

胃癌における laminin の免疫組織学的検討 —組織型および転移と laminin との関連—

近畿大学医学部第1外科

松田 泰次 坂口 隆啓 肥田 仁一 久保 隆一
田中 晃 赤埴 吉高 安富 正幸

IMMUNOHISTOLOGICAL STUDY ON LAMININ IN GASTRIC CANCER IN RELATION TO HISTOLOGICAL TYPE AND METASTASIS

Taiji MATSUDA, Takahiro SAKAGUCHI, Jinichi HIDA,
Ryuichi KUBO, Akira TANAKA, Yoshitaka AKABANE
and Masayuki YASUTOMI

The 1st Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

胃癌切除例214例を対象とし、formalin 固定 paraffin 切片について、avidin-biotin peroxidase complex 法による laminin 染色を行い、組織型および肝転移との関係について検討した。組織型では、高分化腺癌48.7%、中分化腺癌29.3%、低分化腺癌7.2%であり、高分化な癌ほど laminin 陽性率は高かった。低分化腺癌の陽性6例はすべて充実胞巣型であった。肝転移との関係では、laminin 陽性率は肝転移陰性例23.1%、肝転移陽性例91.3%、肝転移巣90.9%と肝転移例ほど laminin 陽性率が高く、低分化腺癌の肝転移陽性4例中3例は laminin 陽性の充実胞巣型であった。以上より、laminin は肝転移を促進し、従来の組織型と肝転移の関係を laminin の面から解明できることを示唆した。

索引用語：laminin, 胃癌組織, 免疫組織学的染色 (ABC 法), 胃癌肝転移

I. はじめに

Laminin は分子量82万ダルトンの糖蛋白であり、fibronectin, proteoglycan, entactin, type IV collagen などとともに、基底膜構成成分の1つである。最近、培養細胞を用いた研究で、これらの基底膜成分の質的・量的変化が癌の浸潤・転移に関与するとして注目されている¹⁾²⁾。免疫組織化学的研究では、乳癌³⁾⁴⁾、甲状腺癌⁵⁾、大腸癌⁶⁾において基底膜成分の破壊あるいは消失が、浸潤・転移能の強い癌にみられることを報告している。これに対し、われわれ⁷⁾は酵素抗体法による laminin の免疫組織化学的研究を行い、大腸癌では肝転移例ほど laminin 陽性率が高いことを示してきた。しかし、大腸癌は高・中分化腺癌が大部分を占め、低分化腺癌や未分化癌は極めて少数であるため、癌の組織型、laminin 活性および肝転移の関係について検討

することが困難であった。しかも、胃癌組織における laminin の研究に関してはほとんど行われていない⁸⁾。そこで、本研究では胃癌組織における laminin の免疫組織化学的研究を行い、laminin の分布を明らかにするとともに、組織型および肝転移との関係について検討した。

II. 対象と方法

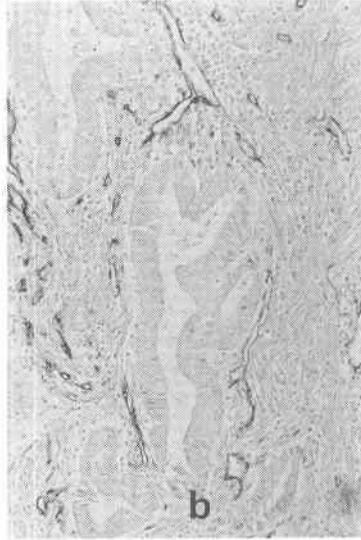
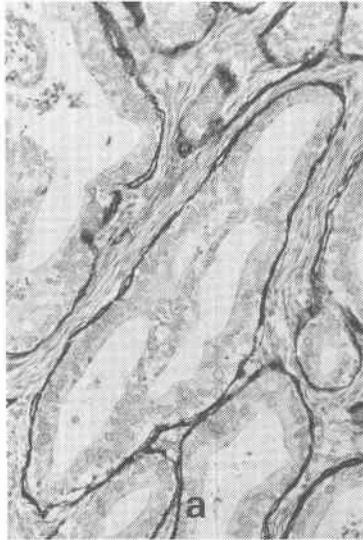
対象症例は1988年までに近畿大学第1外科で切除された胃癌214例である。病理学的検討は「胃癌取扱い規約」⁹⁾に基づいて行った。初回手術時に肝転移を認めなかった症例は187例、肝転移陽性例27例であった。

切除材料より、1つは病巣の中心を通る少なくとも3つの幅5mm 標本を採取した。標本は直ちに10% formalin 液で48時間固定し、paraffin 包埋ブロックを作成した後、厚さ6 μ m の切片を作成した。脱 paraffin 後、内因性 peroxidase 活性を阻止するために、methanol 中0.3%過酸化水素水で30分間処理した。各切片は trypsin によって37 $^{\circ}$ C、20分間処理した。Trypsin 処理

<1989年9月19日受理> 別刷請求先：松田 泰次
〒589 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部第1外科

図1 胃高分化腺癌における laminin の局在

a. Laminin 染色陽性：癌腺管基底部に laminin 染色を認める ($\times 130$). b. Laminin 染色陰性：Laminin 染色は血管壁に見られるが、腺管基底部には認められない ($\times 100$).



には、蒸留水に0.02%CaCl₂および0.02%trypsin (DAKO, 1:250)を溶解した液 (pH 7.80)を用いた。

免疫組織学的染色は Hsu-Ming (1981)¹⁰⁾により開発された avidin-biotin peroxidase complex 法 (ABC 法)に準じて、以下の操作を行った。(i) 10%正常ヤギ血清 (2次抗体を作成した動物と同種の正常血清)を滴下、切片を被覆し37°C, 10分間反応させ、(ii) 1次抗体として燐酸緩衝液 (PBS)で200倍希釈したウサギ抗 laminin 抗体 (CR 社)を用い、4°Cで12時間反応させた。(iii) 2次抗体は biotin 化 IgG (PBSで200倍希釈)を用いて、室温、30分間反応させた。続いて、(iv) ABC キット (Vectastain, VECTOR)を用い、30分間室温で反応させた。各操作の終了ごとに PBS で洗浄した。発色には、0.02%3,3'-diaminobenzidine (DAB) (和光純薬)、0.005%H₂O₂を加えた tris-buffer 液を用いた。

Laminin はすべての正常組織の基底膜と血管壁で陽性に染色された。正常胃上皮基底膜および血管壁に laminin が明瞭に染色された切片に限り適切であるとし、免疫組織学的研究に用いた。本研究では、癌腺管上皮基底膜および癌巣塊周囲 (以下に腫瘍-間質境界とする) の laminin 活性のみを評価の対象とした (図 1)。Laminin 染色陽性の判定は、われわれ⁷⁾の以前の

研究結果ならびに Forster の判定規準¹¹⁾¹²⁾を参考にして、数切片について検索し、laminin 活性が各切片における癌病巣全体の50%以上を占める場合に laminin 陽性と判定した。

統計処理は、 χ^2 検定を用いて、 $p < 0.05$ の場合を有意差ありと判定した。

III. 結 果

1. 組織型と laminin 活性

胃癌原発巣の全体の laminin 陽性率は24.3% (52/214)であった。腫瘍-間質境界の laminin 染色と組織型 (分化度) の関係を表 1 に示す。Laminin 陽性率は高分化腺癌で48.7% (19/39)、中分化腺癌29.3% (27/92)、低分化腺癌13.3% (6/45)であり、低分化型になるほど有意に laminin 陽性例は低率となった ($p < 0.01$)。また膠様腺癌と印環細胞癌ではすべて陰性であった。低分化腺癌における laminin の局在様式について詳細に検討するために、低分化腺癌をさらに充実胞巣型 (solid type)、髄様型 (medullary type)、硬性型 (scirrhous type) の3つに組織学的に分類した (図 2)。髄様型、硬性型は胃癌取扱い規約⁹⁾に基づき、髄様型は病巣内には結合織がほとんどなく髄様に増殖しているもの、硬性型は線維成分を多く含む間質結合織の中に単一癌細胞が遊離した状態で増殖するもの、とした。本研究で新しく加えた充実胞巣型は、間質結合

図2 低分化腺癌における laminin の局在. 充実胞巣型にのみ, 腫瘍-間質境界に laminin 染色がみられる (×200).

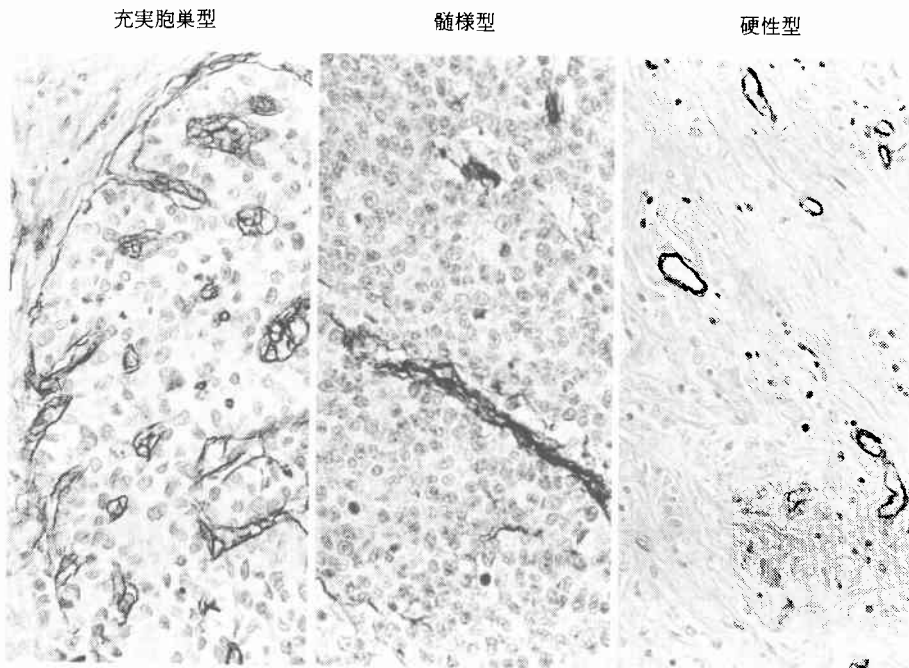


表1 組織型と laminin 染色性

組織型	laminin陽性率 (%)	
高分化型腺癌 (pap, tub.)	19/39	(48.7%)
中分化型腺癌 (tub.)	27/92	(29.3%)
低分化腺癌	6/45	(13.3%)
膠様腺癌	0/21	(0%)
印環細胞癌	0/13	(0%)
特殊型	0/4	(0%)

表2 低分化腺癌の亜分類と laminin 染色性

亜型	laminin陽性率	
充実胞巣型	6/6	(100%)
髄様型	0/23	(0%)
硬性型	0/16	(0%)

表3 壁深達度と laminin 染色性

	laminin陽性例 / 全例 (%)
~pm	8/46 (17.4%)
ss~	44/168 (26.2%)

織中に比較的膨張性に発育したいくつかの癌巣塊が島状に存在するものとした。低分化腺癌の laminin 陽性 6 例はすべて充実胞巣型であった(表2)。充実胞巣型における laminin の局在は、数個以上の癌細胞塊を取り囲むように線状にみられた。しかし、髄様型、硬性型では腫瘍間質境界にも、癌細胞質にも認められなかった(図2)。

2. 壁深達度と laminin 染色

癌の壁深達度を固有筋層までにとどまるもの (pm 以下) と、固有筋層を貫くもの (ss 以上) とに分類した。pm 以下の laminin 陽性率は17.4%、ss 以上では26.2%と、壁深達度と laminin 陽性率の間には相関が

みられなかった(表3)。

3. 肝転移と laminin 染色性

肝転移陰性の胃癌原発巣と肝転移陽性の原発巣の laminin 陽性率を比較した(表4)。高・中分化腺癌では肝転移陰性群原発巣の laminin 陽性率は23.1%(25/108)であるのに対して、肝転移例の原発巣では91.3%(21/23)、肝転移巣では90.9%(10/11)であり、肝転移例ほど laminin 陽性率は有意に高率であった (p<0.001)(表4, 図3)。低分化腺癌でも同様の傾向がみられたが、肝転移陽性例4例のうち3例までが

表4 組織型別にみた肝転移と laminin 染色性の比較

laminin 陽性例 (laminin 陽性率) 全例	肝転移陽性群 原発巣	肝転移陽性群 原発巣	肝転移巣
高・中分化型腺癌	25/108 (23.1%)	21/23 (91.3%)	10/11 (90.9%)
低分化型腺癌	3/79 (3.8%)	3/4 (75.0%)	1/1* (100%)
total	28/187 (15.0%)	24/27 (88.9%)	11/12 (91.7%)

* 充実胞巣型

図3 高分化腺癌の肝転移巣における laminin の局在 (×400)

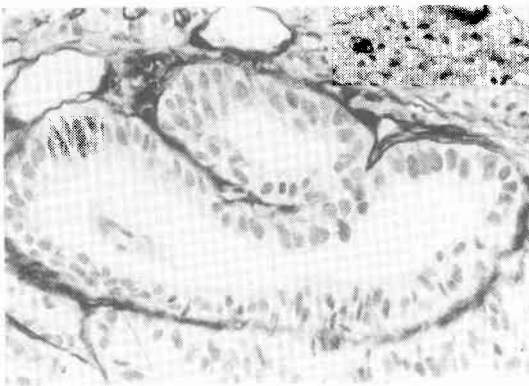
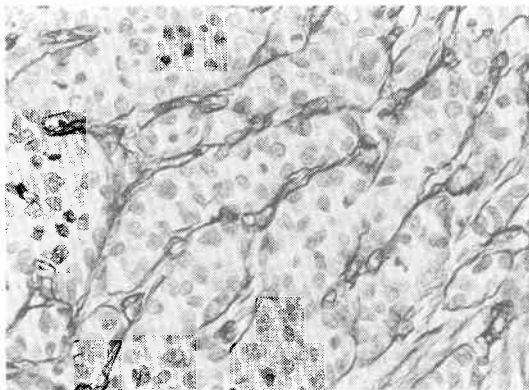


図4 低分化腺癌充実胞巣型の肝転移巣における laminin の局在 (×400)



laminin 陽性例であり、この3例はすべて充実胞巣型であった(表4)。低分化腺癌の肝転移巣は1例のみしか検索していないが、充実胞巣型で数個の癌細胞塊の周囲の腫瘍一間質境界に陽性染色がみられた(図4)。

IV. 考 察

最近の培養細胞を用いた研究¹²⁾では、基底膜を構成している laminin や fibronectin は接着能をもった glycoprotein で、この消失が浸潤さらには転移に影響することが報告されてきている。しかし、laminin の組織学的研究に関しては、現在までのところ十分ではなく報告も少ない。しかも、従来の報告^{3)~6)}はほとんどが fibronectin と同様、癌の進行とともに laminin が消失し、癌の浸潤が起こるとする報告である。たとえば、Burtin⁶⁾は蛍光抗体法によって、大腸癌の辺縁部では laminin がほとんど完全に消失していることから、laminin 消失例ほど浸潤しやすいとしている。その後、Forster ら¹¹⁾¹²⁾は酵素抗体法によって、癌腺管基底部の laminin 染色が遠隔転移と正の相関があり、laminin 染色性の低下した癌ほど肝転移を起こしやすいと報告している。しかしながら、今回のわれわれの研究結果は、Forster らの報告と大きく異なることを示した。われわれは癌の肝転移と laminin の関係を検討するためには、肝転移巣における laminin の局在を検索することが重要であると考えた。この結果、手術時に肝転移のない胃癌の laminin 陽性率は15.0%であるのに対し、肝転移を有する胃癌の陽性率は88.9%、肝転移巣は91.7%であり、laminin 陽性の腫瘍ほど肝転移率が高いことを示した。Terranova ら¹³⁾¹⁴⁾は in vitro で好転移細胞株と低転移細胞株の type IV collagen に対する接着について検討した結果、laminin が転移過程のうち、腫瘍細胞の基底膜への接着を促進することを示唆した。Liotta ら¹⁵⁾¹⁶⁾も同様に培養細胞を用いた laminin の生化学的測定により、laminin の存在が転移を促進することを報告した。これらの結果は、laminin 陽性の癌細胞が転移しやすいという本研究結果に一致すると考えられる。しかし、転移の第1段階では基底膜の破壊が重要であり、基底膜構成成分である laminin も消失する必要があるのではないかという反論^{1)~6)}も多い。Liotta¹⁶⁾の提唱した‘three step hypothesis’は癌の基底膜破壊(=浸潤)と着床(=転移)という一見相反する現象を矛盾なく、一連の過程として説明している。すなわち、基底膜の組織構築に関しては type IV collagen が重要な役割をになっており、癌が浸潤する際にはこの強固な collagen network を破壊する matrix 分解物質を癌細胞自身が分泌することが必要である。この matrix 分解物質には plasminogen activator, cathepsin B および各種の collagenase があるが、type IV-collagen を特異的に分解する type

IV collagenase が特に重要である。これら matrix 分解物質とくに type IV collagenase の癌細胞よりの分泌は、癌細胞膜表面に存在する laminin receptor に laminin が結合することにより起こるとされている。したがって、原発巣周囲組織への癌細胞浸潤には laminin が関与し、浸潤した癌細胞にはむしろ laminin が結合していると想像される。そして、標的臓器では、癌細胞に結合した laminin が接着剤として標的臓器内の脈管基底膜への接着を促進し、その後は原発巣での過程を繰り返し、標的臓器の組織内へ浸潤するという考え方である。この Liotta¹⁶⁾の仮説を正確に理解するならば、laminin 陽性例が肝転移を来しにくいとする Forster ら¹¹⁾¹²⁾の結果は矛盾があり、むしろ、転移が認められる時点では、原発巣の他の多くの癌細胞の receptor にも laminin が結合していると考えの方が妥当であり、本研究結果の方が合理性があると考えられる。

本研究のもう1つの目的は、組織型と laminin の関係を検討することであった。組織型別に laminin 陽性率をみると、高分化腺癌で48.7%であるのに対し、低分化腺癌では7.2%と、分化度が低いものほど laminin 陽性率も低下した。これは諸家の大腸癌⁶⁾¹²⁾や乳癌³⁾⁴⁾における研究結果と一致した。しかし、本研究では胃癌を対象とすることによって、大腸癌に比べより多くの低分化腺癌を検討することが可能となった。われわれは低分化腺癌を従来の髓様型、硬性型に充実胞巣型を加えて、3つに分類した結果、浸潤度の低い比較的膨張性増殖を示す充実胞巣型に laminin 陽性率が高かった。以上のことから、分化度の高いものほど、低分化腺癌では浸潤度の低い充実胞巣型に laminin 陽性例が多いことが判明した。

組織型と肝転移に関しては、一般に分化型ほど肝転移例が多いとされてきた¹⁷⁾¹⁸⁾。太田ら¹⁹⁾は H₁ で75%、H₂ で90%が分化型であったとしている。一方、渡辺ら²⁰⁾は動物実験により、血行性転移は単一細胞ではなく細胞群により形成されるとし、長尾ら²¹⁾も剖検例における胃癌の血管侵襲と血行性転移について検討し、小静脈系侵襲では数十個以下、中静脈系侵襲では数百個以上が癌細胞塊を形成していることが大多数であることより、細胞群が血行性転移を起こしやすいとしている。安富ら²²⁾は以上の報告と自験例の検討を踏まえて、高分化型が低分化型に比べ肝転移を来しやすいのは、細胞群を形成するからであると指摘している。また曾和ら²³⁾、木村ら²⁴⁾、高橋ら²⁵⁾は、低分化腺癌でも髓様型増殖をとる症例では肝転移陽性例が多いことを示

唆している。本研究では、従来おそらく髓様型の範ちゅうに入れられていたと考える充実胞巣型に肝転移例が多いことが判明した。しかも、充実胞巣型は原発巣の laminin が陽性であるばかりでなく、静脈内に侵襲した癌細胞も塊状形成をし、その周囲に laminin が存在していた。以上のことから、高分化型、低分化型を問わず、laminin 陽性のものは塊状形成しやすく、このことが laminin 陽性例ほど肝転移を起こしやすいもう1つの理由ではないかと考えた。それとともに、従来の肝転移と組織型の関係を laminin の面から裏打ちできると考える。

壁深達度と laminin に関しては、Forster ら¹¹⁾¹²⁾は壁深達度の深いものほど laminin 陽性例が多い傾向を示しているが、本研究結果では壁深達度と laminin 陽性率は相関しなかった。いいかえれば、laminin は血行性転移の予測に関しては壁深達度とは別の因子であると考えられる。

以上、胃癌組織における laminin の免疫組織学的研究を行い、胃癌肝転移と laminin の関係を中心に述べた。さらに type IV collagen やその他の基底膜構成成分、あるいは matrix 分解酵素についての研究が必要であることが考えられるが、しかし、従来の報告になく、laminin 染色性が肝転移と密接に関係し、laminin 陽性の癌ほど肝転移を来しやすいことを示すとともに、癌の組織型と血行性転移の関係を laminin 活性から解明できることを示唆した。

文 献

- 1) Kleinman HK, Klebe RJ, Martin GR: Role of collagenous matrix in the adhesion and growth of cells. *J Cell Biol* 88: 473-482, 1981
- 2) Woody DT, Liotta LA, Martin GR et al: Interaction of basement components. *Biochem Biophys Acta* 761: 278-283, 1983
- 3) Siegel G, Terranova VP, Liotta LA et al: Stages of neoplastic transformation of human breast tissue as monitored by dissolution of basement membrane component. *Invasion Metastasis* 1: 54-65, 1981
- 4) Barsky SH, Siegel G, Liotta LA et al: Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 49: 140-148, 1983
- 5) Kendall C, Sanderson P, Talbot U et al: Follicular thyroid tumors: A study of laminin and type IV collagen in basement membrane endothelium. *J Clin Pathol* 38: 1100-1105, 1985
- 6) Burtin P, Foidart JM, Martin E et al:

- Antigens of the basement membrane and the peritumoral stroma in human colonic adenocarcinomas: An immunofluorescence study. *Int J Cancer* 30: 13-20, 1982
- 7) 松田泰次: 大腸癌の免疫組織学的検討からみた癌の浸潤・転移におけるラミニンの役割. 医のあゆみ 141: 194, 1987
 - 8) Grigioni WF, Biagini G, Errico AD et al: Behaviour of basement membrane antigens in gastric and colorectal cancer: Immunohistochemical study. *Acta Pathol Jpn* 36: 173-184, 1986
 - 9) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 第11版. 東京, 金原出版, 1985
 - 10) Hsu SM, Ralhe L, Fanger H: The use of antiavidin antibody and avidin-biotin peroxidase complex in immunoperoxidase technique. *Am J Clin Pathol* 75: 816-821, 1981
 - 11) Forster SJ, Talbot IC, Claiton DC et al: Tumor basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum: An immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int J Cancer* 37: 813-817, 1986
 - 12) Forster SJ, Talbot IC: Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: Relationship to tumor grade, stage and metastasis. *Br J Cancer* 50: 51-61, 1984
 - 13) Terranova VP, Hujanen ES, Martin GR et al: Use of a reconstituted basement membrane to measure cell invasiveness and select for highly invasive tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 465-469, 1986
 - 14) Terranova VP, Martin GR, Kleinman H et al: Regulation of cell attachment and cell number by fibronectin and laminin. *J Cell Physiol* 127: 473-479, 1986
 - 15) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49: 636-649, 1983
 - 16) Liotta LA: Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986
 - 17) 西 満正, 田村竜男, 高月英夫: 肝転移胃癌の臨床病理学的研究—とくに肝転移成立の条件因子について—. 癌の臨 8: 759-767, 1962
 - 18) 橋本 謙, 掛川暉夫, 武田仁良ほか: 肝転移を有する胃癌に対する臨床的検討. 日消外会誌 19: 752-756, 1986
 - 19) 太田博俊, 高木国夫: 胃癌肝転移例の検討. 消外 4: 999-1004, 1981
 - 20) Watanabe S: The metastasizability of tumor cells. *Cancer* 7: 215-223, 1954
 - 21) 長尾孝一, 松寄 理, 井出源四郎: 胃癌の血管侵襲と腫瘍塞栓形成について—剖検例における血行性肝転移症例を中心に—. 癌の臨 21: 148-153, 1975
 - 22) 安富正幸, 丸山次郎, 松田泰次ほか: 転移性肝癌の治療と予後. 外科 45: 137-142, 1983
 - 23) 曾和融生, 加藤保之, 芳野裕明ほか: 肝転移胃癌の検討—とくに髄様型低分化腺癌と核DNAとの関連について—. 日消外会誌 21: 32-37, 1988
 - 24) 木村 修, 万木英一, 岡本恒之ほか: 肝転移・肝再発のみられた胃癌の病理組織学的特徴—とくに髄様型低分化腺癌について—. 癌の臨 30: 131-137, 1984
 - 25) 高橋 豊, 磨伊正義, 秋本龍一ほか: 胃癌の肝転移 high risk 症例の臨床病理学的検討—とくに AFP 産生胃癌との関係について—. 日消外会誌 17: 1732-1736, 1984
-