

Apoptosis, CD 44 は大腸癌の予後因子になりうるか？ —化学療法の有効性を含めた検討—

三川大介*^{1,2)}, 有馬純孝*¹⁾, 岩下明德*²⁾

REVIEW ARTICLE

W'Waves

癌転移にはリンパ節転移, 血行性転移, 播種性転移の主な3ルートがあるが, 血行性転移の過程は複雑で原発巣からの癌細胞の離脱, 周囲組織への浸潤, 脈管侵入, 接着, 遠隔臓器への移動血管内皮への接着, 浸潤・増殖の経路をとる¹⁾. この経路のなかでいずれかを阻止できたときに転移抑制が可能になることが考えられる. そこで血流中の癌細胞が遠隔臓器内で定着するためには血管内皮細胞に対する接着能が亢進していなければならない, いくつかの細胞接着分子が関与していることが示唆されてきた. そのなかの一つであるCD 44は多くのアイソフォームからなりタイプIVコラーゲン, フィブロネクチン, ヒアルロン酸などの細胞間基質の蛋白と結合し癌の浸潤転移・造血・リンパ球フォーミングなどの多様な現象に関わっていると報告されている²⁻⁴⁾. またApoptosisは個体発生における器官形成などに生理的にみられる現象であるが癌の発生に対しては一種の防御機構になっているものと考えられ^{5,6)}. 近年癌細胞の増殖亢進とともにApoptosisからの回避が癌のプログレッションに重要であることが明らかになってきた⁷⁻⁹⁾.

今回筆者らは転移をとりまく微小環境因子の一つとしてCD 44とApoptosisとの関連と化学療法の有用性を検討する目的で, 癌化学療法におけるTS (thymidylate synthase), TSIR (thymidylate synthase inhibition rate) も併せて

検討した.

対象と方法

福岡大学筑紫病院外科にて1987年から1993年間に, 術前画像診断にて根治術可能と判断された大腸癌治癒切除例66例を対象とした. 術前3日から7日間tegafur-uracil (UFT; TAIHO pharmaceutical company) 600mgの連日経口投与を行い切除標本の一部を採取し, ただちに凍結し腫瘍組織内TS, TSIRを測定した. TSIRはSpearsら¹⁰⁾の変法により総TS量と遊離TS量から計算した. 術後の維持化学療法としてtegafur-uracil 400mgの連日経口投与を2年間行った.

CD 44染色: 主病巣部位の20%ホルマリン固定パラフィン包埋標本を4 μ mに薄切後脱パラフィンし, 0.01Mクエン酸緩衝液下マイクロウェーブ100 $^{\circ}$ Cで20分加熱処理し抗原賦活を行った. 一次抗体として抗ヒト食細胞グリコプロテインマウスモノクローナル抗体(DF 1485; DACO社)を室温で60分反応させたのちLSAB法を行いヘマトキシリンで核染色した.

Apoptosis検出: CD 44に用いた同一切片でTUNEL法 (*in situ* cell death detection kit, AP Boehringer Mannheim社)を用いた. 20%ホルマリン固定パラフィン包埋標本を4 μ mに薄切後脱パラフィンし, トリプシン処理(37 $^{\circ}$ C 30分間), TdT加ビオチンdUTP(37 $^{\circ}$ C 60分間), アルカリホスファターゼ標識ヒツジ抗フルオレセイン抗体(37 $^{\circ}$ C 30分間)を反応させメチルグリーンで核染

*¹⁾ 福岡大学筑紫病院外科, *²⁾ 同病理

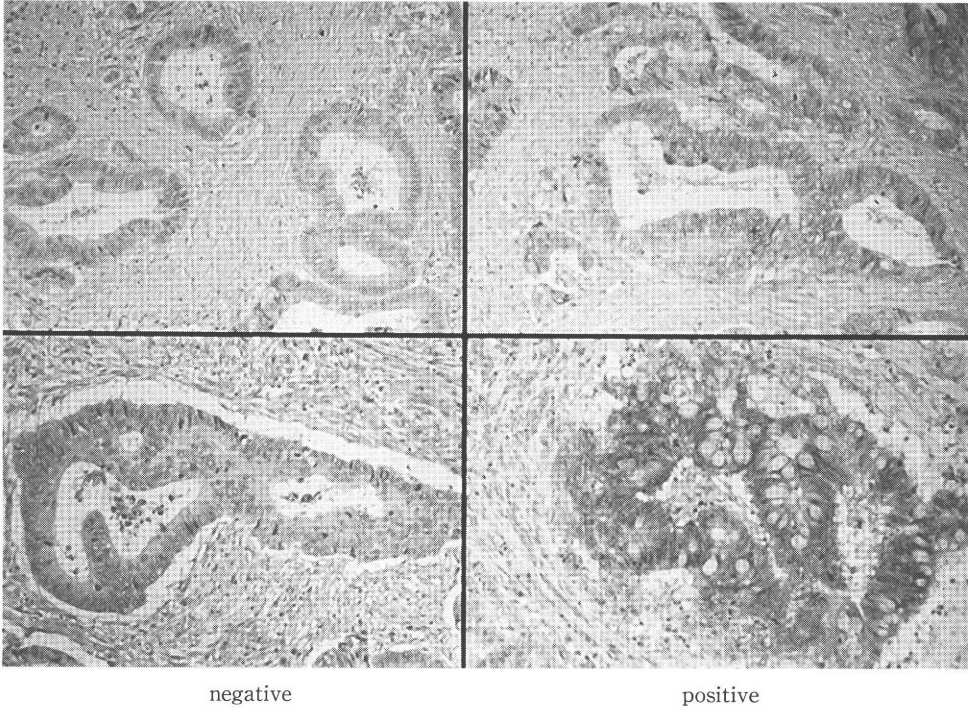


Fig. 1 CD 44 staining ($\times 100$)

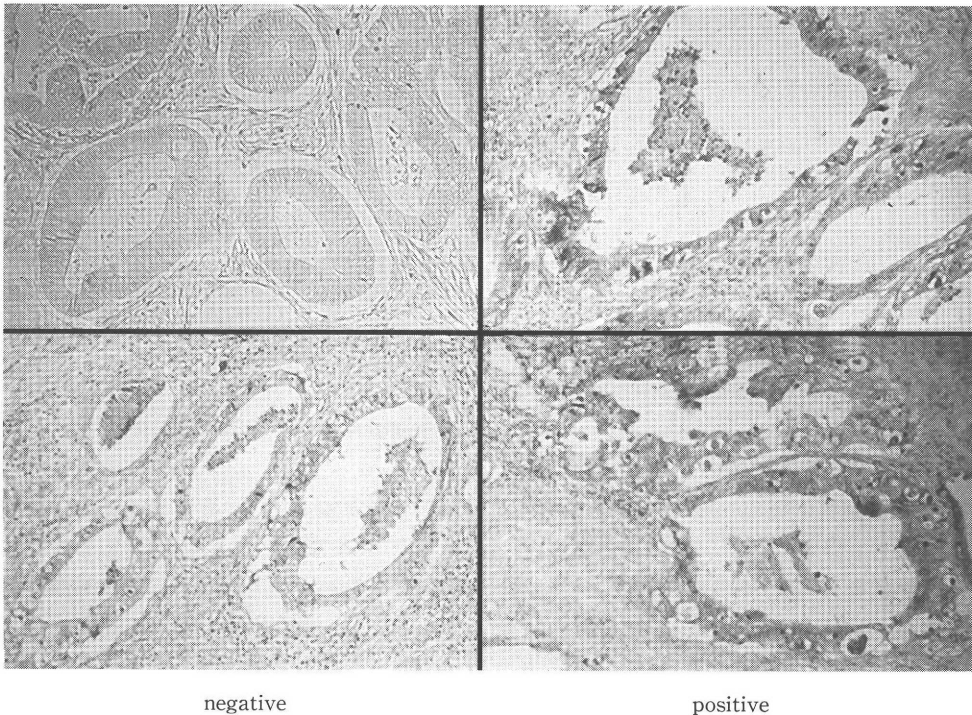


Fig. 2 Apoptosis staining ($\times 100$)

Table 1 Clinicohistopathological factor (CD 44)

Factor	negative (- · +)	positive (+ + · + + +)	P value
	n=38	n=28	
Age (Mean)	61.45±10.73	65.18±10.51	NS
Sex			
Male	26	15	NS
Female	12	13	
Location			
Colon	21	19	NS
Rectum	17	9	
Histologic grade			
well mode	22	12	NS
poor	1	1	
Depth			
sm	0	1	NS
mp	5	1	
ss (a 1)	25	21	
se (a 2)	8	5	
ly			
0	4	7	NS
1	29	14	
2	5	7	
v			
0	5	6	NS
1	25	14	
2	8	7	
3	0	1	
Dukes			
A	3	1	NS
B	11	15	
C	24	12	
stage			
II	16	16	NS
III a	13	8	
III b	9	4	

Table 2 Clinicohistopathological factor (Apoptosis)

Factor	negative (- · +)	positive (+ + · + + +)	P value
	n=37	n=29	
Age (Mean)	63.95±10.48	61.86±11.09	NS
Sex			
Male	21	20	NS
Female	16	9	
Location			
Colon	26	14	NS
Rectum	11	15	
Histologic grade			
well mode	15	19	NS
poor	2	0	
Depth			
sm	0	1	NS
mp	4	2	
ss (a 1)	26	20	
se (a 2)	7	6	
ly			
0	7	4	NS
1	20	23	
2	10	2	
v			
0	5	6	NS
1	23	16	
2	8	7	
3	1	0	
Dukes			
A	1	3	NS
B	14	12	
C	22	14	
stage			
II	17	15	NS
III a	14	7	
III b	6	7	

色した。

CD 44, Apoptosis 陽性細胞の判定は陽性に染まった核および細胞質の発現程度および分布状況で、- : 陰性, 1+ : 軽度散在性, 2+ : 中等度局所性, 3+ : 高度びまん性と4段階に判定した。Apoptosis に関しては0.5×0.5mmの面積内に存在する陽性細胞数を測定し単位面積1mm²あたりの細胞数に換算し、上記と比較したが特異的な変化を認めないため上記判定法を用い、-, 1+

をnegative, 2+, 3+をpositiveとした (Fig. 1, 2)。

統計学的処理は χ^2 検定およびlog rank testを用いて危険率5%未満を有意とした。生存率はKaplan-Meier法を用いた。なお臨床病理学的因子の分類は大腸癌取り扱い規約¹¹⁾に従って記載した。

Table 3 Relationship between CD 44 and recurrence

	negative (- · +)	positive (+ + · + + +)	positive rate(%)
Recurrence	7	17	70.8
Non recurrence	31	11	26.2
Total	38	28	42.4

p < 0.01

Table 4 Relationship between Apoptosis and recurrence

	negative (- · +)	positive (+ + · + + +)	positive rate(%)
Recurrence	21	3	12.5
Non recurrence	16	26	61.9
Total	37	29	43.9

p < 0.01

Table 5 Relationship between CD 44 and Apoptosis

Apoptosis staining	CD 44 staining		Total
	negative (- · +)	positive (+ + · + + +)	
negative (- · +)	17	20	37
positive (+ + · + + +)	21	8	29
Total	38	28	66

p < 0.05

結果

① 臨床病理学的因子と CD 44, Apoptosis 各因子との間に関連は認めなかった (Table 1, 2).

② CD 44 と再発

CD 44 発現陽性は再発例 70.8% と非再発例 26.2% に比べ高値を示した (p < 0.01) (Table 3).

③ Apoptosis と再発

Apoptosis 発現陽性は非再発例 61.9% と再発例 12.5% に比べ高頻度に発現しており有意差を認めた (p < 0.01). 特に強陽性例には再発は認めなかった (Table 4).

④ TSIR と再発

TSIR は非再発例 41.10 ± 16.81% と再発例 31.58 ± 12.66% に比して有意に高値を示した

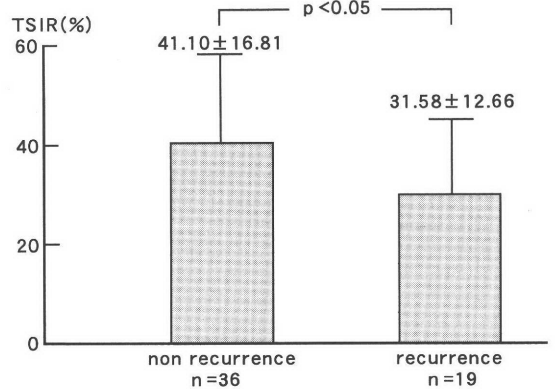


Fig. 3 Relationship between TSIR and recurrence

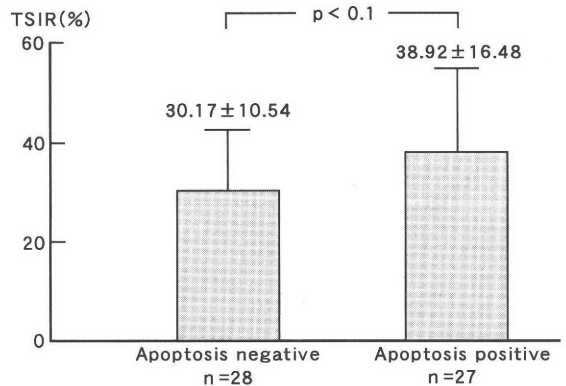


Fig. 4 Relationship between Apoptosis and TSIR

(p < 0.05) (Fig. 3).

⑤ CD 44 と Apoptosis

CD 44 陽性例は陰性例に比して Apoptosis 陰性例が多く有意差を認めた (p < 0.05) (Table 5).

⑥ TSIR と Apoptosis

TSIR は Apoptosis 発現陽性例 38.92 ± 16.48%, 陰性例 30.17 ± 10.54% と陽性例で高値を示す傾向を示した (p < 0.1) (Fig. 4).

⑦ CD 44 と TSIR

TSIR は CD 44 発現陽性例 33.03 ± 13.70%, 陰性例 41.24 ± 16.91% に比して低値を示す傾向を示した (p < 0.1) (Fig. 5).

⑧ CD 44 と生存率

CD 44 発現陽性例で 5 年生存率 46.4% と陰性例 81.6% に比して有意に予後不良であった (p < 0.001) (Fig. 6).

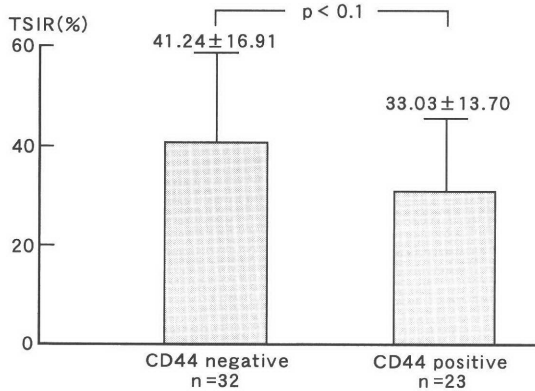


Fig. 5 Relationship between CD 44 and TSIR

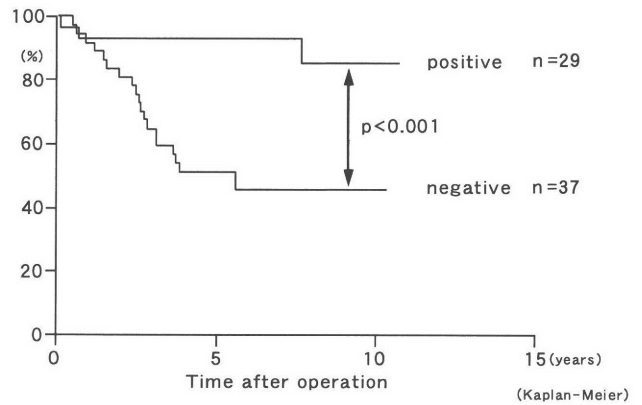


Fig. 7 Comparison of survival (Apoptosis)

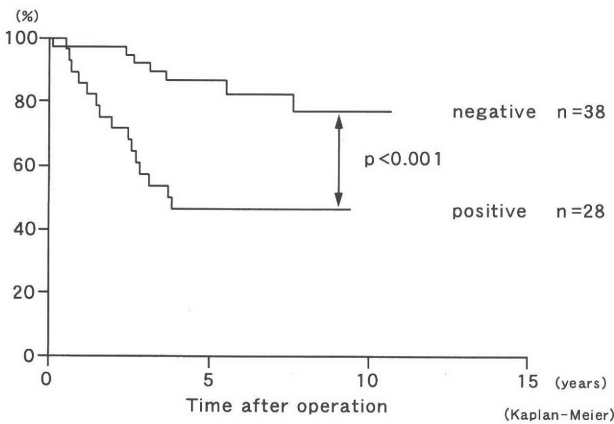


Fig. 6 Comparison of survival (CD 44)

⑨ Apoptosis と生存率

Apoptosis 発現陽性例で 5 年生存率 89.7% と陰性例 48.6% に比して有意に予後良好であった ($p < 0.001$) (Fig. 7).

考 察

癌転移因子として CD 44 に注目し、免疫化学的検討を行い予後および Apoptosis との関連について検討した。CD 44 はヒアルロン酸の発現がみられる血管内皮細胞と癌細胞との接着に関与し、早期の癌細胞接着である rolling 現象に深く関与しているとされている。CD 44 は standard form (CD 44 s) と variant isoform (CD 44 v) が存在し、CD 44 v の発現は癌の進展と関連するとされている¹²⁾。CD 44 standard form のリガンドはヒアルロン酸であるが、alternative splicing 機構に

より多く isoform がつくりだされている。CD 44 の発現と転移能に関し Gunthert ら¹³⁾ はラット膀胱癌由来細胞株において、転移能を有する細胞株と転移能をもたない細胞株の遺伝子解析にて転移能をもつ細胞株には CD 44 分子 162 個のアミノ酸が挿入した変異がみられ、この変異 CD 44 を転移能のない細胞株に導入すると、高頻度で転移がみられたと報告した。

大腸癌における CD 44 isoform の発現をいくつかの variant exon に対する抗体を用いて免疫組織学的検索した報告もみられ、Wielenga ら¹⁴⁾ は variant exon v 5, v 7, v 8~10 を含む CD 44 variant form は早期大腸癌にも存在するのに対して、v 6 を含む CD 44 は Dukes' C, D において高率に発現することより、この CD 44 v 6 が転移と関係し予後因子となりうると報告している。しかし v 6, 7 を含む CD 44 variant 蛋白は発癌の早期にみられるとの逆の報告もあり¹⁵⁾、いかなる isoform が転移に関与しているかは不明である。

今回筆者らは CD 44 s のみ検索したが、CD 44 v との同時発現例では細胞外に高分子複合体を形成し抗原性が高くなると報告されており¹⁶⁾、また挿入配列の部位によっては CD 44 v 自体が CD 44 s の免疫組織学的発現例に CD 44 v の発現例も含まれる可能性が十分考えられ、CD 44 の免疫組織学的検討は有用と思われる。Tanabe ら¹⁷⁾ は大腸癌には CD 44 variant が存在し、正常粘膜に対して原発巣や転移巣での発現が強いことを明らかにし予後予測に役立つことを示唆した。Yamaguchi

ら¹⁸⁾はCD 44 v 8~10の発現がリンパ節転移、血行性転移で有意に高くみられ、CD 44陽性例で5年生存率、10年生存率はそれぞれ56.9%、41.9%とCD 44陰性例79.8%、79.8%に比して予後不良であり多変量解析で独立した予後因子となることを示唆した。

今回の検討でも同様にCD 44発現陽性例で有意に再発例が多く血行性転移のマーカーおよび独立した予後因子になるものと考えられた。

大腸癌の転移・浸潤に関してHolmgrenら¹⁹⁾は大腸癌の患者は多くの場合原発巣を除去された際にすでに微小転移が形成されていることが多く、潜伏した微小転移は原発巣除去後接着や血管新生を介した微小環境因子が癌細胞のApoptosis減少によって再び活動をはじめるとのではないかと報告している。Qin Yuら²⁰⁾は乳癌細胞においてCD 44が腫瘍浸潤を促進し、CD 44を抑制することでApoptosisを誘導すると報告している。筆者らも同様にCD 44とApoptosisの関係についてCD 44陰性例にApoptosis発現陽性例が多くみられるという結果を得た。またフツ化ピリミジン系抗癌剤の抗腫瘍効果は5-FUのリン酸化で生成された代謝産物である、5-fluorodeoxy uridine monophosphate (FdUMP)がdTMP生成酵素であるTSを競合的に阻害しDNA合成阻害²¹⁻²³⁾を引き起こすといわれており、TSIRが抗腫瘍効果の指標となりうるとの報告²⁴⁾もある。

本研究でもTSIRがApoptosis発現陽性例に高値を示しtegafur-uracilによるApoptosisの誘導が示唆された。またCD 44発現陰性例でTSIRが高値を示したことがCD 44発現を抑制し接着能を阻害させていると考え、tegafur-uracilはDNA合成阻害作用だけでなく細胞接着阻害を介した転移抑制作用も併せもつことが示唆された。これらの結果はマウス高肝転移株²⁵⁾、マウス腎癌株²⁶⁾およびヒト乳癌株²⁷⁾を用いた*in vivo*および動物実験でのtegafur-uracilの強い転移抑制作用を支持するものであった。

最近の研究でYonekuraら²⁸⁾はマウス腎細胞株でtegafur-uracilが強い血管新生阻害作用をもつことを明らかにしており、今後血管新生や血

小板凝集能についても追加検討が必要と考える。

文 献

- 1) Stamenkovic I, Amiot M, Pesando JM, Seed B. A lymphocyte molecule implicated in lymph node homing is a member of the cartilage link protein family. *Cell*, 56: 1057-1062, 1989.
- 2) Wayner EA, Carter WG, Piotrowicz RS, Kunicki TJ. The function of multiple extracellular matrix receptors in mediating cell adhesion to extracellular matrix: preparation of monoclonal antibodies to the fibronectin receptor that specifically inhibit cell adhesion to fibronectin and react with platelet glycoproteins Ic-IIa. *J Cell Biol*, 107: 1881-1891, 1988.
- 3) Stamenkovic I, Aruffo A, Amiot M, Seed B. The hematopoietic and epithelial forms of CD 44 are distinct polypeptides with different adhesion potentials for hyaluronate-bearing cells. *EMBO J*. 10: 343-348, 1991.
- 4) Jalkanen S, Jalkanen M. Lymphocyte CD 44 binds the COOH-terminal heparin-binding domain of fibronectin. *J Cell Biol*, 116: 817-825, 1992.
- 5) Bellamy CO, Malcomson RD, Harrison DJ, Wyllie AH. Cell death in health and disease: the biology and regulation of apoptosis. *Semin Cancer Biol*, 6: 3-16, 1995.
- 6) Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. *Science*, 267: 1456-1462, 1995.
- 7) Harrington EA, Fanidi A, Evan GI. Oncogenes and cell death. *Curr Opin Genet Dev*, 4: 120-129, 1994.
- 8) Wyllie AH. The genetic regulation of apoptosis. *Curr Opin Genet Dev*, 5: 97-104, 1995.
- 9) Symonds H, Krall L, Remington L, Saenz-Roble M, Lowe S, Jacks T, Van Dyke T. p 53-dependent apoptosis suppresses tumor growth and progression in vivo. *Cell*, 78: 703-711, 1994.
- 10) Spears CP, Shahinian AH, Moran RG, Heidelberg C, Corbett TH: In vivo kinetics of thymidylate synthase inhibition in 5-fluorouracil sensitive and resistant murine colon adenocarcinoma. *Cancer Res*, 42: 450-456, 1982.
- 11) General Rules for Clinical and Pathological Studies on Cancer of the Colon, Rectum and Anus. 5th ed. Tokyo: Japanese Research Society for Cancer of the Colon and Rectum, 1994.
- 12) Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. Expression of CD 44 variant protein in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res*, 53: 4754-4756, 1993.
- 13) Gunthert U, Hoffman M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Haussman I, Matzku S, Wenzel A, Ponta H, Herrlich P. A new variant or glycoprotein CD 44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell*, 65: 13-24, 1991.
- 14) Wielenga VJM, Heider K-H, Offerhaus GJA: Expression of CD 44 variant protein in human colorectal cancer is related to tumor progression.

- Cancer Res, 53: 4754-4756, 1993.
- 15) Heider KH, Hofmann M, Hors E, van den Berg F, Ponta H, Herrlich P, Pals ST. A human homologue of the rat metastasis-associated variant of CD 44 is expressed in colorectal carcinomas and adenomatous polyps. *J Cell Biol*, 120: 227-233, 1993.
 - 16) Sleeman J, Moll J, Sherman L, Dall P, Pals ST, Ponta H, Herrlich P. The role of CD 44 splice variants in human metastatic cancer. *Ciba Found Symp*, 189: 142-156, 1995.
 - 17) Tanabe KK, Ellis LM, Saya H. Expression of CD 44 R 1 adhesion molecule in colon carcinoma and metastases. *Lancet*, 341: 725-726, 1993.
 - 18) Yamaguchi A, Urano T, Goi T, Saito M, Takeuchi K, Hirose K, Nakagawara G, Shiku H, Furukawa K. Expression of a CD 44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *J Clin Oncol*, 14: 1122-1129, 1996.
 - 19) Holmgren L, O'Reilly MS, Folkman J. Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat Med*, 1: 149-153, 1995.
 - 20) Qin Yu, Toole BP, Stamenkovic I. Induction of apoptosis of metastatic mammary carcinoma cells in vivo by disruption of tumor cell surface CD 44 function. *J Exp Med*, 186: 1985-1996, 1997.
 - 21) Danenberg PV. Thymidylate synthetase—a target enzyme in cancer chemotherapy. *Biochim Biophys Acta*, 473: 73-92, 1977.
 - 22) Hartman KU, Heidelberger C. Fluorinated pyrimidines. XIII. Inhibition of thymidylate synthase. *J Biol Chem*, 236: 3006-3013, 1961.
 - 23) Spears CP, Gustavsson Bg, Mitchell MS, Spicer D, Berna M, Bernstein L, Danenberg PV. Thymidylate synthetase inhibition in malignant tumor and normal liver of patients given intravenous 5-fluorouracil. *Cancer Res*, 44: 4144-4150, 1984.
 - 24) Kotake K, Koyama Y, Konishi F, Kanazawa K, Namba M, Shida S, Umemoto S, Nara K, Kon T, Nozawa K. Neo-adjuvant chemotherapy with tegafur suppository for rectal cancer—evaluation of the antitumor effects, tissue levels of 5-FU and inhibition of thymidylate synthase. *Jpn J Cancer Chemother*, 19: 1837-1842, 1992. (in Japanese)
 - 25) Satake H, Takechi T, Nakano K, Saito H, Uchida J, Takeda S, Unemi N, Fukushima M. Antimetastatic effects of UFT on murine metastasis model L 5178 Y-HM lymphoma. *Jpn J Cancer Chemother*, 23: 2001-2004, 1996. (in Japanese)
 - 26) Shibata J, Murakami K, Abe M, Hashimoto A, Utsugi T, Fukushima M, Yamada Y. Life prolonging effect of antitumor agents on postoperative adjuvant therapy in the lung spontaneous metastasis model in mice. *Anticancer Res*, 18: 1203-1210, 1998.
 - 27) Kurebayashi J, Nukatsuka M, Fujioka A, Saito H, Takeda S, Unemi N, Fukumori H, Kurosumi M, Sonoo H, Dickson RB. Postsurgical oral administration of Uracil and Tegafur inhibits progression of micrometastasis of human breast cancer cells in nude mice. *Clinical Cancer Res*, 3: 653-659, 1997.
 - 28) Yonekura K, Miyadera K, Yamada Y. Anti-angiogenic activity of UFT against mice bearing renal cancer in Dorsal Air Sac. *Journal Jap Soc Cancer Ther*, 33: 381 (Abstract No. GP 733), 1998.