

# ss 胃癌における urokinase-type plasminogen activator と type 1 plasminogen activator inhibitor の発現

## —肝再発予測因子としての有用性—

防衛医科大学校第1外科

富松 聡一 市倉 隆 玉熊 正悦

胃癌肝転移における組織線溶系酵素の関与につき検討した。深達度 ss の胃癌根治切除例中、肝再発群14例と無再発で5年以上生存した対照群30例を比較すると、再発群の方が高齢でリンパ節転移が高度であったが、他の病理学的因子や PCNA 標識率に両群間の差はみられなかった。免疫組織染色による urokinase type plasminogen activator (u-PA) の陽性率は、肝再発群が64.3%と、対照群の40.0%より高い傾向にあり、逆に type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) の陽性率はそれぞれ 28.6%, 36.7%であった。u-PA と PAI-1 とを組み合わせると、u-PA (+), PAI-1 (-) の症例は肝再発群において35.7%と対照群の6.7%に比べ有意に高頻度だった。また肝再発の有無に関する判別分析では、有用な説明変数として u-PA, PAI-1, リンパ節転移, 手術時年齢が選択され、u-PA は有意に肝再発に関わっていた。以上より u-PA および PAI-1 の染色性は肝再発を予測する上で有用な因子と考えられた。

**Key words:** gastric cancer, liver metastasis, fibrinolytic activity, urokinase type plasminogen activator, type 1 plasminogen activator inhibitor

### はじめに

胃癌の肝転移は髄様型の乳頭腺癌または低分化腺癌、 $\alpha$ -fetoprotein (AFP) 産生胃癌などの症例に多くみられるが<sup>1)2)</sup>、根治切除後の肝再発例を予測するのは必ずしも容易ではない。癌の血行性転移は癌細胞の遊離、血管内進入、転移先血管壁への接着、血管外脱出、微小転移巣形成、増殖という過程を経て形成されるが、近年、それぞれのステップに影響する因子について検討されている<sup>3)4)</sup>。このうち初期の遊離、血管内侵入の段階ではさまざまなプロテアーゼを産生し、線溶活性を高めうる癌細胞が転移に有利であることが報告されている<sup>5)6)</sup>。今回、腹膜播種性転移が比較的少なく、かつ進行程度がある程度一定になるように、深達度が漿膜下層であった胃癌 (ss 胃癌) 症例を対象とし、セリンプロテアーゼである urokinase type plasminogen activator (u-PA) とそのインヒビター、type 1 plasminogen activator inhibitor (PAI-1) を免疫組織学的に染色し、局所の線溶系酵素が肝再発に及ぼす影響を

調べ、肝再発予測における両因子の有用性を検討した。

### 対象および方法

1978年から1993年までに当科で切除された胃癌症例1,242例中、根治度 A または B の切除が施行されたものは904例で、深達度が ss の症例は169例だった。このうち15例 (8.9%) で肝臓に再発が認められ、65例 (38.5%) は5年以上再発なく生存していた。今回、標本のホルマリン固定時間が48時間以内であった肝再発例14例および5年以上無再発例30例について、それぞれ肝再発群、対照群として以下の検討を行った。なお根治度 A, B 症例904例中の肝再発の頻度は32例 (3.5%) であった。

#### 1. 臨床病理学的検討

両群の臨床病理学的な比較を“第12版胃癌取扱規規約”<sup>7)</sup>に基づいて行った。腫瘍マーカーについては、血清中 carcinoembryonic antigen (CEA) 値は5ng/ml、血清中 AFP 値は20ng/ml を cut-off 値とした。

#### 2. 免疫組織染色

局所線溶能の指標として u-PA, PAI-1 に対する免疫組織染色を行った。1次抗体として u-PA は抗ヒト u-PA モノクローナル抗体である MUK1 (Biopool 社)、

PAI-1 は抗ヒト PAI-1 モノクローナル抗体 MAI12 (Biopool 社) をそれぞれ200倍に希釈して使用した。原発巣のパラフィン包埋組織切片を4 $\mu$ m で作製、正常兔10%血清で20分ブロッキングした後、おのおの1次抗体を室温で120分反応させた。以降の過程は streptavidin-biotin 法 (SAB 法) により、ビオチン標識抗マウス抗体に10分間、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンに5分間反応させ、発色はジアミノベンチジン (DAB) を用いた。染色性は、腫瘍細胞が染色された範囲が腫瘍全体の10%以上の場合陽性、10%未満の場合陰性と判定した。また同様の方法で、腫瘍増殖能の指標として proliferating cell nuclear antigen (PCNA) の免疫染色を行った。線溶系酵素の染色に用いた切片と連続した切片において、50倍希釈した抗ヒト PCNA モノクローナル抗体 PC10 (DAKO 社) を1次抗体として染色を行い、200倍視野で腫瘍細胞約500個をカウント、PCNA 陽性細胞の割合を PCNA 標識率 (%) として表した。

なお統計学的解析には Student's t-test および  $\chi^2$  test を用い、危険率5%未満を有意差ありと判定した。

### 3. 判別分析

u-PA, PAI-1染色性が肝再発の予測に寄与する度合いを検討するために判別分析<sup>9)</sup>を試みた。説明変数には、u-PA, PAI-1の染色性の他に手術時年齢、組織型、腫瘍径、リンパ管侵襲、静脈侵襲、間質量、INF、組織学的リンパ節転移、および PCNA 標識率の11項目を選択した。変数選択は変数増減法により行った。なお上記因子のうちカテゴリー項目については下記のごとく数値化した。

(1) u-PA の染色性；染色部分が腫瘍の10%未満：1, 腫瘍の10%~50%：2, 腫瘍の50%以上：3, (2) PAI-1の染色性；染色部分が腫瘍の10%未満：1, 腫瘍の10%~50%：2, 腫瘍の50%以上：3, (3) 組織型；pap, tub1, tub2：1, por1, por2, muc, sig：2, (4) リンパ管侵襲；ly0：1, ly1：2, ly2：3, ly3：4, (5) 静脈侵襲；v0：1, v1：2, v2：3, v3：4, (6) 間質量；medullary：1, intermediate：2, scirrhus：3, (7) INF；INF $\alpha$ ：1, INF $\beta$ ：2, INF $\gamma$ ：3, (8) リンパ節転移；n0：1, n1(+): 2, n2 (+) 以上：3。

## 結 果

### 1. 臨床病理学的背景

肝再発群は、手術時平均年齢が有意に高かったが、腫瘍の占居部位、肉眼型、最大腫瘍径に有意差はなかつ

**Table 1** Clinical characteristics of gastric cancer with subserosal invasion between the patients who showed recurrence in the liver and the patients who survived five years or longer without any recurrence

	RL <sup>a)</sup> (n=14)	Control <sup>b)</sup> (n=30)
Sex (male : female)	2.8 : 1	1.3 : 1
Average age* (y/o #)	61.9 $\pm$ 7.3	54.2 $\pm$ 13.8
Location		
C	4(28.6%)	8(26.7%)
M	4(28.6%)	17(56.6%)
A	6(42.8%)	5(16.7%)
Gross appearance		
type 0	2(14.3%)	11(36.7%)
type 1,2	5(35.7%)	8(26.6%)
type 3,4	7(50.0%)	11(36.7%)
CEA positive <sup>c)</sup>	1( 7.1%)	3(10.0%)
AFP positive <sup>d)</sup>	2(14.3%)	1( 3.3%)
Tumor size(cm #)	5.3 $\pm$ 2.6	4.9 $\pm$ 2.5

a) RL ; patients who showed recurrence in the liver

b) Control ; patients who survived five years or longer without any recurrence

c) Cases with positive serum CEA concentration

d) Cases with positive serum AFP concentration

\* : p<0.05 # : mean $\pm$ SD

た。CEA 陽性症例は肝再発群で1例、対照群に3例で、同様に AFP 陽性症例はそれぞれ2例、1例と両群で差がなかった (Table 1)。リンパ節転移を比較すると、肝再発群では n2 (+) 症例が35.7%と対照群の10.0% に比べ高頻度で (p<0.05)、転移個数の平均値も対照群の2.2 $\pm$ 2.8個に対し肝再発群では6.7 $\pm$ 7.8個と有意に多かった (p<0.05)。またリンパ管侵襲について肝再発群の方が高度の症例が多かったが (p<0.05)、組織型、間質量、静脈侵襲、および原発巣の PCNA 標識率に差を認めなかった (Table 2)。

### 2. 局所線溶系酵素の染色性

胃癌において u-PA および PAI-1は、腫瘍細胞の細胞膜および細胞質が染色され、特に腫瘍先進部に強く染色された (Fig. 1, 2)。また u-PA については一部の腫瘍で間質細胞が染色された。

u-PA の染色陽性率は、肝再発群は64.3%で、対照群の40.0%より高い値を示し、一方 PAI-1陽性率は肝再発群の28.6%に対し、対照群の方が36.7%とやや高かったが、いずれも有意な差ではなかった (Table 3)。しかし u-PA と PAI-1を組み合わせると、局所線溶能が最も高いと考えられる u-PA (+) かつ

**Table 2** Pathological characteristics of gastric cancer between RL group and control group

	RL <sup>a)</sup> (n=14)	Control <sup>b)</sup> (n=30)
Stage of lymph node metastasis*		
n0	2(14.3%)	12(40.0%)
n1	7(50.0%)	15(50.0%)
n2	5(35.7%)	3(10.0%)
Histologic classification		
Differentiated	6(42.9%)	10(33.3%)
Undifferentiated	8(57.1%)	20(66.7%)
Venous invasion		
v0,1	9(64.3%)	22(73.3%)
v2,3	5(35.7%)	8(26.7%)
Lymphatic invasion*		
ly0,1	4(28.6%)	19(63.3%)
ly2,3	10(71.4%)	11(36.7%)
Stromal type		
med	2(14.3%)	5(16.7%)
int	6(42.9%)	14(46.6%)
sci	3(21.4%)	11(36.7%)
Metastatic lymph nodes #	6.7±7.8	2.2±2.8
PCNA(%#)	31.8±7.9	28.1±8.2

a) RL; patients who showed recurrence in the liver  
 b) Control; patients who survived five years or longer without any recurrence  
 \*: p<0.05 #; mean±SD

**Table 3** Immunohistochemical staining for u-PA or PAI-1

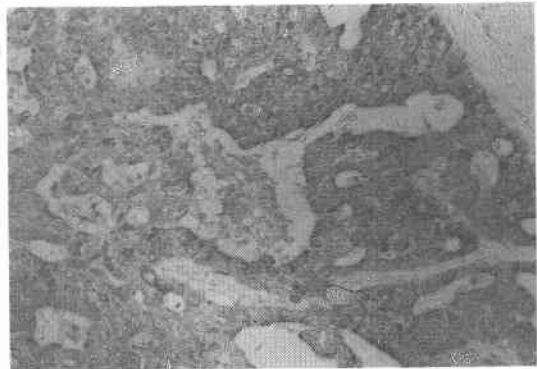
	positive	negative
u-PA		
RL (n=14)	9(64.3%)	5(35.7%)
Control (n=30)	12(40.0%)	18(60.0%)
PAI-1		
RL (n=14)	4(28.6%)	10(71.4%)
Control (n=30)	11(36.7%)	19(63.3%)

PAI-1 (-) の症例の頻度は肝再発群において35.7%と対照群の6.7%に比べ有意に高かった (p<0.05) (Fig. 3).

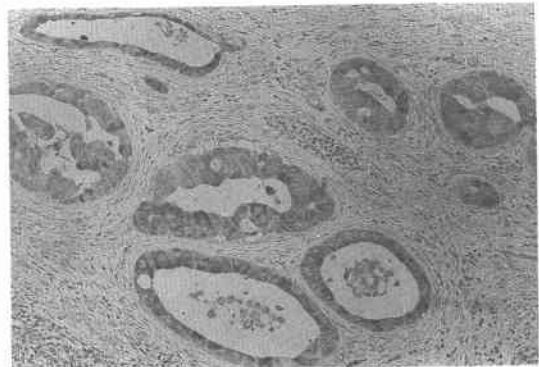
3. 判別分析

肝再発の有無を判別するのに有用な説明変数として、変数増減法により u-PA, PAI-1, リンパ節転移, 手術時年齢が選択され, なかでも u-PA は有意に肝再発に関わっていた (p<0.01) (Table 4). 本解析の精度は判別的中率89.7%, 誤判別の確率18.6%と良好であった。

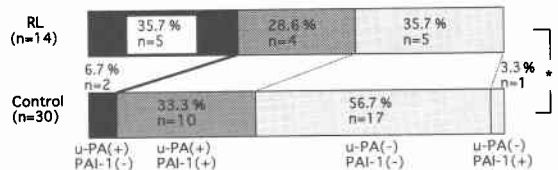
**Fig. 1** Immunohistochemical staining of u-PA in gastric cancer (×200)



**Fig. 2** Immunohistochemical staining of PAI-1 in gastric cancer (×200)



**Fig. 3** Combination immunohistochemical analysis for fibrinolytic activity



\* p<0.05; u-PA(+)&PAI-1(-) vs the others

考 察

胃癌根治切除後に肝再発をきたす頻度は, 全胃癌症例の3%~6%と報告されている<sup>9)</sup>. われわれの検討でも同様で, 深達度をssに限ると8.9%であった. 肝転移を予測することは, 術後のより強力な補助化学療法の必要性を判断する上で非常に重要であるが, 手術標本の病理組織学的所見から予測することは困難であ

**Table 4** Multivariate discriminant analysis for recurrence after curative gastrectomy

Factor	Coefficient	F-value	p
u-PA staining	-2.32043	10.02592	<0.01
PAI-1 staining	2.47730	5.33712	
Stage of lymph node metastasis	-1.31607	4.20443	
Age at operation	-0.07033	3.81686	

る。

今回われわれは腫瘍局所の線溶系酵素に着目し、セリンプロテアーゼである u-PA とそのインヒビターである PAI-1 の肝再発に及ぼす影響を検討した。癌細胞が産生する u-PA は、オートクリン、またはパラクリン的に癌細胞表面 u-PA 受容体と結合する。これにより活性化されたプラスミノゲンは、プラスミンやプロメタロプロテイナーゼを次々と活性化し、癌細胞周囲のマトリックスを構成するコラーゲンやゼラチン、および血管の基底膜を効率よく分解し、癌細胞の遊離、遊走、血管内侵入を容易にすると考えられる<sup>10)11)</sup>。さらに局所の線溶酵素は vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor 等の血管新生因子によって活性化され、血管新生の初期に重要な役割を担っているといわれる<sup>12)13)</sup>。また hepatocyte growth factor (HGF) は細胞の遊走に関与する scatter factor と同一であることが判明しているが、u-PA はこの HGF を活性化することが報告されており<sup>14)</sup>、u-PA が癌細胞の遊走にも関与する可能性を示唆するものである。

腫瘍局所のこれらの作用は u-PA のみでなく、u-PA の受容体、および PA 活性を阻害するインヒビター (PAIs) により複雑に制御されている<sup>3)4)15)</sup>。PAIs については現在 4 種類知られているが、PAI-1 は他と比較して極めて高い反応速度で効率よく u-PA を失活させること、PAI-1 は PA の特異的インヒビターであるのに対し、他の PAIs は PA 以外にも抑制を受けるターゲットがありうることなどの知見から PAI-1 がもっとも重要な u-PA のインヒビターと考えられている<sup>15)16)</sup>。

u-PA, PAI-1 は癌の増殖、浸潤、転移の面から乳癌<sup>17)18)</sup>や大腸癌<sup>19)20)</sup>でよく研究されている。両酵素はいずれも癌細胞やその周囲の間質細胞などで発現して

おり、ともに予後に悪影響を与え、かつ両者間の発現には正の相関があるとする報告が多い<sup>17)18)20)</sup>。

胃癌においても組織抽出液中の線溶酵素を測定した報告がみられる。すなわち西野らは組織 u-PA 抗原量は癌周囲正常部より癌組織で有意に高値を示し、またリンパ節転移陽性例では陰性例に比較し PAI-1 が高値であったが、u-PA は腫瘍進行度と関連がなかったとしている<sup>21)</sup>。Nakarda らも組織抽出液の抗原量を別の方法で測定しほぼ同様の結果を報告している<sup>22)</sup>。一方、丁らは u-PA の活性を検討し、正常組織より胃癌組織の方が活性が低かったとしている<sup>23)</sup>。当教室で胃癌組織をホモジネート、遠沈し、mitochondria 分画の単位蛋白当たりの u-PA 活性を測定したところ、深達度 ss 以上、リンパ節転移陽性、未分化型組織型でそれぞれ高値を示した。また PAI-1 活性は活性の見られる腫瘍と見られない腫瘍があり、PAI-1 活性陽性の腫瘍では u-PA との間に正の相関がみられた<sup>24)</sup>。

Romer らはヌードマウスにヒト乳癌を移植したところ、腫瘍側からは腫瘍由来の u-PA が発現しており、間質からは反応性にマウス由来の u-PA が発現していることを明らかにした<sup>25)</sup>。胃癌の場合、腫瘍によっては間質量が多く、マクロファージや線維芽細胞由来の線溶系酵素を無視しえない。腫瘍抽出物を測定する方法では、間質細胞の産生を同時に判定することになり、腫瘍固有の特性が反映されない可能性もある。

そこでわれわれは u-PA および PAI-1 を免疫組織学的に染色し、腫瘍そのものの染色性を検討した。u-PA の免疫組織染色において、間質細胞が染色された症例がみられたが、染色性の判定は腫瘍細胞のみで行った。MUK1 は u-PA の A-chain に対するモノクローナル抗体で、線溶活性をほとんど持たない single-chain u-PA と活性型の high molecular weight u-PA の両方が染色され、抗 PAI-1 モノクローナル抗体 MAI12 も活性型優位であるが、潜在型も染色される。したがって今回の癌細胞の染色性は必ずしも腫瘍局所の線溶系酵素の活性をそのまま反映するとはいえないが、Takai らは、抗 u-PA モノクローナル抗体による検討で u-PA 染色陽性細胞割合の大きい腫瘍ほど線溶活性が高かったと報告している<sup>26)</sup>。

われわれは対象の深達度 ss に限り、局所線溶酵素の染色性が肝再発に及ぼす影響を検討した。その結果、肝再発群で、浸潤・転移に局所線溶環境上最も有利と考えられる u-PA 陽性で PAI-1 陰性の染色性を示す症例が対象群に比べ有意に多かった。前田らも、u-PA の

免疫組織学的染色性は血行性転移と相関したと報告している<sup>27)</sup>。多変量解析の結果からも、u-PA および PAI-1の染色性は肝再発を予測する上で重要な因子と考えられ、術後に抗癌剤の肝動注など積極的な補助療法を行う上で有用な指標となろう。

#### 文 献

- 1) 磨伊正義, 望月福治: 胃疾患の X 線・内視鏡診断と臨床病理. 医学書院, 東京, 1993, p66—68
- 2) Uefuji K, Ichikura T, Tamakuma S: Role of histological findings and serum AFP levels in the prognosis of AFP-producing gastric cancers. *Jpn J Clin Oncol* 24 : 135—140, 1994
- 3) Liotta LA, Rao CN, Barsky SH: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab Invest* 49 : 636—649, 1983
- 4) Poste G, Fidler IJ: The pathogenesis of cancer metastasis. *Nature* 283 : 139—146, 1980
- 5) Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J et al: Plasminogen activators, tissue degradation and cancer. *Adv Cancer Res* 44 : 146—239, 1985
- 6) 高橋 敬: u-PA・受容体と癌細胞の浸潤. 血液・腫瘍科 26 : 190—205, 1993
- 7) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第12版. 金原出版, 東京, 1994
- 8) 菅 民郎: 実践多変量解析. 社会情報サービス, 東京, 1993, p82—123
- 9) 竹下公矢, 羽生 丕, 砂川正勝ほか: 再発様式からみた胃癌外科治療の問題点—特に治癒切除例について—. 日外会誌 89 : 173—180, 1988
- 10) Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB: Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a proteinase cascade. *Cell* 47 : 487—498, 1986
- 11) 岡田保典: マトリックスメタロプロテイナーゼの活性調節. 実験医 10 : 44—50, 1992
- 12) 佐藤靖史: プラスミノゲンアクチベーターと血管新生. 臨病理 92 : 155—165, 1992
- 13) 中川和憲, 居石克夫: 血管新生における内皮細胞の役割. 医のあゆみ 170 : 531—535, 1994
- 14) Mars WM, Zarnegar R, Michalopoulos GK: Activation of hepatocyte growth factor by the plasminogen activators uPA and tPA. *Am J Pathol* 143 : 949—958, 1993
- 15) 深尾偉晴, 松尾 理: 転移に関係する間質成分—プラスミノゲン・アクチベーター. 臨科学 29 : 1173—1179, 1993
- 16) 三室 淳: Urokinase-type plasminogen activator (u-PA) と smlasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1) の分子作用機作. 血液・腫瘍科 26 : 184—189, 1993
- 17) Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ et al: Plasminogen activator inhibitor-1 and prognosis in primary breast cancer. *J Clin Oncol* 12 : 1648—1658, 1994
- 18) Reilly D, Christensen L, Duch M et al: Type-1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 50 : 208—214, 1992
- 19) Pyke C, Kristensen P, Ralfkiaer E et al: The plasminogen activation system in human colon cancer: Messenger RNA for the inhibitor PAI-1 is located in endothelial cells in the tumor stroma. *Cancer Res* 51 : 4067—4071, 1991
- 20) Ganesh S, Sier CFM, Griffioen G et al: Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res* 54 : 4065—4071, 1994
- 21) 西野 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
- 22) Nekarda H, Siewert JR, Schmitt M et al: Tumour associated proteolytic factors uPA and PAI-1 and survival in totally resected gastric cancer. *Lancet* 343 : 117, 1994
- 23) 丁 聖民, 川井啓市, 丁 禧民ほか: 胃癌及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
- 24) 大草 康, 小野 聡, 市倉 隆ほか: 胃癌組織の urokinase-type plasminogen activator 並びに同 inhibitor-1 活性の臨床的意義に関する検討. 防衛医大誌 19 : 147—149, 1995
- 25) Romer J, Pyke C, Lund LR et al: Expression of u-PA and its receptor by both neoplastic and stromal cells during xenograft invasion. *Int J Cancer* 57 : 553—560, 1994
- 26) Takai S, Yamamura M, Tanaka K et al: Plasminogen activators in human gastric cancers: Correlation with DNA ploidy and immunohistochemica staining. *Int J Cancer* 48 : 20—27, 1991
- 27) 前田 清, 鄭 容錫, 澤田鉄二ほか: 胃癌の進展, 転移におけるプラスミノゲンアクチベーター発現の意義. 日消外会誌 27 : 1015—1020, 1994

**Expression of Urokinase-Type Plasminogen Activator and Type 1 Plasminogen Activator Inhibitor in Gastric Cancer with Subserosal Invasion  
—Predictive Significance for Recurrence in the Liver—**

Soichi Tomimatsu, Takashi Ichikura and Shoetsu Tamakuma  
First Department of Surgery, National Defense Medical College

The purpose of this study was to determine the correlation between tissue fibrinolytic activity and recurrence in the liver after curative resection for gastric cancer. Among the patients who underwent curative resection for gastric cancer with subserosal invasion, 14 patients who showed recurrence in the liver (RL group) and 30 who survived for five years or longer without any recurrence (control group) were compared clinicopathologically. Paraffin-embedded tissue sections were stained immunohistochemically for urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and its inhibitor (PAI-1) by the streptavidin-biotin method. The staining was judged as positive when 10% or more of the cancer cells were stained. Although higher incidences of metastatic involvement in distant nodes and that of moderate and severe lymphatic invasion were observed in the RL group than in the control group, there were no differences in the rate of proliferating cell nuclear antigen positive cells in the cancer and other pathological factors between the groups. The staining for u-PA was positive in 64.3% of the RL group and 40.0% of the control group. The PAI-1 staining was positive in 28.6% of the RL group and 36.7% of the control group. Positive staining for u-PA and negative staining for PAI-1 was observed in 35.7% of the RL group and 6.7% of the control group ( $p < 0.05$ , chi-square test). Multivariate discriminant analysis revealed that the positive staining for u-PA and negative staining for PAI-1 were useful predictors for hepatic recurrence along with nodal involvement and age at operation. We believe the immunohistochemical staining for u-PA and PAI-1 is a useful predictor for recurrence in the liver after curative resections for gastric cancer.

**Reprint requests:** Soichi Tomimatsu First Department of Surgery, National Defense Medical College  
3-2 Namiki, Tokorozawa, 359 JAPAN

---