

胃癌転移のメカニズム

—胃癌組織内の基底膜分解コラーゲナーゼからの検討—

慶應義塾大学医学部外科学教室¹⁾, 同 衛生学公衆衛生学教室²⁾, 防衛医科大学校共同利用研究施設³⁾
国立東京第二病院外科⁴⁾, 浦和市長立病院外科⁵⁾, 国家公務員等共済連合組合会立川病院外科⁶⁾

吉野 肇一¹⁾ 窪地 淳⁴⁾ 岡崎 勲²⁾ 大谷 吉秀⁵⁾
松山 重雄³⁾ 鈴木 文雄⁶⁾ 深瀬 達¹⁾ 會澤健一郎¹⁾
松井 英男¹⁾ 島田 敦¹⁾ 石引 久弥¹⁾ 阿部 令彦¹⁾

上皮性癌の転移過程では、まず癌原発巣部における癌細胞の基底膜層の通過、間質内での浸潤、その後には遭遇する脈管基底膜層の通過と脈管内への侵入、さらには転移としての着床部位における脈管外への遊出の際の脈管基底膜層の通過などが考えられ、転移におけるいわゆる seed and soil の際に癌細胞が基底膜を何回にも渡って通過しなければならない。基底膜は主にIV型コラーゲンから構成されており、IV型コラーゲン分解酵素 (IV ase) によって特異的に分解される。

そこで癌組織中の IV ase 活性はその癌の生物学的悪性度を表す指標となる可能性の追求を、まず組織中 IV ase 活性測定法を確立し、それを胃癌症例に用いて行い、その可能性を証明した。

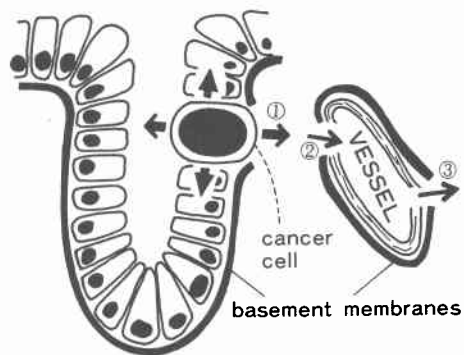
さらにIV型コラーゲンの分解産物である尿中3-hydroxyproline が進行胃癌症例で増加していることもわかった。

Key words: cancer metastasis, basement membrane, collagen degradative enzyme

1. われわれの仮説

胃癌の転移の重要な過程の1つとして、癌化した細胞が血流ないしリンパ流に入ることが考えられる。それにはまず、癌の原発部位において癌細胞が基底膜の層を通過して間質に逸脱する (Fig. 1-①) ことが必要であり、さらにそれから先で遭う、脈管を取り囲む基底膜をも通過して癌細胞が脈管内へ侵入し (Fig. 1-②)、これに加えて転移先の着床部では再び脈管を取り囲む基底膜を通過する (Fig. 1-③) ものと思われる¹⁾。癌細胞が基底膜を通過するメカニズムの1つとして、基底膜の主な構成成分であるIV型コラーゲンを特異的に分解する蛋白分解酵素 (IV ase) による基底膜の溶解が考えられており、またこのIV型コラーゲンは一般的な間質コラーゲナーゼによっては溶解されないとされている²⁾。このような IV ase が悪性腫瘍中に存在することはすでに数多く証明されている³⁾。

Fig. 1 Schema of steps to cancer metastasis —cleavages of basement membranes—



また尿中の3-hydroxyproline (3-HYP) の多くはIV型コラーゲンの代謝産物とされている⁴⁾。

このような考え方に基づいて次のような仮説を立てた:

- 1) 胃癌組織中の IV ase 活性の強さは、その胃癌の生物学的悪性度の指標となる。
- 2) 胃癌患者では尿中3-HYP 量が多い。

*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12月12日受理〉別刷請求先: 吉野 肇一
〒160 新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部外科

Table 1 New direct assay method of IVase in tissue homogenate

- (1) mixture of substrate (0.2% ³H-labeled type IV collagen solution), enzyme material (tissue homogenate) and incubation buffer containing p-CMB.
- (2) Incubation : 37°C, 24 h
- (3) add trichloroacetic acid & tannic acid
- (4) left on ice : 30 m
- (5) centrifugation : 10,000 × g, room temperature, 5 m
- (6) measurement of radioactivity of supernatant by liquid scintillation counter

以上の仮説を証明するために以下の実験を行い成績を得た。

2. 組織中 IV ase 活性測定法の確立

従来の Liotta ら²⁾の方法に共同研究者の Maruyama ら⁵⁾の間質コラーゲナーゼ活性の測定原理を取り入れ, IV ase 活性を組織ホモジネートから直接測定する solution assay 法を確立した⁶⁾ (Table 1).

IV型コラーゲンの基質としては正常ヒト胎盤から抽出したものを用い, IV型コラーゲンの同定はポリアクリルアミド・スラブ・ゲル電気泳動による。IV ase 活性の測定に当たって最も重要なことの1つはIV型コラーゲンを分解する他の蛋白分解酵素(プロテアーゼ)である酸性プロテアーゼ, チオールプロテアーゼ, セリンプロテアーゼの作用を排除ないし消去することである。Table 1 に示した基質に対する酵素の反応を中性領域で行うことにより, 酸性プロテアーゼは失活していると考えられ, p-chloromercuribenzoate (p-CMP)でチオールプロテアーゼを失活させた。これで得られた値(A)にはセリンプロテアーゼの活性が含まれている。そこで Table 1 の(1)の incubation buffer 中の CaCl₂に替えて ethylene diamine tetraacetic acid(EDTA)を用いて, IV ase を含む金属プロテアーゼの活性を抑えたセリンプロテアーゼのみによる値(B)を測定し, A-B をもって IV ase の活性値とした。これらの反応液をポリアクリルアミド・スラブ・ゲル電気泳動で分析すると, 反応が SBTI や PMSF の添加で抑制されなかったことから, 金属プロテアーゼによるIV型コラーゲンの分解であることを証明することができたと考えている。

3. 胃癌切除胃における間質コラーゲナーゼおよび IV ase の活性

1) 部位別比較

Fig. 2 Activities of collagen degradative enzymes in various tissues of cancer bearing stomach

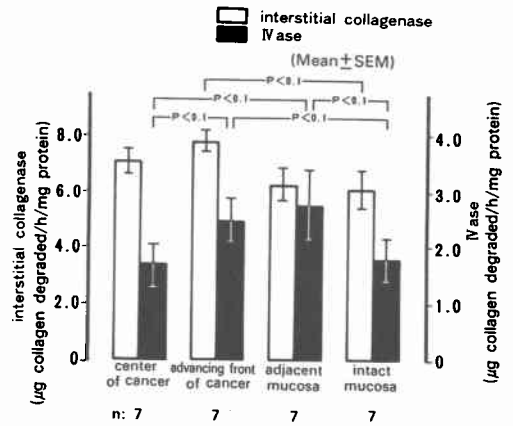
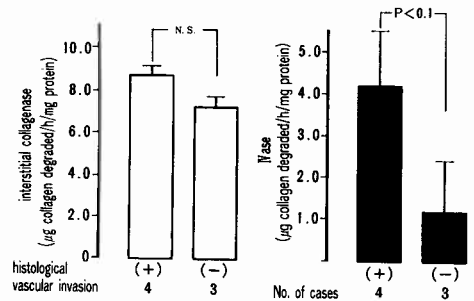


Fig. 3 Activities of collagen degradative enzymes and histological vascular invasion



間質コラーゲナーゼ活性は Maruyama ら⁶⁾の fibril assay による。間質コラーゲナーゼ活性は胃癌の原発巣先進部(肉眼的にそのように思われるところ, 以下同様)で遠隔非癌部胃粘膜よりも高い傾向(p<0.1)にあったのに対し, IV ase 活性は癌隣接非癌胃粘膜および癌先進部で癌中心部および遠隔非癌部胃粘膜よりも高い傾向(いずれも p<0.1)にあった (Fig. 2).

このように酵素活性が癌の先進部とそれに隣接する非癌部の粘膜に比較的高いということは, 胃癌の浸潤性とともにもその周辺組織がすでに被浸潤状態にあるものと考えられる。

2) 組織学的脈管侵襲での比較

胃癌を組織学的な脈管侵襲が著明なものとそうでないものに2大別して, それぞれの間質コラーゲナーゼおよび IV ase 活性を原発巣先進部組織で検討した (Fig. 3). 間質コラーゲナーゼに関しては Fig. 3 の左側のように両群間に有意の差が認められなかったが, IV ase に

Fig. 4 IV ase activities: size of primary lesion and extent of lymph nodes metastases

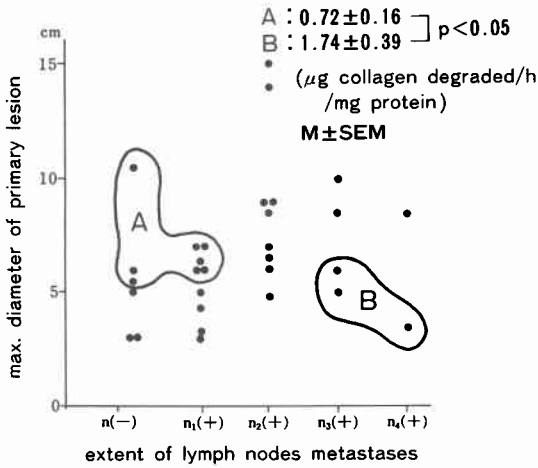
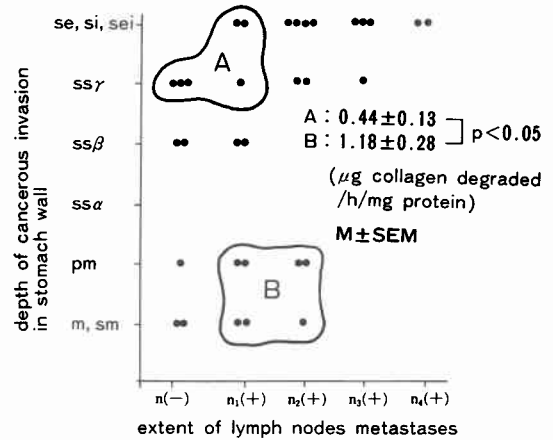


Fig. 5 IV ase activities: depth of cancerous invasion in stomach wall and extent of lymph nodes metastases



関しては脈管侵襲の著明な群で活性がより高い傾向 ($p < 0.1$) が認められた。

したがって IV ase の方が脈管侵襲により密接な関連性がある可能性が示唆された。そこで IV ase に関してリンパ節転移状況から検討を加えた。

3) リンパ節転移状況からみた胃癌の悪性度と IV ase

i. 胃癌原発巣の大きさとの関係

Fig. 4 の A で囲った群は原発巣が大きいにもかかわらずリンパ節転移が軽微な、すなわちリンパ節転移からみるかぎり、悪性度が比較的に低い群であるのに対して、B 群はその反対で、悪性と考えられるものである。これは両群間で原発巣先進部組織中の IV ase 活性を比較したところ、B 群の方がより高かった ($p < 0.05$)。

ii. 胃癌原発巣の深達度との関係

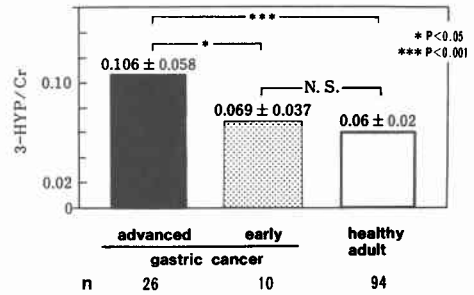
前項と同様に **Fig. 5** で A で囲った群は原発巣の深達度が深いにもかかわらずリンパ節転移が軽微で悪性度が比較的に低いと考えられる群であり、B 群はその反対である。この検討でも同様に、より悪性と考えられる B 群の IV ase 活性がより高値を示した ($p < 0.05$)。

4. 胃癌患者の尿中3-HYP

1) 測定法

Szymanowicz ら⁷⁾の方法に準じて、*Delonix Regia* の種子より3-HYP を抽出・生成して標準溶液を作成し、それを基にしてアミノ酸分析器で尿中の3-HYP 濃

Fig. 6 3-HOP in urine/urine creatinine



度を測定し、腎機能の影響を除くために、同時に計った尿中クレアチニン濃度で除した値で示すことにした。採尿に当たっては食事の影響を避けるために、採尿前日の夕食以後、禁食とし、夕食後2時間以上経ってから排尿させ、翌早朝の第1尿を検体とした。健康人による pilot study で、この方法に十分な再現性があることを確かめてある。

2) 成績

進行胃癌、早期胃癌、健康人の3群に分けて検討したところ、進行胃癌の群で最も高く、早期胃癌、健康人の順で、進行胃癌群は早期胃癌群および健康人群よりも有意 (それぞれ $p < 0.05, 0.00$ (**Fig. 6**)) に高値を示した。

5. 考 察

結論から述べてしまうと、冒頭に掲げた2つの仮説はいずれも一応は立証されたものと考えられる。

その経過の第1段階として組織中 IV ase 活性測定

方法の確立があったのであるが、ここで述べた方法はわれわれはすでに1985年以来、国内・外で数回にわたって発表しており、十分な評価を得ているものと考えている。

組織中 IV ase 活性が、胃癌原発巣で肉眼的に癌の先進部と思われるところで高く、組織学的脈管侵襲およびリンパ節転移と相関していたことは、同部の IV ase 活性が、少なくともリンパ節転移に関するかぎり、その胃癌の悪性度を示唆する可能性がある。

この IV ase 活性は数 mm 角の小さい標本でも測定が可能なので、胃生検組織での検討ができる。そこで術前に IV ase 活性を測定し、リンパ節郭清範囲の設定に供すことが考えられる。このことは、最近広く行われるようになりつつある進行胃癌に対する傍大動脈リンパ節までも含む超拡大リンパ節郭清の適応決定や、逆に、胃癌手術の1/3以上を占めるようになった早期胃癌ではリンパ節郭清の縮小が提唱されている⁸⁾が、早期胃癌でもリンパ節転移を認める例もあるので、その適応を決める際にきわめて大きな意義を持つものと考えられる。

尿への3-HYP 排泄量が進行胃癌で増加していたということは、尿中の3-HYP の大部分が基底膜の主要な構成成分であるIV型コラーゲンの分解産物である⁴⁾ことより、各種の転移が認められることの多い進行胃癌では基底膜が大量に分解されていることが容易に推定される。すなわち、この面からみても基底膜の破壊という現象が癌の転移に深くかかわっていることが考えられる。われわれは胃癌のみならず他の癌においても尿中3-HYP が増加するという成績を得ており、検体採取の容易さ、-20℃で検体の長期保存が可能であることなどより、尿中3-HYP の癌のマスクリーニングへの応用を考えている。

本研究に要した費用の一部は文部省科学研究費補助金の昭和63年・平成元年・同2度一般研究C第6357064号、同平成2年度奨励研究A第0277075号および平成元年度慶應健

康相談センター研究助成金によった。

文 献

- 1) 吉野肇一, 岡崎 勲, 松山重雄ほか: 胃癌の進展。間質とくにコラーゲンからみて。Oncologia 22: 27-34, 1989
- 2) Liotta LA, Tryggvason K, Gargisa S et al: Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. Nature 284: 67-68, 1980
- 3) 窪地 淳: 組織内IV型コラーゲナーゼ活性値測定法の確立とそれによる胃・肺癌組織内同酵素活性に関する研究—I型コラーゲナーゼ活性および病理組織学的所見と対比して一。日外会誌 91: 174-183, 1990
- 4) Kefalides NA: Isolation and characterization of the collagen from glomerular basement membrane. Biochem 7: 3103-3112, 1968
- 5) Maruyama K, Feinman L, Okazaki I et al: Direct measurement of neutral collagenase activity in homogenates from baboon and liver. Biochem Biophys Acta 658: 124-131, 1981
- 6) Kubochi K, Otani Y, Maruyama K et al: Development of a direct measurement assay for collagenase against type I and type IV collagens in tissue homogenate and its application in stomach and lung cancers. Edited by Tschesche H., Proteinases in Inflammation and Tumor Invasion. Walter de Gruyter, Berlin, New York, 1986, p337-356
- 7) Szymanovisz A, Poulin G, Randoux A et al: A method for the evaluation of 3-hydroxyproline in the urine. Clin Chem Acta 91: 141-146, 1979
- 8) 吉野肇一: 早期胃癌の外科治療の現況—縮小手術を中心に—。診断と治療 4: 767-770, 1990
- 9) 窪地 淳, 山崎一人, 吉野肇一ほか: ヒト由来の胃癌細胞と線維芽細胞の混合培養系における細胞間相互作用。日癌会49回総会記, p209, 1990
- 10) 深瀬 達, 窪地 淳, 吉野肇一ほか: スキルス胃癌の間質形成における金属依存性プロテアーゼインヒビター (TIMP) の役割。日癌会49回総会記, p229, 1990

**Mechanism of Metastasis of Gastric Cancer, from the Viewpoint of
Basement Membrane Degradative Enzyme**

Keiichi Yoshino¹⁾, Kiyoshi Kubochi⁴⁾, Isao Okazaki²⁾, Yoshihide Otani³⁾, Shigeo Matsuyama³⁾, Humio Suzuki⁶⁾,
Tatsu Fukase¹⁾, Kenichiro Aizawa¹⁾, Hideo Matsui¹⁾, Atsushi Shimada¹⁾,
Kyuya Ishibiki¹⁾ and Osahiko Abe¹⁾

¹⁾Department of Surgery, ²⁾Department of Preventive Medicine and Public Health, Keio University
School of Medicine, ³⁾Central Research Lab, National Defence Medical College, ⁴⁾Department of Surgery,
National Tokyo Second Hospital, ⁵⁾Department of Surgery, Urawa City Hospital, ⁶⁾Department of
Surgery, Federation of National Public Service and Faciliated Personnel
Mutual Aid Association, Tachikawa Hospital

The activity of basement membrane degradative enzyme (type IV collagen degradative enzyme, IV ase) in cancer tissue may be indicative of the degree of biological malignancy of the cancer, since the basement membrane encircling the primary cancer site and vessels is cleaved in the process of cancer metastasis, especially when cancer cells are released from their primary site and invade adjacent connective tissue, undergoing both intravasation and extravasation after lodgement. The IV ase activity of gastric cancer tissue was measured by means of the solution assay developed by us, and the results were as follows; the activity was found to be higher in the advancing front of the cancer, to be higher in cases with marked microscopic vascular invasion and in cases with widely disseminated lymph node metastasis. In addition, the concentration of urinary 3-hydroxyproline (3-HYP), which is derived mainly from type IV collagen, was measured, with the results showing that it was higher in cases of advanced gastric cancer than in healthy subjects and cases of early gastric cancer. The following conclusion appears justified: the basement membrane and IV ase participate in cancer metastasis. Our findings suggest that the measurement of IV ase activity in cancer tissue might contribute to choosing powerful strategies against the cancer and that 3-HYP based cancer screening might be possible.

Reprint requests: Keiichi Yoshino Department of Surgery, Keio University School of Medicine
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 JAPAN
