

**Clinical significance of CD44 variant 9 expression as a
prognostic indicator in bladder cancer**

(膀胱癌の予後指標におけるCD44 variant 9発現の臨床的重要性)

氏名 小林 圭太

所属 山口大学大学院医学系研究科 医学博士課程
情報解析医学系専攻 泌尿器科学分野

平成28年7月

目次

1.要旨	3
2.研究の背景	4
3.対象と方法	5
4.結果	10
5.考察と結語	12
6.謝辞	14
7.参考文献	15
8.図の説明	17
9.図と表 (巻末)	

要旨

CD44には様々なvariant isoform (CD44v) が存在し、近年CD44 variant 9 (CD44v9) が、治療抵抗性や腫瘍浸潤、転移などに関連することが報告されている。また筋層浸潤性膀胱癌(MIBC)において、乳癌に類似したサブタイプ (basal, luminal, p53-like subtype) が報告され、basal typeは予後不良とされている。今回、MIBCおよびpT1およびhigh gradeの非筋層浸潤性膀胱癌 (high-risk NMIBC) におけるCD44v9の発現と予後の関連性および腫瘍浸潤との関連性を検討した。

膀胱癌臨床検体98例 (MIBC 36例, high risk-NMIBC 62例) を用いて、免疫組織化学染色法を用いて、CD44v9発現強度と予後との関連性、またbasalおよびluminal subtypeマーカーの発現強度および部位の関連性を検討した。ヒト膀胱癌細胞株 (HT1376, 5637) を用いて、浸潤能・遊走能、上皮間葉転換誘導因子との関連を検討した。

MIBCおよびhigh-risk NMIBCにおいて、CD44v9強陽性症例は、その他症例に比べ有意に進展および癌特異死亡までの期間が短かった ($P<0.05$)。MIBCにおいてCD44v9の発現強度はCK5/6の発現強度と相関性があり ($P<0.001$)、high-risk NMIBCにおいてCD44v9はinvasive frontでの発現傾向があった。CD44v9発現抑制した細胞は、コントロール細胞に比べ有意に浸潤能・遊走能の低下を認め ($P<0.05$)、E-cadherinの増加とN-cadherinの低下を認めた。

MIBCおよびhigh-risk MIBCにおいて、CD44v9はbasal subtypeマーカーとして予後予測因子となりうる可能性が示唆された。

研究の背景

膀胱癌は代表的な泌尿器癌の1つである。膀胱癌の約70%は筋層非浸潤性膀胱癌 (NMIBC) であるが、その20%は筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) や転移性膀胱癌へ移行する (1, 2)。MIBCは根治的手術 (膀胱全摘術) 加療後でも、5年生存率は約50%と予後不良である (3)。また、pT1およびhigh gradeのNMIBC (high-risk NMIBC) は、MIBCに進展しやすく、予後不良とされている。

CD44は代表的なヒアルロン酸レセプターの1つで、リンパ球のホーミングと活性化、細胞間接着、細胞遊走、腫瘍細胞の浸潤および転移に関連すると報告されている (4-6)。CD44はAlternative splicingにより10の変異型エクソンが様々な組み合わせ挿入されたCD44 variant isoform (CD44v) があり、CD44vは様々な上皮性腫瘍において主要な癌幹細胞のマーカーの1つとしても報告されている (7)。また、近年CD44vがシスチントランスポーターのサブユニットであるxCTの安定化を図ることで、酸化ストレス耐性を獲得し、薬剤耐性や腫瘍増大に関連するとも報告されている (8)。

膀胱癌においては、CD44 variant 6 (CD44v6) の発現は、病理組織学的悪性度の予測因子となることや、CD44 standard isoform (CD44s) の発現が浸潤性膀胱癌の予後予測因子となる可能性が報告されているが、まだ議論のある所である (9, 10)。近年CD44v9は、癌幹細胞マーカーとして、大腸癌および早期胃癌などで予後予測因子になると報告されている (11, 12)。またMIBCにおいて、近年乳癌類似のサブタイプへの分類 (basal type and luminal type, p53-like subtype) が報告されており、basal typeは転移・浸潤を来しやすく予後不良と報告されている (13)。

今回、CD44v9が膀胱癌における臨床的予後指標の重要性を検討するとともに、膀胱癌の腫瘍浸潤におけるCD44v9機能解析を行った。また、MIBCにおけるCD44v9とbasal typeとの関連性および、high-risk NMIBCにおけるCD44v9の発現部位についても検討した。

対象と方法

患者と標本について

2001年1月から2012年12月までに、山口大学医学部付属病院にて膀胱全摘術および標準骨盤内リンパ節郭清術を受けたMIBC36症例および経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-BT) を受け、病理組織検査にてpT1およびhigh gradeの診断を受けたhigh-risk NMIBC62症例の組織検体を用いた。全例にインフォームドコンセントを行い、本研究は山口大学のinstitutional review boardにて承認を受けている

(Approval No. 17)。すべての組織において、病理医により尿路上皮癌の診断を受けている。表1に全ての患者背景を示す。

免疫組織染色

ホルマリン固定後にパラフィン包埋された膀胱癌組織を用いて免疫組織染色を行った。パラフィンブロックを5 μ mの厚さで切除し、プレパラートに固定した。キシレンにて脱パラフィン処理、エタノールにて脱水処理を行い、0.3%過酸化水素水とメタノール液に10分間インキュベートした。切片を10mMのクエン酸緩衝液 (pH 6.0) にインキュベートし、15分間マイクロウェーブ処理を行った。ブロッキング液 (IMMUNO SHOT, Cosmo Bio Co., Ltd., Tokyo, Japan) に30分間インキュベートし、非特異的反応のブロッキング処理を行った。その後、以下の1次抗体を用いて、4°Cで一晩インキュベートし1次抗体反応を行った。

anti-CD44v9 (1/500 dilution: kindly provided by Prof. Saya, Keio University)

anti-cytokeratin 5/6 (CK5/6) (1/200 dilution; Dako, Kyoto, Japan)

anti-cytokeratin 20 (CK20) (1/100 dilution; Dako)

リン酸緩衝液 (PBS) にて洗浄した後、各1次抗体に対応した2次抗体 (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) に室温30分間インキュベートし、2次抗体反応を行った。免疫染色はジアミノベンジジン

(DAB) (Nichirei Bioscience, Tokyo, Japan) を用いて、ヘマトキシレンにて対比染色し、顕鏡した。二重免疫染色は、anti-CD44v9とanti-CK5/6もしくはanti-CD44v9とanti-CK20の1次抗体を用いて、DABおよびfast redを用いて、二重染色した。評価は、異なる3視野それぞれにて500細胞をカウントし、平均した染色強度(強陽性;3 \times , 陽性;2 \times , 弱陽性;1 \times)と染色陽性細胞割合を乗して求めたH-score

(0-300) を用いた。ヒト膀胱癌細胞株 (HT1376, 5637) の免疫染色は、 -80°C に凍結した細胞塊を10%ホルマリンにて16時間固定を行い、パラフィンブロックを作成し、上記と同様の方法にて行った (16)。

細胞培養

ヒト膀胱癌細胞株 (HT1376, 5637) およびヒト乳癌細胞株 (MDA-MB 468) を購入 (ATCC, Manassas, VA, USA) し、培養・継代を行い使用した。過去の報告からMDA-MB 468をCD44v9陽性細胞として用いた。細胞は、DMEM (Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, USA) に10%FBS (Biological Industries, Cromwell, CT, USA) と抗菌・抗真菌薬 (Sigma-Aldrich, Tokyo, Japan) を添加した培地を用いて、 37°C の5%CO₂環境下で培養した。

siRNA 導入

CD44およびCD44v9のsiRNAを作成・購入した (Thermo Fisher Scientific, Inc)。各siRNAの配列は以下の通りである。
CD44 siRNA sense: 5'-UAU UCC ACG UGG AGA AAA Att-3' and antisense: 5'-UUU UUC UCC ACG UGG AAU Aca-3'
CD44v9 siRNA sense: 5'-CUA CUU UAC UGG AAG GUU Att-3' and antisense: 5'-UAA CCU UCC AGU AAA GUA Gtt-3'.
Control siRNAとして、High GC Duplex (Thermo Fisher Scientific, Inc) を用いた。各細胞にLipofectamine RNAi-MAX (Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて、リポフェクタミン法にて一過性にsiRNAを導入した。siRNA導入後は、 37°C の5% CO₂環境下で48時間インキュベートし、ウェスタンブロット法とRT-PCR法を用いて、発現抑制効果を確認した。

RT-PCR

TRIzol (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いて細胞のtotal RNAを分離・抽出した。各細胞のRNA量を1 μg に調整し、Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Inc.) を用いてcDNAに逆転写した。その後、cDNAを各プライマーとSYBR Green Supermix (Takara Bio Inc., Osaka, Japan) を用いて、Real time PCR system (Step One Plus; Thermo Fisher Scientific, Inc.) にてRT-PCR施行した。サンプル間の比較は $2^{-\Delta\Delta\text{C}_t}$ 法を用いて評価した。各プライマーの

配列は以下に示す。

CD44, forward: 5'-CCG CTA TGT CCA GAA AGG A-3' and reverse: 5'-CTG TCT GTG CTG TCG GTG AT-3'

CD44 standard isoform, forward: 5'-AAA GGA GCA GCA CTT CAG GA-3' and reverse: 5'-TGT GTC TTG GTC TCT GGT AGC-3'

CD44v9, forward: 5'-GGC TTG GAA GAA GAT AAA GAC C-3' and reverse: 5'-TGC TTG ATG TCA GAG TAG AAG TTG-3'

β-actin, forward: 5'-GCA TCC TCA CCC TGA AGT A-3' and reverse: 5'-TGT GGT GCC AGA TTT TCT CC-3'

フローサイトメトリー法

各細胞 (5×10^5) を2% FBSと0.02%アジ化ナトリウムを添加したPBSに準備し、遠心分離および洗浄を行い、1次抗体(anti-CD44v9)を加え4°Cで30分間1次抗体反応を行った。その後2回洗浄を行い、phycoerythrin (PE) 標識2次抗体を加え、4°Cの暗室にて30分間、2次抗体反応を行った。再度2回洗浄した後、フローサイトメトリー (Cell Analyzer EC800; Sony, Tokyo, Japan) にて各細胞のCD44v9発現を検討した。

ウェスタンブロット法

各細胞より放射性免疫沈降法を用いて、蛋白を分離・抽出した。各蛋白 (30μg) をSDS-PAGEにて分離し、PVDFメンブレンに転写した。5% skim-milkもしくは5% BSAを用いてブロッキング処理した後、各1次抗体を用いて4°Cで一晩、1次抗体反応を行った。0.05% Tweenを添加したTBS (TBS-T) にて洗浄した後、HRP結合型の2次抗体を用いて室温で1時間、2次抗体反応を行った。TBS-Tにて再度洗浄した後、標識蛋白をECL detection system (ChemiDocTMXRS+; Bio-Rad Laboratories, Inc., Berkeley, CA, USA) を用いて検出した。β-actinをハウスキーピング遺伝子として用いた。各1次抗体は下記に示す。

anti-CD44 (1/1000 dilution, Abcam (Cambridge, UK))

anti-β-actin (1/1000 dilution, Abcam)

anti-E-cadherin (1/1000 dilution, Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA))

anti-N-cadherin (1/500 dilution, Santa Cruz Biotechnology)

anti-snail (1/500 dilution, Santa Cruz Biotechnology)

anti-slug (1/500 dilution, Santa Cruz Biotechnology)

Invasion assay

siRNAを導入した細胞 (1×10^5 個) を、FBSを添加していないDMEMに準備し、invasion chamber (BD BioCoat Matrigel Invasion Chamber, 12 wells, 8 μ m) と control chamber (BD BioCoat Control Insert Chamber, 8 μ m; Beckton Dickinson, Bedford, MA, USA) に散布した。各chamber下層のwellには、10% FBSを加えたDMEMを加え、37°Cで、48時間細胞を浸潤させた。その後、chamber内に残存する細胞を拭き取り、chamber底面に浸潤した細胞をDiffQuick (Dade Behring, Duedingen, Switzerland) を用いて細胞染色し、スライドグラスに固定、顕鏡した。異なる5視野で浸潤した細胞数を計測し、浸潤能 (invasion chamber浸潤平均細胞数/ control chamber浸潤平均細胞数 $\times 100$) を算出し、異なるsiRNAを導入した細胞間で比較した。同じsiRNAを導入した細胞のものを1回に3組ずつ測定し、同一条件で2回検証した。

Wound healing assay

12-wellのchamberに各siRNAを導入した細胞を飽和状態まで培養した。その後、chamberに200 μ lのチップ (幅500 μ m) を用いて、1本の線を引くようにスクラッチし、細胞を除去した。細胞遊走による創傷治癒を、スクラッチした線の幅を経時的にphase-contrast microscope (x100 magnification; Olympus, Tokyo, Japan) を用いて計測、撮像した。遊走率 (%) (各時間での平均線幅 (μ m) / 観察開始時の平均線幅 (μ m) $\times 100$) を算出して、比較検討した。同じsiRNAを導入した細胞のものを1回に2組ずつ測定し、同一条件で2回検証した。

統計解析

2群間の有意差検定には、スチューデントt検定を用い、コックス比例ハザードモデルを用いて予後予測因子を抽出した。無再発生存期間および無癌特異生存期間は、カプランマイヤー法を用いて算出し、対数順位検定にて有意差判定を行った。H-scoreの相関関係については、ピアソンの積率相関係数を用いて判定した。全ての統計解析において、 P 値 <0.05 を統計学的有意差ありと判定した。CD44v9のH-scoreのカットオフ値は、癌特異死亡の有無についてROC曲線を描

出し決定した。MIBCにおいてはH-score 153 (AUC = 0.6428)、high-risk NMIBCにおいてはH-score 170 (AUC = 0.6354) をカットオフ値として用いた。統計解析はJMP version 10 (SAS, Cary, NC, USA) を用いた。

結果

CD44v9発現と臨床的予後の相関性

MIBC36症例およびhigh-risk NMIBC62症例でCD44v9の発現レベルを免疫組織染色にて判定した。図1 (a) にMIBCおよびhigh-risk NMIBCにおけるCD44v9強陽性・弱陽性（陰性）例を示し、表1に患者背景を示す。観察期間は中央値で、MIBC39ヶ月（3-104ヶ月）、high-risk NMIBC50ヶ月（18-125ヶ月）であった。CD44v9発現陽性と判定した症例は、MIBC（H-score>153）11症例（30.6%）、high-risk NMIBC（H-score>170）24症例（38.8%）であった。表2で、臨床的予後予測因子とCD44v9発現の関係について示す。MIBCにおいては、CD44v9発現陽性症例が陰性症例に比べ、リンパ脈管浸潤陽性やリンパ節転移陽性症例が多い傾向にあった（64% vs 36%, 18% vs 8%）（表2（a））。high-risk NMIBC症例では、単変量および多変量解析にて、CD44v9発現陽性と膀胱内再発症例がMIBCへの進展の独立予後予測因子として認められた（表3）。MIBCおよびhigh-risk NMIBC症例において、CD44v9発現陽性症例は、有意に無再発生存期間および無癌特異死生存期間が短い結果となった（ $P<0.05$ ）（図2）。

CD44v9とCK5/6発現の相関とhigh-risk NMIBCにおけるinvasive frontでのCD44v9発現

CD44v9の発現とbasal subtypeマーカーであるCK5/6およびluminal typeマーカーのCK20発現の関係性を免疫組織染色にて検討した。図1 (b) に示す様に、免疫組織染色法でCD44v9発現部位とCK5/6発現部位が酷似しており、MIBCにおいてCD44v9とCK5/6のH-scoreに有意な相関関係を認めた（表1（c）； $R^2=0.6329$, $P<0.001$ ）。high-risk NMIBCにおいては、CD44v9とCK5/6は腫瘍の最深部（invasive front）に共発現する傾向にあり、CK20は腫瘍表面の乳頭状病変に発現している傾向にあった（表1（d））。

HT1376と5637細胞株におけるCD44v9の発現とsiRNAによるCD44v9の発現抑制

ヒト膀胱癌細胞株（HT1376, 5637）のCD44v9発現の有無を免疫組織染色法（図3（a））およびフローサイトメトリー法（図3

（b））、ウェスタンブロット法（図3（c））にて確認した。両細

胞とも、CD44v9とCK5/6の発現を免疫組織染色法にて確認できたが、CK20の発現は認めなかった。図3 (d) に示すように、CD44およびCD44v9 siRNAを導入した細胞の発現抑制は、ウェスタンブロット法およびRT-PCRにて確認した。

CD44v9発現抑制による浸潤能と遊走能の抑制

ヒト膀胱癌細胞株 (HT1376, 5637) において、CD44v9発現抑制による浸潤能および遊走能の変化をinvasion assayおよびwound healing assayを用いて検証した。浸潤能については、CD44もしくはCD44v9 siRNAを導入した細胞が、control siRNAを導入した細胞に比べ、有意に浸潤能が低下した (図4 (a), 4 (b))。また、遊走能についても、CD44もしくはCD44v9 siRNAを導入した細胞が、control siRNAを導入した細胞に比べ、有意に遊走能の低下が見られた (図4 (c), 4 (d))。CD44v9 siRNAを導入した細胞において、増殖能やシスプラチンに対する薬剤感受性についても検証したが、control siRNAを導入した細胞と比較して有意な差は認めなかった。

CD44v9と上皮間葉転換 (EMT) 関連因子との関連性

CD44v9と上皮間葉転換関連因子であるE-cadherin、N-cadherin、snail、slugとの関連性をウェスタンブロット法にて検証した (図5)。CD44もしくはCD44v9 siRNAを導入した細胞は、control siRNAを導入した細胞に比べ、蛋白レベルでE-cadherinの発現が増加し、N-cadherinおよびsnail、slugの発現が低下した。

考察と結語

MIBCおよびhigh-risk NMIBC患者の予後は不良であり、予後を予測する分子マーカーを特定することで、臨床に応用し、適切な治療および経過観察が可能になると考える。近年、CD44v9は癌幹細胞マーカーとして、様々な癌種で予後予測因子となる可能性が報告されている(11, 12)。本研究では、CD44v9の発現が、MIBCおよびhigh-risk NMIBCにおいて、腫瘍進展や癌特異死に関連している可能性が示唆された。またCD44v9はヒト膀胱癌において、腫瘍浸潤や遊走、上皮間葉転換に関連している可能性も示唆された。

過去の三宅らの報告では、尿路上皮癌において、CD44 variant 8-10 (CD44v8-10) がCD44sに対して発現比率が高い症例では、無再発生存期間が短いことが報告されている(17)。本研究でも、CD44v9の高発現症例は、MIBCおよびhigh-risk NMIBCにおいて、有意に無再発生存期間および無癌特異死生存期間が短かった。また、過去にCD44v8-10を過剰発現させたヒト膀胱癌細胞株において、腫瘍進展能が増加したと報告されている(18)。本研究でもCD44v9の発現を抑制した膀胱癌細胞の浸潤能および遊走能が低下した結果を得ている。

近年、MIBCの遺伝子発現パターンと乳癌の遺伝子発現パターンが類似する報告があり、3つのサブタイプ (basal type, luminal type, p53-like) に分類されることが報告されている(13, 19, 20)。Basal typeは、腫瘍浸潤や転移を起こしやすいが、シスプラチンベースの化学療法に感受性が高いことが報告されている(13)。本研究では、basal typeマーカーの1つであるCK5/6とCD44v9の発現部位および発現レベルが相関している傾向にあり、MIBCにおいてCD44v9がbasal typeのマーカーとなる可能性が示唆された。High-risk NMIBC症例においては、luminal typeマーカーの1つであるCK20が多くの症例に発現していたが、ほとんどが腫瘍上層の乳頭状構造に局在していた。対して、CD44v9は腫瘍底部(粘膜下層付近)のinvasive frontに発現している傾向にあり、CD44v9が高発現している症例は、有意に無再発生存期間や無癌特異死生存期間が短かった。またin vitroにおいて、CD44v9の発現を抑制することで腫瘍浸潤能や遊走能の低下を認め、EMT関連因子との関連性が示唆された。これらの結果から、CD44v9が腫瘍浸潤や遊走に関連しており、high-risk NMIBCにおいては、筋層浸潤への進展に関連している可能性、もしくは進

展のマーカーとなりうる可能性が示唆された。

過去には、様々なCD44v (CD44v6, CD44v8-10) が、大腸癌や悪性黒色腫において転移に関連すると報告されている。CD44v6は肝細胞増殖因子と結合するチロシンキナーゼレセプターであるc-Metと反応することで、悪性黒色腫細胞の脳転移を促進すると報告されている。またCD44v9は、細胞の酸化還元状態を調整するシステントランスポーターのサブユニットであるxCTに作用し、酸化ストレスへの抵抗性を引き起こす。結果として薬剤耐性の獲得や腫瘍再発、転移を起こすことが報告されている (8, 22-24)。CD44vは、主に上皮性癌細胞に発現しており、一方CD44sが主に間葉系癌細胞に発現していると言われている。CD44のスプライシングはESRP1に制御されている。酸化ストレスがWntシグナルおよびTGF- β シグナルを活性化することで、CD44のスプライシングを誘発し、EMT転写因子(snail, slug等)が活性化され、結果としてEMTを誘導(カドヘリン変換等)し、腫瘍浸潤や遊走が引き起こされると報告されている (25)。本研究でも、CD44v9の発現を抑制することで、E-cadherinの増加、N-cadherinおよびsnailとslugの低下を認め、CD44v9がEMTに関与している可能性も示唆された。

CD44 splicing is regulated by ESRP1, redox stress-induced Wnt activation, and TGF- β signaling. EMT-inducing transcriptional factors (e.g., snail and slug) enhance the invasive and migratory phenotype through the cadherin switch and a change in the alternative splicing of CD44 (25). The decreased expression of E-cadherin in association with N-cadherin increase and of decreased expression EMT markers by CD44v9 knockdown in our results are in good agreement with previous report, and suggest the close association of CD44v9 expression with EMT in high-risk NMIBC.

本研究の限界点としては、CD44v9の機能についてCD44との明確な区別をつけることができなかつた点が挙げられる。CD44の発現を抑制した際も、CD44v9の発現を抑制した時と同様の浸潤能および遊走能の低下を認めた。これは、過去の報告からもCD44vは腫瘍浸潤等において同様な役割を持っている可能性が考えられた。しかしながら、膀胱癌においてCD44v9の発現は予後と大きな相関関係を認め、またhigh-risk NMIBCにおいては、免疫組織染色でinvasive frontにCD44v9発現細胞が局在する傾向にあり、予後不良および今後進展を予測する因子となり得ると考えた。

本研究では、CD44v9はMIBCおよびhigh-risk NMIBCにおいて腫瘍進展や癌死の予後予測因子となる可能性が示唆された。特に、high-risk NMIBCに対するTUR-BT標本のinvasive frontにCD44v9が局在し

ていたことから、CD44v9高発現していた症例については、今後MIBCに進展する可能性が高く、膀胱全摘術やシスプラチンをベースとした化学療法といった積極的治療を考慮できる可能性が考えられる。今後、症例の蓄積による更なる検討が必要と考える。

謝辞

抗CD44v9抗体の提供、実験の助言をいただいた佐谷秀行教授、またフローサイトメトリー法等の技術支援および実験の助言をいただいた玉田耕治教授に感謝の意を示す。この研究は、いかなる財政支援も受けていないことを開示する。

参考文献

1. Nargund VH, Tanabalan CK and Kabir MN: Management of non-muscle-invasive (superficial) bladder cancer. *Semin Oncol* 39: 559-572, 2012.
2. Al Hussain TO and Akhtar M: Molecular basis of urinary bladder cancer. *Adv Anat Pathol* 20: 53-60, 2013.
3. May M, Helke C, Nitzke T, Vogler H and Hoschke B: Survival rates after radical cystectomy according to tumor stage of bladder carcinoma at first presentation. *Urol Int* 72: 103-111, 2004.
4. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, et al.: A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell* 65: 13-24, 1991.
5. Nagano O and Saya H: Mechanism and biological significance of CD44 cleavage. *Cancer science* 95: 930-935, 2004.
6. Ponta H, Sherman L and Herrlich PA: CD44: from adhesion molecules to signalling regulators. *Nat Rev Mol Cell Biol* 4: 33-45, 2003.
7. Kimura Y, Goi T, Nakazawa T, et al.: CD44variant exon 9 plays an important role in colon cancer initiating cells. *Oncotarget* 4: 785-791, 2013.
8. 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* 19: 387-400, 2011.
9. Hong RL, Pu YS, Hsieh TS, Chu JS and Lee WJ: Expressions of E-cadherin and exon v6-containing isoforms of CD44 and their prognostic values in human transitional cell carcinoma. *J Urol* 153: 2025-2028, 1995.
10. Lipponen P, Aaltoma S, Kosma VM, Ala-Opas M and Eskelinen M: Expression of CD44 standard and variant-v6 proteins in transitional cell bladder tumours and their relation to prognosis during a long-term follow-up. *J Pathol* 186: 157-164, 1998.
11. Hirata K, Suzuki H, Imaeda H, et al.: CD44 variant 9 expression in primary early gastric cancer as a predictive marker for recurrence. *Br J Cancer* 109: 379-386, 2013.
12. Yamaguchi A, Urano T, Goi T, et al.: Expression of a CD44 variant containing exons 8 to 10 is a useful independent factor for the prediction of prognosis in colorectal cancer patients. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* 14: 1122-1127, 1996.
13. Choi W, Porten S, Kim S, et al.: Identification of distinct basal and luminal subtypes of muscle-invasive bladder cancer with different sensitivities to frontline chemotherapy. *Cancer Cell* 25: 152-165, 2014.
14. Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, et al.: Sex steroid hormone receptors

in human thymoma. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* 88: 2309-2317, 2003.

15. Pirker R, Pereira JR, von Pawel J, et al.: EGFR expression as a predictor of survival for first-line chemotherapy plus cetuximab in patients with advanced non-small-cell lung cancer: analysis of data from the phase 3 FLEX study. *The Lancet. Oncology* 13: 33-42, 2012.

16. Subik K, Lee JF, Baxter L, et al.: The Expression Patterns of ER, PR, HER2, CK5/6, EGFR, Ki-67 and AR by Immunohistochemical Analysis in Breast Cancer Cell Lines. *Breast Cancer (Auckl)* 4: 35-41, 2010.

17. Miyake H, Eto H, Arakawa S, Kamidono S and Hara I: Over expression of CD44V8-10 in urinary exfoliated cells as an independent prognostic predictor in patients with urothelial cancer. *J Urol* 167: 1282-1287, 2002.

18. Muramaki M, Miyake H, Kamidono S and Hara I: Over expression of CD44V8-10 in human bladder cancer cells decreases their interaction with hyaluronic acid and potentiates their malignant progression. *J Urol* 171: 426-430, 2004.

19. Damrauer JS, Hoadley KA, Chism DD, et al.: Intrinsic subtypes of high-grade bladder cancer reflect the hallmarks of breast cancer biology. *Proc Natl Acad Sci U S A* 111: 3110-3115, 2014.

20. McConkey DJ, Choi W and Dinney CP: New insights into subtypes of invasive bladder cancer: considerations of the clinician. *European urology* 66: 609-610, 2014.

21. Yoshida GJ and Saya H: Inversed relationship between CD44 variant and c-Myc due to oxidative stress-induced canonical Wnt activation. *Biochem Biophys Res Commun* 443: 622-627, 2014.

22. Yoshikawa M, Tsuchihashi K, Ishimoto T, et al.: xCT inhibition depletes CD44v-expressing tumor cells that are resistant to EGFR-targeted therapy in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 73: 1855-1866, 2013.

23. Tsugawa H, Suzuki H, Saya H, et al.: Reactive oxygen species-induced autophagic degradation of *Helicobacter pylori* CagA is specifically suppressed in cancer stem-like cells. *Cell host & microbe* 12: 764-777, 2012.

24. Yae T, Tsuchihashi K, Ishimoto T, et al.: Alternative splicing of CD44 mRNA by ESRP1 enhances lung colonization of metastatic cancer cell. *Nature communications* 3: 883, 2012.

25. Saya H: The Novel Anti-tumor Therapy Targeting the "Functional" Cancer Stem Cell Markers. *Clinical & Experimental Pharmacology* 042014.

図の説明

図1

(a) CD44v9のHE染色と免疫組織染色

(b, c) CK5/6とCD44v9の二重免疫染色と相関関係

(d) high-risk NMIBCにおけるCK20とCD44v9の二重免疫染色

(a) MIBCおよびhigh-risk NMIBC症例での、CD44v9高発現と低発現の例。CD44v9は主に細胞膜に発現している。

(b) CD44v9とCK5/6がほぼ同一部位に発現する1症例。本症例は膀胱全摘術から7か月後に鼠径部リンパ節転移が出現し、術後18か月後に癌死した。

(c) MIBC36症例で、CK5/6とCD44v9のH-scoreに相関関係を認めた ($R^2=0.6392$, ピアソン積率相関係数)。

(d) 同一腫瘍におけるCD44v9とCK20の発現部位が完全に異なる high-risk NMIBCの1症例。CD44v9が、腫瘍最深部 (invasive front) に高発現していた。本症例は、経尿道的膀胱腫瘍切除術後12ヶ月で膀胱内再発を来し、術後25ヶ月にMIBCへ進展した。

図2. CD44v9発現に対する無進展生存曲線および無癌特異死生存曲線

MIBC (36症例) の無進展生存曲線 (a) および無癌特異死生存曲線 (b) と、high-risk NMIBC (62症例) の無進展生存曲線 (c) および無癌特異死生存曲線 (d) を示す。MIBCおよびhigh-risk NMIBCにおいて、CD44v9高発現症例 (灰色線) が低発現症例 (黒色線) に比べ、有意に進展および癌死までの期間が短かった (* $P<0.05$; ** $P<0.01$) 。

図3. ヒト膀胱癌細胞株 (HT1376, 5637) におけるCD44v9の発現とsiRNAによるCD44v9発現抑制

HT1376および5637細胞における、CD44およびCD44v9、CK5/6の免疫染色 (DAB染色; 茶色) と抗CD44v9抗体を用いたフローサイトメトリー (赤色曲線下領域; CD44v9陽性細胞、青色曲線下領域; コントロール細胞) (a, b)。siRNAを用いてCD44およびCD44v9を抑制し、ウェスタンブロット法 (c) およびHT1376細胞についてRT-PCR (d) で確認した。CD44v9陽性細胞として、ヒト乳癌細胞株 (MDA-MB 468) を用いた。

図4. CD44およびCD44v9発現抑制による浸潤・遊走能の変化

HT1376細胞において、CD44およびCD44v9の発現を抑制すると、有意に浸潤能が低下した ($P<0.01$) (a, b)。5637細胞でも同様の結果であった ($P<0.01$)。5637細胞において、CD44およびCD44v9の発現を抑制すると、12時間後に有意に遊走能の低下を認めた ($P<0.01, P<0.05$) (c, d)。HT1376細胞でも、48時間後に同様に遊走能の低下を認めた ($P<0.01$)。

図5. CD44v9と上皮間葉転換因子の関連性

HT1376および5637細胞において、CD44およびCD44v9の発現を抑制すると、E-cadherin発現の増加とN-cadherin発現の低下を認め、上皮間葉転換誘導因子であるsnail、slugの発現低下を認めた。

1

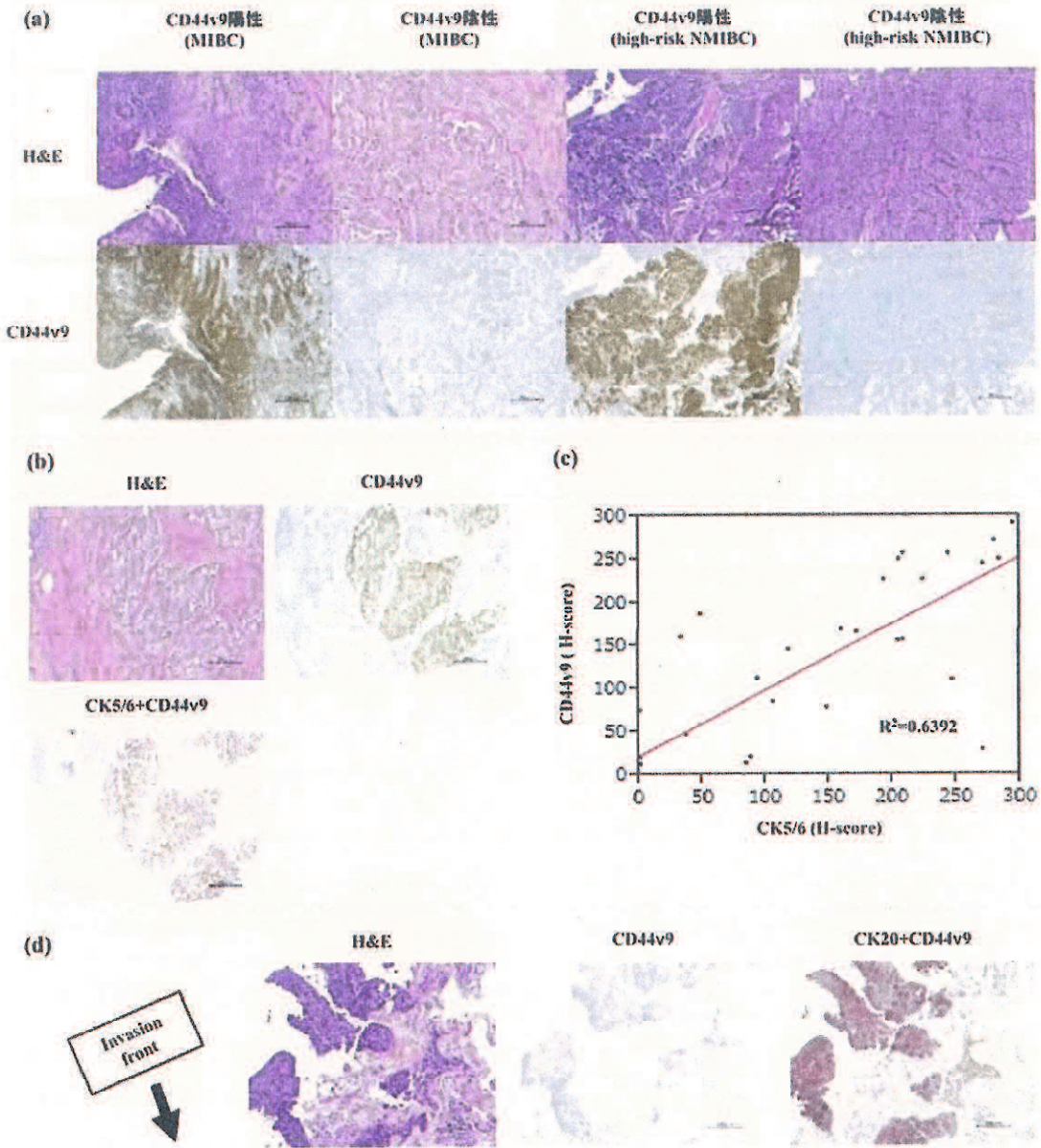
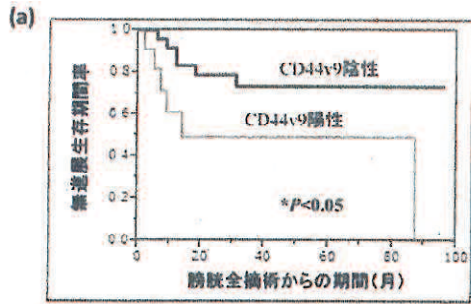
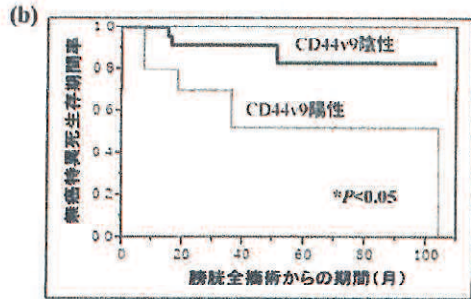


図2



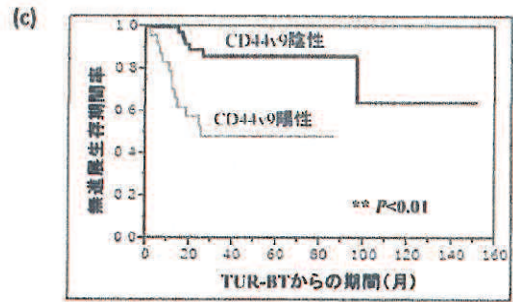
生存患者数

陰性	23	17	13	5	4	0
陽性	13	3	3	2	1	0



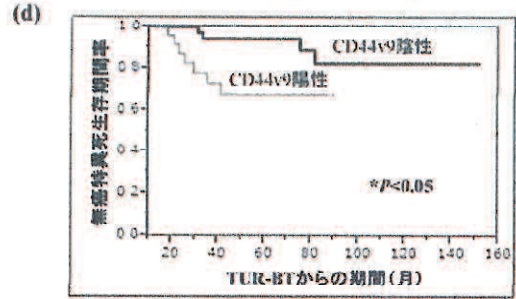
生存患者数

陰性	23	19	14	5	4	1
陽性	13	7	4	2	1	1



生存患者数

陰性	45	39	27	18	13	3	1	1	0
陽性	17	7	3	0	0	0	0	0	0



生存患者数

陰性	45	44	35	25	16	5	4	1	0
陽性	17	15	7	1	0	0	0	0	0

图3

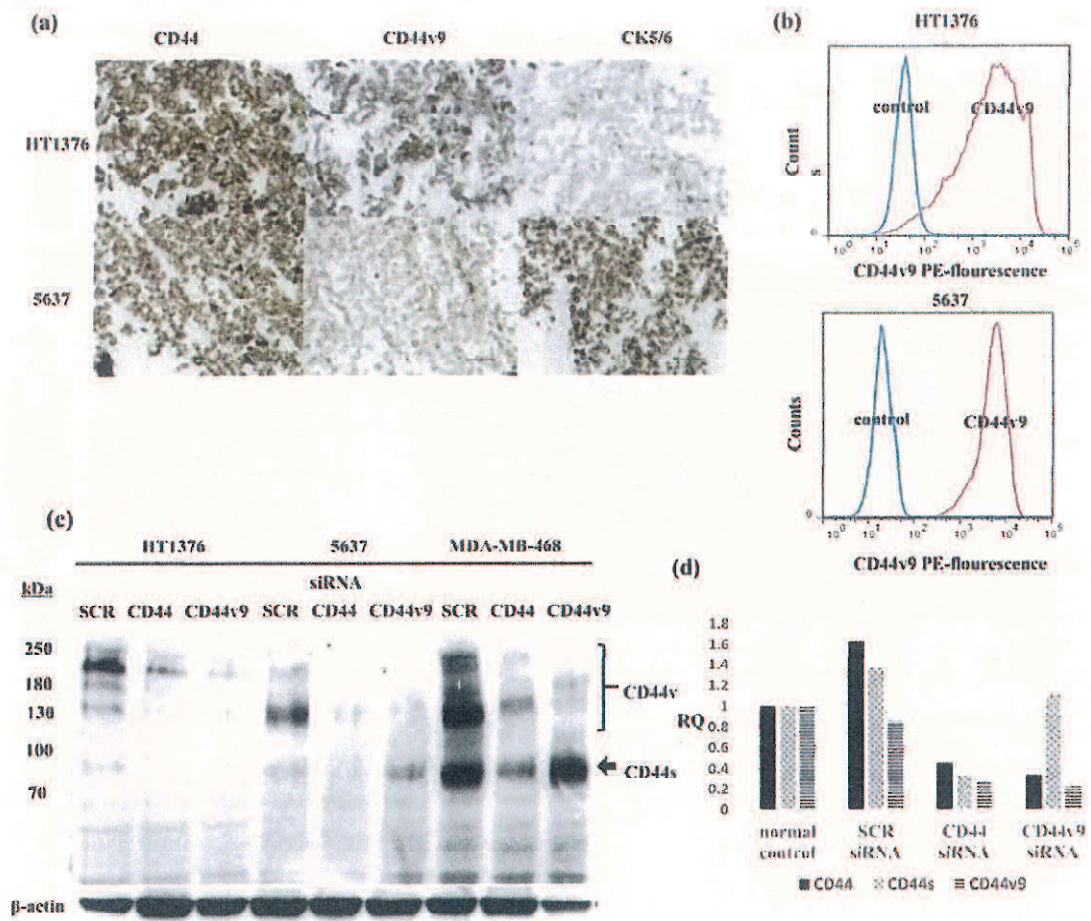


圖4

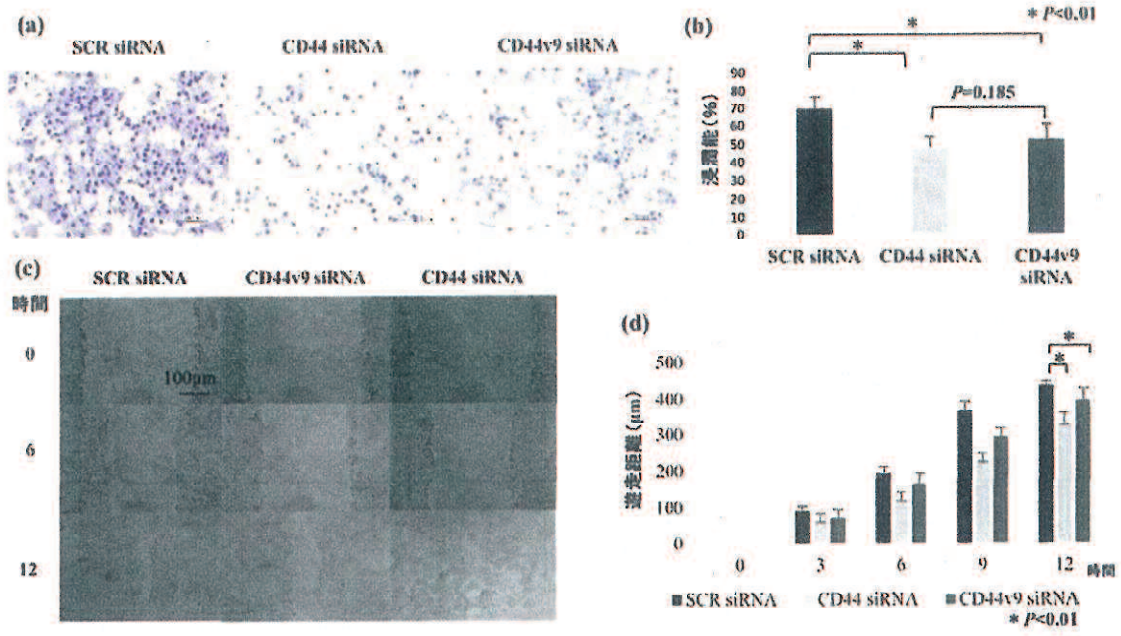


图5

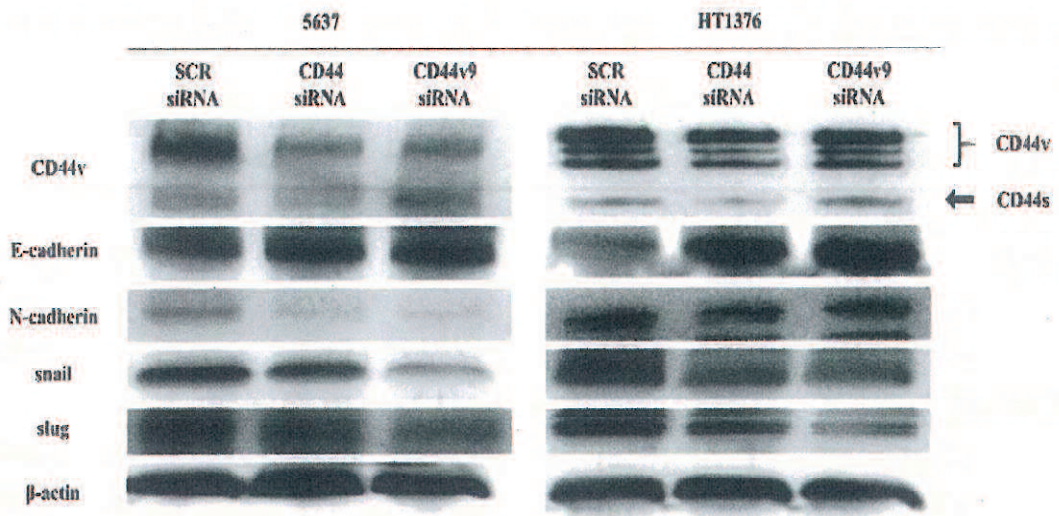


表1. 膀胱全摘術を施行した筋層浸潤性膀胱癌 (MIBC) 患者 (a) および経尿道的膀胱腫瘍切除術 (TUR-BT) を施行したhigh risk非筋層浸潤性膀胱癌 (high-risk NMIBC) 患者 (b) の臨床病理学的背景

(a) MIBC患者 (n=36)			
年齢中央値	63	(42-79)	病理組織型
性別			UC 29 (81%)
男性	32	(89%)	SCC 2 (6%)
女性	4	(11%)	Other 5 (13%)
臨床病期			リンパ脈管浸潤
cTis	1	(3%)	陰性 16 (44%)
cT1	3	(8%)	陽性 16 (44%)
cT2	8	(22%)	不明 4 (12%)
cT3	16	(44%)	術前化学療法
cT4	8	(22%)	未施行 21 (58%)
病理病期			施行 15 (42%)
pTa	2	(6%)	術後化学療法
pT1	8	(22%)	未施行 24 (67%)
pT2	9	(25%)	施行 12 (33%)
pT3	10	(28%)	
pT4	7	(19%)	
Grade			
G1	1	(3%)	
G2	9	(25%)	
G3	23	(64%)	
不明	3	(8%)	

(b) high-risk NMIBC患者 (n=62)		
年齢中央値	71	(51-88)
性別		
男性	51	(82%)
女性	11	(18%)
初発/再発		
初発	55	(89%)
再発	7	(11%)
病理組織型		
UC	55	(89%)
UC + SCC	3	(5%)
UC + AC	4	(6%)
リンパ脈管浸潤		
陰性	31	(50%)
陽性	5	(8%)
不明	26	(42%)
上皮内癌の併発		
なし	26	(42%)
あり	36	(58%)
2nd TUR-BT		
未施行	38	(61%)
施行	24	(39%)

MIBC muscle invasive bladder cancer, NMIBC non-muscle invasive bladder cancer, UC urothelial carcinoma, SCC squamous cell carcinoma, AC adenocarcinoma, TUR-BT transurethral resection of bladder tumor

表2. CD44v9発現と臨床病理学的予後予測因子との関連性

(a) MIBC患者 (n=36)		
	CD44v9陰性 (n=25)	CD44v9陽性 (n=11)
臨床病期		
<T3	9 (36%)	3 (27%)
≥T3	16 (64%)	8 (73%)
病理病期		
<T3	14 (56%)	5 (45%)
≥T3	11 (44%)	6 (55%)
リンパ節転移		
陰性	23 (92%)	9 (82%)
陽性	2 (8%)	2 (18%)
リンパ脈管浸潤		
陰性	13 (52%)	3 (27%)
陽性	9 (36%)	7 (64%)
不明	3 (12%)	1 (9%)

(b) high-risk NMIBC患者 (n=62)		
	CD44v9陰性 (n=38)	CD44v9陽性 (n=24)
腫瘍数		
単発	12 (32%)	4 (17%)
複数	26 (68%)	20 (83%)
腫瘍サイズ		
<3cm	30 (79%)	19 (79%)
≥3cm	8 (21%)	5 (21%)
初発/再発		
初発	33 (87%)	21 (87%)
再発	5 (13%)	3 (13%)
上皮内癌合併		
なし	13 (34%)	13 (54%)
あり	25 (66%)	11 (46%)

MIBC muscle invasive bladder cancer, CD44v9 CD44 variant 9, NMIBC non-muscle invasive bladder cancer

表3. High-risk NMIBC患者における、無進展生存期間予測因子の単変量および多変量解析

	単変量		多変量	
	HR (95% CI)	P値	HR (95% CI)	P値
初発/再発				
初発vs再発	0.25 (0.09-0.80)	0.022	0.19 (0.06-0.63)	0.009
腫瘍数				
単発vs複数	0.53 (0.12-1.61)	0.287		
腫瘍サイズ				
<3cm vs ≥3cm	0.85 (0.30-3.03)	0.787		
上皮内癌の合併				
なしvsあり	0.83 (0.28-2.20)	0.725		
CD44v9発現				
陰性vs陽性	0.18 (0.05-0.49)	0.007	0.15 (0.05-0.43)	0.003

NMIBC non-muscle invasive bladder cancer, CD44v9 CD44 variant 9,