

氏名（本籍）	田 中 香 織（岐阜県）
学位の種類	博 士（医学）
学位授与番号	甲第 996 号
学位授与日付	平成 27 年 9 月 9 日
学位授与要件	学位規則第 4 条第 1 項該当
学位論文題目	ALDH1A1-overexpressing cells are differentiated cells but not cancer stem or progenitor cells in human hepatocellular carcinoma
審査委員	（主査）教授 中 島 茂 （副査）教授 長 岡 仁 教授 清 水 雅 仁

論文内容の要旨

Aldehyde dehydrogenase (ALDH)は主に肝細胞で解毒・代謝に関与する酵素であるが、「stemness (幹細胞性)」の維持に関連した性質も有するため、ALDH1 family は幹細胞マーカーと考えられるようになってきた。その中でも ALDH1A1 は造血幹細胞や神経幹細胞といった正常幹細胞のマーカーと見なされ、また様々な癌種でも癌幹細胞マーカーとされ、新たな治療標的となる可能性が期待されている。上皮系癌種では ALDH1A1 陽性細胞の増加は予後不良因子とされる報告が多いが、肝細胞癌における ALDH1A1 の意義については未だ不明である。そこで本研究では手術標本を用いて、肝細胞の ALDH1A1 タンパク質を免疫組織化学染色にて、さらに mRNA の発現レベルを qRT-PCR にて評価し、臨床的予後との関係を解析した。また肝癌の癌幹細胞マーカーとされる様々な標的分子に対する抗体との二重染色を施行し、ALDH1A1 が肝において癌幹細胞マーカーに値するか否かを検討した。

【対象と方法】

患者と組織切片

2004～2013 年に岐阜大学病院で原発性肝癌の診断で肝切除された 60 症例を対象とした。混合型肝癌、多発癌、術前治療歴を有するもの、病理組織学的に広範な壊死を伴う症例は除外した。免疫染色にはこの 60 症例のパラフィン切片を、qRT-PCR にはそのうち 47 症例の凍結標本を用いた。

qRT-PCR による評価

癌部・非癌部の凍結組織から mRNA を抽出し、ALDH1A1-mRNA 値の比（癌部／非癌部）により ALDH1A1-mRNA-low group と ALDH1A1-mRNA-high group に分類した。

免疫組織化学染色による評価

抗 ALDH1A1 抗体で染色すると、非癌部では脈管周囲肝細胞がやや強い染色性を示すものの、背景肝に影響されることなくほぼ一様に淡く染色された。一方癌部では様々な染色性を示し、中には ALDH1A1 を強発現する細胞 (ALDH1A1-overexpressing cells) を有する症例も散見された。ALDH1A1-overexpressing cells の出現率を 4 段階にスコア化し (0 [0%], 1 [1-9%], 2 [10-20%], 3 [>20%])、それに基づいて ALDH1A1-low group (0-1) と ALDH1A1-high group (2-3) に分類した。

【結果】

qRT-PCR での評価

癌部と非癌部では ALDH1A1-mRNA 値に有意差は認めなかった。また、2 群間 (ALDH1A1-mRNA-low group と ALDH1A1-mRNA-high group) で臨床所見に有意差は認めなかった。

免疫染色での評価

ALDH1A1-high group では ALDH1A1-low group と比べて有意に血清 AFP 値が低値であり (P=0.0168)、腫瘍径が小さく (P=0.0019)、脈管浸潤は少なく (P=0.0208)、より高分化な組織像を示し (P=0.016)、ステージも早期であった (P=0.0215)。予後評価では 2 群間で生存率および無再発生存率に有意差は

認めなかったものの、5年無再発生存率に関しては、ALDH1A1-high groupの方が予後良好な傾向を示した(37.9%[ALDH1A1-low group] vs. 54.8%[ALDH1A1-high group])。

無再発生存率に寄与する因子

多変量解析ではHCV非感染と血清AFP低値が5年無再発生存率と有意に関連していたが、ALDH1A1は有意差を認めなかった。

ALDH1A1と癌幹細胞マーカーの二重染色

ALDH1A1が肝臓における癌幹細胞マーカーとなりうるかどうかを検索する目的で、ALDH1A1と肝細胞癌の癌幹細胞マーカーとされる分子(EpCAM, BMI1, CD13, CD24, CD90, CD133)との二重染色を施行した。ALDH1A1-overexpressing cellsはこれらすべての癌幹細胞マーカーいずれとも共染色せず、また細胞増殖活性をみるKi67ともほとんど共染色しなかった。

【考察】

本研究で最も重要なことは、免疫染色による評価の際にALDH1A1-overexpressing cellsに注目した点である。このALDH1A1-overexpressing cellsとは、非癌部の肝細胞と比べて、より強い染色性を有する癌細胞と定義している。この細胞の出現率は個々の症例で異なっているのが特徴であり、本研究ではこの細胞の出現率が高いものほど、高分化な組織像を呈し、予後良好な傾向を示した。これは癌幹細胞が未分化な細胞で予後不良因子であることを考慮すると相反する結果であった。さらにALDH1A1-overexpressing cellsと肝細胞癌の他の癌幹細胞マーカーとの二重染色を施行したところ、ALDH1A1-overexpressing cellsは癌幹細胞マーカーと全く共染色せず、また細胞増殖活性をみるKi67ともほとんど共染色しなかった。以上の結果よりALDH1A1-overexpressing cellsは、いわゆる癌幹細胞、さらには癌前駆細胞の性質に乏しいという結論に至った。

これまでの報告では、高いALDH1酵素活性を有する細胞(ALDH-bright cell)は肝臓を含めた様々な臓器で、その高い細胞増殖活性、易転移性、易浸潤性、抗癌剤抵抗性を有することから癌幹細胞に値するとされてきた。しかし、ALDH-bright cellは酵素活性をみるALDEFUOR assayにて分離され、ALDH1A1-overexpressing cellsとは検出方法が異なること、および「stemness」の性質の違いから、この2つの細胞は違うものとする。現在大腸癌など上皮系腫瘍で進みつつあるALDH1A1を標的とした癌幹細胞治療は、本研究から肝細胞癌に対しては治療効果が期待できず、正常肝細胞へのダメージ(副作用)を十分に考慮して治療方針を決定する必要があると考えられた。

【結論】

原発性肝臓癌において明らかとなったALDH1A1-overexpressing cellsは、癌幹細胞マーカーとは異なった分化度を示すマーカーであり、ALDH1A1を標的として考慮されている癌幹細胞治療とは別の治療指針が必要であることが示唆された。

論文審査の結果の要旨

申請者 田中 香織は、肝細胞癌におけるALDH1A1発現の意義について、臨床的に有用性の高い免疫組織化学染色を用いて解析した。その結果、肝細胞癌においてALDH1A1の発現は予後良好因子であり、癌幹細胞マーカーというよりは分化度を示すマーカーであることを見出した。本研究の成果は、今後の肝細胞癌における癌幹細胞治療の発展に少なからず貢献するものと認める。

[主論文公表誌]

Kaori Tanaka, Hiroyuki Tomita, Kenji Hisamatsu, Takayuki Nakashima, Yuichiro Hatano, Yoshiyuki Sasaki, Shinji Osada, Takuji Tanaka, Tatsuhiko Miyazaki, Kazuhiro Yoshida, Akira Hara : ALDH1A1-overexpressing cells are differentiated cells but not cancer stem or progenitor cells in human hepatocellular carcinoma

Oncotarget (in press)