



Title	Expression of C4.4A at the invasive front is a novel prognostic marker for disease recurrence of colorectal cancer
Author(s)	小西, 健
Citation	大阪大学, 2012, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/58999
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉 大阪大学の博士論文について 〈/a〉 をご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka

氏名	小西健
博士の専攻分野の名称	博士(医学)
学位記番号	第25156号
学位授与年月日	平成24年3月22日
学位授与の要件	学位規則第4条第2項該当
学位論文名	Expression of C4.4A at the invasive front is a novel prognostic marker for disease recurrence of colorectal cancer (癌先進部におけるC4.4A発現は大腸癌再発の新規予後因子である)
論文審査委員	(主査) 教授 森 正樹 (副査) 教授 青笹 克之 教授 小川 和彦

論文内容の要旨

〔 目 的 〕

消化器がん患者の尿中に含まれるアミノ酸断片のひとつであるC4.4Aに注目した。この分子はラットの転移性膝腫瘍から同定され、胞膜表面にGPIアンカーを介して接着する。本研究では大腸癌組織中におけるC4.4AのmRNA発現を調べ、大腸癌患者の予後との関連性について調べた。さらにC4.4A蛋白のC末端側、N末端を認識するポリクローナル抗体を2種類作成し、C4.4A蛋白発現について検討した。本研究では大腸癌におけるC4.4Aの発現と意義を明らかにすることを目的とした。

〔 方 法 〕

- ① 大腸癌組織は、1995年から2007年の間に手術を受けた大阪大学での132例と、1993年から1999年までの九州大学生医研での108例を用いた。
 - ② RNAの抽出にはTRIzolを用い、RT(reverse transcription)の後、定量RT-PCRを行った。
 - ③ C4.4Aのアミノ酸配列のうちN末端近傍のCGSGLPGKNDRLDLとC末端近傍のGPIアンカー鎖を含むAGHQDRSNGQYPAKGをそれぞれ抗原として2種類のポリクローナル抗体(抗C4.4A-1抗体、抗C4.4A-2抗体)を作成した。これらの抗体を用いてwestern blottingと免疫染色(Vectastain ABC peroxidase kit)を行った。
 - ④ ヒト大腸癌の細胞株としてHCT116とKM12smを使用した。
- C4.4Aの細胞内局在を調べるために通常の2次元培養に加えCollagen gel kitを用いて細胞株の3次元培養を行った。

〔 成 績 〕

RNAの質の良いStageIからIVの大腸癌154例でのmRNA発現と予後の関連を検討した結果、高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良となることが分かった(P=0.0005)。Western blotting法・免疫染色にて抗C4.4A抗体の反応性を調べた結果、抗C4.4A-1、抗C4.4A-2両抗体ともにpositive controlとした食道扁平上皮でC4.4A発現はみられたものの、大腸癌組織・細胞株では抗C4.4A-2抗体によるのみ発現がみられた。抗C4.4A-2抗体を用いて、大腸癌132例について免疫組織染色を行ったところ、原発巣では79.5% (105/132)にC4.4A蛋白の発現がみられた。また全症例の約4分の1では癌の表層部分から中間層にかけてはC4.4A蛋白は細胞質に弱く認められるにすぎなかったが、癌の先進部では浸潤癌細胞の細胞膜に強い発現がみられた。リンパ節転移巣や肺転移巣においても同様の浸潤性細胞におけるC4.4A発現を認めた。

132例の大腸癌をC4.4Aの発現形式により以下のように群分けした。A.表層から先進部にかけてintensityの

増加と細胞質から細胞膜へ局在の変化がみられるもの(n=34)、B1. 細胞質から細胞膜へ局在の変化のみがみられるもの(n=12)、B2. intensityの増加のみがみられるもの(n=15)、C. 両方とも見られないもの(n=71)。A群とそれ以外(B1, B2, C)の臨床病理学的因子を比較検討した結果、A群は有意に大腸壁深達度が深くまた静脈侵襲が強い特徴を認めた。全生存率について多変量解析を行った結果、A群、腫瘍径、リンパ節転移、腹膜播種が独立した予後因子であった。中間的な予後を示すStageIIとIII症例における無再発生存率を検討した結果、同様の結果が得られた。これらStageII・III症例では、A群は肝転移、肺転移などの血行性転移を起こしてることが明らかとなった。HCT116細胞は2次元培養では核にC4.4Aが局在していたがCollagen中で培養するとC4.4Aは細胞膜上に強発現していることが分かった。

〔 総 括 〕

RNAレベルの解析でC4.4Aは大腸癌の新規予後因子となることを見出した。更に、大腸癌先進部の浸潤癌細胞を特異的に認識する新規ポリクローナル抗体の作成に成功した。この抗体で細胞膜陽性となった大腸癌細胞は大腸組織内の血管に侵入しやすく後に血行性遠隔転移を来しやすいことが分かった。本抗体が中間群ステージの大腸癌患者の治療方針決定の一助となることが期待される。

論文審査の結果の要旨

StageIからIVの大腸癌154例でのC4.4A mRNA発現と予後の関連を検討した結果、高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良となることが分かった(P=0.0005)。C4.4A蛋白のC末端を認識するポリクローナル抗体を作成し、C4.4A蛋白発現について検討した。大腸癌132例について免疫組織染色を行ったところ、全症例の約4分の1では癌の表層部分から中間層にかけてはC4.4A蛋白は細胞質に弱く認められるにすぎなかったが、癌の先進部では浸潤癌細胞の細胞膜に強い発現がみられた。そのような発現が見られるもの(膜型発現)は、それ以外ものに比べ有意に大腸壁深達度が深くまた静脈侵襲が強い特徴を認めた。中間的な予後を示すStageIIとIII症例における無再発生存率を検討した結果、膜型発現群は予後因子となることが分かった。これらStageII・III症例では、膜型発現群は肝転移、肺転移などの血行性転移を起こしてることが明らかとなった。本研究で作成した抗体が中間群ステージの大腸癌患者の治療方針決定の一助となることが期待され、学位論文に値する。