

基底膜形成癌と肝転移

近畿大学第1外科

久保 隆一 喜多岡雅典 赤埴 吉高 待寺 則和
肥田 仁一 田中 晃 進藤 勝久 安富 正幸

基底膜の構成成分である laminin (LN) の免疫組織化学的染色を大腸癌・胃癌に行ったところ LN 活性が癌組織の基底膜部分に認められる症例に高率に肝転移, 肝転移再発がみられることが明らかになった。また同じ基底膜成分である type IV collagen (CIV) の染色部位は LN と一致し, LN 陽性部位は基底膜であると考えられた。1987年より LN 染色による大腸癌の肝転移再発の prospective study を行った結果, 高率に肝転移再発が予測できた。一方, LN 陽性で基底膜を形成する癌がなぜ高率に肝転移するのかを解明するため培養細胞を用いた研究を行った。培養細胞でも基底膜を形成する癌としない癌があったが, いずれの細胞も LN, CIV を産生していた。

以上より大腸癌・胃癌では基底膜を形成する癌としない癌があり, 基底膜形成癌 (basement membrane producing cancer; BMPC) が高率に肝転移することが明らかになった。

Key words: basement membrane producing cancer, liver metastasis of colonic and gastric cancer, laminin

はじめに

Laminin (以下 LN) は, IV型コラーゲン (以下 CIV), ファイブロネクチン (以下 FN), プロテオグリカンなどととも基底膜を構成する糖蛋白である。なかでも LN は癌の浸潤, 転移に関与するとして注目されている。我々は FN の研究から LN に注目し, 1984年頃からそれまでほとんど行われていなかった LN の組織化学研究を行った。その結果, LN 活性が癌組織の基底膜部分に認められる大腸癌・胃癌では高率に肝転移・肝転移再発が見られることが明らかになった。現在では大腸癌・胃癌では癌腺管基底部に癌細胞自身が分泌した基底膜構成成分による基底膜様構造を形成する癌としない癌があり, 基底膜形成癌 (basement membrane producing cancer; BMPC) が高率に肝転移再発を起こすことを報告している。本稿では現在までの研究結果と基底膜形成性癌の概念について述べる。

研究対象と方法

1. 免疫組織化学的染色法

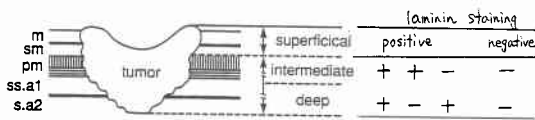
染色は隣接切片に LN 染色と hematoxylin-eosin 染色を行った。LN 染色は avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法に準じて行った。1次抗体 (抗 LN 抗体) は polyclonal ウサギ抗ヒト LN 抗体 (Chemicon 社) を pH 7.2 に調節した 0.01M リン酸緩衝液 (PBS) で 100倍希釈して使用した。ABC 法には Peroxidase Rabbit IgG キット (Vector 社) を使用した。ホルマリン固定パラフィン切片を脱パラフィンし, 0.3% H₂O₂ 加メタノールで 30分間処理した後, トリプシン処理を 37°C 40分間行った。トリプシン処理液は蒸留水に 0.02% CaCl₂ および 0.02% トリプシン 1:250 (Difco 社) を溶解した液 (pH 7.8) を用いた。10% 正常ヤギ血清により切片を被覆し, moist chamber 内室温で 20分間インキュベートした。Avidin-biotin-peroxidase complex (Vector 社) で 30分間反応させた後, 3,3'-Diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) により発色させた。DAB 発色は 0.02% DAB の 0.01% H₂O₂ 加トリスバッファー溶解液に室温で 5分間浸して行った。核染色には hematoxylin を用いた。

2. 判定基準

LN 染色性の判定は Fig. 1 のごとく行った。すなわ

* 第41回日消外会総会シンポジウム・消化器癌の新しい予後因子—細胞生物学的並びに分子生物学的アプローチ <1993年6月14日受理> 別刷請求先: 久保 隆一 〒589 大阪狭山市大野東377-2 近畿大学医学部第1外科

Fig. 1 Distribution of laminin staining



ち腫瘍の表層部すなわち正常組織の m・sm に相当する部位は染色が不安定な場合があり、この影響を少なくするため判定には用いず pm 以下腫瘍の最深部までを2等分し、中間層、深層とした。中間層、深層内でそのどちらかあるいは両者に LN が腫瘍管の50%以上染色された場合、陽性症例とした。

3. Retrospective study

Retrospective study には1986年までに近畿大学第1外科で手術された大腸癌341例、胃癌161例を用いた。標本は癌病巣の中心を通る幅5mmの薄片を採取し、採取後ただちに10%中性ホルマリンで48時間固定後パラフィン包埋し、病巣の中心を通る6μmの連続3切片を作成した。この切片に LN 染色、CIV 染色、HE 染色を行い検鏡した。大腸癌では LN 染色性と転移を中心にした病理学的諸因子について検討し、胃癌では主に組織型と LN 染色性について検討した。

4. Prospective study

大腸癌の肝転移再発を予測する prospective study を行った。対象は1987年1月より1991年3月までに近畿大学第1外科で手術された結腸・直腸癌のうち無作為抽出された226例である。対象となった症例の条件は、

- ① 80歳未満の大腸癌症例
- ② 治癒切除症例
- ③ 早期癌は除外

であり、組織学的に確認されたものを対象とした。これらの条件を満たす症例を無作為に抽出し、手術後早期(原則1週間以内)に LN 染色を用いて基底膜形成のある癌、ない癌の2群に分類した。退院後は決められたスケジュールに従って検査を行い、肝転移再発の最終診断は原則として画像診断で行ったが、second look operation で最終診断がついた症例も2例あった。

5. コラーゲンゲル3次元培養法による培養細胞の基底膜形成能の検討

Japanese Cancer Research Resource Bank (JCRB) より供与された13種類の癌細胞を用いてコラーゲンゲル3次元培養を行った (Fig. 2)。

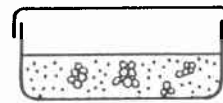
Fig. 2 Collagen gel embedded culture method

1. Collagen gel matrix

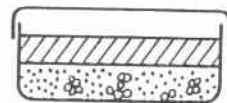
- solution A: Type I collagen
- solution B: Ham's F12
- solution C: 2.2%NaHCO3
- 0.2M HEPES (0.05N NaOH)
- A:B:C:FCS=8:1:1:1

2. Embedded culture method

- Collagen gel 1ml
- ↓ 5×10⁴~1×10⁵/ml cells



after 37°C, 10min.
overlay medium 2ml



↓ incubate 37°C, 10~16days
washed by 0.1M PBS
↓
fixed by 10% formaldehyde

6. 病理組織学的分類

大腸癌取扱い規約¹⁾に従って、各症例の病理組織学的分類を行った。

7. 有意差検定

χ²検定により、p<0.01の場合を有意差ありと判定した。

結果

1. Retrospective study

大腸癌における LN 染色性と転移との関係では、大腸癌341例中 LN 陽性は115例 (33.7%) であった。同時性異時性肝転移例は83例であり、LN 陽性は67例 (80.7%) と高率であった。局所再発、腹膜播種は24例であり、5例 (20.8%) が LN 陽性であった。一方、転移・再発のない症例は234例であり、LN 陽性は43例

Table 1 Comparison of laminin staining and metastasis

	Liver metastasis	peritoneal or local rec.	No metastasis and rec.	Total
laminin positive / cases	67 / 83	5 / 24	43 / 234	115 / 341
(positive rate)	80.7	20.8	18.4	33.7

rec : recurrence

(18.4%)であった (Table 1). 病理学的諸因子との関係で有意差は静脈侵襲にのみ認められた (Table 2). 胃癌161例では高・中分化腺癌111例中 LN 陽性は43例 (38.7%), 低分化腺癌50例では LN 陽性は 4 例

(8.0%) であり全例充実包巣型であった (Table 3).

つぎに LN 陽性部位は基底膜そのものではないかという疑問を解決するため, LN と同様基底膜成分である C IV を用いた染色を行ったところ癌腺管基底部の LN と C IV 陽性部位は一致し, LN 陽性部位は癌腺管基底膜であると考えられた (Fig. 3). この結果, LN 陽性例とは基底膜を形成している癌 (basement membrane producing cancer ; BMPC) であり, LN 陰性

Table 2 Laminin staining in colorectal cancers and clinico-pathological factors

	Laminin staining		x ₂
	(+)	(-)	
Differentiation			
well	49(43)	109(48)	NS
mod	61(53)	108(48)	
poor	5 (4)	9 (4)	
Depth of invasion			
pm	28(24)	57(25)	NS
ss. a1	45(36)	88(39)	
s. a2	34(30)	64(28)	
si. ai	12(10)	17 (8)	
Lymphnode metastasis			
n(-)	62(54)	125(55)	NS
n(+)	53(46)	101(45)	
Venous invasion			
v(-)	28(24)	112(50)	p<0.01
v(+)	87(76)	114(50)	
Lymphatic invasion			
ly(-)	34(30)	78(35)	NS
ly(+)	81(70)	148(65)	

() : %

Fig. 3 Sites which stained positive for type IV collagen (C IV) showed good correspondence to the pattern obtained for laminin (LN), indicating that LN-positive sites corresponded to basement membrane.

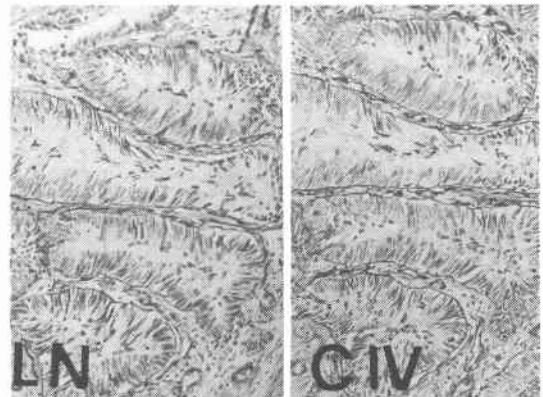


Table 3 Laminin positive rate in the gastric cancer without or with liver metastasis

Histological type	Primary lesion		Total cases
	Without liver metastasis	With liver metastasis	
Well and moderately differentiated-type	20/21	23/90	43/111
Poorly			
solid type	2/2	2/2	4/4
medullary type		0/28	0/28
scirrhous type		0/18	0/18
	23/23	25/138	47/161

例とは基底膜を形成していない癌であると考えられた。

2. Prospective study

大腸癌172例で行った prospective study ではLN陽性で基底膜形成を認めた癌46例，基底膜形成のなかった癌126例であった(Table 4)。この結果，大腸癌の基底膜形成の有無で肝転移再発を予測する study の sensitivity は89.5%， specificity は81.0%となった。

3. 株化細胞のコラーゲンゲル 3次元培養

13種類の株化細胞をコラーゲンゲル内で3次元培養

した(Table 5), LN は検討したすべての細胞で陽性であった。4種類の細胞は基底膜様構造を細胞塊周囲に形成し，この部位がLN陽性であった。その他の細胞では細胞塊周囲にLN陽性の顆粒状分泌物を認めたが基底膜様構造は形成しなかった(Fig. 4)。さらにこ

Fig. 4 In culture, COLO 201 established from cancer with liver metastasis formed basement membrane, whereas SW 837 did not.

COLO 201 SW 837

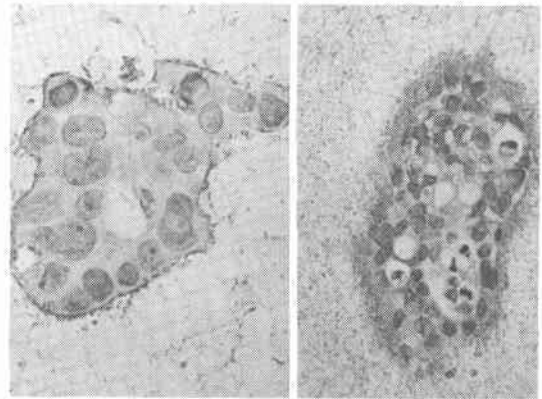


Table 4 Prospective study (1987, 1 ~1990, 3) Liver metastasis and basement membrane production

Liver metastasis	Basement membrane in primary cancer		Total cases
	(+)	(-)	
(+)	17	2	19
(-)	29	124	153
	46	126	172

Table 5 Human cell lines

Cell line	Origin (primary tumor)	Histology
COLO 201	colon	well diff. Metastases were present in the liver
COLO 320DM	sigmoid colon	poorly diff. invasive (muscle, serosal layer)
LoVo	colon	moderately well diff. established from a lymph node meta.
SW 837	rectum	poorly diff. established from a lymph node meta.
DLD-1	sigmoid colon	moderately~poorly diff.
WiDr	rectosigmoid	moderately well diff.
RCM-1	rectum	well diff.
CCK-81	colon	papillotubular. established from a lymph node meta.
C-1	colon	well diff. Metastases were present in the lung.
MKN-1	stomach	adenosquamous cell carcinoma established from a lymph node meta.
MKN-7	stomach	well diff. established from a lymph node meta.
MKN-28•6TG	stomach	well diff. established from a lymph node meta.
KATO-III	stomach	poorly diff. (signet ring cell) established from a pleural effusion.

これらの細胞にCIV染色を行ったところ、CIVは検討した細胞全例で陽性であり、陽性部位はLNと一致した。この結果、検討した癌細胞はすべてLN、CIVを分泌しており、基底膜様構造を形成する癌細胞と形成しない癌細胞が存在すること、また基底膜様構造の形成はそれぞれの癌細胞自体の性質によることが明らかになった。

考 察

結腸・直腸癌や胃癌の肝転移は予後を左右する重要な因子であり、さまざまな面から検討されてきた。病理組織学的に静脈侵襲や壁深達度が肝転移と関係が強いことが知られている。静脈侵襲と肝転移の研究では最近2つの流れがある。1つは従来からの弾性繊維染色を用いてより詳細に静脈侵襲を検討するものであり²³⁾、もう1つはLNや第Ⅷ因子を用いてより小さな静脈への侵襲を検討しようとするものである^{4)~6)}。いずれの研究もある程度の成果をあげているものの不十分である。何か別の因子が肝転移と関係しているのではないかと考えられた。

松田ら⁷⁾⁸⁾は基底膜のfibronectin(FN)が癌組織では消失していることを報告した。FNの消失が基底膜破壊に関係しており癌の浸潤に関係しているのではないかと考えた。しかしこれだけで基底膜と転移の関係を説明するには不十分であった。そこで同じ基底膜成分であるLNの検討を行った。

著者ら⁹⁾の検討では癌腺管基底膜LNのretrospective studyにおいてLN陽性例は肝転移と強い関係が認められたが、リンパ節転移や腹膜播種転移とは関係がなかった。この結果はForsterらの報告¹⁰⁾と相反するものであった。転移に関してForsterらは原発巣のLN陽性例では8/27(30%)に遠隔転移を認め、陰性例では19/23(83%)に遠隔転移を認めることからLN消失例が遠隔転移を起こしやすいとした。しかし彼らの報告には症例に偏りがあり、retrospective studyであったため、著者らは1987年よりLN染色で肝転移再発を予測するprospective studyを行った。

Studyを開始する前にLN陽性部位が基底膜そのものであるのか検討するためにCIV染色をLN染色と同時に陽性部位を検討した。この結果、LN陽性部位とCIV陽性部位は一致し、LN陽性部位は癌腺管の基底膜であると考えられた¹¹⁾。すなわち癌の基底膜はLN、CIV陽性でFN陰性である。LN陽性癌とは基底膜形成のある癌(基底膜形成癌)であると考えられた。また胃癌でも大腸癌と同様の結果が得られた。胃

癌の基底膜電成は充実包巣型であり、肝転移と関係が強かった¹²⁾¹³⁾。

Prospective studyでは術後3年経過症例でsensitivity 89.5%、specificity 81.0%と良好な結果であった。特に偽陰性症例の少なさが特徴的であった。このstudyにより基底膜形成癌が高率に肝転移することが明らかになった。現在大腸癌の肝転移再発は多数例が予測できている。

臨床的には基底膜形成癌が肝転移と強い関係があることは明らかになったが種々の問題が残っている。癌の基底膜はどのようにして造られ、正常基底膜とどのような違いがあるのか、そしてなぜ基底膜の形成のある癌が転移するのかである。

癌の基底膜がどう造られるのかを検討する目的で株化細胞を用いた検討を行った。培養にはコラーゲンゲル3次元培養を用いた。この培養法は通常の培養法と異なり細胞の伸展や扁平化を防ぎ、生体内環境に近い細胞増殖が期待できる。この結果培養細胞でも基底膜様構造物を形成する癌と顆粒状物質を認めるのみで基底膜様構造を形成しない癌が認められた。しかしLN、CIVはすべての癌に陽性であった¹⁴⁾。すなわち基底膜形成癌は自らが分泌したLNやCIVを用いてそれぞれの癌自身の性質により癌基底膜を形成するかしなが決定されると考えられた。

基底膜形成癌の肝転移はどのようにして起こるのであろうか。従来癌の進展は基底膜の破壊から始まるとされ基底膜成分の分解酵素も発見されている。またこれらの酵素は癌細胞が産生していることも証明されている。確かに基底膜形成のない癌は局所で浸潤性に発育するのである。しかし肝転移は基底膜形成のある癌と関係が強い。このことは基底膜分解酵素は癌の浸潤において議論できても転移はこれだけでは説明できないことを示している。すなわち癌の転移能の獲得は、癌の悪性度がより高まった先にあるという従来の考え方では説明がつかない。なぜならば病理学的に悪性度が高いとされる低分化腺癌ではむしろ基底膜形成能は低く、逆に高・中分化腺癌では低分化腺癌に比べ基底膜形成能が高いからである。そして前述のごとく基底膜形成のある癌は高率に肝転移するのである。このことは癌の基底膜形成能は病理組織学的な分化度とは異なる因子であることを示しているばかりか、外科医であれば誰でも経験的に知っている高分化な癌に転移が多く低分化な癌にはむしろ転移は少ないという臨床的事実の説明がされるのである。

基底膜形成癌の概念からすれば大腸癌・胃癌では癌本来の性質は浸潤能であり、転移能は正常組織が癌化する過程である形質（基底膜形成能）が残った癌に特別にそなわった性質であると考えられる。

文 献

- 1) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約，改訂第4版，金原出版，東京，1985
- 2) 稲田 潔，下川邦泰，池田庸子ほか：大腸癌の静脈侵襲に関する臨床病理学的研究，日消外会誌 21：2278—2286，1988
- 3) 白井 聡：大腸癌の肝転移に関する臨床病理学的研究，日本大腸肛門病学会誌 44：1005—1018，1991
- 4) 久保隆一：Lamininの免疫組織化学の静脈染色への応用と癌の静脈侵襲判定における意義，近畿大医誌 15：259—270，1990
- 5) 久保隆一，松田泰次，肥田仁一ほか：Lamininの免疫組織化学による癌の静脈侵襲に関する研究，日本大腸肛門病学会誌 43：172—177，1990
- 6) 諸富立寿，白水和雄，磯本浩晴ほか：大腸癌の静脈侵襲判定への第VIII因子関連抗原の応用，日本大腸肛門病学会誌 38：355—358，1985
- 7) 松田泰次，浜田 宏，安富正幸：大腸組織における酵素抗体法によるfibronectinの組織化学的研究，日消外会誌 15：1798—1806，1982
- 8) 松田泰次，安富正幸：大腸疾患とフィブロネクチン，最新医 39：2070—2075，1984
- 9) 波江野善昭：大腸癌原発巣と肝転移巣におけるlamininの局在に関する免疫組織学的検討，近畿大医誌 14：361—372，1989
- 10) Forster SJ, Talbot IC, Claiton DG 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
- 11) 肥田仁一：大腸癌基底膜におけるtype IV collagenの免疫組織学的研究，近畿大医誌 16：339—351，1991
- 12) 坂口隆啓：胃癌原発巣および転移巣におけるlamininの免疫組織学的研究，近畿大医誌 14：537—551，1989
- 13) 松田泰次，坂口隆啓，肥田仁一ほか：胃癌におけるlamininの免疫組織学的検討，日消外会誌 22：2778—2783，1989
- 14) 赤埴吉高，松田泰次：ヒト腫瘍細胞株と大腸癌組織におけるlamininの免疫組織学的研究および転移との関連，近畿大医誌 17：249—263，1992

The Basement Membrane of Colonic and Gastric Carcinoma and Liver Metastasis

Ryuichi Kubo, Masanori Kitaoka, Yoshitaka Akabane, Norikazu Machidera, Jinichi Hida,
Akira Tanaka, Katsuhisa Shindo and Masayuki Yasutomi
First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

Colonic and gastric carcinomas were studied by immunohistochemical staining of laminin (LN), a structural component of the basement membrane. High rates of liver metastasis and recurrence of liver metastasis were found in cases in which LN activity was noted in the basement membrane of cancer tissue. In addition, sites which stained positive for type IV collagen (CIV), likewise a component of basement membrane, showed good correspondence to the pattern obtained for LN, indicating that LN-positive sites corresponded to basement membrane. Prospective studies on the recurrence of liver metastasis associated with colonic cancer, performed by LN staining since 1987, indicated that the recurrence of liver metastasis was able to be predicted in a high proportion of cases. Cell culture studies were additionally performed to investigate why carcinomas with LN-positive basement membrane have a high rate of liver metastasis. In culture, some carcinomas formed basement membrane whereas other did not, but all cells elaborated LN and CIV. The foregoing results demonstrated that some carcinomas of the colon and stomach form basement membrane while others do not. Basement membrane-producing cancers (BMPC) were found to be associated with a high rate of liver metastasis.

Reprint requests: Ryuichi Kubo First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ohnohigashi, Ohsaka-sayamashi, 589 JAPAN