日消外会誌 26 (12)：2809～2815, 1993年

大腸癌における新しい癌抗原 coagulant cancer antigen 1の発現

近畿大学医学部第1外科
犬房 春彦　足立 俊之　中村 正人
進藤 勝久　安富 正幸

癌特異性抗原 coagulant cancer antigen 1 (CCA-1) はわれわれが発見した血液凝固第X因子を直接活性化する新しい serine protease である. CCA-1を認識し, その凝固活性を特異的に抑制するモノクローナル抗体 AI18抗体を用いて大腸癌および大腸腺腫における CCA-1の発現を免疫組織学的に検討し, CEA と比較検討した. 大腸癌における CCA-1の発現率は92%であり, CEA は98%であった. しかし, 注目すべきは CCA-1がすべての症例で正常大腸組織には認められなかったのに対し, CEA では72%の正常大腸粘膜にも発現が認められたことである. 大腸腺腫内癌と大腸腺腫においては, CCA-1の発現は約半数に認められた. 正常組織における CCA-1の発現は成人, 胎児ともに扁平上皮, 気管支粘液腺, 胃固有線の一部分に認められたにすぎない. その生物学的特性が明らかな CCA-1は, 大腸癌に特異性の高い新しい抗原である.

Key words: colorectal cancer, coagulant cancer antigen 1, immunohistological staining, unbalanced haemostasis in cancer, direct factor X activator

はじめに

癌患者において血液凝固活性が上昇することはよく知られており, この凝固異常は癌の転移機構に関与し, 癌末期患者に生じる播種性血管内凝固症候群 (DIC) の原因になると考えられている[1]. 癌細胞の産生する血液凝固活性物質は, 組織因子[2)~4)]および cystein protease A (CPA)[5)~7)]の報告があるにもかかわらず詳細は明らかではない. 一方, 大腸癌の関連抗原としては糖蛋白抗原 carcinoembryonic antigen (以下, CEA と略記), 糖鎖抗原 CA19-9および NCC-ST-439などがあり, 臨床的有用性が認められている[8)~10)]. 特に CEA は大腸癌患者の血液中および大腸癌組織に高率に存在するが, 現在用いられている抗 CEA 抗体を用いた免疫組織学的検討では正常大腸粘膜にも存在する[11)]. また CEA 以外の癌抗原は大腸癌患者の血中および癌部での発現率が50%以下と低値である[8)~11)].

われわれはヒト扁平上皮癌細胞株 LK52を樹立し[12)], この細胞株が血液凝固因子 factor X を直接活性化する serine protease を産生することを発見した. その serine protease を単離精製した特性よりみて, 従来の組織因子や CPA と異なることを報告してきた[13)]. また, この serine protease に対するモノクローナル抗体を作成し, この抗体がヒト癌細胞株のみに反応することよりこれを coagulant cancer antigen (以下, CCA-1と略記) と名づけた[13)]. CCA-1の発現を多臓器原発癌で検討したところ, 食道癌, 胃癌, 大腸癌などの消化器癌に高率に発現していることが明らかとなった[14)]. 抗 CCA-1抗体を用いて大腸癌における CCA-1の発現を免疫組織学的に検討したところ CCA-1は CEA と同様に高率に発現が認められ, CEA よりも癌特異性が高いことが認められたので報告する. また成人および胎児の正常組織における CCA-1の発現を検討した結果, 癌胎児性抗原とは異なる新しい腫瘍抗原であることが示唆されたので若干の文献的考察を加えた.

＜1993年7月7日受理＞別刷請求先：犬房 春彦
〒589 大阪狭山市大野東377－2 近畿大学医学部第1外科

材料および方法

1) モノクローナル抗体

1. 抗 CCA-1抗体. CCA-1抗原を認識し, CCA-1の凝固活性を特異的に抑制する AI18 (IgM) 細胞の培養上清 (抗体濃度5μg/ml) を用いた. コントロールには親株である SP2の培養上清を用いた. また AI18と同様に CCA-1抗原を認識し, 同様の特性を有する AI51 (IgG_1) 抗体についても一部の大腸癌症例で検討した.

2. 抗 CEA 抗体. 組織染色用の抗 CEA 抗体 A5 B7 (Dako, Ca, USA) を phosphate buffer saline (以

下，PBS と略記）で10倍希釈して用いた．コントロールには付属の bovin serum albumin 溶液を用いた．

2）大腸組織

近畿大学医学部第1外科で切除手術，または内視鏡的ポリペクトミーを行った大腸癌原発巣100例，大腸癌肝転移巣7例，腺腫内癌15例，腺腫11例のパラフィン包埋切片を脱パラフィン後，免疫組織染色に供した．大腸癌の stage および組織学的分類は大腸癌取扱い規約[15]に従った．大腸癌症例の内訳は stage I，20例，stage II，21例，stagd III，18例，stage IV，42例，stage V，17例であり，組織学的分類では高分化型腺癌3例，粘液癌1例である．

3）免疫組織染色

ABC kit（Vector，USA）により行った．すなわち1次抗体に上記の抗体を用い，発色は DAB で行った．DAB 発色後の核染色は Hematoxylin で行った．

CEA の大腸癌組織における染色性を高めるために，脱パラフィン後1.0mg/ml，trypsin（PBS）で37℃，30分処理を行った．

CCA-1抗原は酵素阻害剤 diisopropyl fluorophosphate（以下，DFP と略記）および $HgCl_2$でその凝固活性が制名されることより，一部の症例では組織切片を脱パラフィン後，1.0mM DFP または1.0mM $HgCl_2$で37℃，30分処理後に染色を行い，その影響を検討した．また一部の症例では CEA と同様に trypsin 処理を行い染色性への影響を検討した．

4）成人および胎児の正常組織

CCA-1抗原の正常組織における局在を検討するために，成人の正常な皮膚，肺，食道，胃，十二指腸，肝臓，膵臓，胆嚢，胆管，および胎生約10週の胎児のパラフィン包埋切片を脱パラフィン後免疫組織染色した．

5）抗原の発現程度の判定

大腸癌原発巣における CCA-1および CEA の発現程度は，組織切片の癌組織に発現が全く認められないものを陰性，発現の面積が，1/3以下のものを弱陽性，1/3から2/3のものを中等度陽性および2/3から3/3のものを強陽性と判定した．また正常大腸粘膜ではわずかでも発現の認められた症例は陽性とした．大腸癌肝転移巣においては原発巣と同様に判定した．

腺腫および腺腫内癌の症例における CCA-1の発現はどの部位にも発現の全く認められないものを陰性とし，ごく軽度でも発現の認められる症例は陽性とした．

結　果

1）大腸癌原発巣における CCA-1の発現

大腸癌における CCA-1の発現を stage 別に示す

Table 1 CCA-1 expression on colorectal cancer with immunohistological detection

Expression	(Stained cancer area)	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV	Stage V	Total
Strongly positive	(2/3—3/3)	11(55.0%)	13(62.0%)	12(66.7%)	12(50.0%)	8(47.1%)	56(56.0%)
Moderately positive	(1/3—2/3)	1(5.0%)	4(19.0%)	5(27.8%)	1(4.2%)	3(17.6%)	14(14.0%)
Weakly positive	(<1/3)	6(30.0%)	4(19.0%)	1(5.5%)	6(25.0%)	5(29.4%)	22(22.0%)
Total positive		18(90.0%)	21(100.0%)	18(100.0%)	19(79.2%)	16(94.1%)	92(92.0%)
Negative	(0)	2(10.0%)	0	0	5(10.8%)	1(5.9%)	8(8.0%)
Non specific staining		0	0	0	0	0	0
Total cases		20	21	18	24	17	100

Table 2 CEA expression on colorectal cancer with immunohistological detection

Expression	(Stained cancer area)	Stage I	Stage II	Stage III	Stage IV	Stage V	Total
Strongly positive	(2/3—3/3)	12(60.0%)	17(81.0%)	7(38.9%)	17(70.8%)	11(64.7%)	64(46.0%)
Moderately positive	(1/3—2/3)	6(30.0%)	4(19.0%)	8(44.5%)	7(29.2%)	5(29.4%)	30(30.0%)
Weakly positive	(<1/3)	2(10.0%)	0	2(11.1%)	0	0	4(4.0%)
Total positive		20(100.0%)	21(100.0%)	17(94.5%)	24(100.0%)	16(94.1%)	98(98.0%)
Negative	(0)	0	0	1(5.5%)	0	1(5.9%)	2(2.0%)
Non specific staining		14(70.0%)	13(61.9%)	14(77.8%)	19(79.2%)	12(70.6%)	72(72.0%)
Total cases		20	21	18	24	17	100

(**Table 1**). 癌部における発現はいずれの stage においても79.2%から100%と高率で，全体では92%の陽性率であった．このうち中等度以上の陽性を示したものは70%であった．正常大腸組織における CCA-1の発現はすべての症例で認められなかった．CEA では stage により94.1%から100%に発現が認められ，全体では98%の陽性率であった．しかしながら CEA では正常大腸組織での発現が72%の症例に認められ，それらのほとんどの症例が大腸粘膜における発現であった (**Table 2**)．同一症例の連続切片における CCA-1と CEA の染色性は，**Fig. 1**，**2** に示す症例では，写真右2/3の癌部分では CCA-1と CEA はその発現程度や発現面積に大きな差は認められない．しかし隣接する正常大腸粘膜では CEA が発現し，CCA-1は認められない．**Fig. 3, 4** の症例も同一症例の連続切片の染色であるが，癌が正常粘膜下に浸潤している．この症例では CEA の癌組織での発現はほとんど認められないが，CCA-1は癌組織で強い発現が認められる．この症例においても CEA は表面の正常粘膜に認められた．

CCA-1は癌細胞膜に最もつよく発現し，細胞質の中の顆粒状物質にも認められた．また一部の症例では癌細胞核にも発現が認められた(**Fig. 5**)．CCA-1の発現率や活性は，高分化型腺癌と中分化型腺癌において大きな差は認められなかった．

2) 大腸癌肝転移巣における CCA-1の発現

大腸癌肝転移症例 7 例の肝転移巣における CCA-1の発現はいずれも中等度以上の陽性であった．正常肝臓組織においても CCA-1 の発現はすべての症例で認められなかった．同様に CEA の発現も 7 例すべてに中等度以上の発現を認めた．

3) 大腺腺腫および腺腫内癌における CCA-1の発現

大腸腺腫においても CCA-1は約半数の症例で発現が認められた (**Table 3**)．大腸腺腫内癌においても

Fig. 1 Histological findings of CCA-1 expression on a colon cancer. Cancer tissue of the section was strongly stained with AI18 antibody. No reaction was observed on normal epitherial tissue. (×100)

Fig. 2 Histological findings of CEA expression on a colon cancer (same case as Fig. 1). Cancer and normal epitherial gland were strongly stained with anti-CEA antibody. (×100)

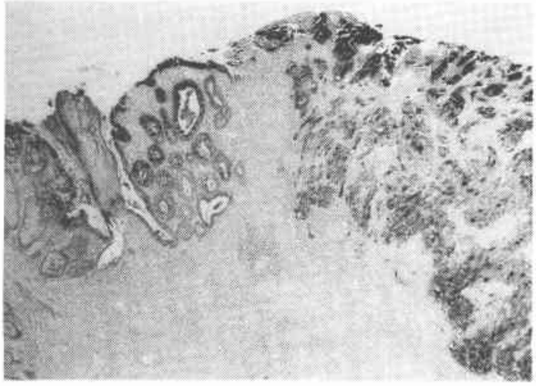

Fig. 3 Histological findings of CCA-1 expression on a rectal cancer. Cancerous tissue under the normal epithelial glands was strongly stained with AI18 antibody. (×100)

Fig. 4 Histological findings of CEA expression on a rectal cancer (same case as Fig. 3). Cancerous tissue was weakly stained and normal epithelial glands over it were also positive for CEA. (×100)

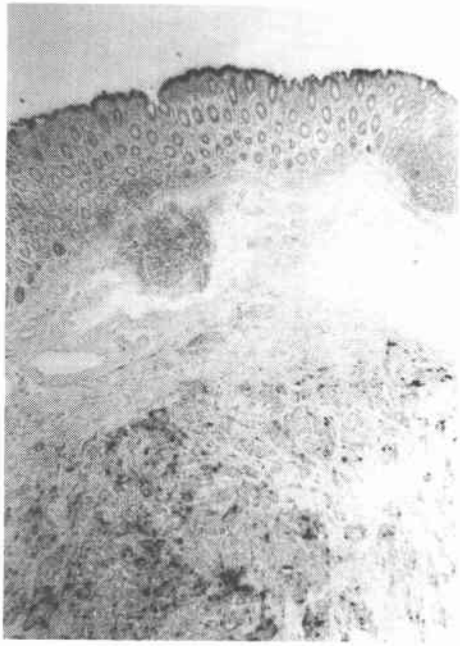

Fig. 5 Histological finding of CCA-1 expression on a colon cancer.
Cell surface, glanules of cytoplasm and some of the nuclei were stained with AI18 antibody. (×400)

CCA-1の発現は同様であり，CEA はほとんどの症例で発現が認められた．腺腫内癌における CCA-1の発現はその組織学的異型度の高い部分に局在する症例と腺腫の多くの部分に発現が認められる症例があり，その発現形式は一定ではなかった．一方，CEA の発現は，ほとんどの症例で組織学的異型度に関係なく全体に発現していた．

4）正常組織における CCA-1の発現

成人では皮膚，食道の重層扁平上皮，肺気管支の絨毛上皮と粘液腺，膵管および胃，十二指腸粘膜下層の固有腺のそれぞれ一部分に CCA-1の発現が認められた．胎児においては体表，肺気管支上皮ならびに胃上皮のそれぞれ一部分に発現が認められた．上記以外の組織では成人，胎児とともに発現は認められなかった．

5）AI18抗体と AI51抗体の大腸癌組織における反応性および酵素阻害剤の影響

20例の大腸癌組織切片での検討で，抗 CCA-1抗体 AI51は AI18抗体と全く同様の組織染色性を示した．

DFP または $HgCl_2$処理を行った大腸癌組織切片では，処理を行わなかったものと比較して AI18および AI51抗体により認識される CCA-1の発現に差は認められなかった．また Trypsin 処理による影響も認められなかった．

考　察

癌患者において，血液凝固能が亢進していることは古くから知られている[1]．癌細胞が産生する血液凝固

Table 3 CCA-1 and CEA expression on colorectal adenoma and cancer in adenoma

	CCA-1 expression		CEA expression		Total cases
	Positive	Negative	Positive	Negative	
Adenoma	8	7	14	1	15
Cancer in adenoma	6	5	11	0	11

を活性させる物質については，組織因子[1)~4)]のほかに，Gordonらによるウサギ VX2腫瘍より抽出されたCPA[5)~7)]および最近Pangasnanらにより報告されたマウス fibrosarcomaより抽出したserine proteaseの報告[16)]がみられる．とくにCPAに関しては，抗CPA抗体を用いて担癌患者の血中での抗原測定により腫瘍マーカーになる可能性が示唆されている[7)]．しかし，ヒト大腸癌を用いた検討で，大腸癌よりの抽出物中にCPAの活性が認められないという報告[17)]および大腸癌凍結切片を用いた免疫組織染色より癌細胞局所では直接的凝固活性化が認められなかったとの報告[18)]もあり一定の評価は得られていない．ヒト扁平上皮癌細胞株LK52[12)]より精製したserine proteaseは分子量11～20KDaで，その凝固活性はRussell's viper venom（RVV）と同様の限定分解であり，RVVより強い凝固活性をもつことが確認されている．その切断部位はヒト factor X heavy chainの52残塩基目Argと53残塩基目Ileの間である[13)]．また，この凝固活性は酵素阻害剤を用いた検討でDFP，Leupeptineおよび$HgCl_2$で失活する．このserine protease活性は過去に報告のある癌産生性の血液凝固活性物質のいずれとも異なり，新しいプロテアーゼである．この新しいserine proteaseを認識するモノクローナル抗体AI18（IgM）を作成し，その発現を検討したところヒト肺癌および大腸癌細胞株の80%に発現を認め，ヒト肺および大腸由来の繊維芽細胞およびマウス癌細胞株では発現を認めなかった．以上の結果よりこのserine proteaseをcoagulant cancer antigen 1（CCA-1）と名付けた[13)]．また，食道癌，胃癌，乳癌，肺癌，膵頭部癌，十二指腸乳頭癌，大腸癌を試験的にAI18抗体で免疫組織染色を行った結果56%から100%の発現率であった[14)]．

今回の大腸癌におけるCCA-1抗原の発現の検討では癌に特異的な発現が認められた．CEAでは72%の症例で正常の大腸粘膜にその発現が認められたのに対してCCA-1では大腸の正常粘膜およびその他の組織においてもその発現は認められなかった．また大腸癌におけるCCA-1の発現率も全体で92%と高率であった．CCA-1の発現は，大腸癌の進行度や組織型と関係なく発現することより，CCA-1は大腸癌全般に特異的に高く発現する抗原であることが考えられた．一方，CEAの発現率も98%と，同じ抗体を用いた他の報告[11)]よりも高かった．これはTrypsin処理により染色性が向上したためと考えられる．しかし，CEAは正常大腸粘膜で72%と高率に発現していた．近年CEAは詳細な研究が進められ，15KDaのCEAは正常大腸粘膜に多く存在することが判明しており[19)]，今回の結果は用いた抗体が15KDaのCEAも認識しているものと考えられる．

CCA-1が正常大腸腺組織で全く発現が認められなかったにもかかわらず，大腸腺腫および腺腫内癌では約半数の症例で発現が認められたことより，異型化の早期に発現することが想像されるが，この点についてはさらに詳細な検討が必要であると考えられる．

ヌードマウスで転移能の異なる肺腺癌細胞株[21)]を用いた検討で転移能の高い細胞株は低い株と比較してCCA-1の発現が強いことがすでに示されている[14)]．大腸癌肝転移巣でも全例に高い発現を認めたことより，CCA-1の発現が大腸癌転移にも関与していることが推測される．すなわち癌細胞が血液中に流出した際にCCA-1の血液凝固活性により，細胞表面でフィブリン形成が生じるとすれば癌細胞が毛細血管で着床するのに有利であろう．

CEAやCA19-9の各抗原は癌細胞の接着に関与しているとの報告があるが[21)22)]，生体内の癌細胞においての実際の機能は明らかではない．これに対しCCA-1はヒト factor Xの直接的活性化という生物学的特性があることも従来の腫瘍抗原とは異なっている．

CCA-1の凝固活性を抑制するDFP，$HgCl_2$の酵素阻害剤処理を行っても組織染色ではその発現に影響が認められなかったことより，CCA-1は安定した膜蛋白として存在するものと考えられる．また，AI18抗体はCCA-1の活性部分も認識しているが，今回の検討では活性が抑制されていてもAI18抗体はCCA-1抗原を認識できることが明らかになった．

大腸癌組織では直接的な血液凝固が認められないという報告があるが[15)]，AI18抗体はCCA-1の凝固活性を有する部分を認識していることより，生体内での大腸癌組織表面でCCA-1による血液凝固が生じているのか，またはCCA-1が膜蛋白に結合している状態ではその血液凝固活性が機能しないのかについては，今後CCA-1抗原の癌細胞膜における活性の検討が必要である．ヒト大腸癌において，組織因子やCPA以外の血液凝固活性物質の存在を確認したのは本報告が初めてである．

成人および胎児の正常組織においてはCCA-1抗原は，扁平上皮，肺上皮，胃，十二指腸上皮の一部などに発現が認められ，両者に多きな差はなかった．CCA-1抗原が胎生期に一時的に発現する可能性は否定でき

ないが，成人と胎児における局在がほとんど同一の部位であることよりCCA-1抗原は少なくともCEAやAFPなどの癌胎児性抗原といわれる癌抗原とは異なると考えられる．

正常ヒト組織におけるCCA-1の局在を認めたことより，生体内においてCCA-1が何らかのの酵素学的役割をはたしているものと考えられる．近年，A型インフルエンザウイルスやセンダイウイルスが生体内活性化されるにはfactor Xaが必要であることが明らかになっているが，ウイルス感染部位でfactor XをXaに変換する酵素はいまだ同定されていない[23)24)]．今回，正常気管支および肺胞上皮にCCA-1の局在を認めたことより，気道でのウイルス感染の活性化にCCA-1が関与している可能性が考えられた．

以上，大腸癌において新しい癌抗原CCA-1の発現を免疫組織学的に検討した結果より，CCA-1抗原はCEAやCA19-9などと異なりその生物学的特性が明らかな新しい癌抗原であり，大腸癌においてはCEAよりも癌特異性が高い抗原であることが明らかになった．ヒト大腸癌の多数の症例において血液凝固を直接活性化するセリンプロテアーゼの存在を認めたのは本報告が最初であり，大腸癌によるCCA-1の産生は癌患者で臨床的に生じる血液凝固能亢進や血管内播種性凝固症候群の一因になることが考えられた．

文　献

1) 坂井利幸：悪性腫瘍と血管外凝固．血栓止血会誌 2：451―460，1991
2) Colucci M, Giavazzi M, Alessandri G et al: Procoagulant activity of sarcoma sublines with different metastatic potential. Blood 57：773―739，1981
3) Dvorak HF, Van Dewater L, Bitzer AM et al: Procoagulant activity associated with plasma membrane vesicles shed by cultured tumor cells. Cancer Res 43：4434―4442，1983
4) Zacharski LR, Memoli VA, Rousseau SM: Thrombin-specific sites of fibrinogenin small cell carcinoma of the lung. Cancer 62：299―302，1988
5) Gordon SG, Franks JJ, Lewis B: Cancer procoagulant: A factor X activating procoagulant from malignant tissue. Thromb RES 6：127―137，1975
6) Gordon SG, Cross BA: A factor X¥activating cystein protease from malignant tissue. J Clin Invest 67：1665―1671，1981
7) Gordon SG, Cross BA: An enzyme linked immunosorbent assay for cancer procoagulant and its potential as a new tumor marker. Cancer Res 50：6229―6234，1990
8) 黒木政秀：消化器系マーカー．Oncologia 24：24―32，1991
9) 大倉久直，森谷宣晧：CEA検査．外科診療 27：341―343，1987
10) 菅野康吉，大倉久直．大腸癌の腫瘍マーカー．高山昭三 編．大腸癌．図説臨床，癌シリーズ2．メジカルビュー社，東京，1986, p38―46
11) 桐山幸三，渡辺　正，坂本純一ほか：大腸癌における1型血液型関連糖鎖抗原（Le^a, Le^b, CA19-9）の発現とその臨床的意義―CEAと対比して―．日外会誌 92：320―330，1991
12) 犬房春彦，原　聡，森　亘平ほか：凝固促進物質を産生するヒト扁平上皮癌細胞株LK52の樹立と性状．Human Cell 5：287―291，1992
13) 犬房春彦，足立俊之，鈴木基之ほか：新しい癌産生性凝固活性物質Coagulant Cancer Antigen 1（CCA-1）に対するモノクローナル抗体の作成とそのヒト癌細胞株における発現．日血栓止血会誌 4：232―236，1993
14) 犬房春彦，足立俊之，中村正人ほか：新しい癌抗原Coagulant Cancer Antigen 1（CCA-1）の多種類のヒト癌における発現．日外会誌 94：1166, 1993
15) 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
16) Pangasnan RS, Devereux D, DeCunzo LP et al: The production of a factor X activator by a methylcholanthrene-induced rat fibrosarcoma. Thromb Haemost 68：407―412，1992
17) Francis JL, El-Baruni K, Roath OS et al: Factor X-activating activity in normal and malignant colorectal tissue. Thromb Res 52：207―217，1988
18) Wojtukiewicz MZ, Zacharski LR, Memoli VA et al: Indirect activation of blood coagulation in colon cancer. Throm Haemost 62：1062―1066，1989
19) 松尾雄治：CEAに関する新知見．外科治療 68：312―319，1993
20) Inufusa H, Kojima N, Yasutomi M et al: Human lung adenocarcinoma cell lines with different lung colonization potential (LCP), and a correlation between expression of sialosyl dimeric Le^x (defined by MAb FH6) and LCP. Clin Exp Metastasis 9：245―257，1991
21) Oikawa S, Inuzuka C, Kuroki MO et al: Cell adheasion activity of non-specific cross reacting antigen (NCA) and carcinoembryonic antigen (CEA) expressed on CHO cell surface; homophilic and heterophilic adheasion. Biochem

Biophys Res Commun 164 : 39—45, 1986
22) Tyrell D, James P, Rao N et al: Structual requirements for the carbohydrate ligand of E-selectin. Proc Natl Acad Acad Sci USA 88 : 10372—10379, 1991
23) Suzuki H, Harada A, Hayashi Y et al: Primary structure of the virus activating protease from chick embryo: Its identity with the blood clotting factor Xa. FEBS Lett 283 : 281—285, 1991
24) 永井美之, 後藤　敏：古くて新しい感染論, プロテアーゼ依存性トロピズム. 蛋核酵 37 : 2775—2784, 1992

Expression of a Novel Cancer Antigen Coagulant Cancer Antigen 1 on Colorectal Cancers

Haruhiko Inufusa, Toshiyuki Adachi, Masato Nakamura, Katsuhisa Shindo and Masayuki Yasumtomi
The First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

The cancer specific antigen coagulant cancer antigen 1 (CCA-1) is a novel serine protease that has a strong potential to activate Factor X directly. The monoclonal antibody AI18, which recognizes CCA-1 and has a specific inhibitory effect on CCA-1 coagulant activity, was used for the immunohistological detection of CCA-1 on colorectal cancer tissues, and for comparison to CEA expression. CCA-1 expression on colorectal cancers was detected in 92% of the patients, while CEA was found in 98% of patients. Expression of CCA-1 on normal colorectal tissues was not observed, hence CEA was expressed in 72% of patients. Half the cases of colorectal adenoma and cancer'in-adenoma showed positive CCA-1 expression. CCA-1 expression was observed partially on squamous epithelial cells, gastric glands and bronchial mucoglands of normal adults and fetuses. CCA-1 is a novel cancer-specific antigen with well-characterized biological activity.

Reprint requests: Haruhiko Inufusa The First Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ohonohigashi, Osakasayama, 589 JAPAN