

特集2

## 胃癌の浸潤・転移における間質の意義 —スキルス胃癌と非スキルス胃癌とを対比して—

国立東京第二病院外科・臨床研究部, 東京歯科大学市川総合病院外科<sup>1)</sup>

国立埼玉病院外科<sup>2)</sup>, 慶應義塾大学外科<sup>3)</sup>

窪地 淳 島田 敦 松井 英男  
磯部 陽 島 伸吾 小川 信二<sup>1)</sup>  
吉野 肇一<sup>1)</sup> 石引 久弥<sup>2)</sup> 北島 政樹<sup>3)</sup>

スキルス胃癌と非スキルス胃癌とを対比し, 臨床病理学的動態すなわち浸潤・転移への間質の意義について検討した。その結果, I型およびIV型コラーゲンに対する分解酵素活性値は, いずれも非スキルス胃癌で高い値を示していたが, TIMP-1はスキルス胃癌の癌組織中に豊富に存在し, 胃癌患者の血清中においてもスキルス胃癌で高い値を示していた。

我々はいずれの胃癌においても癌組織内のコラーゲン産生が亢進していることを報告してきたが, 今回の成績と考え合わせると, 癌組織内へのコラーゲンの蓄積の差は, 胃癌組織内のこの分解動態の差によって生じるものと考えられた。また, スキルス胃癌では間質の蓄積は, 癌細胞が増殖・進展するために合目的に行われているものと推測され, 血清中のTIMP-1の動態は, 未分化型腺癌特にスキルス胃癌の臨床的特徴であるリンパ行性・腹膜播種と何らかのかかわりがあるものと考えられた。

**Key words:** scirrhous type of gastric cancer, metalloproteinase and tissue inhibitor of metalloproteinase, cancer invasion and metastasis of gastric cancer

### はじめに

近年, 分子生物学や生化学などの分野のめざましい発展に伴い, 結合組織に関する基礎的な研究も多岐にわたり, 形態学的, 生化学的ないしは生理学的な面から, 結合組織に関する多くのことが解明されてきた。

その一つとして, 各種コラーゲンやラミニンあるいはフィブロネクチンなど, 間質を構成する結合組織の成分が, 多くの細胞に対して細胞接着因子を介した動的な生物学的活性を有していることが明らかとなった。それに伴い, 癌の増殖・浸潤・転移における癌細胞と間質組織との相互作用についても注目されるに至った。

しかし, 間質成分の蓄積の程度や局在性が癌腫によって異なり, 間質の蓄積程度によってスキルス癌と

非スキルス癌とに分類されている。

我々は癌組織内のこの間質蓄積程度の差が, 癌の生物学的特性すなわち臨床病理的動態にどの様に反映されるものであるのかに興味を持った。

そこで我々は, 細胞質内に存在し, 各種コラーゲンのらせん構造の構築に関与し, コラーゲン分子の産生に強く相関する prolyl 4-hydroxylase (以下, PH と略す) を指標として, 胃癌組織におけるコラーゲンの産生について検討した。

その結果として, (1) 胃癌組織中の PH 活性は, スキルス胃癌・非スキルス胃癌ともに正常粘膜より癌組織で高値を示し, むしろ非スキルス胃癌で高い傾向にあったこと<sup>1)</sup>, また(2) この免疫組織化学的検討で, スキルス胃癌・非スキルス胃癌ともに癌組織内でのコラーゲン産生に関与している細胞が癌細胞および線維芽細胞であることが判明し, 胃癌組織内の細胞成分からのコラーゲン産生機序に大きな差がみられなかったこと<sup>2)</sup>が判明したことから, 胃癌組織内へのコラーゲンの蓄積の差は, コラーゲンの産生の差によるものと

\* 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: 窪地 淳  
〒152-0021 東京都目黒区東が丘2-5-1 国立東京第二病院外科

考えるよりは、むしろコラーゲンの分解活性の差による可能性があるものと推測した。

しかし、スキルス胃癌は臨床的に生物学的悪性度が高く、癌の転移にコラーゲンの分解に関与する金属プロテアーゼ (matrix metalloproteinase; 以下 MMP と略す) が大きな役割を担っていることから考えると、胃癌組織内の局所的反応としては、スキルス胃癌と非スキルス胃癌とでは逆の現象が起きている可能性があり、癌組織内の間質成分が、癌の生物学的悪性度に何らかの関わりがあるものと考えられた。

このような結果に注目し、今回、我々はコラーゲンの代謝特にコラーゲンの分解に関与する金属プロテアーゼおよび金属プロテアーゼインヒビター (tissue inhibitor of metalloproteinase; 以下、TIMP と略す) を指標とし、スキルス胃癌と非スキルス胃癌とを対比して、胃癌組織におけるコラーゲンの分解動態に関して検討した。

さらにこれらの結果および血清中の TIMP の動態から、胃癌の浸潤・転移の形態すなわち臨床病理学的動態における間質の意義についても考察した。

#### 材料および方法

##### I) 材料

###### 1) 胃癌組織

手術時に摘出された切除標本より、癌の先進部から約3mm 角の大きさの検体組織を採取した。これらの材料は、採取後直ちに生理食塩水で血液を洗浄除去した後、酵素活性測定時まで $-70^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

また、染色用の材料として、手術時に採取された切除標本を、肉眼的に癌中心部から先進部にかけて約1 cm 幅の組織ブロックに分割した後、これらの材料を急速凍結し、染色時まで $-70^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

###### 2) 血清

胃癌の担癌患者から採血した血液を、 $4^{\circ}\text{C}$ 下で遠心分離した後、血清を採取し、測定材料とした。これらの血清は、測定時まで $-40^{\circ}\text{C}$ で冷凍保存した。

また、対照として、健康人より血液を採取し、上記と同様の処理を行った。

##### II) 方法

###### 1) 胃癌組織中の I 型・IV 型コラーゲン分解酵素活性値の測定<sup>9)</sup>

手術時に採取・冷凍保存した組織を測定時解凍し細切した後、microglass-hand homogeniser で、組織をホモジナイズし、その一部を測定材料とした。

組織中の I 型コラーゲン分解酵素活性値の測定は、

$^3\text{H}$ -標識 I 型コラーゲンを基質とした fibril assay 法により行った。

また、組織中の IV 型コラーゲン分解酵素活性値の測定は、 $^3\text{H}$ -標識 IV 型コラーゲンを基質とした solution assay 法によって行った。

酵素活性値は、組織ホモジネートに含まれる蛋白量 1mg に対して $37^{\circ}\text{C}$ 、1 時間に分解されたコラーゲン量 ( $\mu\text{g}$  collagen degraded/h/mg protein) で表示した。

###### 2) 胃癌組織における TIMP-1 の局在に関する検討 (免疫組織化学的検討)

各ブロックに分割し急速凍結した組織材料から厚さ $4\mu\text{m}$ の凍結切片を作製し、 $4^{\circ}\text{C}$ の条件下でアセトンを用い 5 分間固定し、TIMP-1 抗体を用い、avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) 法にて染色した。

染色した各切片を光学的顕微鏡で観察し評価した。

###### 3) 担癌患者の血清中 TIMP-1 濃度の測定

凍結保存していた血清を測定時解凍し、これらの血清の一部を測定材料として、TIMP-1 のモノクローナル抗体を用い、one-step sandwich enzyme immunoassay 法にて血清中の TIMP-1 濃度を測定した。

測定した濃度は ng/ml で表示した。

#### 結 果

###### 1) 胃癌組織中の I 型および IV 型コラーゲン分解酵素活性値の検討

スキルス胃癌・非スキルス胃癌とに分け、胃癌組織内のコラーゲン分解酵素活性値を測定すると、I 型コラーゲンに対する分解酵素活性値は、スキルス胃癌 ( $n=8$ ) では $7.50 \pm 0.45$  (Mean  $\pm$  SEM, 以下同様)、非スキルス胃癌 ( $n=20$ ) では $14.08 \pm 0.71$ であり、IV 型コラーゲンに対する分解酵素活性値は、スキルス胃癌 ( $n=8$ ) では $0.54 \pm 0.19$ であり、非スキルス胃癌 ( $n=16$ ) では $1.52 \pm 0.33$ であり、I 型および IV 型コラーゲンそれぞれに対する分解酵素活性値は、いずれもスキルス胃癌で低い値を示していた ( $p < 0.05$ , Student's t-test) (Table 1)。

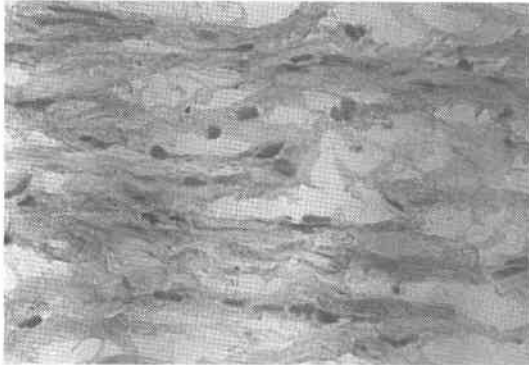
###### 2) 胃癌組織における TIMP-1 の局在に関する検討

胃癌組織内の TIMP-1 の局在に関して、TIMP-1 の抗体を用いて免疫組織化学的に検討した。

その結果、正常組織においては血管壁が染色されるのみで、他部位にはほとんど染色されなかった。しかし、スキルス胃癌では癌組織中の線維に一致して染色され (Fig. 1)、また紡錘形を呈した細胞すなわち線維芽細胞の細胞質にも染色されていた。間質形成の伴わない高分化型腺癌ではほとんど染色されていなかった

**Table 1** Collagenolytic activities against type I and type IV collagens in scirrhous type and non-scirrhous type of gastric cancer tissues

	Collagenolytic Activity*	
	against Type I Collagen	against Type IV Collagen
Scirrhous Type	7.50±0.45 (n=8)	0.54±0.19 (n=8)
Non-scirrhous Type	14.08±0.71 (n=20)	1.52±0.33 (n=16)

\* : Mean±SEM  $\mu$ g collagen degraded/hr/mg protein**Fig. 1** Immunohistochemical staining of TIMP-1 in scirrhous type of gastric cancer tissue  $\times 400$ 

が、中分化型腺癌では僅かに存在する間質に一致して染色されている像が観察された (Fig. 2).

3) 担癌 (胃癌) 患者の血清中の TIMP-1 濃度の検討  
血清中の TIMP-1 濃度を測定した結果、健常人から採取した血清すなわち対照群 (n=11) では、 $123.2 \pm 9.0$  (Mean±SEM 以下同様) であったが、分化型腺癌の胃癌患者の血清中の TIMP-1 濃度 (n=11) は  $136.1 \pm 10.0$  であり、未分化型腺癌の胃癌患者 (n=36) では  $164.3 \pm 9.9$  であった。未分化型腺癌をスキルス胃癌と非スキルス胃癌とに分け検討すると、スキルス胃癌の患者 (n=7) では  $207.7 \pm 36.5$  であり、非スキルス胃癌の患者 (n=29) では  $157.3 \pm 8.9$  であった。これらの間で統計学的分析を行うと、未分化型腺癌は、対照群および分化型腺癌それぞれの間で有意差を認め、未分化型腺癌で高い値を示していた (それぞれ  $p < 0.025$ ,  $p < 0.05$ , Student's t-test). また、未分化型腺癌の中でのスキルス胃癌と非スキルス胃癌との間にも有意差を認め、スキルス胃癌で高い値を示していた ( $p < 0.025$ ) (Table 2).

#### 考 察

上皮に発生した癌細胞が間質組織に浸潤し、遠隔臓

器に転移巣を形成するまでには、組織破壊を伴った多くの段階を経なければならない。この組織破壊に MMPs が関与していることが判明し、現在数多くの MMPs が見つかり、転移能の 1 つの指標として MMPs が用いられている。

癌組織内で MMPs の活性亢進が起これば、癌組織内の組織破壊が進み、癌組織への間質の蓄積は乏しくなるものと考えられるが、癌組織内での間質の蓄積はさまざまである。しかも、スキルス癌と非スキルス癌とでは臨床上浸潤・転移の形態が異なり、スキルス胃癌の生物学的悪性度は高い。

このスキルス癌の成因として、癌組織内の組織破壊が激しく、組織破壊後の再構築として局所的に線維増生をきたしたのと考えられるべきなのか疑問である。

このことを解明するために、コラーゲンの代謝の面から MMP および TIMP の動態について検討した。

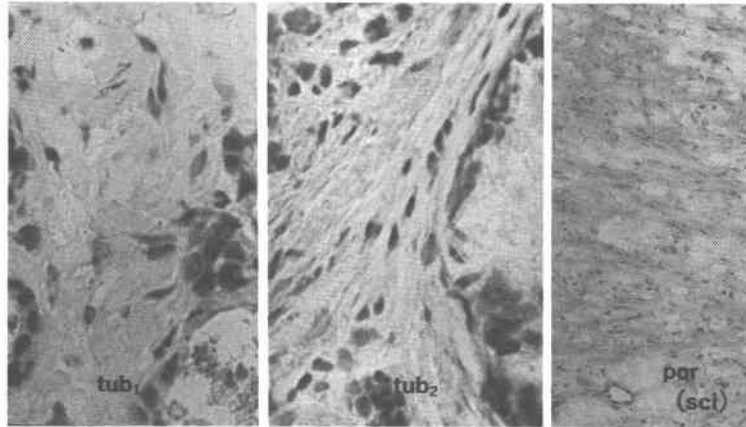
まず、より臨床に近い形で MMP および TIMP の動態について研究するために、胃癌組織を用い、これらの組織ホモジネートから直接、特異的に I 型 (間質性) および IV 型 (基底膜) コラーゲンに対する分解酵素活性値を測定した。その結果、いずれの酵素活性値もスキルス胃癌よりも非スキルス胃癌で高値を示していた。

さらに、胃癌組織内の TIMP-1 に関して免疫組織学的に検討すると、癌組織内の間質線維に一致して染色されていたことから、TIMP-1 は間質成分の多いスキルス胃癌の癌組織内に多く存在していることが判明した。

これらの成績と、上述したスキルス胃癌・非スキルス胃癌にかかわらず胃癌組織内のコラーゲンの合成は亢進していたとの結果とを考えると、癌組織内へのコラーゲンの蓄積の差は、MMP および TIMP の産生動態の差によって生じるものと推測された。

スキルス胃癌由来の癌細胞は、間質 (I 型コラーゲン) 内で培養した結果、細胞の増殖率が上昇したとの

**Fig. 2** Immunohistochemical staining pattern of TIMP-1 in non-scirrhous type and scirrhous type of gastric cancer tissues (tub1, tub2  $\times 400$ , por  $\times 100$ )



**Table 2** Serum level of TIMP-1 in gastric cancer patients

	case	Level of TIMP-1 (ng/ml)
control	11	123.2 $\pm$ 9.0*
Differentiated Type	11	136.1 $\pm$ 10.0
Undifferentiated Type	36	164.3 $\pm$ 9.9
Scirrhous Type	7	207.7 $\pm$ 36.5
Non-scirrhous Type	29	157.3 $\pm$ 8.9

\* : Mean  $\pm$  SEM

報告や、また癌組織内の間質には TGF- $\beta$  や IGF などのサイトカインが豊富に蓄積され、さらには TIMP にも増殖因子としての働きがあるとの報告<sup>9)</sup>がみられる。

われわれの結果および他者の報告から、スキルスを形成する胃癌細胞は、もともと癌組織内の間質の蓄積に結びつく環境を作り出す性格を持っているものと考えられ<sup>9)</sup>、組織破壊後の組織再構築として局所的に線維増生をきたした結果スキルスを形成するとの考え方とは異なった現象であると理解された。さらに、スキルス胃癌は間質蓄積が合目的に行われた結果、ある一面では癌細胞は間質との相互作用によって間質の持つ動的な生物活性を利用し増殖・進展していく可能性があり、臨床上新スキルス胃癌とは異なった浸潤性の強いスキルス胃癌の生物学的特性に結びついているものと考えられた。

すなわちこの現象は、分化型腺癌の様な間質成分の乏しい胃癌では、局所的に組織破壊が亢進し、癌細胞は脈管内への侵入や脈管外への逸脱をきたしやすく、血行性転移の形態がとり易い可能性があることを示唆

している反面、間質成分の豊富なスキルス胃癌では、組織破壊が乏しく、癌細胞は脈管内への侵入や脈管外への逸脱をきたし難く、血行性転移の形態がとり難い環境にあることを示唆しているものと考えられた。

さらに、胃癌の担癌患者の血清中における TIMP-1 の濃度を測定すると、この TIMP-1 は分化型腺癌と比較し、未分化型腺癌特にスキルス胃癌で高値を示していた。

この結果からも、未分化型腺癌特にスキルス胃癌では、血清中に TIMP が豊富に存在する為に、MMPs の活性が抑制され、脈管内に侵入した癌細胞の脈管外に逸脱する過程が制御されている可能性が示唆された。

このように、循環系においても未分化型腺癌特にスキルス胃癌では、血行性転移がきたし難くなる環境にあり、臨床病理的特徴であるリンパ行性転移ないしは腹膜播種となんらかの関わりがあるものと考えられた。

近年、この分野からも癌の治療に応用する試みがみられる。治療を組み立てていく際に、我々の結果を踏まえて考えるならば、(1) 金属プロテアーゼが優位になっている状況にある場合と、(2) 金属プロテアーゼインヒビターが優位になっている状況にある場合とに分けて、治療法を考えなければならないであろう。

すなわち、(1) の局面が考えられる時には、酵素阻害剤や、インヒビターの投与あるいは酵素産生亢進に働く接着分子・増殖因子などの因子や酵素の活性化因子に対する拮抗剤を投与することになる。また一方(2) の局面が考えられる時には、インヒビターの阻害剤およびインヒビター産生の亢進に働く増殖因子などの因子

に対する拮抗剤の投与などが考えられ、(1)の場合と(2)の場合とでは全く逆の治療法を選択しなければならなくなるからである。

この方面からの治療法が確固としたものになるためには、数多く発見されている金属プロテアーゼやインヒビターの中で、どれが癌の転移を抑制ないしは予防するための Key Word となるのか、今後の益々の検討が必要になるものと考えられるとともに、担癌状態にある生体下での金属プロテアーゼやインヒビターの動態について、もっと詳細な検討が必要であると考えられた。

これらの酵素およびインヒビターは、通常生体内に存在するものであり、この方面からの治療を考えるにあたり、正常な臓器への影響を十分に考慮する必要があるが、癌の浸潤・転移を抑制する目的から、この方面の薬剤が新たに開発され、スキルス胃癌の治療成績が向上することを期待している。

## 文 献

- 1) 片井 均：胃癌組織中のコラーゲン合成酵素 prolyl hydroxylase 活性値の測定とその意義に関する研究。慶應医 68：113-125, 1991
- 2) 松井英男, 窪地 淳, 吉野肇一ほか：胃癌組織におけるコラーゲン産生動向に関する研究—prolyl 4-hydroxylase の免疫組織化学的研究による—。消化器癌 2：195-197, 1992
- 3) 窪地 淳：組織内IV型コラーゲナーゼ活性値測定法の確立とそれによる胃・肺癌組織内酵素活性に関する研究—I型コラーゲナーゼ活性および病理組織学的所見と対比して—。日外会誌 91：174-183, 1990
- 4) Yamashita K, Suzuki M, Iwata H et al：Tyrosine phosphorylation is crucial growth signaling by tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP-1 and TIMP-2)。FEBS Lett 396：103-107, 1996
- 5) 窪地 淳, 吉野肇一, 岡崎 勲ほか：癌組織におけるコラーゲン分解酵素とそのインヒビター (TIMP)。Biother 5：1431-1440, 1991

### The Metabolism of Extracellular Matrix and Gastric Cancer Invasion and Metastasis —Comparison between Scirrhus Type and Non-scirrhus Type—

Kiyoshi Kubochi, Atsushi Shimada, Hideo Matsui, Yoh Isobe,  
Shingo Shima, Shinji Ogawa<sup>1)</sup>, Keiichi Yoshino<sup>1)</sup>,  
Kyuya Ishibiki<sup>2)</sup> and Masaki Kitajima<sup>3)</sup>

Department of Surgery, Institute of Clinical Research, National Second Tokyo Hospital

<sup>1)</sup>Department of Surgery, Ichikawa General Hospital, Tokyo Dental College

<sup>2)</sup>Department of Surgery, National Saitama Hospital

<sup>3)</sup>Department of Surgery, School of Medicine, Keio University

To investigate the role of collagens in gastric cancer tissues with regard to cancer invasion and metastasis. We homogenized cancer tissues and measured the collagenolytic activity against type I and IV collagens in tissue homogenates. We also studied the location of a tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) in gastric cancer tissues by the immunoperoxidase staining procedure and measured the serum levels of TIMP-1 in patients before the operation for gastric cancer. We compared these results in scirrhus and non-scirrhus types of gastric cancer. Collagenolytic activities against both type I and IV collagens in the non-scirrhus type were significantly higher than those in the scirrhus type ( $p < 0.01$ ). TIMP-1 was stained on collagens in cancer tissues and therefore a large amount of TIMP-1 was present in the scirrhus type. The serum level of TIMP-1 in undifferentiated cancer was high ( $p < 0.05$ ), especially in the scirrhus type ( $p < 0.025$ ). These results suggest that gastric cancer cells forming the scirrhus type might have the ability to accumulate collagens in cancer tissue and that cancer cells should use the dynamic biological activity of the extracellular matrix and then invade the stomach wall. Because the TIMP level in the scirrhus type was higher in cancer tissue and serum of patients than in the non-scirrhus type, the mechanism of cancer cell metastasis in the scirrhus type characterizing lymph node metastasis and peritoneal dissemination might be different from those in the non-scirrhus type characterizing venous metastasis mainly.

**Reprint requests:** Kiyoshi Kubochi Department of Surgery, National Second Tokyo Hospital  
2-5-1 Higashigaoka, Meguro-ku, Tokyo, 152-0021 JAPAN