

消化器癌転移病変の特性

福井医科大学第2外科

谷川 允彦 下松谷 匠 高橋 康嗣 堀内 哲也
北角 泰人 増田 靖彦 村岡 隆介

癌の転移形成プロセスは段階を追って進む一連の事象の積み重ねであることから、その研究領域は多岐にわたるが大きく分けると癌細胞固有を対象にした検討と細胞外マトリックスの分解・生体防御反応・増殖因子などを含めた癌の微小環境を検討対象としたものに二分できる。本研究は前者に位置づけられるもので、胃癌・大腸癌の原発・転移巣別に制癌剤感受性、In vitro 増殖能、DNA ploidy、In vivo 増殖能 (Tpot) を指標に転移巣を構成する腫瘍細胞の特性を検討して以下の結論を得た。(1) 原発巣をモザイクに構成する細胞群の一部の、中でも増殖活性の高い細胞群(多くは aneuploid) が転移巣形成に関係する。(2) 転移形成の早期はことに増殖能が高く、制癌剤感受性も高い傾向にある。したがって手術療法後の微小転移巣に対する感受性薬剤による積極的・強力な化学療法の意義は大きいものと考えられる。

Key words: tumor heterogeneity, chemosensitivity, tumor growth potential

はじめに

近年の治療法の進歩にかかわらず、癌の治療を困難なものにしている一大原因は転移という事象であることは異論のないところである。転移病巣を構成する腫瘍細胞の生物学的な特性を部分的にでも明確にすることができれば転移のメカニズム追究の一助となり、ひいては転移をコントロールするという癌治療の究極の目標に寄与する可能性が高い。われわれはかねてから原発巣と対比した転移巣の特性を5種類のパラメーターを用いて検討してきた^{1,2)}。ここに、それらの成績を報告して転移形成細胞の特徴を見出し、その臨床での対応策を考察したい。そしてまた、現在国際的に精力的に行われている癌転移に関する研究成果を概括することを通して本研究の結果を位置づけてみたいと思う。

1. 原発巣・転移巣別の In vitro 増殖能と制癌剤感受性

われわれ消化器外科医が取り扱う固形腫瘍は腫瘍細胞と間質細胞とからなり、通常の組織培養法では線維

芽細胞などの間質細胞の増殖が優勢で腫瘍細胞を選択的に培養することは容易でなかった。1977年 Hamburger らにより導入された二層軟寒天培養法はヒト新鮮腫瘍細胞を選択的に培養可能にしたという意味では画期的な成果といえる。本研究でも基本的にそれを利用しているが、腫瘍コロニーの形成数を指標にしたコロニー法とわれわれが1982年に開発したシンチレーション法³⁾の2種類の方法により原発・転移巣別の制癌剤感受性および in vitro 増殖能を比較検討した。

悪性腫瘍患者12症例の比較的大きな原発巣の2か所の制癌剤感受性を比較したとき、それらが一致しなかった頻度は52%であった。これは、同一の腫瘍内でもその径が大きい場合は制癌剤感受性からみると1/2は異なることを意味している。一方、同一患者の原発巣と転移巣の間を23症例で比較したところその不一致率は35%であり、また同一患者内での異所性転移巣の間の比較では27%の不一致率であった。ちなみに、同一の腫瘍細胞浮遊液を用いて行った2回の感受性試験の不一致率(換言すれば感受性試験法そのものが持つ非再現性)は10%であり、52, 35, 27%といった値はそれに比べて明らかに高く、このことはヒト腫瘍の制癌剤感受性における不均一性 Heterogeneity を示していると解釈できる。

胃癌症例におけるコロニー形成能を原発巣・転移巣

*第36回日消外会総会シンポI・消化器癌転移のメカニズム

<1990年11月19日受理> 別刷請求先: 谷川 允彦
〒910-11 福井県吉田郡松岡町下合月23 福井医科大学第2外科

Table 1 Clonogenic ability of human fresh tumors

1. Gastric cancers		
Primary (n=33)	60 ± 83	} p < 0.01
Metastasis (n=31)	106 ± 200	
2. Corresponding specimens (n=15)		
Primary	53 ± 89	} 0.1 > p > 0.05
Metastasis	118 ± 204	

Table 2 DNA synthesis ability of human fresh tumors

1. Total Cases (n=80)		
Primary	2055 ± 3384	} *
Metastasis	7177 ± 14060	
2. Gastric Cancer (n=33)		
Primary	2781 ± 4692	} *
Metastasis	14554 ± 20243	
3. Corresponding Specimen (n=17)		
Primary	2232 ± 3100	} *
Metastasis	6689 ± 13788	

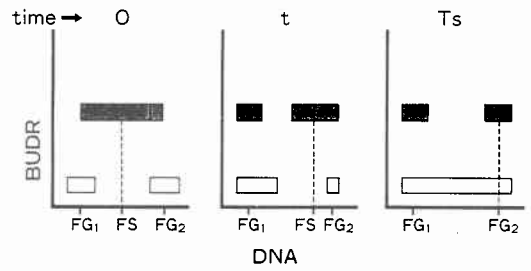
* p < 0.05

の別に比較した結果を **Table 1** に示した。ここにおいては腫瘍細胞 5 × 10⁵個当たりのコロニー形成数をもってコロニー形成能の指標にした。転移巣を構成する癌細胞のコロニー形成能が原発巣のそれに比べて有意に高く (p < 0.01), この傾向は胃癌15症例での対応する原発巣と転移巣の間の比較でもやはり転移巣のコロニー形成能が高いことが示された。新鮮癌細胞のDNA合成能は前述のシンチレーション法における³Hサイミディンの摂取能測定により評価できるが、胃癌・大腸癌80症例からの腫瘍標本について、ついで胃癌33標本の、そして胃癌・大腸癌17症例における対応する原発巣・転移巣の³H摂取能をそれぞれ比較したところ、すべての比較検討結果はやはり転移巣構成細胞のDNA合成能が原発巣より有意に高いことを示している(**Table 2**)。このように、コロニー形成能、DNA合成能を指標にした以上の検討結果は転移構成癌細胞の方が原発巣より In vitro 増殖能が有意に高いことを明らかにしている。

2. ヒト生体内における腫瘍の増殖能 Tpot の測定と原発・転移巣間の相違

Fig. 1 にヒト生体内における腫瘍の増殖能 Tpot の算出方法を示したが、手術直前の数時間前に Bromodeoxyuridine (以下 BrdU) を経静脈的に投与して t 時間後に手術的に摘出してすぐにアルコール固

Fig. 1 Methods of calculation of in vivo tumor growth potential (Tpot) by use of flowcytometry



$$RM = \frac{FS - FG_1}{FG_2 - FG_1}$$

$$T_s = \frac{0.5}{RM - 0.5} \times t$$

$$T_{pot} \text{ (days)} = \frac{T_s \times 100}{24} \times \frac{1}{\text{cell viability}}$$

定を行うことにより BrdU により標識された腫瘍細胞群の移動度 Relative Movement をフローサイトグラムで知ることができる。これらから S 期時間 Ts が求まり、同時に自動測定できる Labeling Index (LI) の値を含めて表の下段に示す式によって Tpot が算出できるわけである。

さらにわれわれは腫瘍細胞の生残率を導入することにより Tpot が腫瘍倍加時間によく一致することを見出している。胃癌・大腸癌など11種類のヒト悪性腫瘍由来のヌードマウス可移植性腫瘍を用いて上記のように算出した Tpot と実際に計測して求めた腫瘍倍加時間とは相関係数0.915ときわめて高い相関性を示した。すなわち、ヌードマウス腫瘍については腫瘍倍加時間は手術摘除する前に BrdU 標識を行うことにより Tpot として算出できるわけである。これが、ヒト腫瘍についてもあてはまるか、最近の症例の中で画像診断で腫瘍倍加時間を計測できた2例に適用してみた。大腸癌の脾臓内転移症例において computed tomography (以下 CT) で計測した腫瘍倍加時間 (以下 Td) は22.1日であるのに対して前述のようにして算出した Tpot は22.5日ときわめてよく類似した。

また、右上葉肺癌症例では Td 41.5日、Tpot 56日とおおよそ似た数値を示した。このように、Tpot はヒト腫瘍の生体内での増殖能をよく反映していることが裏付けられた。

これを利用して胃癌の原発巣と転移巣の In vivo 増殖能 Tpot を算出すると、8症例の原発巣の平均は9.0日であるのに対して5症例で検討できた転移巣の Tpot は6.1日であった(**Table 3**)。このように、In vivo

Table 3 In vivo kinetic data of gastric cancer

Diagnosis	No. of Pt.	LI (%)	Ts (h)	Tpot (d)
Gastric Cancer (Primary)	8	9.6±6.0	17.4±2.6	9.0±8.3
(Metastasis)	5	12.8±6.4	23.3±8.7	6.1±0.7

Table 4 Kinetic data stratified by DNA ploidy pattern

Ploidy	No. of Pt.	LI (%)	Ts (h)	Tpot (d)
Diploid	14	6.7±5.6	16.1±3.6	10.4±8.4
Aneuploid	21	14.0±5.3	19.0±7.3	5.8±2.2

* p<0.01

においても胃癌の転移巣の方が原発巣より増殖能が高い傾向にあることがこの Tpot の検討で明らかにされた。

3. 原発巣・転移巣と DNA ploidy の関連

胃癌・大腸癌35症例において Tpot を算出してそれらの DNA ploidy pattern との関連をまず検討してみると、diploid pattern を示す14標本の Tpot は10.4日であるのに対して aneuploid pattern を示す21標本は平均5.8日と aneuploid の腫瘍の増殖能が高い傾向にあることが示された (Table 4)。一方、原発巣・転移巣別に DNA ploidy pattern を調べてみると原発巣に diploid が多く、それに反して転移巣には aneuploid が多い傾向にあり、この傾向は胃癌・大腸癌だけに限定した検討でも同様に示された。

前述の DNA ploidy 別の Tpot の結果を踏まえると、この DNA ploidy の検討も転移巣の増殖能が原発巣より高いことを示している。

4. 原発巣・転移巣別の制癌剤感受性

ところで、原発・転移巣の間に制癌剤感受性の相違があるであろうか。胃癌96標本を用いて前記の2種類の In vitro 感受性試験法で検討した。感受性陽性率は原発巣37標本では21% (42/198) であり、転移巣59標本では25% (94/370) であった。転移巣の方が制癌剤感受性が高い傾向にあるもののその差は有意なものではない (p>0.10)。

胃癌17症例の対応する原発巣と転移巣の間の比較でも前者の陽性率は13% (13/102)、後者のそれは23% (21/93) とやはり転移巣の感受性がより高い傾向にある。しかしこれも現在のところ有意差をもっては示されていない (0.1>p>0.05)。

Table 5 Wet weight and clonal ability of metastatic lymph nodes

Involved node weight (gram)	n	Colony forming cells per gram of wet node	Colony count
<0.5	11	34541±99844	117±243
0.5-1.0	11	4325±9175	90±99
1.0-1.5	10	2326±3245	104±173
1.5-2.0	6	396±401	94±81
2.0-3.0	7	348±521	63±83
3.0-4.0	2	142±94	39±33
4.0-5.0	2	202±211	31±21
5.0-	3	345±240	24±3

ここで、転移巣形成早期とそれの増大の間の腫瘍細胞の増殖能と制癌剤感受性を検討してみた。胃癌・大腸癌のリンパ節転移巣52標本を湿重量0.5g以下、0.5~1.0g、1.0~1.5g、…と0.5g増加単位で単位重量当たりのコロニー形成能と制癌剤感受性陽性率を調べたところ、転移巣が小さいほどコロニー形成能(すなわち In vitro 増殖能)が高く、重量的に増大するともにそれが低下する傾向があることが明らかになった (Table 5)。一方、制癌剤感受性もやはり転移巣が小さなものほど高い傾向が示されたが、これも推計学的に有意差をもっては示されていない。

5. DNA histogram によるヒト腫瘍の多クローン構成の証明

癌研究に用いられる動物腫瘍の中でも代表的な B16 黒色腫をヌードマウスに移植継代を繰り返すことによりそれぞれの世代の腫瘍の DNA 量と DNA ploidy pattern をフローサイトメトリーで解析した。Fig. 2 に初代、11代、20代目のそれぞれの DNA histogram を示したが、左端のマウス正常脾細胞の約2倍の DNA 量の monoploidy pattern が初代から20代まで全く変わらず継続することが明らかになった。一方、ヒト新鮮胃癌を B16黒色腫と同じようにヌードマウスに移植・継代を繰り返して各世代の DNA histogram を In vivo および In vitro 増殖能とともに追跡した。Fig. 3 には7代以上を追跡できた6例の内の特徴的な変化を示した胃癌リンパ節転移巣からの結果を示している。移植4代目までは手術的に採取した新鮮腫瘍に変わらない DNA 量と ploidy pattern を呈していたが、5代目に至って突如 DNA index 1.62の新しい stem line が登場するとともに、Tdの短縮・DNA合成能の著増という In vitro, In vivo ともに腫瘍増殖能が突然に上

Fig. 2 DNA histogram of B16 melanoma serially transplanted into nude mice

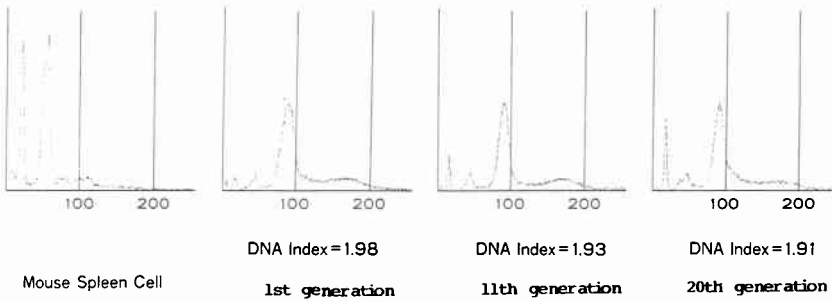
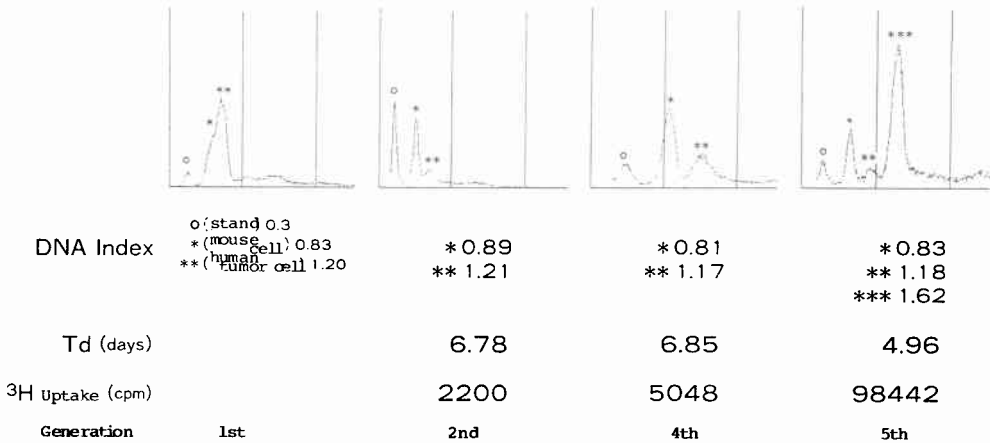


Fig. 3 DNA histogram of human gastric cancer serially transplanted into nude mice



昇した。これは移植初代の腫瘍に潜在していた増殖能の高いクローンが顕在化したものと考えられ転移形成にかかわる細胞の特性を想起させて興味深い。

考 察

5種類のパラメーターを用いた本研究の検討結果が転移に関連して明らかにした事柄は以下のように総括することができる。すなわち heterogeneous な原発巣の構成細胞群の一部の、中でも増殖活性の高い細胞群(多くは aneuploid)が転移巣の形成に関係しており、転移巣形成の早期は増殖活性が高く、制癌剤感受性も高い傾向にあるということである。

癌細胞の転移は細胞の増殖、移動、定着などの一連の現象でありそれに関連する形質は多様な要素からなる複合的なものである。分子生物学的アプローチも積極的に導入された最近の癌転移の研究をまず概括してみたい。

腫瘍細胞の主要組織適合抗原の発現と転移能との検

討や、着床組織におけるNK活性や活性化マクロファージなどと転移形成との関連などは転移のメカニズムの一部を生体防御反応にたいする抵抗性に関連づけるものである。また、転移の第一歩は増殖した癌細胞による浸潤であり細胞外マトリックスの破壊を伴う。これら細胞外マトリックスの分解酵素にはプラスミノゲンアクティベーターやタイプIVコラゲナーゼなどがあり、これら癌細胞に見い出されている酵素活性がその浸潤性や転移能と一部腫瘍と相関していることが示されている。また、タイプIVコラゲナーゼやコラゲナーゼなどの総称であるメタロプロテイナーゼの特異的阻害物質 TIMP が最近見つかり、これを用いて癌細胞の基底膜透過性を下げ、転移を抑制させるという動物実験の報告が最近相次いでいるのが現状である。そのほか転移形成と細胞間接着因子カドヘリンなどとの関連を追究する検討もある。

加えて、転移形成メカニズムに言及する場合、癌の

転移先の臓器選択性はきわめて重要な生物反応である。原発巣から遊離した癌細胞の転移先の決定に関しては古くから2つの仮説が唱えられてきた。1つは“anatomical-mechanical”説と呼ばれ、癌細胞が脈管に乗って運ばれ最初に出会った臓器の毛細血管で機械的にトラップされてその臓器に定着するというものであり、多くの臨床像を説明するが、中にはこうした解剖学的位置関係だけでは説明できない例も少なくない。例えば、乳癌における骨転移や悪性黒色腫での肝転移・脳転移などである。これらを説明するべくもう1つの仮説として今から101年前の1889年 Paget は“seed and soil”説を唱えた。この説は個々の臓器の微小環境 (soil) は癌細胞 (seed) の定着・浸潤・生存および増殖に影響を与え、seed と soil の両者の固有の性質が適合して初めて転移巣が形成されるとするものである。そして、最近の研究結果は着床先の臓器由来の増殖因子 (増殖阻止因子) や血中の増殖因子など種々の腫瘍増殖因子の存在が明確にされてきており、これらの転移形成への関与が転移メカニズム研究の一方の重要課題とされてきている。

以上の研究対象が癌細胞 (seed) そのものというより微小環境 (soil) に重点をおいたものであるのに対して、本研究はあくまでも転移形成癌細胞を対象にしたものである。

その転移癌細胞を対象にした最近の研究成果はどうであろうか。われわれは1984年にヒト新鮮固形腫瘍が制癌剤感受性において不均一な細胞集団であることを明確にしたが、癌が転移性に関しても不均一な性格の細胞集団からなり、その中で“転移形質”とでも呼ぶべき形質を有する細胞によって転移が形成されることが明らかになり、それら形質に関する研究が広く行われるようになってきている。そしてそれは関連遺伝子を追究する分子生物学のレベルで行われてきた。

癌細胞の特有な自律増殖能に関係した癌遺伝子の研究の結果、現在までのところ K-ras, fos, N-myc, c-myc, sis, erbB-2, myb などの癌遺伝子や癌抑制遺伝子などが悪性化に関連している可能性が示唆されている。しかしこれら遺伝子の増幅や強い発現それ自身だけで癌細胞の転移形質の有無を判定することには無理があることも次第に明らかにされてきた。転移のプロセス自体が段階を追って進む一連の事象の積み重ねであり、癌転移を決定する種々の局面があることを考えれば、それはむしろ当然のことかもしれない。

ヒト新鮮腫瘍を対象にした本研究においては転移巣

形成細胞の特性を原発巣のそれと比較する形で特に増殖能を指標に検討した。そして転移巣の増殖活性が In vitro, In vivo とともに原発巣より有意に高いことを明示することができた。これを支持する報告として、最近、Chadwick, Lagarde⁵⁾はチャイニーズハムスター CCL-39肺繊維芽細胞をヌードマウスに移植し、生じた原発腫瘍と肺転移巣からおのおの培養系を作ったところ転移巣由来の細胞は自律増殖 (血清非存在下での増殖) できること、逆に自律増殖可能な細胞と自律増殖不能の細胞とを In vitro で選別したところ、前者のみが転移性を持つことを示し、転移性と自律増殖性との間の相関を見出ししている。同様に Rodeck ら⁶⁾はヒトのメラノーマについて原発巣由来細胞株と転移巣由来細胞株とを比較し、後者は自律増殖可能だが前者は不可能と報告している。転移巣に伺える高い増殖能は自律増殖ができるということと同義語ではないもののお互いに関連したものと判断できる。

ここに、近年発見された癌細胞自ら作り出す増殖因子 (オートクリン増殖因子) が関与しているとすれば、その転移細胞の選択的な増殖阻止へむけた治療研究が将来花咲いて行く可能性がある。

本研究において、また転移形成の早い時期ほど増殖活性が高く、制癌剤感受性も高い傾向にあることが示されたが、その制癌剤感受性に関しては期待するほどの高感受性とはいえない。しかし、ここに概括した癌転移研究の今日までの成果を思うとき、外科手術でできるだけ担癌量を減少させ、growth fractionが増加した術後早期に感受性薬剤による積極的な化学療法を施行することが、われわれ臨床外科医が行える唯一理論的な癌転移に対する治療姿勢であることは間違いないと思われる。

文 献

- 1) Tanigawa N, Mizuno Y, Hashimura T et al: Comparison of drug sensitivity among tumor cells within a tumor, between primary tumor and metastases, and between different metastases in the human tumor colony-forming assay. *Cancer Res* 44: 2309-2312, 1984
- 2) Tanigawa N, Morimoto H: Colony-forming ability in vitro and clonology of colorectal cancer. *Jpn J Cancer Res* 81: 687-691, 1990
- 3) Tanigawa N, Kern DH, Hikasa Y et al: Rapid assay for evaluating the chemosensitivity of human tumors in soft agar culture. *Cancer Res* 42: 2159-2164, 1982
- 4) Nicolson GL: Tumor cell instability,

- diversification, and progression to the metastatic phenotype: From oncogene to oncofetal expression. *Cancer Res* 47 : 1473—1487, 1987
- 5) Chadwick DE, Lagarde AE: Coincidental acquisition of growth autonomy and metastatic potential during the malignant transformation of factor-dependent CCL39 lung fibroblasts. *J Natl Cancer Inst* 80 : 318—325, 1988
- 6) Rodeck U, Herlyn M, Menssen MD et al: Metastatic but not primary melanoma cell lines grow in vitro independently of exogenous growth factors. *Int J Cancer* 40 : 687—690, 1987

Specific Character of Metastatic Lesions of Gastrointestinal Cancer

Nobuhiko Tanigawa, Takumi Shimomatsuya, Kohji Takahashi, Tetsuya Horiuchi, Yasuhito Kitakado,
Yasuhiko Masuda and Ryusuke Muraoka
Second Department of Surgery, Fukui Medical University

Processes leading to the metastasis of tumor cells consist of various fundamental cell behaviors such as cell adhesion, cell movement and cell proliferation. In this study we focused on the proliferating ability of metastatic cells as relevant to metastasis. By using fresh gastric and colorectal cancer specimens, the biological characteristics, chemosensitivity, in vitro and in vivo growth potential, and DNA ploidy of primary and metastatic specimens were compared. The results indicate that (1) cells responsible for metastasis formation are mainly aneuploid cells with high proliferating potential and (2) in the early phase of metastasis formation, tumor cells have a very high growth potential and are also chemosensitive. Therefore, postoperative early chemotherapy should be beneficial in terms of prevention of metastasis formation.

Reprint requests: Nobuhiko Tanigawa Second Department of Surgery, Fukui Medical University
23 Matsuoka-cho, Yoshida-gun, Fukui, 910-11 JAPAN
