



Expression profile of CD44s, CD44v6 and CD44v10 in localized prostate cancer: impact on prognostic outcomes following radical prostatectomy

Tei, Hiromoto

(Degree)

博士（医学）

(Date of Degree)

2015-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第6383号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1006383>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

学位論文の内容要旨

Expression profile of CD44s, CD44v6 and CD44v10 in localized prostate cancer: impact on prognostic outcomes following radical prostatectomy

限局性前立腺癌における CD44s, CD44v6, CD44v10 の臨床的意義

神戸大学大学院医学研究科外科系講座

腎泌尿器科学分野

指導教員： 藤澤正人 教授

鄭 裕元

【緒言】

幹細胞の概念が確立されるのは、1961年 Till と McCulloch による研究であり、1980年代になると Cancer Stem Cell の名を冠した論文が増加する。1997年に Dick 博士の白血病幹細胞の発見と癌細胞にも幹細胞ヒエラルキーがあるという仮説を端に、2000年代には癌幹細胞の研究が盛んになっている。この研究では、免疫不全マウスにヒト白血病細胞を移植し、一部の亜集団が高い生着率をもち、残りの集団がもたないことを明らかにした。この細胞表面形質は、正常幹細胞と同様で、癌に幹細胞の概念を取り込むことができた。これより後、Clark 博士によって乳癌細胞など固形腫瘍にも同様な幹細胞集団があることが証明された。癌幹細胞の概念は、癌発生のメカニズムを説明する上で重要な役割を担っていると考えられ、また、転移や治療においても重要な役割を持つものと考えられる。

一般的な抗癌剤による治療では、固形腫瘍の縮小が治療方針になり、腫瘍の大部分を占める癌幹細胞以外のガン細胞がターゲットになっている可能性がある。さらに、一部の癌幹細胞には薬剤耐性を獲得しているものもあると指摘されている。治療によって大部分のガン細胞を取り除いても、ごく少数の幹細胞が生き残っていれば再発しその時点で薬剤耐性を持った癌腫が増大していくと考えられる。このことから治療効果をためるためには癌幹細胞を同定し、癌増殖に関するメカニズムを解明が不可欠になる。癌幹細胞を同定する手法を確立することで癌幹細胞を標的として除去する手段の確立が期待でき、さらには転移や再発を始め有用な治療法となり得ると考えられる。

近年、前立腺癌においては CD44+, インテグリン $\alpha 2\beta 1$, CD133+ や Sca-1+ などが前立腺癌幹細胞の細胞表面形質と考えられている。しかし、これらの表面マーカーと臨床データを結びつけて検討された報告は乏しいのが現状である。また、これらの表面マーカーを臨床治療へ応用していく方法は、未だに確立していない。このことから前立腺癌幹細胞が前立腺癌の予後に与える影響に関して基礎研究を通じて検証する。これにより、予後に影響する癌細胞がさらに細かく分類可能となり、治療方針を決める大きな指針に成り得ると考えられる。本研究では、前立腺癌で前立腺全摘術を行った症例の臨床サンプルを用いて、前立腺癌幹細胞マーカーと考えられる CD44+ の variant に注目して予後との関連について検討する。

【対象と方法】

2007年から2010年の間に当院の泌尿器科で前立腺全摘術を施行した160例を対象とした。摘出した標本を前立腺の尖部から精囊まで 3mm 間隔で切断し、切除標本を評価し、外縁に腫瘍が露出している場合を断端陽性と定義した。前立腺全摘術後 2年間は 3ヶ月ごとに、その後は 6ヶ月ごとに受診してもらい PSA を

測定することで生化学的再発の有無を検討した。術後の PSA 最低値から 0.2ng/ml 以上の上昇が 2 回連続すれば生化学的再発と定義した。フォローアップ期間の中央値は 51 ヶ月 (6-76 ヶ月) であった。

臨床病理学的パラメータとして年齢、血清 PSA 値、病期分類、グリソンスコア、リンパ管浸潤、血管浸潤、神経周囲浸潤、精嚢浸潤、断端陽性の 9 項目、CD44 の standard form と variant exons として CD44v6 と CD44v10 の発現量と生化学的再発との関連に関して検討した。生存率に差があるかどうかを Kaplan-Meier 手法を用いて、その検定にはログランク検定を用いた。

前立腺組織 160 例の標本をホルムアルデヒド固定、パラフィン包埋組織の切片を CD44 の standard form、variant exons として CD44v6 と CD44v10 の三種類の抗体で免疫組織化学染色法を用いて評価した。

免疫染色の評価方法として広がりと強弱の 2 項目を数値化することで評価することとした。まず、広がりに関しては 0 (0%-5%), 1 (5%-25%), 2 (26%-75%), 3 (75%-100%) と 4 段階で評価し、強弱に関しては弱いものを 1 点に強いものを 3 点にして 3 段階で評価した。この 2 つの点数の合計をもとに 3 点以下を弱陽性、4 点以上を強陽性とした。

【結果】

まず、CD44s、CD44v6 と CD44v10 の発現レベルと臨床病理学的パラメータと比較したところ、CD44v6 の発現レベルが有意に血清 PSA 値レベルは、病理学的病期および精嚢浸潤と関連していた。

観察期間中に 160 人中 40 人 (25%) に生化学的再発を認めた。1 年、3 年、5 年無病生存率はそれぞれ 89.3%、76.8%、71.6% であった。この患者群で生化学的無増悪生存率を予測する因子を臨床病理学的パラメータと CD44s、CD44v6 と CD44v10 の発現パターンで解析を行った。Cox 比例ハザードモデルで单変量解析を行ったところ、血清 PSA 値、病期分類、グリソンスコア、精嚢浸潤、断端陽性と CD44v6 が関連する因子として導かれた。この 6 つの項目で多変量解析を行ったところ、血清 PSA 値、断端陽性、CD44v6 が生化学的再発を予測する独立因子として導き出された。

さらに多変量解析により導かれた 3 つの独立した危険因子の数に応じて 3 群に分類して検討した。危険因子を持っていなかった群は 42 人中で生化学的再発を認めた症例はなかった。危険因子を 1 つ持っていた群は 54 人中 9 人 (16.7%) で、危険因子を複数個持っていた群は 64 人中 31 人 (48.4%) で生化学的再発を認めた。この 3 群は有意差を認めていた。

【考察】

悪性腫瘍で外科的治療を受けた患者において臨床経過を正確に予測することは、適切な術後フォローアップスケジュールを決定するだけでなく、追加治療の必

要性を検討する意味においても非常に重要である。現在、前立腺癌においては前立腺全摘術後の生化学的再発を予測する臨床病理学的パラメータがいくつか報告されており、さらに複数の因子を用いて治療後の予後を予測するノモグラムを開発されてきている。しかしながら、今までの臨床病理学的パラメータだけでは限界もあり、前立腺癌に関連する分子マーカーの有用性が注目されている。

CD44 はヒアルロン酸をはじめとした細胞外マトリックスと結合する接着分子であり、リンパ球ホーミング、リンパ球活性化、細胞-細胞間接着及び細胞-基質間接着、細胞運動、癌細胞増殖・転移などに深く関与していると考えられている。その機能は発現レベルだけでなく、選択的スプライシングによるバリエントアイソフォームの発現や、糖鎖付加やリン酸化などによっても制御される。最近の研究では、選択的スプライシングによるバリエントアイソフォームの変化によって上皮間葉転換を誘導し、幹細胞様の挙動示すようになると考えられている。前立腺癌においても CD44 の重要性は注目されながらも予後指標として十分に検討されていない。従って、本研究では従来の臨床病理学的パラメータに加え、CD44s、CD44v6、および CD44v10 の発現レベルを調べた。その結果、CD44v6 の発現レベルは血清 PSA 高値、病期分類、精嚢浸潤と関連しており、前立腺癌の進展と関連している可能性が示唆された。

従来の予後因子と CD44 関連マーカーを生化学的再発との関連を検討したところ、单変量解析では、血清 PSA 値、病期分類、グリソンスコア、精嚢浸潤、断端陽性と CD44v6 が有意差を認めた。さらに多変量解析を行ったところ、血清 PSA 値、精嚢浸潤、CD44v6 発現が生化学的再発を予測する独立因子として同定された。このことから、CD44v6 の過剰発現は局所前立腺癌において前立腺全摘術後の予後を予測する有益なバイオマーカーになり得る可能性が示唆された。

さらに、術後の生化学的再発を予測するために、複数の予後指標を組み合わせて評価する方法を検討することが重要である。血清 PSA 値、精嚢浸潤、CD44v6 の 3 項目に関しては生化学的再発に関して有意差を認めなかった。すなわち、この 3 つの危険因子は同時評価をすることでより信頼性の高い予測を可能にするシステムの開発に寄与すると考えられた。

本研究にはいくつかの制限がある。はじめに、後ろ向き研究でありまた前立腺全摘術を行った患者にしてはサンプル数が 160 例と少ないことである。つぎに日本人と西洋人の間に有意差があることと外科医の能力によって影響が受けてしまうことである。最後に、CD44 の他のバリエントに関して検討していないことである。より明確に CD44 関連マーカーの重要性を示すために本研究で検討されていないバリエントの予後の意義を検討する必要がある。

結論としては従来の予後予測因子に加えて CD44v6 の過剰発現が生化学的再発を

予測する因子の一つになり得る可能性が示唆された。

| 論文審査の結果の要旨 | | | |
|-------------------------------|--|------|------|
| 受付番号 | 甲 第2498号 | 氏名 | 鄭 裕元 |
| 論文題目 Title of Dissertation | 限局性前立腺癌における CD44s、CD44v6、CD44v10 の臨床的意義 Expression profile of CD44s, CD44v6 and CD44v10 in localized prostate cancer: impact on prognostic outcomes following radical prostatectomy | | |
| 審査委員 Examiner | 主査 Chief Examiner | 白川利朗 | |
| | 副査 Vice-examiner | 林祥園 | |
| | 副査 Vice-examiner | 横崎 元 | |

(要旨は1,000字～2,000字程度)

限局性前立腺癌の術後、一定の割合で生化学的再発を認めるものの、その再発を正確に予測することは難しいのが現状である。この論文では、前立腺癌の生化学的再発を予測する新規のマーカーとなり得るものはないかを検討している。

新規のマーカーを検討する上で、CD44 が選択的スプライシングによる variant isoform の変化を介して細胞-細胞間接着、癌細胞の運動、分化、増殖・転移などに関与し、さらに上皮間葉転換を誘導し、幹細胞様の挙動を示すようになることが指摘されていることに注目し、CD44 に焦点を絞り検討を開始している。この CD44 は前立腺癌においても重要な予後因子である可能性を指摘されているものの、CD44 の variant isoform と前立腺癌の予後との関連は十分に検討されていない。この問題に対して、CD44 standard form, variant exons として CD44v6 と CD44v10 を合わせた 3 種類と、前立腺癌の臨床データで生化学的再発との関連を検討する研究を開始した。

2007 年から 2010 年の間に神戸大学医学部付属病院の泌尿器科で、術前内分泌療法を施行していない前立腺癌患者に対して根治的前立腺全摘除術を施行した 160 例を対象とした研究である。観察期間の中央値は 51 ヶ月 (6-76 ヶ月) であった。術後の PSA 最低値から 0.2ng/ml 以上の上昇が 2 回連続すれば生化学的再発と定義とした。前立腺全摘術後 2 年間は 3 ヶ月ごとに、その後は 6 ヶ月ごとに受診してもらい PSA を測定することで生化学的再発の有無を検討している。

臨床データとして年齢、血清 PSA 値、病期分類、グリソンスコア、リンパ管浸潤、血管浸潤、神経周囲浸潤、精嚢浸潤、断端陽性の 9 項目、と CD44s、CD44v6、CD44v10 を合わせた 12 項目と生化学的再発との関連を検討することが彼らの目的であった。CD44s、CD44v6、CD44v10 の発現量を調べる方法として、前立腺全摘術の摘出標本を免疫組織化学染色法する手法を選択している。

この研究の対象群では、観察期間中に 160 人中 40 人 (25%) に生化学的再発を認めていた。Cox 比例ハザードモデルで単変量解析を行い、血清 PSA 値、病期分類、グリソンスコア、精嚢浸潤、断端陽性と CD44v6 が生化学的再発を予測する因子として導いていた。この 6 項目で多変量解を行い、血清 PSA 値、断端陽性、CD44v6 の 3 項目が生化学的再発を予測する独立因子として導き出していた。

さらに多変量解析により導き出された 3 つの独立した危険因子の個数に応じて 3 群に分類し、生化学的再発をさらに予測できるかどうかを検討している。その結果は危険因子を持たない群では 42 人中 1 例も生化学的再発した症例は認めておらず、危険因子 1 つの群は 54 人中 9 人 (16.7%)、危険因子を複数個持つ群は 64 人中 31 人 (48.4%) と、危険因子の個数が増えるにつれて生化学的再発するリスクが高いとしている。この 3 つの危険因子を同時に評価することで生化学的再発を予測するより信頼度の高いシステムを開発していくことができるのではないかと検討していた。

さらに論文の中で、症例数が 160 例と十分でないこと、CD44 の他 variant isoform に関する検討していないことなどさらに検討すべき課題を指摘していた。その範囲の中ではあるが、従来の予後予測因子に加えて CD44v6 の過剰発現が生化学的再発を予測する因子の一つになり得る可能性を示唆している。

本研究によって、このように、限局性前立腺癌において CD44v6 の過剰発現が生化学的再発を予測する因子の一つになり得る可能性を示す重要な知見を得たものとして価値ある研究である。よって、本研究者は博士(医学)の学位を得る資格があると認める。