日消外会誌　27 (10)：2308～2311，1994年

特集10

細胞接着分子NCAMとDCC癌抑制遺伝子

岡山大学医学部第1外科
平本　孔彦　合地　明　片岡　正文　岡林　孝弘
山田　隆年　嶋村　廣視　買原　彰彦　丸尾　幸喜
剱持　雅一　折田　薫三

直腸癌の神経浸潤と深い関わりを持つ神経接着分子neural cell adhesion molecule（NCAM）について，臨床病理学的な面から免疫組織染色法にて検討し再発形式の予測をした．また，高い相同性を有する癌抑制遺伝子の1つであるdeleted in colorectal carcinoma（DCC）遺伝子についてreverse transcription-polymerase chain reaction（RT-PCR）法にて大腸癌の各占居部位別変異率を検索し，NCAMとの相関性を合わせて検討した．大腸癌ではNCAMは組織学的進行度と無関係に約40％の発現率を認め，直腸癌では中分化型に高い陽性率61％を示した．各占居部位別DCC遺伝子変異は対象症例がまだ少ないため明確には言えないが右半結腸部の方が高い傾向を示した．また，DCC遺伝子異常はリンパ節転移のみと高い相関性を認めた．NCAM発現とDCC遺伝子異常とに有意な相関性は認めなかったものの，NCAM陰性DCC遺伝子異常症例に肝転移が多い傾向を示した．

Key words：neural cell adhesion molecule, deleted in colorectal carcinoma, local recurrence and distant metastasis in colorectal cancer

はじめに

大腸癌の中でも直腸癌においては術後の排尿排便障害を考え，自律神経温存の立場から側方郭清縮小傾向が進められている．しかし，我々の研究では直腸癌症例の約27～32％に神経浸潤を認めている[1]ことを考えると骨盤腔内局所再発の危ぐは残る．また，神経浸潤を認めた癌細胞は神経周膜内を連続的に進む独特な経路をたどることから，リンパ・血行性転移に次ぐ第3のルートとして考えられている．今回我々は癌細胞に発現するneural cell adhesion molecule（以下，NCAMと略記）に注目し，神経親和性の特徴から直腸癌の神経浸潤との関係を検討し，特に最近その構造式との類似性がいわれ細胞接着分子としての働きが論議されているdeleted in colorectal carcinoma（以下，DCCと略記）癌抑制遺伝子異常との相関性について調べ，大腸癌の転移再発形式の予測ならびに治療方針の選択について検討したので報告する．

＊第43回日消外会総会シンポ1 (1)・再発，浸潤形式からみた消化器癌に対する治療の工夫―消化管
＜1994年7月6日受理＞
別刷請求先：平本　孔彦
〒700　岡山市鹿田町2－5－1　岡山大学医学部第1外科

対象および方法

1．組織材料

当科並びに関連施設で切除された大腸癌131例（結腸癌40例，直腸癌91例），大腸癌新鮮凍結標本44例，大腸癌転移巣新鮮凍結標本10例（肝再発8例，局所再発2例）を対象とした．大腸癌131例の性別は，男性87例，女性44例，年齢は41歳から88歳，平均69.2歳であった．大腸癌新鮮凍結標本44例の性別は，男性31例，女性13例，年齢は35歳から86歳，平均66.3歳であった．なお，大腸癌の組織学的分類は大腸癌取扱い規約に準じた[2]．

2．免疫組織染色

抗NCAM抗体（CHEMICON社）を使用し，avidin-biotinylenzyme complex method（以下，ABC法と略記）による免疫組織染色を行った．ABC kitは，Vectastain ABC kit（Vector社）を用い，発色にはVectastain DAB基質kit（Vector社）を用いた．その後，ヘマトキシリンにて核染色を行った．

3．染色の判定

染色の判定は，癌組織の10％以上の発現を陽性とし，神経浸潤判定は神経周膜の内側に癌細胞を認めたものを陽性と判定した．

4. Reverse transcription-polymerase chain reaction(以下，RT-PCR と略記)法による DCCmRNA 発現異常の解析

−80°Cに凍結保存し，AGPC (acid guanidium thiocyanate-phenol-chloroform) 法にて抽出した mRNA から cDNA を合成し，プライマーC1, C2 (C1：5′-CTGGCTCAATTATTAGTCGG-3′, C2：5′-TCGGGAGTCACCTGGGATT-3′)[3]を用いて PCR を行い得られた産物を電気泳動し DCCmRNA 異常を確認した．

5. 統計学的処理

統計学的処理には χ^2検定を行い，$p<0.05$を有意と判定した．なお，生存率の算出は Kaplan-Meier 法で行った．

結　果

1. 大腸癌の NCAM 陽性率

大腸癌131例中53例40%に NCAM 発現を認め，うち結腸癌40例中17例42%，直腸癌91例中36例40%陽性を認めた (**Table 1**)．

2. 大腸癌の各病理組織型における NCAM 陽性率

結腸癌において高分化では 8 例中 3 例38%，中分化では32例中14例44%の NCAM 発現を認めた．一方，直腸癌において高分化では47例中13例28%，中分化では36例中22例61%，低分化では 8 例中 1 例13%の NCAM 発現を認めた．直腸癌では中分化型に NCAM 陽性率を高率に認めた (**Table 2**)．

3. 直腸癌の臨床病理学的因子・病理学的因子と神経浸潤との関係

Stage, location, depth のおのおのについて相関性は認めなかったものの location(Rs, Ra, Rb)で約34%の神経浸潤陽性を認め，depth は pm 以深に神経浸潤陽性を認めた．

4. 直腸癌の神経浸潤と NCAM 発現との関係

直腸癌の神経浸潤陽性例の73%に NCAM 発現陽性を認め両者間に有意な相関を認めた ($p<0.01$, $\chi^2=10.088$)．

5. 大腸癌の組織学的進行度と NCAM 発現

組織学的進行度と NCAM 発現とには相関は認めなかった (**Table 3**)．

6. 大腸癌の占居部位別 DCCmRNA 発現異常率

DCC 遺伝子異常は盲腸で 3 例中 2 例67%，上行結腸 7 例中 6 例86%，横行結腸 3 例中 3 例100%，下行結腸 4 例中 3 例75%，S 状結腸11例中 6 例55%，直腸16例中10例63%を認めた (**Fig. 1**)．

Table 1 Frequency of NCAM expression in colorectal cancers

	NCAM experssion		Total
	(+)	(−)	
Colon Cancers	17 (42%)	23 (58%)	40
Rectal Cancers	36 (40%)	55 (60%)	91

Table 2 Frequency of NCAM expression in histologic type of colorectal cancers

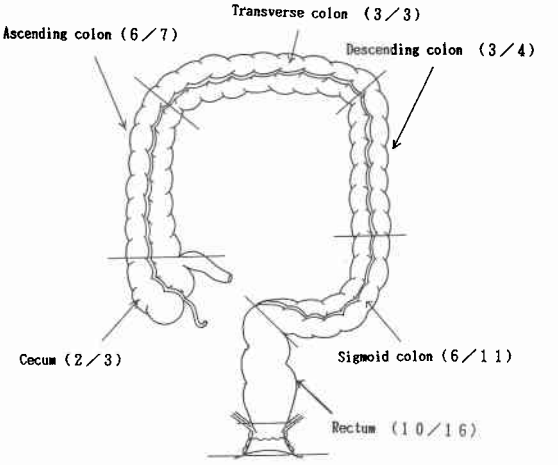
		NCAM expression		Total
		(+)	(−)	
Colon cancers	1. Well*	3(38%)	5	8
	2. Moderately**	14(44%)	18	32
	3. Poorly***	0(0%)	0	0
Rectal cancers	1. Well*	13(28%)	34	47
	2. Moderately**	22(61%)	14	36
	3. Poorly***	1(13%)	7	8

*Well : Well differentiated adenocarcinoma
**Moderately : Moderately differentiated adenocarcinoma
***Poorly : Poorly differentiated adenocarcinoma

Table 3 Correlation between NCAM expression and histological stage

		Stage I	II	III	IV	V	Total
NCAM	(+)	4	15	14	5	15	53
	(−)	23	11	9	19	16	78

Fig. 1 Frequency of DCC gene mutation in each location of colorectal cancers



7. DCC 遺伝子異常とリンパ節転移との関係

大腸癌44例中 DCC 遺伝子異常をきたした30例中24例80%にリンパ節転移陽性を認め両者に有意な相関を認めた（$p<0.01$, $\chi^2=14.158$）.

考　察

大腸癌症例の増加に対し，手術の根治性と患者の quality of life（以下，QOL と略記）はある面で相反する状況を作る．特に直腸癌における患者の QOL を考え神経温存術式を進める点において局所再発の危ぐは今回の検討でますます残る．

リンパ行性，血行性につぐ第3の転移ルートとして神経浸潤が考えられ，それによる局所再発の心配から術式の選択には難しい点がある．そこで，外科治療の上で癌細胞のもつ特性を神経親和性を有する NCAM についてどの程度癌細胞に発現し，神経浸潤との関連があるのか検討した．NCAM は，1977年 Edelman ら[4]が抽出した神経と筋肉とのシナプス形成に関与する糖蛋白であり，神経原基由来以外の腫瘍細胞でも発現してくることが言われている[5]．今回我々の研究でも組織学的に神経浸潤が確認できた症例と癌細胞産生 NCAM 発現とに有意な相関を認め，これは局所浸潤再発とこうした接着分子とが深くかかわっていることを示唆している．NCAM 発現の有無のみで見れば，生存率の検討から陽性症例が予後不良であるが遠隔転移の有無でみれば NCAM 陰性例に肝転移が多い傾向を示した[1]．特に最近，構造式の相同性から注目された接着分子として働くこと[6]がいわれている DCC 遺伝子について今回あわせて NCAM との関連について調べたが，統計上有意な相関は認めなかったものの，NCAM 強陽性・DCC 正常発現症例は局所再発を，NCAM 陰性・DCC 遺伝子異常症例は肝転移が多い傾向を認めた．また，DCC 遺伝子ついては，リンパ節以外の病理学的因子との相関性は認めなかったもののリンパ節転移とは高率に相関し，やはり転移の一因をなす癌抑制遺伝子と思われた．Fearon ら[7]によって単離された DCC 遺伝子は我々の検討でも大腸癌原発巣で約70%，転移巣で100%変異を認め，今回は NCAM との明確な相関は認めなかったもののいまだ症例も少ないこともあり，今後症例を増やしより詳しいデーターをだすつもりである．NCAM との関係を含め，他の相同性がいわれている接着分子についても調べていきたいと思う．

文　献

1) 釼持雅一，合地　明，丸尾幸喜ほか：直腸癌における NCAM の発現と神経浸潤および転移形成について―抗 NCAM (neural cell adhesion molecule：神経接着分子)抗体による検索―．日外会誌 **2**：66―70，1994
2) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約．改訂第5版．金原出版，東京，1994
3) Fearno ER, Cho KR, Nigro JM et al: Identification of a chromosome 18q Gene that is altered in colorectal cancers. Science **247**: 49―56, 1990
4) Edelman GM: Cell Adhesion Molecule. Science **219**: 450―457, 1983
5) 釼持雅一：膵癌の神経浸潤と神経特異抗原および神経接着分子．日消外会誌　**23**：2580―2585, 1990
6) 石丸悟正，横田　淳：接着分子構造をもつ癌抑制遺伝子 DCC．実験医　**11**：2163―2167，1993
7) Fearon ER, Vogelstein B: A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell **61**: 759―767, 1990

Neural Cell Adhesion Molecule (NCAM) and Deleted in Colorectal Carcinomas (DCC) Tumor Suppressor Gene

Yoshihiko Hiramoto, Akira Gouchi, Masafumi Kataoka, Takahiro Okabayashi, Takatoshi Yamada, Hiroshi Shimamura, Akihiko Kaihara, Yukinobu Maruo, Masaichi Kenmotsu and Kunzo Orita

First Department of Surgery, Okayama University Medical School

We examined neural cell adhesion molecule (NCAM), which is concerned with the neural invasion of rectal cancers, by an immunohistochemical staining method in clinicopathology and estimated the route of recurrence. The DCC gene, a tumor suppressor gene, showed high homology with NCAM. We examined the relationship between the DCC gene and NCAM by the RT-PCR method and investigated the rate of DCC mutation in various locations of colorectal cancer. NCAM expression was not related to histological stage, and was found in 40% of colorectal cancers and 61% of moderately differentiated rectal cancers. We could not elucidate the relationship between DCC gene mutation and the location of

colorectal cancers due to the limited number of cases of colorectal cancer, but DCC gene mutation occurred more often on the right side of the colon than the left. DCC gene mutation was significantly related to lumph node metastasis but not to NCAM expression. Cases of negative NCAM expression and decreased DCC tended to show liver metastasis.

Reprint requests: Yoshihiko Hiramoto First Department of Surgery, Okayama University Medical School
2-5-1 Shikata-cho, Okayama, 700 JAPAN