

学位論文

「結腸癌の転移における

幹細胞マーカー発現腫瘍細胞への依存性低下」

DM16009 甲斐田 武志

北里大学大学院医療系研究科医学専攻博士課程  
臨床医科学群 外科学  
指導教授 比企 直樹  
内藤 剛  
山下 継史

## 著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。



## 【要旨】

結腸直腸癌(CRC)は、近年のヒトにおける癌死亡の主要な死因の一つとなっている。CRCは遺伝子疾患であり、CRCにおける遺伝子変異はヒトの癌の中で最も頻度が高いと言われている。APC(Adenomatous polyposis coli)遺伝子やK-ras遺伝子、癌抑制遺伝子であるTP53遺伝子の変異発生率は、新世代シーケンス(NGS)によってそれぞれ、81%、43%、および60%と高頻度であることが示されている。そのためCRCにおけるK-ras遺伝子の変異に応じて、分子標的治療まで確立されている。最新の前臨床研究ではAPC/ $\beta$ -カテニン経路がTNIK(TRAFF/NCK-interacting protein kinase)阻害によって標的にされる可能性があることも明らかになった。また、癌抑制遺伝子であるTP53遺伝子が機能することは、TP53遺伝子変異を有する腫瘍細胞の新たな潜在的標的にされる可能性があることも明らかになった。

その一方で遺伝子変異以外のCRC治療標的戦略として、これまで癌幹細胞理論に基づいて進められてきた。癌幹細胞はさまざまな抗癌治療に耐性があり、治療の妨げになると考えられてきた。CRCにおいては、癌幹細胞マーカーとしてCD44、CD133、Ascl2、Lgr5などの癌幹細胞バイオマーカーが特定されている。

特にCD44に関しては、さまざまな報告がなされている。CD44転写産物の中で、CD44v9を含むCD44バリエント(CD44V)のみが、シスチントランスポーター(xCT)と相互作用できることや、抗酸化分子としての活性酸素(ROS)の調節におけるCD44Vの機能について報告されている。さらにCD44VはxCTと結合して細胞質へのシスチン流入を増大させ、細胞内システイン濃度を高めるが、システイン輸送による腫瘍増殖は、NRF2(NF-E2-related factor2)との関連において、癌誘発能としての癌幹細胞性において重要な役割を果たすことが報告されている。

しかしながら興味深いことに、CD44V発現は原発性結腸癌組織で頻繁に認められたが、非癌部である結腸正常粘膜組織はCD44S(バリエント配列のない標準型)のみを発現していた。CD44V発現は、CRCの癌進行マーカーであると以前から予想されていたが、最終的には実証されていない。その結果、CRCの癌進行マーカーとしてのCD44発現プロファイルへの関心は次第に低下し、現時点では未だに十分な検証は進んでいない。

そこで CD44 バリエントアイソフォームに対する最近の高度な知見を加味して、癌幹細胞性の特性がある可能性を秘めた CD44V の臨床的意義は CD44T とは異なるのではないだろうかという仮説を立て、検証した。この研究では、CD44V と CD44T、さらに原発性結腸癌における新たな幹細胞マーカーである CD133 の発現について、定量的リアルタイム PCR 法を用いて定量的評価システムを開発することで、新しい知見を報告できると考えた。

### 【背景】

CD44 と CD133 は、結腸直腸癌(CRC)の幹細胞マーカーとして知られている。特に CD44 には、CD44T や CD44V などのさまざまな腫瘍学的特性を持つ特徴的なアイソフォームが知られている。しかしながら、このようなマーカーの臨床的意義については、はっきりとした知見が得られていない。

### 【目的】

CD44V と CD44T および CD133 の mRNA レベルでの発現について、定量的評価システムを開発して検討することで、癌幹細胞マーカーの臨床的意義について明らかにしたい。

### 【方法】

60 例の結腸癌症例を対象に CD44T と CD44V および CD133 の発現値を mRNA レベルで定量的 PCR 法により定量した。癌部(原発性結腸癌組織)と非癌部(正常粘膜組織)での発現を定量化し、比較検討した。また、22 例の結腸直腸癌の肝転移症例を対象に同様の検討を行った。また、臨床病理学的因子との関連についても明らかにした。

### 【結果】

(1)CD44T、CD44V mRNA はともに非癌部よりも癌部での発現が高かった( $p<0.0001$ )。一方で、CD133 mRNA は非癌部でも発現を認め、癌部ではむしろ減少していた( $p=0.048$ )。

(2)癌部における CD44V mRNA の発現は CD44T mRNA の発現と有意に相関していた( $R=0.62$ 、 $p<0.0001$ ) が、CD133 mRNA の発現とはまったく相関していなかった。

(3)癌部における CD44V と CD44T の mRNA 発現はともに左側結腸癌よりも右側結腸癌で有意に高かった(それぞれ  $p=0.035$ 、 $p=0.012$ )。一方で、癌部における CD133 の mRNA 発現は左右差を認めなかった( $p=0.20$ )。

(4)原発結腸癌症例では、予想とは異なり CD44V、CD44T、CD133 の mRNA 発現は予後不良因子とは相関してはいなかった。一方で、CD44V と CD44T の mRNA 発現は予後不良因子であるリンパ節転移や遠隔転移とは有意に逆相関していた(それぞれ  $p=0.040$ 、 $p=0.039$ )。さらに CD44V と CD133 の mRNA 発現はともに、原発結腸癌症例と比較して肝転移症例で有意に減少していた(それぞれ  $p=0.0005$ 、 $p=0.0006$ )。

#### 【結論】

癌幹細胞マーカーの発現分析の結果、それらの癌幹細胞マーカーの発現が原発性および転移性腫瘍の悪性度や進行に関わる攻撃的な表現型を示す可能性があるとは言えなかった。むしろ癌幹細胞性に対する需要が低下していることが示唆された。



## 目次

	頁
1. 序論 -----	1
2. 研究 結腸癌の転移における幹細胞マーカー	
発現腫瘍細胞への依存性低下 -----	3
2-1. 研究方法と材料 -----	3
2-1-1. 対象症例と標本採取方法 -----	3
2-1-2. 細胞株と培地 -----	3
2-1-3. RNA 抽出と cDNA 精製 -----	4
2-1-4. 半定量的 RT-PCR -----	4
2-1-5. 定量的 PCR -----	4
2-1-6. 統計 -----	5
2-2. 結果 -----	5
2-2-1. CRC 細胞株における CD44 発現 -----	5
2-2-2. 原発結腸癌における CD44V/CD44T mRNA 発現 --	6
2-2-3. 原発結腸癌における CD44V mRNA 発現の臨床病理学的意義 -----	7
2-2-4. 右側結腸癌における CD44V mRNA 発現と マイクロサテライト不安定性 (MSI) -----	7
2-2-5. 原発結腸癌における CD44T mRNA 発現の臨床病理学的意義 -----	8
2-2-6. 原発結腸癌における CD133 mRNA 発現の臨床病理学的意義 -----	8
2-3. 考察 -----	9
2-4. 結語 -----	12
3. 総括 -----	12
4. 引用文献 -----	13
5. 謝辞 -----	18
(6. 図表 -----	19)

## 1. 序論

結腸直腸癌 (CRC) は、最近のヒト癌死亡の主要な要因である<sup>1)</sup>。従来型の CRC は遺伝病であり、ゲノム変異はヒトの癌腫の中で最も頻度が高いとされる<sup>2)</sup>。新世代シーケンス (NGS) によって、APC (Adenomatous polyposis coli) や K-ras、TP53 (腫瘍タンパク質 p53) の変異は、それぞれ 81%、43%、および 60% の高頻度で認められている。そして CRC における分子標的治療は K-ras 変異の状態に応じて奏功している<sup>3)</sup>。また、最新の前臨床研究では APC/ $\beta$ -カテニン経路が、TNIK (TRAF および NCK-interacting protein kinase) 阻害によって標的にされる可能性があることも明らかになった<sup>4)</sup>。さらに TP53 はその機能を獲得することで、TP53 の変異を持つ腫瘍細胞の新しい潜在的な標的になり得る<sup>5, 6)</sup>。

その一方で、CRC の別の標的戦略は、癌幹細胞理論に基づいていた<sup>7)</sup>。癌幹細胞はさまざまな抗癌療法に耐性があり、治療の妨げになると考えられており、CRC においては CD44、CD133、Ascl2、Lgr5 などの幹細胞バイオマーカーが特定されている<sup>8, 9, 10)</sup>。

Ishimoto らは、さまざまな CD44 転写産物の中で、CD44v9 を含む CD44 バリエント (CD44V) のみが、CD44v9 エキソンカウンターパートを介して xCT (シスチントランスポーター) と相互作用できることを実証し、抗酸化分子としての活性酸素 (ROC) の調節における CD44V の機能を確立した。さらに CD44V は xCT と結合して細胞質へのシスチン流入を増大させ、細胞内システイン濃度を高め、そのシステイン輸送による腫瘍の増殖は、NRF2 (NF-E2 関連因子 2) と関連して癌誘発能である癌幹細胞性に重要な役割を果たすことを実証した<sup>11, 12)</sup>。

しかしながら、CD44V 発現は原発性 CRC 組織で頻繁に認められる一方で、非癌結腸粘膜組織は CD44S (バリエント配列のない標準型) のみを発現していることが報告されている<sup>13, 14)</sup>。さらに CD44V 発現は、CRC の癌進行マーカーであると提唱された<sup>15, 16)</sup> が、最終的にそれを証明することはできなかった<sup>17, 18)</sup>。その結果、CRC の進行マーカーとしての CD44 発現プロファイルへの関心は次第に低下し、現時点ではまだ十分に検証されていない。これは CD44V 発現の定量分析においても同様である<sup>19, 20)</sup>。

CD44 バリエントアイソフォームの最近の知見を考慮し、われわれは癌幹細胞性の特性を表現する可能性のある CD44V の臨床的意

義の検討は、CD44T とは異なる可能性があるという仮説を立てた。

原発性結腸癌において癌幹細胞マーカーである CD44V 発現と CD44T 発現、および CD133 発現をリアルタイム PCR で定量し、比較検討した研究がなかったため、この研究でわれわれは初めてそれら癌幹細胞マーカーの発現についての臨床的意義を検討した。

## 2. 研究 結腸癌の転移における

### 幹細胞マーカー発現腫瘍細胞への依存性低下

#### 2-1. 研究方法と材料

##### 2-1-1. 対象症例と標本採取方法

2018 年 1 月～2018 年 12 月に北里大学病院下部消化管外科で結腸切除術を受けた 連続 60 症例の結腸癌患者から摘出した検体を用いて、腫瘍部分と同一検体の非癌正常結腸粘膜の両方から標本を採取した。また、2020 年 6 月～2020 年 12 月に北里大学病院小児・肝胆膵外科で肝切除術を受けた 連続 22 症例の CRC 癌患者 (8 人の結腸癌を含む) の肝転移検体の標本を用いた。結腸癌症例は Union for International Cancer Control (UICC) の TNM 分類を用いて分類された。すべての組織標本は北里大学病院で採取され、書面にてインフォームド・コンセントを取得した。

また本研究は、北里大学医学部倫理委員会の承認を得て実施した (承認番号 B20-382)。

##### 2-1-2. 細胞株と培地

下記の CRC 細胞株を使用した。COL0205 細胞株、COL0320 細胞株、DLD1 細胞株、HCT116 細胞株、および LOVO 細胞株は、東北大学加齢医学研究所の医用細胞資源センター(仙台)から提供されたものを用いた。SW480 細胞株は、American Type Culture Collection (ATCC) (米国バージニア州) から購入したものを用いた。HCT15 細胞株は、理化学研究所バイオリソース研究センター(筑波)から購入したものを用いた。LS174T 細胞株は European collection of authenticated cultures (英国ポータンダウン) から購入したものを用いた。また培地については下記の通り使用した。LOVO 細胞株は混合培地 (RPMI1640 : F-12 HAMS = 1:1) (Sigma-Aldrich 社製 N6658 番) で増殖させた。SW480 細胞株はライボヴィッツ L15 培地 (ThermoFisher SCIENTIFIC 社製 11415064 番) で増殖させた。その他すべての細胞株は、10% ウシ胎児血清とペニシリン-ストレプトマイシン (Gibco 社製) を添加した RPMI1640 培地 (Gibco 社製) で増殖させた。



### 2-1-3. RNA 抽出と cDNA 精製

手術中にすべての標本を直ちに採取し、RNAlater™ RNA Stabilization Solution (ThermoFisher SCIENTIFIC) に 4 °C の冷蔵庫内で一晩保存した。標本を採取した翌日に標本を薄切り、-80°C の冷凍庫内に保存した。均質化された標本および細胞株からの RNA 抽出は、RNeasy Mini Kit (Qiagen) を使用して製造元のプロトコルに従って実施した。抽出した RNA は、オリゴ d (T) プライマーおよび Super ScriptIII 逆転写酵素キット (ThermoFisher SCIENTIFIC) を用いて、全量 2  $\mu$ g の RNA を相補的 DNA (cDNA) に逆転写した。

### 2-1-4. 半定量的 RT-PCR

標的になる cDNA 混合物に 0.2  $\mu$ l のプライマー、1  $\mu$ l の dNTP 混合物、1.5  $\mu$ l の MgCl<sub>2</sub>、5  $\mu$ l の PCR バッファー、および 0.2  $\mu$ l の Platinum Taq DNA ポリメラーゼ (ThermoFisher SCIENTIFIC) を添加し、最終容量 50  $\mu$ l になるように混合した。CD44T および CD44V の PCR 条件は、95 °C で 3 分間の初期変性と、95°C で 30 秒、アニーリング温度 (60°C) で 30 秒、72°C で 30 秒の 35 サイクル、および 72°C で 10 分のプロトコルで実施した。プライマー F1 とプライマー R1 はエクソン 5 からエクソン 15 への遺伝子増幅用に設計され (図 1a)、プライマー F2 とプライマー R2 はエクソン 8 からエクソン 10 への遺伝子増幅用に設計した (図 1b)。プライマー配列は以下に示した (補表 1)。

### 2-1-5. 定量 PCR

遺伝子発現量は、iQ™ Supermix Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad 社製) を使用した定量的リアルタイム PCR 法によって評価した。200nmol/l の蛍光プローブ (プローブ 2) と 12.5  $\mu$ l の iQ™ Supermix、標的とする cDNA 1  $\mu$ l を含む合計 25  $\mu$ l の反応液を使用した。CD44V (v8-10) (図 1b) の PCR 条件は、95°C で 3 分間の初期変性と、95°C で 20 秒、アニーリング温度 (60°C) で 30 秒、72°C で 30 秒の 40 サイクルで実施した。標的遺伝子の発現レベル (本文中の Ex 値) を  $\beta$ -アクチン発現に対して正規化し、サイクル閾値を比較する方法を用いて分析した。発現値は、標的遺伝子発現 /  $\beta$ -アクチン発現  $\times 100$  として定義した。



## 2-1-6. 統計

連続変数はスチューデントの t 検定を使用して評価し、カテゴリー変数は必要に応じてフィッシャーの正確確率検定またはカイ二乗検定を使用して評価した。0.05 未満の p 値は、統計的有意性を示すと見なした。すべての統計的計算は、JMP バージョン 14 ソフトウェア (SAS Institute Japan) を使用して実施した。

## 2-2. 結果

### 2-2-1. CRC 細胞株における CD44 発現

CRC 腫瘍からの CD44 転写産物は、図 1a に示されているように、CD44S と CD44V の両方を含むさまざまなアイソフォームで構成されている<sup>17)</sup>。その CD44V すべてのバリエーションにはバリエーション 8-10 が含まれている。CD44V は、システイントランスポーター (xCT) と結合する領域を含むバリエーション 9 のエクソン部分を持ち、癌細胞の酸化還元状態を調節することで幹細胞性を維持している<sup>11)</sup>。そのため CD44V は癌幹細胞性を示すと考えられている。

プライマー F1 とプライマー R1 の両方を使用して (図 1a)、LOVO を除く CRC 細胞株において、複数のバンドを示している CD44 バリエーションが検出されたが、LS174T を除く CRC 細胞株でも CD44S が発現していた (図 1c 上)。以前の報告では、CD44S は非癌粘膜組織でのみ検出されるとされていたが<sup>21)</sup>、現在の研究ではほとんどの CRC 細胞株で明らかに発現を認めている。

プライマー F2 とプライマー R2 の両方を使用すると (図 1b)、CD44V (v8-10) は単一のバンド内でバリエーションの総量を表す可能性があり、LOVO を除く CRC 細胞株で強く発現していた (図 1c 中央)。β-アクチンも内因性コントロールとして示した (図 1c 下)。

次に CD44V および CD44T において、TaqMan プローブ (それぞれプローブ 2 およびプローブ 3) および特異的プライマー (それぞれプライマー F2/R2 およびプライマー F3/R3) を使用した定量的リアルタイム PCR を実施し (図 1d)、HCT116 細胞が両方の形態で最も強い発現を示したため、CD44V/T mRNA 発現のポジティブコントロールとして選定した。

定量 PCR 法により、CD44V mRNA 発現は HCT116、LS174T、DLD1 細胞の順に強く、CD44V mRNA 発現の弱い LOVO 細胞において CD44T mRNA は発現が確認された。また LOVO 細胞では、CD44S がその他の細胞株と異なって強い発現を認めた。また、LOVO 細胞を除く CRC 細胞株では、CD44V と CD44T mRNA の発現に密接な相関関係を認めた ( $R=0.83$ 、 $p=0.0092$ 、図 1e)。

## 2-2-2. 原発結腸癌における CD44V/CD44T mRNA 発現

結腸癌患者 60 症例において、原発結腸癌組織と非癌粘膜組織の両方から CD44V mRNA 発現を調査した。CD44V mRNA 発現は、非癌粘膜組織と比較し、原発結腸癌組織で有意に増加した ( $p<0.0001$ ) (図 2a)。

ROC 曲線を使用して非癌粘膜組織から原発結腸癌組織を識別すると、曲線下面積 (AUC) は 0.95 であることが示され (図 2b)、CD44V mRNA 発現レベルの最適なカットオフ値が 1.54 と決定した。この最適なカットオフ値を使用すると、CD44V mRNA の発現は、原発結腸癌組織では 92% (55/60) で高く、非癌粘膜組織では 10% (6/60) で高かった ( $p<0.0001$ )。それゆえ、CD44V mRNA 発現が原発結腸癌組織で特異的に上昇していることが示された。

同様に CD44T mRNA 発現を調査したところ、CD44T mRNA 発現は、非癌粘膜組織と比較し、原発結腸癌組織で有意に高いことが示された ( $p<0.0001$ ) (補図 1a)。また同様に、ROC 曲線を使用して原発結腸癌組織を非癌粘膜組織から識別すると、AUC は CD44T で 0.84 であることが示され (補図 1b)、CD44V mRNA 発現よりは劣り、リアルタイム PCR で決定された最適なカットオフ値は 5.71 と決定した。この最適なカットオフ値を使用すると、CD44T mRNA 発現は、原発結腸癌組織では 78% (47/60) で高く、非癌粘膜組織では 18% (11/60) で高かった ( $p<0.0001$ )。

これらのデータは、CD44T mRNA 発現も原発結腸癌組織で特異的に上昇していることを示しているが、癌組織に対する感度と特異性は CD44V よりはるかに劣っており、CD44T 転写産物に、非癌粘膜組織で発現すると考えられる CD44S 転写産物が含まれていた可能性が示唆された<sup>21)</sup>。しかしながら、CRC 細胞株で確認されたように、原発結腸癌での CD44T mRNA 発現は原発



結腸癌での CD44V mRNA 発現と密接に関連していた ( $R=0.62$ ,  $p<0.0001$ )。

### 2-2-3. 原発結腸癌における CD44V mRNA 発現の 臨床病理学的意義

結腸癌患者 60 症例における定量 PCR による CD44V mRNA 発現の臨床病理学的特徴を検討した。スチューデントの  $t$  検定では、CD44V mRNA 発現は右側結腸癌と左側結腸癌の間に有意差を認めた ( $p=0.035$ ) (図 2c) が、リンパ節転移を除く TNM 因子などの他の臨床病理学的因子に関して統計学的有意差は認めなかった ( $p=0.04$ ) (図 2d-f)。意外なことに、CD44V mRNA の発現は、リンパ節転移や遠隔転移を伴う進行大腸癌の症例ではむしろ低い傾向にあった。

次に、右側結腸癌と左側結腸癌を分離した後、臨床病理学的特徴を検討した。CD44V mRNA 発現の最適なカットオフ値を、右側結腸癌と左側結腸癌を識別するために ROC 曲線によって新たに設定した。最適なカットオフ値は 6.72 で、CD44V mRNA 発現は右側結腸癌では 39% (12/31) で高く、左側結腸癌では 7% (2/29) で高かった ( $p=0.004$ ) (図 2g)。

CD44V mRNA の高発現は右側結腸癌で特異的に認められたため、右側結腸癌に限定して臨床病理学的特徴を再度検討した (表 1)。その結果、CD44V mRNA の高発現は、70 歳未満の若年 ( $p=0.041$ ) と有意に関連しており、リンパ節転移の減少とは関連する傾向にあった ( $p=0.060$ )。

### 2-2-4. 右側結腸癌における CD44V mRNA 発現 とマイクロサテライト不安定性 (MSI)

CD44V mRNA 高発現が右側結腸癌および若年症例に関連しているという臨床病理学的特徴は、マイクロサテライト不安定性が高い (MSI-H) 結腸癌の表現型を連想させた。そこで、5 つの Bethesda パネルマーカーを使用して MSI 状態を分析し、右側結腸癌における CD44V mRNA 高発現と MSI 状態との関連を検討した。まず、MSI-H の症例は 31 例の右側結腸癌のうち 8 例 (26%) で認められ、これは文献的に報告されているデータ (20% ~) <sup>22, 23)</sup> と概ね一致した。しかしながら右側結腸癌では、

MSI-H の状態は臨床病理学的因子と相関を認めなかった。さらに、MSI-H は CD44V mRNA 発現が低いもの(7/19) (37%) と比較して CD44V mRNA 発現が高い右側結腸癌ではほとんど(1/12) (8%) 認められなかった ( $p=0.077$ ) (表 1) (図 2g 左の赤色部分)。これは、MSI-H 表現型の悪性度の低い生物学的特徴に一致していた。

#### 2-2-5. 原発結腸癌における CD44T mRNA 発現の

##### 臨床病理学的意義

結腸癌患者 60 症例における定量 PCR による CD44T mRNA 発現の臨床病理学的特徴を検討した。スチューデントの  $t$  検定では、CD44T mRNA 発現は右側結腸癌と左側結腸癌の間に再び有意差を認めた ( $p=0.012$ ) (補図 1c) が、遠隔転移を除く TNM 因子などの他の臨床病理学的因子に関して統計学的有意差は認めなかった (M 因子) ( $p=0.039$ ) (補図 1d-f)。CD44T mRNA の発現は、CD44V と同様に悪性度が低い結腸癌で認める傾向を示した。右側結腸癌と左側結腸癌を区別するための最適なカットオフ値は 7.24 で、CD44T mRNA 発現は右側結腸癌では 71% (22/31) で高く、左側結腸癌では 34% (10/29) で高かった ( $p=0.005$ ) (補図 1g)。また CD44T mRNA 発現は、右側結腸癌の MSI-H 状態とは相関を認めなかった。

#### 2-2-6. 原発結腸癌における CD133 mRNA 発現の

##### 臨床病理学的意義

CRC 細胞株および結腸癌患者 60 症例の原発結腸癌組織と非癌粘膜組織の両方で CD133 mRNA 発現を調査した。CD133 mRNA の発現は、DLD1 細胞のような発癌性のある多くの CRC 細胞株で抑制されており<sup>24)</sup> (図 3a)、非癌粘膜組織と比較して原発結腸癌組織ではむしろ低下していた ( $p=0.048$ ) (図 3b)。しかし、特定のヒト癌腫における CD133 mRNA の発現低下は、結腸直腸癌における CD133 の癌特異的プロモーター DNA メチル化を記述した報告と一致していた<sup>25, 26)</sup>。

また結腸癌組織における CD133 mRNA 発現は、非癌粘膜組織における発現と弱く相関しており (図 3c) ( $R=0.28$ ) ( $p=0.030$ )、CD133 mRNA 発現が非癌粘膜組織を部分的に表現していること



が示唆された。公開データベース<sup>27)</sup>(図 3d)を使用し、CRC 組織と非癌粘膜組織の両方の上皮および間質成分における CD133 mRNA 発現を分析すると、非癌粘膜組織での CD133 mRNA 発現が高い傾向にあり、これは我々のデータと一致していた。

次に、結腸癌患者 60 症例におけるリアルタイム PCR による CD133 mRNA 発現の臨床病理学的特徴を検討した。スチューデントの t 検定では、原発結腸癌組織における CD133 mRNA 発現は、非癌粘膜組織でのみ有意に発現を認めた( $p=0.048$ )(図 3e)が、その他の臨床病理学的因子に関しては統計学的な有意差は認めなかった(補図 2)。

非癌性粘膜から結腸癌組織を識別するための CD133 mRNA 発現の最適なカットオフ値は 1.20 ( $AUC=0.62$ )で、CD133 mRNA の高発現は再び右側結腸癌と有意に関連していた( $p=0.10$ )。しかし、原発結腸癌組織のその他の臨床病理学的要因では統計学的な有意差は認めなかった(補表 2)。

最後に、CRC の肝転移症例( $n=33$ )と原発結腸癌症例( $n=60$ )の両方で CD133 と CD44V/T の両方の mRNA 発現を比較した。原発結腸癌と比較して肝転移で CD133 と CD44V の両方の mRNA 発現が有意に低下していたが、CD44T mRNA の発現は低下していなかった(図 3f)。CD44T mRNA の発現は、原発結腸癌よりも肝転移で独特に高かったが、統計的な差は認めなかった。

### 2-3. 考察

癌幹細胞仮説は、癌幹細胞性が治療抵抗性と関連していることが提唱されたため、長い間注目されてきた<sup>28-30)</sup>。その後のいくつかの報告では、癌幹細胞性は、予後不良因子である転移能と相関している可能性があることが提唱されており<sup>31-33)</sup>、癌幹細胞性は癌転移を制御するための標的になり得ると考えられている。しかしながら、幹細胞マーカーが臨床的に癌転移の予測因子となり得るかどうかは、はっきりしていない。本研究では、この重要な臨床的テーマを探索したいと考えた。

原発結腸癌のバイオマーカーである Asc12 や PRL3 に関するわれわれの初期の報告<sup>34, 35)</sup>と併せて、われわれは CD44V や CD133 などのよく知られている原発結腸癌の癌幹細胞マーカーを mRNA レベルで調査した。その結果、幹細胞マーカーである CD44V

は、Ascl2<sup>34, 35)</sup>と同様に原発結腸癌組織において顕著な高発現を示したが、転移などの結腸癌の攻撃的な表現型とはまったく関連していなかった。これらの結果は、Ascl2 および CD44V によって引き起こされる癌幹細胞性が、原発腫瘍の臨床検体における転移の可能性を必ずしも表現していないことを示している。

一方この研究では、CD133 mRNA は原発結腸癌組織で発現を認めていたが、非癌粘膜組織でもかなりの量の CD133 転写産物が発現していた。これまでの報告では原発結腸癌組織における CD133 mRNA の有意な高発現が報告されていたため ( $p=0.001$ )<sup>36)</sup>、非癌粘膜組織での CD133 の mRNA レベルでの高発現については信憑性が疑われた。これらを検証するために、公開データベースを使用して CRC の CD133 mRNA レベルでの発現を調査し<sup>27)</sup>、非癌粘膜上皮および間質での発現を確認した (図 3d)。他の研究者による検証においても、分化した結腸粘膜が CD133 の mRNA レベルでの明確な発現を示したため、我々の結果の信憑性が支持されたと考えられた<sup>37)</sup>。これらの結果は、CD133 の機能的役割が癌組織と非癌粘膜で異なる可能性があることを示している。

CD133 の mRNA レベルにおいては、結腸癌の転移とはまったく相関が見られないが、われわれのデータは、CD133 タンパク質が CRC の生存率の低さと相関する可能性があるという初期の発見を否定することはできない<sup>38, 39)</sup>。さらに、CD133 は十分に確立された癌幹細胞マーカーであり、結腸癌を含む多くの癌腫に対する治療抵抗性において重要な役割を果たすことが明確に示されている<sup>28, 40)</sup>。

HDAC6 (ヒストン脱アセチル化酵素複合体 6) と  $\beta$ -カテニンは CD133 と三元複合体を形成し、HDAC6 デアセチラーゼ活性を介して  $\beta$ -カテニンと CD133 タンパク質を安定化させ、間葉から上皮への分化を抑制する<sup>41)</sup>。したがって、CD133 は、形質転換された結腸細胞の場合にのみ、APC/ $\beta$ -カテニンシグナル伝達を増幅させる可能性がある。CD133 発現は、過剰に活性化された Ras-Raf-MEK-ERK 経路を有する CRC 腫瘍でアップレギュレートされることが最近報告されたため、K-ras または BRAF の変異に関連している<sup>42)</sup>。さらに、K-ras 変異が癌幹細胞を活性化し、APC 変異を有する CRC 細胞の結腸直腸腫瘍形成および転移に寄与することが示された<sup>43)</sup>。これらの知見では CD133 が CRC の進行に極め



て重要な役割を果たすことの説明は可能であるが、非癌粘膜における CD133 の果たす役割を説明することはできない。

それにも関わらず、われわれの研究では癌幹細胞マーカーの転写産物の発現は、原発結腸癌よりも肝転移で有意に低かったため、転移などの攻撃的な性質をまったく表現していなかった(図 3f)。癌幹細胞マーカーの転写産物が少ないことは、転移において幹細胞より非幹細胞である間質細胞が多く関与している可能性を示している。一般的に幹細胞集団は、総腫瘍細胞集団のごく一部を占めるに過ぎず、この非幹細胞が関与しているメカニズムは癌の進行において大きな役割を果たしている可能性がある<sup>40)</sup>。また、予後不良を示す結腸癌の転移は、独自の分子プロファイルを有する特定の癌関連線維芽細胞(CAF)と関連している可能性があり<sup>44)</sup>、幹細胞の機能は、腫瘍の拡大中に微小環境的に定義される<sup>45)</sup>。したがって、幹細胞マーカーの転写産物は、間質活性化のために著しく希釈され、相対的に転移が少ないように見えるという解釈ができると考えられた。

CD44V(v8-10)は、腫瘍増殖を促進するシスチントランスポーター(xCT)との結合領域を含む v9 を含んでおり<sup>11)</sup>、膜貫通型 xCT を介して酸化還元状態を調節し、癌幹細胞性を表す癌開始能におけるシステイン代謝の重要な役割を果たしている<sup>12)</sup>。一方で癌細胞表面から放出された可溶性 CD44 は、腫瘍関連マクロファージ(TAM)におけるマクロファージ IL-1 産生を誘発することにより、腫瘍転移を促進するとの報告がある<sup>46)</sup>。この可溶性 CD44 は CD44T を反映している可能性が考えられ、腫瘍の進行における個々の CD44 アイソフォームの異なる役割を示していると考えられた。

本研究での癌幹細胞マーカーの定量的評価により、右側結腸癌における独自の発現パターンが明らかになった。これは新しい個別化された治療戦略につながる可能性が示唆された。しかしながら、本研究で調査した幹細胞マーカー(CD44V、CD133)の mRNA レベルでの発現は当初の予想に反し、大腸癌の転移と正の相関を認めず、転移マーカーとして利用することは難しいと考えられた。

## 2-4. 結語

癌幹細胞マーカーの定量的評価により、右側結腸癌は独自の発現パターンを呈していた。

一方で、幹細胞マーカー(CD44V、CD133)の mRNA レベルでの発現は結腸癌の転移と正の相関を認めなかった。

## 3. 総括

本研究では、結腸癌の転移における幹細胞マーカー発現腫瘍細胞への依存性低下について検討した。

癌幹細胞マーカーの定量的評価により、右側結腸癌における独自の発現パターンを明らかにすることができ、新しい個別化された治療戦略につながる可能性が示唆された。その一方で、本研究で調査した幹細胞マーカー(CD44V、CD133)の mRNA レベルでの発現については、転移と正の相関は認めなかった。

既知の癌幹細胞マーカーにおいて、その癌開始能が遠隔転移やリンパ節転移などの予後不良因子を増長させる可能性が論じられているが、本研究ではその癌幹細胞マーカーの発現と癌悪性度がむしろ逆相関傾向にあること示され、新たな知見が得られた。

最近の報告では、腫瘍微小環境と癌の進行や転移の関与が指摘されている。腫瘍微小環境は Tumor Micro Environment (TME) と呼ばれ、癌細胞とともに免疫系細胞や血管系細胞、細胞外基質や線維芽細胞などの細胞が作り出す複雑な微小環境のことを指している。特に、癌細胞を取り巻く癌間質においてマクロファージや線維芽細胞は、腫瘍関連マクロファージ(TAM)や癌関連線維芽細胞(CAF)と通常のマクロファージや線維芽細胞とは区別され、腫瘍微小環境において癌の進行や転移だけでなく、治療抵抗性などに寄与している可能性が指摘されている。癌転移は腫瘍微小環境の変化により形成され、原発癌では幹細胞性がなくても転移形成能が獲得されていると言われて<sup>47)</sup>。本研究では癌幹細胞マーカーの発現が癌の進行や転移などの悪性度と結びつく結果は得られなかった。むしろ癌の進展には腫瘍微小環境が関与し、TAM や CAF などの癌間質における機能解析が今後の癌転移などの治療標的として期待できるのかもしれない。



#### 4. 引用文献

1. Ferlay J, Colombet M, Soerjomataram I, et al: Estimating the global cancer incidence and mortality in 2018: GLOBOCAN sources and methods. *Int J Cancer*. 2019; 144:1941-1953
2. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. *Nature*. 2012; 487:330-337
3. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, et al: K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2008; 359:1757-1765
4. Masuda M, Uno Y, Ohbayashi N, et al: TNIK inhibition abrogates colorectal cancer stemness. *Nat Commun*. 2016; 7:12586
5. Schulz-Heddergott R, Stark N, Edmunds SJ, et al: Therapeutic Ablation of Gain-of-Function Mutant p53 in Colorectal Cancer Inhibits Stat3-Mediated Tumor Growth and Invasion. *Cancer Cell*. 2018; 34:298-314 e7
6. Tanaka T, Watanabe M, Yamashita K: Potential therapeutic targets of TP53 gene in the context of its classically canonical functions and its latest non-canonical functions in human cancer. *Oncotarget*. 2018; 9:16234-16247
7. Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al: Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104:10158-10163
8. Todaro M, Francipane MG, Medema JP, et al: Colon cancer stem cells: promise of targeted therapy. *Gastroenterology*. 2010; 138:2151-2162
9. de Sousa EMF, Colak S, Buikhuisen J, et al: Methylation of cancer-stem-cell-associated Wnt target genes predicts poor prognosis in colorectal cancer patients. *Cell Stem Cell*. 2011; 9:476-485
10. Giakountis A, Moulos P, Zarkou V, et al: A Positive Regulatory Loop between a Wnt-Regulated Non-coding RNA and ASCL2 Controls Intestinal Stem Cell Fate. *Cell Rep*. 2016; 15:2588-2596

11. Ishimoto T, Nagano O, Yae T, et al: CD44 variant regulates redox status in cancer cells by stabilizing the xCT subunit of system xc(-) and thereby promotes tumor growth. *Cancer Cell*. 2011; 19:387-400
12. Kang YP, Torrente L, Falzone A, et al: Cysteine dioxygenase 1 is a metabolic liability for non-small cell lung cancer. *Elife*. 2019; 8:e45572
13. Rodriguez C, Monges G, Rouanet P, et al: CD44 expression patterns in breast and colon tumors: a PCR-based study of splice variants. *Int J Cancer*. 1995; 64:347-354
14. Goodison S, Yoshida K, Sugino T, et al: Rapid analysis of distinctive CD44 RNA splicing preferences that characterize colonic tumors. *Cancer Res*. 1997; 57:3140-3144
15. Tanabe KK, Ellis LM, Saya H: Expression of CD44R1 adhesion molecule in colon carcinomas and metastases. *Lancet*. 1993; 341:725-726
16. Mulder JW, Kruijt PM, Sewnath M, et al: Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet*. 1994; 344:1470-1472
17. Gotley DC, Fawcett J, Walsh MD, et al: Alternatively spliced variants of the cell adhesion molecule CD44 and tumour progression in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 1996; 74:342-351
18. Givvehchian M, Wörner S, Sträter J, et al: No evidence for cancer-related CD44splice variants in primary and metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 1998; 34:1099-1104
19. Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, et al: Receptor for hyaluronan-mediated motility and CD44 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Jpn J Cancer Res*. 1999; 90:987-992
20. Yamada Y, Itano N, Narimatsu H, et al: CD44 variant exon 6 expressions in colon cancer assessed by quantitative analysis using real time reverse transcriptase-polymerase chain reaction.

21. Matsumura Y, Tarin D: Significance of CD44 gene products for cancer diagnosis and disease evaluation. *Lancet*. 1992; 340:1053-1058
22. Ward R, Meagher A, Tomlinson I, et al: Microsatellite instability and the clinicopathological features of sporadic colorectal cancer. *Gut*. 2001; 48:821-829
23. Yaeger R, Chatila WK, Lipsyc MD, et al: Clinical Sequencing Defines the Genomic Landscape of Metastatic Colorectal Cancer. *Cancer Cell*. 2018; 33:125-136 e3
24. Shirasawa S, Furuse M, Yokoyama N, et al: Altered growth of human colon cancer cell lines disrupted at activated Ki-ras. *Science*. 1993; 260:85-88
25. Yi JM, Tsai HC, Glöckner SC, et al: Abnormal DNA methylation of CD133 in colorectal and glioblastoma tumors. *Cancer Res*. 2008; 68:8094-8103
26. Hibi K, Sakata M, Kitamura YH, et al: Demethylation of the CD133 gene is frequently detected in advanced colorectal cancer. *Anticancer Res*. 2009; 29:2235-2237
27. Nishida N, Nagahara M, Sato T, et al: Microarray analysis of colorectal cancer stromal tissue reveals upregulation of two oncogenic miRNA clusters. *Clin Cancer Res*. 2012; 18:3054-3070
28. Bao S, Wu Q, McLendon RE, et al: Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature*. 2006; 444:756-760
29. Todaro M, Alea MP, Di Stefano AB, et al: Colon cancer stem cells dictate tumor growth and resist cell death by production of interleukin-4. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:389-402
30. Ma S, Lee TK, Zheng BJ, et al: CD133+ HCC cancer stem cells confer chemoresistance by preferential expression of the Akt/PKB survival pathway. *Oncogene*. 2008; 27:1749-1758

31. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al: Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:313-323
32. Ieta K, Tanaka F, Haraguchi N, et al: Biological and genetic characteristics of tumor-initiating cells in colon cancer. *Ann Surg Oncol*. 2008; 15:638-648
33. Zeppernick F, Ahmadi R, Campos B, et al: Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin Cancer Res*. 2008; 14:123-129
34. Tanaka T, Kojima K, Yokota K, et al: Comprehensive Genetic Search to Clarify the Molecular Mechanism of Drug Resistance Identifies ASCL2-LEF1/TSPAN8 Axis in Colorectal Cancer. *Ann Surg Oncol*. 2019; 26:1401-1411
35. Yokota K, Tanaka Y, Harada H, et al: WntRLINC1/ASCL2/c-Myc Axis Characteristics of Colon Cancer with Differentiated Histology at Young Onset and Essential for Cell Viability. *Ann Surg Oncol*. 2019; 26:4826-4834
36. Artells R, Moreno I, Díaz T, et al: Tumour CD133 mRNA expression and clinical outcome in surgically resected colorectal cancer patients. *Eur J Cancer*. 2010; 46:642-649
37. Karbanová J, Missol-Kolka E, Fonseca AV, et al: The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia. *J Histochem Cytochem*. 2008; 56:977-993
38. Kojima M, Ishii G, Atsumi N, et al: Immunohistochemical detection of CD133 expression in colorectal cancer: a clinicopathological study. *Cancer Sci*. 2008; 99:1578-1583
39. Horst D, Kriegl L, Engel J, et al: CD133 expression is an independent prognostic marker for low survival in colorectal cancer. *Br J Cancer*. 2008; 99:1285-1289
40. Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*. 2007; 445:111-115



41. Mak AB, Nixon AM, Kittanakom S, et al: Regulation of CD133 by HDAC6 promotes  $\beta$ -catenin signaling to suppress cancer cell differentiation. *Cell Rep.* 2012; 2:951-963
42. Kemper K, Versloot M, Cameron K, et al: Mutations in the Ras-Raf Axis underlie the prognostic value of CD133 in colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2012; 18:3132-3141
43. Moon BS, Jeong WJ, Park J, et al: Role of oncogenic K-Ras in cancer stem cell activation by aberrant Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Natl Cancer Inst.* 2014; 106:djt373
44. Li H, Courtois ET, Sengupta D, et al: Reference component analysis of single-cell transcriptomes elucidates cellular heterogeneity in human colorectal tumors. *Nat Genet.* 2017; 49:708-718
45. Lenos KJ, Miedema DM, Lodestijn SC, et al: Stem cell functionality is microenvironmentally defined during tumour expansion and therapy response in colon cancer. *Nat Cell Biol.* 2018; 20:1193-1202
46. Jang JH, Kim DH, Lim JM, et al: Breast Cancer Cell-Derived Soluble CD44 Promotes Tumor Progression by Triggering Macrophage IL1 $\beta$  Production. *Cancer Res.* 2020; 80:1342-1356
47. Yang CH, Kathleen M, Raghu K, et al: Clinical and therapeutic relevance of cancer-associated fibroblasts. *Nat Rev Clin Oncol.* 2021; 18(12):792-804

## 5. 謝辞

稿を終えるにあたり、本研究において御指導を賜りました  
北里大学医学部 上部消化管外科学 主任教授 比企 直樹 先生  
北里大学医学部 下部消化管外科学 主任教授 内藤 剛 先生  
北里大学医学部附属新世紀医療開発センター  
先進腫瘍外科学 教授 山下 継史 先生  
に厚く御礼申し上げます。

また、本研究において技術的指導を賜りました  
北里大学医学部 技術員 三宅 友海 氏  
松尾 由紀子 氏  
藤谷 和子 氏

に重ねて御礼申し上げます。

最後に、本研究において多大なご協力とご助言を賜りました  
北里大学大学院医療系研究科外科学教室の諸先生方  
に心より御礼申し上げます。

## 7. 図表

表1. 右側結腸癌における臨床病理学的因子とCD44V発現の関係

	症例数	CD44V発現		p値
	n=31	高	低	
性別				NS*
男性	11 (35%)	4 (33%)	7 (37%)	
女性	20 (65%)	8 (67%)	12 (63%)	
年齢				p=0.041*
< 70歳	9 (29%)	6 (50%)	3 (16%)	
≥ 70歳	22 (71%)	6 (50%)	16 (84%)	
T因子				NS*
I	8 (26%)	5 (41%)	3 (16%)	
II	5 (16%)	2 (17%)	3 (16%)	
III	15 (48%)	3 (25%)	12 (63%)	
IV	3 (10%)	2 (17%)	1 (5.0%)	
N因子				NS (p=0.060)**
0	18 (58%)	10 (83%)	8 (42%)	
1	11 (35%)	2 (17%)	10 (53%)	
2	2 (7.0%)	0 (0%)	1 (5.0%)	
M因子				NS**
0	28 (90%)	12 (100%)	16 (84%)	
1	3 (10%)	0 (0%)	3 (16%)	
リンパ管侵襲				NS*
無	23 (74%)	10 (83%)	13 (68%)	
有	8 (26%)	2 (17%)	6 (32%)	
脈管侵襲				NS*
無	11 (35%)	5 (42%)	6 (32%)	
有	20 (65%)	7 (58%)	13 (68%)	
MSI				NS (p=0.077)*
High	8 (26%)	1 (8.0%)	7 (37%)	
Low	23 (74%)	11 (92%)	12 (63%)	

NS : 有意差なし \* カイ二乗検定 \*\* フィッシャー正確確率検定

補表1. PCRに使用したプライマーおよびプローブの配列	
標的遺伝子	Forwardプライマー
<i>CD44V</i> (Variant 8-10)	5'-TGGACAGGACAGGACCTCTT-3'
<i>CD44T</i> (Exon4-5)	5'-AGTCACAGACCTGCCCAATG-3'
<i>CD133 (PROM1)</i>	5'-CCTTCATCCACAGATGCTCCTAA-3'
	Reverseプライマー
<i>CD44V</i> (Variant 8-10)	5'-GGGTCTCTTCTTCCACCTGTG-3'
<i>CD44T</i> (Exon4-5)	5'-AACCTCCTGAAGTGCTGCTC-3'
<i>CD133 (PROM1)</i>	5'-TAATAAACAGCAGCCCCAGGAC-3'
	プローブ
<i>CD44V</i> (Variant 8-10)	5' (FAM)-ACGCAGCAGAGTAATTCTCAGAGCTTC-3' (TMRA)
<i>CD44T</i> (Exon4-5)	5' (FAM)-CCATAACTATTGTTAACCGTGATGGCACCC-3' (TMRA)
<i>CD133 (PROM1)</i>	5' (FAM)-TGTGGTACAGCCGCGTGATTTCCAGA-3' (TMRA)

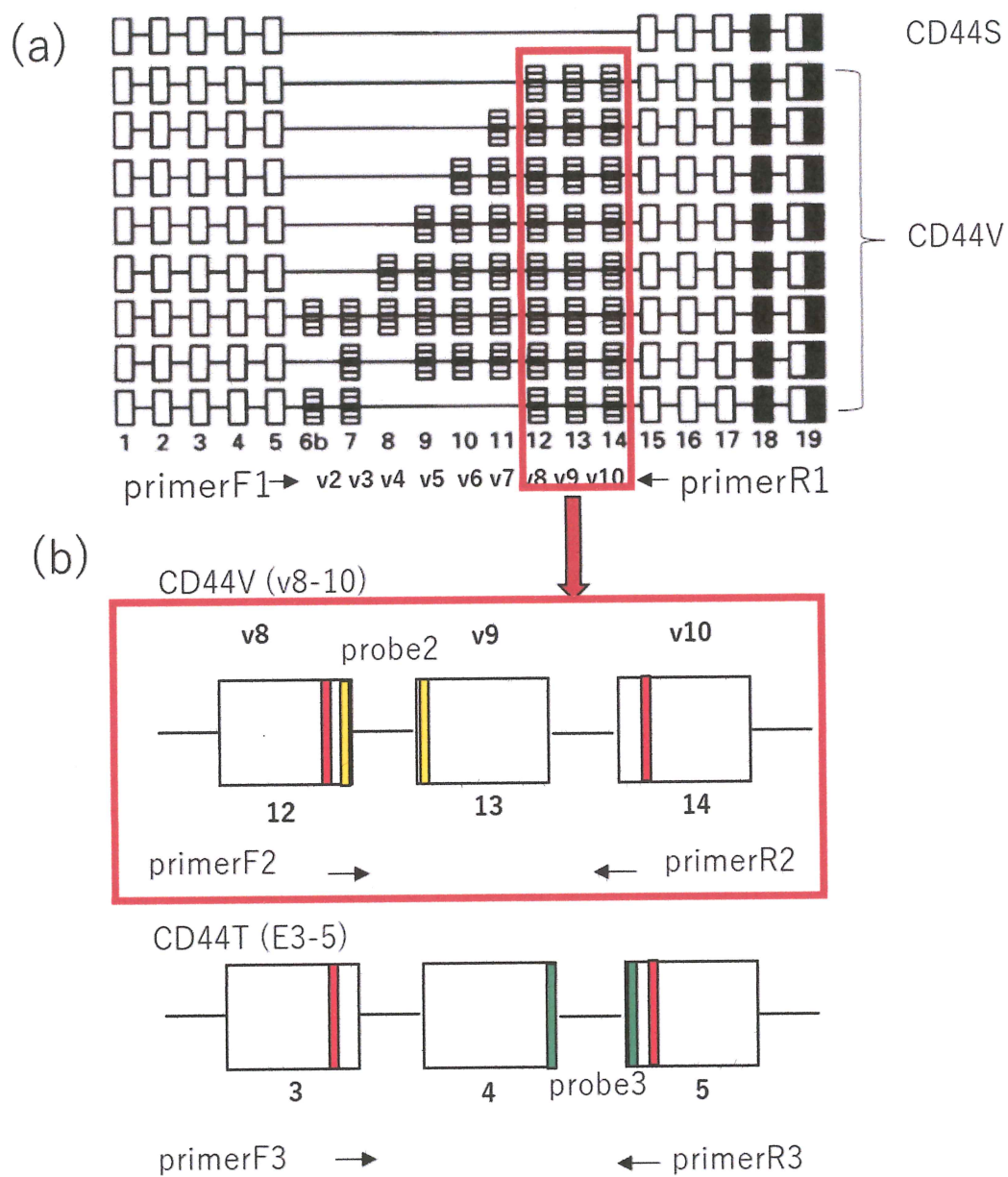


補表2. 結腸癌における臨床病理学的因子とCD133発現の関係

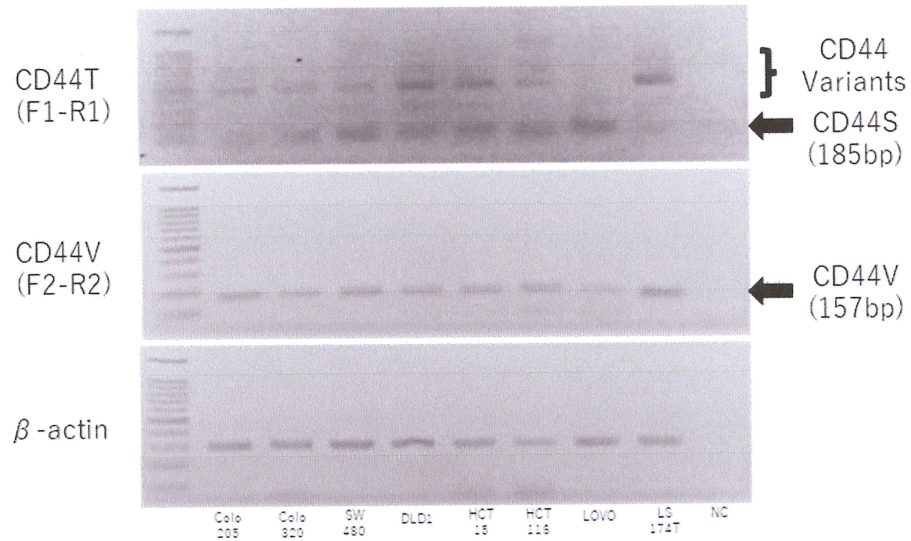
	症例数	CD133発現		p値
	n=60	高 (n=47)	低 (n=13)	
性別				NS*
男性	22 (37%)	19 (40%)	3 (23%)	
女性	38 (63%)	28 (60%)	10 (77%)	
年齢				NS*
< 70歳	22 (37%)	15 (32%)	7 (54%)	
≥ 70歳	38 (63%)	32 (68%)	6 (46%)	
局在部位				p=0.020*
右側結腸	31 (52%)	28 (60%)	3 (23%)	
左側結腸	29 (48%)	19 (40%)	10 (77%)	
T因子				NS*
1	13 (22%)	9 (18%)	4 (31%)	
2	6 (10%)	5 (11%)	1 (8.0%)	
3	34 (57%)	28 (60%)	6 (46%)	
4	7 (11%)	5 (11%)	2 (15%)	
N因子				NS*
0	38 (63%)	30 (64%)	8 (61%)	
1	18 (30%)	14 (30%)	4 (31%)	
2	4 (7.0%)	3 (6.0%)	1 (8.0%)	
M因子				NS**
0	54 (90%)	41 (87%)	13 (100%)	
1	6 (10%)	6 (13%)	0 (0.0%)	
リンパ管侵襲				NS*
無	44 (73%)	36 (77%)	8 (61%)	
有	16 (27%)	11 (23%)	5 (39%)	
脈管侵襲				NS*
無	19 (32%)	17 (36%)	2 (15%)	
有	41 (68%)	30 (64%)	11 (85%)	

NS : 有意差なし \* カイ二乗検定 \*\* フィッシャー正確確率検定

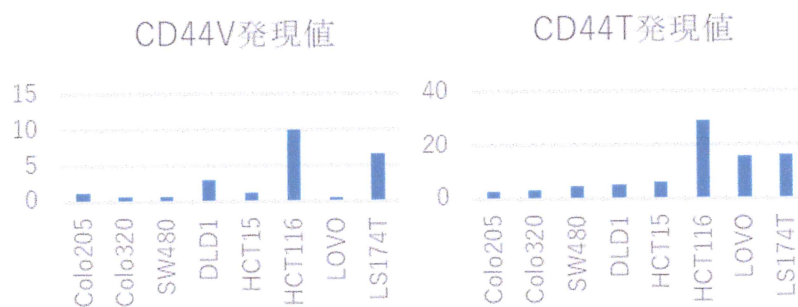
図 1



(c)



(d)



(e)

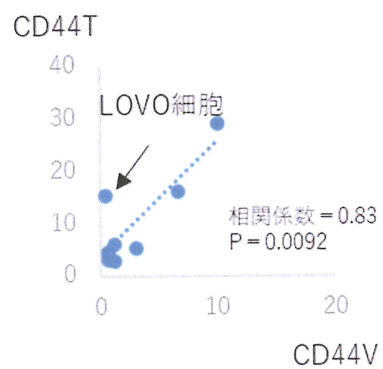
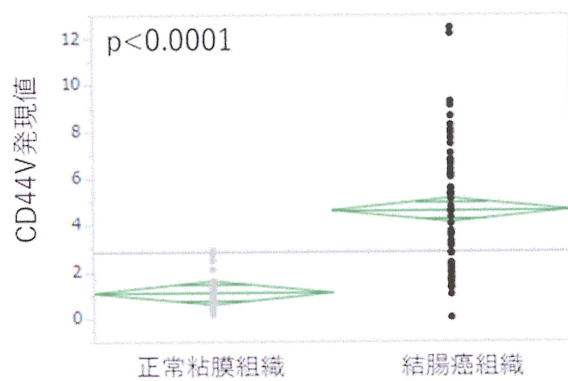
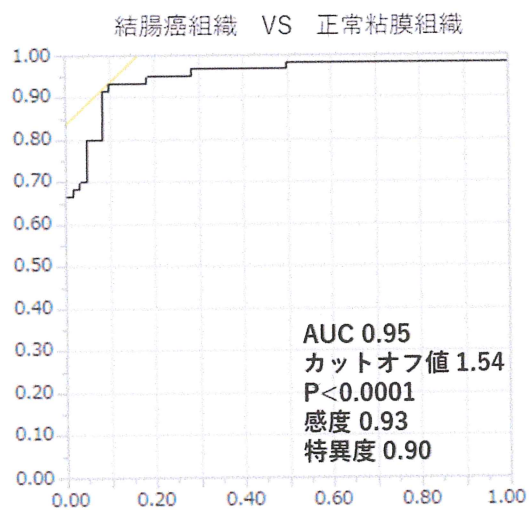


図 2

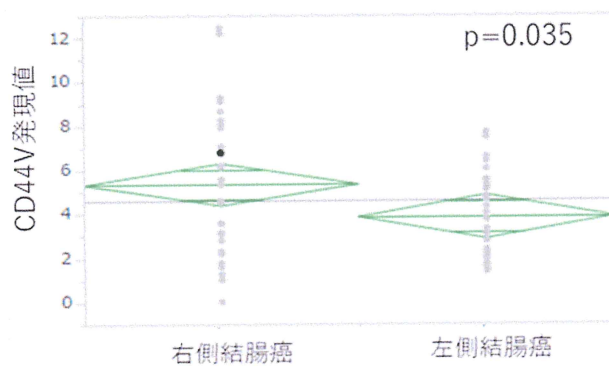
(a)



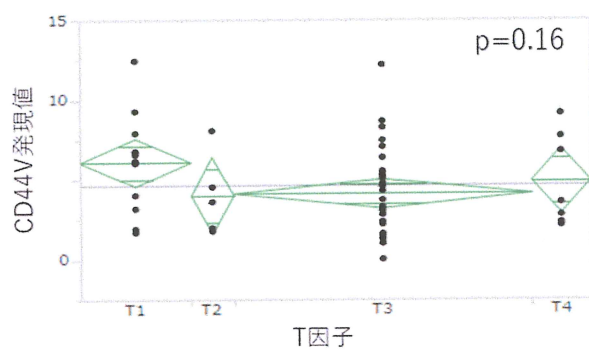
(b)



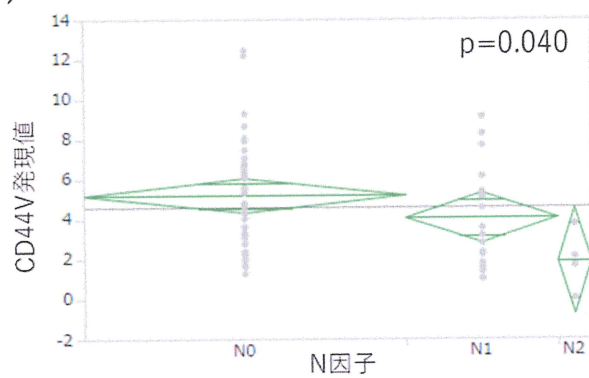
(c)



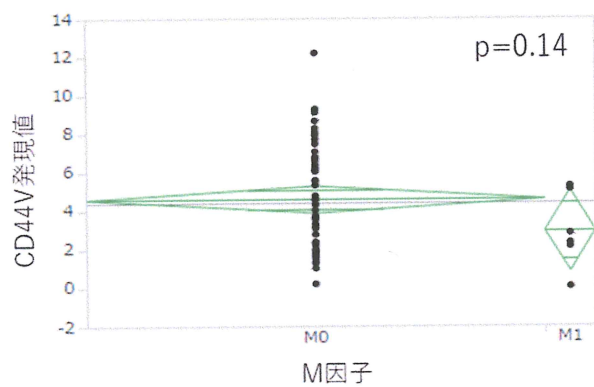
(d)



(e)



(f)



(g)

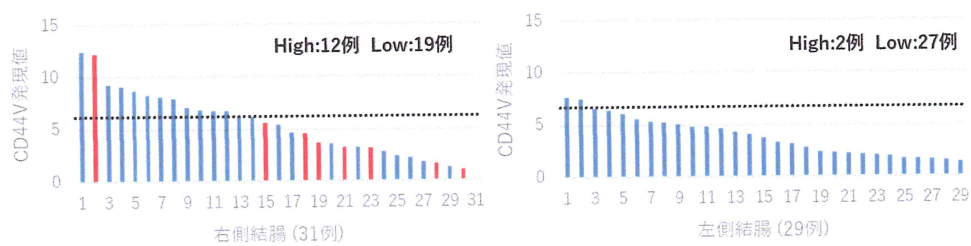
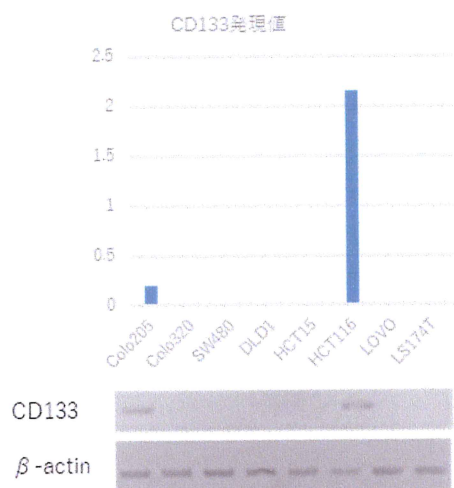
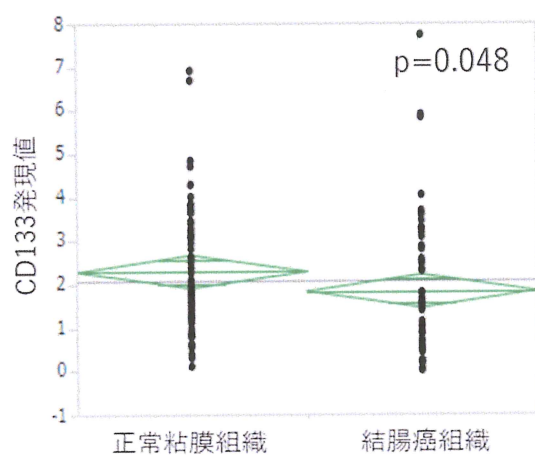


図 3

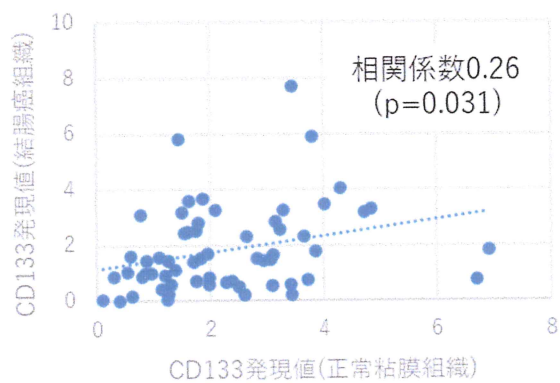
(a)



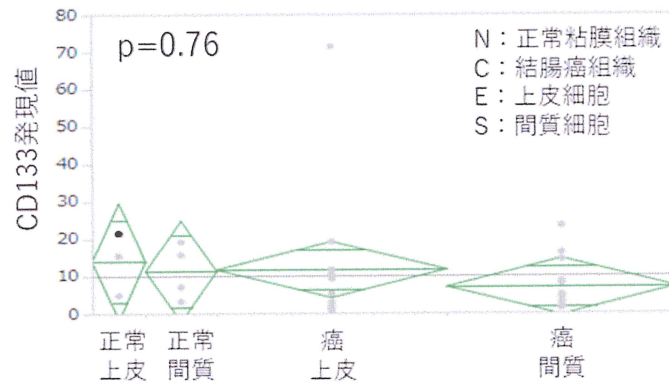
(b)



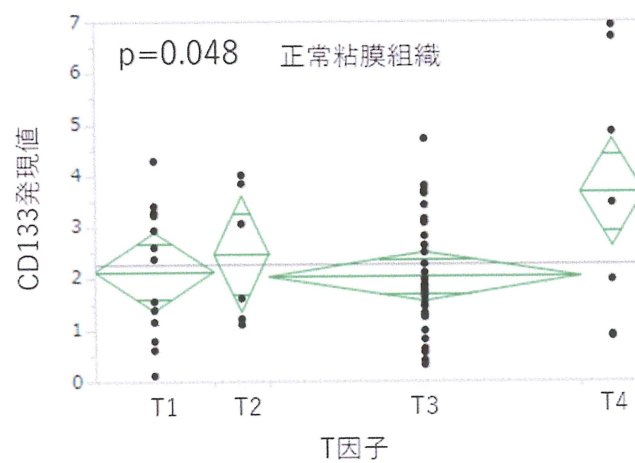
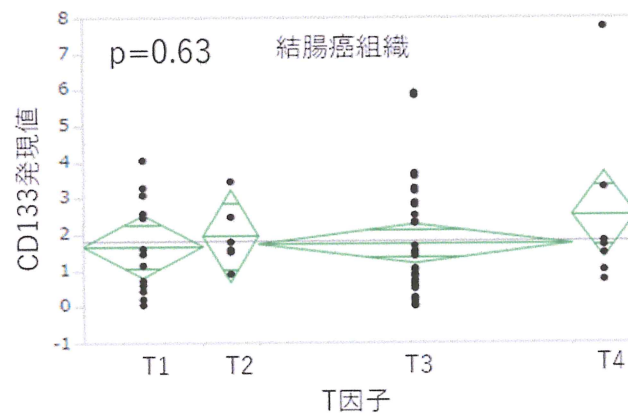
(c)



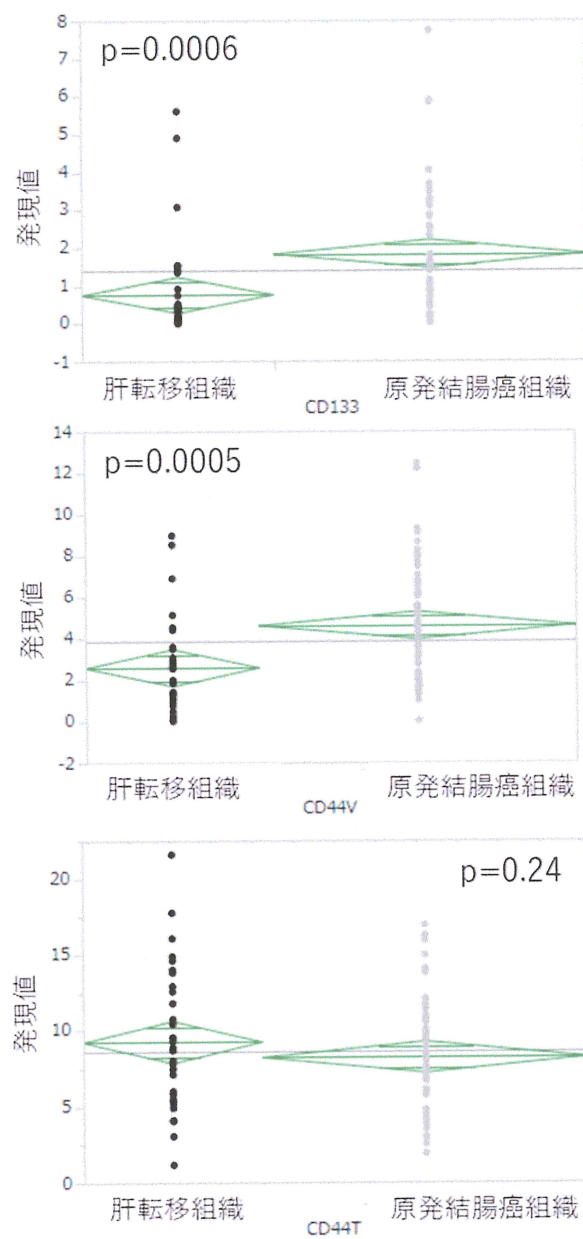
(d)



(e)

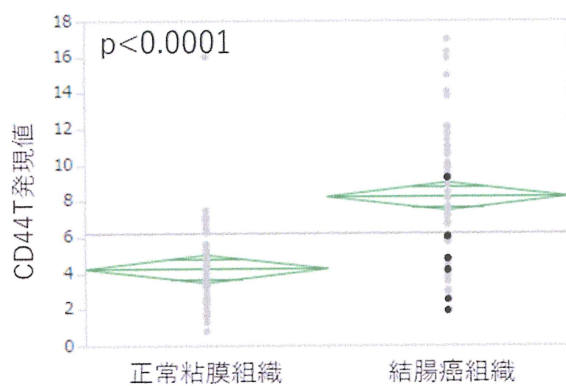


(f)

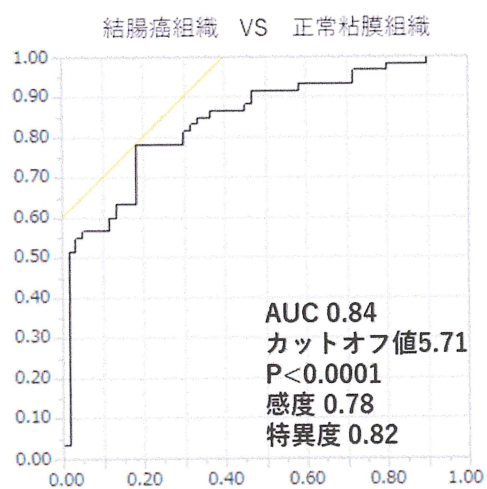




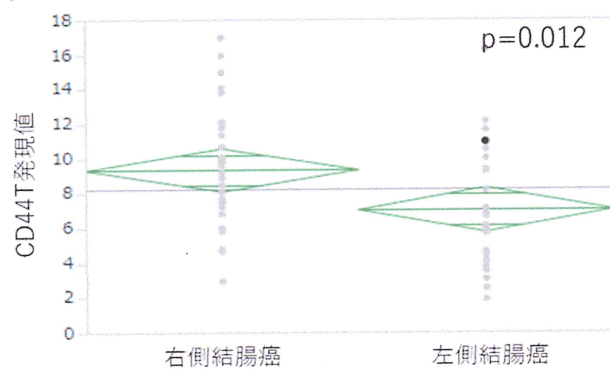
補図 1  
(a)



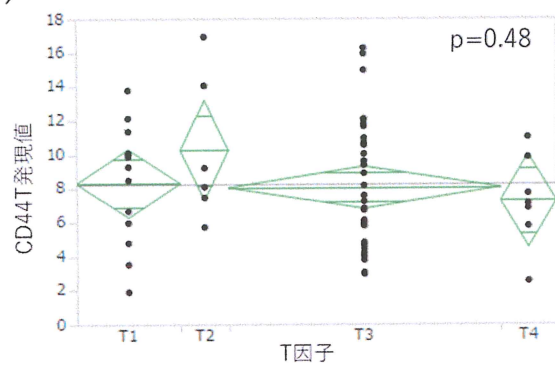
(b)



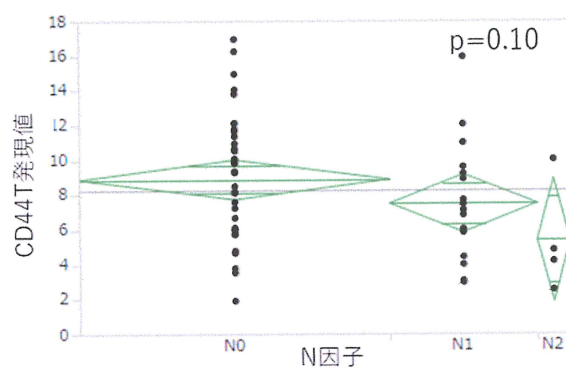
(c)



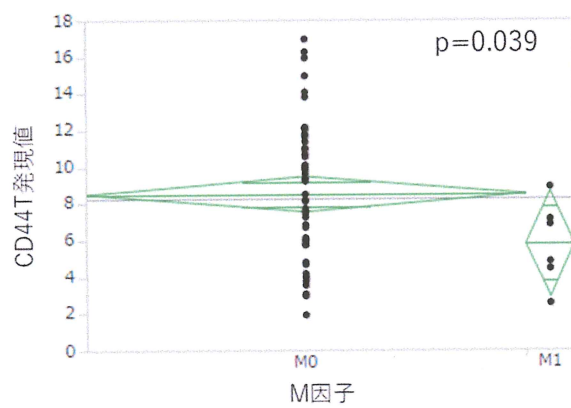
(d)



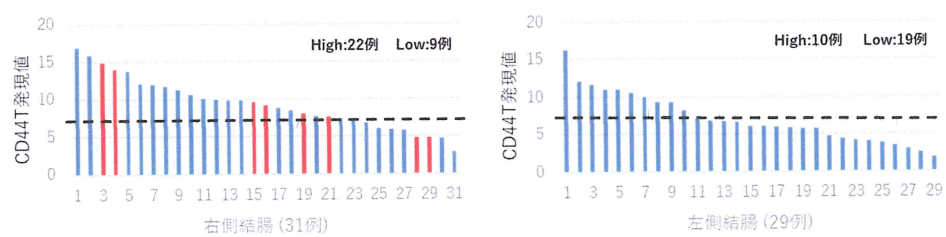
(e)



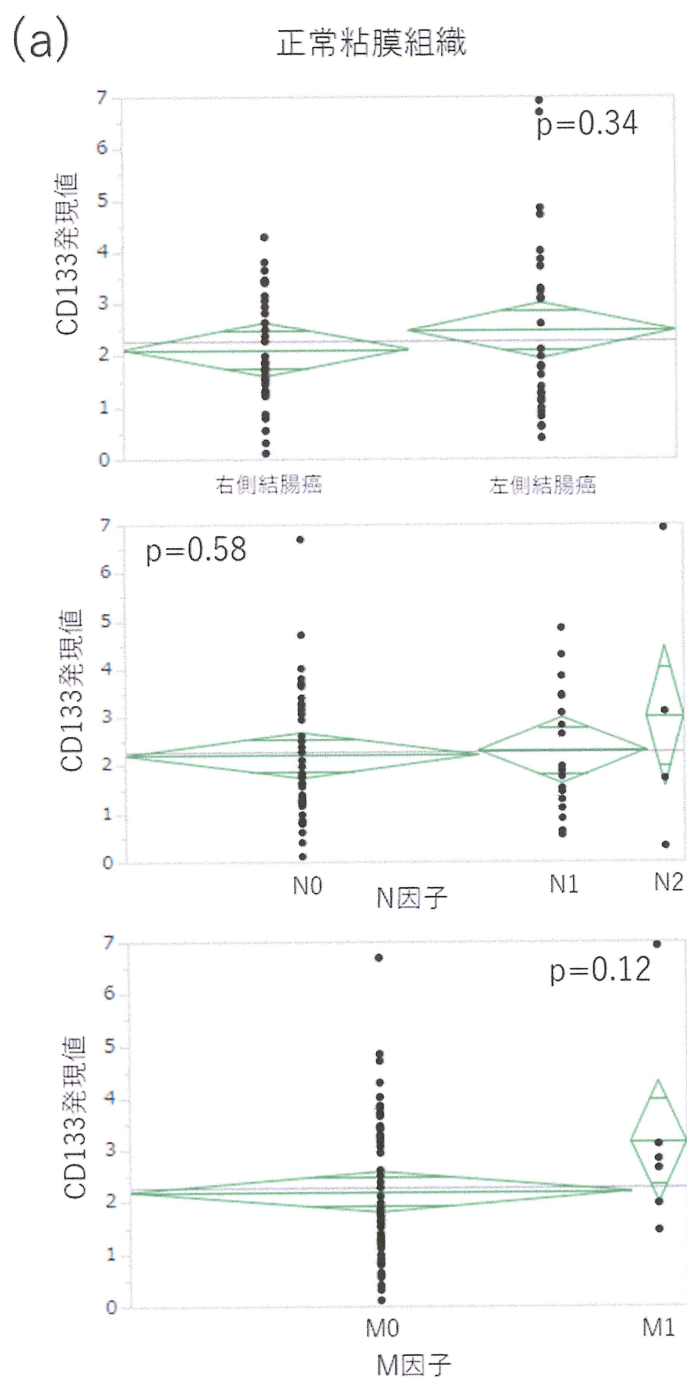
(f)



(g)



補図 2



(b)

原発結腸癌組織

