

18) 癌症例のホルマリン固定標本における癌幹細胞の同定と局在の検討

研究代表者 三代川齊之

[研究目的]

1997年 Dick らのグループが急性骨髄性白血病の幹細胞を同定することに成功したのを機に、脳腫瘍・乳癌・肺癌・肝癌・大腸癌・前立腺癌と多くの固形癌でも癌幹細胞が同定されてきた。しかしながら、これらはいずれも in vitro での解析であり培養細胞でしか同定がなされていない。癌幹細胞が in vivo の状態を反映する組織標本上で同定可能であれば、その分布状況や局在を解析することにより癌幹細胞のみをターゲットとした癌幹細胞特異的治療法の開発に大きな可能性を見出すことができるものと考え、免疫組織化学的手法により固形癌の癌幹細胞同定を試みた。

[方法]

1. 乳癌幹細胞は培養細胞を用いた実験では CD44⁺/CD24⁻ の細胞とされている。また、BRCA1

も乳癌幹細胞と関連があることが報告されている。さらに他の固形癌幹細胞マーカーの CD133 を加えて 4 種類の抗体による免疫染色を行った。大腸癌幹細胞は培養細胞を用いた実験では CD133 陽性細胞とされているので、CD133 による免疫組織化学的解析を行った。

2. 対象症例は第一外科・第二外科にて手術を行った乳癌症例・大腸癌症例それぞれ10症例を用いた。いずれも平成20年10月時点において包括合意による研究への検体流用の了承を得ている症例を用いた。

3. 本研究に用いた抗体を表1に示す。5種類の抗体はすべて abcam 社製の抗体を用いた。反応条件を検討した後、それぞれの抗体で免疫染色を行った。また、乳癌に関しては CD44 と CD24 の二重染色を行い癌幹細胞の同定を試みた。

表 1

抗体名	クローン番号	種類	抗原賦活化	反応性
CD44	F10-44-2	ウスモノクローナル抗体	pH 6.0	△
CD44	156-3C11	ウスモノクローナル抗体	pH10.0	◎
CD24	SN3	ウスモノクローナル抗体	pH 6.0	○
BRCA1	ab47429	兎ポリクローナル抗体	pH10.0	○
CD133	ab16518	兎ポリクローナル抗体	pH10.0	○

[結果]

乳癌に関しては、CD44 抗体 2 種類に関し検討し、クローン 156-3C11 を用いることとした。免疫染色の結果を表 2 および図 1・2 に示す。

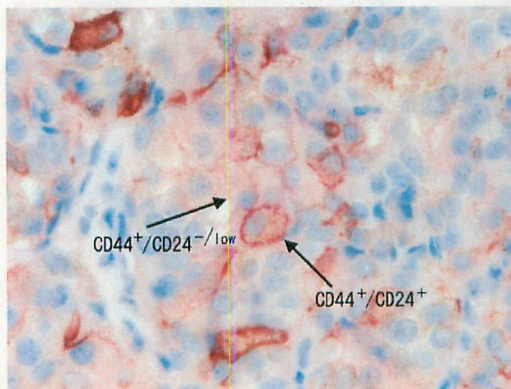


図 1 乳癌細胞の CD44 と CD24 発現

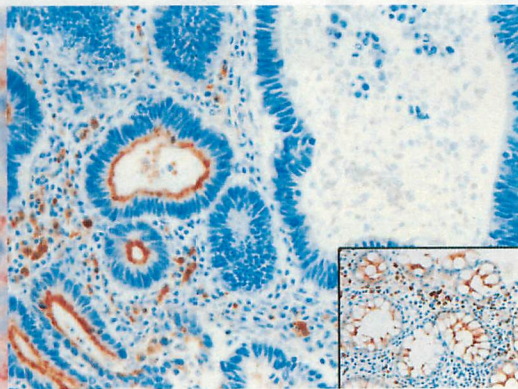


図 2 大腸癌細胞の CD133 発現
(右下は正常大腸粘膜)

表2

	CD44	CD24	BRCA1	CD133	CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}
乳癌	100	100	100	0	40
大腸癌				10	

数字は各10症例中の陽性症例数を%表示

乳癌細胞は全例がCD44・CD24・BRCA1陽性となったが、陽性細胞比率や反応強度に差を認めた。また、CD44とCD24の二重免疫染色では、乳癌幹細胞の指標となるCD44⁺/CD24^{-low}の細胞はわずか4例のみに確認出来たもののその陽性率は0.01%~10%と症例により差異があった。CD133に関しては全例が陰性であった。

大腸癌に関しては1例のみCD133陽性であった。その症例は分化度が高く、癌細胞の管腔形成傾向が明瞭な症例で、CD133は癌細胞の管腔面側に均等に発現していた。

[考案]

成果報告書作成時点(平成21年7月)では乳癌症例における検討が十分でなかったが、その後の検討により上記の結果を得ることができた。

乳癌においては、CD44⁺/CD24^{-low}の細胞は全例に確認できなかったこと、陽性細胞比率が症例によりばらつきが大きいことから癌幹細胞を認識しているかどうか判定できなかった。

大腸癌においては、CD133抗体は癌幹細胞を認識するというより細胞突起部分に発現しているProminin-1を検出している可能性を示唆している。

今回のホルマリン固定パラフィン包埋組織標本を用いた免疫組織化学的手法による乳癌及び大腸癌の癌幹細胞同定という研究においては期待される結果は得られなかったが、未だにホルマリン固定材料を用いて免疫組織化学的に癌幹細胞を同定したという論文が稀なものも本研究と同様組織検体の固定法による問題が解決していないことに起因している可能性がある。

今後は凍結標本やパラホルムアルデヒド固定による検討を進めていくと同時に、LMD(Laser microdissection)法を用い、免疫染色で同定された癌幹細胞の分子生物学的特性を解析することが急務と考える。