



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、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

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

The University of Osaka

【133】		
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 2 5 1 5 6 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膀胱癌から同定され、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 を使い、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 CGSGLPGKNDRGDL 及び C 末端近傍の GPI アンカー鎖を含む AGHQDRSNSGQYPAGK 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 の質の良好な Stage I 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 抗体によって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Stage II・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Stage II・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。