

平成 21 年 6 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19790277

研究課題名 (和文) 直腸癌における放射線化学療法後の病理学的評価法の確立

研究課題名 (英文) Pathological assessment of the rectal cancer with preoperative chemoradiation therapy

研究代表者

小嶋 基寛 (Kojima Motohiro)

国立がんセンター(研究所及び東病院臨床開発センター)・臨床腫瘍病理部・室長

研究者番号：30338470

研究成果の概要：

放射線化学療法後に外科的切除される症例の病理組織学的評価判定基準を作成する目的で放射線化学療法後に切除された直腸癌症例の残存腫瘍面積を総面積、固有筋層もしくはそれより内側と固有筋層を超える成分に分けて計測した結果、固有筋層を超える残存腫瘍面積が再発と最も関連した。放射線化学療法後の病理組織判定においては場所を考慮した評価が重要であることが分かった。

次に放射線化学療法抵抗性と関連するとされているがん性幹細胞マーカーである CD133 の免疫組織学的発現を検討した。CD133 発現は放射線化学療法が施行された症例で発現がより強く、無治療症例及び放射線化学療法後症例のいずれにおいても予後不良因子であった。上記より、CD133 発現が患者予後に影響することが判明した。また、CD133 の発現が放射線化学療法後症例で強く見られることから、治療抵抗性に関わり、放射線化学療法後の患者予後予測に有用であると考えられた。

一方、CD133 のがん性幹細胞マーカーとしての正当性をヒト大腸癌細胞株を用いて検討したが、CD133 陰性細胞分画から CD133 陽性細胞と陰性細胞が出現した。すなわち、CD133 陰性細胞もがん性幹細胞の特徴である多分化能を有する結果となり、ヒト大腸癌細胞株において CD133 はがん性幹細胞マーカーとなる根拠は得られなかった。

結論

1. 放射線化学療法後の組織学的評価判定においては残存腫瘍の場所を考慮した評価が重要である。
2. CD133 発現は放射線化学療法抵抗性に関わる可能性があり、放射線化学療法後の予後予測や病理組織評価判定に有用である。
3. CD133 陽性細胞は大腸がん細胞株においてがん性幹細胞マーカーとなる根拠を認めなかった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,000,000	0	2,000,000
2008 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	390,000	3,690,000

研究分野：基礎医学

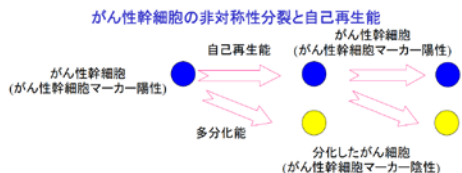
科研費の分科・細目：人体病理学

キーワード：癌、病理学

### 1. 研究開始当初の背景

病理組織学的な治療効果判定法を確立することにより、これから増加すると考えられる術前治療された標本の適切な病理学的評価が可能になるだけでなく、新しい治療法の効果判定のためにもきわめて重要と考えられる。がん治療後の病理学的な効果判定方法としてわが国ではこれまで一般に大星・下里分類が用いられている(大星他、1967)。大星・下里分類を基にした病理組織学的評価法では術前加療(放射線療法、放射線化学療法、または化学療法)後に切除された病理標本において、生存しているがん細胞の量をもともとがんが治療前に存在したと仮定される組織量に対する比率として判定している。一方で形態測定を利用した、残存腫瘍面積の絶対的評価は行われていない。形態測定を詳細に行う事により、腫瘍の再発や予後に影響する大きさや残存腫瘍部位が分かり、新しい治療効果判定につながると考えた。また近年、がん性幹細胞が治療抵抗性と関わり、がん移植モデルに治療を加えた組織において増加していると報告されている。がん性幹細胞は通常の体性幹細胞と類似した性質を有し、非対称性分裂を行い、がん性幹細胞自身を自己再生し、また分化した細胞も産生する(Figure-1)。がん性幹細胞や体性幹細胞は適所(ニッチ)を形成してその部分に多く存在するとされる。がん性幹細胞マーカー陽性細胞は非対称性分裂を行いマーカー陽性細胞と陰性細胞を産生するが、マーカー陰性細胞からは陽性細胞は出現しないと考えられている。

(Figure-1)

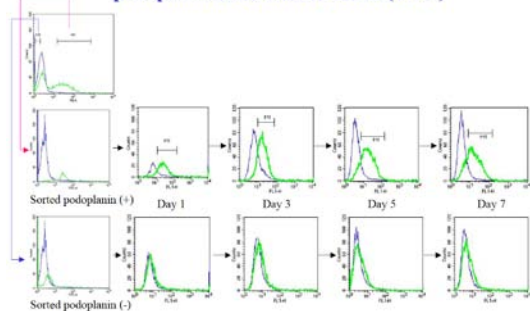


本検討と並列して我々は podoplanin が A431 のがん性幹細胞マーカーであると報告しているが、その例を示す(Figure-2)。ヒト扁平上皮癌細胞株 A431 には podoplanin 陽性細胞と陰性細胞が存在する。Podoplanin 陽性細胞分画を flowcytometry によって採取、培養すると Podoplanin 陽性細胞と陰性細胞が出現する(赤矢印)。一方で podoplanin 陰

性細胞分画を培養しても podoplanin 陰性細胞しか出現しない(青矢印)。よって podoplanin 陽性細胞はがん性幹細胞の特徴の一つを満たしていることになる。さらに、免疫不全マウスに移植した際、少数の細胞でも幹細胞マーカー陽性細胞は腫瘍を形成し、元の腫瘍に類似した形態を呈すること(造腫瘍能、自己再生能)、薬剤抵抗性があること、高いコロニー形成能を有することなどの特徴を満たしておりがん幹細胞マーカーであると報告した。

(Figure-2)

単離した podoplanin 陽性細胞および陰性細胞における podoplanin 発現の経時的变化 (A431)



がん性幹細胞マーカーを免疫染色にて検討することで、実際の生体でのがん幹細胞の分布や放射線化学療法後の変化を知ることができ、治療効果判定に用いることができる可能性がある。

### 2. 研究の目的

#### (1) 放射線化学療法後残存腫瘍面積とその部位に関する検討

新しい病理学的治療効果の判定法を検討する目的で上記を行った。

#### (2) 術前無治療ヒト大腸癌組織におけるがん幹細胞マーカーCD133 発現の検討

治療抵抗性に関わるがん性幹細胞マーカーの発現と臨床病理像を検討する目的で上記を行った。

#### (3) 術前無治療症例と術前放射線化学療法症例のけるがん性幹細胞マーカー CD133 発現の比較検討

治療抵抗性に関わるがん性幹細胞マーカーの発現が放射線化学療法後にどのように変化するかを検討する目的で上記を行った。

#### (4) CD133 のがん幹細胞マーカーとしての妥当性の検討

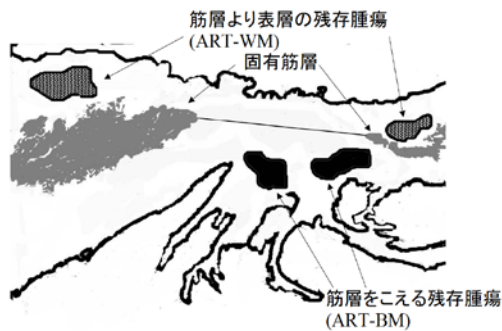
CD133 陽性細胞がヒト大腸癌細胞株においてがん性幹細胞マーカーとしての定義を満たすかを確認し、がん性幹細胞と放射線化学療法抵抗性の関連を示す目的で上記を行った。

### 3. 研究の方法

#### (1) 放射線化学療法後残存腫瘍面積とその部位に関する検討

術前に一定の放射線化学療法をされた後、一定期間で同一の手術手技で切除された 43 症例において残存腫瘍面積 (area of residual tumor: ART) を計測した。計測は総残存腫瘍面積 (total ART: T-ART)、固有筋層もしくはより表層の残存腫瘍面積 (ART within muscular layer: ART-WM)、固有筋層を越える残存腫瘍面積 (ART beyond muscular layer: ART-BM) をそれぞれ計測し患者予後と関連する残存腫瘍の大きさと部位を検討した (Figure 1)。AX80T 顕微鏡及び DP70 デジタルカメラ (オリンパス、東京) を用いて残存腫瘍の最大断面の組織像を撮影し、形態測定ソフト (WinRoof, Mitani Corporation、福井) を用いて ART を測定した。2mm 以上はなれているがん胞巣は別個に計測し固有筋層の下縁もしくは筋層を結ぶ線の上で ART-WM と ART-BM を分けた。

(Figure 1)



#### (2) 術前無治療ヒト大腸癌組織におけるがん幹細胞マーカー CD133 発現の検討

当施設で 1997-1998 に外科的に切除された術前無治療大腸がん 189 症例において、大腸癌の幹細胞マーカーと報告されている CD133 発現を免疫組織学的に検討した。臨床病理学的所見との相関及び発現部位を検討することで、無治療状態のヒト大腸癌組織におけるがん幹細胞マーカーの発現を検討した。

#### (3) 術前無治療症例と術前放射線化学療法症例のけるがん幹細胞マーカー CD133 発現の比較検討

術前無治療ヒト直腸癌組織 49 症例と (1) で用いた 43 症例において CD133 発現を比較検討した。放射線化学療法後の CD133 陽性細胞の変化を推測し、放射線化学療法後の患者にお

ける CD133 発現が患者再発と関連するかを検討することで放射線化学療法抵抗性との関連を検討した。

#### (4) CD133 のがん幹細胞マーカーとしての妥当性の検討

ヒト大腸癌のがん性幹細胞マーカーと報告されている CD133 発現を大腸がん細胞株において flowcytometry を用いた検討を行い、その発現を検討した。次に CD133 陽性細胞及び CD133 陰性細胞を採取し、CD133 陽性細胞から陽性細胞と陰性細胞が出現し、CD133 陰性細胞からは CD133 陽性細胞が出現しないことを確認する検討を行った。

### 4. 研究成果

#### (1) 放射線化学療法後残存腫瘍面積とその部位に関する検討

T-ART, ART-WM, ART-BM いずれも臨床病理像とよく相関することが示された。これらは、ART は臨床病理像とよく相関する重要な因子であることを示す (Table 1, 2)。さらに、予後の検討において病理組織学的リンパ節転移と、ART-BM が患者再発に関わることが示された。このことから、大腸癌の放射線化学療法効果判定においては、筋層を越える残存腫瘍の面積評価が重要であり、この成分は再発により強く関わる重要な残存腫瘍部位であることが示された。

Table 1. Patient Characteristics AND T-ART

characteristics	number	T-ART	P value
cT	cT2 10	16.8±23.1	0.05
	cT3, 4 33	66.9±77.6	
cN	cN0 26	33.6±54.3	0.01
	cN 1, 2 17	88.3±83.9	
ypT	ypT 1, 2 20	15.4±28.9	0.01>
	ypT3 23	89.8±80.3	
ypN	ypN0 30	94.2±79.5	0.02
	ypN 1, 2 13	38.3±62.4	
Tumor down stage	present 21	25.4±49.2	0.01>
	absent 22	83.6±79.3	
Lymphovascular invasion	present 17	94.3±86.6	0.01>
	absent 26	29.7±46.5	
Perineural invasion	present 8	155.9±89.4	0.01>
	absent 35	32.2±42.5	
Dworak grade of regression	Grade 0-2 28	83.8±74.8	0.01>
	Grade 3,4 15	1.8±3.8	

ART, area of residual tumor; T-ART, total area of residual tumor; IW-ART, intrarectal wall ART; P-ART, periadipose area of residual tumor; cT, clinical T stage; cN, clinical N stage; ypT, pathological T stage; ypN, pathological N stage.

Table 2. Patient Characteristics AND ART-WM, ART-BM

	number	ART-WM	P value	ART-BM	P value
cT	cT2 10	16.5±22.9	0.07	0.24±0.76	0.17
	cT3, 4 33	48.2±52.9		18.6±41.4	
cN	cN0 26	27.2±39.6	0.02	6.4±17.4	0.08
	cN 1, 2 17	61.7±56.2		26.5±53.5	
ypT	ypT 1, 2 21	14.7±28.4	0.01>	0	0.01
	ypT3 22	65.9±52.5		28.1±48.3	
ypN	ypN0 30	32.9±53.0	0.11	5.4±15.6	0.01
	ypN 1, 2 13	59.1±34.6		35.0±59.5	
Tumor down stage	present 21	24.2±47.2	0.03	1.2±5.0	0.02
	absent 22	56.7±46.9		26.9±48.8	
Dworak grade of regression	Grade 0-2 28	61.8±49.7	0.01>	22.1±44.2	0.06
	Grade 3,4 15	1.8±3.8		0	
Lymphovascular invasion	present 17	66.1±51.7	0.01>	28.2±55.2	0.05
	absent 26	24.3±40.7		5.3±11.7	
Perineural invasion	present 8	105.6±40.0	0.01>	50.3±73.3	0.01>
	absent 35	26.0±38.2		6.2±14.6	

ART-WM, area of residual tumor within muscular layer; ART-BM, area of residual tumor beyond muscular layer; cT, clinical T stage; cN, clinical N stage; ypT, pathological T stage; ypN, pathological N stage.

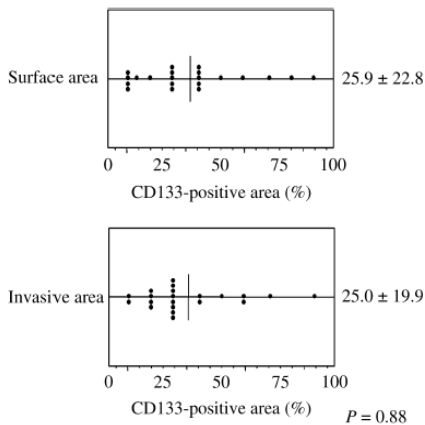
	n	Disease-free survival	
		5 year survival	P value
cT			
cT1,2	10	60.0%	0.31
cT3,4	33	65.5%	
cN			
cN0	26	70.5%	0.17
cN1,2	17	52.6%	
ypT			
ypT0,1,2	20	74.4%	0.15
ypT3	23	52.6%	
ypN			
ypN0	30	74.8%	0.03
ypN1,2	13	37.9%	
Down stage			
positive	22	73.2%	0.15
negative	21	53.7%	
Dworak grade of regression			
Grade 0-2	28	59.8%	0.30
Grade 3,4	15	65.0%	
T-ART			
>55.2mm <sup>2</sup>	29	54.10%	0.27
≤55.2mm <sup>2</sup>	14	64.30%	
ART-WM			
>40.8mm <sup>2</sup>	15	53.20%	0.37
≤40.8mm <sup>2</sup>	28	68.60%	
ART-BM			
>14.3mm <sup>2</sup>	33	37.50%	0.02*
≤14.3mm <sup>2</sup>	10	70.60%	

cT, clinical T stage; ypT, pathological T stage; cN, clinical N stage; ypN, pathological N stage. T-ART: total area of residual tumor, ART-WM: area of residual tumor within muscular layer, ART-BM: area of residual tumor beyond

## (2) 術前無治療ヒト大腸癌組織におけるがん幹細胞マーカーCD133 発現の検討

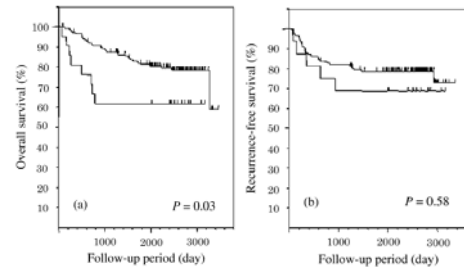
CD133 のヒト大腸癌組織の表層部と浸潤部における発現を検討した (Figure 5)。CD133 の発現は腫瘍内にびまん性に認められ、腫瘍の浸潤部と表層部において発現の違いは認められなかった。上記から適所を作って存在するがん性幹細胞のマーカーとしての特徴は確認されなかった。

(Figure 5)



その一方、CD133 陽性症例は陰性症例と比較して再発率に差を認めないが、予後に有意差を認めることが分かった。以上から、CD133 の再発後の放射線化学療法抵抗性が予後に関与し、再発自体には影響しない可能性が考えられた (Figure 6)。

(Figure 6)

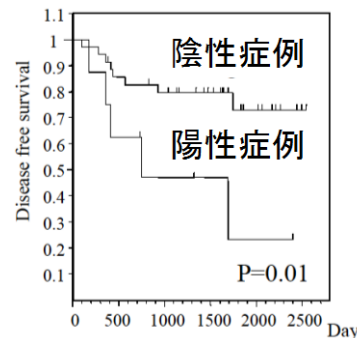


## (3) 術前無治療症例と術前放射線化学療法症例のけるがん幹細胞マーカー CD133 発現の比較検討

術前放射線化学療法後に外科的切除された直腸癌症例と術前無治療で外科的に切除された症例において CD133 発現の比較検討を行った (Table 1, Figure 7)。

	術前放射線化学療法症例		術前無治療症例		P value
	頻度	症例数	頻度	症例数	
CD133 陽性症例	18.6%	(8/43)	4.1%	(2/49)	0.03

(Figure 7)

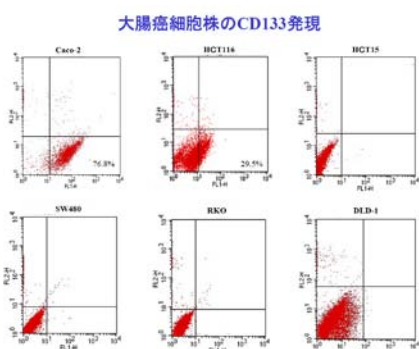


CD133 発現は術前放射線化学療法症例において有意に発現頻度が高く、また術前放射線化学療法症例において CD133 陽性症例は無病再発期間が有意に短かった。これらの結果から、CD133 が放射線化学療法後に残存している可能性を示しており、放射線化学療法抵抗性と関わる可能性がさらに強く示唆された。

## (4) CD133 のがん幹細胞マーカーとしての妥当性の検討

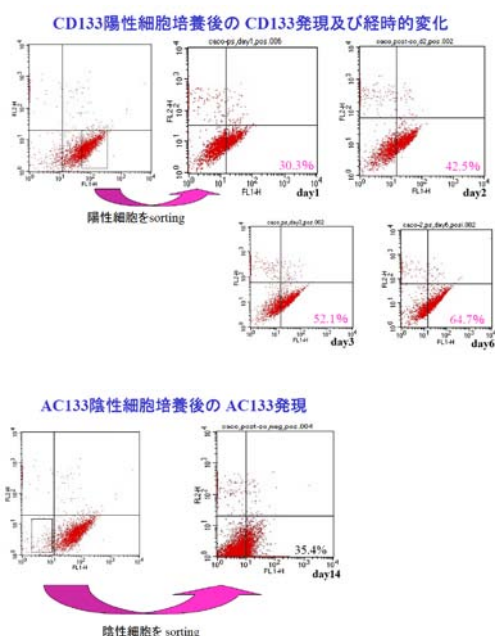
大腸癌細胞株において CD133 の発現を検討した。検討した 6 細胞株のうち Caco-2 と HCT116 において CD133 陽性細胞分画が認められた (Figure-8)。

(Figure-8)



次に両細胞株から CD133 陽性細胞分画を採取、培養すると CD133 陽性細胞と陰性細胞が出現し、経時的に CD133 陽性細胞が増加することが分かった。一方で CD133 陰性細胞を採取培養しても CD133 陽性細胞が出現することが分かり、Caco2 及び HCT116 において CD133 はがん性幹細胞の特徴を満たさないことが分かった (Figure-9)。

(Figure-9)



### 結論

1. 放射線化学療法後の組織学的評価判定においては残存腫瘍の場所を考慮した評価が重要である。
2. CD133 発現は放射線化学療法抵抗性に関わる可能性があり、放射線化学療法後の予後予測や病理組織評価判定に有用である。
3. CD133 陽性細胞は大腸がん細胞株においてがん性幹細胞マーカーとする根拠は確認されなかった。

### 現在

- (1) 放射線化学療法後残存腫瘍面積の検討
- (3) 術前無治療症例と術前放射線化学療法症例のけるがん幹細胞マーカー CD133 発現の比較検討

において論文を作製中である。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕 (計 2 件)

① 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, 99(8), 1578-1583, 2008, 査読有。

② Atsumi N, Ishii G, Kojima M, Sanada M, Fujii S, Ochiai A, Podoplanin, a novel marker of tumor-initiating cells in human squamous cell carcinoma A431. Biochem Biophys Res Commun, 373(1), 36-41, 2008, 査読有

〔学会発表〕 (計 2 件)

① 小嶋 基寛、大腸癌における CD133 発現とその意義、日本癌学会総会、2009 年 10 月 1 日、パシフィコ横浜

② 小嶋 基寛、大腸癌における CD133 発現とその意義、日本病理学会総会、2009 年 5 月 9 日、京都国際会議場

〔図書〕 (計 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

出願年月日 :

国内外の別 :

○取得状況 (計◇件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小嶋 基寛 (KOJIMA MOTOHIRO)

国立がんセンター(研究所及び東病院臨床開発センター)・臨床腫瘍病理部・室長

研究者番号:

30338470

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:







(7) ○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○  
○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

5. 主な発表論文等  
(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

- ① 学振太郎、半蔵門一郎、学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ② 学振太郎、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無
- ③ 学振花子、論文名、掲載誌名、巻、最初と最後の頁、発表年(西暦)、査読の有無

〔学会発表〕(計5件)

- ①
- ②
- ③

〔図書〕(計2件)

- ①
- ②

[産業財産権]

○出願状況 (計□件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

http://○○○○○○○○○○○○○○○○○○○○

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

学振 太郎 (GAKUSHIN TARO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

### (2) 研究分担者

学振 花子 (GAKUSHIN HANAKO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 次郎 (GAKUSHIN JIRO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

学振 三郎 (GAKUSHIN SABURO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：

### (3) 連携研究者

学振 四郎 (GAKUSHIN SHIRO)  
○○大学・大学院理工学研究科・教授  
研究者番号：