

特集 1

胃癌の転移, 浸潤のメカニズム

札幌医科大学医学部第1外科

伝野 隆一 平田 公一 八十島孝博 宍戸 隆之
浦 英樹 山口 浩司 水口 徹 佐藤 文彦

胃癌の転移・浸潤機序を解明するためにヒト胃癌細胞株 AZ521からヌードマウスの肝臓に高率に転移する AZ-H5c を作製し, 両者を比較することにより転移・浸潤の各ステップについて検討した。① E-カドヘリン, α カテニン, β カテニンについて, ② MMP2, MMP9 について, ③ インテグリン, CD44 について検討した。AZ-H5c は AZ521 に比べ, 高い運動能をもち, MMP-9, インテグリン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, インテグリン $\beta 1$, CD44v3 の発現量が増強していた。胃癌の臨床材料での検討ではインテグリン $\alpha 2$ の発現とリンパ節転移が関係し, インテグリン $\alpha 3$ の発現と肝転移が関係していた。MMP-9 に関してはこれまでの病理学的因子と関係はみられなかった。今後胃癌の転移・浸潤に関する機序が解明されることにより機能を温存した縮小手術の適応を拡大できるものと考えられる。

Key words: gastric carcinoma, metastasis/invasion in gastric carcinoma, adhesion molecules in gastric carcinoma

はじめに

消化器癌の転移・浸潤は極めて多くの複雑なステップを経た後に形成されるものと考えられる。最近は分子生物学的手法により各ステップに関する新しい知見が得られている。①主病巣からの細胞離脱には E-カドヘリンやその裏打ち蛋白である α カテニン, β カテニンなどが関与し, ②基底膜の分解・破壊には細胞外マトリックスを分解するマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinases, MMPs) や MMPs を最終段階で抑制的に制御する TIMPs (tissue inhibitors of metalloproteinases) などが関与し, ③血管内に侵入した細胞が標的臓器の血管内皮細胞と接着するためには癌細胞表面にあるインテグリン・ファミリー, CD44 などが関与すると考えられる。

これらの各ステップに関して, 我々はヒト胃癌細胞株からヌードマウスの肝臓に高率に転移する細胞株を作製し, 親株と比較することにより, 胃癌の浸潤・転移のメカニズムについて検討したので報告する。

I. 高転移性細胞株の作製¹⁾

* 第50回日消外会総会シンポ2・癌細胞と間質との相互関係からみた転移, 浸潤の諸問題
<1997年12月3日受理>別刷請求先: 伝野 隆一
〒060-0061 札幌市中央区南1条西16 札幌医科大学
医学部第1外科

Fidler²⁾の方法に準じて, ヒト胃癌細胞株 AZ521 5×10^6 個をヌードマウスの脾臓に接種し, 5 週後ヌードマウスの肝臓にできたわずかな転移巣から得られた細胞を *in vitro* で培養した。この操作を 5 回繰り返すことにより, ニードマウスの肝臓に高率に転移する高転移性細胞株 AZ-H5c を作製した。この細胞株の転移率は 83% である。以下この細胞株を用いて比較検討した。

II. 高転移性細胞株の特徴

1. ヒト胃癌細胞株の運動能

ポイデン・チャンパーの上室に細胞浮遊液 AZ521 (1×10^4) および AZ-H5c (1×10^4) を注入し, 2 日間培養した。下室に移動した細胞をメタノール固定し, それをギムザ染色し, 100 倍の視野で検鏡した。

対象液中におけるそれぞれの平均細胞数は AZ521 35.7cells/field, AZ-H5c 228.5cells/field であり, AZ-H5c の運動能は有意に高い値を示した。培養液中の Ca^{2+} 濃度を 0.2mM に低くすると AZ521 は 14.3cells/field, AZ-H5c は 469cells/field であり, AZ521 は Ca^{2+} 濃度による変化はみられないが AZ-H5c は有意に高くなっていった。AZ521 の運動能は Ca^{2+} 濃度に関係なく低いままであったが AZ-H5c の運動能は Ca^{2+} 濃度が低いほうが高かった。

2. ヒト胃癌細胞株における E-カドヘリンの発現量
AZ-521 と AZ-H5c を E-カドヘリンのモノクローナ

ル抗体である HECD-1 で染色し、その発現量を FACS で検討した。AZ-521 の発現陽性細胞は 5.0%、AZ-H5c の発現陽性細胞は 2.5% と発現量そのものが低く、両者に有意差はみられなかった。

3. ヒト胃癌細胞株における α -カテニン、 β -カテニンの発現量

E-カドヘリンは細胞間のカルシウム依存性の細胞間接着分子であり、その細胞内ドメインには裏打ち蛋白として α -カテニン、 β -カテニンが結合している。癌細胞転移の最初のステップにおいては癌細胞が当該組織から遊離することが必須である。しかし、E-カドヘリンの発現があるにもかかわらず細胞間接着を示さない癌細胞では α -カテニン³⁾、 β -カテニン⁴⁾ の発現低下が関与しているものと考えられる。そこで Western blotting 法で AZ521 および AZ-H5c の α -カテニンおよび β -カテニンの発現量を測定した。

AZ521 における α -カテニンの発現量を 100 としたとき AZ-H5c の発現量は 158 と差はみられなかった。次に AZ521 における β -カテニンの発現量を 100 としたとき AZ-H5c の発現量は 314 と著明に増加していた。カテニンは細胞内のアクチンフィラメント相互作用を示し、カテニンを介したカドヘリンと細胞骨格蛋白の相互作用はカドヘリン-カテニン複合体の接着帯への局在を高め、付着帯に安定性を与えると考えられている。しかし、今回の結果では転移能の高い AZ-H5c において β -カテニンの発現増強がみられ、かつ運動能が増強していた。

一方、低分子量 G 蛋白質のうち *Rho* はアクトミオシン系を介して細胞形態の維持や運動能に関係していると言われている⁵⁾。したがって E-カドヘリンを介して細胞外からの情報がカテニンに伝達され、細胞接着機能に関係すると同時に細胞の運動能にも関係するものと考えられる。

4. ヒト胃癌細胞株における MMP-2 と MMP-9 の発現量

癌細胞は浸潤性増殖する場合に細胞周辺の細胞外マトリックスを分解しながら周辺組織を破壊する。この細胞外マトリックスを分解する酵素として MMPs がある。この MMPs の活性を抑制的に制御しているのが TIMPs である。MMPs はその基質特異性から大きく 5 つのグループに分けられる。このうち今回は 72kD タイプ IV コラゲナーゼ (ゼラチナーゼ A, MMP-2) と 92kD タイプ IV コラゲナーゼ (ゼラチナーゼ B, MMP-9) をザイモグラフィで測定した。

MMP-2 に関しては ZA521 を 100 とすると AZ-H5c は 139 であり、大きな差はみられなかった。MMP-9 に関しては AZ521 を 100 とすると AZ-H5c は 589 であり、有意に AZ-H5c が高い活性を示した。胃癌では MMP-2 の活性上昇が癌の浸潤・転移に関係が深いと言われているが⁶⁾細胞株を用いた今回の結果では MMP-2 よりは MMP-9 が肝転移に関係しているものと考えられた。

5. ヒト胃癌細胞株におけるインテグリン、CD44 の発現量

次に遊離した腫瘍細胞が細胞外マトリックスや血管内皮細胞に接着するためにはインテグリン、CD44 など接着分子の役割が考えられる。

AZ521 および AZ-H5c におけるインテグリン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\beta 1$, $\alpha v \beta 3$, CD44H, CD44V3, CD44v6 の発現量をモノクローナル抗体を用い FACS にて解析した。

インテグリン $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, インテグリン $\beta 1$ の発現量は AZ-H5c で増強し、インテグリン $\alpha 6$ の発現量は AZ-H5c で低下していた。インテグリンの発現の違いにより浸潤、転移能が異なるとする報告は多数みられる。しかしその詳細についてはいまだ不明な点が多い。

また CD44H, CD44V6 の発現量は AZ521 および AZ-H5c いずれの細胞株においても低く変化を認めなかったが CD44v3 の発現量は AZ-H5c で増強していた。CD44 が転移に強く関係すると考えられるのは CD44 のリガンドであるヒアルロン酸の発現が認められる血管内皮細胞と癌細胞が接する部分と考えられる。CD44 強陽性症例は弱陽性症例に比較して有意に予後不良であるといわれている⁷⁾。

以上の結果に基づいて臨床例について検討を加えた。

III. 臨床への応用

1. インテグリンの発現と肝・リンパ節転移の関係

インテグリンと転移の関係については肺癌でインテグリン $\alpha 2$ が正常組織の 20 倍も増加しているとの報告⁸⁾、インテグリン $\alpha 2$ の発現量が高い骨肉腫細胞は浸潤性が高いとの報告⁹⁾、乳癌でインテグリン $\alpha 3$ の発現のあるものはリンパ節転移頻度が高いとの報告¹⁰⁾などがある。

対象は当科で切除した原発性胃癌 110 例を対象とした。方法は切除標本のパラフィン包埋ブロックから連続切片を作製し、インテグリン $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ に対する

モノクローナル抗体を用い, SAB法にて免疫組織化学染色を行った. 判定は染色された癌細胞の比率が10%以上の検体を陽性, 10%未満を陰性と判定した.

インテグリンの発現率はインテグリン $\alpha 2$ は30例/110例 (27.3%), インテグリン $\alpha 3$ は22例/110例 (20.2%), インテグリン $\alpha 4$ は16例/110例 (14.5%)であった. リンパ節転移とインテグリンの発現の関係をみるとリンパ節転移のない症例のインテグリン $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ の発現率は50%, 59%, 61%であり, リンパ節転移のある症例における発現率は78%, 70%, 58%であり, 有意差がみられたのはインテグリン $\alpha 2$ であった (Fig. 1).

次に肝転移とインテグリンの発現の関係をみると, 肝転移のない症例におけるインテグリン $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ の発現率は24%, 24%, 26%であり, 肝転移のある症例における発現率は40%, 50%, 25%と, 有意差をみたのはインテグリン $\alpha 3$ であった (Fig. 2). ヒト胃癌細胞株における肝転移実験の結果からはインテグリン $\alpha 3$ だけではなく $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ も高転移株 AZ-H5cで高値を示した.

2. MMP-9の発現と予後

MMP-9は大腸癌, 乳癌, 肺癌などほとんどの上皮由

来の癌細胞で高いレベルの発現がみられ, 大腸癌では明瞭な転移性との相関が得られている¹¹⁾.

対象は当科で切除した原発性胃癌102例を対象とした. 方法は切除標本のパラフィン包埋ブロックから連続切片を作製し, MMP-9に対する抗体を用い, SAB法にて免疫組織化学染色を行った. 判定は染色された癌細胞の比率が10%以上の検体を陽性, 10%未満を陰性と判定した.

MMP-9の腫瘍細胞における発現率は85例/102例 (83.3%), 転移性リンパ節における発現率は42例/102例 (72.4%)であった. MMP-9の発現と組織型 (分化型, 未分化型), 胃癌深達度, リンパ節転移度, リンパ管侵襲の程度, 静脈侵襲の程度, 腹膜播種の程度について検討したがいずれも有意差はなかった. しかしリンパ管侵襲 ly_0 と $ly_1+ly_2+ly_3$ に分けて検討するとリンパ管侵襲の陽性例でMMP-9の発現率が有意に高

Fig. 1 Correlation of the expression of integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and lymph node metastasis (* <0.05)

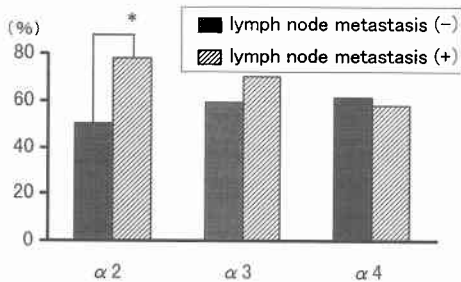


Fig. 2 Correlation of integrin $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$ and liver metastasis (* <0.05)

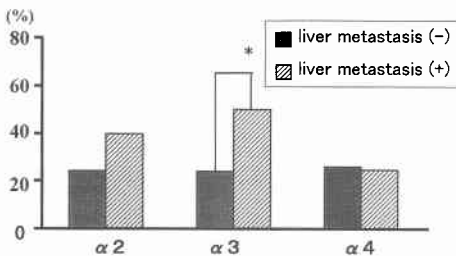
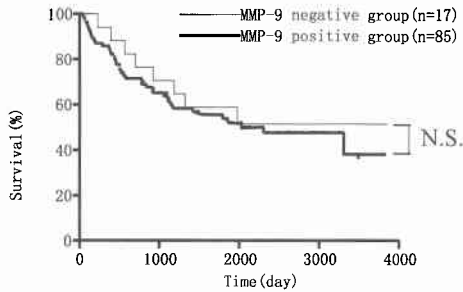


Table 1 Correlation of the clinico-pathologic characteristics and the expression of MMP-9 on human gastric carcinoma

	positive/all(%)	expression of MMP-9 value	p
pathological type			N.S.
differentiated	46/55 (83.6)		
undifferentiated	38/46 (82.6)		
wall invasion			N.S.
m, sm	30/39 (76.9)		
mp, ss	38/45 (84.4)		
se, sei	12/13 (92.3)		
lymph node metastasis			N.S.
n0	30/40 (75.0)		
n1	27/30 (90.0)		
n2	22/26 (84.6)		
n3,4	6/6 (100)		
lymphatic invasion			N.S.
ly0	15/21 (71.4)	}	p=0.044
ly1	2/2 (100)		
ly2	22/26 (84.6)		
ly3	8/9 (88.9)		
venous invasion			N.S.
v0	71/87 (81.6)		
v1	10/10 (100)		
v2	4/5 (80.0)		
peritoneal metastasis			N.S.
p0	29/87 (33.3)	}	p=0.034
p1	5/7 (71.4)		
p2	1/2 (50.0)		
p3	4/6 (66.7)		

Fig. 3 Relationship between expression of MMP-9 and survival



かった。また腹膜播種性転移度の関しては P_0+P_1 と P_2+P_3 とを比較すると播種の程度が高いほうが MMP-9 の発現率が有意に高かった (Table 1)。しかし MMP-9 の発現の有無による生存率には差はみられなかった (Fig. 3)。

IV. 今後の展望

今後胃癌の生物学的悪性度に関する情報が得られ、また転移・浸潤に関する機序が解明されることにより機能を温存した縮小手術あるいは拡大手術、そして内視鏡的粘膜切除術 (EMR) の適応決定に有用と考えられた。

文 献

- Denno R, Yasoshima T, Hirata K et al: Tumorigenicity, motility and liver metastasis of human gastric carcinoma lines with high metastatic potential in the liver of nude mice. *Tumor Res* 30 : 57-65, 1995
- Fidler IJ: Selection of successive tumor lines for metastasis. *Nature New Biol* 242 : 148-149, 1973
- Matsui S, Shiozaki H, Inoue M et al: Immunohistochemical evaluation of alpha-catenin expression in human gastric cancer. *Virchow Arch* 424 : 375-381, 1994
- Kawanishi J, Kato J, Sasaki K et al: Loss of E-cadherin-dependent cell-cell adhesion due to mutation of the β -catenin gene in a human cancer cell line, HSC-39. *Mol Cell Biol* 15 : 1175-1181, 1995
- Ridley AJ, Hall A: The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* 70 : 389-399, 1992
- Nomura H, Fujimoto N, Seiki M et al: Enhanced production of matrix metalloproteinase and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *Int J Cancer* 69 : 9-16, 1996
- Washington K, Gottfried MR, Telen MJ: Expression of the cell adhesion molecule CD 44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol* 25 : 1043-1049, 1994
- Languino LR, Gehlsen KR, Carter WG et al: Endothelial cells alpha 2 beta 1 integrin as a laminin receptor. *J Cell Biol* 109 : 2455-2462, 1989
- Albida SM, Mette SA, Elder DE et al: Integrin distribution in malignant melanoma: association of the beta 3 subunit with tumor progression. *Cancer Res* 50 : 6757-6764, 1990
- Koukoulis GK, Virtanen I, Korhonen M et al: Immunohistochemical localization of integrins in the normal, hyperplastic, and neoplastic breast. Correlation with their functions as receptors and cell adhesion molecules. *Am J Pathol* 139 : 787-799, 1991
- Nakajima M, Morikawa K, Fabra A et al: Influence of organ environment on extracellular matrix degradative activity and metastasis of human colon carcinoma cells. *J Natl Cancer Inst* 82 : 1890-1898, 1990

Mechanism of Metastasis and Tumor Invasion in Gastric Carcinoma

Ryuichi Denno, Koichi Hirata, Takahiro Yasoshima, Takayuki Shishido,
Hideki Ura, Koji Yamaguchi, Toru Mizuguchi and Fumihiko Sato
First Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine

Surgery should be a curative and minimally invasive treatment for early gastric cancer. Therefore we need to know the biology of malignancy of gastric carcinoma. We established a new cell line, AZ-H5c, which has a high potential of metastasis to the nude mice liver, from the human gastric carcinoma line AZ521. Experimental studies revealed that, compared with AZ521 cells, AZ-H5c cells moved more actively, had stronger enzymatic activity of MMP-9, and expressed higher levels of integrin alpha 1, alpha 2, alpha 3, alpha 4, alpha 5, integrin beta 1 and CD44v3. Based on the above information, we investigated the clinico-pathologic characteristics of patients with carcinoma of the stomach. There were significant correlations of integrin alpha 2 and lymph node metastasis and integrin alpha 3 and liver metastasis. There was no correlation of clinico-pathologic characteristics and the expression of MMP-9, nor was the MMP-9 staining pattern related to survival. To foster the development of more effective, minimally invasive surgery, we should continue to accumulate data on gastric carcinoma so as to improve diagnostic accuracy regarding lymph node metastasis, the pattern of recurrence and other factors.

Reprint requests: Ryuichi Denno First Department of Surgery, Sapporo Medical University School of Medicine
Minami 1 Jyo Nishi 16, Chuo-ku, Sapporo, 060-0061, JAPAN
