

「CD109 expression in tumor cells and stroma correlates with  
progression and prognosis in pancreatic cancer」

(腫瘍細胞および間質における CD109 の発現は、膵臓癌の進行および予後と関連する)

論文要旨

北里大学 DM18001 安達 快

## 1. 序論

膵管癌 (Pancreatic ductal adenocarcinoma: PDAC) は、高い致死率を伴う予後不良な悪性腫瘍である。病理学的には、PDAC は高い浸潤性を有し、線維性間質を伴って周囲の組織に急速に浸潤し、遠隔臓器に転移する。手術例を含めた 5 年生存率は 10%程度で、80%以上の患者が手術不能な状態で診断される。また、手術可能な症例でも PDAC は早期に再発し、5 年生存率は 10%~25%となっている。PDAC の予後を改善するためには、疾患の早期発見による手術可能症例の増加と、手術不能症例や再発症例に対する有効な抗がん剤治療の開発が重要である。しかし、PDAC の早期発見や予後予測に有用な分子マーカーは現在のところ存在せず、PDAC の治療に使用できる有効な分子標的薬もほとんどないのが現状である。したがって、膵臓癌の新しい診断マーカー・予後予測マーカーや分子標的治療薬の開発が望まれる。

CD109 は、グリコシルホスファチジルイノシトールアンカー型の細胞表面に存在する糖タンパクで、 $\alpha 2$ -マクログロブリン/C3, C4, C5 ファミリーに属する。CD109 は、形質転換増殖因子  $\beta 1$  (Transforming growth factor (TGF)- $\beta 1$ ) およびその受容体と複合体を形成し、TGF- $\beta 1$  シグナルを抑制するとともに、上皮成長因子受容体 (Epidermal growth factor receptor: EGFR) と複合体を形成し、EGF シグナルを促進的に制御することが報告されている。また、CD109 は、ヒトやマウスにおいて、腫瘍細胞から血清中に分泌されるエクソソームの構成成分である。CD109 が、上皮間葉転換を制御していることも報告されている。これまでも、正常組織と腫瘍組織における CD109 の発現については多数報告されている。正常組織では、CD109 は、乳腺、唾液腺、涙腺、気管支腺の筋上皮細胞、気管支上皮や前立腺の基底細胞、血管内皮細胞などの限られた細胞でのみ発現が認められるが、多くの上皮細胞では発現が検出されないことが報告されている。一方、CD109 は、口腔、食道、子宮頸部、皮膚、肺の扁平上皮癌、膀胱の尿路上皮癌、乳癌、メラノーマ、膠芽腫、悪性リンパ腫、肉腫などの悪性細胞に高発現していることが報告されている。またいくつかの報告では、CD109 発現の臨床的意義が示されており、CD109 が高発現している腫瘍は、低発現の腫瘍と比較して、予後が悪いことが明らかになっている。近年、CD109 の発現が、JAK-signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3)、EGFR-AKT-mTOR、または TGF- $\beta$  シグナルの調節を通じて、肺腺癌の進行と関連していることが報告された。しかし、CD109 の膵臓癌における報告はわずかであり、腫瘍細胞を取り巻く間質における CD109 の発現の臨床的意義は明らかにされていない。

本研究では、豊富な線維性間質を有する悪性腫瘍である PDAC における CD109 発現の意義を臨床検体や細胞株を用いて検討した。腫瘍細胞だけでなく、周囲の間質での CD109 の発現も PDAC の腫瘍進行や予後不良と関連しており、CD109 は膵臓癌の有用な予後マーカーとなる可能性がある。

## 2. 方法と結果

### 2-1. 手術検体を用いた解析

#### 2-1-1. 腫瘍細胞における CD109 の高発現は、PDAC の予後不良と関連する

PDAC 患者 92 名の手術標本における CD109 の発現を、抗 CD109 (C-9) 抗体を用いた免疫組織化学的解析により調べた。正常な膵臓組織では、膵管上皮や腺房細胞は陰性であったが、血管内皮細胞は CD109 の発現が陽性であった。PDAC 腫瘍細胞では、CD109 は主に細胞膜に局在していたが、しばしば細胞質全体にびまん性に発現していた。また、正常膵臓組織および腫瘍細胞における *CD109*mRNA の発現を *in situ* hybridization により解析し、正常な腺上皮および腺房細胞では陰性、血管内皮細胞および PDAC 腫瘍細胞では陽性であることを確認した。腫瘍組織における CD109 の発現を 92 例全てで評価した。全症例を CD109-tumor-positive 群 (n=49, 53.3%) と -negative 群 (n=43, 46.7%) に分類し、腫瘍細胞における CD109 の発現と臨床病理学的パラメータとの相関関係を統計的に解析した。CD109 陽性の腫瘍は、PDAC の TNM stage ( $\geq$  stage II+III+IV,  $p=0.060$ )、histopathological grading ( $\geq$  G2+G3,  $p=0.054$ ) が高い傾向を示したが、その差は有意ではなかった。Kaplan-Meier 解析と log-rank 検定では、CD109-tumor-positive 群は、CD109-tumor-negative 群に比べて、DFS と OS が有意に短かった (DFS,  $p=0.003$ ; OS,  $p=0.002$ )。これらの結果は、PDAC 腫瘍細胞における CD109 の発現が患者の予後と関連していることを示唆している。

#### 2-1-2. 間質にも CD109 の染色性が認められ、 $\alpha$ -SMA の染色性と類似している

本研究の免疫組織化学染色では、かなりの数のサンプルにて、腫瘍細胞を取り巻く間質に CD109 の染色性を認めた。CD109 の染色性はがん関連線維芽細胞 (Cancer-associated fibroblasts: CAFs) の組織学的マーカーである  $\alpha$ -SMA の染色性と類似しており、このことは CD109 と  $\alpha$ -SMA の蛍光二重染色でも確認された。また、間質における *CD109*mRNA の発現は、*in situ* hybridization によっても確認され、間質の線維芽細胞様細胞の周囲に *CD109* mRNA の陽性シグナルが散在していることが示された。これらの結果から、腫瘍周囲の間質での CD109 の発現は、CAF の存在を示している可能性が示唆された。

#### 2-1-3. 間質での CD109 の発現は PDAC の腫瘍の進行と関連する

次に、CAFs の存在が腫瘍の進行と関連していることから、間質組織における CD109 の発現と臨床病理学的パラメータとの相関を分析した。間質における CD109 の発現は、すべての患者を CD109-stroma-positive 群 (n=44, 47.8%) と -negative 群 (n=48, 52.2%) に分類した。その結果、TNM stage ( $\geq$  stage II+III+IV,  $p=0.033$ )、N 因子 ( $\geq$  N1+N2,  $p=0.024$ )、lymphatic invasion (L1,  $p=0.028$ ) は、CD109-stroma-

positive 群の方が・negative 群よりも有意に進行度が高く、間質での CD109 の発現は腫瘍の進展に影響する可能性が示唆された。Kaplan-Meier 曲線と log-rank 検定では、CD109-stroma-positive 群と・negative 群の間で DFS と OS に有意な差は認めなかった (DFS  $p=0.139$ , OS  $p=0.256$ )。さらに、腫瘍細胞と間質における CD109 の発現に基づいて、患者を 4 つのグループに分類し、各グループの DFS と OS を分析した。CD109-tumor-negative/CD109-stroma-negative 群は、DFS において他のすべての群よりも有意に予後が良好であった (vs tumor-negative/stroma-positive  $p=0.037$ , vs tumor-positive/stroma-negative  $p=0.004$ , vs tumor-positive/stroma-positive  $p=0.008$ )。また OS でも全ての群ではないが 2 つの群と比べて有意に予後が良好であった (vs tumor-negative/stroma-positive  $p=0.194$ , vs tumor-positive/stroma-negative  $p=0.005$ , vs tumor-positive/stroma-positive  $p=0.005$ )。これらの結果は、間質における CD109 の発現も PDAC の腫瘍の進行に影響することを示唆しており、腫瘍細胞と間質における CD109 の発現に応じて PDAC 患者を分類することは、患者集団全体から予後の良い患者群を特定するのに有用であると考えられる。

2-1-4. 腫瘍細胞における CD109 の発現は、PDAC の無病生存期間と全生存期間の両方に対する独立した予後予測因子である

腫瘍細胞および間質における CD109 の予後に対する重要性を、Cox 比例ハザードモデルを用いて解析した。DFS については、T 因子 (T3,  $p=0.0003$ )、N 因子 (N1,N2,  $p<0.0001$ )、M 因子 (M1,  $p=0.0029$ )、lymphatic invasion (L1,  $p=0.0011$ )、腫瘍細胞における CD109 発現 (positive,  $p=0.0036$ )、術後補助化学療法 (done,  $p=0.0245$ ) が単変量解析で有意な予後因子となり、多変量解析では T 因子 ( $p=0.0056$ ) と腫瘍細胞における CD109 発現 ( $p=0.0173$ ) が独立した予後予測因子となった。OS では、T 因子 (T3,  $p=0.0135$ )、N 因子 (N1,N2,  $p=0.0331$ )、histological grading (G2,G3,  $p=0.036$ )、腫瘍細胞における CD109 発現 (positive,  $p=0.0024$ ) が単変量解析で有意な予後因子となり、多変量解析では腫瘍細胞における CD109 発現 ( $p=0.0104$ ) のみが独立した予後因子となった。

## 2-2. 膵癌培養細胞株を用いた解析

### 2-2-1. CD109 の発現は MIA PaCa-2 膵癌細胞株の運動性に影響を与える

膵臓癌における CD109 の生物学的意義を調べるために、膵癌細胞株における CD109 の発現を評価した。すべての細胞株で CD109 が発現していたが、発現レベルにはばらつきがあった。PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞を用いて、CRISPR/Cas9 システムにより *CD109* ノックアウト細胞株を樹立することに成功した (PANC-KO1, PANC-KO2, MIA PaCa-KO1, MIA PaCa-KO2)。

*CD109* をノックアウトした細胞株と野生型の細胞株を用いて、細胞増殖実験と migration assay を行った。すべての *CD109* ノックアウト細胞株は、野生型細胞株と比較して、その増殖に明らかな変化を示さなかった。Wound healing assay では、MIA PaCa-KO1 および KO2 細胞株は、野生型の MIA PaCa-2 細胞と比較して創傷治癒の遅延が見られたが、PANC-KO1 および PANC-KO2 細胞と野生型の PANC-1 細胞との間には有意な差は見られなかった。Transwell migration assay でも同様の結果が得られた。これらの結果は、決定的なものではないが、*CD109* が PDAC の悪性度の高い表現型に関与している可能性を示唆している。

#### 2-2-2. *CD109* は PDAC 細胞株の EGF、TGF- $\beta$ 1、STAT3 シグナルに影響しない

最後に、*CD109* ノックアウト細胞株と野生型細胞株を用いて、*CD109* の発現が細胞内シグナルに及ぼす影響を調べた。PANC-1、PANC-KO1、MIA PaCa-2、MIA PaCa-KO1 の各細胞株を EGF または TGF- $\beta$ 1 で表示した時間刺激し、細胞内シグナルの活性化をウエスタンブロットで評価した。*CD109* ノックアウト後、両シグナル経路の活性化は影響を受けなかった。また、*CD109* ノックアウト細胞と野生型細胞で STAT3 経路を評価したが、STAT3 のリン酸化に対する *CD109* ノックアウトの効果を示すことはできなかった。これらの結果から、*CD109* は PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞株において、EGF、TGF- $\beta$ 1、STAT3 のシグナル伝達経路に与える明らかな影響は検出できなかった。

### 3. 考察

*CD109* は、様々なヒト悪性腫瘍で優位に発現しているがん関連タンパク質であり、腫瘍促進特性は様々な悪性腫瘍で提唱されているが、そのメカニズムの詳細は未だ不明である。本研究では、膵臓癌における *CD109* の臨床的・生物学的意義を明らかにすることを目的とした。PDAC 標本で *CD109* の発現を免疫組織化学的に分析し、臨床病理学的情報を調査した。その結果、かなりの症例で、*CD109* が PDAC の腫瘍細胞を取り巻く間質に発現していることが、mRNA レベルの *in situ* hybridization によって確認された。さらに、間質内の *CD109* 陽性領域は、CAF の組織学的マーカーである  $\alpha$ -SMA を発現している領域と類似していることを示した。これらの結果から、*CD109* は PDAC の間質に存在する CAF の組織学的マーカーでもある可能性が考えられる。また、間質における *CD109* の発現は、疾患の進行度 (TNM stage、N 因子、lymphatic invasion) と相関していたが、患者の予後には影響しなかった。CAF は腫瘍の進行と浸潤に関与する腫瘍微小環境の最も重要な構成要素の 1 つであり、また PDAC は豊富な線維性間質を有する代表的なヒト悪性腫瘍で、CAF についての研究も散見される。一方、*CD109* は、furinase によって切断され細胞外に分泌され、隣接する細胞の活動に関与している。このように、*CD109* は CAF における生物学的

な役割を担い、腫瘍の微小環境に影響を与えている可能性がある。ヒトの悪性腫瘍における CD109 の生物学的意義を理解するためには、腫瘍細胞だけでなく、間質における CD109 の発現を検討することが重要であると考ええる。

また、本研究では腫瘍細胞における CD109 の発現が PDAC の予後 (DFS および OS) と相関していること、膵癌細胞株である MIA PaCa-2 において CD109 の発現を阻害すると、PANC-1 では同様の結果は得られなかったものの、その移動能が著しく抑制された。このように、腫瘍細胞における CD109 の発現は、*in vivo* では早期再発や予後不良、*in vitro* では細胞の運動性と関連している可能性がある。いくつかの論文では、腫瘍細胞における CD109 の発現が、ヒトの悪性腫瘍の進行および予後と関連していることが示されており、本研究の結果はそれらの知見と一致している。Hatsuzawa らは最近、CD109 が *in vitro* での膵臓癌細胞の移動能を促進し、担癌マウスモデルでは腫瘍形成、膵臓癌の転移再発を促進することを報告したが、臨床材料を用いて行った免疫組織化学的研究では、他の臨床病理学的特徴や予後に対する CD109 の意義は認められなかった。本研究の免疫組織化学的研究の結果が彼らの結果と異なっていた理由として考えられることは以下の通りである。1) 彼らの研究には非治癒的手術 (R1 および R2) を受けた症例が含まれていたが、本研究には非治癒的手術を受けた症例が含まれていなかった。そのため、本研究の参加者の総数も比較的少なかった。2) CD109 発現の評価基準が 2 つの研究で異なっていた。3) 免疫組織化学的染色に使用した抗体が 2 つの研究で異なっていた。

CD109-tumor-negative/CD109-stroma-negative の PDAC が、他の 3 つの群 (CD109-tumor-positive/CD109-stroma-positive、CD109-tumor-negative/CD109-stroma-positive、CD109-tumor-positive/CD109-stroma-negative) よりも予後が良好であったことから、腫瘍細胞と間質における CD109 の発現を複合的に評価することで、患者全体の中から予後の良い患者群を特定することができることに留意すべきである。したがって、CD109 は膵臓癌の予後マーカーとして魅力的な候補である。

*in vitro* 試験では、CD109 の発現を阻害することで MIA PaCa-2 細胞の遊走能が明らかに低下したが、これは過去の研究結果と同様であった。一方、PANC-1 細胞の遊走能に対しては、CD109 の阻害による明らかな影響は認められなかった。この違いの理由として考えられるのは、*CD109* の翻訳後修飾が 2 つの細胞株間で異なっている可能性である。ウェスタンブロット解析の結果、MIA PaCa-2 細胞では CD109 のバンドが 2 本あったのに対し、PANC-1 細胞では 1 本であった。いくつかの研究では、*CD109* の転写後修飾のレベルは、細胞株の種類によって異なる可能性があることが示されている。CD109 タンパク質は、翻訳後に furinase による切断やグリコシル化によって修飾され、細胞の活動や細胞内のシグナル伝達に影響を与えられている。CD109 の生物学的多様性を理解するためには、その翻訳後の修飾を詳細に調べる必要がある。Hatsuzawa らによる以前の研究では、small interfering RNA

(siRNA) による CD109 発現抑制により、PANC-1 細胞の移動能が阻害された。CD109 の急性の不活化が PANC-1 細胞の運動性に影響を与える可能性がある。PANC-1 および MIA PaCa-2 細胞において、EGF、TGF- $\beta$ 1、STAT3 経路などの細胞内シグナル伝達経路に対する CD109 の影響を示すことはできなかったが、これは以前の報告と一致している。また、CD109 の発現が細胞内シグナル伝達に及ぼす影響は、細胞の種類によって多様である。PANC-1 と MIA PaCa-2 の両細胞株は活性化 KRAS 変異を有しており、これが細胞内シグナルに何らかの影響を与えている可能性がある。膵臓癌における CD109 の生物学的意義を明らかにするには、さらなる検討が必要である。

#### 4. 総括

本研究では臨床材料と PDAC 細胞株を用いて PDAC における CD109 の意義を解析し、腫瘍細胞と間質における CD109 の発現が PDAC の進行と予後に影響することを明らかにした。CD109 は、PDAC の予後を左右する有用なマーカーであるとともに、治療のターゲットにもなりうると考えられる。