

胃膠様腺癌に対する免疫組織学的検討

久留米大学第1外科

孝富士喜久生 武田 仁良 児玉 一成
青柳慶史朗 大田 準二 高宮 博樹
水谷 和毅 緒方 裕 白水 和雄

胃膠様腺癌は腹膜播種やリンパ節転移が高頻度に見られるが、肝転移はまれという特徴がみられる。この特徴ある転移形式の要因を明らかにする目的で、胃膠様腺癌28例と同時性肝転移胃癌例31例を臨床病理学的に検討するとともに、vascular endothelial cell growth factor (VEGF) と matrix metalloproteinase (MMP) の癌巣内発現を免疫組織学的に比較検討した。膠様腺癌例は肝転移例に比べ、v (+) 例が有意に ($p < 0.001$) 少なかったが、占居部位、腫瘍最大径、肉眼型、t, n, ly, P 因子で有意な差はなかった。VEGF と MMP-9の発現の頻度は、膠様腺癌例が21.4%と28.6%、肝転移例が45.2%と51.6%で、両者とも膠様腺癌例で有意に ($p < 0.05$) 低率であった。一方、MMP-2も、膠様腺癌例が32.1%、肝転移例が45.2%で、胃膠様腺癌例の方が低率であったが、有意差はなかった。胃膠様腺癌例に肝転移がみられない理由として、v 因子以外に VEGF や MMP-9の発現が少ないことが考えられた。

Key words: gastric cancer, mucinous adenocarcinoma, vascular endothelial cell growth factor, matrix metalloproteinase-2, matrix metalloproteinase-9

はじめに

胃膠様腺癌は、粘液結節内に癌細胞が浮遊する特徴的な組織像をもつ癌種であり、その転移の特徴として腹膜播種やリンパ節転移が高頻度に見られるものの、血行性転移である肝転移はまれであることがあげられている¹⁾。

癌の血行性転移は、①原発巣における増殖と血管新生、②周辺結合組織への浸潤、③血管内への侵入、原発巣からの遊離、④標的臓器の血管内皮細胞への接着、⑤血管外への脱出と増殖、⑥転移巣での増殖と血管新生、といういくつかの長い過程を経る²⁾が、このプロセスには多数の血管新生因子、プロテアーゼ、接着分子、増殖因子などが関与している。今回、これらの因子のうち、血管新生因子のひとつである vascular endothelial cell growth factor (VEGF) と matrix metalloproteinase (MMP) の癌巣内の発現について、教室で経験した胃膠様腺癌症例と同時性肝転移胃癌症例を対象に免疫組織学的に比較検討したので報告する。

対象と方法

1985年から1994年までの切除単発胃癌1,255例中膠様腺癌例28例(2.2%)と同時性肝転移例31例(2.5%)を対象とした。膠様腺癌例の定義は、膠様腺癌の組織像が癌巣の1/2以上を占めるものとした。両者について、性、年齢、占居部位、腫瘍最大径、肉眼型、t 因子、n 因子、P 因子、ly 因子、v 因子、stage を臨床病理学的に比較検討するとともに、VEGF、MMP-2、MMP-9の癌巣内での発現について免疫組織学的に検索した。使用した一次抗体は、VEGF が R&D 社の抗マウスモノクローナル抗体、MMP-2が Oncogene Science 社製の抗マウスモノクローナル抗体、MMP-9が教室の緒方ら³⁾が作製した抗羊ポリクローナル抗体で、10%ホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4 μ mの薄切切片を作成し、脱パラフィン後 Abidin Biotin Peroxidase (ABC) 法を用いて原発巣内での発現の有無について検索した。陽性癌細胞が癌巣の10%以上を占める場合を陽性例とした。なお、統計学的な有意差検定は χ^2 検定、または t 検定を用い、臨床病理学的用語は胃癌取扱い規約⁴⁾に準じた。

結 果

1. 膠様腺癌例と肝転移例の臨床病理学的比較検討

Table 1 Clinical characteristics of the cases with mucinous adenocarcinoma and the cases with liver metastasis

	Cases with mucinous adenocarcinoma (n=28)	Cases with liver metastasis (n=31)
Average age(#)	65.4±11.2	64.1±11.4
Sex (male : female)	22 : 6	27 : 4
Tumor location		
A	14 (50.0%)	10 (32.3%)
M	4 (14.3%)	3 (9.7%)
C	6 (21.4%)	11 (35.5%)
Others	4 (14.3%)	7 (22.6%)
Tumor size (cm #)	9.1±5.1	10.2±3.7
Gross appearance		
type 0	3 (10.7%)	2 (6.5%)
type 1	4 (14.3%)	2 (6.5%)
type 2	5 (17.9%)	8 (25.8%)
type 3	14 (50.0%)	14 (45.2%)
type 4	2 (7.1%)	5 (16.1%)

: mean ± SD

Fig. 1 a) Case with mucinous adenocarcinoma. The number of vessels in the stroma was less due to destruction by adenocarcinoma cells and mucin (H.E. ×50).

b) Venous invasion was seen prominently in case with liver metastasis (H.E. ×50).

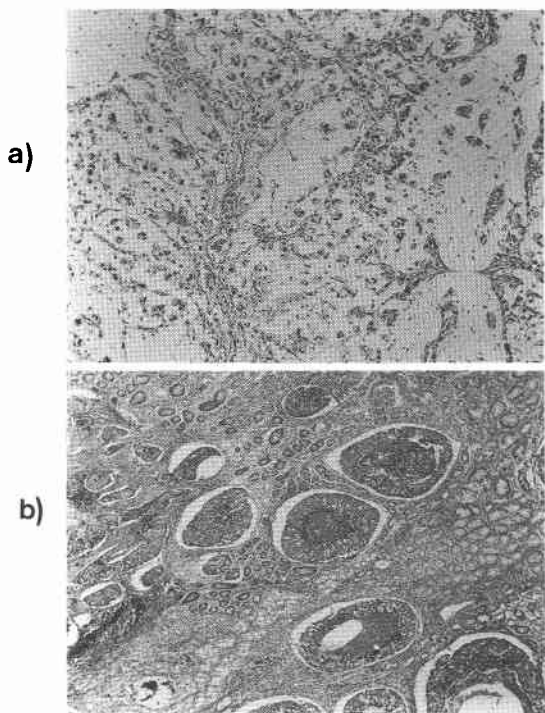


Table 2 Pathological characteristics of the cases with mucinous adenocarcinoma and the cases with liver metastasis

	Cases with mucinous adenocarcinoma (n=28)	Cases with liver metastasis (n=31)
Depth of invasion		
t1	4 (14.3%)	2 (6.5%)
t2	5 (17.9%)	2 (6.5%)
t3	14 (50.0%)	17 (54.8%)
t4	5 (17.9%)	10 (32.3%)
Lymph node metastasis		
n0	5 (14.9%)	4 (12.9%)
n1	6 (21.4%)	3 (9.7%)
>n2	17 (60.7%)	24 (77.4%)
Lymphatic invasion		
ly0	1 (3.6%)	0
ly1	4 (14.3%)	3 (9.7%)
ly2	6 (21.4%)	5 (16.1%)
ly3	17 (60.7%)	23 (74.2%)
Venous invasion		
v0	12 (42.9%)	1 (9.7%)*
v1	9 (32.1%)	3 (9.7%)
v2	6 (21.4%)	9 (29.0%)
v3	1 (3.6%)	18 (58.1%)*
Peritoneal invasion		
P(-)	21 (25.0%)	17 (54.8%)
P(+)	7 (25.0%)	14 (45.2%)
Stage		
I	5 (17.9%)	0
II	2 (7.1%)	0
III	6 (21.4%)	0
IV	15 (53.6%)	31 (100%)*

* : p < 0.001

臨床的な特徴の比較では、両者とも性別では男性が多くを占め、平均年齢では膠様腺癌例が65.4±11.2歳、肝転移例が64.1±11.4歳であった。占居部位では、膠様腺癌例は A 領域が多く、肝転移例は C 領域が多かったが有意な差はなかった。肉眼型は、両者とも 3 型が多く、平均腫瘍最大径も膠様腺癌例が9.1±5.1cm、肝転移例が10.2±3.7cm で有意な差はなかった (Table 1)。病理組織学的特徴の比較では、両者とも t 因子では t₃が多く、n 因子では n₂以上が多くを占め、有意な差はなかった。また、ly 因子や P 因子の比較でも有意な差はなかった。一方、v 因子では、肝転移例で血管侵襲が高度な例が多いのに対し、膠様腺癌例では間質が貯留した粘液により破壊されるため、癌巣内での血管数は少なく、血管侵襲も軽度またはみられない症例が多かった (Fig. 1)。v (+) 率は、膠様腺癌例が57.1%

Fig. 2 Immunohistochemical staining of VEGF.

The expressions of VEGF are observed mainly in the cytoplasm of the cancer cells.

a) Mucinous adenocarcinoma ($\times 100$). b) Well differentiated adenocarcinoma with liver metastasis ($\times 100$)

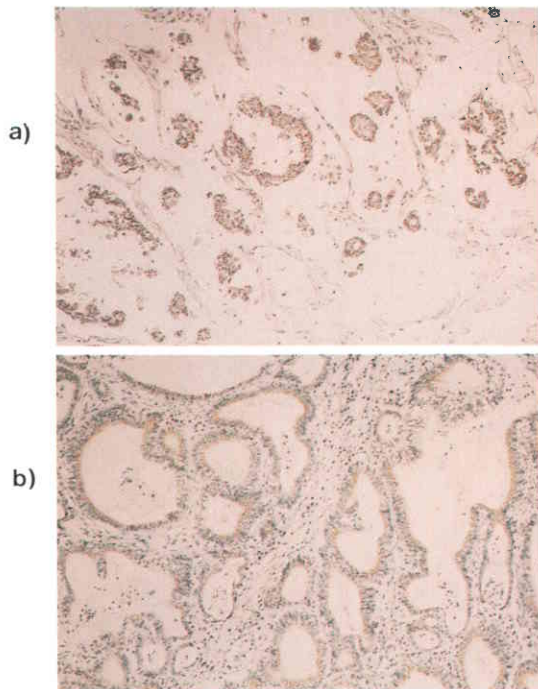
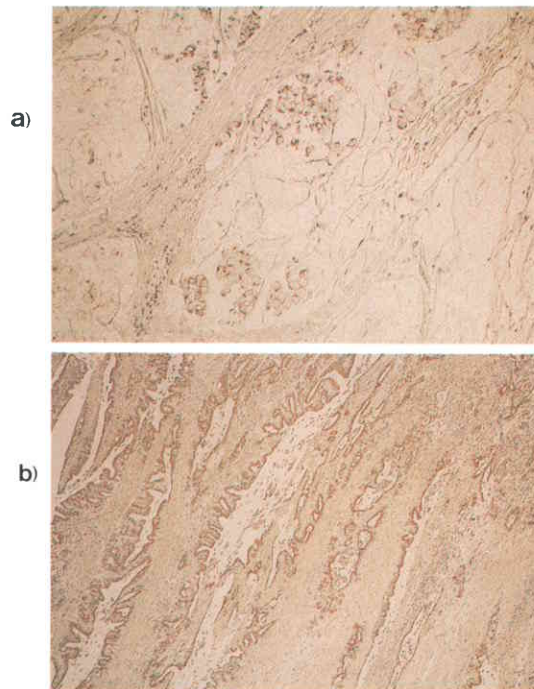


Fig. 3 Immunohistochemical staining of MMP-9.

The expressions of MMP-9 are observed mainly in the cytoplasm of the cancer cells.

a) Mucinous adenocarcinoma ($\times 100$). b) Well differentiated adenocarcinoma with liver metastasis ($\times 50$)



肝転移例が96.8%で、肝転移例の方が有意に ($p < 0.001$) 高かった。また、肝転移例の stage は全例 stage IV であったが、膠様腺癌例では stage IV の占める比率は53.6%にとどまった (Table 2)。

2. 原発巣における VEGF, MMP-9, MMP-2 の発現について

癌細胞での VEGF の局在は、膠様腺癌例、肝転移例とも胞体内にみられた (Fig. 2)。VEGF 陽性率は、膠様腺癌例：21.4%、肝転移例：45.2%で、膠様腺癌例で有意に ($p < 0.05$) 低率であった。また、癌細胞における MMP-9 と MMP-2 の局在も膠様腺癌例、肝転移例とも胞体内にみられたが (Fig. 3, 4)、MMP-9 陽性率は、膠様腺癌例：28.6%、肝転移例：51.6%で、膠様腺癌例で有意に ($p < 0.05$) 低率であったのに対し、MMP-2 陽性率は、膠様腺癌例：9 例 (32.1%)、肝転移例：14 例 (45.2%) で、両者間で有意な差はなかった。また、VEGF, MMP-9, MMP-2 の 3 者の関係では、3 者とも同時に陽性であった症例は、膠様腺癌例：2

例 (7.1%)、肝転移例：11 例 (35.5%) で、膠様腺癌例で有意に ($p < 0.01$) 低率であった (Table 3)。なお、肝転移例における肝転移の程度は、 H_1 ：2 例、 H_2 ：11 例、 H_3 ：18 例で H_2 以上の症例が多かったが、肝転移の程度と原発巣における VEGF, MMP-9, MMP-2 陽性率との関係では、有意な関連はみられなかった (Table 4)。

考 察

胃の膠様腺癌と肝転移例とを臨床病理学的に比較すると、肝転移以外の諸因子、すなわち、性、年齢、占居部位、腫瘍最大径、肉眼型、t 因子、n 因子、P 因子、ly 因子において有意な差がなかったが、v 因子陽性率は肝転移例に比べ有意に低率であった。この要因として、膠様腺癌の癌巣内間質が主に粘液で構成されているために既存の間質、とくに血管が破壊されていることが考えられた。

つぎに、肝転移と密接な関連がある血管新生因子の VEGF と基底膜中のタイプIVコラーゲン分解能をも

Table 3 The rates of VEGF, MMP-9 and MMP-2 expressions

	Cases with mucinous adenocarcinoma (n=28)	Cases with liver metastasis (n=31)
VEGF(+) MMP-9(+)MMP-2(+)	2(7.1%)	11(35.1%)*
MMP-9(+)MMP-2(-)	3(10.7%)	2(6.5%)
MMP-9(-)MMP-2(+)	0	1(3.2%)
MMP-9(-)MMP-2(-)	1(3.6%)	0
VEGF(-) MMP-9(+)MMP-2(+)	2(7.1%)	1(3.2%)
MMP-9(+)MMP-2(-)	1(3.6%)	2(9.7%)
MMP-9(-)MMP-2(+)	5(17.9%)	2(3.2%)
MMP-9(-)MMP-2(-)	14(50.0%)	12(38.7%)

* : p<0.01

Fig. 4 Immunohistochemical staining of MMP-2.

The expressions of MMP-2 are observed mainly in the cytoplasm of the cancer cells.

a) mucinous adenocarcinoma (×100), b) moderately differentiated adenocarcinoma with liver metastasis (×50).

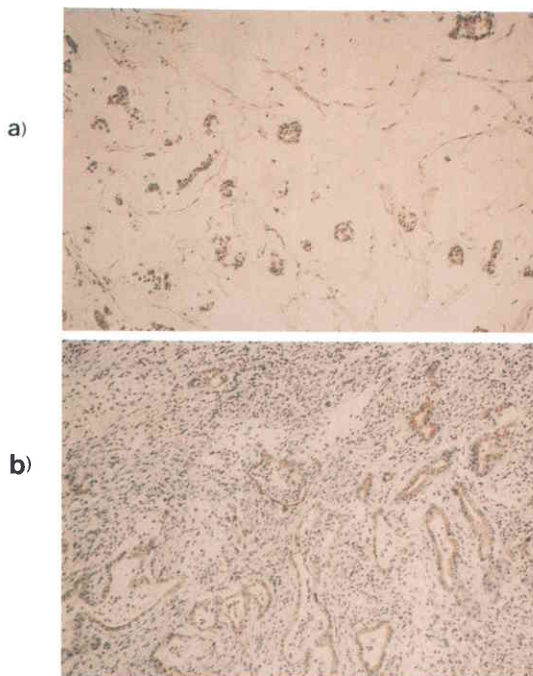


Table 4 Relationship between the degree of H factor and the rates of VEGF, MMP-9 and MMP-2 expressions

H factor	VEGF	MMP-9	MMP-2
H ₁ (n=2)	1(50.0%)	1(50.0%)	2(100%)
H ₂ (n=11)	5(45.5%)	6(54.5%)	4(36.4%)
H ₃ (n=18)	8(44.4%)	11(61.1%)	8(44.4%)

皮細胞と一部の単球系に限られており、現在非常に注目を集めている血管新生因子の1つである⁵⁾、シグナル配列を有する分泌性のペプチドを有し、血管内皮細胞の増殖を特異的に促進する。レセプターである fmslike tyrosine kinase (Flt)-1や kinase insert domain-containing receptor (KDR)/fetal liver kinase(Flk)-1が、血管内皮細胞に特異的に発現しており⁷⁾、Flt を介して腫瘍血管を形成するというパラクリン系の存在が示唆されている⁵⁾。

膠様腺癌例と肝転移例の VEGF の発現を比較すると、膠様腺癌例は肝転移例に比べ、VEGF 発現率が有意に低率であった。前田ら⁷⁾も胃癌治癒切除例を対象に VEGF の免疫組織学的検討を行い、VEGF 発現例は非発現例に比し有意に肝再発率が高かったと述べている。また、乳癌においても、VEGF 陽性例は血管密度が高く、予後不良とされている⁸⁾⁹⁾。

腫瘍血管新生には以下の3つの段階を経て進むと考えられている²⁾。①血管内皮細胞による基底膜と細胞外基質の消化、②血管内皮細胞の遊走と増殖、③血管内皮細胞の管腔形成と毛細管網の形成である。VEGF は、血管内皮細胞の extravasation, proliferation, migration, tube formation, differentiation といった血管新生のすべての過程に作用する general endothelial growth factor とされている¹⁰⁾。また、血管新生

つ MMP-9と MMP-2について免疫組織学的に検討した。従来、血管新生因子の研究は fibroblast growth factor (FGF) や tumor growth factor (TGF) α などを中心に行われてきたが、標的細胞が多岐にわたり、血管内皮細胞に特異的な因子とはいえなかった⁵⁾。VEGF は、1989年に同定され⁶⁾、その生物学的活性は内

過程において血管内皮細胞は、さまざまな血管新生因子に応答してプロテアーゼを産生しており、この酵素の産生は細胞外基質や間質組織消化に必須で、血管新生を開始するうえでも重要な鍵となる現象と考えられている²⁾。

Folkmanら¹¹⁾は、固形腫瘍がある一定の大きさ(1~2mm³)以上に急速に増殖する場合、腫瘍血管新生が必要であることを報告した。また、腫瘍にとって血管新生は増殖を促進させるのに必要である以外に、原発巣から癌細胞が血管系へ侵入する経路としても重要であり²⁾、腫瘍が誘導した新生血管は基底膜が薄く分断されやすく、腫瘍細胞は正常血管より腫瘍血管内に侵入しやすくなっている。さらに、血管新生は転移形成の最終段階にも必要であり、血流中の血管新生誘導性の腫瘍細胞は、標的臓器に達した後、血管新生を誘導し、転移巣を形成する。すなわち、癌の異常増殖性のみならず転移能の発現も、血管新生に依存しているのである¹²⁾。

最近では、VEGF-Flt family系に着目し、腫瘍の増殖を抑制しようとする試みがはじまっており、VEGFに対する抗体を用いてVEGFを不活化させたり¹³⁾、Flk-1の変異型を腫瘍細胞に dominant-negative に導入する試みなどが行われており¹⁴⁾、VEGFをはじめ、血管新生因子のリガンドレセプター機構の解明は血管内皮細胞に特異的な阻害剤を開発する上でも重要と考えられている¹²⁾。

MMP-2とMMP-9は、マトリックスメタロプロテナーゼの中でも基底膜の構成成分であるタイプIVコラーゲン分解能をもち、活性化型MMPの高レベルの発現は高転移性癌細胞の少なくとも必要条件と考えられている¹⁵⁾。磨伊ら¹⁶⁾は、MMP-2とMMP-9の発現を免疫組織学的に検討し、進行胃癌では、それぞれ41%と49%にみられたと報告している。自験例でも、肝転移例ではMMP-2:45.2%、MMP-9:51.6%で、両者とも40%以上の陽性率であった。大腸癌においても、肝転移例の方が非肝転移例より原発巣においてMMP-9の陽性率が有意に高く¹⁷⁾、緒方ら¹⁷⁾は、MMP-9が微小環境の変化に応じて産生される肝転移形質のひとつである可能性を示唆している。MMPが肝転移形質となりうるか否かは原発巣と肝転移巣でのMMPの発現を比較検討することが必要であるが、自験例では肝転移巣合併切除例が少ないため原発巣と比較検討することができなかった。教室の赤木¹⁸⁾はzymogramを用いて大腸癌原発巣とその肝転移巣のMMP-2およ

びMMP-9分泌能を検出し、MMP-9分泌能が原発巣に比し肝転移巣で有意に高かったことより、原発巣中のMMP-9産生性のクローンが選択的に肝臓で着床し増殖した結果肝転移巣における分泌能が高くなったと考察しており、MMPの中でもとくにMMP-9を肝転移形質として注目している。

MMP-2とそのインヒビターであるtissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP)-2との関連について、梶原ら¹⁹⁾は、胃癌症例を対象に両者のmRNAを検索し、静脈侵襲例、肝転移例とも癌部でMMP-2のmRNAが高率に発現する一方で、TIMP-2 mRNAの発現が低下し、MMP-2の過剰発現がみられたことから、MMP-2とTIMP-2の不均衡が肝転移に関与している可能性を述べている。また、MMP-9とそのインヒビターであるTIMP-1の発現を検討することが大腸癌の異時性肝転移の予知に有用であることが指摘されており²⁰⁾、今後MMPとTIMPの相互関係を明らかにしていくことが重要と思われた。近年、TIMPを含めたMMPのインヒビターを癌の抗転移治療に利用することが考えられており²¹⁾、その効果が期待される。

文 献

- 1) 孝富士喜久生, 武田仁良, 児玉一成ほか: 胃膠様腺癌の臨床病理学的特徴. 臨と研 73: 98-100, 1996
- 2) 中山喜文, 後 信, 小野真弓ほか: 血管新生と癌転移. Mol Med 32: 406-412, 1995
- 3) Ogata Y, Pratta MA, Nagase H, et al: Matrix metalloproteinase 9(92-kDa gelatinase/type IV collagenase) is induced in rabbit articular chondrocytes by cotreatment with interleukin 1 β and a protein kinase C activator. Exp Cell Res 201: 245-249, 1992
- 4) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第12版. 金原出版, 東京, 1993
- 5) 高橋知子, 渋谷正史: VEGF受容体と微小血管. 現代医療 26: 79-83, 1994
- 6) Ferrara N, Henzel WJ: Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding cells. Biochem Biophys Res Commun 161: 851-858, 1989
- 7) 前田 清, 鄭 容錫, 小川佳成ほか: 胃癌の再発予測因子としてのVascular Endothelial growth factorの発現. 癌と治療 22: 699-701, 1995
- 8) 富永 健, 戸井雅和: 予後と腫瘍血管. 現代医療 26: 43-46, 1994
- 9) Toi M, Hoshima S, Takayanagi T et al: Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. Jpn

- J Cancer Res 85 : 1045-1049, 1994
- 10) 戸井雅和, 谷口忠明, 山本 豊, 他: 血管新生因子と血行性転移. 消外 18 : 1965-1970, 1995
 - 11) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenetic factors. Science 234 : 442-447, 1987
 - 12) 及川 勉: 癌増悪機能と血管新生. 最新医 50 : 70-83, 1995
 - 13) Kim JK, Li B, Winner J et al: Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. Nature 362 : 841-844, 1993
 - 14) Millauer B, Shawver LK, Plate KH et al: Glioblastoma growth inhibited in vivo by a dominant-negative FLK-1 mutant. Nature 367 : 576-579, 1994
 - 15) 佐藤 博: メタロプロテアーゼの産生と転移. Mebio 9 : 65-69, 1992
 - 16) 磨伊正義, 土屋百合, 渡辺美智夫ほか: メタロプロテアーゼとそのインヒビター. 外科治療 71 : 176-182, 1994
 - 17) 緒方 裕, 諸富立寿, 大北 亮ほか: 大腸上皮性腫瘍における matrix metalloproteinase 9(gelatinase B)の発現変化. 日消外会誌 28 : 2194-2199, 1995
 - 18) 赤木由人: 肝転移に関する matrix metalloproteinase-2と matrix metalloproteinase-9の分泌能の研究—ヌードマウス大腸癌自然肝転移モデルによる検討—. 日本大腸肛門病会誌 47 : 552-563, 1994
 - 19) 梶原哲郎, 小川健治: マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) と血行性転移. 消外 18 : 1933-1939, 1995
 - 20) 緒方 裕, 大北 亮, 掛川暉夫: 大腸癌肝転移における MMP-9および TIMP-1産生の意義. 日臨 53 : 255-259, 1995
 - 21) 中島元夫: 細胞外マトリックス分解酵素. Mebio9 : 57-64, 1992

Immunohistochemical Study on Gastric Cancers with Mucinous Adenocarcinoma

Kikuo Koufuji, Jinryo Takeda, Issei Kodama, Keishirou Aoyagi, Junji Ohta,
Hiroki Takamiya, Kazuku Mizutani, Yutaka Ogata and Kazuo Shirouzu
First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine

Gastric cancers with mucinous adenocarcinoma had no liver metastases despite frequently having peritoneal and lymphatic metastases. To clarify the reason for gastric cancers with mucinous adenocarcinoma having no liver metastases, we investigated 28 gastric cancers with mucinous adenocarcinoma and 31 gastric cancers with liver metastasis clinicopathologically and studied the expressions of VEGF, MMP-9 and MMP-2 immunohistochemically. There was no differences, clinicopathologically, between the former and the latter except for V factor and H factor. The rates of VEGF and MMP-9 expressions were 21.4% and 28.6%, respectively, in the former and were significantly lower than those in the latter. On the other hand, the rate of MMP-2 expression in the former was 32.1%, and showed no significant difference with that in the latter. These results suggest that VEGF and MMP-9, produced in tumor cells, may play an important role in the development of liver metastasis in gastric cancer.

Reprint requests: Kikuo Koufuji First Department of Surgery, Kurume University School of Medicine
67, Asahi-machi, Kurume, 830 JAPAN