

主論文の要旨

**Epithelial to Mesenchymal Transition Might be Induced
via CD44 Isoform Switching in Colorectal Cancer**

〔 大腸癌において上皮間葉転換は CD44
アイソフォームスイッチにより誘導される 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 消化器外科学分野

(指導：小寺 泰弘 教授)

間下 直樹

【背景】

上皮間葉転換(Epithelial to mesenchymal transition; EMT)は癌の浸潤や転移に関与しており、近年、癌幹細胞マーカーの1つである CD44 との相関が報告されている。乳癌においては、CD44 standard(以下、CD44s)と CD44 variant(以下、CD44v)の両者間におけるアイソフォームスイッチが EMT の制御に関与していると報告され、また、肝細胞癌においては CD44s の発現と予後との相関が指摘されている。しかしながら、大腸癌における CD44 アイソフォームスイッチが EMT に与える影響は明らかではない。

【対象及び方法】

大腸癌細胞株 14 種と教室の大腸癌切除検体 150 例を用いて、上皮系マーカー(E-cadherin)、間葉系マーカー(vimentin)、CD44s、CD44 variant9(以下、CD44v9)の発現を定量 PCR 法にて測定した。vimentin / E-cadherin の発現比と CD44s / CD44v9 の発現比をそれぞれ「EMT status」、「CD44 status」と定義した。また、EMT status と CD44 アイソフォームスイッチとの相関を検討し、臨床病理学的因子、予後との関係を解析した。さらに、CD44 高発現である間葉系大腸癌細胞株において CD44 発現抑制を行い、EMT と細胞機能に与える影響を検討した。

【結果】

大腸癌細胞株を、E-cadherin 発現優位の上皮系群、vimentin 発現優位の間葉系群、どちらにも属さない中間群の 3 群に分類した(Figure 1A)。CD44s、CD44v9 の発現を比較すると、間葉系群では CD44v9 発現が低く、CD44s 発現が相対的に高値であった(Figure 1B)。EMT status と CD44 status との間には有意な相関を認めた($r = 0.996$, $P < 0.001$; Figure 1C)。CD44 アイソフォームスイッチに関与する epithelial splicing regulatory protein 1(以下、ESRP1)発現は、CD44s 優位である間葉系細胞(RKO, COL-3-JCK, COLO320)において低値を示した(Figure 1D)。

間葉系大腸癌細胞株である COL-3-JCK を用いて、CD44 発現抑制による機能解析を行った。CD44 発現抑制により、間葉系マーカーである vimentin の発現が抑制された(Figure 2A)。細胞増殖能、遊走能、浸潤能はいずれにおいても、CD44 発現抑制により低下した(Figure 2B, C, D)。

大腸癌切除検体 150 例の癌部における E-cadherin、vimentin 発現より、EMT status を決定した。vimentin / E-cadherin 比の平均値 1.24 以下を上皮系群($n = 115$)、1.24 以上を間葉系群($n = 35$)として二分し、疾患特異的生存率を検討すると、間葉系群において有意に予後不良であった($P = 0.0085$; Figure 3A)。EMT status と臨床病理学的因子との関係では、病理学的壁深達度 T4(以下、pT4)、リンパ管侵襲、組織型(低分化もしくは粘液もしくは扁平上皮)の 3 因子が間葉系群と有意な相関を認めた(Table D)。次に、CD44s、CD44v9 発現から CD44 status を決定し、CD44s / CD44v9 比の平均値 0.059 以下を CD44 status 低値群($n = 114$)、0.059 以上を CD44 status 高

値群(n = 36)と二分して生存率を検討すると、CD44 status 高値群で有意に予後不良であった(P = 0.0251 ; Figure 3B). EMT status と CD44 status の間には有意な相関を認めた(r = 0.298, P = 0.0002 ; Figure 3C). 予後因子を検討すると、単変量解析では組織型(低分化もしくは粘液もしくは扁平上皮), pT4, 病理学的リンパ節転移陽性, リンパ管侵襲陽性, 静脈侵襲陽性, 同時性肝転移, CEA 5 ng/ml 以上, CA19-9 37 U/ml 以上, EMT status (間葉系群), CD44 status 高値が有意な予後因子であった. 多変量解析では pT4, 同時性肝転移, CA19-9 37 U/ml 以上, CD44 status 高値の 4 つが独立予後因子であった(Table II).

【考察】

他の消化器癌と比較して、大腸癌の治療成績は良好ではあるものの、遠隔転移あるいは局所進行大腸癌症例の予後は満足できるものではなく、新たな治療法の開発が求められている。特に、癌の浸潤や転移、抗腫瘍薬の治療抵抗性を鑑みれば、EMT、癌幹細胞の解明と治療への応用は有望であり、近年、大腸癌を含む様々な癌種において積極的な研究がなされている。

本研究では、大腸癌における EMT の臨床的意義を検討するために、上皮系、間葉系マーカーとして E-cadherin, vimentin 発現をそれぞれ測定し、利用した。過去の報告では、E-cadherin 高発現群は低発現群と比較して全生存率が良好であるとされ、E-cadherin 発現は予後予測因子と考えられている。本研究においては、間葉系群は上皮系群と比較して有意に予後不良であり、EMT status は腫瘍の壁深達度、リンパ管侵襲、組織型と有意な相関を認めていた。われわれは膵癌、胃癌における EMT status の有用性を報告してきたが、大腸癌においても臨床的に有用と考えられた。

一方、CD44 のスプライスバリエーションは、EMT の誘導に必要と考えられるようになってきた。特に、乳癌では CD44v から CD44s へのアイソフォームスイッチが EMT を介して腫瘍進展に関与し、また、肝細胞癌では CD44s が EMT を制御し、予後と相関すると報告されている。大腸癌において CD44s が有する役割は明らかではなく、本研究は大腸癌における CD44 アイソフォームスイッチが EMT の誘導に関与することを示した最初の報告である。大腸癌細胞株において、CD44 status と EMT status との間に有意な相関を認めた。また、間葉系大腸癌細胞において CD44 発現抑制を行うと、間葉系マーカーの発現が抑制され、機能解析で有意差を認めた。切除検体において、CD44 status 高値の患者は、低値の患者と比べて有意に予後不良で、EMT status と CD44 status の間に有意な相関を認めたことから、CD44 アイソフォームスイッチは EMT の誘導に関与し、大腸癌における予後因子として有用であることが示唆された。

【結語】

大腸癌において CD44 status は予後予測因子であり、CD44 のアイソフォームスイッチが EMT の誘導に関与している可能性が示唆された。EMT と CD44 アイソフォー

ムスイッチの相関を解析し、新規治療標的としての可能性を評価するため、さらなる研究が必要である。