日消外会誌　28（3）：673～678，1995年

Prostaglandins，c-erbB-2およびploidyよりみた大腸癌肝転移能の検討

福島県立医科大学第2外科学講座，大原総合病院外科*

吉田　典行　　金沢　匡司　　水沼　　廣　　渡辺　文明
菊地　洋一　　佐藤　久芳　　安藤　善郎　　竹内　真一*
土屋　敦雄　　阿部　力哉

遠隔転移のない大腸癌44例と，同時性肝転移を有する大腸癌11例の計55例についてprostaglandin（以下，PGと略記）をDCC（Dextran-coated charcoal）法にて測定し，癌細胞核DNA ploidy patternをホルマリン固定パラフィン包埋標本より測定した．また，c-erbB-2染色をABC（Avidin-biotin peroxidase complex）法にて行い，これらおのおのの関連性ならびにこれらが悪性度の指標となりうるかどうかを検討した．肝転移陽性例と陰性例におけるc-erbB-2染色陽性率には統計的有意差は認めなかった．またc-erbB-2染色陽性例の平均DI（DNA index）は染色陰性例より高い傾向を認め，c-erbB-2発現が悪性度の1つの指標となりうる可能性が示唆された．肝転移陽性例およびc-erbB-2染色陽性大腸癌のPGE_2ならびにPGD_2濃度は，肝転移陰性例および染色陰性例大腸癌の濃度よりそれぞれ有意に低く，これらPGsが肝転移に対し抑制的に働いている可能性が示唆された．

Key words：prostaglandin E_2，prostaglandin D_2，c-erbB-2，hepatic metastasis of colon cancer

はじめに

Prostaglandin（以下，PGと略記）が1935年von Eulerにより発見されて以来，種々のPGが見いだされ，それぞれの生理活性や作用について多くの報告がなされるようになった．

1976年Santoroら[1)~3)]がin vivoおよびin vitroにてPGEシリーズが抗腫瘍効果を有することを報告後，PGsと，癌のイニシィエーション，プロモーションおよび腫瘍細胞の転移とのかかわりについても論じられるようになってきている．

c-erbB-2はヒトの第17番染色体q21領域にマップされ，185KDのチロシンキナーゼ活性を持つ受容体型の糖蛋白質で，その遺伝子増幅や過剰発現が腺癌で高頻度に認められるといわれている[4)]．

一方，ホルマリン固定パラフィン包埋組織より癌細胞核DNA量が測定可能となり，種々の腫瘍において生物学的な増殖能の指標となりうることが報告されている[5)6)]．

そこで著者は遠隔転移のない原発性大腸癌および同時期の肝転移を有する大腸癌症例において，原発病巣のPGsならびに癌細胞核DNAを測定するとともにc-erbB-2の組織染色を行い，おのおのの関連性や，肝転移能との関連から，これらが悪性度の指標となりうるかどうかについて検討した．

対　象

1987年12月から1993年7月までに福島県立医科大学第2外科教室で手術を施行しPGsを測定しえた大腸癌症例55例を対象とした．その内訳は遠隔臓器転移のない原発性大腸癌44例（結腸癌22例，直腸癌22例），同時性肝転移を有する大腸癌11例（結腸癌5例，直腸癌6例）で，stageの内訳はstage I 7例，II 19例，III 10例，IV 8例，およびVは11例で，性別は遠隔臓器転移のない原発性大腸癌で男性29例，女性15例，同時性肝転移を有する大腸癌では男性7例，女性4例であった．両者間の壁浸達度，Dukes分類および脈管浸襲などの背景因子には有意差は認められなかった（**Table 1**）．

方　法

1）c-erbB-2染色法

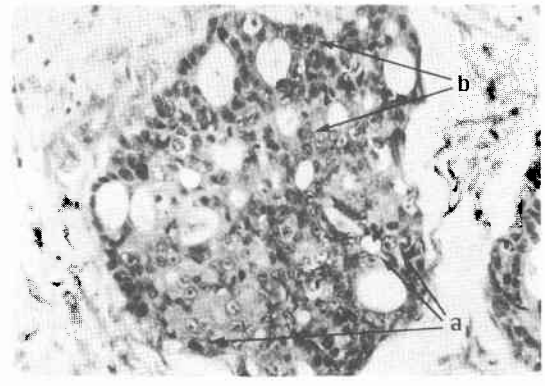
ホルマリン固定パラフィン包埋標本より得た4μmの薄切切片を脱パラフィン後0.1%ペプシン処理し

＜1994年11月9日受理＞別刷請求先：吉田　典行
〒960　福島市光が丘1　福島県立医科大学第2外科

Table 1 Patient characteristics

	Hepatic metastasis(+)	Hepatic metastasis(−)	p
number	11	44	
sex			
Male	7	28	
Female	4	16	n.s.
age	59.7±13.8	63.5±10.9	n.s.
differentiation			
well diff.	9	37	
undiff.	2	7	n.s.
Dukes' classification			
A	1	7	
B	1	21	
C	9	16	n.s.
vessel invasion			
ly(−)	1	10	
ly(+)	10	34	n.s.
v(−)	1	13	
v(+)	10	31	n.s.

Fig. 1 Staining for c-erbB-2 oncoprotein. Moderately differentiated adenocarcinoma showing membrane staining (← a) and granular cytoplasmic staining (← b) for c-erbB-2 oncoprotein (magnification×200)



0.3%H_2O_2加メタノールで内因性ペルオキシダーゼをブロックし，3%希釈正常ヒツジ血清で20分間反応させた．1次抗体としてc-erbB-2ポリクローナル抗体(Triton Biosciences社×20)を，2次抗体としてbiotin化抗ラビット抗体を用い，ABC (Avidin-biotin peroxidase complex, Vector社)法にて染色し，0.1% H_2O_2加3-3′DAB (diamino-benzidine tetrahydrochrolide)で発色させhematoxylinで核染後光学顕微鏡にて検索した．

判定は全視野中の癌細胞の細胞膜または細胞質に褐色顆粒状に染色を認めたものを陽性と判断した(**Fig. 1**)．

2) 大腸癌核DNA量の測定

10%ホルマリン固定した大腸癌病巣部のパラフィン包埋ブロックより切り出した光顕用4μm H.E. 染色標本にて病巣部を確認し，それに接する部位を40μm幅で3個薄切した．またheterogeneityの有無をみるため，腫瘍最大割面部より最低2か所測定した．この包埋切片はSchutte[7]らの方法に準じ，おのおの処理を行いVindelϕv[8]のstock-solutionにて溶解し，0.25% trypsinにより37°C15時間インキュベーションした後40μm nylon meshを用いて濾過し単離裸核細胞を得た．核染色はVindelϕvの方法によってpropidium iodine (PI)を用い行った．核DNA量はCoulter社EPICS-751 Flow cytometerを用い，1検体あたり10^4個の細胞数を測定した．得られたヒストグラムのG0/G1期細胞のmodal peak値よりDNA index (DI)を求め，DI=1をdiploid，一方DI≠1をaneuploidとし，CV値が8%以下のものを評価対象とした．

3) 大腸癌組織内PG測定

摘出組織を氷冷インドメタシン加メタノール(10 μM/l)5ml中にてホモジナイズし遠心後，メタノール層を抽出し蒸留水を加え15%に濃度を調整した．1N塩酸を用いpHを4に調整し，活性化Seppak C 18カラムに抽出液を吸着後おのおのPGsを溶出した．

酢酸エチル層を減圧乾固後，乾固sampleを10 mMTris-HCL Buffer(pH 7.6)に溶解する．^{3}H-PGE$_2$, D$_2$ Hot 100μl添加後PG抗体100μlを添加し4°Cにて1昼夜インキュベーションし，DCC (Dextran-coated charcoal)を加え4°C，3,000rpm，10分間遠心分離後，液体シンチレーションカウンターにて放射活性を測定した．

4) 差の検定

得られた結果の統計処理はt検定またはχ^2検定にて行った．

結　果

1) 肝転移とc-erbB-2染色性

c-erbB-2染色陽性例は肝転移陽性群11例中4例(36.4%)で，肝転移陰性群では44例中7例(15.9%)であった．両者間に統計的有意差はなかった(**Fig. 2**)．

2) 肝転移とploidy pattern

cv値8%以下の評価可能な症例は52例であった．肝転移陽性群10例中aneuploidが9例(90.0%)，diploid 1例であり，肝転移陰性群42例中aneuploidは28例

Fig. 2 Presence of hepatic metastasis and c-erbB-2 staining

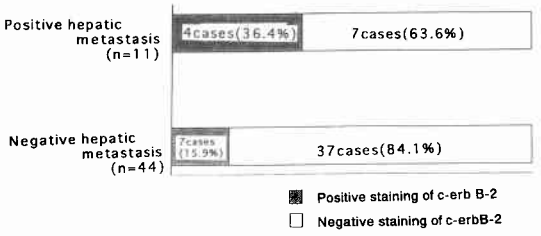
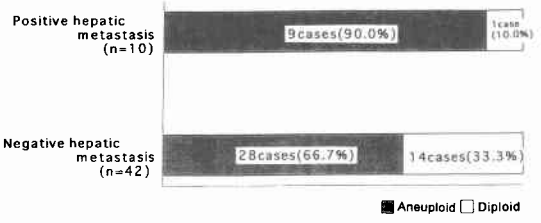


Fig. 3 Presence of hepatic metastasis and DNA ploidy pattern



(66.7%) diploid は14例 (33.3%) であった．両群間に統計的有意差はなかった (**Fig. 3**).

3) 肝転移と PGs 濃度

大腸癌組織の PGE_2濃度の平均は肝転移陽性群では6.1±1.0ng/g tissue で，肝転移陰性は16.1±2.9ng/g tissue であり，肝転移陽性群での PGE_2濃度は陰性群のそれより有意に低かった ($p<0.01$).

大腸癌組織の PGD_2濃度の平均は肝転移陽性群では12.9±2.6ng/g tissue で，肝転移陰性例の平均濃度23.3±3.6ng/g tissue より有意に低かった ($p<0.05$) (**Fig. 4**).

4) c-erbB-2染色性と PGs 濃度

c-erbB-2染色陽性群の PGE_2濃度の平均は6.7±1.1 ng/g tissue，染色陰性群のそれは13.1±2.2ng/g tissue であり，前者は統計的に有意に低い値 ($p<0.02$) であった．

c-erbB-2染色陽性群の PGD_2濃度の平均は11.3±3.4ng/g tissue であり染色陰性群の PGD_2濃度の平均21.4±3.3ng/g tissue より有意に低かった ($p<0.05$) (**Fig. 5**).

5) ploidy pattern と PGs 濃度

DNA ploidy pattern が aneuploid であった37症例の PGE_2濃度は11.4±1.6ng/g tissue であったのに対し，diploid の15症例では，13.9±5.0ng/g tissue で，

Fig. 4 PGs levels depend on the presence of the hepatic metastasis

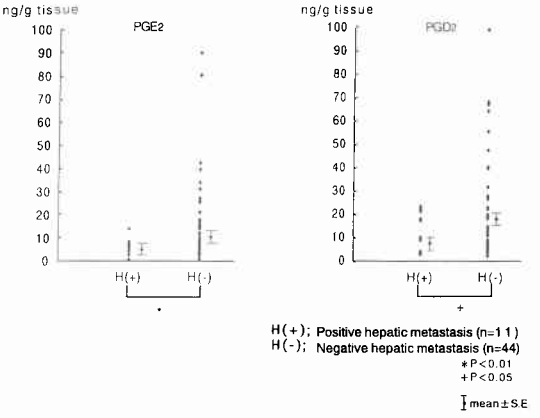
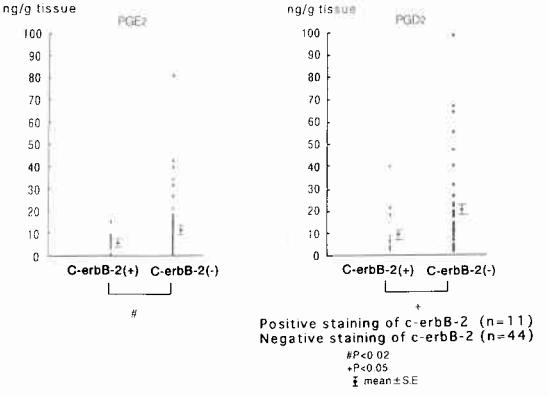


Fig. 5 PGs levels depend on c-erbB-2 staining



両者間に統計的有意差は得られなかった．

PGD_2の aneuploid 症例の平均濃度は18.9±3.6ng/g tissue なのに対し，diploid 症例のそれは20.1±4.4 ng/g tissue と，両者間に統計的有意差はなかった (**Fig. 6**).

6) c-erbB-2染色性と ploidy pattern

c-erbB-2染色陽性10例中8例 (80.0%) および染色陰性42例中28例 (66.7%) に aneuploid が認められた．一方，染色陽性例中2例 (20.0%) および染色陰性例中14例 (33.3%) が diploid であったが両者間に統計的有意差はなかった (**Fig. 7**).

7) c-erbB-2染色性と DI

c-erbB-2染色陽性群の DI の平均は1.41±0.09と染色陰性群の平均1.25±0.04より高い傾向 ($p<0.1$) を認めた (**Fig. 8**).

Fig. 6　PGs levels depend on DNA ploidy pattern

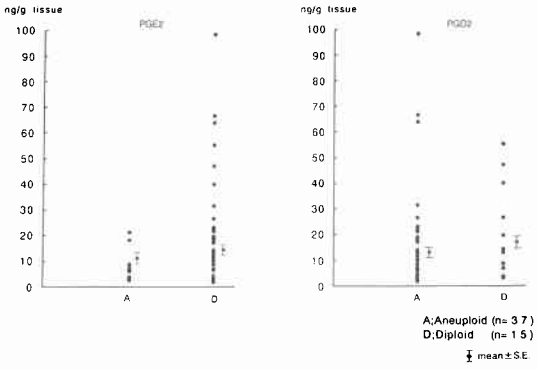


Fig. 7　C-erbB-2 staining and ploidy pattern

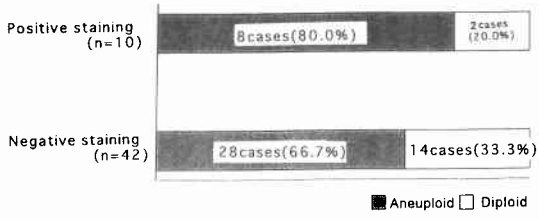
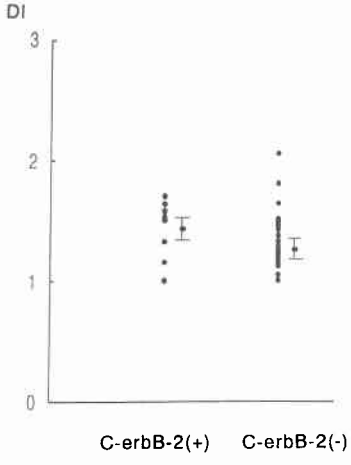


Fig. 8　C-erbB-2 staining and DNA index



考　察

PGs と腫瘍とのかかわりについての研究の報告は，1976年 Santoro ら[1)~3)]の，PGE シリーズによるものが最初と思われる．しかし，その抗腫瘍効果を得た濃度は生理的な濃度をはるかに越えた高い濃度であった．

1979年 Honn ら[9)]は PGA シリーズが臨床的に有効な抗腫瘍剤と同等な強さで DNA 合成を阻害することを報告し，以後 PGs と腫瘍増殖の関連に関する報告が種々なされるようになってきた．

c-erbB-2は構造上，アミノ酸配列の50%以上が epidermal growth factor receptor（以下，EGFR と略記）と相同し，細胞内領域のキナーゼ領域においては，その80%以上が ErbB/EGFR 相同性を示している[10)]．この遺伝子増幅や過剰発現は腺癌において高頻度に認められ，腺癌の増殖になんらかの関与をしているものと推測されている[4)]．遊佐ら[11)]はマウスに移植した低転移能の結腸癌細胞に活性型 c-erbB-2を導入することにより，その転移能が上昇することを報告し，大森[12)]も肝転移陽性例の大腸癌原発巣における c-erbB-2遺伝子産物発現は肝転移陰性症例のそれより有意に高率であったと報告している．著者らの検討では，症例数が少ないためか両者間に統計的有意差は得られなかった．

大腸癌における aneuploid 群の予後は，diploid 群に比べ不良であるとの報告が多く[13)14)]，壁深達度，リンパ節転移，肝転移と DNA ploidy との間に有意差を認め，腫瘍の発育増生，転移に伴い aneuploid の割合が増加したとの報告もある[12)15)]．しかし自験例においては，肝転移と ploidy との間に統計的有意差は得られなかった．

腫瘍増殖能と PGs 濃度との関連については，Koeffler ら[16)]は leukemia cell lines を用い PGE_2 と E_1 が，その増殖を抑制したことを報告している．その腫瘍増殖抑制の作用機序の1つとして，Wiley ら[17)]は baby hamster kidney（BHK-21）cell を用い PGE は S 期で合成阻害を起こすことを報告している．PGE_2 と転移との関連について，Bennett ら[18)]がヒト乳癌細胞中の PGE_2 量は正常組織の5～6倍多く，骨転移のあるものほど PGE_2 量が多いと報告している．

今回の著者らの検討では，肝転移陽性例の PGE_2 濃度は肝転移陰性例のそれより低く，Bennett らとは逆の結果で，むしろ Koeffler[16)]，Wiley ら[17)]の腫瘍増殖抑制効果を支持する結果であった．Bennett らの結果との相違については，PGs が異なる臓器や転移場所において違う役割を果たしている可能性があり今後の研究課題と思われる．

PGD_2 に関しては，福島ら[19)]が，L1210白血病培養細胞で，Sakai ら[20)]が，human osteosarcoma cells（KSu cell line）を用い，それぞれ腫瘍増殖を抑制することを

報告している．

PGD_2と転移能に関し，Stringfellow と Fitzpatric ら[21)22)]は中等度転移株の B-16 melanoma 細胞（B16-Fl）のほうが，高転移株（B16-F10）より PGD_2の生成量が多く，肺転移を起こしにくいことから，PGD_2が melanoma 細胞の肺転移能に関与している可能性を報告している．著者らの検討でも，肝転移陽性例の PGD_2濃度は，有意に肝転移陰性例に比べ低く PGD_2が肝転移能を抑制している可能性が示唆された．PGD_2の肝転移能へ及ぼす影響としては PGD_2の腫瘍増殖抑制効果と[19)20)]腫瘍の転移巣形成には血小板凝集能の関与があることから PGD_2の持つヒト血小板凝集阻止作用が転移巣形成に抑制的に働き転移を抑制しているものと思われる[21)~23)]．

先にも述べたが c-erbB-2が腫瘍増殖，転移能にかかわっているとの報告があるが，著者らの検討では，c-erbB-2染色陽性群の PGE_2，PGD_2濃度は，染色陰性群のそれより有意に低かった（$p<0.02$，$p<0.05$）．このことも PGE_2，PGD_2両者が腫瘍増殖を抑制している可能性を示唆している．

Polgar ら[24)]は PGE_1が uridine および thymidine 取り込みを抑制することを報告し，Wiley らは PGE は S 期で合成阻害を起こすと報告している．一方，江原[25)]は sarcoma-180，KATO-III において PGD_2が腫瘍細胞の増殖抑制作用を持つことを報告し，DNA ヒストグラムでは，前者で G_2＋M 期の蓄積と S 期の増加，後者では中等度の S 期の増加が認められたと報告している．著者らの ploidy の検討では，aneuploid での s 期の解析をしていないためか PGs 濃度との間に有意の結果は得られなかった．

c-erbB-2染色性と DI に関し，Tsushima ら[26)]は大腸癌肝転移症例の DI を low DI（≦1.5）と，high DI（＞1.5）にわけその予後を検討した結果 high DI 群は有意に予後が悪かったと報告している．著者らの検討では c-erbB-2染色陽性の DI の平均は1.41と染色陰性の DI の平均1.25より高い傾向を認め（$p<0.1$），c-erbB-2染色性が腫瘍の生物学的悪性度を反映している可能性が示唆された．

以上よりこれら PGs が肝転移に対し抑制的に働いている可能性が示唆された．

文　献

1) Santoro MG, Jaffe BM: Inhibition of friend erythroleukemia-cell tumors in vivo by a synthetic analogue of prostaglandin E_2. Br J Cancer **39**：408—413，1979
2) Santoro MG, Philpott GW, Jaffe BM: Inhibition of tumor growth in vivo and in vitro by prostaglandin E. Nature **263**：777—779，1976
3) Santoro MG, Philpott GW, Jaffe BM: Inhibition of B-16 melanoma growth in vivo by a synthetic analogue of PGE_2. Cancer Res **37**：3774—3779，1977
4) 松田　覚，山本　雅：erbB 関連遺伝子産物の細胞癌化能．日臨　**48**：1679—1684，1990
5) Teodri L, Capurso L, Cordelli E et al: Cytometrically determined relative DNA content as an indicator of neoplasia in gastric lesions. Cytometry **5**：63—70，1984
6) Kokal WA, Duda RB, Azumi N et al: Tumor DNA content in primary and metastatic colorectal carcinoma. Arch Surg **121**：1434—1439，1986
7) Schutte B, Reynders MMJ, Bosman FT et al: Flow cytometric determination of DNA ploidy level in nuclei isolated from paraffin-embedded tissue. Cytometry **6**：26—30，1983
8) Vindelφv LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry **3**：323—327，1983
9) Honn KV, Dunn JR, Morgan LR: Inhibition of DNA synthesis in harding-passey melanoma cells by prostaglandins A1 and A2. Biochem Biophys Res Commun **87**：795—801，1979
10) 松田　覚，秋山　徹，山本　雅：ErbB-2 情報伝達機構と発癌．実験医　**9**：1509—1515，1991
11) Yusa K, Sugimoto Y, Yamori T et al: Activated c-erbB-2 increased metastatic potential in a low metastatic clone from murine colon adenocarcinoma 26. J NCI sub mitted **82**：1633—1636，1990
12) 大森一吉：腫瘍核 DNA 量および c-erbB-2 癌遺伝子産物発現．日外会誌　**92**：1469—1479，1991
13) Kokal W, Sheibani K, Terz J et al: Tumor DNA content in the prognosis of colorectal carcinoma. JAMA **255**：3123—3127，1986
14) 安藤善郎：DNA flow cytometry からみた大腸癌の予後に関する検討．日外会誌　**91**：1700—1709，1990
15) 武川啓一：直腸癌と DNA．日外会誌　**91**：980—986，1990
16) Koeffler HP, Golde DW: Humoral moduration of human acute myelogenous leukemia cell growth in vitro. Cancer Res **40**：1858—1862，1980
17) Wiley MH, Feingold KR, Grunfeld C et al:

Evidence for cAMP-indipendent inhibition of s-phase DNA synthesis by prostaglandins. J Biol Chem **258**：491—496, 1983
18) Bennett A, Charlier EM, McDonald AM et al: Prostaglandins and breast cancer. Lancet **2**：624—626, 1977
19) 福島雅典, 加藤武俊, 太田和雄ほか：プロスタグランジンD2の抗腫瘍性. 癌と化療 **9**：159—160, 1982
20) Sakai T, yamaguchi N: Prostaglandin D2 inhibits the proliferation of human malignant tumor cells. Prostaglandins **27**：17—26, 1984
21) Stringfellow DA, Fitzpatrick FA: Prostaglandin D2 controls pulmonary metastasis of malignant melanoma cells. Nature **282**：76—78, 1979
22) Fitzpatrick FA, Stringfellow DA: Prostaglandin D_2 formation by malignant melanoma cells correlates inversely with cellular metastatic potential. Proc Natl Acad Sci USA **76**：1765—1769, 1979
23) 成宮 周, 加藤武俊, 福島雅典ほか：プロスタグランジン (PG) による細胞増殖抑制とそのメカニズム. 生化学 **57**：578—593, 1985
24) Polgar P, Taylor L: Effects of prostaglandin on substrate uptake and cell division in human diploid fibroblasts. Biochem J **162**：1—8, 1977
25) 江原 博：Prostaglandin (PG) D2の抗腫瘍効果に関する実験的研究. 日外会誌 **90**：980—987, 1989
26) Tsusima K, Nagorney DM, Rainwater LM et al: Prognostic significance of nuclear deoxyribonucleic acid ploidy patterns in resected hepatic metastases from colorectal carcinoma. Surgery **102**：635—643, 1987

Malignant Potential and Correlation between Prostaglandins, c-erbB-2 Oncoprotein Expression and Ploidy Pattern in Colon Cancer

Tsuneyuki Yoshida, Masashi Kanazawa, Hiroshi Mizunuma, Fumiaki Watanabe, Youichi Kikuchi, Hisayoshi Satoh, Yoshiroh Andoh, Shinichi Takeuchi*, Atsuo Tsuchiya and Rikiya Abe
Second Department of Surgery, Fukushima Medical College
*Ohhara General Hospital

The relation between prostaglandins, c-erbB-2 and DNA ploidy pattern was investigated in 55 patients with colon cancer (11 with hepatic metastasis and 44 without hepatic metastasis) to assess malignant potential. The c-erbB-2 oncoprotein was immunohistochemically stained using a polyclonal antibody. Prostaglandin E_2 and D_2 were determined by the DCC method. DNA ploidy was determined from formalin-fixed, paraffin-embedded tissue using an Epics-751 flow cytometer. The positive staining rate of c-erbB-2 oncoprotein in the positive metastatic group was higher than that in the negative group. The DNA aneuploidy rate and mean of D.I. in the positive staining group were higher than those in the negative staining group. Therefore, it is suggested that c-erbB-2 might be an indicator for assessing the malignant potential of colon cancer. PGE_2 and D_2 tissue concentrations were lower in the positive metastatic group and/or positive oncoprotein cases. These findings suggest that PGs might play a role in inhibiting hepatic metastasis in colon cancer.

Reprint requests: Tsuneyuki Yoshida Second Department of Surgery, Fukushima Medical College
1-Hikarigaoka, Fukushima, 960 JAPAN