日消外会誌　27（5）：1015～1020，1994年

胃癌の進展，転移におけるプラスミノーゲンアクチベーター発現の意義

大阪市立大学医学部第1外科
前田　清　鄭　容錫　澤田　鉄二　小川　佳成
加藤　保之　久保　俊彰　小野田尚佳　新田　敦範
有本　裕一　曽和　融生

plasminogen activator（以下，PA と略記）は tissue-type PA（以下，t-PA と略記）と urokinase-type PA（以下，u-PA と略記）の2種類が存在するが，胃癌患者102例を対象に胃癌原発巣における PA の発現と臨床病理学的諸因子および予後との関係を免疫組織化学的に検討した．u-PA の発現は58例（56.9%）にみられたのに対し，t-PA の発現は22例（21.6%）のみに認められた．臨床病理学的諸因子別には肝転移症例では肝転移陰性例に比べて有意に u-PA 発現率が高かった．また，t-PA の発現率は漿膜浸潤陽性例では陰性例に比べて有意に低く，stage 別には進行癌よりも早期癌において有意に高かった．予後との関係では u-PA 発現陽性例では u-PA 陰性例に比べ，また，t-PA 発現陰性例では t-PA 発現陽性例に比べて予後不良の傾向を示した．以上より t-PA は胃癌の進行度，壁浸潤と逆相関し，一方，u-PA は癌の進展，特に血行性転移と相関し，胃癌の悪性度を反映する1つの指標となりうることが示唆された．

Key words: urokinase-type plasminogen activator, tissue-type plasminogen activator, gastric carcinoma, immunohistochemical study

はじめに

Serine protease である plasminogen activator（以下，PA と略記）は tissue-type plasminogen activator（以下，t-PA と略記）と urokinase-type plasminogen activator（以下，u-PA と略記）の2種類が存在し，plasmin 活性化を介して fibrin を分解するとされている[1)2)]．近年，これらの PA が癌細胞の進展，転移に深く関与していることが知られ，乳癌，大腸癌などをはじめとする多くの癌細胞では u-PA が分泌されていることが報告されている[3)~8)]．一方，胃癌ではむしろ t-PA が癌の進展の主役であるという報告[9)10)]もみられるが，これらの報告はいずれも組織抽出物より生化学的測定を行ったものであり，PA 抗原の組織局在に関しての検討を少ない[7)8)]．

今回，われわれは胃癌患者を対象に胃癌原発巣における t-PA および u-PA の発現と臨床病理学的諸因子および予後との関係について免疫組織化学的に検討した．

＜1994年1月12日受理＞別刷請求先：前田　清
〒545　大阪市阿倍野区旭町1－5－7　大阪市立大学医学部第1外科

対象と方法

1986, 1987年に当科にて切除された胃癌患者102人を対象とした．102例中男性は75例，女性27例で，年齢は27歳から84歳まで平均58.7歳であった．

これらの症例の切除標本を10%ホルマリン固定，パラフィン包埋の後，4μm 切片を作製し，avidin-biotin complex（以下，ABC と略記）法にて免疫組織化学染色を行った．1次抗体として u-PA は MUK-1, t-PA は PAM-1（いずれも Biopool 社製）を200倍希釈して用い，室温にて組織切片と90分間反応させた．ついでビオチン化抗マウス抗体と20分間，ABC complex とも20分間反応させた．発色は diaminobenzidine を用い，methyl green にて核染色を行った．判定は光顕的に行い，全く染色のみられないもの，あるいは散在性に染色がみられるが，特異性に問題のあるものを陰性とし，癌細胞が明らかに染色され，かつ，癌組織中の陽性範囲が10%以上のものを陽性とした．

臨床病理学的諸因子は胃癌取扱い規約[11)]に準じ，統計学的処理は χ^2 検定を用い，予後は Kaplan-Meier 法

にて算出し，一般化Wilcoxon検定にて有意差検定を行った．なお，今回の検討では組織型は胃癌取扱い規約[11]上のpapillary adenocarcinoma, tubular adenocarcinomaを高分化型（differentiated type）とし，poorly differentiated adenocarcinoma, signet ring cell carcinoma, mucinous adenocarcinomaを低分化型（undifferentiated type）として分類した．

結　果

u-PAは胃癌組織とくに最深部の癌細胞膜，細胞質において強い発現を認めたが，癌巣周囲の一部の血管内皮細胞，線維芽細胞様の間質細胞にも発現がみられた（**Fig. 1, 2A**）．これに対し，癌より離れた正常組織ではu-PAの発現がごく一部の血管内皮細胞にみられるのみであった．胃癌組織におけるu-PAの発現は58例（56.9%）に認められた．

一方，t-PAの発現も癌細胞の細胞膜，細胞質および血管内皮の両者に認められたが（**Fig. 2B**），102例中t-PA陽性症例は22例（21.6%）のみであった．

癌細胞中のu-PA，t-PAの発現の相関をみると，t-PA陽性例22例中16例がu-PAも陽性を示し，t-PAのみが発現していた症例は6例のみであった．同一症例の連続切片における検討でもt-PAのみを産生している癌細胞はまれでu-PAも産生していることが多く，また，u-PAの発現範囲が広範囲にみられる症例ほどt-PAの発現は減弱していた（**Table 1**）．

PAの発現と臨床病理学的諸因子との関係では，組織型別にはu-PA, t-PAともに高分化型のほうが低分化型よりも高い陽性率を示したが，有意差はなかった．壁深達度別には壁深達度が増すにつれ，u-PAの発現率が高くなる傾向がみられた．t-PAの発現率は漿膜浸潤陽性例では陰性例に比べて有意に（$p<0.05$）低く，深達度がm, smの症例では28.1%，pm, ssの症例では30.7%であるのに対し，se, seiの漿膜浸潤例では43例中わずか4例（9.3%）に発現がみられるのみであった．

Table 1　Correlation between expression of u-PA and t-PA in cancer cells

		u-PA	
		positive (n=58)	negative (n=44)
t-PA	positive (n=22)	15.7* (16/102)	5.9 (6/102)
	negative (n=80)	46.8 (42/102)	31.6 (38/102)

*：%

Fig. 1　Microscopic findings of u-PA in gastric carcinoma. u-PA positive cells were mainly distributed at the bottom of the tumor invasion（×100）.

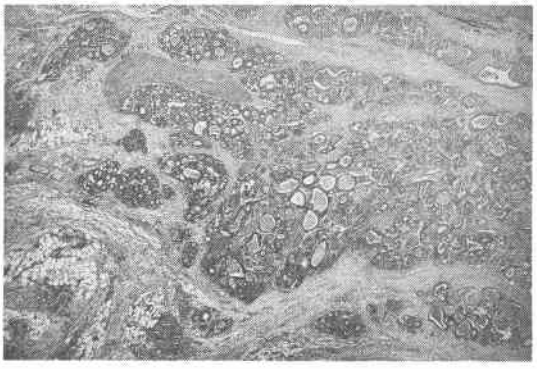
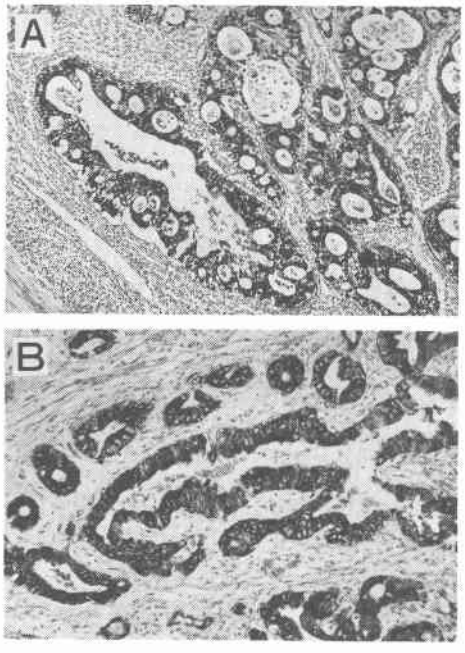


Fig. 2　Immunohistochemical staining of PA. A：Expression of u-PA, B：Expression of t-PA. Expression of PA（both u-PA and t-PA）were observed in the cytoplasm or the apical portion of cancer cells（×400）.



た．脈管侵襲との関係をみるとリンパ管侵襲の有無とPAの発現率との間には相関関係は認められなかったが，静脈侵襲陽性例では57例中41例，71.9%と高率にu-PAの発現がみられたのに対し，陰性例での発現率は37.8%（17/45）にすぎず，静脈侵襲陽性症例では有

意にu-PAの発現が高率にみられた（p<0.025）.

ついで，他臓器転移との関係について検討した．リンパ節転移陽性例，腹膜転移陽性例では転移陰性例に比べて，いずれもu-PA発現率は高く，t-PAの発現率は低くなる傾向がみられたが，有意差はなかった．しかし，肝転移症例では10例すべてにu-PAの発現がみられたのに対し，肝転移陰性例ではu-PA発現率は52.2%（48/92）にすぎなかった．肝転移を有する症例では肝転移陰性例に比較して有意にu-PAの発現率が高かった（p<0.025）.

組織学的進行度別にu-PA，t-PAの発現率をみるとu-PAの発現と進行度との間には明らかな相関関係はみられなかったが，t-PAはstage I, IIの比較的早期の症例では48例中17例（35.4%）に発現がみられたのに対し，stage III, IVの進行例では54例中5例（9.3%）にのみt-PAの発現がみられ，stageの進行した症例よりも早期癌においてt-PAの発現が有意に（p<0.05）高頻度に認められた（**Table g**）.

さらに，u-PA, t-PAの発現の組み合わせから症例を4群に分け，臨床病理学的所見と比較検討した．組織型，脈管侵襲，リンパ節転移の有無についてはこれら4群間には明らかな差は認めなかった．壁深達度別にはu-PA陽性，t-PA陰性症例では漿膜浸潤例が54.3%（23/42）と他の3群よりも高値であり，u-PA, t-PAともに陽性の群よりも有意（p<0.05）にse, seiの症例が多かった（**Fig. 3**）．また，他臓器転移のうち肝転移についても，やはり，u-PA陽性，t-PA陰性群では42例中9例（21.4%）に肝転移がみられ，他の3群よりも有意に（p<0.01）高値を示した（**Fig. 4**）．さらに深達度別に肝転移率を比較してもu-PA陽性かつt-PA陰性群ではse, sei症例において他の3群よりも有意に（p<0.05）肝転移率が高かった．（**Table 3**）．組

Table 2 Correlation between clinicopathological factors and the expression of PA

		Number of patients (%)	
		u-PA(+)	t-PA(+)
Histologic type			
differentiated	(n=43)	28(65.1)	13(30.2)
undifferentiated	(n=59)	30(50.8)	9(15.3)
Depth of invasion			
m, sm	(n=32)	15(46.9)	9(28.1)
pm, ss	(n=26)	16(61.5)	8(30.7) *
se, sei	(n=43)	26(60.5)	4(9.3) *
Lymphatic invasin			
negative	(n=37)	19(51.4)	10(27.0)
positive	(n=65)	39(60.0)	12(18.5)
Venous invasion			
negative	(n=45)	17(37.8) **	10(22.2)
positive	(n=57)	41(71.9) **	12(21.1)
Lymph node metastasis			
negative	(n=43)	20(46.5)	13(30.2)
positive	(n=59)	38(64.4)	9(15.3)
Liver metastasis			
negative	(n=92)	48(52.2) **	21(22.8)
positive	(n=10)	10(100) **	1(10.0)
Peritoneal metastasis			
negative	(n=89)	49(55.1)	21(23.6)
positive	(n=13)	9(69.2)	1(7.7)
Stage			
I, II	(n=48)	25(52.1)	17(35.4) *
III, IV	(n=54)	33(61.1)	5(9.3) *

*；p<0.05　**；p<0.025

Fig. 3 Correlation between depth of invasion and the expression of PA.

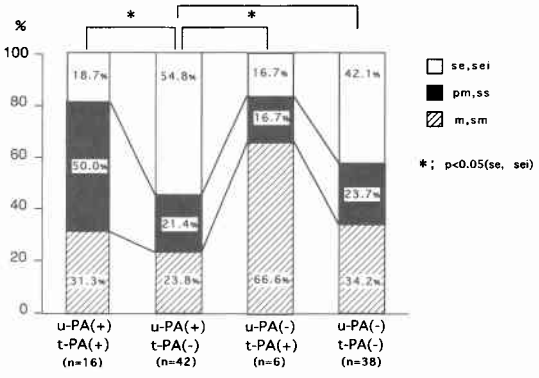


Fig. 4 Correlation between liver metastasis and the expression of PA.

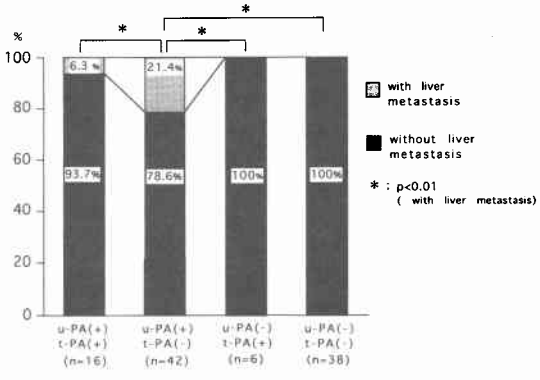


Table 3 Percentage of liver metastasis according to the expression of PA and the depth of invasion

	Depth of invasion			
	m, sm	pm, ss	se, sei	
u-PA(+)t-PA(−) (n=42)	0 (0/10)	22.2 (2/9)	30.4 (7/23)	$p<0.05$
Other groups (n=60)	0 (0/22)	0 (0/17)	4.8 (1/21)	

Fig. 5 Correlation between tumor stage and the expression of PA.

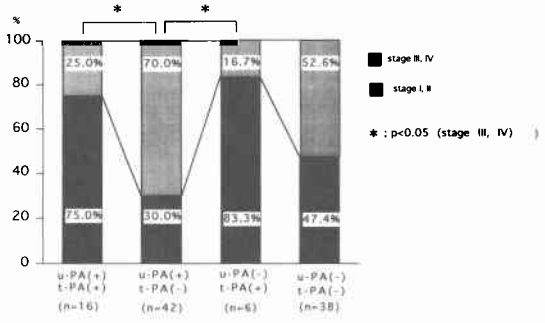
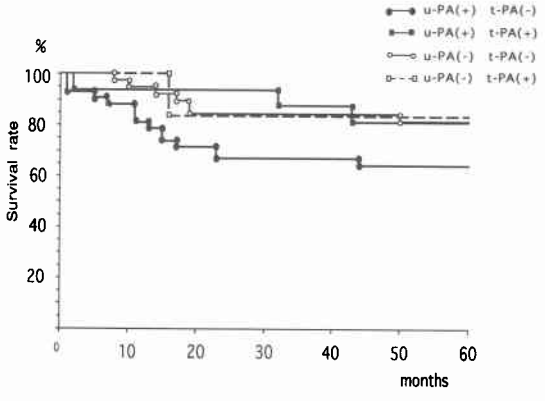


Fig. 6 Survival rate after curative resection.



織学的進行度についても u-PA 陽性，t-PA 陰性群では stage III, IV の進行癌が高頻度に認められた（**Fig. 5**）.

102例中86例に対し，治癒切除が施行されたが，この治癒切除症例86例について PA の発現と予後との関係について検討した．u-PA 発現陽性症例では u-PA 陰性症例に比べ，また，t-PA 発現陰性例では t-PA 発現陽性例に比べて予後不良の傾向を示したが，いずれも有意差はなかった．u-PA, t-PA の組み合わせからも予後を検討したが，u-PA 陽性，t-PA 陰性群の5年生存率は66.7%と他の群よりも予後不良の傾向を示したが，有意差は認めなかった（**Fig. 6**）.

考　察

PA は serine protease の一種であり，plasminogen を plasmin に活性化させる[1)2)]．近年，癌組織中 PA 活性が癌の進展，転移に関与していることが指摘されているが[3)~10)]，今までの報告は PA 活性を組織抽出物を用い，RIA 法や EIA 法で測定しているため，癌細胞のみならず，正常細胞，血管，血液中に存在している PA の総量を検討したものであり，組織中 PA の発現を検討した報告はきわめて少ない．

u-PA は分子量55,000の糖蛋白であり，生理学的に広く上皮細胞，非上皮細胞に分布し，線溶酵素として血栓を溶解するだけでなく，cell migration や tissue degradation に関与するとされている[12)13)]．また，u-PA は乳癌，大腸癌をはじめとする，多くの腫瘍細胞から分泌され，plasmin のみならず，type IV collagenase の活性化を介し，細胞外 matrix や基底膜を破壊することが報告されている[3)~7)]．乳癌[8)~5)]，大腸癌[6)7)]などでは癌組織中の u-PA 活性が正常組織よりも高く，癌組織中の u-PA 活性が臨床的悪性度と相関するという報告がみられるが，今回の胃癌を対象とした検討でも壁深達度が増すにつれ，u-PA の発現が高頻度にみられ，また，stage III, IV の進行癌では stage I, II の比較的早期の症例に比べて有意差はないものの u-PA 発現率が高くなる傾向を認めた．また，肝転移症例では肝転移陰性例と比較して，また，静脈侵襲を有する症例では静脈侵襲を認めない症例に比べて有意に u-PA 発現率は高値を呈しており，胃癌組織中の u-PA の発現と癌の悪性度とくに血行性転移と相関することが示唆された．

一方，t-PA は分子量75,000の糖蛋白で主に血管内皮に分布し，血管内に放出され，血管内の micro fibrin の分解に関与するとされている[12)13)]．近年，肺癌，乳癌などの腫瘍細胞にも t-PA の産生能があることが明らかにされ[14)15)]，今回の免疫組織学的検討でも t-PA は血管内皮のみならず，低頻度ながらも癌細胞に発現がみられた．t-PA 発現症例では漿膜浸潤を認めることはまれで，stage 別にも比較的早期の症例が多かった．

以上のように同じ PA でも u-PA と t-PA では構造，生化学的作用など多くの点で差がみられるが，今回の検討ではそれらの発現と臨床病理学的諸因子との間にも全く異なる結果が得られ，u-PA は胃癌の進展，

特に血行性転移と「正」の相関を示すのに対し，t-PAは組織学的進行度，壁浸潤とは「負」の相関関係が認められた．一方，丁ら[9]，西野ら[10]は胃癌の進行とともにt-PA活性が高くなり，胃癌の進展の主役はt-PAであると報告しているが，これは組織抽出物におけるPA活性を測定したものであり，癌組織だけでなく，周囲の正常範囲，血管内皮および血液中に存在するt-PAを測定したため，われわれとは逆の結果となったのではないかと思われた．

PAが実際にどのように癌細胞の浸潤，転移に関与しているかは不明な点ば多いが，一般的にはu-PAにより活性化されたplasmin, type IV collagenaseが細胞外matrixや基底膜を破壊し，癌の進展に有利な環境を作り出すと考えられている[3)~8)]．さらに最近ではu-PAの構造の一部が細胞増殖因子として働くこと[16)17)]，また，u-PAが血管新生を誘導する因子であり，腫瘍血管の増生にも重要な役割を演じることが報告され[18)19)]，癌の浸潤，転移との関係において注目されている．今回のわれわれの検討では癌部より離れた正常組織ではu-PAの発現は一部の血管内皮細胞にみられるのみであったのに対し，癌組織中では最深部の癌細胞のみならず，周囲の間質細胞にもu-PAの発現が認められた．このことから癌細胞が周囲の間質細胞との相互作用により周囲組織に浸潤していくことが示唆された．また，u-PAの発現が広範囲にみられる症例ではt-PAの発現が減弱していることが多く，さらにu-PA陽性かつt-PA陰性の症例ではその他の症例よりも進行癌が高率に認められたことより，癌組織中のt-PAの発現は癌の進行とともに減弱，消失し，これに対し，u-PAの発現は逆に増加していく可能性が示唆された．また，u-PA, t-PAともに陰性である症例ではu-PA陽性かつt-PA陰性の症例についで進行した症例が多かったが，このことより，胃癌の進展にはPAだけでは説明できないさまざまなfactorが関与していることが示唆され，u-PA, t-PAいずれも陰性である症例ではPA以外の他のfactorが影響を及ぼしている可能性があると思われた．

予後との関係ではDuffyら[3)]，Foekensら[5)]は乳癌組織中のu-PA活性を測定し，u-PAが高値を示す症例ではu-PA低値群に比べて有意に予後不良であったと報告している．今回のわれわれの検討でもu-PAを発現している症例ではu-PA発現陰性症例に比較して予後不良の傾向がみられたが，有意差は認められなかった．一方，t-PAの発現と予後との関係では逆にt-PA陽性例のほうがt-PA陰性例よりも予後良好な傾向を示した．

最近，plasminogen activator inhibitor（以下，PAIと略記）が一部の癌細胞で分泌されることが明らかにされ，PAIが癌の進展に抑制的に働く可能性もあることが報告されており[20)21)]，予後を検討するうえで今後PAIも含めた検討が必要であると思われた．

今回の免疫組織化学染色を用いたretrospectiveな検討ではt-PAは胃癌の組織学的進行度および壁浸潤と「負」の相関を示した．一方，u-PAは癌の進展，特に血行性転移と相関し，胃癌の悪性度を反映する1つの指標となりうることが示唆された．

文　献

1) Saksela O, Rfkin DB: Cell associated plasminogen activator-regulation and physiological functions. Ann Rev Cell Biol 4：93—126, 1988
2) 居石克夫：癌の転移とプロテアーゼ—凝固線溶系を中心に．最新医 43：795—799, 1988
3) Duffy MJ, Reilly D, Sullivan CO et al: Urokinase-plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. Cancer Res 50：6827—6829, 1990
4) 芝　英一，小林哲郎，弥生恵司ほか：乳癌組織中の線溶系酵素とそのインヒビターの定量．日外会誌 93：109, 1992
5) Forekens JA, Schmitt M, Patter WLJ et al: Prognostic value of u-PA in 671 primary breast cancer patients. Cancer Res 52：6101—6105, 1992
6) Nishino N, Aoki K, Tokura Y et al: The urokinase type of plasminogen activator in cancer of digestive tracts. Thromb Res 50：527—535, 1988
7) Kogha S, Harvey SR, Weaven RM: Localization of plasminogen activators in human colon cancers by immno peroxidase staining. Cancer Res 45：1787—1796, 1991
8) 東山聖彦，土井　修，児玉　憲ほか：非小細胞肺癌組織におけるプラスミノーゲンアクチベーターの発現に関する免疫組織学的検討．肺癌 31：309—317, 1991
9) 丁　聖民，川井啓市，丁　農民ほか：胃癌および大腸癌組織におけるプロテアーゼ活性の発現．日消病会誌 87：1678—1685, 1990
10) 西野暢彦，中村昌樹，青木克憲ほか：消化器癌転移におけるPlasminogen activatorの役割．日消外会誌 24：1096—1100, 1991
11) 胃癌研究会：胃癌取扱い規約．改訂第11版．金原出版，東京，1985

12) 松尾　理：プラスミノーゲンアクチベター．医のあゆみ　160：639—643，1992
13) 高橋　敬：ウロキナーゼと受容体．医のあゆみ　160：654—659，1992
14) Sappino AP, Bussi N, Belin D et al: Increase of urokinase-type plasminogeb activator gene expression in human lung and breast carcinomas. Cancer Res 47：4043—4046，1987
15) Heidtmann HH, Hofmann M, Jacob E et al: Synthesis and secretion of plasminogen activators and plasminogen activator inhibitors in cell lines of different groups of human tumors. Cancer Res 49：6960—6965，1989
16) Apella E, Robinson EA, Ullrich SJ et al: The receptor-binding sequence of urokinase. J Biol Chem 262：4437—4440，1987
17) Ballance DJ, Marshall JM, Cottinghams IR, et al: A hydrid protein of urokinasegrowth-factor dommain and PA1 type 2 inhibits urokinase activity and binds to the urokinsase inhibitor. Eur J Biochem 27：177—183，1992
18) Yasunaga C, Nakashima Y, Sueishi K: A role of fibrinolytic activity in angiogenesis. —Quantitative assay using in vitro method. Lab Invest 61：698—704，1989
19) 佐藤靖史：プラスミノーゲンアクチベーターと血管新生．臨病理　92：155—165，1993
20) 田中順也：胃癌及び大腸，直腸癌の癌組織中における plasminogen activator inhibitor-1．近畿大医誌　15：195—207，1990
21) Simiyoshi K, Serizawa K, Urano T et al: Plasminogen activator system in breast cancer. Int J Cancer 50：345—348，1992

Immunohistochemical Analysis of Plasminogen Activators in Gastric Carcinoma

Kiyoshi Maeda, Yong-Suk Chung, Tetsuji Sawada, Yoshinari Ogawa, Yasuyuki Kato, Toshiaki Kubo, Naoyoshi Onoda, Atsunori Nitta, Yuichi Arimoto and Michio Sowa
First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

The expression of tissue-type and urokinase-type plasminogen activators was examined in 102 cases of gastric carcinoma, using an immunohistochemical method with specific monoclonal antibodies. Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) was detected in 58 cases (56.9%), whereas the expression of tissue-type plasminogen activator (t-PA) was seen in cancer cells of only 22 cases (21.6%). The positive rate for u-PA was significantly higher in patients with liver metastasis than in those without liver metastasis. On the other hand, t-PA positivity decreased as tumor invasion became deeper and the positive rate for t-PA also became lower as the histologic stage increased. In relation to prognosis, patients with u-PA positive or t-PA positive or t-PA negative tumors tended to have a worse prognosis than those with u-PA negative or t-PA positive tumors. Our findings suggest that the expression of plasminogen activators is associated with tumor progression and that u-PA may be a predictive indicators of malignant potential in gastric carcinoma.

Reprint requests: Kiyoshi Maeda　First Department of Surgeyr, Osaka City University Medical School
1-5-7 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545 JAPAN