

博士論文

論文題目 大腸癌肝転移症例におけるCD133発現の
免疫組織学的検討

氏 名 岸川 純子

目次

・ 要旨	2
・ 序文	3
・ 本文	14
1 実験方法	14
2 実験結果	19
3 考察	62
4 結論	73
5 謝辞	74
6 引用文献	75

要旨

CD133 は大腸癌幹細胞マーカーの一つであることが示唆されているが、大腸癌転移巣における CD133 発現の検討はこれまで十分になされていない。今回、大腸癌肝転移症例における CD133 発現について免疫組織学的に検討した。東京大学医学部附属病院で根治手術が施行された大腸癌同時性肝転移症例 88 例を対象として、原発巣および肝転移巣における CD133 発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子、生存率との相関を解析した。肝転移巣における CD133 陽性症例は、陰性症例と比較し有意に良好な 5 年無再発生存率および 5 年生存率を示した。特に肝転移巣における CD133 陽性症例は肝以外の臓器への転移再発が有意に少なく、これが良好な予後に寄与していることが示唆された。

序文

【大腸癌肝転移について】

大腸癌の罹患者数は増加傾向にあり、2013 年には世界でおよそ 77 万人が大腸癌が原因で死亡している¹。特に転移を伴う大腸癌の3年生存率は21.4%と低率である²。大腸癌のおおよそ19%に肝転移を伴い³、これに対する唯一の根治治療は外科的切除である。肝転移が根治切除不能であった症例の3年生存率は5%である一方で、根治切除が可能であった肝転移症例は63%と良好な生存率が得られている³。しかしながら現在、根治切除の可能な大腸癌肝転移症例の割合は、全体の23%に過ぎない⁴。こうしたなか、近年オキサリプラチン、CPT-11といった抗癌剤、さらにはベバシズマブ・セツキシマブ・パニツムマブといった分子標的薬などの新規薬剤を用いた化学療法の発達により、根治切除不能症例でも2年以上の生命予後が見込めるようになった^{5,6}。また肝転移巣の縮小により約40%の患者が手術可能となりうることも報告されており、今後大腸癌肝転移患者のさらなる予後の改善が期待される⁷。

また現在、根治切除可能な大腸癌肝転移症例に対して一律に術後補助化学療法が必要であ

るとする証拠は示されていないが、原発巣の深達度や肝転移径・転移個数などは術後再発のリスク因子であるとされており、これらハイリスク症例は術後補助化学療法の良い適応であることが示唆される⁸⁻¹⁰。こうした再発のハイリスク群を同定し、術後補助化学療法の適応とすることは、大腸癌肝転移症例の予後改善につながると期待される。

【癌幹細胞について】

腫瘍を構成する細胞はすべてが同一ではなく、一部の細胞が正常組織の幹細胞同様に自己複製能と多分化能の二つの特徴を有するという癌幹細胞仮説（図 1）は 1960 年代に初めて Bruce らによって提唱された¹¹。Bruce らは、マウスリンパ腫中の 1 - 4% の細胞のみが移植後に腫瘍を形成することを動物実験で示し、腫瘍組織が少数の癌幹細胞から形成されていることを示唆した。癌幹細胞は自己複製能によって抗癌剤・放射線治療をはじめとした治療に抵抗性を示すと考えられ、腫瘍内に癌幹細胞を高率に有する症例は治療に対するハイリスク群として扱う必要があることが推測される。そこで癌幹細胞を同定しその性質について検討を行うことが治療に寄与すると考えられてきた。1997 年に Bonnet により急性骨髄性白血病に

おける癌幹細胞が CD34+CD38-細胞として同定されて以来¹²、固形腫瘍でも癌幹細胞を同定する試みがなされてきた。この検討で癌幹細胞を特異的に分離するために用いられるのが、細胞表面マーカーを利用した方法である。癌幹細胞を同定するための数多くの癌幹細胞マーカーが、大腸癌¹³のほか、胃癌¹⁴、膠芽腫¹⁵、肝細胞癌¹⁶、肺癌¹⁷、膵癌¹⁸、前立腺癌^{19, 20}、乳癌などで報告されてきた (表 1)。

【CD133 について】

これらの癌腫の多くで幹細胞マーカーとして用いられている CD133 は 5 回膜貫通型タンパク質であり、もともとマウス胎児において神経系幹細胞で発現していることが示され、さらにマウス成体においては上皮細胞および尿細管細胞で発現することが示された²¹。1997 年に Yin らによりヒト造血幹細胞で発現していることが証明され²²、その後白血病²³、前立腺癌²⁴、肺癌²⁵、膵癌²⁶、膠芽腫²⁷ などにおいても発現していることが示され、CD133 発現細胞が多くの癌腫で癌幹細胞の性質を持っていることが示唆された。大腸癌においては、2007 年に O'Brien らと Ricci-Vitiani らによって報告された 2 本の論文において、CD133 が癌幹細胞

胞である可能性が大腸癌細胞を用いた実験で初めて示された。O'Brien らは磁気細胞分離装置を用いることによって大腸癌症例 17 例から CD133 陽性癌細胞を分離し、それらを NOD/SKID マウスの腎被膜下に移植するとすべてのマウスで腫瘍が形成されることを報告した（造腫瘍能の証明）²⁸。この腫瘍には CD133 陽性細胞と陰性細胞が含まれており、この部位からさらに CD133 陽性細胞を分離して移植を行うと、再び腫瘍が形成されることを示した（多分化能、自己複製能の証明）。また Ricci-Vitiani らも同様の動物実験のほか、CD133 陽性細胞が CD133 陰性細胞と比較して無血清培地において高い増殖能を示し、さらに CD133 陽性細胞は 1 年以上未分化状態を保ったまま増殖し続けるといった強い造腫瘍能を持つことを示した²⁹。この結果から CD133 が大腸癌における幹細胞マーカーである可能性が示唆された。また、同年には大腸癌検体からの分離細胞を用いた実験により CD44 および EpCam³⁰、2008 年には ALDH1³¹、2009 年には Lgr5³² などが同様に大腸癌幹細胞マーカーである可能性が示され、現在大腸癌の発育・進展におけるこれらのマーカーの機能について研究が進められている。

その一方で、CD133 が腫瘍形成や転移において担っている分子機序については、未だ明ら

かにされていない点が多い。これまでにマイクロアレイなどを用いた実験により、CD133 陽性大腸癌細胞で APC 遺伝子の発現抑制や Wnt3A 遺伝子の発現増加がみられること³³、CD133 陽性膀胱癌細胞で上皮間葉転換に関係する N-cadherin や Slug といった遺伝子の発現が増加していることが報告されている³⁴。また、神経芽腫では CD133 が Akt および p38MAPK 経路を介して分化の抑制や細胞増殖にはたらくこと³⁵、大腸癌では Ras-Raf 経路が活性化している癌細胞で CD133 が高発現であることや、PI3K/Akt 経路を阻害することにより CD133 の発現が低下することも報告されているが^{32, 36}、CD133 からこれらの経路に至る分子機序や、CD133 に直接結合するリガンドは未だ不明であり、今後更なる細胞生物学的検討が必要である。

また大腸癌検体における CD133 発現についても免疫組織学的に検討が行われてきた。これまでに報告された、大腸癌における CD133 発現と予後との相関に関する論文の一覧を表 2 に示す³⁷⁻⁵⁴。これらの報告を用いて検討された 2 つのメタアナリシスでは、大腸癌原発巣における CD133 の発現が全生存率の低下と相関することが示された^{55, 56}。これは CD133 が大腸癌幹細胞マーカーであり、CD133 陽性細胞は癌細胞で治療抵抗性を示すという推論に合致する結果である。その一方、転移巣における CD133 発現についてはこれまで報告がなかった

ものの、2014 年にはじめて肝転移巣における CD133 発現についての論文が報告された⁵³。

この報告では103例の同時性および異時性の大腸癌肝転移巣においてCD133発現が陽性である症例が有意に予後良好であり、これまでの大腸癌原発巣についての論文とは異なる結果であった。さらにこの報告では、CD133 陰性細胞では有意に細胞増殖能を示す MIB-1 の発現が高く、かつ接着因子である E-カドヘリンの発現が低かったことが示された。ここから CD133 陰性細胞が CD133 陽性細胞と比較してより高い細胞増殖能を持つ可能性や、上皮-間葉転換 (epithelial - mesenchymal transition; EMT) を介したより高い転移能を持つ可能性が示唆されている。しかし、すでにこれまで多くの論文で CD133 陽性癌細胞が CD133 陰性細胞と比較して高い増殖能を持つことが示されており、膀胱癌を始めとした他の癌腫では CD133 発現とフィブロネクチンや N-カドヘリンといった EMT マーカーの発現が相関することも示されている⁵⁷。このように現時点での大腸癌肝転移における CD133 発現についての報告は、これまでの大腸癌原発巣についての知見と相反する点が多く、肝転移に関して更なる検討が必要であることを示唆している。

【本研究に至った経緯】

大腸癌症例が増加傾向にある現在、特に予後が不良なStageIV大腸癌の治療をについて検討することが重要である。過去のコホート研究ではStageIV大腸癌は根治切除が可能であれば比較的良好的な予後が得られることが示されているが、根治切除後StageIV症例に対する補助化学療法の有効性は示されていない。しかし、StageIII大腸癌では術後補助化学療法の有効性が示されていることから、StageIV症例でもハイリスク症例については術後補助化学療法が有効である可能性がある。今回ハイリスク症例を考えるに当たり、細胞生物学的に大腸癌の幹細胞マーカーである可能性が示唆されてきたCD133に注目した。原発巣におけるCD133陽性症例は予後不良であることが示されているが、2014年には肝転移巣におけるCD133陽性症例で予後良好であるとの報告がなされ、さらなる検討が必要と考えられた。そこで本研究では、東京大学医学部附属病院で根治手術が施行された大腸癌同時性肝転移症例を対象とし、切除検体を用いて免疫組織学的に原発巣・肝転移巣双方におけるCD133発現について検討を行うことにより、(1) 肝転移巣におけるCD133発現頻度、(2) CD133発現と臨床病理学的因子および予後との相関について、そして(3) CD133の発現は予後マーカーとしての可能性を持つかどうか

うかについて明らかにすることを目的とした。

表 1 これまでに報告されている固形癌幹細胞マーカー

著者	報告年	癌腫	主な腫瘍マーカー
Tabatabai	2011	glioblastoma	CD133, $\alpha 6$ -integrin, ALDH1
Xu	2012	gastric cancer	CD44, CD24, CD54, EpCAM, CD90, ALDH1, CD71
Ji	2012	hepatocellular carcinoma	CD13, CD24, CD44, CD90, CD133, EpCAM, OV6
Alamgeer	2013	lung cancer	CD133, CD44, ALDH1
Abel	2013	pancreatic cancer	CD133, CXCR4, c-Met, CD44, CD24, ALDH1
Sharpe	2013	prostate cancer	CD44, $\alpha 2 \beta 1$ -integrin, CD133, ALDH1, c-kit, nestin
Gangopadhyay	2013	breast cancer	CD44, CD24, CD47, CD133, ALDH1
Fanali	2014	colorectal cancer	CD133, CD44, CD24, CD29, EpCAM, Lgr5, CD166

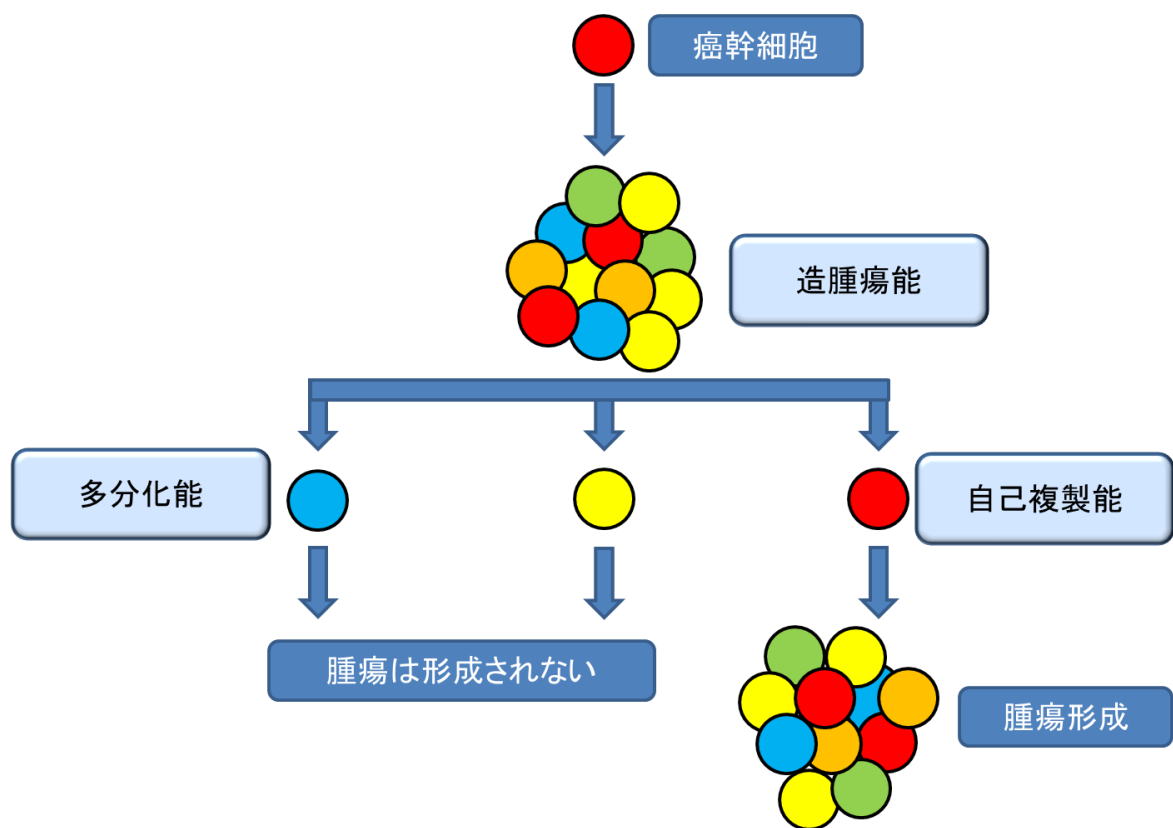


図 1 癌幹細胞説

癌幹細胞は造腫瘍能・多分化能・自己複製能を持ち合わせている。癌幹細胞（赤丸で表示）は細胞分裂を繰り返して腫瘍を形成するが（造腫瘍能）、同時に様々な性質の細胞へと分化を行っており、腫瘍は不均一な細胞集団として形成されている（多分化能）。この中には元の細胞と同様の性質を持つ癌幹細胞も含まれており、この細胞からさらに腫瘍を形成することが可能である（自己複製能）。分化した異なる性質の細胞からは腫瘍は形成されない。

表2 大腸癌手術検体における CD133 発現についてのこれまでの検討

著者	報告年	対象	症例数	カットオフ値	CD133発現例の予後
Kojima†*	2008	Stage I -IV	189	10%	OS不良
Horst†*	2008	T2-3N0M0	77	50%	OS不良
Wang†*	2009	直腸癌Stage 0-IV	73	10%	OS不良
Li†*	2009	Stage III B	104	5%	OS不良
Lugli†	2010	Stage I -IV	1420	5%	OS有意差なし
Ong†	2010	Stage I -IV	501	5%	OS不良
Choi†*	2010	Stage 0-IV	523	-	OS有意差なし
Takahashi†*	2010	Stage I -IV	151	50%	OS不良
Xi†*	2011	Stage I -IV	201	score5	OS・DFS不良
Garcia*	2011	直腸癌Stage 0-III	88	10%	OS有意差なし
Nagata*	2011	Stage I -III	58	50%	OS有意差なし
Zhang†*	2012	Stage II -III	125	grade4	OS不良
Coco†*	2012	Stage I -IV	137	5%	OS・DFS不良
Hongo*	2012	直腸癌Stage I-IV	78	5%	OS有意差なし
Ying	2013	Stage II	176	horst	OS・DFS不良
Zhou	2014	Stage I -IV	60	20%	OS有意差なし
Yamamoto	2014	同時性・異時性肝転移	103	10%	OS良好
Oliver	2014	Stage I -IV	123	50%	DFS不良

OS: Overall Survival, DFS: Disease Free Survival
†: Wangらによるメタアナリシスに用いられた論文²⁷
*: Chenらによるメタアナリシスに用いられた論文²⁸

大腸癌肝転移症例における CD133 発現の 免疫組織学的検討

1. 実験方法

1.1 症例と手術検体

1998 年 1 月より 2008 年 12 月までに東京大学医学部附属病院で根治手術が施行された大腸癌同時性肝転移症例 88 例を検討対象とした。また、以前当科で本郷らが報告した論文で用いた、1991 年 1 月より 1995 年 10 月までに根治手術を施行され、かつ術前化学放射線療法が施行されなかった大腸癌症例のうち⁵⁰、遠隔転移を伴わない 224 症例を今回の対照群として用いた。また内視鏡的に切除された大腸ポリープ 114 症例も対照群として用いた。大腸癌根治切除後のフォローアップでは 1 年ごとの全大腸内視鏡、6 か月ごとの computed tomography (CT) および 3 か月ごとの腫瘍マーカー測定が施行され、観察期間中央値は 52.5 か月であった。臨床病理学的因子については国際対がん連合 (UICC) による TNM 悪性腫

瘍の分類第7版およびWHO病理分類に基づき解析を行った。患者の病理検体の研究への使用については、初診時・あるいは手術前に本人に対して書面で同意を得ており、研究プロトコルは東京大学大学院医学系研究科倫理委員会で承認されている（審査番号 10056、2013年3月8日承認）、

1.2 免疫染色

大腸癌の原発巣については最深部の1切片を用いてCD133発現を免疫組織学的に評価した。肝転移についても88例全例のすべての同時性肝転移巣についてCD133発現の評価を行ったが、肝転移の診断においては原則として各転移巣につき各1切片のみが作成されており、これを用いて染色を行った。88例のうち肝再発を来して2回目の肝切除が施行された27例については、2回目の入手可能な全肝切除検体におけるCD133発現についても検討を追加した。また大腸ポリープについては、各病変から中央部の1切片を染色に用いた。

免疫染色は以下の方法で行った。ホルマリン固定後にパラフィン包埋された検体から4 μ m厚の切片を作成した。まずキシレン・エタノールで脱パラフィンを行った後にPBSで洗浄し

たプレパラートをクエン酸バッファに浸漬し、120 度のオートクレーブで 5 分間処理すること
とで抗原賦活化を行った。その後内因性ペルオキシダーゼを 0.3%過酸化水素を加えたメタノ
ールで常温で 15 分処理することにより不活化した。室温まで戻して PBS で 3 回洗浄を行っ
た後、5%BSA 溶液で室温で 30 分間処理を行い、非特異的タンパク質のブロッキングを行っ
た。抗 CD133 抗体 (AC133; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) を 1:100 に希釈してスライド
グラスに滴下し一晩反応させた。PBS で 3 回洗浄後、2 次抗体は Dako envision kit (Dako,
Carpinteria, CA, USA) を製品プロトコル通りに用いた。続いて 2% 3,3'-diaminobenzidine
tetrahydrochloride と、0.3% 過酸化水素を加えた 50 mM tris-buffer (pH 7.6) を順に用いて発色
を行った。PBS で洗浄後、Meyer's hematoxylin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) を用
いて対比染色を行った。Positive control としては腎検体における尿細管を用い、Negative control
としては抗 CD133 抗体を PBS に置き換えて染色を行った。

1.3 CD133 免疫染色の評価

CD133 の発現の評価には当科の本郷らによる以前の報告と同様に以下の前田法を用いて

検討した^{50,58}。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が強く染まった部位を10視野選定した。次に400倍で各視野を観察し、細胞100個ずつ、計1000個の細胞について評価を行った。カットオフ値については、Cocoらが正常大腸組織におけるCD133陽性細胞は腺管にわずかに散在する程度であった一方で、癌組織におけるCD133陽性細胞は中央値にして5%の割合で認められたために5%をカットオフ値として用いたことから⁴⁹、本研究においても5%以上を過剰発現とみなした。複数の肝転移を持つ症例については、少なくとも1つ以上の肝転移巣が陽性であれば肝転移におけるCD133陽性症例とした。この評価は2人の医師(J.K.およびS.K.)が臨床病理学的所見が不明な状態で行い、2人の病理医(T.U.およびH.A.)による評価との乖離を κ 値を用いて評価した⁵⁹。判定が異なる検体については見直しを行ったうえで病理医の診断を採用したが、さらに判定が異なった症例については直接の話し合いにより意見を一致させた。

1.4 統計的解析

CD133の発現と臨床病理学的因子の相関の解析には、カイ2乗検定、フィッシャーの正確

確率検定、Student の t 検定を使用した。全生存率、無再発生存率の評価には Kaplan-Meier 法 (Log-rank test) あるいはボンフェローニの方法を用いた。各生存率に関わる因子についての多変量解析にはCox の比例ハザードモデルを用いた。以上の解析はJMP Pro 10 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) を用いて行い、P 値が 0.05 未満となった場合を有意とした。

2. 実験結果

2.1 大腸癌肝転移症例、転移を伴わない大腸癌症例、および大腸ポリープ症例の背景因子

大腸癌肝転移症例 88 例の臨床病理学的因子を表 3 に示す。大腸癌肝転移症例の観察期間中央値は 52.5 か月であった。40 例 (45.5%) が術後補助化学療法を施行されており、このうち 7 例 (8.0%) が FOLFOX、25 例 (28.4%) は 5-フルオロウラシルを用いたレジメン (5FULV 点滴静注 9 例、5FU 肝動注 1 例、UFTLV 内服 15 例) 、8 例 (9.1%) がその他の経口抗癌剤を用いたレジメン (ドキシフルリジン 5 例、テガフル・ギメラシル・オテラシルカリウム配合剤 2 例、カペシタビン 1 例) であった。

また、対照群として他臓器転移を伴わない大腸癌症例 224 例の背景因子を表 4 に示した。224 例中、Stage I が 43 例 (19.2%) 、Stage II が 94 例 (42.0%) 、Stage III が 87 例 (38.8%) であった。

もう一つの対照群として、大腸ポリープ症例 114 例の背景因子を表 5 に示した。組織型が癌であったものが 21 例 (18.4%) 含まれ、残りのうち adenoma が 87 例 (76.3%) 、hyperplastic

polyp が 6 例 (5.3%) であった。

表3 大腸癌肝転移症例の背景因子

		症例数	
		n	%
性別			
	男性	52	59.1
	女性	36	40.9
年齢(歳)		59.4 ± 10.6 †	
深達度			
	T2/3	55	62.5
	T4	33	37.5
所属リンパ節転移			
	なし	27	30.7
	あり	61	69.3
組織型			
	高分化腺癌	40	45.5
	中分化腺癌	43	48.9
	低分化腺癌	3	3.4
	粘液癌	2	2.3
リンパ管侵襲			
	なし	53	60.2
	あり	35	39.8
静脈侵襲			
	なし	12	13.6
	あり	76	86.4
肝外遠隔転移			
	なし	77	87.5
	あり	11	12.5
肝転移数		3 (1-30) *	
肝転移最大径 (mm)		39.5 ± 33.4 †	
術後補助化学療法			
	なし	48	54.5
	あり	40	45.5

† 平均±標準偏差で表示, * 中央値(最少値-最大値)で表示。

表4 転移を伴わない大腸癌症例の背景因子

		症例数	
		n	%
性別			
	男性	139	62.1
	女性	85	37.9
年齢（歳）		63.4 ± 10.8 †	
Stage			
	I	43	19.2
	II	94	42.0
	III	87	38.8
組織型			
	高分化腺癌	172	76.8
	中分化腺癌	44	19.6
	低分化腺癌	5	2.2
	粘液癌	3	1.3
リンパ管侵襲			
	なし	171	76.3
	あり	53	23.7
静脈侵襲			
	なし	89	39.7
	あり	135	60.3

† 平均±標準偏差で表示, * 中央値（最少値-最大値）で表示。

表5 大腸ポリープ 114 例の背景因子

		症例数	
		n	%
性別			
	男性	97	85.1
	女性	17	14.9
年齢（歳）		58.1 ± 7.8 †	
ポリープ長径			
	10mm未満	64	56.1
	10mm以上	50	43.9
組織型			
	過形成性	6	5.3
	腺腫	87	76.3
	軽度異型	13	11.4
	中等度異型	70	61.4
	高度異型	4	3.5
	癌	21	18.4

† 平均±標準偏差で表示。

2.2 大腸癌における CD133 発現率

2.2.1 大腸癌肝転移における CD133 発現率

免疫染色の結果、CD133 発現は我々と同じ抗体を用いたこれまでの報告と同様に、癌組織の腺管内腔表面に認められ (図 2)、正常組織には発現を認めなかった。大腸癌肝転移 88 症例中、原発巣における CD133 発現陽性症例 (pCD133+) は 44 例 (50.0%)、陰性症例 (pCD133-) は 44 例 (50.0%) であった。また肝転移巣における CD133 発現陽性症例 (mCD133+) は 50 例 (56.8%)、陰性症例 (mCD133-) は 38 例 (43.2%) であった。この mCD133+ 症例 50 例中、すべての肝転移において CD133 陽性であった症例 (mCD133+all) は 39 例、複数の肝転移巣のうちの一部のみが CD133 陽性であった症例 (mCD133+partial) は 11 例であった。その内訳は、肝転移巣のうち 1 つのみで CD133 陽性であったものが 7 例、2 つで陽性であったものが 2 例、4 つまたは 5 つで陽性であったものが各 1 例であった (図 3)。すべての同時性肝転移を合計すると、268 個の肝転移中、113 個 (42.2%) が CD133 陽性であった。医師間の評価の乖離を示す κ 値は 0.76 であり、良好な一致率が得られた。

原発巣における CD133 発現と、肝転移巣における CD133 発現の関係を表 6 に示した。

pCD133+症例 44 例中、mCD133+が 42 例 (95.5%) を占めた。また、pCD133-症例 44 例中、mCD133+症例は 8 例 (13.6%) にとどまり、原発巣における CD133 発現と、肝転移巣における CD133 発現との間には相関が認められた ($p<0.001$)。

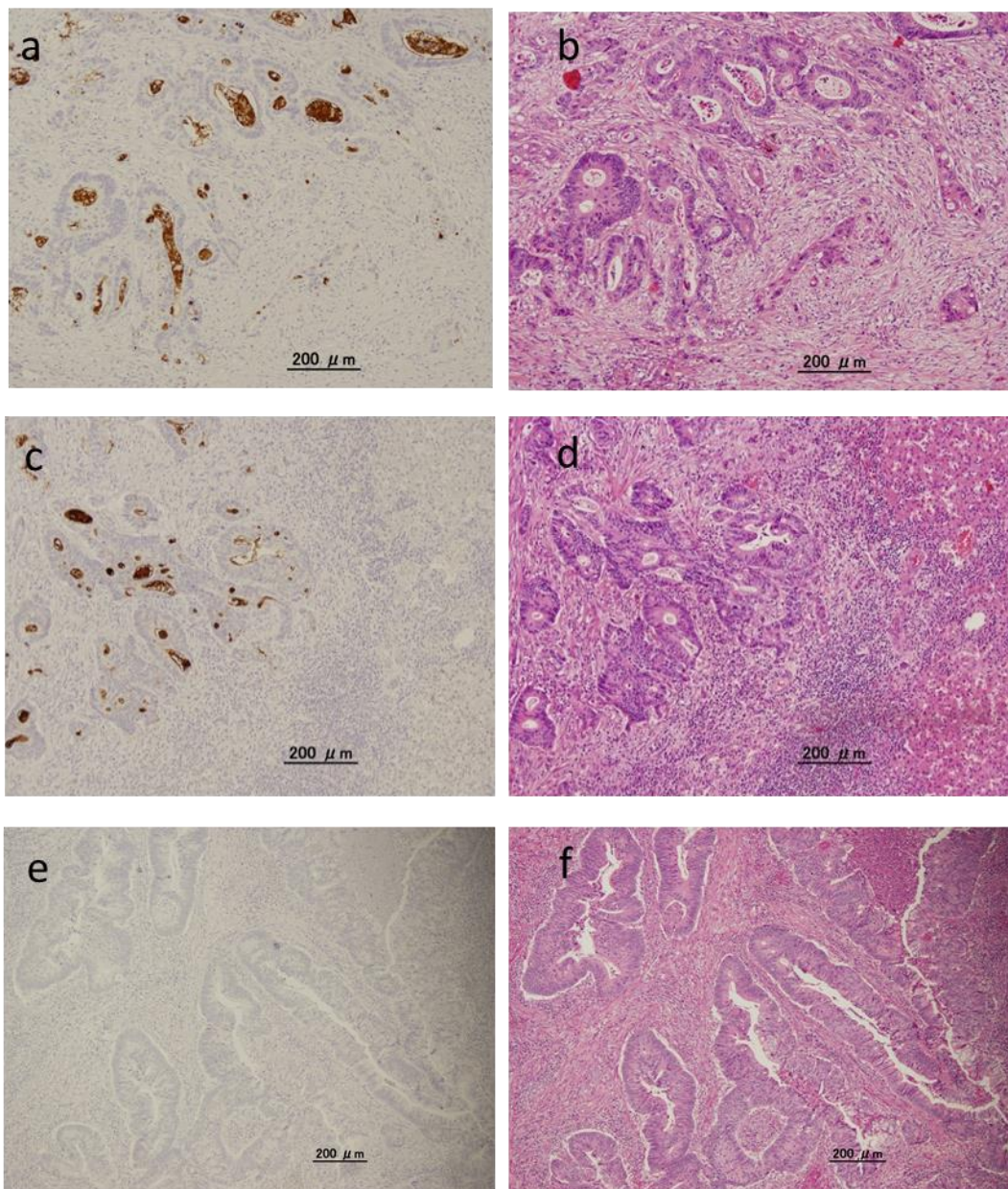


図2 大腸癌原発巣・肝転移巣染色像

大腸癌 CD133 染色の陽性像を示す (いずれも 100 倍)。原発巣の CD133 染色 (図 2a)、H.E.染色 (図 2b)、および肝転移巣の CD133 染色 (図 2c)、H.E.染色 (図 2d)。図 2e・f は CD133 陰性例の CD133 染色および H.E.染色。

症例	各肝転移巣のCD133発現状況
1	●○○○○○○○
2	●○○○○○
3	●○○○
4	●○○○
5	●○○
6	●○
7	●○
8	●●○○○○○
9	●●○
10	●●●●○
11	●●●●●○

○ および ● ひとつで1個の肝転移巣を示す;
○: mCD133-, ●: mCD133+

図3 mCD133-partial 群の各症例における CD133 発現の詳細

複数の肝転移のうち一部のみが陰性であった 11 例 (mCD133+partial) において、肝転移巣のうち 1 つのみで CD133 陽性であったものが 7 例、2 つで陽性であったものが 2 例、4 つまたは 5 つで陽性であったものが各 1 例であった。

表 6 大腸癌原発巣・肝転移巣における CD133 陽性率

	pCD133+	pCD133-
	(n=44)	(n=44)
mCD133+ (n=50)	42 (95.5%)	8 (18.1%)
mCD133- (n=38)	2 (4.5%)	36 (81.9%)
pCD133+: 原発巣におけるCD133陽性, pCD133-: 原発巣におけるCD133陰性		
mCD133+: 肝転移巣におけるCD133陽性, mCD133-: 肝転移巣におけるCD133陰性		

2.2.2 他臓器転移を伴わない大腸癌における CD133 発現

進行度に伴う CD133 発現率を検討するため、対照群として他臓器転移を伴わない大腸癌切除検体を用いて同様の免疫染色を行った。ここでも CD133 発現は癌部のみに認められ、正常組織には認めなかった。このうち各 Stage における CD133 陽性症例は、Stage I で 19 例 (44.2%)、Stage II で 38 例 (40.4%)、Stage III で 36 例 (41.4%) であった。Stage IV を加えて比較すると、各 Stage 間で有意差を認めなかった ($p=0.57$ 、表 7)。

表 7 大腸癌 Stage 別 CD133 発現率の比較

		CD133+		P value
		n	%	
計		137		
Stage	I	19	44.2	0.573
	II	38	40.4	
	III	36	41.4	
	IV	44	50.0	

2.3 大腸癌における CD133 発現と臨床病理学的因子の相関

2.3.1 大腸癌肝転移における CD133 発現と臨床病理学的因子の相関

大腸癌原発巣・肝転移巣における CD133 発現と、臨床病理学的因子の相関関係について検討した。原発巣 (表 8) ・肝転移巣 (表 9) いずれにおける CD133 発現も、各臨床病理学的因子との相関は認めなかった。

表 8 大腸癌原発巣における CD133 発現と臨床病理学的因子の相関

		pCD133+		pCD133-		P value
		n	%	n	%	
計		44		44		
性別	男性	24	54.5	28	63.6	0.516
	女性	20	45.5	16	36.4	
年齢 (歳)		60.5 ± 9.5 †		58.4 ± 11.6 †		0.368
原発巣部位	結腸	17	38.6	19	43.2	0.829
	直腸	27	61.4	25	56.8	
	右側	8	18.2	6	13.6	0.559
	左側	36	81.8	38	86.4	
深達度	T2/3	27	61.4	28	63.6	1.000
	T4	17	38.6	16	36.4	
所属リンパ節転移	なし	15	34.1	12	27.3	0.644
	あり	29	65.9	32	72.7	
組織型	高分化型腺癌	21	47.7	19	43.2	0.415
	中分化型腺癌	22	50.0	21	47.7	
	低分化型腺癌	0	0.0	3	6.8	
	粘液癌	1	2.3	1	2.3	
リンパ管侵襲	なし	28	63.6	25	56.8	0.663
	あり	16	36.4	19	43.2	
静脈侵襲	なし	5	11.4	7	15.9	0.757
	あり	39	88.6	37	84.1	
肝外遠隔転移	なし	40	90.9	37	84.1	0.521
	あり	4	9.1	7	15.9	
肝転移数		3 (1-16) *		2 (1-30) *		0.443
肝転移最大径 (mm)		34.6 ± 23.1 †		44.9 ± 40.7 †		0.314
術後補助化学療法	なし	21	47.7	27	61.4	0.284
	あり	23	52.3	17	38.6	

† 平均 ± 標準偏差で表示, * 中央値 (最少値-最大値) で表示。

表9 大腸癌肝転移巣におけるCD133発現と臨床病理学的因子の相関

		mCD133+		mCD133-		P value
		n	%	n	%	
計		50		38		
性別	男性	26	52.0	26	68.4	0.188
	女性	23	46.0	12	31.6	
年齢(歳)		59.5 ± 9.8 †		59.3 ± 11.6 †		0.939
原発巣部位	結腸	22	44.0	14	36.8	0.520
	直腸	28	56.0	24	63.2	
深達度	T2/3	31	62.0	24	63.2	1.000
	T4	19	38.0	14	36.8	
所属リンパ節転移	なし	17	34.0	10	26.3	0.491
	あり	33	66.0	28	73.7	
組織型	高分化型腺癌	23	46.0	17	44.7	0.868
	中分化型腺癌	25	50.0	18	47.4	
	低分化型腺癌	1	2.0	2	5.3	
	粘液癌	1	2.0	1	2.6	
リンパ管侵襲	なし	29	58.0	24	63.2	0.665
	あり	21	42.0	14	36.8	
静脈侵襲	なし	8	16.0	4	10.5	0.542
	あり	42	84.0	34	89.5	
肝外遠隔転移	なし	45	90.0	32	84.2	0.520
	あり	5	10.0	6	15.8	
肝転移数		3 (1-16) *		2 (1-30) *		0.767
肝転移最大径 (mm)		35.3 ± 23.4 †		41.4 ± 40.7 †		0.268
術後補助化学療法	なし	27	54.0	21	55.3	1.000
	あり	23	46.0	17	44.7	

† 平均±標準偏差で表示, * 中央値(最少数-最大値)で表示。

2.3.2 他臓器転移を伴わない大腸癌における CD133 発現と臨床病理学的因子の相関

対照群である他臓器転移を伴わない大腸癌症例における CD133 発現と臨床病理学的因子

の相関を表 10 に示す。CD133 発現は静脈侵襲と有意な相関を認めた ($p=0.037$)。

表 10 他臓器転移を伴わない大腸癌における CD133 陽性例と陰性例の臨床病理因子の比較

		CD133+		CD133-		P value
		n	%	n	%	
計		93		131		
性別	男性	60	64.5	79	60.3	0.577
	女性	33	35.5	52	39.7	
年齢 (歳)		64.6 ± 9.5 †		62.6 ± 11.0 †		0.202
Stage	I	19	20.4	24	18.3	0.921
	II	38	40.9	56	42.7	
	III	36	38.7	51	38.9	
組織型	高分化腺癌	76	89.4	95	72.5	0.294
	中分化腺癌	16	18.8	29	22.1	
	低分化腺癌	0	0.0	3	2.3	
	粘液癌	1	1.2	4	3.1	
リンパ管侵襲	なし	70	75.3	101	77.1	0.873
	あり	23	24.7	30	22.9	
静脈侵襲	なし	29	31.2	60	45.8	0.037
	あり	64	68.8	71	54.2	

† 平均 ± 標準偏差で表示。

2.3.3 大腸ポリープにおける CD133 発現と臨床病理学的因子の相関

これまで CD133 が癌部のみに認められ、正常組織には認められないことを考慮し、大腸ポリープ 114 症例について同様に CD133 の発現を検討した。大腸ポリープにおける CD133 発現と臨床病理学的因子との相関を表 11 に示す。Carcinoma 21 例 (M 癌 19 例、SM 癌 2 例) 中、7 例 (33.3%) で CD133 陽性であった。また、adenoma 87 例中 7 例 (8.0%) で CD133 陽性であった。異型度別に検討すると、高異型腺腫では 4 例中 1 例 (25.0%)、中等度異型腺腫では 60 例中 6 例 (10.0%)、低異型腺腫では CD133 発現は認めなかった。また hyperplastic polyp 6 例においても CD133 発現は認めず、CD133 発現率は異型度の高いポリープで有意に高かった ($p=0.01$)。また、ポリープ径が 10mm 以上の症例で有意に CD133 陽性率が高かった ($p=0.03$)。

表 11 大腸ポリープにおける CD133 陽性例と陰性例の臨床病理因子の比較

		CD133+		CD133-		P value
		n	%	n	%	
計		14		100		
性別	男性	13	85.2	84	84.0	0.690
	女性	1	85	16	16.0	
年齢(歳)		60.7 ± 7.4 †		57.6 ± 7.8 †		0.950
ポリープ長径	10mm未満	4	28.6	60	60.0	0.030
	10mm以上	10	71.4	40	40.0	
組織型	過形成性	0	0.0	6	6.0	0.010
	腺腫	7	50.0	80	80.0	
	軽度異型	0	0.0	13	13.0	
	中等度異型	6	42.9	54	54.0	
	高度異型	1	7.1	3	3.0	
	癌	7	50.0	14	14.0	
	M癌	7	50.0	12	12.0	
	SM癌	0	0.0	2	2.0	

† 平均±標準偏差で表示。

2.4 大腸癌における CD133 発現と生存率の相関

2.4.1 大腸癌肝転移における CD133 発現と生存率の相関

CD133 発現と予後との相関を調べるために、原発巣・肝転移巣における CD133 発現別の無再発生存率・全生存率について検討した (図 4)。

まず原発巣における CD133 発現と生存率の相関について検討した。pCD133+症例・pCD133-症例の 5 年無再発生存率はそれぞれ 20.5%、16.5% ($p=0.27$ 、図 4a)、全生存率はそれぞれ 60.6%、43.0% ($p=0.098$ 、図 4b) であり、CD133 発現による有意差を認めなかった。

続いて肝転移巣において同様の検討を行った。mCD133+症例・mCD133-症例の 5 年無再発生存率はそれぞれ 24.0%、11.0% ($p=0.043$ 、図 4c)、全生存率はそれぞれ 63.0%、37.1% ($p=0.014$ 、図 4d) であり、無再発生存率・全生存率とも mCD133 陽性症例で有意に良好であった。

ここで、mCD133+群をさらに mCD133+all および mCD133+partial に群わけして解析した。無再発生存率については、mCD133+all は mCD133- より有意に良好な生存率を示したが ($p=0.022$)、mCD133+partial とは有意差を認めなかった (図 5a)。全生存率については、

mCD133+all は mCD133-、mCD133+partial の双方より有意に良好な生存率を示した ($p=0.022$, 0.002 ; 図 5b)。

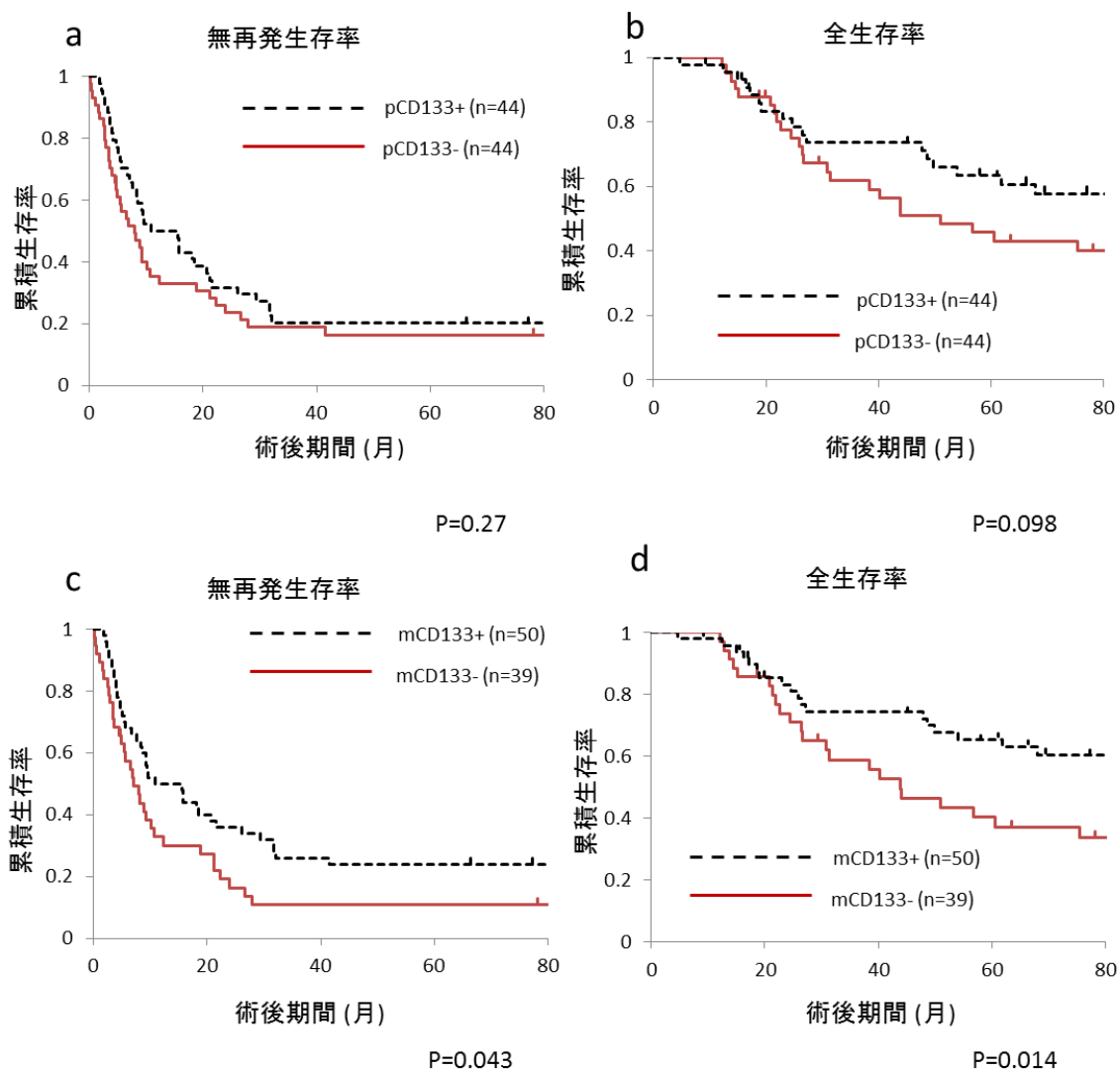


図4 大腸癌原発巣・肝転移巣におけるCD133発現と生存率

a・b) 大腸癌原発巣におけるCD133発現陽性症例 (pCD133+)・陰性症例 (pCD133-) の無再発生存率と全生存率。CD133発現による有意な差は認めなかった。c・d) 大腸癌肝転移巣におけるCD133発現陽性症例 (mCD133+)・陰性症例 (mCD133-) の無再発生存率と全生存率。いずれもCD133発現陽性症例で有意に予後良好であった ($p=0.043$, $p=0.014$)

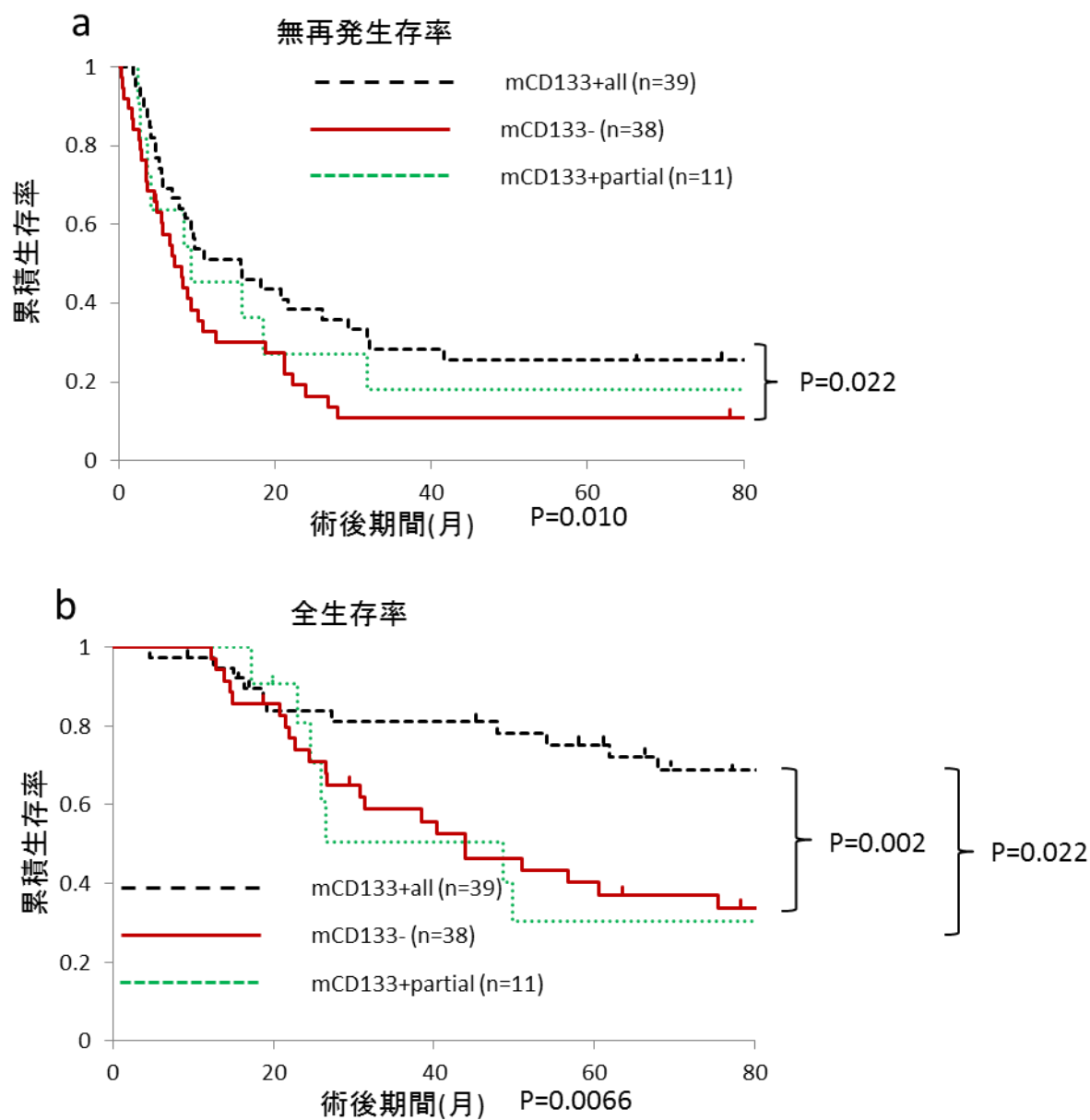


図5 大腸癌原発巣・肝転移巣における CD133 発現と生存率

a) 無再発生存率については、mCD133+は mCD133-と比較して有意に良好であったが (p=0.022) 、mCD133+partial とは有意差を認めなかった。b) 全生存率については、mCD133+は mCD133-、mCD133+partial の双方より有意に予後良好であった (p=0.002, p=0.022) 。

2.4.2 転移を伴わない大腸癌における CD133 発現と生存率の相関

一方で、対照群である転移を伴わない大腸癌症例についても同様の検討を行い、CD133+ 症例・CD133-症例の 5 年無再発生存率はそれぞれ 86.6%、88.4% ($p=0.79$ 、図 6a)、全生存率はそれぞれ 93.2%、91.7% ($p=0.68$ 、図 6b) であり、無再発生存率・全生存率とも CD133 発現による有意差を認めなかった。

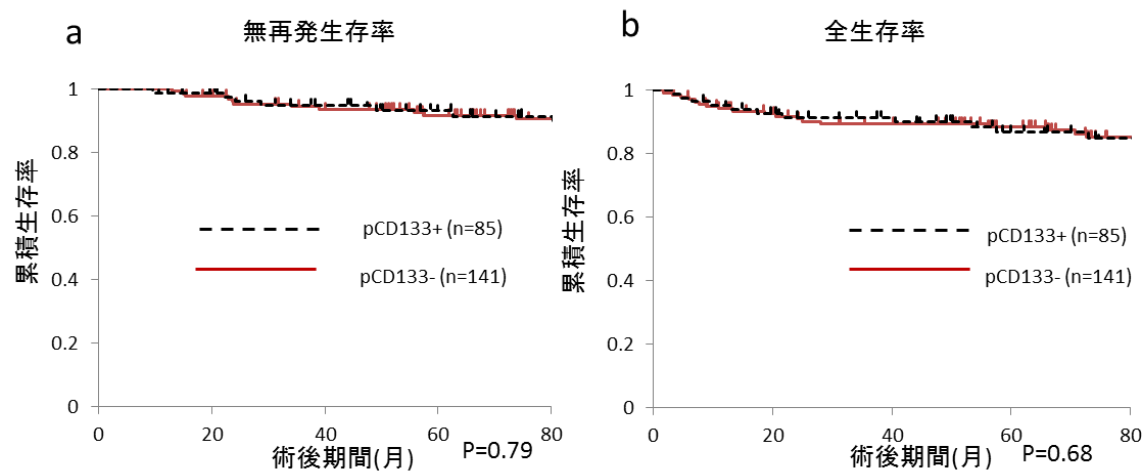


図6 Stage I -III大腸癌における CD133 発現と生存率

a・b) Stage I -III大腸癌における CD133 発現陽性症例 (CD133+) ・陰性症例 (CD133-) の無再発生存率と全生存率。CD133 発現による有意な差は認めなかった ($p=0.79$, $p=0.68$)。

2.4.3 原発巣と肝転移巣における CD133 発現状況の異なる症例についての検討

前項で pCD133 発現と予後の相関が認められず、mCD133 発現と予後には相関が認められたことから、原発巣と肝転移巣で CD133 発現状況が異なった症例について検討を行った。表 12 に各症例の臨床病理学的因子および転帰を示した。pCD133+/mCD133-であったのは 2 例のみであり、ともに早期に肝再発を認めたものの再肝切除により長期生存が得られた。一方 pCD133-/mCD133+であった 8 例では、5 例 (62.5%) に再発を認めたが 7 例 (87.5%) で長期生存が得られた (表 12)。ここで pCD133・mCD133 の発現状況により 4 群に分類して各群の生存率について検討を行うと、pCD133-/mCD133-群は他のいずれの群よりも有意に予後不良であったが、他の各群間では有意差を認めなかった ($p<0.001$ 、図 7)。

表 12 原発巣と肝転移巣における CD133 発現状況が異なる症例のまとめ

原発巣におけるCD133陽性／肝転移巣におけるCD133陰性症例								
症例	年齢	性別	原発巣部位	組織型	予後	OS (月)	再発	DFS (月)
1	56	女性	S	well	生存	152	無	152
2	52	女性	R	mod	生存	161	無	161
3	71	女性	S	mod	生存	157	無	157
4	62	女性	S	well	生存	133	肝	5
5	51	男性	R	well	生存	128	リンパ節	41
6	33	男性	R	por	死亡	26	肝	4
7	52	女性	A	mod	生存	20	肝	3
8	57	男性	S	mod	生存	81	肺	9

原発巣におけるCD133陰性／肝転移巣におけるCD133陽性症例

症例	年齢	性別	原発巣部位	組織型	予後	OS	再発臓器	DFS
1	49	男性	R	mod	生存	123	肝	7
2	70	女性	R	well	生存	101	肝	21

A: ascending colon, S: sigmoid colon, R: rectum, well: well differentiated

adenocarcinoma, mod: moderately differentiated adenocarcinoma, Por: poorly

differentiated adenocarcinoma, OS: overall survival, DFS: disease free survival

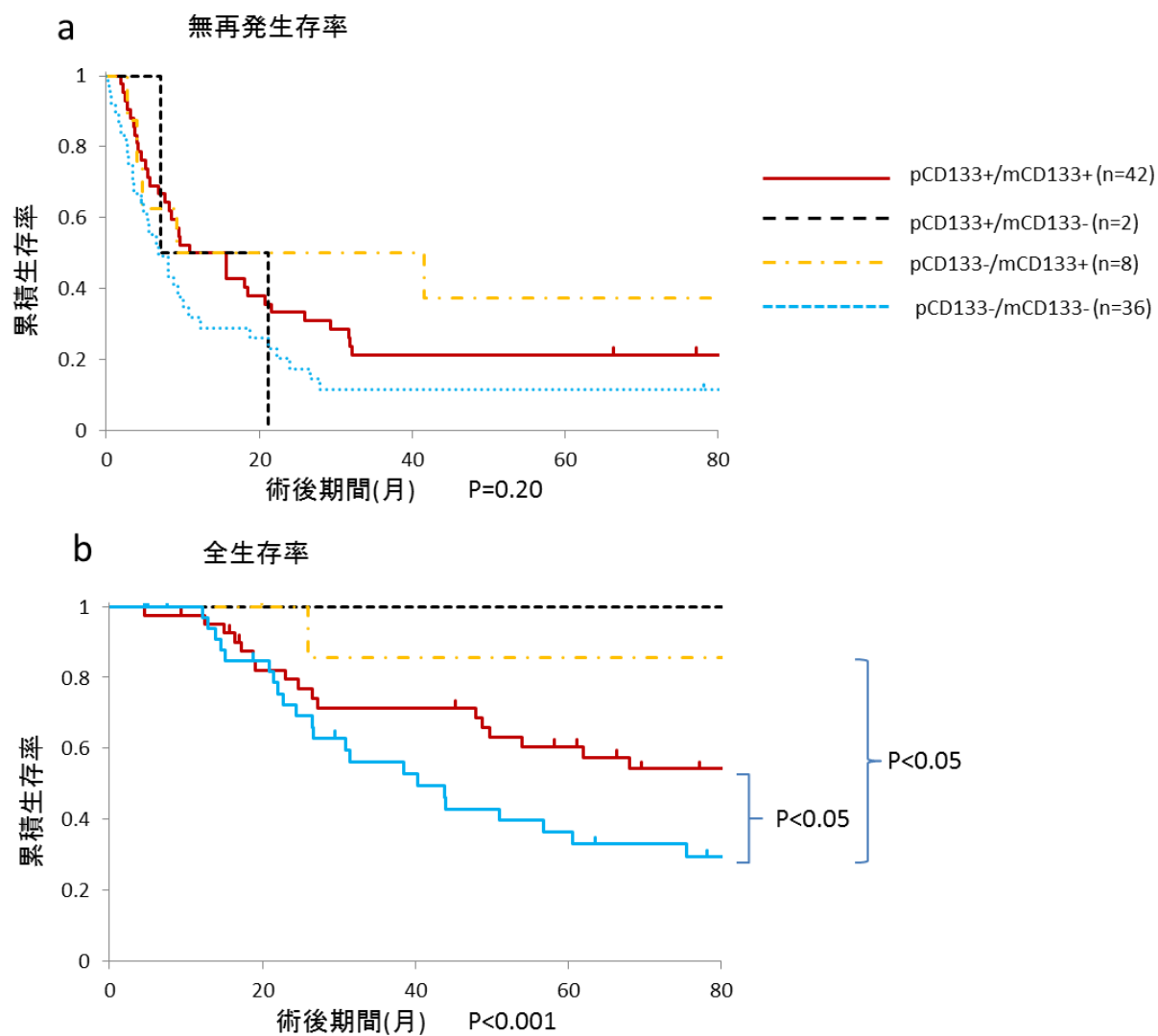


図7 原発巣と肝転移巣における CD133 発現状況が異なる症例の予後

a) 原発巣と肝転移巣における CD133 発現状況ごとの 4 群の無再発生存率。各群間で有意差を認めなかった ($p=0.19$)。b) 同 4 群の全生存率。pCD133-/mCD133-群は pCD133+/mCD133-群および pCD133-/mCD133+と比較して予後不良であったものの、他の群間では有意差は認めなかった。

2.5 CD133 発現と再発形式

2.5.1 肝転移巣における CD133 発現と再発形式

次に、肝転移巣における CD133 発現が再発形式に与える影響について検討を行った。肝転移再発 (Liver recurrence-free survival) については、mCD133+症例は mCD133-症例と比較して有意差を認めなかった ($p=0.57$ 、図 8a)。しかし肝以外の臓器における再発 (Extrahepatic recurrence-free survival) については、mCD133-症例が mCD133+症例と比較して有意に高い再発率を示した ($p<0.001$ 、図 8b)。

これについても、mCD133+群を mCD133+all と mCD133+partial に分類し解析した。無肝転移生存率については、各群間において有意差は認められなかった ($p=0.76$ 、図 9a)。一方、無肝外再発生存率については、mCD133+all 症例は mCD133-と比較して有意に予後良好であったが、mCD133+partial との間には有意差が認められなかった ($p<0.001$ 、図 9b)。

肝外再発について、リンパ節再発・腹膜播種再発・肝以外の遠隔転移再発に分類して詳細を検討した (図 10)。肝以外の遠隔転移再発および局所再発については CD133 陰性症例が CD133 陽性症例と比較して有意に高い再発率を示したが ($p=0.47$, $p=0.010$ 、図 10c, d)、リン

関節再発、腹膜播種再発については有意差は認められなかった ($p=0.89$, $p=0.55$ 、図 10a, b)。

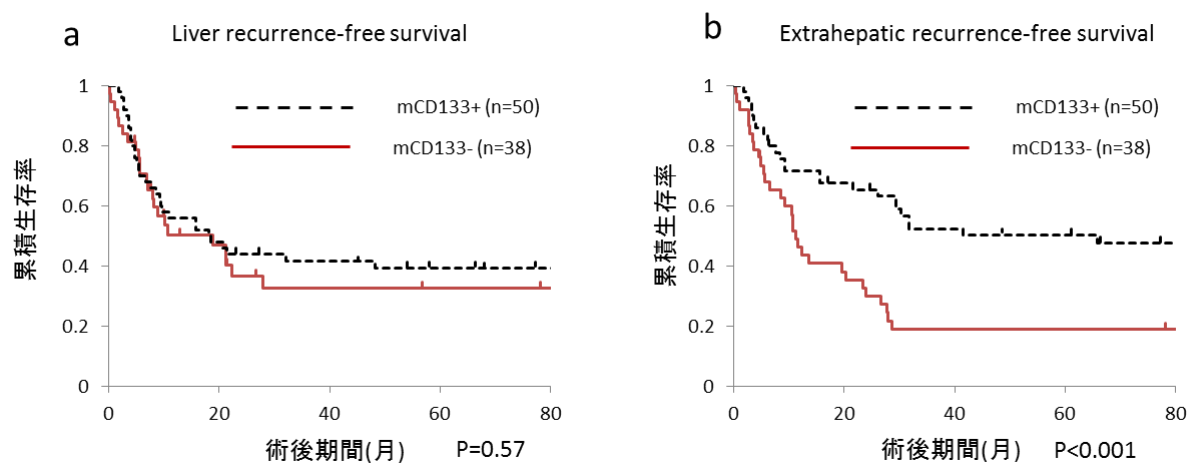


図8 大腸癌肝転移巣におけるCD133発現と再発形式 (1)

a) 術後の liver recurrence-free survival はCD133 の発現状況によって有意な差を認めなかった ($p=0.57$)。b) 術後の extrahepatic recurrence-free survival は、肝転移におけるCD133発現陽性症例 (mCD133+) で有意に高かった ($p<0.001$)。

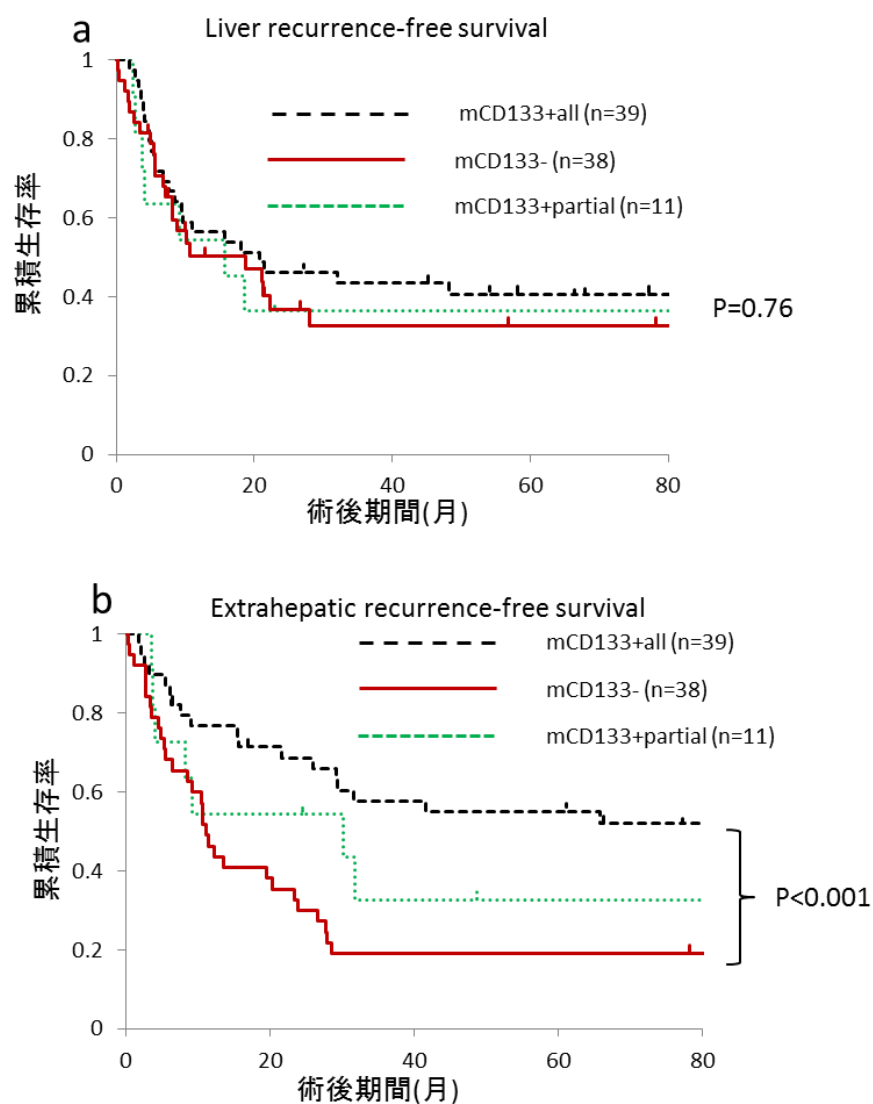


図9 大腸癌肝転移巣におけるCD133発現と再発形式 (2)

mCD133-群を mCD133+all および mCD133+partial に分類して検討を行った。a) Liver recurrence-free survival は CD133 の発現状況によって有意な差を認めなかった ($p=0.76$)。b) Extrahepatic recurrence-free survival については、mCD133+all 症例はmCD133-症例と比較して有意に予後良好であったが ($p<0.001$)、mCD133+partial との間には有意差は認められなかった。

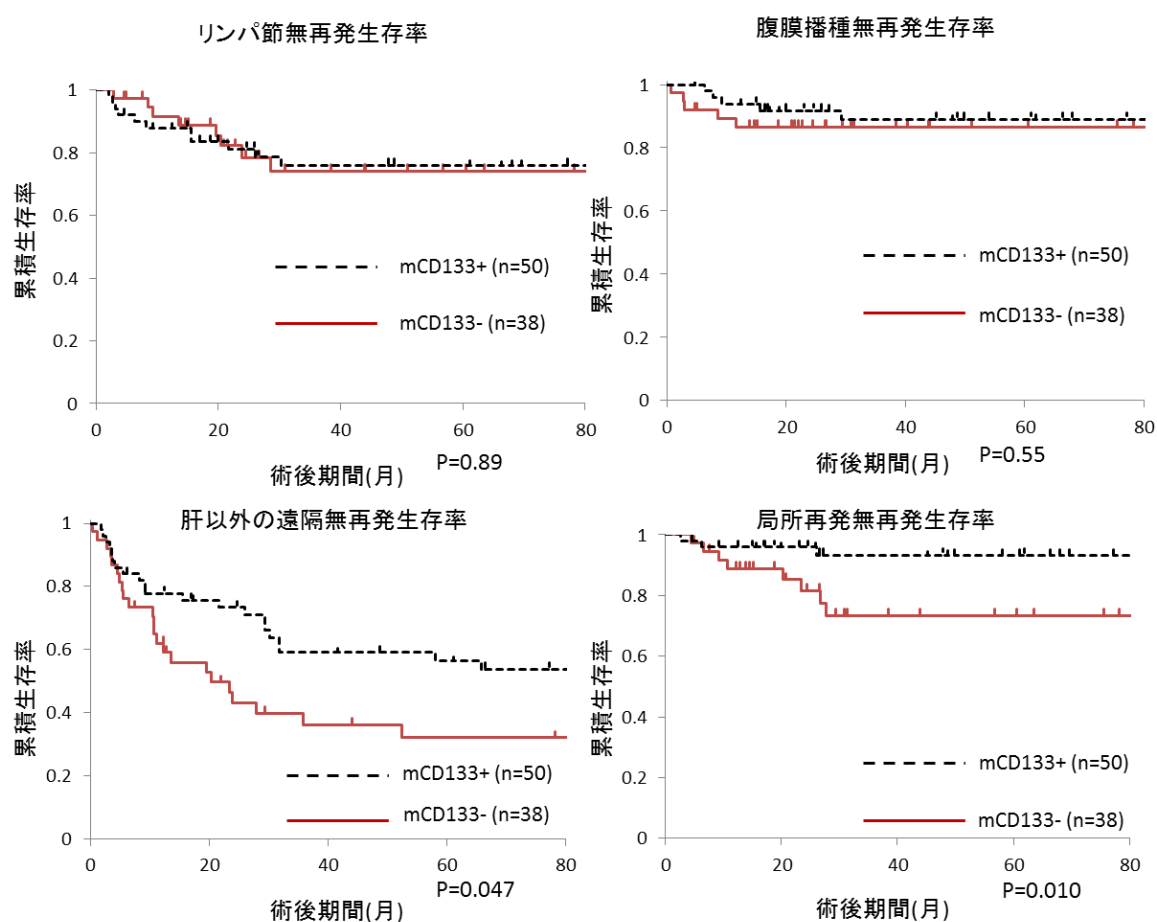


図 10 大腸癌肝転移巣における CD133 発現と再発形式の詳細

大腸癌肝転移症例の a) リンパ節再発に関する無再発生存率($p=0.89$)、b) 腹膜播種再発に関する無再発生存率 ($p=0.55$)、c) 肝以外の遠隔転移に関する無再発生存率 ($p=0.047$)、d) 局所再発に関する無再発生存率 ($p=0.010$)。肝以外の遠隔転移、および局所再発は mCD133+で有意に高率であったが、リンパ節再発・腹膜播種再発について有意差は得られなかった。

2.5.2 大腸癌原発巣における CD133 発現と再発形式

原発巣における CD133 発現と無再発生存率との相関は認めなかったが、再発形式ごとには相関があるかについて再度検討した。肝転移巣における CD133 発現と同様に、Liver recurrence-free survival については、pCD133+症例は pCD133-症例と比較して有意差を認めなかったが ($p=0.57$ 、図 11a)、Extrahepatic recurrence-free survival については、pCD133-症例が pCD133+症例と比較して有意に高い再発率を示した ($p<0.001$ 、図 11b)。しかし肝外再発の詳細については、いずれの形式についても有意差は認めなかった (図 12)。

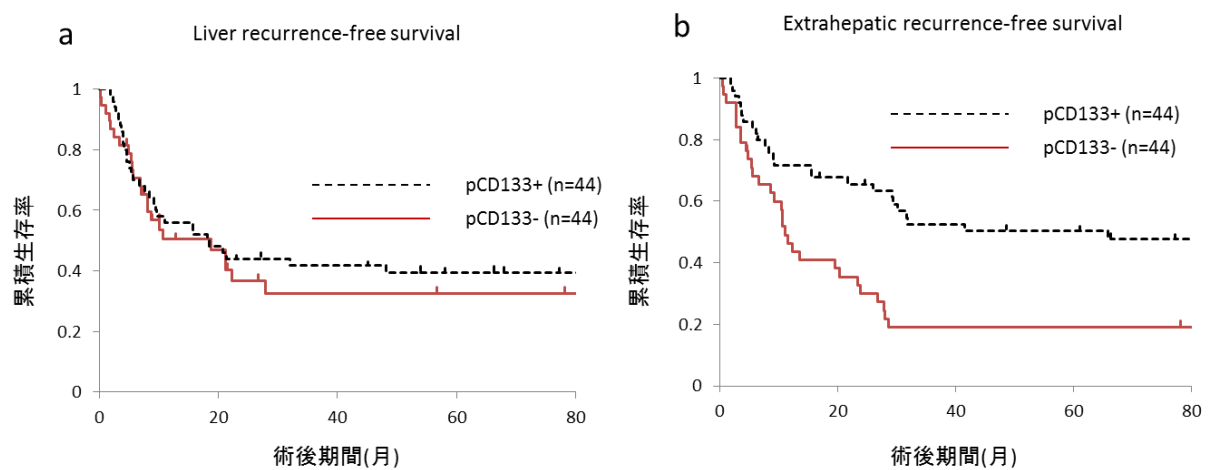


図 11 大腸癌原発巣における CD133 発現と再発形式

a) Liver recurrence-free survival は CD133 の発現状況によって有意な差を認めなかった ($p=0.97$)。b) Extrahepatic recurrence-free survival は、CD133 発現陽性症例 (pCD133+) で有意に高かった ($p=0.003$)

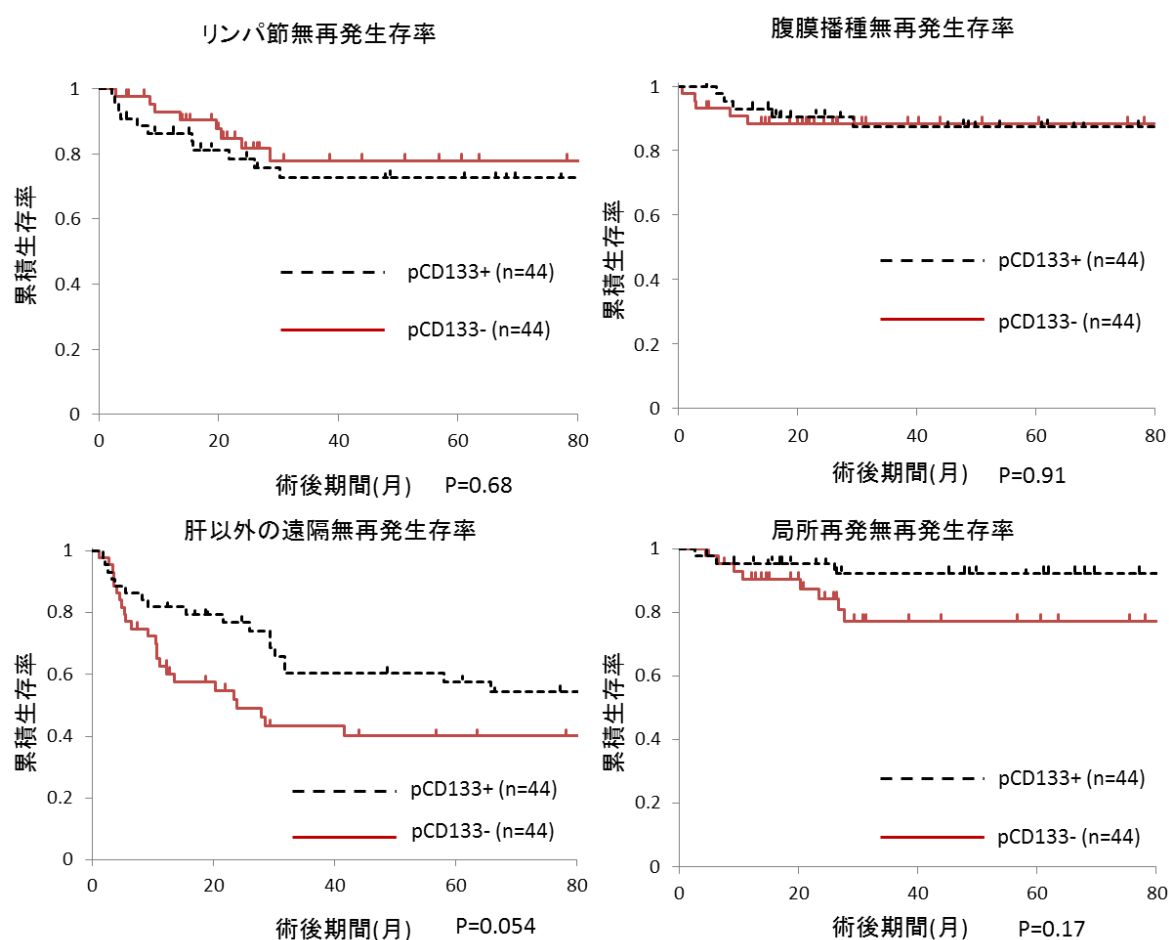


図 12 大腸癌原発巣における CD133 発現と再発形式の詳細

大腸癌肝転移症例の a) リンパ節再発に関する無再発生存率 ($p=0.68$)、b) 腹膜播種再発に関する無再発生存率 ($p=0.91$)、c) 肝以外の遠隔転移に関する無再発生存率 ($p=0.054$)、d) 局所再発に関する無再発生存率 ($p=0.17$)。いずれについても原発巣 CD133 発現による有意差は得られなかった。

2.5.3 大腸癌肝転移症例の転帰

mCD133 陽性・陰性症例の転帰を示すフローチャートを図 13 に示した。mCD133 陽性 50 例中、12 例 (24.0%) が初回手術で治癒した。13 例が 2 回目肝切除を施行されたが、このうち 10 例 (76.9%) で治癒が得られ、生存中患者は計 26 例 (52.0%) であった (図 13a)。また、mCD133 陰性 38 例中、初回手術で治癒したのは 6 例 (15.8%) のみであった。14 例が 2 回目肝切除を施行されたが、このうち 4 例 (28.6%) で治癒が得られ、生存中患者は 10 例 (26.3%) にとどまった (図 13b)。また、この初回再発の際の再発臓器の内訳を表 13 に示した。

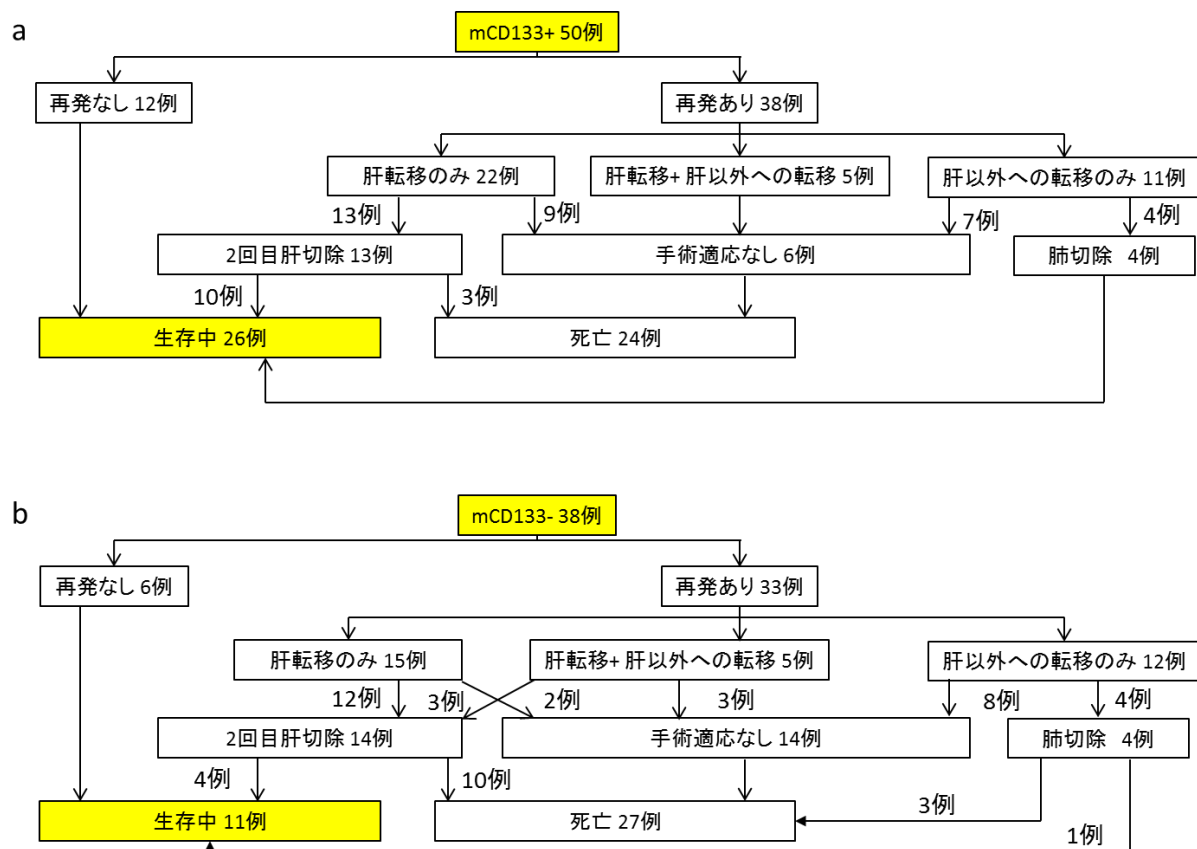


図 13 大腸癌肝転移巣における CD133 発現と再発形式の詳細

mCD133 陽性 50 例中、生存中患者は計 26 例 (52.0%) であった (図 13a)。また、mCD133 陰性 38 例中、再発に対する手術適応がないとされた患者は 14 例にのぼり、生存中患者は 11 例 (28.9%) にとどまった (図 13b)。

表 13 初回再発時の再発臓器

初回再発臓器		CD133	
		陽性(生存数)	陰性(生存数)
肝以外の遠隔転移	肺	8(3)	12(1)
	その他	1(0)	0
リンパ節		8(0)	3(0)
局所再発		2(0)	5(0)
腹膜播種		5(0)	3(0)
重複あり。			

2.5.3 再肝切除検体における CD133 発現

肝再発症例における CD133 発現が、初回肝切除の CD133 発現と相関するかを検討した。初回および 2 回目の肝切除における CD133 発現状況を表 14 に示す。2 回目肝切除における CD133 発現 (recCD133) 陽性症例は、初回肝切除で mCD133+ であった症例で有意に多かった ($p<0.001$)。2 回目肝切除における CD133 発現と転帰との関係は、mCD133+11 例中、生存中の 10 例全例で recCD133+ であり、肝肺転移で死亡した 1 例のみが recCD133- であった。また mCD133- で死亡した 12 例中、10 例を recCD133- が占めた。

表 14 初回および2回目肝切除における CD133 発現

	recCD133+	recCD133-
mCD133+ (n=13)	12 (92.3%)	1 (7.7%)
	生存 10	生存 0
	死亡 2	死亡 1
mCD133- (n=14)	3 (21.4%)	11 (78.6%)
	生存 0	生存 4
	死亡 3	死亡 7

2.6 大腸癌肝転移術後の予後予測因子の検討

CD133 発現の予後予測能を検証するために、肝転移巣における CD133 発現の有無を含めた臨床病理学的因子について単変量解析・多変量解析を行った (表 15)。表 15 には、単変量解析において無再発生存率・全生存率との相関傾向を認めた ($p < 0.1$) 臨床病理学的因子を示した。なお、化学療法についてはレジメンによる影響を考慮し、図 14 に示す通りさらに 3 群に分類して検討を行ったが、レジメンによる生存率の差は認められなかった。

無再発生存率に関しては、深達度 T4 ($p = 0.087$)、リンパ節転移陽性 ($p = 0.093$)、組織型が高・中分化型腺癌以外 ($p = 0.001$)、リンパ管侵襲陽性 ($p = 0.005$)、静脈侵襲陽性 ($p = 0.037$)、肝転移数 4 以上 ($p = 0.005$)、肝転移最大径 51mm 以上 ($p = 0.006$)、肝転移における CD133 発現陰性 ($p = 0.043$) が単変量解析において相関傾向を認めた因子であった。このうち多変量解析において、リンパ管侵襲 (risk ratio [RR]: 1.95, 95% confidence interval [CI]: 1.13-3.36, p value: 0.016)、肝転移数 (RR: 1.84, 95% CI: 1.06-3.17, p value: 0.031)、肝転移最大径 (RR: 2.05, 95% CI: 1.10-3.68, p value: 0.026)、および肝転移における CD133 発現陰性 (RR: 1.86, 95% CI: 1.09-3.19, p value: 0.024) が互いに独立した有意な無再発生存率予測因子として認められた。

(表 15a)。

次に全生存率については、組織型が高・中分化型腺癌以外 ($p<0.001$)、肝転移数 4 以上 ($p=0.022$)、肝転移における CD133 発現陰性($p=0.014$) が単変量解析において相関傾向を認めた因子であった。このうち多変量解析において、組織型が高・中分化型腺癌以外 (RR: 3.45, 95% CI: 1.11-8.98, p value: 0.034)、および肝転移における CD133 発現陰性(RR: 2.08, 95% CI: 1.11-3.94, p value: 0.022) が互いに独立した有意な無再発生存率予測因子として認められた (表 15b)。

表 15 大腸癌同時性肝転移治癒切除症例の予後因子

a 無再発生存率

	単変量解析		多変量解析	
	P value	P value	relative risk	95% CI
深達度 (T4 対 T2-3)	0.087	0.159		
所属リンパ節転移 (あり 対 なし)	0.093	0.977		
組織型 (por・muc 対 well・mod)	0.001	0.356		
リンパ管侵襲 (あり 対 なし)	0.005	0.016	1.95	1.13 - 3.36
静脈侵襲 (あり 対 なし)	0.037	0.200		
肝転移数 (4個以上 対 3個以下)	0.005	0.031	1.84	1.06 - 3.17
肝転移最大径 (51mm以上 対 50mm以下)	0.006	0.026	2.05	1.10 - 3.68
肝転移巣におけるCD133 (陰性 vs. 陽性)	0.043	0.024	1.86	1.09 - 3.19

b 全生存率

	単変量解析		多変量解析	
	P value	P value	relative risk	95% CI
組織型 (por・muc 対 well・mod)	<0.001	0.034	3.45	1.11 - 8.98
肝転移数 (4個以上 対 3個以下)	0.022	0.070		
肝転移巣におけるCD133 (陰性 vs. 陽性)	0.014	0.022	2.08	1.11 - 3.94

por : poorly differentiated adenocarcinoma, muc : mucinous adenocarcinoma,

well : well differentiated adenocarcinoma, mod : moderately differentiated adenocarcinoma

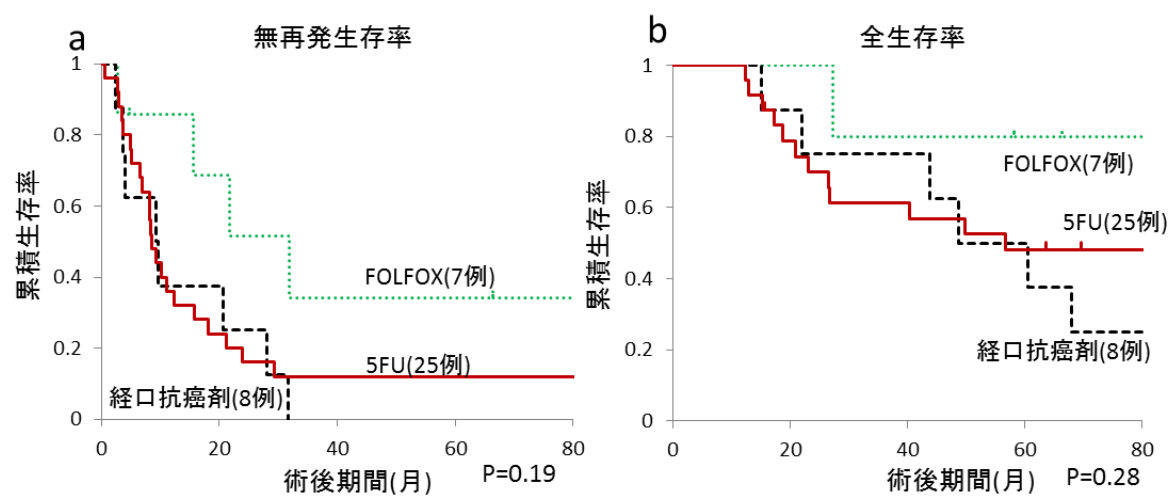


図 14 化学療法レジメンごとの生存率の比較

レジメンの違いが生存率に与える影響を明らかにするため、FOLFOX 群・5FU を主剤とした群・その他の経口抗癌剤の 3 群に分類して検討を行った。無再発生存率（図 14a）、全生存率（図 14b）ともにレジメンによる生存率の差は認めなかったため、多変量解析には用いなかった。

3. 考察

本研究にて、大腸癌肝転移治癒切除症例において、肝転移巣での CD133 発現が全生存率のみならず無再発生存率についても独立した予後因子であることが示された。また CD133 陽性症例は陰性症例と比較して肝以外の術後再発が有意に少ないことが示された。

大腸癌肝転移の唯一の根本的治療は治癒切除である。原発巣の深達度や肝転移径、個数などは術後再発のリスク因子であるとされており、術後補助化学療法の適応とすることで予後が改善する可能性があると考えられるが⁸⁻¹⁰、どのような症例に術後補助化学療法を追加すべきかについては今後も更なる検討が必要である。CD133 は大腸癌における幹細胞マーカーである可能性が示唆されてきた膜タンパク質である。しかしその機序は明らかでなく、特に転移巣における発現についてはこれまで十分な検討がなされていなかった。肝転移における CD133 の発現および特性を明らかにすることは、化学療法などの治療につながると考えられる。肝転移巣における CD133 の発現および予後との関連について明らかにするため、当院における切除標本を用いて免疫組織学的に検討を行った。

明らかになったことの一つは、原発巣および肝転移巣における CD133 の発現状況である。肝転移巣における CD133 発現率は 88 例中 50 例 (56.8%) であったが、この値は 2014 年に

Yamamoto らによって肝転移について報告されている 53.6% とほぼ同様であった⁶⁰。一方で、肝転移症例の 44 例 (50.0%) は原発巣において CD133 陰性であり、このうち 36 例 (81.9%) は肝転移巣においても CD133 陰性であった。この結果は、CD133 陰性細胞も CD133 陽性細胞同様に転移能を持っている可能性を示唆している。当科では以前に、大腸癌細胞株 (LoVo) から分離した CD133 陰性細胞は β 1-インテグリンの発現を介して、コラーゲンに対する CD133 陽性細胞より高い接着能を持つことを報告しており⁶¹、これは CD133 陰性細胞が転移能をもっていることを示唆する本研究と矛盾しない結果であったといえる。また、今回 pCD133 陽性症例の 75% が mCD133 陽性、pCD133 陰性症例の 86% が mCD133 陰性であり、原発巣における CD133 発現と肝転移巣における CD133 発現には強い相関が認められた。これは前出の Yamamoto らの報告とは異なる結果であり⁶⁰、本研究がカイ 2 乗検定、Yamamoto らが Spearman の相関係数と異なる統計手法を用いたことによる違いと考えられる。また Yamamoto らの報告では複数の肝転移がある場合の詳細については言及されていない。本研究は複数の肝転移がある症例については入手可能なすべての肝転移巣を用いて免疫染色を行った点で価値のあるデータと考えられる。

次に、大腸癌肝転移における CD133 発現と予後との関係について明らかにした。まず原発巣については、pCD133 陽性症例と pCD133 陰性症例の予後には有意差を認めなかったものの、全生存率については pCD133 陽性症例で予後良好である傾向がみられた。大腸癌原発巣における CD133 発現についてのメタアナリシスでは、pCD133 陽性症例は pCD133 陰性症例と比較して予後不良であるとされているが、メタアナリシスは Stage I から IV までを含んだ結果であり、現時点では Stage IV のみについての CD133 と予後との関係については明らかになっておらず、今回の結果は新たな知見である可能性がある。続いて転移巣については、mCD133 陽性症例は mCD133 陰性症例と比較して有意に良好な全生存率が得られた。これは前出の Yamamoto らの結果とも一致しているが⁶⁰、一方で前出の原発巣についてのメタアナリシスとは逆の結果であるといえる^{55, 56}。しかし、肝転移についての報告は我々の報告を含めて 2 編のみであり、用いる抗体やカットオフ値による結果の違いも明らかになっていないのが現状であり、今後の検討が期待される。

また今回もう一つの重要な所見として、mCD133 陰性症例は、mCD133 陽性症例と比較して有意に肝以外の臓器における再発が多く認められることが示された。そこで症例の経過を

フローチャートとしてまとめてみると、肝再発症例のうち2回目肝切除が施行された症例については、mCD133陽性症例は13例中10例(76.9%)と高率に生存が得られていた。この10例はいずれもrecCD133陽性で、その後肝以外への遠隔転移を来していなかった。一方、mCD133陰性症例では2回目肝切除を行った14例中10例(71.4%)が死亡した。まとめると、今回mCD133陰性症例の全生存率が有意に不良であったことは、①mCD133陰性症例では肝以外の臓器における再発や腹膜播種再発が多く、再手術にもちこめなかった可能性があること、②肝転移のみで再手術に持ち込めた場合にも、その後再発する症例が多い傾向にあったこと、の2つの経緯によるものと考えられる。また、mCD133陽性症例をmCD133+allとmCD133+partialに分類すると、全生存率においてmCD133+partialはmCD133+allより有意に予後不良であった。なお今回CD133発現の評価は前田法を用いており、CD133陰性病変の実際のCD133発現率は5%より低いと考えられる。これらの結果をあわせて、複数の肝転移(同時性・異時性含む)のうちmCD133陰性転移巣をより多く含む症例ほど予後不良であることが推測される。一方、原発巣におけるCD133発現は肝転移巣におけるCD133発現と強く関連していたことを考慮すると、原発巣と肝転移巣でCD133発現状況が異なる10症例が

結果に大きく影響したと予想される。これを裏付けるために、原発巣で CD133 陰性かつ転移巣で CD133 陽性であった 2 例と、原発巣で CD133 陽性かつ肝転移巣で CD133 陰性であった 8 例について臨床病理学的因子と生存率の検討を行ったが、各群の症例数が少なく特定の傾向を見出すことは困難であった（図 7）。今後さらなる症例数の蓄積が必要である。

さらに多変量解析によって、mCD133 陰性であることが独立した予後不良因子であることが示された。これらの結果は、CD133 陽性細胞が癌幹細胞という従来の見解と異なり、mCD133 陰性細胞の悪性度の高さを示唆する結果である。一方で、これまでの見解とは逆の結果ながら、mCD133 は予後マーカーとしては有用であるともいえる。

前述のように、原発巣ではなく肝転移における CD133 発現が予後と関連した理由について、Gao らの報告で述べられている “Migrating Cancer Stem Cell (MCSC)” の概念が参考になる可能性がある⁶²。MCSC は、癌幹細胞の中でも高い転移能を持つものとして定義されている。したがって転移巣中の幹細胞は、原発巣中の幹細胞と比較して、より転移しやすい性質を持ち、ひいては予後により強く影響すると考えられる。よって転移を有する症例の予後予測に関しては、転移巣についての検討が不可欠である。今回転移巣における CD133 陰性細胞が予

後不良因子であったことは、CD133 陰性細胞が CD133 陽性細胞と比較して何らかの転移機序に強く関わっていることを示唆している。

もともと大腸癌の転移は門脈を介した肝への血行性転移が多く、ここから全身に血行性に播種されるカスケード理論が提唱されてきた⁶³。一方で、肺などの多臓器転移を同時性に来たす症例もあり、異なる転移先臓器にそれぞれ親和性を持つ臓器特異的な癌細胞が存在する可能性が示唆されてきた。前出の Gao らの報告では、マウスに大腸癌細胞を移植して肺転移・肝転移を形成させ、これを採取・分離してさらにマウスに移植することを繰り返して特異的に肺転移・肝転移を来たしやすい細胞株を作成し、これを解析したところ CDCP1 が肺転移、CD110 が肝転移に特異的な癌幹細胞マーカーとして認められたと述べられている⁶²。特に CDCP1 は肺上皮細胞への接着促進に働くことで肺転移をおこしやすいとも考察されている。mCD133 陰性であることは、このような肝以外の臓器へ特異的に転移しやすい細胞のマーカーとして役立つ可能性がある。

また今回、①pCD133 陰性症例は、肝外再発率は pCD133 陽性症例より有意に高かったが、無再発生存率は pCD133 陽性症例と同等であり、②mCD133 陰性症例は、mCD133 陽性症例

より肝外再発率が mCD133 陽性症例より有意に高く、かつ無再発生存率も不良であった。この結果から図 14 のごとく、原発巣から肝へは CD133 陽性・陰性細胞とも同等に転移し、肝から他臓器へは CD133 陰性細胞が有意に転移しやすいことが示唆される。そもそも幹細胞マーカーは癌幹細胞を濃縮することはできるものの、真の癌幹細胞を精製できるものではなく、事実 CD133 と CD44 あるいは CD133 と CXCR4 などの共発現細胞がより強い stemness を示すという報告もある。CD133 の機能は現在明らかになっていないが、これらの結果からは CD133 の働きは常に stemness に直結するものではなく、原発巣や転移巣といった環境の違いにより左右されるものであることが推測される。なお、大腸癌肝転移を経た肺転移については Urošević らが、①原発巣から肝への転移には ERK2 の活性化が、②肝転移から肺への転移には p38MAPK 経路の抑制が関与していることを報告しているが⁶⁴、神経芽腫で CD133 が p38MAPK 経路に作用するという報告を考慮すると³⁵、p38MAPK 経路が活性化されていない CD133 陰性細胞はより肝から肺への転移を起こしやすいと考えられ、今回の結果に矛盾しないものと考えられる。今後、各臓器特異的な接着能や遊走能についてのメカニズムを明らかにすることは今後の新しい治療法の開発につながると考えられる。

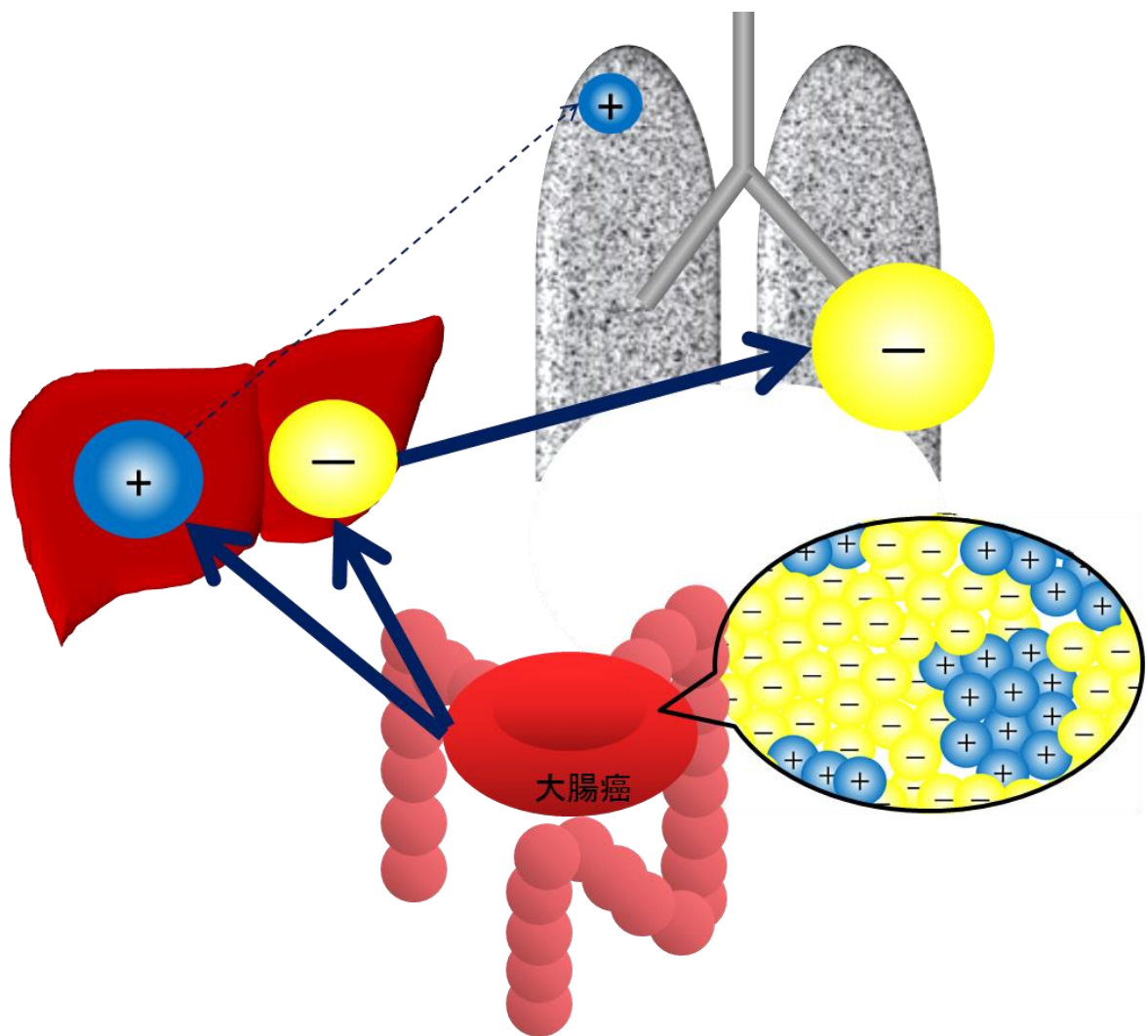


図 14 大腸癌肝転移を経た肺転移の形成

本結果からは、大腸癌原発巣からは CD133 陽性・陰性細胞同等に肝転移がおこる一方で、肝転移からは CD133 陰性転移巣から有意に他臓器への転移がおきると考えられる。CD133 陰性細胞では肝から他臓器への転移に関わる p38MAPK 経路が CD133 陽性細胞と比較して活性化されていないと考えられ、これは今回 CD133 陰性肝転移で他臓器転移が有意に多かった結果と矛盾しない。

一方、今回の検討では肝転移症例に限定して解析したことにより、データにバイアスがかかっている可能性がある。しかし、今回の結果でもしめされているように、肝以外の臓器への転移を伴う症例については根治切除ができる症例が少ない傾向にあり、データ収集が困難であるのが実状である。このような背景はあるものの、これまでの転移についての報告は前出の Yamamoto らの 1 編のみである。今回、Yamamoto らの報告と同様に mCD133-症例が独立した予後不良因子であったこと、さらに CD133 陰性症例で肝以外への転移再発が多かったことは、大腸癌転移における CD133 発現についての数少ない貴重なデータと考える。

今後の応用としては、肝転移における CD133 陰性症例をハイリスク群として術後補助化学療法の適応とすることで予後が改善する可能性がある。今回の検討では症例数が少なく、CD133 の発現と術後補助化学療法の有無による予後の差は見いだせなかったが、CD133 陰性細胞が抗癌剤に対する耐性が弱いことはこれまでも細胞実験で報告されているほか、治癒切除後の StageIV 症例について 5FU を用いたレジメンで術後補助化学療法を行った場合に CD133 陰性症例では予後の改善につながったことも示されている⁴²。また、CD133 陰性症例の術後フォローアップにおいて、遠隔転移検索の重点化により肝以外の臓器への転移を早期

発見できる可能性がある。

対照群として用いた Stage I -III 大腸癌根治切除症例 226 例については、今回 CD133 発現と予後についての相関は見られなかった。メタアナリシスで用いられたこれまでの報告のうち 4 つの論文では CD133 発現と予後に相関が認められていない (表 2)^{41,43,50,52}。これらのメタアナリシスでの問題点として、①各論文の対象症例の Stage が異なること、②各論文で用いられている抗 CD133 抗体が異なること、が挙げられる。まず①について、メタアナリシスでは Stage 別の解析は行われておらず、今後の検討課題と考えられる。また②について、他の抗 CD133 抗体を用いた報告では細胞質も染色されるとしているものがあり、胃癌についての免疫組織学的検討を行った Hashimoto らの論文では、胃癌細胞の細胞質における CD133 発現陽性は独立した予後不良因子であり、細胞質における CD133 陽性症例では HIF-1 α の陽性率が高かったと報告されているが⁶⁵、メタアナリシスによる検討では細胞膜での発現が予後と相関すると結論付けられている⁵⁶。今回用いた抗体 (AC133; Miltenyi Biotec, Auburn, CA, USA) では、これを用いた以前の報告はいずれも腺管の細胞膜および管腔内部の debris が染まることが示されており^{37,42,50}、今回も同様の染色結果を得ることができた。

またもうひとつの対照群として内視鏡的に切除された様々な組織型の大腸ポリープについても検討を行い、ステージと CD133 陽性率には相関は認められなかった。一方でポリープ長径、組織型が CD133 の発現と相関することが示された。2011 年にマウス大腸癌発癌モデルを用いた実験で、マウスの発癌の早期の段階から CD133 が発現することが示されている。また、大腸癌細胞株を用いた実験で、tyrosine phosphatase κ が CD133 の脱リン酸化を介して PI3K/AKT 経路の制御に働くことが示されており⁶⁶、CD133 が癌化経路に関与することが推測されていたものの、ヒトにおける免疫組織学的検討はなされていなかった。今回ポリープ長径と CD133 の発現に相関がみられたことはこの結果を支持するものと考えられ、今後は他の癌遺伝子との関連についての検討が待たれる。

4. 結論

1. 大腸癌原発巣と肝転移巣における CD133 の発現は関連した。
2. 大腸癌肝転移症例の肝転移巣における CD133 陰性症例は有意に予後不良であり、特に肝以外への転移再発が多かった。
3. 肝転移巣における CD133 発現陰性は予後不良マーカーとなる可能性が示唆された。

本研究が発端となり、大腸癌転移のメカニズムがさらに解明され研究が発展することを期待する。

5. 謝辞

本研究をすすめるにあたり、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 渡邊聡明教授にはひとかたならぬ御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝いたします。そして、腫瘍外科学・血管外科学 北山丈二准教授、須並英二先生、石原聡一郎先生には、具体的な実験方法、実験手技の習得、データの解釈、研究の進め方など、多岐に渡る詳細な御指導を頂きました。

さらに、実際の実験に際しては、多くの先生方に多大なるご協力を頂きました。

ここに深甚なる謝意を表します。

6. 参考文献

1. Fitzmaurice C, Dicker D, Pain A, Hamavid H, Moradi-Lakeh M, MacIntyre MF, Allen C, Hansen G, Woodbrook R, Wolfe C, Hamadeh RR, Moore A, Werdecker A, Gessner BD, Te Ao B, McMahon B, Karimkhani C, Yu C, Cooke GS, Schwebel DC, Carpenter DO, Pereira DM, Nash D, Kazi DS, De Leo D, Plass D, Ukwaja KN, Thurston GD, Yun Jin K, Simard EP, Mills E, Park EK, Catala-Lopez F, deVeber G, Gotay C, Khan G, Hosgood HD, 3rd, Santos IS, Leasher JL, Singh J, Leigh J, Jonas JB, Sanabria J, Beardsley J, Jacobsen KH, Takahashi K, Franklin RC, Ronfani L, Montico M, Naldi L, Tonelli M, Geleijnse J, Petzold M, Shrive MG, Younis M, Yonemoto N, Breitborde N, Yip P, Pourmalek F, Lotufo PA, Esteghamati A, Hankey GJ, Ali R, Lunevicius R, Malekzadeh R, Dellavalle R, Weintraub R, Lucas R, Hay R, Rojas-Rueda D, Westerman R, Sepanlou SG, Nolte S, Patten S, Weichenthal S, Abera SF, Fereshtehnejad SM, Shiue I, Driscoll T, Vasankari T, Alsharif U, Rahimi-Movaghar V, Vlassov VV, Marcenes WS, Mekonnen W, Melaku YA, Yano Y, Artaman A, Campos I, MacLachlan J, Mueller U, Kim D, Trillini M, Eshrati B, Williams HC, Shibuya K, Dandona R, Murthy K, Cowie B, Amare AT, Antonio CA, Castaneda-Orjuela C, van Gool CH,

- Violante F, Oh IH, Deribe K, Soreide K, Knibbs L, Kereselidze M, Green M, Cardenas R, Roy N, Tillmann T, Li Y, Krueger H, Monasta L, Dey S, Sheikhabaei S, Hafezi-Nejad N, Kumar GA, Sreeramareddy CT, Dandona L, Wang H, Vollset SE, Mokdad A, Salomon JA, Lozano R, Vos T, Forouzanfar M, Lopez A, Murray C, Naghavi M. The Global Burden of Cancer 2013. *JAMA Oncol* 2015;1:505-27.
2. Kodeda K, Nathanaelsson L, Jung B, Olsson H, Jestin P, Sjovall A, Glimelius B, Pahlman L, Syk I. Population-based data from the Swedish Colon Cancer Registry. *Br J Surg* 2013;100:1100-7.
 3. Leporrier J, Maurel J, Chiche L, Bara S, Segol P, Launoy G. A population-based study of the incidence, management and prognosis of hepatic metastases from colorectal cancer. *Br J Surg* 2006;93:465-74.
 4. Adam R, Delvart V, Pascal G, Valeanu A, Castaing D, Azoulay D, Giacchetti S, Paule B, Kunstlinger F, Ghemard O, Levi F, Bismuth H. Rescue surgery for unresectable colorectal liver metastases downstaged by chemotherapy: a model to predict long-term survival. *Ann Surg* 2004;240:644-57; discussion 57-8.

5. Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, Scheithauer W, Figuer A, Wong R, Koski S, Lichinitser M, Yang TS, Rivera F, Couture F, Sirzen F, Cassidy J. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008;26:2013-9.
6. Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, Zaluski J, Chang Chien CR, Makhson A, D'Haens G, Pinter T, Lim R, Bodoky G, Roh JK, Folprecht G, Ruff P, Stroh C, Tejpar S, Schlichting M, Nippgen J, Rougier P. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009;360:1408-17.
7. Beppu T, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Imai K, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Baba H. Chemotherapy and targeted therapy for patients with initially unresectable colorectal liver metastases, focusing on conversion hepatectomy and long-term survival. *Ann Surg Oncol* 2014;21 Suppl 3:S405-13.
8. Mann CD, Metcalfe MS, Leopardi LN, Maddern GJ. The clinical risk score: emerging as a reliable preoperative prognostic index in hepatectomy for colorectal metastases. *Arch Surg*

2004;139:1168-72.

9. Scheele J, Stang R, Altendorf-Hofmann A, Paul M. Resection of colorectal liver metastases.

World J Surg 1995;19:59-71.

10. Smith MD, McCall JL. Systematic review of tumour number and outcome after radical

treatment of colorectal liver metastases. Br J Surg 2009;96:1101-13.

11. Bruce WR, Van Der Gaag H. A QUANTITATIVE ASSAY FOR THE NUMBER OF

MURINE LYMPHOMA CELLS CAPABLE OF PROLIFERATION IN VIVO. Nature

1963;199:79-80.

12. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates

from a primitive hematopoietic cell. Nat Med 1997;3:730-7.

13. Fanali C, Lucchetti D, Farina M, Corbi M, Cufino V, Cittadini A, Sgambato A. Cancer stem

cells in colorectal cancer from pathogenesis to therapy: controversies and perspectives. World J

Gastroenterol 2014;20:923-42.

14. Xu G, Shen J, Ou Yang X, Sasahara M, Su X. Cancer stem cells: the 'heartbeat' of gastric

cancer. *J Gastroenterol* 2013;48:781-97.

15. Tabatabai G, Weller M. Glioblastoma stem cells. *Cell Tissue Res* 2011;343:459-65.

16. Ji J, Wang XW. Clinical implications of cancer stem cell biology in hepatocellular carcinoma.

Semin Oncol 2012;39:461-72.

17. Alamegeer M, Peacock CD, Matsui W, Ganju V, Watkins DN. Cancer stem cells in lung

cancer: Evidence and controversies. *Respirology* 2013;18:757-64.

18. Abel EV, Simeone DM. Biology and clinical applications of pancreatic cancer stem cells.

Gastroenterology 2013;144:1241-8.

19. Sharpe B, Beresford M, Bowen R, Mitchard J, Chalmers AD. Searching for prostate cancer

stem cells: markers and methods. *Stem Cell Rev* 2013;9:721-30.

20. Gangopadhyay S, Nandy A, Hor P, Mukhopadhyay A. Breast cancer stem cells: a novel

therapeutic target. *Clin Breast Cancer* 2013;13:7-15.

21. Weigmann A, Corbeil D, Hellwig A, Huttner WB. Prominin, a novel microvilli-specific

polytopic membrane protein of the apical surface of epithelial cells, is targeted to plasmalemmal

protrusions of non-epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1997;94:12425-30.

22. Yin AH, Miraglia S, Zanjani ED, Almeida-Porada G, Ogawa M, Leary AG, Olweus J, Kearney J, Buck DW. AC133, a novel marker for human hematopoietic stem and progenitor cells.

Blood 1997;90:5002-12.

23. Toren A, Bielorai B, Jacob-Hirsch J, Fisher T, Kreiser D, Moran O, Zeligson S, Givol D, Yitzhaky A, Itskovitz-Eldor J, Kventsel I, Rosenthal E, Amariglio N, Rechavi G. CD133-positive hematopoietic stem cell "stemness" genes contain many genes mutated or abnormally expressed in leukemia. *Stem Cells* 2005;23:1142-53.

24. Collins AT, Berry PA, Hyde C, Stower MJ, Maitland NJ. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Res* 2005;65:10946-51.

25. Eramo A, Lotti F, Sette G, Pilozzi 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* 2008;15:504-14.

26. 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* 2007;1:313-23.

27. Liu G, Yuan X, Zeng Z, Tunici P, Ng H, Abdulkadir IR, Lu L, Irvin D, Black KL, Yu JS. Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol Cancer* 2006;5:67.

28. O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, Dick JE. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* 2007;445:106-10.

29. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, Biffoni M, Todaro M, Peschle C, De Maria R. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* 2007;445:111-5.

30. 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. Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:10158-63.

31. Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, Ginestier C, Dontu G, Appelman H, Fields JZ, Wicha MS, Boman BM. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells

(SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. *Cancer Res* 2009;69:3382-9.

32. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, Richel DJ,

Stassi G, Medema JP. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage

differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008;105:13427-32.

33. Gaiser T, Camps J, Meinhardt S, Wangsa D, Nguyen QT, Varma S, Dittfeld C,

Kunz-Schughart LA, Kemmerling R, Becker MR, Heselmeyer-Haddad K, Ried T. Genome and

transcriptome profiles of CD133-positive colorectal cancer cells. *Am J Pathol* 2011;178:1478-88.

34. 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* 2014;13:15.

35. Takenobu H, Shimozaoto O, Nakamura T, Ochiai H, Yamaguchi Y, Ohira M, Nakagawara A,

Kamijo T. CD133 suppresses neuroblastoma cell differentiation via signal pathway modification.

Oncogene 2011;30:97-105.

36. Moon BS, Jeong WJ, Park J, Kim TI, Min do S, Choi KY. Role of oncogenic K-Ras in cancer

stem cell activation by aberrant Wnt/beta-catenin signaling. *J Natl Cancer Inst* 2014;106:djt373.

37. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, Fujii S, Saito N, Ochiai A. Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci* 2008;99:1578-83.

38. Horst D, Kriegl L, Engel J, Kirchner T, Jung A. CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2008;99:1285-9.

39. Wang Q, Chen ZG, Du CZ, Wang HW, Yan L, Gu J. Cancer stem cell marker CD133+ tumour cells and clinical outcome in rectal cancer. *Histopathology* 2009;55:284-93.

40. Li CY, Li BX, Liang Y, Peng RQ, Ding Y, Xu DZ, Zhang X, Pan ZZ, Wan DS, Zeng YX, Zhu XF, Zhang XS. Higher percentage of CD133+ cells is associated with poor prognosis in colon carcinoma patients with stage IIIB. *J Transl Med* 2009;7:56.

41. Lugli A, Iezzi G, Hostettler I, Muraro MG, Mele V, Tornillo L, Carafa V, Spagnoli G, Terracciano L, Zlobec I. Prognostic impact of the expression of putative cancer stem cell markers CD133, CD166, CD44s, EpCAM, and ALDH1 in colorectal cancer. *Br J Cancer* 2010;103:382-90.

42. Ong CW, Kim LG, Kong HH, Low LY, Iacopetta B, Soong R, Salto-Tellez M. CD133

expression predicts for non-response to chemotherapy in colorectal cancer. *Mod Pathol* 2010;23:450-7.

43. Choi D, Lee HW, Hur KY, Kim JJ, Park GS, Jang SH, Song YS, Jang KS, Paik SS. Cancer stem cell markers CD133 and CD24 correlate with invasiveness and differentiation in colorectal adenocarcinoma. *World J Gastroenterol* 2009;15:2258-64.

44. Takahashi S, Kamiyama T, Tomaru U, Ishizu A, Shida T, Osaka M, Sato Y, Saji Y, Ozaki M, Todo S. Frequency and pattern of expression of the stem cell marker CD133 have strong prognostic effect on the surgical outcome of colorectal cancer patients. *Oncol Rep* 2010;24:1201-12.

45. Xi HQ, Zhao P. Clinicopathological significance and prognostic value of EphA3 and CD133 expression in colorectal carcinoma. *J Clin Pathol* 2011;64:498-503.

46. Garcia VM, Batlle JF, Casado E, Burgos E, de Castro J, Belda C, Barriuso J, Sanchez JJ, Garcia-Cabezas MA, Gonzalez-Baron M, Cejas P. Immunohistochemical analysis of tumour regression grade for rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy. *Colorectal Dis* 2011;13:989-98.

47. Nagata T, Sakakura C, Komiyama S, Miyashita A, Nishio M, Murayama Y, Komatsu S, Shiozaki A, Kuriu Y, Ikoma H, Nakanishi M, Ichikawa D, Fujiwara H, Okamoto K, Ochiai T, Kokuba

Y, Sonoyama T, Otsuji E. Expression of cancer stem cell markers CD133 and CD44 in locoregional recurrence of rectal cancer. *Anticancer Res* 2011;31:495-500.

48. Zhang NH, Li J, Li Y, Zhang XT, Liao WT, Zhang JY, Li R, Luo RC. Co-expression of CXCR4 and CD133 proteins is associated with poor prognosis in stage II-III colon cancer patients. *Exp Ther Med* 2012;3:973-82.

49. Coco C, Zannoni GF, Caredda E, Sioletic S, Boninsegna A, Migaldi M, Rizzo G, Bonetti LR, Genovese G, Stigliano E, Cittadini A, Sgambato A. Increased expression of CD133 and reduced dystroglycan expression are strong predictors of poor outcome in colon cancer patients. *J Exp Clin Cancer Res* 2012;31:71.

50. 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* 2012;29:2849-57.

51. Ying X, Wu J, Meng X, Zuo Y, Xia Q, Chen J, Feng Y, Liu R, Li L, Huang W. AC133 expression associated with poor prognosis in stage II colorectal cancer. *Med Oncol* 2013;30:356.

52. Zhou F, Mu YD, Liang J, Liu ZX, Chen HS, Zhang JF. Expression and prognostic value of tumor stem cell markers ALDH1 and CD133 in colorectal carcinoma. *Oncol Lett* 2014;7:507-12.
53. Yamamoto S, Tanaka K, Takeda K, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Endo I. Patients with CD133-negative colorectal liver metastasis have a poor prognosis after hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2014;21:1853-61.
54. Oliver JA, Ortiz R, Melguizo C, Alvarez PJ, Gomez-Millan J, Prados J. Prognostic impact of MGMT promoter methylation and MGMT and CD133 expression in colorectal adenocarcinoma. *BMC Cancer* 2014;14:511.
55. Wang K, Xu J, Zhang J, Huang J. Prognostic role of CD133 expression in colorectal cancer: a meta-analysis. *BMC Cancer* 2012;12:573.
56. Chen S, Song X, Chen Z, Li X, Li M, Liu H, Li J. CD133 expression and the prognosis of colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* 2013;8:e56380.
57. Ding Q, Yoshimitsu M, Kuwahata T, Maeda K, Hayashi T, Obara T, Miyazaki Y, Matsubara S, Natsugoe S, Takao S. Establishment of a highly migratory subclone reveals that CD133 contributes

to migration and invasion through epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer. *Hum Cell* 2012;25:1-8.

58. Maeda S, Shinchu H, Kurahara H, Mataka Y, Maemura K, Sato M, Natsugoe S, Aikou T, Takao S. CD133 expression is correlated with lymph node metastasis and vascular endothelial growth factor-C expression in pancreatic cancer. *Br J Cancer* 2008;98:1389-97.

59. Viera AJ, Garrett JM. Understanding interobserver agreement: the kappa statistic. *Fam Med* 2005;37:360-3.

60. Yamamoto S, Tanaka K, Takeda K, Akiyama H, Ichikawa Y, Nagashima Y, Endo I. Patients with CD133-Negative Colorectal Liver Metastasis Have a Poor Prognosis After Hepatectomy. *Ann Surg Oncol* 2014.

61. 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 beta1-integrin signaling. *J Surg Res* 2012;175:278-88.

62. Gao W, Chen L, Ma Z, Du Z, Zhao Z, Hu Z, Li Q. Isolation and phenotypic characterization of colorectal cancer stem cells with organ-specific metastatic potential. *Gastroenterology* 2013;145:636-46.e5.
63. Viadana E, Au KL. Patterns of metastases in adenocarcinomas of man. An autopsy study of 4,728 cases. *J Med* 1975;6:1-14.
64. Urosevic J, Garcia-Albeniz X, Planet E, Real S, Cespedes MV, Guiu M, Fernandez E, Bellmunt A, Gawrzak S, Pavlovic M, Manges R, Dolado I, Barriga FM, Nadal C, Kemeny N, Batlle E, Nebreda AR, Gomis RR. Colon cancer cells colonize the lung from established liver metastases through p38 MAPK signalling and PTHLH. *Nat Cell Biol* 2014;16:685-94.
65. Hashimoto K, Aoyagi K, Isobe T, Kouhiji K, Shirouzu K. Expression of CD133 in the cytoplasm is associated with cancer progression and poor prognosis in gastric cancer. *Gastric Cancer* 2014;17:97-106.
66. Shimoizato O, Waraya M, Nakashima K, Souda H, Takiguchi N, Yamamoto H, Takenobu H, Uehara H, Ikeda E, Matsushita S, Kubo N, Nakagawara A, Ozaki T, Kamijo T. Receptor-type protein

tyrosine phosphatase kappa directly dephosphorylates CD133 and regulates downstream AKT activation. *Oncogene* 2014.