

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24592009

研究課題名(和文)大腸癌肝転移巣における癌幹細胞

研究課題名(英文)Cancer stem cell in colorectal liver metastasis

研究代表者

田中 邦哉(TANAKA, Kuniya)

横浜市立大学・医学(系)研究科(研究院)・客員教授

研究者番号：10295503

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：1998年～2008年までに当科で切除術を施行した大腸癌肝転移症例103例を対象とし、CD44、CD133の発現を免疫染色を用い検討した。また、浸潤能、増殖能、抗癌剤耐性能を評価するためMIB-1、E-cadherin、ABC-G2の発現も検討した。CD44の発現率は58.7%で、CD133の発現は44.6%であった。肝転移巣におけるCD133の発現は独立予後規定因子であった(HR 0.320, p=0.0016)。肝転移巣CD133陰性群は有意にMIB-1 indexが高く(p=0.003)、E-cadherinの発現が低かった(p=0.001)。

研究成果の概要(英文)：The CD44-positive rate in primary lesions and L-Mets was 41.4 and 58.7 %, respectively. There was no correlation of CD44 expression between primary lesions and L-Mets ($r = 0.250$, $p = 0.071$). The CD133-positive rate in primary lesions and L-Mets was 53.6 and 44.6 %, respectively. There was no correlation of CD133 expression between primary lesions and L-Mets ($r = 0.219$, $p = 0.135$). In the CD133-negative group, the MIB-1 index was significantly higher than in the CD133-positive group (61.6 vs. 46.3 %, $p = 0.003$), and E-cadherin expression was significantly lower in the CD133-negative group compared with the CD133-positive group (29.3 vs. 46.8 %, $p = 0.001$). Absence of CD133 expression in L-Mets correlated with poor overall survival ($p = 0.006$), and multivariate regression analysis showed that it was an independent marker for poor survival (hazard ratio 0.320, $p = 0.0016$).

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌幹細胞 大腸癌肝転移 CD133 CD44 E cadherin

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は近年増加の一途を辿っており、その予後規定因子である肝転移を制御することが重要な課題となっている。また一方で、癌幹細胞：Cancer Stem Cell(CSC)という概念が広まっており、大腸癌においても数多くの研究がなされ、様々な知見が得られているが、予後規定因子である肝転移巣においては、CSCの研究はほとんどなされていない。

2. 研究の目的

本研究の目的は大腸癌肝転移巣と CSC との関係进行研究し、明らかにすることにより、新規治療薬の開発につなげ、大腸癌肝転移の予後を改善することである。

3. 研究の方法

(1) 大腸癌肝転移巣における CSC マーカー CD133、CD44 の発現と臨床病理学的因子との関係について検討する。また、CD133 の発現と癌の分子機構との関係を解明するため、(2) CD133 高発現群と低発現群での発現タンパクを網羅的に解析し、候補蛋白を選出、ネットワーク解析により、関連 Signaling pathway を同定する。(3) 大腸癌肝転移巣先進部の Growth Pattern と CSC マーカー、予後との関係について検討する。

4. 研究成果

(1) 大腸癌肝転移巣における CSC マーカー CD133、CD44 の発現と臨床病理学的因子との関係

1998 年～2008 年までに当科で切除術を施行した大腸癌肝転移症例 103 例を対象とし、CD44、CD133 の発現を免疫染色を用い検討した。また、浸潤能、増殖能、抗癌剤耐性を評価するため MIB-1、E-cadherin、ABC-G2 の発現も検討した。103 例中 44 例は原発巣での評価も行った。

結果：CD44 の発現率は原発巣で 41.4%、転移巣で 58.7%であった。原発巣と転移巣で発現に marginal な相関を認め (r=0.250, p=0.071)。CD133 の発現は原発巣で 53.6%、転移巣で 44.6%で相関を認めなかった。肝転移巣における CD133 の発現は独立予後規定因子であった (HR 0.320, p=0.0016) (図 1)。肝転移巣 CD133 陰性群は有意に MIB-1 index が高く (p=0.003)、E-cadherin の発現が低かった (p=0.001) (図 2)。

(2) CD133 高発現群と低発現群における発現蛋白の網羅的解析

組織からのサンプリング：肝転移切除検体から凍結切片を作成し、LMD(Laser captured microdissection、Leica LMD 7000)にて癌部のみをサンプリングした。対象検体は、2010～2011 年に当施設で切除された大腸癌肝転移巣切除例 20 例。免疫組織化学にて CD133 高発現群 10 例と低発現群 10 例を選出した。

発現蛋白の網羅的解析：LMD サンプルから蛋白を抽出し、液体クロマトグラフィーにて抽出蛋白を分離、質量分析器にて発現蛋白を同定、定量した (LC FT-LTQ MS)。

候補蛋白の選出：発現蛋白の網羅的解析を施行し、1681 種類 (up regulation:123、down:171)の蛋白を同定した。同定された発現蛋白に対し、ネットワーク解析 (KM データ) を施行し、CD133 の肝転移巣における発現と関連する Signaling pathway を解析した結果、EMT 関連 Pathway (E-cadherin) と Hypoxia 関連 Pathway (HIF 1) が同定された。プロテオーム解析で得られた本結果の裏付けを行うため、大腸癌肝転移巣先進部の Growth Pattern と CSC マーカー、EMT 関連マーカー (E-cadherin) との関連を検討することとした。

図 1 CSC マーカー発現と予後

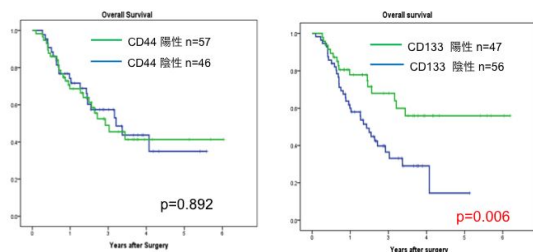
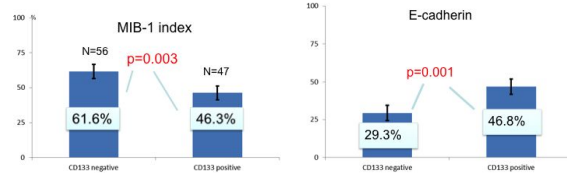


図 2 MIB-1 index と E-cadherin 発現



(3) 大腸癌肝転移巣先進部の Growth Pattern と CSC マーカー、予後との関係

大腸癌肝転移切除例 111 例を解析対象とした。腫瘍辺縁部の growth pattern (GP) を、腫瘍と肝組織の間に線維層を認める Desmoplastic GP 群 (D 群) とそれ以外の Non-desmoplastic GP 群 (ND 群) の 2 群に分類し臨床病理学的因子を比較検討した (図 3)。さらに 111 例中 94 例に対して、腫瘍辺縁部の MIB-1 index、E-cadherin、CD133、CD44 の免疫組織学的染色を行い異なる GP を形成する関連因子を検討した。

結果：111 例中、D 群は 43 例 (38.7%)、ND 群は 68 例 (61.3%) であった。2 群の背景を比較すると、術前因子では D 群で腫瘍径 (23mm vs. 32.5mm, P=0.005) が小さく、CEA 値が低値 (P<0.05) であった。切除前化学療法 (化療) 施行例は 16 例 (37%) vs. 29 例 (43%) で差はなく、奏効率にも差はなかった (22% vs. 27%)。5 年無再発率は、D 群 41.5%、ND 群 23.7% と D 群で良好であり (P<0.05)、また 5 年生存率も D 群 59.9%、ND 群 44.5% と

D 群で良好であった (P<0.05、図3)。また Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析による予後因子は、両葉転移 (P<0.01) と Desmoplastic GP (P<0.05) の 2 因子であった。

(2)腫瘍辺縁部の MIB-1 index は、D 群 57% ± 29%、ND 群 51% ± 25% と差はなく、E-cadherin も両群間で差はなかった (31% ± 25% vs. 40% ± 28%)。また癌幹細胞のマーカーである CD133 陽性率 (58% vs. 41%)、CD44 陽性率 (66% vs. 54%) にも両群間で差を認めなかった (表 1)。

図 3 Tumor growth pattern

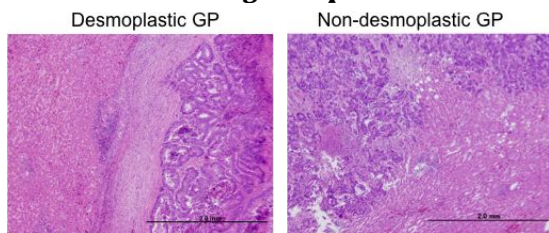


図 4 Growth pattern と予後

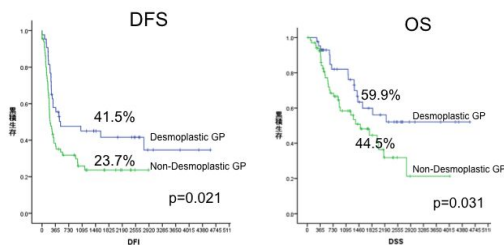


表 1 Growth pattern と CSC マーカー

Variables	Desmoplastic GP (n=38)	Non-Desmoplastic GP (n=56)	P value
CD133			
positive *	22 (58%)	23 (41%)	0.082
negative	16 (42%)	33 (59%)	
CD44			
positive *	25 (66%)	30 (54%)	0.167
negative	13 (54%)	26 (46%)	

以上の結果から肝転移巣の CD133 陰性は予後不良因子であり、癌細胞の増殖、浸潤に関連している可能性が示唆された。大腸癌肝転移巣の Tumor growth pattern において、との関連は認められなかった。Desmoplastic pattern は有意に予後良好であったが、CSC マーカー (CD133, CD44) との関連は認められなかった。

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 14 件)

Fluorescence-Guided Surgery of Liver Metastasis in Orthotopic Nude-Mouse

Models. Murakami T, Hiroshima Y, Tanaka K et al. (7 人中 2, 5 番目) PLoS One. 2015 Oct 1;10(10) 査読有

Therapeutic efficacy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R on human colorectal cancer liver metastasis in orthotopic nude-mouse models. Murakami T, Hiroshima Y, Zhao M, Zhang Y, Chishima T, Tanaka K et al. (9 人中 2, 5 番目) Oncotarget. 2015 Sep 7. 査読有

ALPPS: Short-term Outcome and Functional Changes in the Future Liver Remnant.

Tanaka K, Endo I. Ann Surg. 2015 Aug;262(2):e88-9. doi:

10.1097/SLA.0000000000000665. 査読有

Low infiltration of peritumoral regulatory T cells predicts worse outcome following resection of colorectal liver metastases. Nakagawa K, Tanaka K et al. (7 人中 2 番目) Ann Surg Oncol. 2015 Jan;22(1):180-6. 査読有

Improved disease-free survival and overall survival after fluorescence-guided surgery of liver metastasis in an orthotopic nude mouse model. Murakami T, Hiroshima Y, Zhang Y, Bouvet M, Chishima T, Tanaka K, Endo I, Hoffman RM. J Surg Oncol. 2015 Aug;112(2):119-24. 査読有

Photoimmunotherapy Inhibits Tumor Recurrence After Surgical Resection on a Pancreatic Cancer Patient-Derived Orthotopic Xenograft (PDOX) Nude Mouse Model. Hiroshima Y, Tanaka K et al. (12 人中 1, 9 番目) Ann Surg Oncol. 2015 Apr 17. [Epub ahead of print] 査読有

Fluorescence-guided surgery, but not bright-light surgery, prevents local recurrence in a pancreatic cancer patient derived orthotopic xenograft (PDOX) model resistant to neoadjuvant chemotherapy (NAC). Hiroshima Y, Tanaka K et al. (13 人中 1, 9 番目) Pancreatology. 2015 May-Jun;15(3):295-301. 査読有

Preliminary results of 'liver-first' reverse management for advanced and aggressive synchronous colorectal liver metastases: a propensity-matched analysis. Tanaka K, Murakami T, Matsuo K, Hiroshima Y, Endo I, Ichikawa Y, Taguri M, Koda K. Dig Surg. 2015;32(1):16-22. 査読有

Randomized clinical trial of peritoneal lavage for preventing surgical site infection in elective liver surgery. Tanaka K, Matsuo K, Kawaguchi D, Murakami T, Hiroshima Y, Hirano A, Sato S, Endo I, Taguri M, Koda K. J Hepatobiliary

Pancreat Sci. 2015 Jun;22(6):446-53. 査読有

Efficacy of tumor-targeting Salmonella typhimurium A1-R in combination with anti-angiogenesis therapy on a pancreatic cancer patient-derived orthotopic xenograft (PDOX) and cell line mouse models. Hiroshima Y, Tanaka K et al.(18人中1, 13番目) Oncotarget. 2014 Dec 15;5(23):12346-57. 査読有

Maximal debulking liver resection as a beneficial treatment strategy for advanced and aggressive colorectal liver metastases. Tanaka K, Murakami T, Yabushita Y, Hiroshima Y, Matsuo K, Endo I, Koda K. Anticancer Res. 2014 Oct;34(10):5547-54. 査読有

Patients with CD133-negative colorectal liver metastasis have a poor prognosis after hepatectomy. Yamamoto S, Tanaka K et al.(7人中2番目) Ann Surg Oncol. 2014 Jun;21(6):1853-61. 査読有

The modified Glasgow prognostic score as a predictor of survival after hepatectomy for colorectal liver metastases. Nakagawa K, Tanaka K et al.(7人中2番目) Ann Surg Oncol. 2014 May;21(5):1711-8. 査読有

Reversal of attachment to or invasion of major intrahepatic vessels by colorectal liver metastases according to prehepatectomy chemotherapy regimen. Tanaka K et al. (11人中1番目) Surgery. 2014 May;155(5):936-44. doi: 10.1016/j.surg.2013.12.030. Epub 2013 Dec 31. 査読有

〔学会発表〕(計6件)

Salmonella typhimurium A1-R effectively targets human-patient pancreatic tumorgrafts in nude mice. Ming Zhao, Matthew H. G. Katz, Jason B. Fleming, Atsushi Suetsugu, Yong Zhang, Ali Maawy, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman, Yukihiko Hiroshima *ASCO annual meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago, IL, USA.*

Salmonella typhimurium A1-R targets chemoresistant stem-like human pancreatic cancer cells. Yukihiko Hiroshima, Ming Zhao, Yong Zhang, Ali Maawy, Mohamed K. Hassanein, Atsushi Suetsugu, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman *ASCO annual meeting, May 31-June 4, 2013, Chicago, IL, USA.*

Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R on

chemoresistant stem-like human pancreatic cancer cells

Yukihiko Hiroshima, Ming Zhao, Yong Zhang, Ali Maawy, Mohamed Hassanein, Atsushi Suetsugu, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman. *AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC, USA.*

Fluorescence-guided surgery for human-patient colon cancer tumorgrafts using a fluorophore-conjugated anti-CEA antibody Yukihiko Hiroshima, Ali Maawy, Yong Zhang, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman. *AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC, USA.*

Tumor-educated macrophages promote proliferation of human pancreatic cancer cells in vitro and in vivo Yukihiko Hiroshima, Masashi Momiyama, Mohamed Hassanein, Ali Maawy, Rhiana Menen, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman. *AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC, USA.*

Efficacy of Salmonella typhimurium A1-R treatment on human patient pancreatic tumorgrafts Yukihiko Hiroshima, Ming Zhao, Matthew H.G. Katz, Jason B. Fleming, Atsushi Suetsugu, Yong Zhang, Ali Maawy, Takashi Chishima, Kuniya Tanaka, Michael Bouvet, Itaru Endo, Robert M. Hoffman. *AACR annual meeting, April 6-April 10, 2013, Washington, DC, USA.*

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.ycusurg2.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

田中 邦哉 (TANAKA, Kuniya)
横浜市立大学・医学研究科・客員教授
研究者番号: 10295503

(2)研究分担者

平野 久 (HIRANO, Hisashi)
横浜市立大学・生命科学研究科・特任教授
研究者番号：00275075

廣島 幸彦 (HIROSHIMA, Yukihiro)
横浜市立大学・医学研究科・客員研究員
研究者番号：60718021 (平成25年より研究分担者)

(3)連携研究者