。肝転移症例については、東京大学医学部附属病院で根治切除を施行した 84 症例 (1998 年 1 月から 2010 年 12 月まで) を、腹膜播種症例については東京大学医学部附属病院で外科切除を施行した 58 症例 (1997 年 1 月から 2017 年 12 月まで) を対象とした。CD133 の発現率の算出は、CD133 が強く染色された部位を 10 視野選定し、計 1000 個の癌細胞について評価を行った。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 陽性大腸癌と定義し、患者の臨床病理学的因子との関連について解析を行った。

【結果】 CD133 陽性群は大腸癌肝転移群で 44 / 84 例 (52%)、大腸癌腹膜播種群で 33 / 58 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。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 ($p = 0.04$)。原発巣と転移巣それぞれの CD133 (+) 細胞率は、大腸癌肝転移群では原発巣で中央値 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 ($p = 0.42$)。

【考察】 本研究結果から、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。肝転移を形成した後に腫瘍の増大とともに CD133 (+) 細胞が CD133 (-) 細胞へと分化していることが考えられるため、転移直後の肝転移巣はさらに CD133 の発現率が高いと考えられた。

【総括】 本研究結果から、CD133 (+) 細胞は低酸素下において CD133 (-) 細胞よりも EMT 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。