

学位論文
Doctor's Thesis

イムノビーズによる便中大腸癌細胞の分離と大腸癌診断実用化研究
**(Non-invasive methods for diagnosing colorectal cancer using colonocytes isolated
from feces by immuno-magnetic beads)**

古賀 宣勝
Yoshikatsu Koga

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

指導教員

馬場 秀夫 教授

熊本大学大学院医学教育部博士課程臨床医科学専攻消化器外科学

2009 年度

学 位 論 文

Doctor's Thesis

論文名: イムノビーズによる便中大腸癌細胞の分離と大腸癌診断実用化研究

(Non-invasive methods for diagnosing colorectal cancer using colonocytes isolated from feces by immuno-magnetic beads)

古賀 宣勝

Yoshikatsu Koga

熊本大学大学院医学教育部博士課程 臨床医科学専攻 消化器外科学

指導: 馬場 秀夫 教授

審査委員名	消化器内科学分野担当教授	佐々木 裕 教授
	機能病理学分野担当教授	伊藤 隆明 教授
	病態情報解析学分野担当教授	安東 由喜雄 教授
	免疫識別学分野担当教授	西村 泰治 教授

2009 年度

目次

要旨1
Summary2
発表論文リスト3-4
謝辞5
略号6

第1章 研究の背景と目的

1. 大腸癌7
2. 大腸癌検診としての便潜血反応検査7-8
3. 自然排泄便を対象とした大腸癌診断法8-9
4. イムノビーズを用いた便中剥離細胞分離法9-10
5. 便分離細胞の遺伝子変異解析10
6. 本研究の目的10-11

第2章 対象と実験方法

1. 便の保存条件の検討

1) 対象12
2) 自然排泄便の保存条件12
3) 自然排泄便からの細胞分離法12
4) 大腸癌組織検体13
5) genomic DNA および total RNA の抽出、cDNA の合成13
6) 定量的 real-time PCR13-14
7) 遺伝子変異解析(直接シーケンス法)15

2. 新規 EpCAM 抗体付加イムノビーズの開発・検討	
1) 新規 EpCAM 抗体付加イムノビーズの作製	16-17
2) シミュレーション実験	17
3) 対象	17
4) 臨床検討	17-18
3. mRNA を用いた便分離細胞の遺伝子発現解析	
1) 対象	18-19
2) 便検体からの細胞分離	19
3) total RNA 抽出と cDNA 合成	19
4) 定量的 real-time RT-PCR	19-20
4. 統計解析	20

第3章 結果

1. 便の保存条件の検討	
1) Alu 配列を対象にした Alu-real-time PCR の測定感度と正確性	21
2) 各種保存便における genomic DNA および total RNA の保存効率の比較	21-22
3) 各種保存便における遺伝子変異解析	22-24
2. 新規 EpCAM 抗体付加イムノビーズの開発・検討	
1) 粒子径の異なるビーズを用いた細胞回収率の検討	24-25
2) 異なる親和性を持つ新規 EpCAM 抗体	25
3) 性能の異なる抗体を結合したビーズを用いた細胞回収率の検討	26
4) 臨床検体における新規イムノビーズの細胞回収能力	26-27
3. mRNA を用いた便分離細胞の遺伝子発現解析	
1) 対象遺伝子の選定	27-28
2) Real-time RT-PCR を用いた各種遺伝子の検出率	28-29

3) 各種対象遺伝子の相対発現量29
4) 大腸癌細胞を同定するための各種遺伝子発現量の閾値設定29-30
5) 遺伝子発現解析の感度と特異度30-32

第4章 考察

1. 自然排泄便を用いた大腸癌診断法33
2. 自然排泄便中の大腸剥離細胞34
3. 大腸癌診断に適した自然排泄便の保存条件34-35
4. 便中剥離細胞を効率よく回収する至適イムノビーズ35
5. 便分離細胞を用いた遺伝子発現解析36-37

第5章 将来の展望

1. 便分離細胞から抽出した核酸を用いた大腸癌診断の問題点38
2. 腫瘍マーカーとしての CD44v638-40
3. 蛍光標識癌特異抗体を用いた自動細胞診の可能性40-41

第6章 結語

参考文献43-47
------	------------

要旨

【目的】大腸癌の死亡者数は全悪性腫瘍のうち上位を占め日本でも年々増加しているが、早期に発見し内視鏡的切除や外科的切除による治療が行われれば生存率は極めて良好である。現在、大腸癌検診法として便潜血反応検査が広く普及しているが、便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり大腸癌を特異的に診断してはいない。以前我々は epithelial cell adhesion molecule (EpCAM) 抗体が結合した磁気ビーズ(イムビーズ)を用いて自然排泄便から癌細胞を回収する方法を報告した。そこで本研究は便分離細胞を用いた新しい大腸癌検診法の開発を目的とした。

【方法】はじめに、自然排泄便の保存条件を検討した。便を当日処理群、4°C で 1、2、3 日間保存群、37°C で 1、2、3 日間保存群の 7 群に分け、それぞれから便中剥離細胞を分離回収し DNA および RNA を抽出後、核酸量の比較を行った。つぎに、便から効率よく剥離細胞を回収するイムビーズの検討を行った。粒子径の異なるビーズに性能の異なる EpCAM 抗体を結合させ、それぞれのイムビーズによる培養細胞の回収効率と大腸癌患者便を用いた便分離細胞数の比較を行った。最後に、大腸癌患者 166 名と健常者 134 名の自然排泄便を対象として、便分離細胞の mRNA を抽出し、定量性 real-time RT-PCR による遺伝子発現解析を行った。

【結果】4°C で 3 日間保存した便からは当日処理群と比べて同等の細胞が回収可能だった。一方、37°C で保存した便は 1 日間でも有意に回収細胞量が減少していた。便中剥離細胞を効率よく回収するためには粒子径が小さく、性能の良い EpCAM 抗体を結合させたイムビーズが最も有用であった。mRNA 量が極端に少ない症例を除外し、遺伝子発現解析が検討可能であった大腸癌患者 127 例、健常者 101 例について、4 種類の遺伝子を用いて検討すると感度 58.3% および特異度 88.1% という結果であった。また感度は原発腫瘍の占拠部位 ($P=0.01$) および腫瘍径 ($P=0.02$) と関連があったが、深達度 ($P=0.06$) や進行度 ($P=0.37$) とは関連がなかった。

【考察】便中剥離細胞は冷蔵保存可能であり多くの検体を処理する癌検診が可能であることが示された。粒子径の小さいビーズは 1 個あたりの磁性体量は少ないが、細胞 1 個に対して多量のビーズが効率よく結合できるために結果として粒子径の大きなビーズよりも便中剥離細胞を効率よく回収できたと推測された。便 2g から回収した細胞の RNA 量は極微量であり、約 25% は検討不可能であるため、標的遺伝子は癌に高発現している遺伝子で、なおかつ発現量も高いものが望まれる。一方で癌細胞と正常細胞が混在した検体から一括して RNA を抽出することは癌に高発現している遺伝子であっても平均化されてしまい、結果として感度が低下することが考えられる。便分離細胞の RNA を用いた遺伝子発現解析は大腸癌検診にはまだまだ不十分であると考えている。この改善には細胞 1 個を診断する細胞診が有用であると考え、引き続き検討を行っている。

【結論】自然排泄便中の癌細胞を対象にした大腸癌検診について研究した。遺伝子発現解析のための便の保存と回収用イムビーズに関しては至適条件を確認できたが、診断方法としては遺伝子発現解析以外の診断法の検討が必要である。

Summary

Background: Early detection of colorectal cancer (CRC) is desired for reducing its mortality rate. Recently, the feasibility of a new method for isolating colonocytes from feces was demonstrated, followed by direct sequencing analysis for detecting CRC. The aim of the present study was to develop a new methodology for CRC screening.

Methods: First, we investigated whether the cancer cells could be detected in feces stored under different conditions after evacuation. Feces were manipulated at time after arrival (zero time) and after storage of 24, 48 and 72h at 4 or 37°C. Colonocytes were isolated from each separate fecal sample, and DNA and RNA were extracted from the colonocytes. We investigated the relationship between storage conditions and content of extracted DNA or RNA with real-time PCR. We also clarified the gene alterations regarding *APC*, *p53* and *K-ras* genes under different storage conditions with direct sequence analysis. Second, the recovery rate of colonocytes from feces with several newly developed immunomagnetic beads was analyzed. Several sizes of magnetic beads were prepared and tagged with a monoclonal antibody against EpCAM. Furthermore, we made several new monoclonal antibodies against EpCAM, and each monoclonal antibody was tagged to the optimal size of beads. These newly prepared immunomagnetic beads were evaluated using a simulation and clinical samples. Third, we evaluated the gene expression analysis of colonocytes isolated from feces using quantitative real-time RT-PCR.

Results: First, though the amount of DNA and RNA recovered from colonocytes isolated from each fecal piece decreased significantly at 37°C at any storage time compared with 0 h, the gene alterations were detected independent of any storage conditions. Second, in the simulation and clinical samples, the most efficient result was obtained using the smallest size of beads and using the beads tagged with a monoclonal antibody with a higher affinity against EpCAM. Third, 166 patients with CRC and 134 healthy volunteers were enrolled in the gene expression study. The overall sensitivity and specificity using the combined marker (*MMP7*, *MYBL2*, *PTGS2* and *TP53*) were 58.3% and 88.1%, respectively. The sensitivity was depended on the tumor location and tumor size, but not the depth or cancer stage.

Conclusions: We clarified the optimal fecal storage conditions and optimal immunomagnetic beads conditions. The colonocytes could be kept for 3 days at 4°C. The new immunomagnetic beads, which were 3.0 µm in size and were conjugated with a new monoclonal antibody possessing a higher affinity to EpCAM, could effectively isolate colonocytes from feces. Gene expression analysis of colonocytes isolated from feces may be a useful method for CRC screening. However, development of an alternative CRC screening method may be necessary.

発表論文リスト

関連論文 2編 2冊

1. 著者名:

Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yoshihiro Moriya, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Seiichiro Yamamoto, Takahiro Kozu, Hideo Baba, Yasuhiro Matsumura.

論文題:

Detection of colorectal cancer cells from feces using quantitative real-time RT-PCR for colorectal cancer diagnosis.

(定量的リアルタイム PCR を用いた便中大腸癌細胞診断法)

雑誌名: **Cancer Science**

巻、号、年: **99 巻, 10 号(1977-1983), 2008**

2. 著者名:

Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Yoshihiro Moriya, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Seiichiro Yamamoto, Hideo Baba, Yasuhiro Matsumura.

論文題:

Detection of the DNA Point Mutation of Colorectal Cancer Cells Isolated from Feces Stored Under Different Conditions.

(種々の保存条件下での便分離大腸癌細胞の遺伝子変異解析)

雑誌名: **Japanese Journal of Clinical Oncology**

巻、号、年: **39 巻, 1 号(62-69), 2009**

その他論文 4編 4冊

1. 著者名: **古賀宣勝, 松村保広**

論文題: **イムノビーズによる便中大腸癌細胞の分離と新しい大腸癌診断法の開発**

雑誌名: **実験医学増刊号**

巻、号、年: **25 巻, 17 号(1205-1218), 2007**

2. 著者名: **古賀宣勝, 松村保広**

論文題: **自然排泄便からの大腸癌細胞分離と遺伝子診断の実際**

雑誌名: **臨床検査増刊号**

巻、号、年: **51 巻, 12 号(1376-1382), 2007**

3. 著者名:

Yoshikatsu Koga, Masahiro Yasunaga, Satoshi Katayose, Yoshihiro Moriya, Takayuki Akasu, Shin Fujita, Seiichiro Yamamoto, Hideo Baba, Yasuhiro Matsumura.

論文題:

Improved recovery of exfoliated colonocytes from feces using newly developed immuno-magnetic beads.

(便中剥離細胞を効率よく回収するイムノビーズの開発)

雑誌名: **Gastroenterology Research and Practice**

発行年: 2008

4. 著者名:

Yoshikatsu Koga, Shinji Ishikawa, Tadahiko Nakamura, Toshiro Masuda, Yohei Nagai, Hiroshi Takamori, Masahiko Hirota, Keiichiro Kanemitsu, Yoshifumi Baba, Hideo Baba.

論文題:

Oxysterol binding protein-related protein-5 is related to invasion and poor prognosis in pancreatic cancer.

(ORP5 は膵癌において浸潤と予後に関係がある)

雑誌名: **Cancer Science**

巻、号、年: 99 巻, 12 号(2387-2394), 2008

謝辞

本研究は国立がんセンター東病院・臨床開発センター・がん治療開発部部長 松村保広博士および熊本大学大学院医学研究科・消化器外科学 馬場秀夫教授のご指導の下において行いました。多面に渡りご指導を頂き、深く感謝いたします。

国立がんセンター東病院・臨床開発センター・がん治療開発部室長 安永正浩博士には、遺伝子発現解析を含めて研究全般にわたりご指導を頂きました。ここに深く感謝いたしますとともに、お礼申し上げます。

大腸癌患者の自然排泄便を研究するにあたり、その説明・同意ならびに検体のご提供を頂きました国立がんセンター中央病院・大腸外科 森谷亘皓部長、赤須孝之医長、藤田伸医長、山本聖一郎医師、健常者の検体でその説明・同意をしていただいた元国立がんセンターがん予防・検診研究センター 神津隆弘室長、磁性ビーズとモノクローナル抗体の結合および種々のイムノビーズをご供与していただきました JSR 株式会社・筑波研究所 片寄聡博士に深謝申し上げます。

また、この研究は国立がんセンター東病院・臨床開発センター・がん治療開発部 研究補助員の宮木聡恵さん、井上一也くん、泉澤順子さん、石原悠子さん、小池浩代さん、荒明万里さんおよび秘書の椎名薫さんにご協力いただきました。ここに深く感謝し、お礼申し上げます。

略号

WHO: World Health Organization
UICC: Unio Internationalis Contra Cancrum
APC: ademomatous polyposis coli
K-ras: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
PCR: polymerase chain reaction
CTC: circulating tumor cell
EpCAM: epithelial cell adhesion molecule
FBS: fetal bovine serum
FAM: 6-carboxyfluorescein
MGB: minor groove binder
RT-PCR: reverse transcriptase PCR
Ct: threshold cycle
 Δ Ct: delta Ct
NCBI: The National Center for Biotechnology Information
FCM: flow cytometry
B2M: beta-2-microglobulin
C1orf135: chromosome 1 open reading frame 135
CDC45L: cell division cycle 45-like
CEACAM5 (CEA): carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5
DDX11: DEAD/H box polypeptide 11
ERCC6L: excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like
GAD1: glutamate decarboxylase 1
IGF2BP3: insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
KRT20 (CK20): keratin 20
LAMA5: laminin alpha 5
MMP7: matrix metalloproteinase 7
MYBL2: myeloblastosis viral oncogene homolog like 2
PTGS2 (COX2): prostaglandin-endoperoxide synthase 2
TMEM118: transmembrane protein 118
TP53 (p53): tumor protein p53
M2-PK: M2-pyruvate kinase
GAPDH: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
ACTB: beta actin
SINE: short-interspersed elements
SSCP: single strand conformation polymorphism

第1章 研究の背景と目的

1. 大腸癌

大腸癌は世界で年間約108万人が罹患し、約64万人が死亡する癌である(WHO統計2004)⁽¹⁾。先進国では常に癌死亡率の上位であり、日本でも生活様式の欧米化に伴って増加傾向にあり、国立がんセンターがん対策情報センターの統計では、全悪性腫瘍のうち年間約11万人が罹患し、約4万人が死亡している⁽²⁾(表1、2)。しかし一般的に早期発見し、内視鏡的切除や外科的切除による治療ができれば生存率が極めて良好な癌である^(2,3)(表3)。従って、早期発見・早期治療のためのスクリーニング検査が重要である。

表1. 世界および日本における悪性腫瘍の罹患数(上位5疾患)

	世界(万人、2004) ⁽¹⁾	日本(万人、2002) ⁽²⁾
全体		
肺癌	144.8	胃癌 10.7
乳癌	110.0	大腸癌 10.5
大腸癌	108.0	肺癌 7.4
胃癌	93.3	肝癌 4.1
肝癌	63.2	膀胱癌 2.1
男性		
データなし		胃癌 7.2
		大腸癌 6.2
		肺癌 5.2
		前立腺癌 2.9
		肝癌 2.8
女性		
データなし		大腸癌 4.3
		乳癌 4.2
		胃癌 3.5
		肺癌 2.2
		肝癌 1.3

表2. 世界および日本における悪性腫瘍の死亡率(上位5疾患)

	世界(万人、2004) ⁽¹⁾	日本(万人、2006) ⁽²⁾
全体		
肺癌	132.3	肺癌 6.3
胃癌	80.3	胃癌 5.0
大腸癌	63.9	大腸癌 4.1
肝癌	61.0	肝癌 3.4
乳癌	51.9	膀胱癌 2.3
男性		
肺癌	94.3	肺癌 4.6
胃癌	49.9	胃癌 3.3
肝癌	41.8	肝癌 2.3
大腸癌	33.6	大腸癌 2.3
食道癌	33.1	膀胱癌 1.3
女性		
乳癌	51.7	大腸癌 1.9
肺癌	38.1	胃癌 1.8
胃癌	30.4	肺癌 1.7
大腸癌	30.3	乳癌 1.1
子宮頸癌	26.8	肝癌 1.1

表3. 臨床病期別5年相対生存率

臨床病期		5年相対生存率(%)	
UICC	Dukes	結腸癌	直腸癌
All stage		74.6	73.7
I	A	98.1	96.9
II	B	94	86.4
III	C	77.4	71.7
IV	D	20.1	16.3

参考文献(2)より一部改変引用

2. 大腸癌検診としての便潜血反応検査

現在、大腸癌検診法として簡便で安価な便潜血反応検査が世界中で広く普及している

が、便潜血反応検査には大きく分けて便潜血化学反応検査と便潜血免疫反応検査がある。ヘモグロビンのペルオキシダーゼ反応を用いた便潜血化学法は欧米で一般的な検査であり、より安価であるが、ヒトヘモグロビン以外にも食事中的肉、鉄剤などの影響を受けるため一般的に感度・特異度が低いと言われている。全症例に大腸内視鏡を施行した被験者を対象とした最近の大規模臨床研究において便潜血化学反応3日法の感度は advanced neoplasia において11~24%程度であり、invasive cancer でも25~50%程度であることが分かってきた⁽⁴⁻⁶⁾(表4)。一方で日本においては抗ヒトヘモグロビン抗体を用いた便潜血免疫法による大腸癌検診が行われており、欧米でも感度および特異度が高い便潜血免疫法に替わりつつある⁽⁷⁻¹¹⁾。2万人規模の全症例に大腸内視鏡を施行した検討が日本から報告され、便潜血免疫反応1日法の感度は advanced neoplasia において27.1%であり、invasive cancer では65.8%であると報告された⁽¹²⁾(表4)。さらに、便潜血免疫法は1回よりも2回、3回繰り返して行うことで感度が高くなることも報告されている⁽⁷⁾。また、便潜血検査を用いた大腸癌検診により大腸癌の死亡率が約70%低下したという報告もある⁽¹³⁾。しかし、便潜血反応検査は便中の微量なヘモグロビンを診断するものであり大腸癌を特異的には診断していない。また早期癌の診断率は50%程度である⁽¹²⁾。それゆえ、癌特異的な診断法の開発研究が多くの施設で行われている。

表4. 便潜血反応検査と大腸内視鏡検査の比較試験

報告者	報告年度	対象者	症例数	便潜血法	感度(%、陽性例/全症例)	
					Advanced Neoplasia	Invasive Cancer
Lieberman DA ⁽⁴⁾	2001	無症状	2,885名	化学反応3日法	23.9% (73/306)	50.0% (12/24)
Sung JJ ⁽⁵⁾	2003	無症状	505名	化学反応3日法	14.3% (9/63)	25.0% (1/4)
Imperiale TF ⁽⁶⁾	2004	無症状	4,404名	化学反応3日法	10.7% (47/441)	12.9% (4/31)
Morikawa T ⁽¹²⁾	2005	無症状	21,805名	免疫反応1日法	27.1% (197/530)	65.8% (52/79)

3. 自然排泄便を対象とした大腸癌診断法

大腸癌の発生には1991年にVogelsteinらが提唱したように正常大腸粘膜が腺腫となり大腸癌が発生するという adenoma-carcinoma sequence と呼ばれる発癌形式があり^(14, 15)、APC^(16, 17)や K-ras⁽¹⁸⁾、p53⁽¹⁹⁾など複数の遺伝子異常の蓄積により大腸癌が発生すると考

えられている。一方で大腸癌は大腸粘膜から発生し常に便と接しているため、便中に大腸癌由来の剥離細胞自体や癌細胞由来の DNA や RNA、タンパクが含まれている。この便 DNA を用いて大腸癌特異的な遺伝子変異を探索することで大腸癌を診断する方法がいくつか報告されている⁽²⁰⁻²⁴⁾が、便 DNA に含まれる癌細胞由来の DNA はごくわずかであり検出が困難である。また、便にはタンパク質、食物繊維、ヘモグロビンなどの PCR (polymerase chain reaction) 阻害物質が含まれており、分子生物学的手法をさらに困難なものとしている。以上の理由で、便 DNA を用いた遺伝子診断法には限界がある。

4. イムノビーズを用いた便中剥離細胞分離法

以前より我々の研究室では便中に剥離した大腸癌細胞そのものに着目し、便中でも大腸癌細胞は生存していると報告してきた⁽²⁵⁾。当初はパーコールを用いた密度勾配遠心法を用いて、便中の剥離細胞を分離していたが、手技が煩雑で回収効率も不十分であった。そこで、末梢血遊離癌細胞 (CTC, circulating tumor cells) の回収などに使用されている EpCAM (epithelial cell adhesion molecule) 抗体付加イムノビーズを用いた便中剥離大腸癌細胞分離を検討した (図 1)。EpCAM は、上皮系の接着分子の一つで大腸において

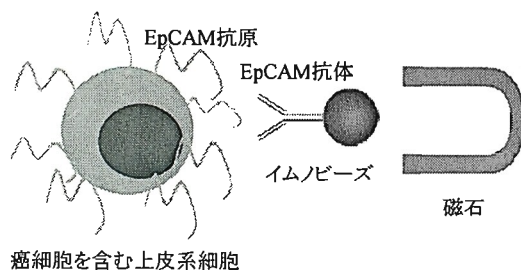


図1. 細胞分離法の原理

細胞分離法の原理。EpCAM抗原を発現している癌細胞を含む上皮系細胞に、EpCAM抗体を付加したイムノビーズを結合させ、磁石にて細胞-ビーズ複合体を回収する。

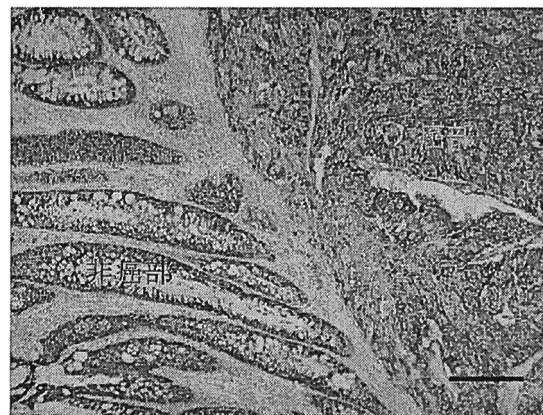


図2. 大腸癌組織の免疫組織化学染色

大腸癌組織のEpCAM染色像。大腸癌手術組織をマウス抗ヒトEpCAM抗体 (Clone VU-1D9) にて免疫組織化学染色を施行した。癌部および非癌部ともにEpCAM陽性。Scale bar: 200 μ m。

は正常大腸上皮で発現を認め、大腸癌では強発現している⁽²⁶⁾ (図 2)。このイムノビーズと特殊な緩衝液を用いて、便中剥離細胞を効率よく回収する便中細胞分離法を確立し、報

告した⁽²⁷⁾(図3)。

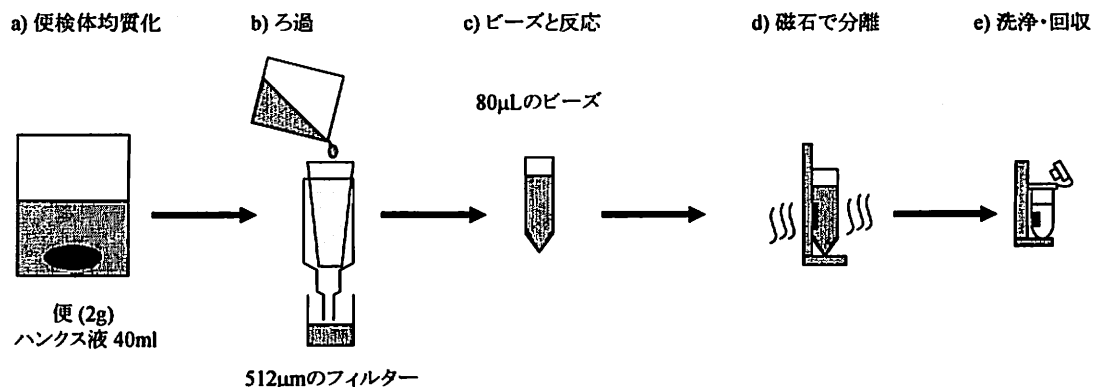


図3. 細胞分離法の概略

a) 便検体 (2g) に対して40mlの10%FBS添加ハンクス液 (pH 7.35) を加えて十分均質化する。b) 512µmのナイロンメッシュフィルターでろ過し、残渣を取り除く。c) 80µLのイムノビーズを加え、室温で30分反応させる。d) 磁石を用いて細胞-イムノビーズ複合体を分離する。e) 洗浄し、便分離細胞を回収する。

5. 便分離細胞の遺伝子変異解析

便中剥離細胞の分離・回収に引き続き、大腸癌診断法の検討を行った。病理学的に大腸癌と診断され、外科的切除予定の大腸癌患者 116 名と、大腸内視鏡検査にて正常であった健常者 83 名の自然排泄便を対象に、便中剥離細胞をイムノビーズで分離し、genomic DNA を抽出し、直接シーケンス法にて *APC*、*K-ras* および *p53* の遺伝子変異解析を行った。結果は感度 71%で、特異度 88%であると報告した⁽²⁷⁾(表 5)。

表5. 大腸癌患者と健常人での便分離細胞の遺伝子変異

	対象遺伝子	大腸癌患者		健常者	
		陽性数	感度 (95%信頼区間)	陽性数	特異度 (95%信頼区間)
全対象者	Combined marker	82名	71% (62-79)	10名	88% (79-94)
大腸癌患者 (116名)	<i>APC</i>	47名	41% (32-50)	1名	99% (93-100)
健常者 (83名)	<i>K-ras</i>	33名	28% (20-38)	1名	99% (93-100)
	<i>p53</i>	45名	39% (30-48)	6名	93% (85-97)
	<i>BAT26</i>	4名	3% (1-9)	3名	96% (90-99)

参考文献⁽²⁷⁾より一部改変引用

6. 本研究の目的

本研究の目的は、新しい大腸癌スクリーニング検査法の開発である。そのために、自然排泄便中から剥離細胞を回収するまでの最適保存条件(時間と温度)、便中剥離細胞を

効率よく回収するのに適したイムノビーズの特徴を明らかにすることを目的とした。さらに、癌検診には感度、特異度が高いことはもちろん、簡便、容易で安価な検査法が必要である。便から分離した大腸癌細胞を対象に直接シーケンス法による遺伝子変異の解析は手技が煩雑で工程が多く、一検査あたりのコストが高いという欠点があった。そのために、更なる検討として mRNA を用いた癌特異遺伝子の発現解析を行い、大腸癌検診としての可能性を検討することとした。

第2章 対象と実験方法

1. 便の保存条件の検討

1) 対象

病理学的に原発性大腸癌と診断され、国立がんセンター中央病院にて外科的切除術を施行された12症例が対象であり、自然排泄便は大腸癌切除前の入院時に提供された。すべての患者は十分に説明され、書面による同意を得た。

2) 自然排泄便の保存条件

自然排泄便42gを2gずつ21個に小分けし、各群3個ずつの7群に分けた。0群は検体が到着してすぐに細胞分離処理を行い、それ以外の検体は滅菌された Stomacher Lab Blender bags (Seward, Thetford, UK) に入れ、それぞれ異なる保存条件下に保管された(表6)。それぞれの保存条件は以下の通りである。1A群は4°Cで24時間、1B群は37°Cで24時間、2A群は4°Cで48時間、2B群は37°Cで48時間、3A群は4°Cで72時間、3B群は37°Cで72時間である。

表6. 便検体の保存条件

群	保存条件
0	当日処理
1A	4°Cで24時間保存
1B	37°Cで24時間保存
2A	4°Cで48時間保存
2B	37°Cで48時間保存
3A	4°Cで72時間保存
3B	37°Cで72時間保存

3) 自然排泄便からの細胞分離法

便検体に40mLの10%ウシ胎仔血清(FBS)添加Hanks液を加えて、Stomacher Lab Blender (Seward)にて十分均質化した。512µmの孔のあいたナイロンメッシュでろ過した便溶液に市販のEpCAM抗体付加イムノビーズ(Dynabeads Epithelial Enrich, Dnal, Oslo, Norway)を80µL加えて、室温で30分間反応させた後に、室温で15分間磁石を用いて細胞-ビーズ複合体を回収し、生理食塩水で2回洗浄してペレットの状態を検討まで-80°Cで保存した(図3)。

4) 大腸癌組織検体

全ての大腸癌患者は国立がんセンター中央病院にて根治術を施行された。12 症例中 6 症例は大腸癌の腫瘍径が小さいなどの理由で新鮮組織検体を得ることができなかった。残りの 6 症例について得られた新鮮組織検体は液体窒素中で検討まで保存した。

5) genomic DNA および total RNA の抽出、cDNA の合成

便分離細胞の genomic DNA および total RNA の抽出は Allprep mini kit (Qiagen, Valencia, CA) を用いて行われた。新鮮凍結組織検体は 1.4mm のセラミックビーズを内包したチューブ (Bertin Technologies, Saint-Quentin-en-Yvelines Cedex, France) に入れ、Percellys 24 device (Bertin Technologies) を用いて 6,000rpm 50 秒にて破碎した後、細胞と同様に Allprep mini kit を用いて genomic DNA および total RNA を抽出した。

cDNA の合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (Applied Biosystems, Foster, CA) を用いて行った。

6) 定量的 real-time PCR

genomic DNA の real-time PCR は、genomic DNA 中の繰り返し配列である Alu 配列を対象とした (表 7)。4 μ L の genomic DNA template、10 μ L の TaqMan Fast Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)、500nM の forward および reverse primer、

250nM の probe を
全容量 20 μ L とし
て、 Applied
Biosystems 7500
Fast Real-Time

表7. Alu-real-time PCRのprimerおよびprobeの塩基配列

塩基配列	
Forward primer	5'-TAGTAGAGACGGGGTTTCACCTTG-3'
Reverse primer	5'-AGCTTGCA GTGAGCCGAGAT-3'
TaqMan [®] probe	5'-GAGAATGGCGTGAA-3'

TaqMan[®] probeは5'末端にreporter dyeとしてFAM(6-carboxyfluorescein)と3'末端にquencher dyeとしてMGB(minor groove binder)を結合している。

PCR Systems (Applied Biosystems) を用いた real-time PCR を行った (表 8)。PCR 条件は 95°C で 20 秒の前処理後に、95°C で 3 秒の denaturation と 62°C で 30 秒の

annealing/extension を 25cycle 繰り返した(表 8)。DNA 量の比較のために、各 PCR の反応系には TaqMan Control Genomic DNA (Applied Biosystems)を 10ng から 100fg まで段階希釈したサンプルを同時に反応させて標準曲線を作製し、絶対的定量法を用いた。

表8. Alu-real-time PCRの条件

	Volume (μL)	
genomic DNA template	4	} Pre-denaturation 95°C 20秒 Denaturation 95°C 3秒 Annealing/extension 62°C 30秒 } 25 cycles
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	10	
TaqMan primer/probe mixture	1	
Distilled water	5	
Total	20	

Total RNA 量の比較は、18S rRNA を対象とした。4μL の cDNA template、10μL の TaqMan Fast Universal PCR Master Mix、1μL の 20× TaqMan Eukaryotic 18S rRNA primers/probe mixture (Applied Biosystems)を全容量 20μL として、Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR Systems を用いた real-time RT-PCR (reverse transcriptase PCR)を行った(表 9)。PCR 条件は 95°C で 20 秒の前処理後に、95°C で 3 秒の denaturation と 62°C で 30 秒の annealing/extension を 40cycle 繰り返した(表 9)。RNA 量の比較は、Ct (Threshold Cycle) 値を用いた相対的定量法 (comparative Ct method) で行った(表 10)。

表9. Real-time RT-PCRの条件

	Volume (μL)	
cDNA template	4	} Pre-denaturation 95°C 20秒 Denaturation 95°C 3秒 Annealing/extension 62°C 30秒 } 40 cycles
TaqMan Fast Universal PCR Master Mix	10	
TaqMan primer/probe mixture	1	
Distilled water	5	
Total	20	

表10. 相対的定量法 (comparative Ct method) の計算式

$$\begin{aligned} \text{(各群の}\Delta\text{Ct値)} &= \text{(各群のCt値)} - \text{(0群のCt値)} \\ \text{(各群の相対発現量)} &= 2^{-\text{(各群の}\Delta\text{Ct値)}} \end{aligned}$$

Ct: threshold cycle, ΔCt: delta Ct.

各保存条件下での DNA 量および RNA 量は、0 群での DNA 量および RNA 量を 100%として数値化した。

7) 遺伝子変異解析(直接シーケンス法)

APC 遺伝子のコドン 1270 から 1594 と、p53 遺伝子のエクソン 5、6、7 および 8、K-ras 遺伝子のコドン 12 を対象として、癌特異遺伝子変異解析を行った。表 11 に各種遺伝子の PCR primer と sequence primer を示す。それぞれの PCR primer を用いて増幅した PCR 断片は sequence primer と BigDye Terminator v3.1 (Applied Biosystems) を用いて sequence PCR 反応を行い、ABI prism 3100 analyzer にて測定した。NCBI (The National Center for Biotechnology Information) GenBank に公開されている塩基配列を利用して、遺伝子解析ソフトウェア Sequencher Ver. 4.7 for Windows (Gene Codes, Ann Arbor, MI) を用いて遺伝子変異解析を行った。

表11. 遺伝子変異解析用のPCR primerおよびSequence primerの塩基配列

対象遺伝子	塩基配列
PCR用primer	
<i>APC</i>	
Forward	5'-AAGATGGGCAAGACCCAAACAC-3'
Reverse	5'-TTCAACACAATACACCCGTGGC-3'
<i>p53</i>	
Forward	5'-AACTCTCTCTAGCTCGCTAG-3'
Reverse	5'-TCCATCGTAAGTCAAGTAGC-3'
<i>K-ras</i>	
Forward	5'-CTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3'
Reverse	5'-CCCAAGGAAAGTAAAGTTC-3'
Sequence用primer	
<i>APC</i>	
Sequence-1	5'-AAACACCTCAAGTTCCAACCAC-3'
Sequence-2	5'-CAAAGGCTGCCACTTGCAAAG-3'
Sequence-3	5'-AAAATAAAGCACCTACTGCTG-3'
Sequence-4	5'-GAATCAGCCAGGCACAAAGC-3'
Sequence-5	5'-TACTGCAGCTTGCTTAGGTC-3'
Sequence-6	5'-TTTGGAGGGAGATTTGCTC-3'
Sequence-7	5'-CATATTGGAGTATCTTCTACAC-3'
Sequence-8	5'-GGTAATTTTGAAGCAGTCTGGGC-3'
<i>p53 Exon 5</i>	
Sequence-1	5'-GCCGTCTTCCAGTTGCTTTAT-3'
Sequence-2	5'-CCAAATACTCCACACGCAAAT-3'
<i>p53 Exon 6</i>	
Sequence-1	5'-CATGAGCGCTGCTCAGATAG-3'
Sequence-2	5'-TGCACATCTCATGGGGTTATAG-3'
<i>p53 Exon 7</i>	
Sequence-1	5'-CTTGGGCCTGTGTTATCTCCTA-3'
Sequence-2	5'-AGAAATCGGTAAGAGGTGGG-3'
<i>p53 Exon 8</i>	
Sequence-1	5'-ACCTCTTAACCTGTGGCTTC-3'
Sequence-2	5'-TACAACCAGGAGCCATTGTC-3'
<i>K-ras</i>	
Sequence-1	5'-CTGGTGGAGTATTTGATAGTG-3'
Sequence-2	5'-CCCAAGGAAAGTAAAGTTC-3'

2. 新規 EpCAM 抗体付加イムノビーズの開発・検討

1) 新規 EpCAM 抗体付加イムノビーズの作製

はじめに、粒子径の異なる磁性ビーズを準備した。1.8、3.3、3.9 μm の polymer microsphere の核に鉄酸化物を重層し、さらに親水性のポリグリシジルメタクリル酸を重

層すると、粒子径がそれぞれ3.0、

4.9、5.9 μm の均一な磁性ビーズ

が得られた(図 4)。抗体の結合

は、まずアミノ基を介してヤギ抗マ

ウス IgG 抗体 (Millipore, Billerica,

MA) を結合させて、さらに市販の

マウス抗ヒト EpCAM 抗体 (Clone

VU-1D9, AbD Serotec, Oxford,

UK) を結合させた(表 12)。

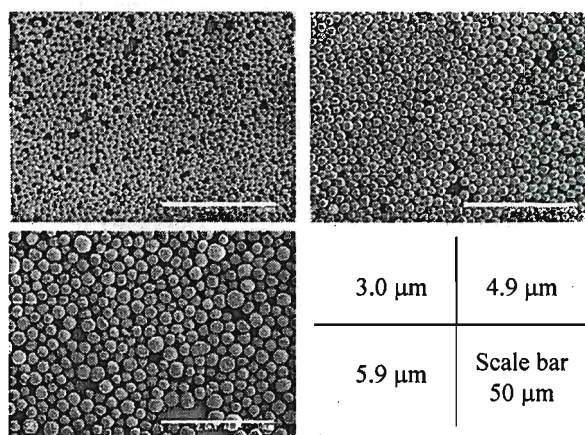


図4. 磁性ビーズの電子顕微鏡像

粒子径の異なる磁性ビーズ。それぞれ3.0 μm 、4.9 μm および5.9 μm の比較的均一な粒子径のビーズを準備した。Scale barは50 μm 。

つぎに、親和性の異なる抗ヒト

EpCAM 抗体の作製を行った。免疫原

として recombinant human EpCAM/Fc

chimera (R&D Systems, Minneapolis,

MN) を complete Freund's adjuvant

(Difco, Detroit, MI) と共に BALB/c マ

ウス (Charles River Japan, Shizuoka,

Japan) の腹腔内に注入した。その後、RIBI adjuvant system (Corixa, Seattle, WA) を用

いて3週毎に計7回の追加免疫を行い、抗原を静脈投与でブーストしたのちに、脾臓を

摘出した。摘出した脾臓細胞は myeloma 細胞と細胞融合を行わせ、dilution method に

て目的のハイブリドーマクローンを得た。ハイブリドーマクローンを CD1-Foxn1tm マウス

(Charles River Japan) の腹腔内に投与し腹水を産生させ、腹水中の抗体は protein G

表12. 新規イムノビーズの種類

Beads	粒子径 (μm)	抗ヒトEpCAM抗体
A	3.0	VU-1D9
B	4.9	VU-1D9
C	5.9	VU-1D9
D	3.0	Clone 1-2
E	3.0	Clone B8-4
F	3.0	Clone B8-7

Clone VU-1D9: 市販されている抗EpCAM抗体、Clone 1-2およびClone B8-4、Clone B8-7: 今回作成した抗EpCAM抗体。

affinity chromatography (GE Healthcare Life Science, Piscataway, NJ)を用いて精製した。

新規 EpCAM 抗体の親和性を確認するために、EpCAM 抗原陽性の大腸癌細胞株 HT-29 細胞と EpCAM 抗原陰性の膀胱癌細胞株 UMUC-3 細胞を対象に、FACSCalibur (BD, Franklin Lakes, NJ)を用いた flow cytometry (FCM)を行った。

最終的に、新規 EpCAM 抗体は最適粒子径の磁性ビーズに結合した(表 12)。

2) シミュレーション実験

便中の細胞を回収するのに適したイムノビーズの条件を解明するために、大腸癌細胞株 HT-29 を用いたシミュレーション実験を行った。2g の便を 40mL の 10% FBS 添加 Hanks 液中で十分均質化し 1×10^5 個の HT-29 細胞を加え、疑似大腸癌患者便溶液を作製した。512 μ m の孔のあいたナイロンメッシュでろ過した便溶液に表 12 で示した各種 EpCAM 抗体付加イムノビーズを 80 μ L 加えて、室温で 30 分間反応させた後に、室温で 15 分間磁石を用いて細胞-ビーズ複合体を回収し、生理食塩水で 2 回洗浄した。細胞数は NucleoCounter (ChemoMetec A/S, Allerød, Denmark)を用いて計測した。また、各種イムノビーズと細胞の結合度を観察するために、細胞-ビーズ複合体をパパニコロウ染色した。

3) 対象

病理学的に原発性大腸癌と診断され、国立がんセンター中央病院にて外科的切除術を施行された 40 症例が対象であり、自然排泄便は大腸癌切除前の入院時に提供された。19 症例はイムノビーズの粒子径に関する検討を行い、21 症例はイムノビーズに付加した EpCAM 抗体の性能に関する検討を行った。すべての患者は十分に説明され、書面による同意を得た。

4) 臨床検討

便検体は2gずつに分けられ、各種ビーズを用いて便中剥離細胞が回収された。細胞-ビーズ複合体は検討まで-80°Cで保存された。

DNAの抽出はAllprep mini kitを用いた。DNA量の検討は本章1-6)と同様に、Alu配列を対象とした定量的real-time PCRを行い、絶対定量法で比較した。

3. mRNAを用いた便分離細胞の遺伝子発現解析

1) 対象

病理学的に原発性大腸癌と診断され、国立がんセンター中央病院にて外科的切除術を施行された大腸癌患者 166 症例と、国立がんセンターがん予防・検診研究センターにて大腸内視鏡検査を施行され、過形成ポリープを含め、大腸腺腫、大腸癌など異常が発見されなかった健常者 134 症例が対象である。健常者の平均年齢は60歳で、男性59症例、女性75症例だった(表13)。癌患者の平均年齢は63歳で、男性108症例、女性58症例だった。大腸癌の局在は、直腸82症例、S状結腸34症例、下行結腸7

表13. 患者および健常者の背景

背景	大腸癌患者 (N = 166)	健常者 (N = 134)
年齢、歳		
平均	63	60
範囲	32-83	40-70
性別、症例数(%)		
男性	108 (65.1)	59 (44.0)
女性	58 (34.9)	75 (56.0)
腫瘍局在、症例数(%)		
盲腸	7 (4.2)	
上行結腸	29 (17.5)	
横行結腸	7 (4.2)	
下行結腸	7 (4.2)	
S状結腸	34 (20.5)	
直腸	82 (49.4)	
腫瘍径、mm		
平均	38	
範囲	10-160	
組織型、症例数(%)		
W/D	89 (53.6)	
M/D	67 (40.4)	
P/D	4 (2.4)	
Mucinous carcinoma	5 (3.0)	
Carcinoid tumor	1 (0.6)	
腫瘍進達度、症例数(%)		
T1	18 (10.8)	
T2	39 (23.5)	
T3	106 (63.9)	
T4	3 (1.8)	
Dukes分類、症例数(%)		
A	46 (27.7)	
B	41 (24.7)	
C	66 (39.8)	
D	13 (7.8)	

W/D: well differentiated adenocarcinoma, M/D: moderately differentiated adenocarcinoma, P/D: poorly differentiated adenocarcinoma.

症例、横行結腸 7 症例、上行結腸 29 症例、盲腸 7 症例だった。平均腫瘍径は 38mm で、Dukes 分類を用いた大腸癌の進行度は、stage A が 46 症例、stage B が 41 症例、stage C が 66 症例、stage D が 13 症例だった(表 13)。すべての患者および健常者は十分に説明され、書面による同意を得た。

2) 便検体からの細胞分離

癌患者の自然排泄便は大腸癌切除前の入院時に提供され、健常者の自然排泄便は大腸内視鏡施行日より 2、3 週間経過してから提供された。2g の便は本章 1-3) で述べた細胞分離法を用いて剥離細胞を回収した。細胞-ビーズ複合体は検討まで -80°C で保存した。

3) total RNA 抽出と cDNA 合成

便分離細胞からの total RNA の抽出は RNeasy mini kit (Qiagen) にて行い、cDNA 合成は High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor を用いて行った。

4) 定量的 real-time RT-PCR

遺伝子発現解析を行うにあたり、過去の報告や microarray の結果より、15 種類の候補遺伝子を選定した(表 14)。また、*B2M* 遺伝子 (beta-2-microglobulin) は内部コントロールとして使用した。Real-time RT-PCR の条件は、本章 1-6) と同じ条件であり、すべての遺伝子に関して、市販の TaqMan primers and probe mixture (Applied Biosystems) を用いた。遺伝子発現解析は内部コントロールである *B2M* 遺伝子に対する相対発現量を相対的定量法 (comparative Ct method) で計算した(表 15)。

表14. 遺伝子発現解析の候補遺伝子および内因性コントロール遺伝子

Gene symbol	Fullspell
対象遺伝子	
<i>C1orf135</i>	chromosome 1 open reading frame 135
<i>CDC45L</i>	cell division cycle 45-like
<i>CEACAM5</i>	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 5
<i>DDX11</i>	DEAD/H box polypeptide 11
<i>ERCC6L</i>	excision repair cross-complementing rodent repair deficiency, complementation group 6-like
<i>GAD1</i>	glutamate decarboxylase 1
<i>IGF2BP3</i>	insulin-like growth factor 2 mRNA binding protein 3
<i>KRAS</i>	Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
<i>KRT20</i>	keratin 20
<i>LAMA5</i>	laminin alpha 5
<i>MMP7</i>	matrix metalloproteinase 7
<i>MYBL2</i>	myeloblastosis viral oncogene homolog like 2
<i>PTGS2</i>	prostaglandin-endoperoxide synthase 2
<i>TMEM118</i>	transmembrane protein 118
<i>TP53</i>	tumor protein p53
内因性コントロール遺伝子	
<i>B2M</i>	beta-2-microglobulin

表15. 遺伝子発現解析に用いた相対的定量法の計算式

$$\begin{aligned} (\text{各種遺伝子の}\Delta\text{Ct値}) &= (\text{各種遺伝子のCt値}) - (\text{B2MのCt値}) \\ (\text{各種遺伝子の相対発現量}) &= 2^{-(\text{各種遺伝子の}\Delta\text{Ct値})} \end{aligned}$$

Ct: threshold cycle, Δ Ct: delta Ct, B2M: beta-2-microglobulin.

4. 統計解析

便の保存条件に関する解析のうち、DNA 量や RNA 量の比較は Fisher's exact test を用いた。ビーズの検討で、シミュレーション実験の細胞回収効率は Tukey-Kramer multiple comparisons test を用い、臨床検体での DNA 回収量の比較は Mann-Whitney U test を用いた。遺伝子発現解析で、各種遺伝子の測定感度と各種条件における感度は Fisher's exact test を用い、患者と健常者の各種遺伝子の相対発現量の比較は Mann-Whitney U test を用いた。すべての統計解析は StatView ver. 5 for Windows (Abacus Concepts, Berkeley, CA) にて行い、 $P < 0.05$ を有意とした。

第3章 結果

1. 便の保存条件の検討

1) Alu 配列を対象にした Alu-real-time PCR の測定感度と正確性

2g の便から回収された細胞の DNA および RNA は極微量であるために、real-time PCR を用いて抽出量を確認した。Genomic DNA 量の解析には Alu 配列をターゲットとした primer/probe kit を用いた。TaqMan Control Genomic DNA を段階希釈して Alu-real-time PCR を行った結果、DNA template 量が 10ng から 100fg まで real-time PCR による検出が可能であった。一方、蒸留水を加えた陰性コントロールでは検出できなかった(図 5a)。また、TaqMan Control Genomic DNA の段階希釈系列と Ct 値の間には相関係数 $R^2=0.9982$ の正の相関を認めた(図 5b)。

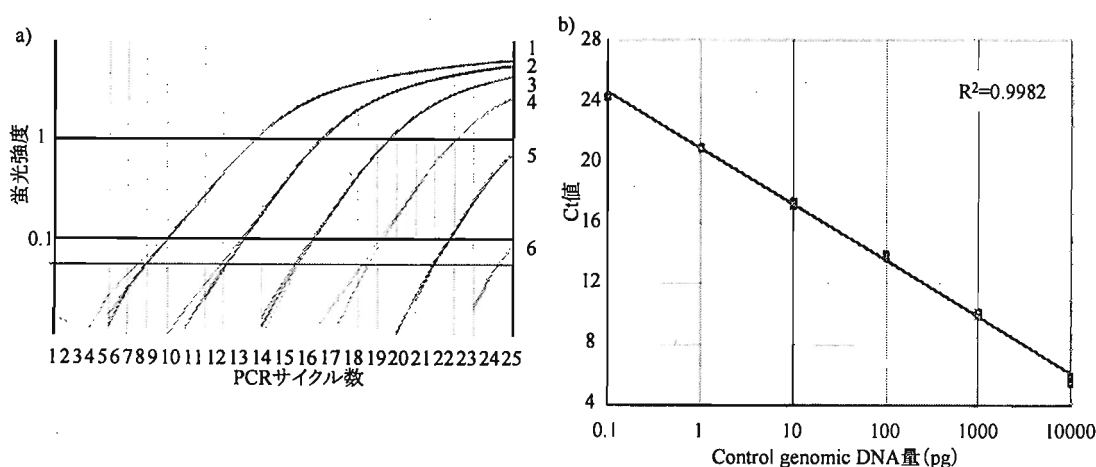


図5. Alu-real-time PCRの測定感度と正確度

a)各濃度のcontrol genomic DNAを使用したAlu-real-time PCRの測定感度。Line 1: 10 ng/μL, line 2: 1 ng/μL, line 3: 100 pg/μL, line 4: 10 pg/μL, line 5: 1 pg/μL, line 6: 100 fg/μL。Negative control (distilled water)は検出されなかった。緑線はThresholdを示している。b)各濃度のcontrol genomic DNAを用いたAlu-real-time PCRの正確度。DNA濃度とCt値の間には正の相関を認めた($R^2 = 0.9982$)。

2) 各種保存便における genomic DNA および total RNA の保存効率の比較

各種条件(表 6)で保存した便から回収した細胞の genomic DNA 量は、Alu-real-time PCR を用いて、当日処理群(Group 0)との比較を行った。0 群、1A 群、1B 群、2A 群、2B 群、3A 群および 3B 群での DNA 保存効率は、それぞれ 100 ± 56 (%、平均 \pm 標準偏差)、 87 ± 128 、 13 ± 20 、 130 ± 216 、 24 ± 58 、 113 ± 174 および 14

± 32 であった(図 6a)。DNA の保存効率に関して、当日処理の 0 群と 4°C で保存した 1A 群、2A 群および 3A 群では有意な差を認めなかった。一方で、37°C で保存した 1B 群、2B 群および 3B 群は 0 群と比べて DNA 回収効率は有意に低下していた ($P < 0.01$)。

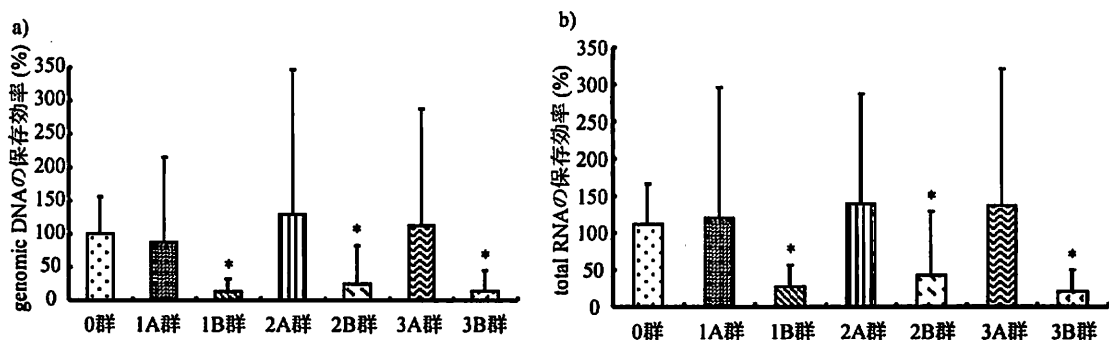


図6. Genomic DNAおよびtotal RNAの保存効率

表6に示した条件で保存した便中剥離細胞の比較を行った。a)0群(当日処理群)と比較した各種保存条件群における便分離細胞からのgenomic DNA保存効率。b)0群(当日処理群)と比較した各種保存条件群における便分離細胞からのtotal RNA保存効率。0群と比較して、1B群、2B群および3B群間には有意差を認めた(*, $P < 0.01$)。

Total RNA の保存効率は、18S ribosomal RNA を対象にした real-time RT-PCR 法を用いて同様に解析した。0 群、1A 群、1B 群、2A 群、2B 群、3A 群および 3B 群での RNA 保存効率は、それぞれ 112 ± 546 (%、平均 ± 標準偏差)、 120 ± 175 、 26 ± 30 、 140 ± 147 、 43 ± 87 、 137 ± 184 および 20 ± 31 であった(図 6b)。DNA の保存効率と同様に RNA においても、当日処理の 0 群と 4°C で保存した 1A 群、2A 群および 3A 群では有意な差を認めなかった。一方で、37°C で保存した 1B 群、2B 群および 3B 群は 0 群と比べて RNA 保存効率は有意に低下していた ($P < 0.01$)。

3) 各種保存便における遺伝子変異解析

DNA 量や RNA 量に関して便の保存は 4°C が良いが、癌組織と同じ遺伝子変異を厳しい条件で保存した便からの分離細胞でも保存されて検出可能かどうかを検討した。手術時の癌部および非癌部組織由来の DNA と、各種条件で保存した便分離細胞由来の DNA がすべてそろっている 6 例のうち、癌組織中に遺伝子変異を認めた 4 症例に関して便分離癌細胞の遺伝子変異解析を行った。APC 遺伝子に遺伝子変異

(C3602A)を認めた一症例を図7に示した。便中に含まれる剥離細胞のポピュレーションはそれぞれの便サンプルにて異なるために、各種保存条件ごとに3個ずつのサンプルを検討した。癌組織と同じ遺伝子変異が便分離細胞でも認められ、それは最も厳しい保存条件である37°Cで3日間放置した便分離細胞でも認められた。全症例における遺伝子変異の種類とそれぞれの保存便の分離細胞における遺伝子変異の検出を表16に示した。原発腫瘍の局在が右結腸(盲腸)にあった症例4においてはいずれの条件でも分離細胞中に遺伝子変異を確認できなかった。その他の症例においては、当日処理群、4°C保存群、37°C保存群いずれでも遺伝子変異を確認できた。

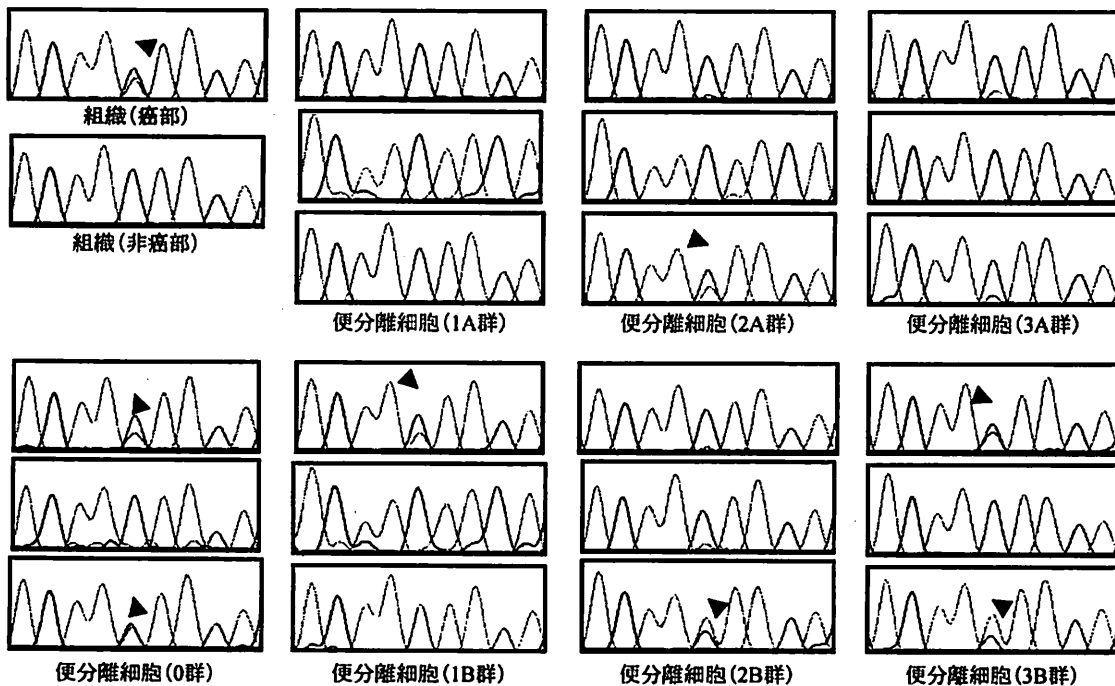


図7. 腫瘍組織と便分離細胞における遺伝子変異の一例

表16に示した症例1におけるAPC遺伝子変異。大腸癌組織においてAPC codon 3602の点突然変異が認められる。この変異によりAPCのアミノ酸はセリン(TCA)から終止コドン(TAA)に置き換わっている。この変異は正常大腸粘膜部では観察されなかった。同様の遺伝子変異は0群、1B群、2A群、2B群および3B群においても認められた。矢頭(▼)は変異を認めた部位を示す。赤線、青線、緑線および黒線はそれぞれT (thymine)、C (cytosine)、A (adenine) および G (guanine)を示す。

表16. 便分離細胞における大腸癌関連遺伝子変異と臨床病理学的特徴

遺伝子変異	保存条件								症例番号	腫瘍局在	Dukes分類
	0	1		2		3					
		A	B	A	B	A	B				
<i>APC</i> gene C3602A TCA (Ser)-TAA (Stop)	○		○					○	症例1	下行結腸	A
<i>APC</i> gene C4634A TCA (Ser)-TAA (Stop)	○	○						○	症例1	下行結腸	A
<i>APC</i> gene 4101-4102insA frame shift			○					○	症例2	直腸	B
<i>p53</i> gene (Exon 5) G517A GTG (Val)-ATG (Met)		○							症例2	直腸	B
<i>APC</i> gene 4667-4668insA frame shift								○	症例3	直腸	C
<i>p53</i> gene (Exon 7) G734T GGC (Gly)-GTC (Val)									症例3	直腸	C
<i>p53</i> gene (Exon 8) C916T CGA (Arg)-TGA (Stop)									症例4	盲腸	B

丸印(○)は、大腸癌組織と同じ遺伝子変異がそれぞれの便分離細胞でも認められたことを示している。

2. 新規 EpCAM 抗体付加イムノビーズの開発・検討

1) 粒子径の異なるビーズを用いた細胞回収率の検討

我々は、3つの異なる粒子径のビーズを作製した。ビーズA、ビーズBおよびビーズCの粒子径はそれぞれ、3.0 μ m、4.9 μ m および 5.9 μ m だった(表12 および図4)。細胞回収に最も適した粒子径を見出すために、市販の EpCAM 抗体であるクローン VU-1D9 をそれぞれの粒子径のビーズに結合した(表12)。培養細胞とボランティア便を用いたシミュレーション実験において、ビーズA、ビーズB およびビーズCの細胞回収率はそれぞれ、65.9 \pm 1.4(%、平均 \pm 標準偏差)、61.1 \pm 1.0 および 57.1 \pm 0.8 であった。ビーズA(最も小さなビーズ)を用いた細胞回収率は粒子径の大きなビーズB($P=0.0001$)およびビーズC($P<0.0001$)よりも有意に優れていた(図8a)。ビー

ズにて回収された細胞を光学顕微鏡下に観察すると、粒子径の大きなビーズ B やビーズ C に比べて粒子径の小さなビーズ A はより多くのビーズが細胞を取り囲んでいた (図 8b)。

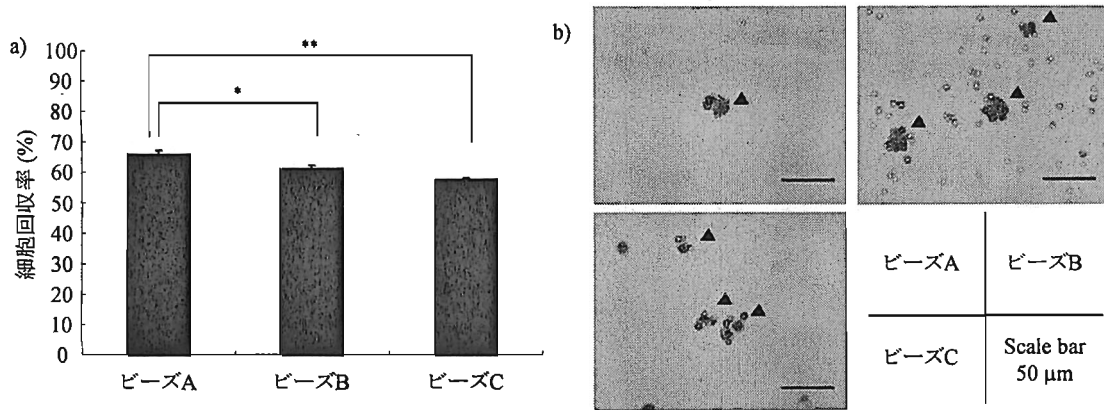


図8. 粒子径の異なるイムノビーズのシミュレーション実験による性能検討

a)細胞回収率の検討。ビーズ A(最小径、3.0 μ m)、ビーズB(中等径、4.9 μ m)およびビーズC(最大径、5.9 μ m)を使用した細胞回収率はそれぞれ、65.9 \pm 1.37(%、平均 \pm 標準偏差)、61.1 \pm 0.98および57.1 \pm 0.75であった。有意差はアスタリスク(*, $P=0.0001$ 、**, $P<0.0001$)にて示す。b)イムノビーズで回収したHT29大腸癌細胞株のPapanicolaou染色像。矢頭(▲)は細胞-ビーズ複合体を示す。粒子径の小さなビーズAは最も強固に細胞と結合している。Scale barは50 μ m。

2) 異なる親和性を持つ新規 EpCAM 抗体

我々は、クローン 1-2、B8-4 および B8-7 というマウス抗ヒト EpCAM モノクローナル抗体を樹立した。FCM の解析結果よりクローン 1-2 は低親和性の抗体であり、B8-4 および B8-7 は高親和性抗体であった(図 9)。それぞれの抗体は最適粒子径(3.0 μ m)のビーズに結合された(表 12)。

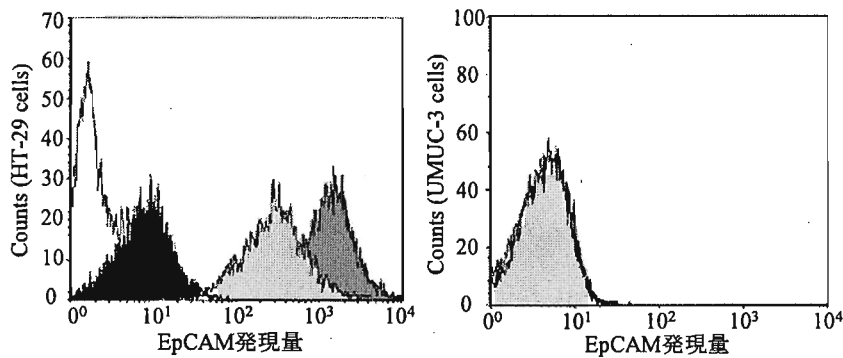


図9. FCMによる新規EpCAM抗体の性能検討

新規EpCAM抗体の親和性はflow cytometry (FCM)にて検討した。EpCAM抗原陽性のHT29細胞株とEpCAM抗原陰性のUMUC3細胞株を使用した。白色、黒色、濃灰色および淡灰色はそれぞれ、non-specific mouse IgG1 mAb、clone 1-2、clone B8-4および clone B8-7を示す。

3) 性能の異なる抗体を結合したビーズを用いた細胞回収率の検討

培養細胞とボランティア便を用いたシミュレーション実験において、ビーズ D、ビーズ E およびビーズ F の細胞回収率はそれぞれ、 4.5 ± 1.0 (%、平均 \pm 標準偏差)、 73.5 ± 2.0 および 71.2 ± 3.4 であった。高親和性の抗体を結合したビーズ E およびビーズ F を用いた細胞回収率は低親和性の抗体を結合したビーズ D ($P < 0.0001$) よりも有意に優れていた(図 10)。

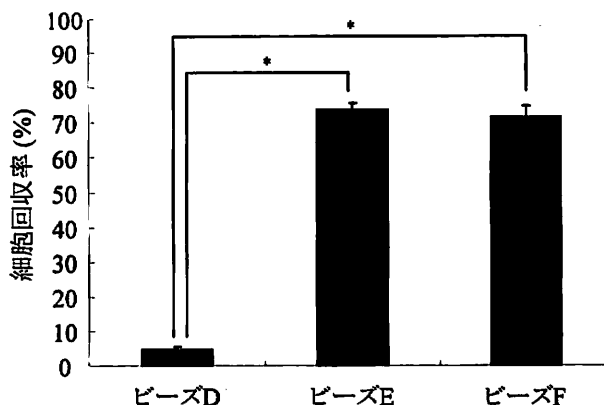


図10. 結合抗体の異なるイムノビーズのシミュレーション実験による性能検討

細胞回収率の検討。ビーズD(低親和性抗体Clone 1-2結合型)、ビーズE(高親和性抗体Clone B8-4結合型)およびビーズF(高親和性抗体Clone B8-7結合型)を使用した細胞回収率はそれぞれ、 4.5 ± 0.98 (%、平均 \pm 標準偏差)、 73.5 ± 1.96 および 71.2 ± 3.39 だった。有意差はアスタリスク (*、 $P < 0.0001$)にて示す。

4) 臨床検体における新規イムノビーズの細胞回収能力

ビーズの粒子径に関する研究で、臨床検体の 2g の便から細胞を回収し、抽出された genomic DNA 量の中央値はビーズ A、ビーズ B およびビーズ C を用いるとそれぞれ、 1.50ng (範囲 $0.09\text{-}8.12$)、 0.58ng (範囲 $0\text{-}4.23$)、 0.25ng (範囲 $0\text{-}4.62$) であった(図 11a)。ビーズ A とビーズ B の間に有意差はなかった ($P=0.09$) が、ビーズ A とビーズ C では有意差を認めた ($P=0.02$)。一方、抗体の性能に関する研究では、抽出された DNA 量の中央値はビーズ D、ビーズ E およびビーズ F を用いるとそれぞれ、 0.75ng (範囲 $0.03\text{-}3.65$)、 1.66ng (範囲 $0.12\text{-}5.74$)、 0.99ng (範囲 $0.08\text{-}5.67$) であった(図 11b)。ビーズ D とビーズ E の間には有意差を認めた ($P=0.01$)。

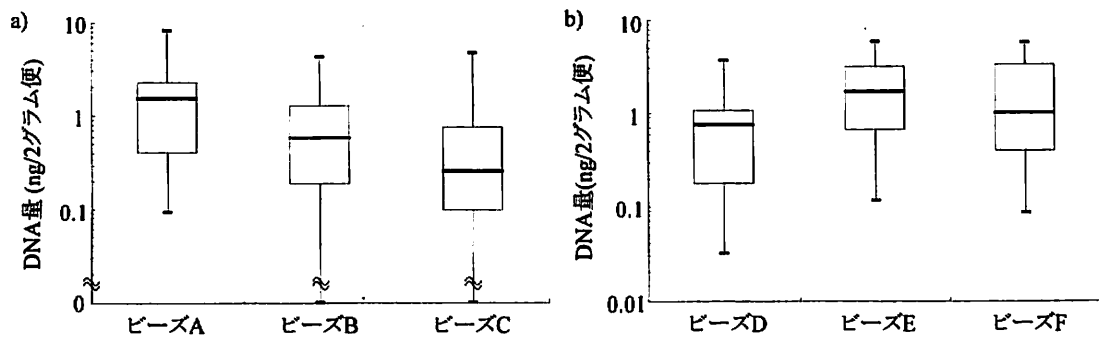


図11. 臨床検体を使用した各種イムノビーズの細胞回収能

a) 粒子径の異なるイムノビーズを使用した細胞回収能の検討。2グラムの便から回収されるDNA量は、ビーズA(最小径、3.0 μ m)、ビーズB(中等径、4.9 μ m)およびビーズC(最大径、5.9 μ m)を使用したときにそれぞれ、1.50 ng(範囲; 0.09-8.12)、0.58 ng(範囲; 0-4.23)および0.25 ng(範囲; 0-4.62)であった。b) 結合した抗体の異なるイムノビーズを使用した細胞回収能の検討。2グラムの便から回収されるDNA量は、ビーズD(低親和性のClone 1-2を付加)、ビーズE(高親和性のClone B8-4を付加)およびビーズF(高親和性のClone B8-7を付加)を使用したときにそれぞれ、0.75 ng(範囲; 0.03-3.65)、1.66 ng(範囲; 0.12-5.74)および0.99 ng(範囲; 0.08-5.67)であった。

3. mRNA を用いた便分離細胞の遺伝子発現解析

1) 対象遺伝子の選定

遺伝子発現解析を行う候補遺伝子 15 種類(表 14)から対象遺伝子を選定するに際し、大腸癌患者 31 症例の新鮮凍結組織のうち癌部由来の RNA と非癌部由来の RNA を用いた遺伝子発現量の比較を行った(表 17)。対象遺伝子は、非癌部より癌部において高発現していることが求められる。さらに、予備実験において、便 2g から抽出可能な RNA 量は微量であり、内因性コントロール遺伝子である *B2M* においてもその Ct 値は 30 前後であることが解っているため、*B2M* と比べても十分に発現量の多い遺伝子である必要がある。以上の条件に合致した遺伝子として *CEACAM5*、*MMP7*、*MYBL2*、*PTGS2* および *TP53* を遺伝子発現解析の対象遺伝子と選定した。

表17. 癌部および非癌部組織RNAの遺伝子発現解析

	<i>Clorf135</i>	<i>CDC45L</i>	<i>CEACAM5</i>	<i>DDX11</i>	<i>ERCC6L</i>	<i>GAD1</i>	<i>IGF2BP3</i>	<i>KRAS</i>
癌部ΔCt値	7.67	8.21	-0.13	6.22	7.09	11.39	13.66	4.79
非癌部ΔCt値	9.29	8.99	0.23	6.65	6.89	13.99	14.96	4.22
癌特異度	28/31	23/31	20/31	23/31	17/31	25/31	18/31	9/31
	<i>KRT20</i>	<i>LAMA5</i>	<i>MMP7</i>	<i>MYBL2</i>	<i>PTGS2</i>	<i>TMEM118</i>	<i>TP53</i>	
癌部ΔCt値	2.65	6.90	6.17	2.90	6.42	13.03	5.88	
非癌部ΔCt値	0.09	7.24	11.67	4.36	7.91	14.04	6.53	
癌特異度	0/31	19/31	31/31	27/31	23/31	23/31	21/31	

ΔCt値: 対象遺伝子のCt値と内因性コントロール遺伝子(*B2M*)のCt値の差。癌特異度: (非癌部よりも癌部での遺伝子発現が高い症例数)/(全症例数)。

2) Real-time RT-PCR を用いた各種遺伝子の検出率

表 18 に各種遺伝子の検出率を示す。大腸癌患者での内因性コントロール遺伝子である *B2M* の検出率は 表18. 便中剥離細胞における各種遺伝子の検出率

対象遺伝子	大腸癌患者 (N = 166)	健常者 (N = 134)	P value
<i>B2M</i>			
検出数 (%)	127 (76.5)	101 (75.4)	
平均Ct値	30.541	32.194	0.89
<i>CEACAM5</i>			
検出数 (%)	125 (75.3)	98 (73.1)	
平均Ct値	30.229	32.023	0.69
<i>MMP7</i>			
検出数 (%)	39 (23.5)	6 (4.5)	
平均Ct値	34.381	37.612	<0.0001
<i>MYBL2</i>			
検出数 (%)	40 (24.1)	1 (0.7)	
平均Ct値	33.949	33.708	<0.0001
<i>PTGS2</i>			
検出数 (%)	84 (50.6)	16 (11.9)	
平均Ct値	33.529	34.892	<0.0001
<i>TP53</i>			
検出数 (%)	49 (29.5)	7 (5.2)	
平均Ct値	35.467	36.361	<0.0001

P value: Fisher's exact testで解析し、P<0.05を有意とした。

している。

対象遺伝子のうち *CEACAM5* 遺伝子の検出率は大腸癌患者で75.3%であり、健常者で 73.1%と有意差を認めなかった ($P=0.69$)。それ以外の *MMP7*、*MYBL2*、*PTGS2* および *TP53* 遺伝子における大腸癌患者での検出率は、それぞれ 23.5%、24.1%、

50.6%および29.5%であり、健常者の4.5%、0.7%、11.9%および5.2%より有意に高かった($P<0.0001$)。

3) 各種対象遺伝子の相対発現量

*B2M*が検出可能だった大腸癌患者127名と健常者101名を対象とした。大腸癌患者の*CEACAM5*、*MMP7*、*MYBL2*、*PTGS2* および *TP53* の相対発現量の平均値はそれぞれ1.706、0.008、0.023、0.137 および 0.003 であった。一方、健常者の

表19. 便中剥離細胞における各種遺伝子の相対発現量

対象遺伝子	大腸癌患者 (N = 127)	健常者 (N = 101)	P value
<i>CEACAM5</i>			
平均相対発現量	1.706	1.290	
範囲	0-20.224	0-12.527	0.21
<i>MMP7</i>			
平均相対発現量	0.008	0.0003	
範囲	0-0.166	0-0.021	0.0009
<i>MYBL2</i>			
平均相対発現量	0.023	9.648×10^{-8}	
範囲	0-1.728	0-0.000009	<0.0001
<i>PTGS2</i>			
平均相対発現量	0.137	0.015	
範囲	0-2.539	0-0.409	<0.0001
<i>TP53</i>			
平均相対発現量	0.003	0.0002	
範囲	0-0.048	0-0.010	<0.0001

(表 19)。

P value: Mann-Whitney testで解析し、 $P<0.05$ を有意とした。

CEACAM5 の発現量は大腸癌患者と健常者で有意差を認めなかった($P=0.21$)。それ以外の対象遺伝子においては大腸癌患者と健常者の間に有意差を認めた($P<0.001$)。

4) 大腸癌細胞を同定するための各種遺伝子発現量の域値設定

大腸癌細胞を同定する最適な域値をそれぞれの遺伝子において設定するために、各種遺伝子について相対発現量を用いたヒストグラムを作製した(図 12)。

CEACAM5、*MMP7*、*MYBL2*、*PTGS2* および *TP53* において特異度95%を確保するた

めの最適な域値はそれぞれ、2.8、0.0003、0.00001、0.06 および 0.001 以上であった。

しかし、*CEACAM5* において、この域値での感度はわずか 14.2% であった。

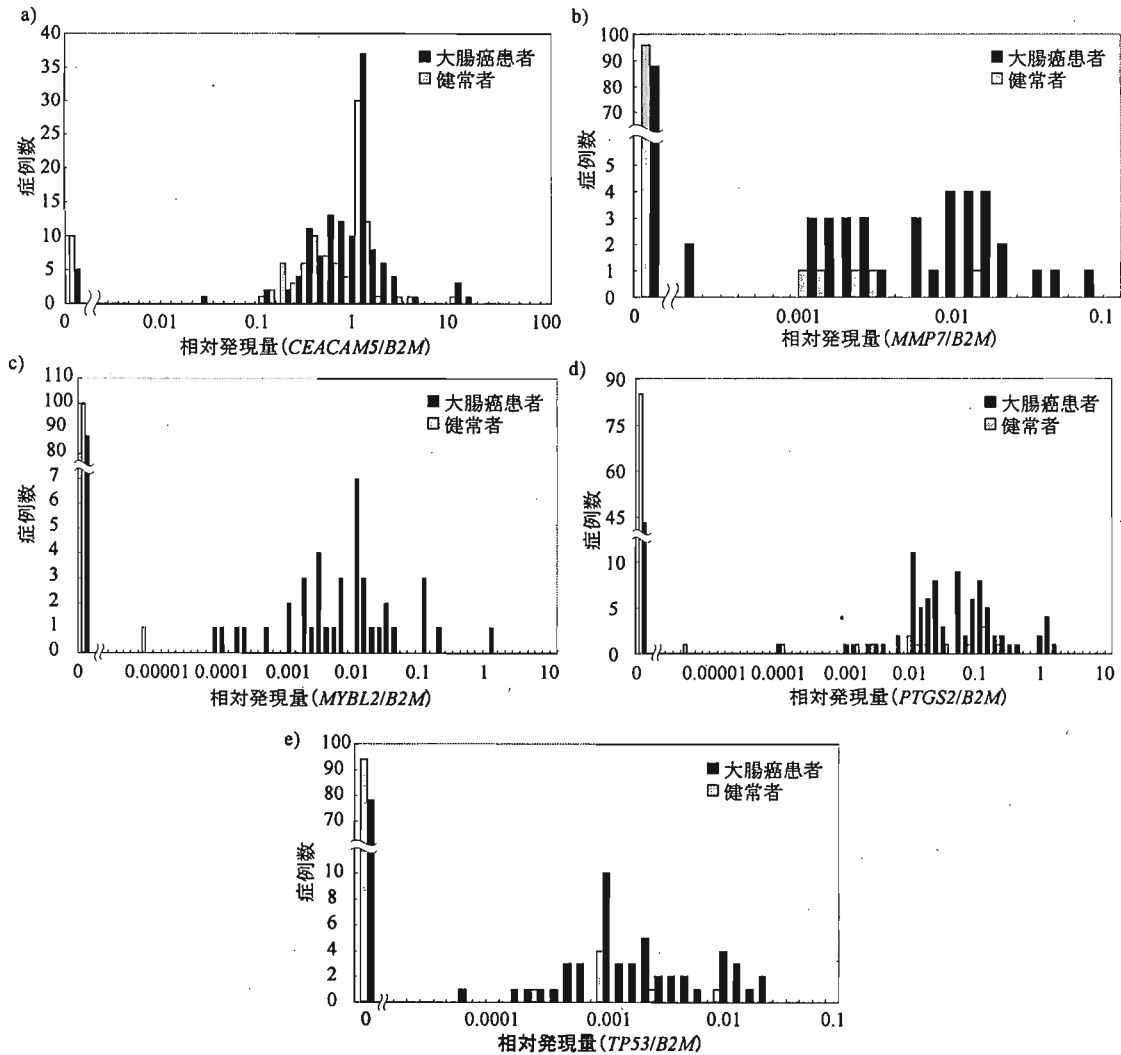


図12. 各種遺伝子発現量のヒストグラム

大腸癌患者および健常者の便中剥離細胞におけるB2Mにて補正した各種遺伝子の相対発現量を用いたヒストグラム。a) *CEACAM5* 遺伝子発現量のヒストグラム。特異度95%以上を確保する適切な域値(2.8以上)では、感度14%だった。b) *MMP7* 遺伝子発現量のヒストグラム。特異度95%以上を確保する適切な域値(0.0003以上)では、感度31%だった。c) *MYBL2* 遺伝子発現量のヒストグラム。特異度95%以上を確保する適切な域値(0.00001以上)では、感度32%だった。d) *PTGS2* 遺伝子発現量のヒストグラム。特異度95%以上を確保する適切な域値(0.06以上)では、感度34%だった。e) *TP53* 遺伝子発現量のヒストグラム。特異度95%以上を確保する適切な域値(0.001以上)では、感度29%だった。

5) 遺伝子発現解析の感度と特異度

便中剥離細胞での *CEACAM5* 発現量は大腸癌患者と健常者で差を認めなかったため、遺伝子発現解析を行う対象遺伝子は *MMP7*、*MYBL2*、*PTGS2* および *TP53* の4 遺伝子とした。4 遺伝子を併用した感度は 58.3% であり、特異度は 88.1% であった

(表 20)。MMP7、MYBL2、PTGS2 および TP53 における各遺伝子の感度はそれぞれ、30.7%、31.5%、33.9%および 29.1%であった。

表20. 便中剥離細胞を用いた遺伝子発現解析の感度と特異度

対象遺伝子	大腸癌患者 (N = 127)		健常者 (N = 101)	
	陽性数	感度 (%) (95%信頼区間)	陰性数	特異度 (%) (95%信頼区間)
Combined markers	74	58.3 (49.2-67.0)	89	88.1 (80.2-93.7)
MMP7	39	30.7 (22.8-39.5)	96	95.1 (88.8-93.7)
MYBL2	40	31.5 (23.6-40.3)	101	100 (96.4-100)
PTGS2	43	33.9 (25.7-42.8)	95	94.1 (87.5-97.8)
TP53	37	29.1 (21.4-37.8)	95	94.1 (87.5-97.8)

各種遺伝子発現量の域値: MMP7 (0.0003以上)、MYBL2 (0.00001以上)、PTGS2 (0.06以上)およびTP53 (0.001以上)。

つぎに 4 種類の遺伝子セットを用いて、原発腫瘍の局在、腫瘍径、深達度および大腸癌の進行度別に感度を検討した(表 21)。原発腫瘍が右側結腸(盲腸、上行結腸、横行結腸)に存在した症例と左側結腸(下行結腸、S 状結腸、直腸)に存在した症例における感度は、40.5%と 65.6%であった。原発腫瘍が小さな腫瘍(35mm 以上)の症例と大きな腫瘍(35mm 以上)の症例における感度は、46.7%と 68.7%であった。原発腫瘍の壁深達度が浅い(固有筋層までにとどまる)症例と深い(固有筋層を越えて浸潤した)症例における感度は、45.2%と 64.7%であった。比較的早期の大腸癌(Dukes' stage A および B)の症例と進行した大腸癌(Dukes' stage C および D)の症例における感度は、63.6%と 55.7%であった。原発腫瘍の局在($P=0.01$)と腫瘍径($P=0.02$)には有意差を認めた。腫瘍の浸潤度($P=0.06$)と大腸癌の進行度($P=0.4$)には有意な差を認めなかった。

表21. 腫瘍局在、腫瘍径、深達度および進行度別の感度

		感度(%)		P value	
対象遺伝子		陽性数	(95%信頼区間)		
腫瘍局在					
右側結腸(N = 37)	Combined markers	15	40.5 (24.8-58.0)	0.01	
	<i>MMP7</i>	4	10.8 (3.0-25.4)		
	<i>MYBL2</i>	3	8.1 (1.7-21.9)		
	<i>PTGS2</i>	7	18.9 (8.0-35.2)		
	<i>TP53</i>	8	21.6 (9.8-38.3)		
	左側結腸(N = 90)	Combined markers	59		65.6 (54.8-75.3)
		<i>MMP7</i>	35		38.9 (28.8-49.7)
		<i>MYBL2</i>	37		41.1 (30.9-52.0)
		<i>PTGS2</i>	36		40.0 (29.8-50.9)
		<i>TP53</i>	29		32.2 (22.7-42.9)
腫瘍径					
35 mm以下(N = 60)	Combined markers	28	46.7 (33.7-60.0)	0.02	
	<i>MMP7</i>	11	18.3 (9.5-30.4)		
	<i>MYBL2</i>	13	21.7 (12.1-34.2)		
	<i>PTGS2</i>	17	28.3 (17.5-41.5)		
	<i>TP53</i>	14	23.3 (13.4-36.1)		
35 mm以上(N = 67)	Combined markers	46	68.7 (56.2-79.5)		
	<i>MMP7</i>	28	41.8 (29.9-54.5)		
	<i>MYBL2</i>	27	40.3 (28.5-53.0)		
	<i>PTGS2</i>	26	38.8 (27.2-51.5)		
	<i>TP53</i>	23	34.3 (23.1-46.9)		
腫瘍深達度					
T1、T2(N = 42)	Combined markers	19	45.2 (29.8-61.3)	0.06	
	<i>MMP7</i>	8	19.0 (8.6-34.1)		
	<i>MYBL2</i>	11	26.2 (13.9-42.0)		
	<i>PTGS2</i>	12	28.6 (15.7-44.6)		
	<i>TP53</i>	9	21.4 (10.3-36.9)		
T3、T4(N = 85)	Combined markers	55	64.7 (53.6-74.8)		
	<i>MMP7</i>	31	36.5 (26.3-47.6)		
	<i>MYBL2</i>	29	34.1 (24.2-45.3)		
	<i>PTGS2</i>	31	36.5 (26.3-47.6)		
	<i>TP53</i>	28	32.9 (23.1-44.0)		
Dukes分類					
Stage A、B(N = 66)	Combined markers	42	63.6 (50.9-75.1)	0.37	
	<i>MMP7</i>	18	27.3 (17.0-39.7)		
	<i>MYBL2</i>	21	31.8 (20.9-44.5)		
	<i>PTGS2</i>	27	40.9 (29.0-53.7)		
	<i>TP53</i>	19	28.8 (18.3-41.3)		
Stage C、D(N = 61)	Combined markers	34	55.7 (42.5-68.5)		
	<i>MMP7</i>	21	34.4 (22.8-47.7)		
	<i>MYBL2</i>	19	31.1 (19.9-44.3)		
	<i>PTGS2</i>	16	26.2 (15.8-39.1)		
	<i>TP53</i>	18	29.5 (18.5-42.5)		

各種遺伝子発現量の域値: *MMP7* (0.0003以上)、*MYBL2* (0.00001以上)、*PTGS2* (0.06以上) および *TP53* (0.001以上)。P value: Fisher's exact testにて解析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

第4章 考察

1. 自然排泄便を用いた大腸癌診断法

大腸癌の死亡率を低下させるためには、癌検診を含めた早期診断が最も重要である。現在の大腸癌検診法は便潜血反応検査(化学法や免疫法)、注腸二重造影検査および大腸内視鏡検査(S状結腸内視鏡検査や全大腸内視鏡検査)が主たるものであるが、American Cancer Societyが推奨する大腸癌検診には、2008年よりオプションとして Stool DNA test と CT colonoscopy が加えられた⁽²⁸⁾。一方で、大腸癌が直接接触する自然排泄便を対象に、便潜血反応検査に替わるべく新しい検査法が世界中の多くの研究施設において検討されている。便 DNA では APC、K-ras、p53 などの癌関連遺伝子変異解析⁽²⁰⁻²⁴⁾や癌関連プロモータ領域のメチル化解析^(29,30)、DNA integrity^(31,32)などがあり、便中腫瘍 M2 ピルビン酸キナーゼ (Tumor M2-PK)⁽³³⁻³⁵⁾や便 RNA を用いた遺伝子発現解析^(36,37)なども報告されている。一方で、我々の研究室では便中に剥離した大腸癌細胞を対象に大腸癌診断法の検討を行っており、報告をしている^(25,27,38)。研究当初はパーコールを用いた濃度勾配遠心法にて剥離大腸癌細胞を回収しており、便の中でも細胞が生きていると述べてきた⁽²⁵⁾。その後、血中を流れる circulating tumor cell (CTC) を EpCAM 抗体付加したイムノビーズを用いて回収する方法を改良して、便中に剥離した大腸癌細胞の回収とそれに続く大腸癌診断法を報告した⁽²⁷⁾。診断法は APC、K-ras、p53 を対象にした遺伝子変異解析を報告したが、1検体あたりの検査コストが高く手技も煩雑という短所があったため、より低コストで簡便な mRNA を用いた遺伝子発現解析を検討することとした。実際、計算上は直接シーケンスを用いた遺伝子変異解析は1検体あたり約 12,000 円であり定量性 real-time PCR を用いた遺伝子発現解析は 3,000 円と約 1/4 のコストである。癌検診(スクリーニング検査)は、感度や特異度も重要であるが、簡便で安価な検査が必要であり、各種診断法に対する費用対効果の報告も散見される⁽³⁹⁻⁴¹⁾。

2. 自然排泄便中の大腸剥離細胞

大腸癌は大腸粘膜上皮に発生するため、早期より便に接している。また、正常大腸上皮細胞を含めて、大腸癌細胞も便中に剥離するため、剥離細胞を対象とした大腸癌診断法の開発は有用であると思われる^(27,38)。しかし便分離細胞から抽出した DNA や RNA は微量であり、通常の分光光度計を用いた核酸量の計測は不可能である。そのため、抽出量の測定は real-time PCR を用いることとした。培養細胞の段階希釈系列からそれぞれ DNA を抽出し、glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) や beta actin (ACTB) にて real-time PCR を行うと、100 個以下では検出限界以下であった。short-interspersed elements (SINE) に分類される Alu-repeat は 300bp 程度の配列でゲノム中に 140 万コピー存在し^(42,43)、ゲノム DNA の 10% 程度を占めるとされている⁽⁴⁴⁾。この Alu-repeat を real-time PCR の target primer とすることで、微量な DNA 量の測定が可能となった(図 5)。今回、大腸癌患者の自然排泄便 2g から細胞を回収して抽出した DNA 量は個人差があるが 10pg~10ng であり、これは約 10 個~10,000 個の剥離細胞が大腸癌患者の便 2g に含まれていることを示している。また、健常者においては大腸癌患者の 1/3 程度の細胞数である。

3. 大腸癌診断に適した自然排泄便の保存条件

我々の研究の対象は、自然排泄便に剥離している大腸癌細胞である。また、将来的な大腸癌検診法の確立を目的としており、自然排泄便の保存条件を検討することは重要である。今回の検討で、DNA や RNA の抽出量に関して 4°C で保存できれば 72 時間まで当日処理群と有意差なく検討可能であることが示された(図 6)。これは、自宅で排便後にクール便などを利用して検体処理施設への輸送が可能であることを意味しており、将来的な自然排泄便を使用した、自宅にいながらの大腸癌検診法の可能性がある。各種保存条件の遺伝子変異解析においては、最も厳しい条件である 37°C で 3 日間保存した自然排泄便からでも遺伝子変異を同定可能であった(図 7 および表 16)。しか

し、DNA 量が特に少ないこの条件での直接シーケンスには nested PCR などの個別な手技が必要であり、遺伝子変異解析を含めて分子生物学的検査法で大腸癌細胞を同定するには DNA および RNA 量が十分に抽出できる 4°C での保存が最も適していると思われた。

4. 便中剥離細胞を効率よく回収する至適イムノビーズ

保存条件と同様に、より多くの細胞を回収するためにはイムノビーズの開発研究が必要である。CTC を効率よく回収するために、通常のイムノビーズ以外に抗体をカラムに結合させて回収する方法も報告されている⁽⁴⁵⁾が、自然排泄便は血液と異なり、残渣が多いためイムノビーズによる剥離癌細胞の回収を改良することとした。はじめにビーズの粒子径を検討した。当初はビーズが大きいほど鉄の含有量が増えるため、より強力で磁石に結合し、細胞の回収率が向上すると考えていた。しかし、結果は粒子径の小さいほど回収率が高かった(図 8a および図 11a)。顕微鏡像において、粒子径の小さなビーズは細胞を完全に取り囲み、癌細胞 1 個あたりに多くのビーズが結合していた(図 8b)。一方で粒子径の大きなビーズは細胞への結合がまばらであった。ビーズ 1 個あたりの鉄含有量は粒子径の大きなビーズが多いが、細胞 1 個あたりのビーズ結合量が異なるために結果として粒子径の小さなビーズの方が細胞 1 個あたりの鉄量が多い結果となり、回収率向上につながったと考えている。つぎにビーズに結合させる抗体について検討した。ビーズに結合させる抗体は上皮性接着抗原である EpCAM を対象とした。今回の検討で、我々は affinity の異なる複数の EpCAM 抗体を作成し(図 9)、これらを最適粒子径である 3.0 μ m のビーズに結合させると、affinity の高い抗体を結合したイムノビーズが最も回収率に優れていた(図 10 および図 11b)。血液中の CTC を効率よく回収する方法はいくつか報告されているが、便中の剥離細胞を回収するための検討は我々以外に報告はなく、便を対象とした大腸癌検診法にとって有意義な検討であると思われる。

5. 便中剥離細胞を用いた遺伝子発現解析

大腸癌と mRNA を用いた遺伝子発現解析の報告は散在している。多くは末梢血⁽⁴⁶⁻⁵⁰⁾や門脈血⁽⁴⁷⁾、腹水洗浄液⁽⁴⁷⁻⁵⁰⁾およびリンパ節^(51, 52)を対象にしたものであり遠隔転移や予後の予測として用いられている。我々の最終目的は大腸癌死亡率の低下であり、そのためには大腸癌の早期診断が重要であり、同じ目的で便 RNA を使用した遺伝子発現解析も報告されている^(36, 37)。対象遺伝子は *CEA (CEACAM5)* や *CK20 (KRT20)*、*COX2 (PTGS2)* が多い。今回の研究では過去の報告に加えて我々のマイクロアレイから選択した計 15 種類を候補遺伝子とした(表 14)。便中剥離細胞から抽出するごく微量の RNA を用いた解析であるため、対象遺伝子は発現量が高い必要がある。また、正常細胞よりも癌細胞において高発現している必要があるため、遺伝子の選別をはじめに行った。すると、明らかに発現の弱いものもあり対象から除外した(表 17)。一方で *KRT20* は高発現であったものの癌部よりも非癌部において高発現しており、今回の検討には不適切であった。そこで 5 種類に絞り込んだ後に、便中剥離細胞での遺伝子発現を検討した。*CEACAM5* を除き他の 4 遺伝子は検出頻度も癌患者の方が高値であった(表 19)。*CEACAM5* に関しては、発現量が高く、多くの研究においても CTC の診断に有用であると報告されている^(53, 54)が健常者の便中剥離細胞においても高発現しており、その発現量は癌患者と有意差がない。末梢血や門脈血、腹水洗浄液に含まれる上皮系細胞はほとんどが癌細胞であり、正常上皮細胞は皆無である。そのため、これらの検体を用いて癌細胞診断するには上皮系マーカーで検出感度が高いものであることが重要で、決して癌特異マーカーである必要がないと思われる。つまり *CEACAM5* や *KRT20* は正常上皮細胞でも高発現しており、上皮系マーカーであり我々が求める大腸癌マーカーとはならず、便中剥離癌細胞診断には有用ではなかった。最終的に *MMP7*、*MYBL2*、*PTGS2*、*TP53* の 4 遺伝子を合わせた便中剥離細胞の遺伝子発現解析は、感度 58%で特異度 88%であった(表 20)。以前我々が報告した直接シーケンスによる遺伝子変異解析⁽²⁷⁾よりもやや劣っており、SSCP による遺伝子変異解析⁽³⁸⁾に比べてはや

や良好な結果であった。細胞回収率を改善し、さらなる有用なマーカーの組み合わせによりこの便中剥離細胞の遺伝子発現解析は将来の大腸癌検診となり得る可能性がある。

第5章 将来の展望

1. 便分離細胞から抽出した核酸を用いた大腸癌診断の問題点

前章までに述べたように EpCAM ビーズで便中の剥離細胞を回収する方法は、便そのものの DNA や RNA を抽出するよりも効率よくヒト大腸細胞由来の核酸を抽出可能である。しかし、EpCAM 抗原は正常大腸粘膜にも発現しており(図 2)、現在のイムノビーズを用いた細胞回収では剥離大腸癌細胞のみならず正常剥離細胞も回収されている。そのヘテロな細胞集団の中で癌細胞が多く正常細胞が少ない条件であれば遺伝子変異解析でも遺伝子発現解析でも検討可能であるが、正常細胞数の方が多い検体では癌特異遺伝子の変異や高発現が正常細胞により平均化されてしまい、せっかく癌細胞が回収されても結果として正常と判断されてしまう可能性がある(図 13)。より効率よく癌細胞のみを回収する癌特異抗体を用いて細胞を分離する方法も考えられるが、affinity

が強くなおかつ癌特異的である抗体はほとんどない。これでは回収率が低下するだけであり、もともと微量な細胞しか含んでいない便などの検体ではさらに抽出核酸量が少なくなる。そこで、さらなる検討として剥離癌細胞そのものに着目した。

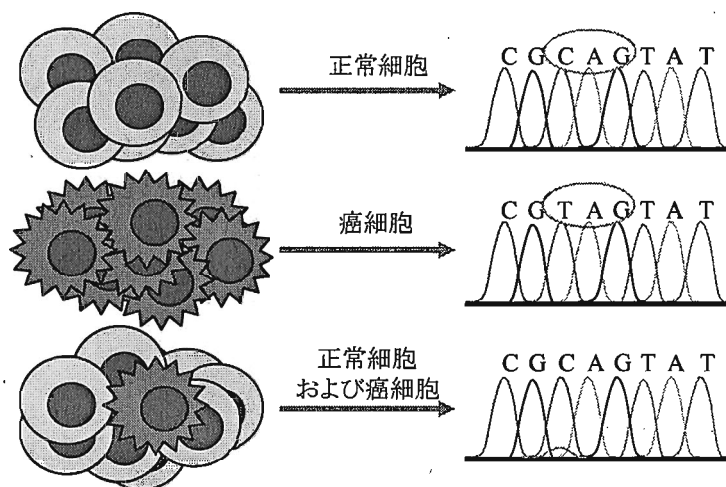


図13. ヘテロな細胞集団でDNAやRNAを用いる問題点
癌細胞にのみ遺伝子変異を認めるが、正常細胞が多く混在した細胞集団では癌特異的遺伝子変異が検出されない。

2. 腫瘍マーカーとしての CD44v6

以前の検討で、便分離細胞の細胞診を報告した⁽²⁷⁾。この細胞診は便分離細胞をパパ

ニコロウ染色し、細胞診技師 2 人による検鏡を用いていた。その結果は感度 28%と報告したが、細胞数自体が少ないうえに変性しており、確実に剥離癌細胞と認められるものは多くなかった。そこで、癌特異的抗体による免疫染色を用いてもっと簡便に

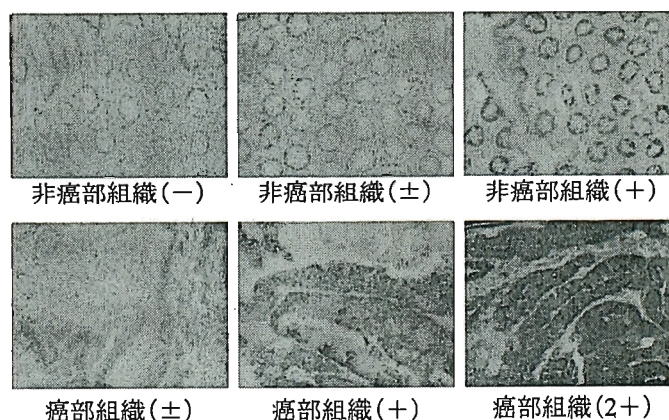


図14. CD44v6による免疫組織化学染色

癌部および非癌部の凍結切片における免疫組織化学染色像。免疫染色の判定は染色強度を使用し、(-)、(±)、(+)、(2+)の4段階で評価した。

癌細胞を診断する方法を検討した。今回検討したのは CD44v6 抗原である。CD44v6 は大腸癌^(25, 55)、頭頸部癌⁽⁵⁶⁾、乳癌⁽⁵⁷⁾、膀胱癌⁽⁵⁸⁻⁶⁰⁾、食道癌⁽⁶¹⁾などさまざまな癌腫で

表22. CD44v6の免疫組織化学染色

	染色強度 (N = 38)			
	(-)	(±)	(+)	(2+)
癌部	0	13	9	16
非癌部	8	23	7	0

高発現していることが報告されている。今回我々は 大腸癌凍結組織切片 (N=38) を用いた CD44v6 の免疫組織化学染色を行った(図 14)。染色強度は (-) から (2+) までの 4 段階で評価し、(+) および (2+) を陽性と診断した結果、CD44v6 陽性症例は

表23. 臨床病理学的特徴とCD44v6免疫染色強度

	染色強度 (N = 38)				P value
	(-)	(±)	(+)	(2+)	
腫瘍局在					0.16
右側結腸 (N = 5)	0	1	0	4	
左側結腸 (N = 33)	0	12	9	12	
腫瘍径					0.51
35mm以下 (N = 13)	0	3	3	7	
35mm以上 (N = 25)	0	10	6	9	
腫瘍深達度					0.61
T1、T2 (N = 11)	0	3	2	6	
T3、T4 (N = 27)	0	10	7	10	
Dukes分類					0.88
Stage A、B (N = 22)	0	7	5	10	
Stage C、D (N = 16)	0	6	4	6	

P value: χ^2 検定にて解析し、 $P < 0.05$ を有意とした。

癌部で 66% (25/38) であり非癌部では 18% (7/38) であった(表 22)。染色強度と大腸癌の臨床病理学的特徴を解析したが、有意な差がなく早期のものから CD44v6 は発現していた(表 23)。これは、過去の報告同様に CD44v6 は腫瘍マーカーと考えられることを

意味している。一方で正常組織における CD44v6 発現は基底層に限局しており⁽⁵⁸⁾、正常組織の剥離面にはほとんど発現していないため、CD44v6 を便中剥離癌細胞の診断に用いることは有用であると考える。

3. 蛍光標識癌特異抗体を用いた自動細胞診の可能性

細胞診を用いて大量の検体を診断するには多くの細胞診技師が必要であり、診断の自動化は必要な条件と思われる。また、陽性陰性を区別する手段として蛍光標識した抗体を使用することで、蛍光強度の域値を設定し自動化できると考えた。また、残渣などの非特異的な蛍光を区別するために DAPI などで核染色を行い、細胞であることの確認が必要である。イムノビーズは便中の剥離細胞を回収するには必要だが、細胞観察には不要である。よって、切り離すことのできるイムノビーズ (CELlection Epithelial Enrich, Dynal) を使用して検討した (図 15)。また、将来的なマスキングのために、回収した細胞は 96well plate に固定して染色した (図 16)。詳細な検討は不十分であるが、一部の症例において

は CD44v6 抗体陽性細胞が自動で認識できた (図 17)。さらなる検討が必要であるが、将来の大腸癌検診法の樹立さらには大腸癌死亡率の低下を目標に今後も検討を続けていく。

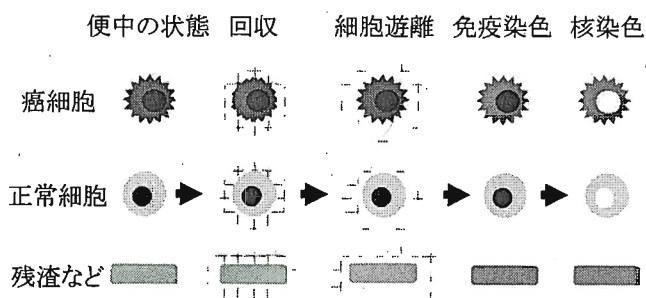


図15. 自動細胞診の原理

便中には剥離癌細胞、剥離正常細胞と残渣などが含まれている。細胞回収用のビーズは細胞観察時にはリリースする。癌特異抗体で免疫染色後に核染色を行い、細胞であることを確認する。

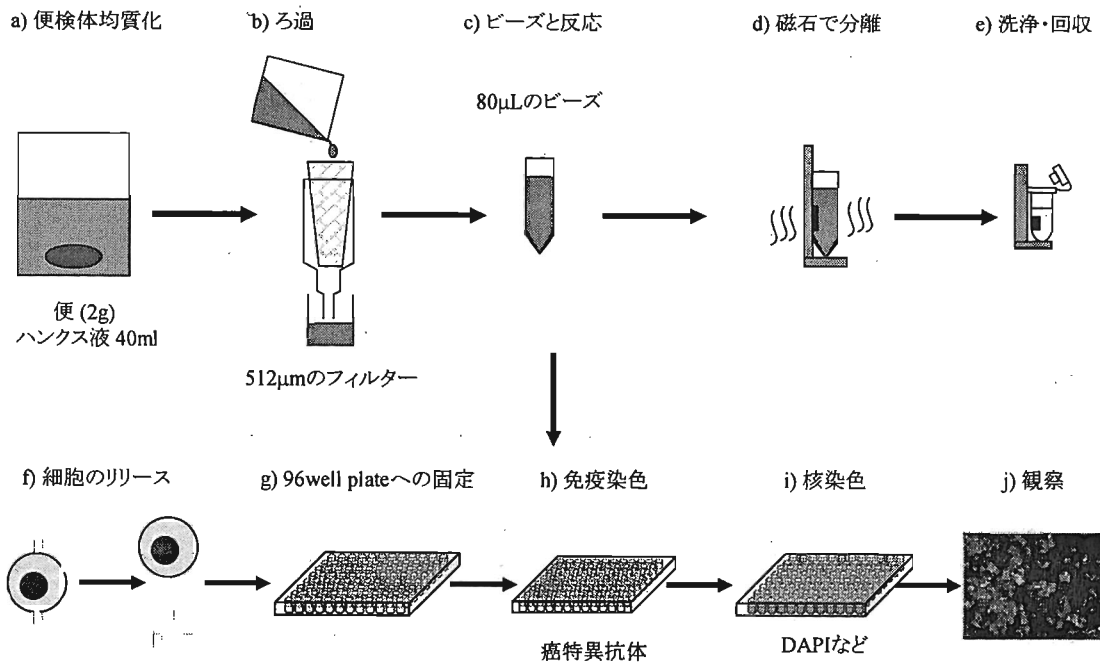


図16. 便中剥離細胞を対象にした自動細胞診の概略図

a)~e) 図3と同様に便中の剥離細胞を、イムノビーズを用いて分離回収する。自動細胞診に使用するビーズはリリース可能なビーズ (CELLlection Epithelial Enrich) を使用する。f) 回収に使用したビーズをリリースする。g) 96well plateへ固定する。h) 蛍光標識した癌特異抗体にて免疫染色を行う。i) DAPIなどを用いて核染色を行う。j) DAPIおよび細胞質の蛍光強度・大きさなどを計測し、癌細胞の診断を行う。

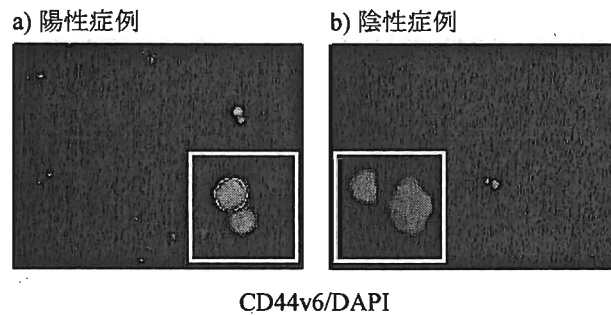


図17. 自動細胞診の実施例

便中剥離細胞を対象に、CD44v6-Alexa647抗体を用いた自動細胞診。a) 74歳、男性、Dukes' stage Bの直腸癌患者。便分離細胞の細胞診にてCD44v6陽性と診断した。b) 66歳、女性、Dukes' stage Cの横行結腸癌患者。便分離細胞の細胞診にてCD44v6陰性と診断した。

第6章 結語

大腸癌の死亡率を低下させるために、自然排泄便中に剥離した大腸癌細胞を対象に新しい大腸癌検診法の検討を行った。自然排泄便は4°Cで3日間は保存可能であり自宅に居ながら大腸癌検診を受けることができる可能性がある。自然排泄便から効率よく剥離細胞を回収するイムビーズの特徴は、粒子径が小さく高親和性の抗体を結合したビーズであった。便分離細胞の mRNA を用いた遺伝子発現解析は感度 58%で特異度 88%であった。将来的な大腸癌検診法のために、現在は自動細胞診の可能性を研究している。

参考文献

1. World Health Organization (WHO). The global burden of disease 2004. Available from: http://www.who.int/healthinfo/global_burden_disease/en/index.html
2. The Editorial Board of the Cancer Statistics in Japan. Cancer Statistics in Japan 2008. Tokyo: Foundation for Promotion of Cancer Research; 2008.
3. Bosman FT. Prognostic value of pathological characteristics of colorectal cancer. *Eur J Cancer* 1995; 31A: 1216-1221.
4. Lieberman DA, Weiss DG. One-time screening for colorectal cancer with combined fecal occult-blood testing and examination of the distal colon. *N Engl J Med* 2001; 345: 555-560.
5. Sung JJ, Chan FK, Leung WK, et al. Screening for colorectal cancer in Chinese: comparison of fecal occult blood test, flexible sigmoidoscopy, and colonoscopy. *Gastroenterology* 2003; 124: 608-614.
6. Imperiale TF, Ransohoff DF, Itzkowitz SH, Turnbull BA, Ross ME. Fecal DNA versus fecal occult blood for colorectal-cancer screening in an average-risk population. *N Engl J Med* 2004; 351: 2704-2714.
7. Levi Z, Rozen P, Hazazi R, et al. A quantitative immunochemical fecal occult blood test for colorectal neoplasia. *Ann Intern Med* 2007; 146: 244-255.
8. Smith A, Young GP, Cole SR, Bampton P. Comparison of a brush-sampling fecal immunochemical test for hemoglobin with a sensitive guaiac-based fecal occult blood test in detection of colorectal neoplasia. *Cancer* 2006; 107: 2152-2159.
9. Allison JE, Sakoda LC, Levin TR, et al. Screening for colorectal neoplasms with new fecal occult blood tests: update on performance characteristics. *J Natl Cancer Inst* 2007; 99: 1462-1470.
10. Brown LF, Fraser CG. Effect of delay in sampling on haemoglobin determined by faecal immunochemical tests. *Ann Clin Biochem* 2008; 45: 604-605.
11. Rao SK, Schilling TF, Sequist TD. Challenges in the Management of Positive Fecal Occult Blood Tests. *J Gen Intern Med* 2009.
12. Morikawa T, Kato J, Yamaji Y, Wada R, Mitsushima T, Shiratori Y. A comparison of the immunochemical fecal occult blood test and total colonoscopy in the asymptomatic population. *Gastroenterology* 2005; 129: 422-428.
13. Lee KJ, Inoue M, Otani T, Iwasaki M, Sasazuki S, Tsugane S. Colorectal cancer screening using fecal occult blood test and subsequent risk of colorectal cancer: a prospective cohort study in Japan. *Cancer Detect Prev* 2007; 31: 3-11.
14. Cho KR, Vogelstein B. Suppressor gene alterations in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *J Cell Biochem Suppl* 1992; 16G: 137-141.

15. Cho KR, Vogelstein B. Genetic alterations in the adenoma--carcinoma sequence. *Cancer* 1992; 70: 1727-1731.
16. Powell SM, Zilz N, Beazer-Barclay Y, et al. APC mutations occur early during colorectal tumorigenesis. *Nature* 1992; 359: 235-237.
17. Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996; 87: 159-170.
18. Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-532.
19. Baker SJ, Fearon ER, Nigro JM, et al. Chromosome 17 deletions and p53 gene mutations in colorectal carcinomas. *Science* 1989; 244: 217-221.
20. Sidransky D, Tokino T, Hamilton SR, et al. Identification of ras oncogene mutations in the stool of patients with curable colorectal tumors. *Science* 1992; 256: 102-105.
21. Ahlquist DA, Skoletsky JE, Boynton KA, et al. Colorectal cancer screening by detection of altered human DNA in stool: feasibility of a multitarget assay panel. *Gastroenterology* 2000; 119: 1219-1227.
22. Rengucci C, Maiolo P, Saragoni L, Zoli W, Amadori D, Calistri D. Multiple detection of genetic alterations in tumors and stool. *Clin Cancer Res* 2001; 7: 590-593.
23. Traverso G, Shuber A, Levin B, et al. Detection of APC mutations in fecal DNA from patients with colorectal tumors. *N Engl J Med* 2002; 346: 311-320.
24. Traverso G, Shuber A, Olsson L, et al. Detection of proximal colorectal cancers through analysis of faecal DNA. *Lancet* 2002; 359: 403-404.
25. Yamao T, Matsumura Y, Shimada Y, et al. Abnormal expression of CD44 variants in the exfoliated cells in the feces of patients with colorectal cancer. *Gastroenterology* 1998; 114: 1196-1205.
26. Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 2003; 163: 2139-2148.
27. Matsushita H, Matsumura Y, Moriya Y, et al. A new method for isolating colonocytes from naturally evacuated feces and its clinical application to colorectal cancer diagnosis. *Gastroenterology* 2005; 129: 1918-1927.
28. Smith RA, Cokkinides V, Brawley OW. Cancer screening in the United States, 2009: a review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. *CA Cancer J Clin* 2009; 59: 27-41.
29. Itzkowitz SH, Jandorf L, Brand R, et al. Improved fecal DNA test for colorectal cancer screening. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2007; 5: 111-117.
30. Zou H, Harrington J, Rego RL, Ahlquist DA. A novel method to capture methylated human DNA from stool: implications for colorectal cancer screening. *Clin Chem* 2007; 53: 1646-1651.
31. Boynton KA, Summerhayes IC, Ahlquist DA, Shuber AP. DNA integrity as a potential

- marker for stool-based detection of colorectal cancer. *Clin Chem* 2003; 49: 1058-1065.
32. Zou H, Harrington JJ, Klatt KK, Ahlquist DA. A sensitive method to quantify human long DNA in stool: relevance to colorectal cancer screening. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15: 1115-1119.
 33. Haug U, Rothenbacher D, Wentz MN, Seiler CM, Stegmaier C, Brenner H. Tumour M2-PK as a stool marker for colorectal cancer: comparative analysis in a large sample of unselected older adults vs colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2007; 96: 1329-1334.
 34. Haug U, Hundt S, Brenner H. Sensitivity and specificity of faecal tumour M2 pyruvate kinase for detection of colorectal adenomas in a large screening study. *Br J Cancer* 2008; 99: 133-135.
 35. Shastri YM, Loitsch S, Hoepffner N, et al. Comparison of an established simple office-based immunological FOBT with fecal tumor pyruvate kinase type M2 (M2-PK) for colorectal cancer screening: prospective multicenter study. *Am J Gastroenterol* 2008; 103: 1496-1504.
 36. Kanaoka S, Yoshida K, Miura N, Sugimura H, Kajimura M. Potential usefulness of detecting cyclooxygenase 2 messenger RNA in feces for colorectal cancer screening. *Gastroenterology* 2004; 127: 422-427.
 37. Leung WK, To KF, Man EP, et al. Detection of hypermethylated DNA or cyclooxygenase-2 messenger RNA in fecal samples of patients with colorectal cancer or polyps. *Am J Gastroenterol* 2007; 102: 1070-1076.
 38. Onouchi S, Matsushita H, Moriya Y, et al. New method for colorectal cancer diagnosis based on SSCP analysis of DNA from exfoliated colonocytes in naturally evacuated feces. *Anticancer Res* 2008; 28: 145-150.
 39. Pickhardt PJ, Hassan C, Laghi A, Zullo A, Kim DH, Morini S. Cost-effectiveness of colorectal cancer screening with computed tomography colonography: the impact of not reporting diminutive lesions. *Cancer* 2007; 109: 2213-2221.
 40. Parekh M, Fendrick AM, Ladabaum U. As tests evolve and costs of cancer care rise: reappraising stool-based screening for colorectal neoplasia. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27: 697-712.
 41. Hassan C, Zullo A, Winn S, Morini S. Cost-effectiveness of capsule endoscopy in screening for colorectal cancer. *Endoscopy* 2008; 40: 414-421.
 42. Hwu HR, Roberts JW, Davidson EH, Britten RJ. Insertion and/or deletion of many repeated DNA sequences in human and higher ape evolution. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1986; 83: 3875-3879.
 43. Gu Z, Wang H, Nekrutenko A, Li WH. Densities, length proportions, and other distributional features of repetitive sequences in the human genome estimated from 430 megabases of genomic sequence. *Gene* 2000; 259: 81-88.

44. Lander ES, Linton LM, Birren B, et al. Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* 2001; 409: 860-921.
45. Nagrath S, Sequist LV, Maheswaran S, et al. Isolation of rare circulating tumour cells in cancer patients by microchip technology. *Nature* 2007; 450: 1235-1239.
46. Guadagni F, Kantor J, Aloe S, et al. Detection of blood-borne cells in colorectal cancer patients by nested reverse transcription-polymerase chain reaction for carcinoembryonic antigen messenger RNA: longitudinal analyses and demonstration of its potential importance as an adjunct to multiple serum markers. *Cancer Res* 2001; 61: 2523-2532.
47. Guller U, Zajac P, Schnider A, et al. Disseminated single tumor cells as detected by real-time quantitative polymerase chain reaction represent a prognostic factor in patients undergoing surgery for colorectal cancer. *Ann Surg* 2002; 236: 768-775; discussion 775-766.
48. Schuster R, Max N, Mann B, et al. Quantitative real-time RT-PCR for detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with colorectal cancer using different mRNA markers. *Int J Cancer* 2004; 108: 219-227.
49. Guo J, Xiao B, Jin Z, et al. Detection of cytokeratin 20 mRNA in the peripheral blood of patients with colorectal cancer by immunomagnetic bead enrichment and real-time reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol* 2005; 20: 1279-1284.
50. Lloyd JM, McIver CM, Stephenson SA, Hewett PJ, Rieger N, Hardingham JE. Identification of early-stage colorectal cancer patients at risk of relapse post-resection by immunobead reverse transcription-PCR analysis of peritoneal lavage fluid for malignant cells. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 417-423.
51. Oberg AN, Lindmark GE, Israelsson AC, Hammarstrom SG, Hammarstrom ML. Detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR for CEA and CK20 mRNAs. *Int J Cancer* 2004; 111: 101-110.
52. Ohlsson L, Hammarstrom ML, Israelsson A, et al. Biomarker selection for detection of occult tumour cells in lymph nodes of colorectal cancer patients using real-time quantitative RT-PCR. *Br J Cancer* 2006; 95: 218-225.
53. Wang JY, Lin SR, Wu DC, et al. Multiple molecular markers as predictors of colorectal cancer in patients with normal perioperative serum carcinoembryonic antigen levels. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 2406-2413.
54. Shen C, Hu L, Xia L, Li Y. Quantitative real-time RT-PCR detection for survivin, CK20 and CEA in peripheral blood of colorectal cancer patients. *Jpn J Clin Oncol* 2008; 38: 770-776.
55. Coppola D, Hyacinthe M, Fu L, et al. CD44V6 expression in human colorectal carcinoma. *Hum Pathol* 1998; 29: 627-635.

56. Kanke M, Fujii M, Kameyama K, et al. Clinicopathological significance of expression of CD44 variants in head and neck squamous cell carcinoma. *Jpn J Cancer Res* 2000; 91: 410-415.
57. Tokue Y, Matsumura Y, Katsumata N, Watanabe T, Tarin D, Kakizoe T. CD44 variant isoform expression and breast cancer prognosis. *Jpn J Cancer Res* 1998; 89: 283-290.
58. Sugiyama M, Woodman A, Sugino T, et al. Non-invasive detection of bladder cancer by identification of abnormal CD44 proteins in exfoliated cancer cells in urine. *Clin Mol Pathol* 1995; 48: M142-M147.
59. Ross JS, del Rosario AD, Bui HX, Kallakury BV, Okby NT, Figge J. Expression of the CD44 cell adhesion molecule in urinary bladder transitional cell carcinoma. *Mod Pathol* 1996; 9: 854-860.
60. Ikegami H, Iwasaki H, Ohjimi Y, Takeuchi T, Ariyoshi A, Kikuchi M. Sarcomatoid carcinoma of the urinary bladder: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 14 patients. *Hum Pathol* 2000; 31: 332-340.
61. Gotoda T, Matsumura Y, Kondo H, et al. Expression of CD44 variants and prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. *Gut* 2000; 46: 14-19.