

特集 3

大腸癌の原発巣と転移巣における形質発現の 差異と、間質との相互作用に関する検討

京都大学第1外科

石上 俊一 有井 滋樹 原田 富嘉
水本 雅己 森 章 花木 宏治
武田 佳久 小野寺 久 今村 正之

原発巣、転移巣あわせて74例の大腸癌における、VEGF (vascular endothelial growth factor), MMP (matrix metalloproteinase)-2, -9, MT1-MMP (membrane type matrix metalloproteinase) の発現の違いを、Northern hybridization と免疫組織染色にて検討した。肝転移を有する原発巣でのこれら分子の遺伝子発現は、肝転移のない原発巣よりいずれも高かったが、肝転移巣における発現は原発巣より高いとは限らなかった。リンパ節転移を有する原発巣は、リンパ節転移のない原発巣に比べ VEGF の発現が高く、リンパ節転移巣においては、原発巣に比べ VEGF と MMP-9 の発現が高かった。肝転移巣の免疫染色においては、VEGF や MMP-2 の発現は、癌細胞でなく、むしろ隣接する肝細胞に認められた。以上の結果は、癌の形質発現が転移先の臓器の環境要因によって左右されること、そして転移という現象が、癌細胞と間質、あるいは肝細胞や炎症細胞との相互関係によって成立することを示唆しているものと考えられた。

Key words: colorectal cancer, vascular endothelial growth factor, matrix metallo-proteinases

はじめに

癌の浸潤・転移は癌の増殖に始まり、癌細胞の原発巣からの離脱、細胞外マトリックスの分解と組織内移動、基底膜の破壊による血管内侵入、血流による運搬、血管内皮への接着と血管外脱出、転移臓器への生着および増殖といった具合に多段階を経て成立するものとされ、癌細胞とそれを取り巻く間質との相互関係で成立するものと考えられている¹⁾。それ故に、転移という複雑な現象を単一の因子だけで説明することは適切でなく、癌を取り巻く周囲環境を無視し、癌細胞だけを取り上げて論ずることも適切でないと思われる。これらの過程には、血管新生因子を初めとする増殖因子、細胞間接着分子、細胞外マトリックス分解酵素など多くの分子がかかわっていることが推測される。血管内皮細胞の特異的な増殖因子である vascular endothelial growth factor (VEGF) は、血管新生を介して癌の増殖進展に関わっているとされ、これまでも血管密度や予後との関連を示した数多くの臨床研究がなされている²⁾。一方、matrix metallo-proteinases (MMPs) は、癌間質や血管基底膜の消化にかかわっているとされる一群の酵素群で、これらのうち癌間質の主たる構成成分である type IV collagen を基質とするものには、MMP-2, MMP-9 の 2 種類がある³⁾。最近、細胞膜貫通領域を有し、潜在型 MMP-2 を特異的に活性化しうる MMP として membrane type matrix metallo-proteinase (MT-MMP) が確認された⁴⁾。MT-MMP は現在までに 4 種類の isoform の存在が知られているが、今回の研究では、大腸癌における発現が確認されており、浸潤・転移と深い関係があるとされる MT1-MMP を対象とした⁵⁾。研究の主たる目的は、大腸癌原発巣および転移巣におけるこれら 4 種類の分子の発現の違いを検討し、臨床的な意義や臨床応用の可能性を探ることにある。

対象と方法

1. 対象は1994年4月より1996年7月までの2年4

*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:石上 俊一

〒520-0046 大津市長等1-1-35 大津赤十字病院 外科

か月間に当科にて切除術を施行された大腸癌74症例で、原発巣が66例、肝転移巣15例（同時性7例、異時性8例）、リンパ節転移巣12例であった。患者年齢は45～90歳（平均64.7歳）で、男女比は1.64：1であった。

2. 手術にて得られた大腸癌の新鮮切除標本から、癌部および非癌部を別々に採取し、直ちに -80°C で凍結保存した。癌部、非癌部それぞれから、塩化セシウム超遠心法にて total RNA を抽出し、さらに poly-A⁺ RNA を精製した。MT1-MMP に関しては $20\mu\text{g}$ の total RNA を、VEGF, MMP-2, MMP-9 の3者に関しては $5\mu\text{g}$ の poly-A⁺ RNA を用いて Northern hybridization を施行した。

3. autoradiography にて得られた画像より、各サンプルにおける各遺伝子の発現量を計測し数値化した。S26 ribosomal protein (S26rp) cDNA を用いて、各メンブランを rehybridization し、この遺伝子の発現量を internal control にして、各遺伝子の発現量を補正した。正常部 (N) に対する腫瘍部 (T) での各遺伝子の相対発現量 (T/N 比) を計算し、以後の解析に用いた。

4. さらに原発巣および肝転移巣における各分子の組織内局在を検討するために、ホルマリン固定パラフィン包埋切片に対して、ABC 法による免疫組織染色を施行した。VEGF の染色には、日本医科大学病理学教室より供与された抗ヒト VEGF ウサギポリクロナール抗体を $0.2\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用し、MT1-MMP に関しては、金沢大学癌研より供与された抗ヒト MT1-MMP マウスモノクロナール抗体 (113-5B7) を $0.5\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用した。MMP-2 および MMP-9 に関しては、富士薬品工業株式会社より購入したマウスモノクロナール抗体を、それぞれ $1.0\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で使用した。

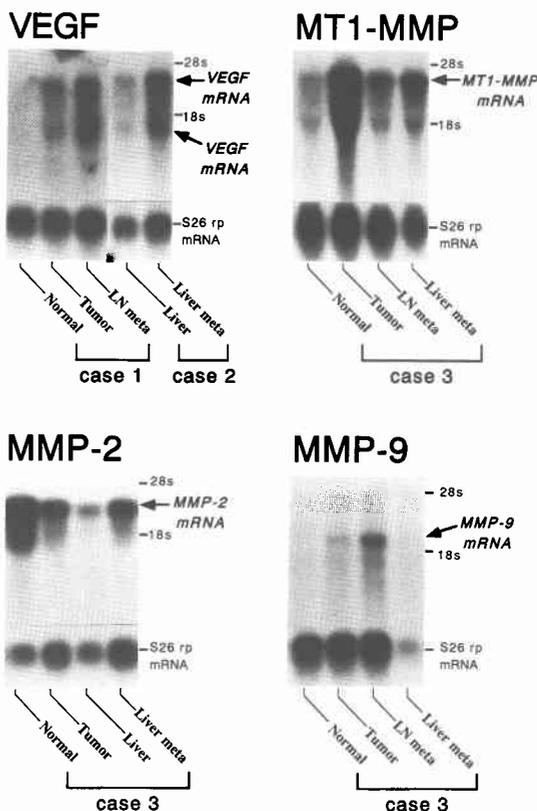
5. 統計学的解析には、unpaired t test を用い、p 値が0.05未満のものを有意とした。

結 果

(1) 原発巣および転移巣における遺伝子発現

Northern Hybridization の代表例を Fig. 1 に示す。VEGF や MT1-MMP の遺伝子発現は、非癌部ではほとんど認められなかったが、原発巣や転移巣の癌部においては、種々の程度の発現増強が観察された。MMP-2 に関しては、正常大腸粘膜や正常肝においても強い発現の認められる事があり、MMP-9 に関してはリンパ節転移巣での発現増強が特徴的であった。原発巣、

Fig. 1 Northern hybridization of VEGF and MMPs in human colorectal cancer tissues. Over-expression of VEGF and MMPs mRNA were observed both in primary and metastatic tumors. Autoradiograms were quantified by densitometry, and gene expression in tumor was compared to that in normal control. LN: Lymph Node, meta: metastasis, S26 rp: S26 ribosomal protein



肝転移巣やリンパ節転移巣におけるこれら4種類の遺伝子の発現に、一定の傾向があるか否かを調べるため、転移を伴わない原発巣、転移を伴う原発巣、転移巣の3群における T/N 比の平均値を比較した。

1. 肝転移と遺伝子発現

肝転移を伴わない原発巣、肝転移を伴う原発巣、肝転移巣のそれぞれにおける T/N 比の平均±標準偏差を Table 1 に示す。肝転移を伴う原発巣での T/N 比の平均値は、VEGF ($p < 0.0001$), MT1-MMP ($p = 0.002$), MMP-2 ($p = 0.02$), MMP-9 ($p = 0.0013$) のいずれに関しても、肝転移を伴わない原発巣に比べ有意に高かった。また、いずれの分子に関しても、肝転

移巣における平均値が、肝転移を有する原発巣のそれを越えることは無かった。肝転移巣における VEGF 遺伝子の発現は、肝転移を有する原発巣に比べ有意に低く ($p=0.004$)、肝転移巣における MT1-MMP 遺伝子の発現は、肝転移の無い原発巣に比べ有意に高かった ($p=0.005$)。

2. リンパ節転移と遺伝子発現

リンパ節転移を伴わない原発巣、リンパ節転移を伴う原発巣、リンパ節転移巣のそれぞれにおける T/N 比の平均±標準偏差を **Table 2** に示す。VEGF に関してのみ、リンパ節転移を伴う原発巣での発現の平均が、リンパ節転移を伴わない原発巣のそれに比べ有意に高かった ($p=0.036$)。リンパ節転移巣での発現の平均値は、VEGF に関しては転移のない原発巣より有意に高く ($p=0.033$)、MMP-9 に関しては転移を有する原発巣よりも有意に高かった ($p=0.013$)。遺伝子発現の程

度を表す T/N 比は、VEGF、MMP-9 のいずれに関しても、原発巣よりリンパ節転移巣の方が高い値を示した。

(2) 原発巣および肝転移巣の免疫組織染色

原発巣における VEGF の発現は主として癌細胞に認められ (**Fig. 2A**)、発現の程度は病期の進行とともに増強する傾向が観察された。特に肝転移を有する原発巣においては、VEGF の産物は癌細胞内にとどまらず、周囲の間質にも散在性に分布していた。肝転移巣においては、転移結節の癌細胞に VEGF の発現は認められず、むしろ結節近傍の肝細胞が染色された (**Fig. 2B**)。

MT1-MMP に関しては、同時に切除された原発巣 (**Fig. 2C**)、リンパ節転移巣、肝転移巣 (**Fig. 2D**) のいずれにおいても、癌細胞が強く染色された。ただし、原発巣よりもリンパ節転移巣、リンパ節転移巣よりも

Table 1 VEGF and MMPs mRNA expression in primary tumor and metastatic liver tumor

	Primary tumor		Metastatic Liver Tumor
	Liver metastasis(-)	Liver metastasis(+)	
VEGF	2.57±1.98 (45)	8.39±7.48 ^a (15)	1.92±2.03 ^b (14)
MT1-MMP	2.93±3.00 (51)	13.95±24.40 ^a (15)	5.87±4.57 ^a (15)
MMP-2	1.33±1.65 (43)	3.12±3.85 ^a (12)	1.25±0.84 (14)
MMP-9	1.02±0.89 (48)	5.55±9.32 ^a (15)	4.92±14.05 (15)

(mean±SD)

^aThe expression is significantly higher than the cases without liver metastasis.

^bThe expression is significantly lower than the cases with liver metastasis.

Table 2 VEGF and MMPs mRNA expression in primary tumor and metastatic lymph node

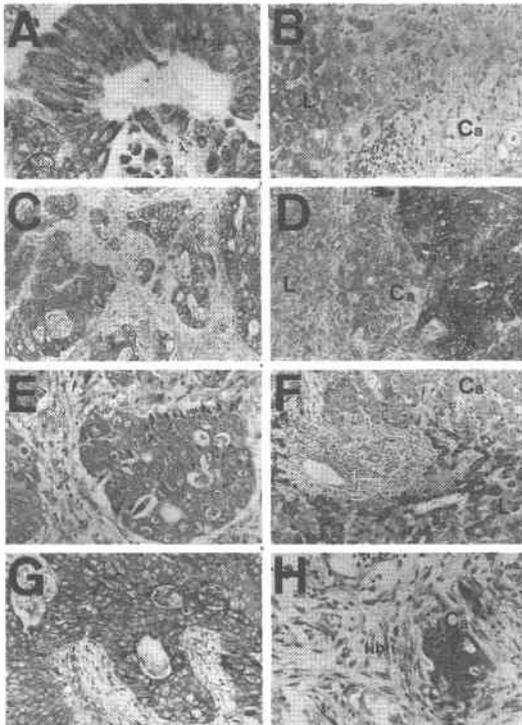
	Primary tumor		Metastatic Lymph node
	Lymph node metastasis(-)	Lymph node metastasis(+)	
VEGF	2.61±3.75 (27)	5.18±5.22 ^a (33)	12.92±23.83 ^a (9)
MT1-MMP	3.08±3.47 (28)	7.17±16.11 (38)	4.66±6.92 (12)
MMP-2	1.58±2.15 (24)	1.83±2.58 (31)	1.14±1.90 (11)
MMP-9	2.13±6.67 (28)	2.07±2.91 (35)	7.57±11.75 ^b (11)

(mean±SD)

^aThe expression is significantly higher than the cases without lymph node metastasis.

^bThe expression is significantly lower than the cases with lymph node metastasis.

Fig. 2 Immunohistochemical staining for VEGF and MMPs in colorectal cancer tissues. (A) VEGF expression in primary tumor with liver metastasis, $\times 1,000$ (B) VEGF in metastatic liver tumor, $\times 400$ (C) MT1-MMP in primary tumor with liver metastasis, $\times 200$ (D) MT1-MMP in metastatic liver tumor, $\times 200$ (E) MMP-2 in primary tumor with liver metastasis, $\times 400$ (F) MMP-2 in metastatic liver tumor, $\times 200$ (G) MMP-9 in primary tumor with liver metastasis, $\times 400$ (H) MMP-9 in metastatic liver tumor, $\times 400$. Ca: cancer cells, L: hepatocytes, fib: fibroblasts



肝転移巣という具合に、常に癌の浸潤先進部において、その発現が高くなる傾向が観察された。

原発巣での MMP-2 の主たる発現細胞は、間質の線維芽細胞であったが、肝転移を伴う原発巣においては癌細胞にも染色性が認められた (Fig. 2E)。しかしながら、VEGF の場合と同様、肝転移巣では癌細胞はほとんど染色されず、むしろ転移結節近傍に分布する肝細胞がこの蛋白を強く発現していた (Fig. 2F)。

原発巣における MMP-9 の発現は、癌細胞以外にも、線維芽細胞、好中球、M ϕ 、血管内皮細胞など、多種類の細胞において観察された (Fig. 2G)。間質成分に乏

しい小さな肝転移結節においては、好中球、M ϕ といった間葉系の細胞が主にこの蛋白を発現しているのに対して、間質成分の豊富な巨大結節においては、線維芽細胞や癌細胞にも MMP-9 の発現が観察された (Fig. 2H)。

考 察

癌の浸潤・転移は多くの過程を経て成立するものと考えられており、各過程には多くの分子が関与していると推測されている。VEGF は、もともと血管の透過性を亢進させる物質として同定されたが、強力な血管新生作用を有することから、腫瘍の増殖に不可欠な分子として認識されるようになった。一方、MMP-2、-9 は血管基底膜の構成成分であるコラーゲンの分解能力を有することから、浸潤・転移において重要な分子であると考えられるようになった。VEGF や MMPs の発現は決して癌に特有なものではなく、正常組織の修復過程においても観察されることが報告されている。しかしながら、正常組織でのこれらの分子の発現がさほど高くないこと、癌組織でこれら分子の過剰発現がしばしば観察されることから、正常の個体が有するこれらの機構を、癌が自らの増殖や浸潤・転移に利用しているのだと考えられるようになった。我々は以前より、病期の進行した大腸癌症例ほど、原発巣でのこれら浸潤・転移関連分子の遺伝子発現が高いことを報告してきたが、今回は特に転移という現象に着目し、転移の有無別に見た原発巣でのこれら分子の発現の違いや、原発巣と転移巣での発現の違いについて検討した。

原発巣での VEGF 遺伝子の発現は、その腫瘍がリンパ節転移や肝転移を伴う場合に有意に高く、転移リンパ節での発現はこれよりもさらに高くなる傾向を示した。しかしながら、肝転移巣における発現は、予想に反して肝転移を有する原発巣より低く、これは免疫染色の結果に沿うものであった。肝転移巣では、VEGF 蛋白の発現はむしろ転移結節に隣接した肝細胞に認められ、転移結節そのものは染色されなかった。すなわち、癌が増殖や浸潤を繰り返しながらリンパ節転移巣を形成する一連の過程において、VEGF が重要な役割を演じている事はほぼ間違いないと思われる。しかしながら、いったん肝転移が形成されれば、転移結節における癌の増殖は、肝細胞が発現する VEGF に依存するようになるのかもしれない。ここで問題となるのは、肝細胞に VEGF の発現を誘導する物質が何であるかということであり、この分子機構を解明することが今後の我々の研究課題である。目下のところ、細胞間接

着分子や種々のサイトカインをその候補と考え、研究を進めているところである。

一方、MT1-MMPに関しては、原発巣はもちろんのこと、リンパ節転移巣や肝転移巣においても強い発現が観察された。原発巣と、同時に切除しえた転移巣での染色性を比較したところ、MT1-MMPの発現は浸潤先進部と考えられる部位において最も強く、特に肝転移結節の癌細胞での発現は、15例全例において陽性であった。転移を有する原発巣でのMT1-MMPの遺伝子発現の平均値は、転移巣における平均よりも高い値を示したが、これは転移巣の検討症例数が少ないことによるものと考えられた。MT1-MMPの発現を考える際に、MMP-2との関係を無視することはできない。MT1-MMPは、潜在型MMP-2を活性化型に変換することが知られているが、同時に細胞膜表面へのMMP-2の結合を誘導するとの報告もある⁶⁾。肝転移巣の免疫組織学的検討によれば、MMP-2の発現はVEGFの場合と同様、転移結節そのものよりもむしろ近傍の肝細胞に認められた。肝細胞にMMP-2の発現が誘導される機序に関しては不明だが、MT1-MMPの関与が推測される。すなわち、肝転移巣に発現したMT1-MMPの作用により、隣接する肝細胞膜表面にMMP-2の発現が誘導され、さらに転移結節近傍に分布するMMP-2が、MT1-MMPの働きにより活性化され、転移巣の発育進展を容易にしているのではないだろうか。

免疫染色で確認されたMMP-9発現陽性細胞は、原発巣においても肝転移巣においても多彩であった。転移を伴わない原発巣や小さな肝転移結節のように、間質の乏しい症例においては、好中球やM ϕ といった炎症性の細胞が主にこの蛋白を発現していたが、進行した原発巣や巨大な肝転移結節のように間質が発達した症例においては、これら炎症細胞以外にも線維芽細胞や癌細胞が強く染色された。

また、MMP-9のNorthern hybridizationでは、リンパ節転移巣における発現亢進が特徴的であったが、免疫染色では転移した癌細胞および濾胞内のリンパ球にMMP-9の強い発現を認めた。転移のないリンパ節の染色を施行していないため明確なことは言えないが、リンパ節内に転移巣が形成されると、リンパ系の細胞にMMP-9の発現が誘導されるのかもしれない。

これら分子発現の意義をまとめると以下となる。リンパ節転移に関しては、VEGFとMMP-9の2者の発現が重要である。すなわち、原発巣の解析でこれ

ら分子の遺伝子発現が高かった症例は、リンパ節再発を来す可能性が高いと考えられる。一方、肝転移巣におけるこれら分子の発現は、それぞれの転移結節によって異なるようである。すなわち、病巣が小さく間質の発育が不十分な間は、癌細胞に発現しているMT1-MMPが、肝細胞膜表面に発現しているMMP-2を活性化し、また一方では好中球やM ϕ といった炎症性の細胞がMMP-9を産生して、間質の再構築や転移結節の増大にかかわっていると考えられる。間質が豊富となり線維芽細胞が増殖してくると、線維芽細胞がMMP-2や-9を大量に産生するようになり、このころには癌細胞もこれらが発現するようになるのであろう。

これらの分子を実際の治療に応用する場合には、2通りの方法が考えられる。1つは、臨床診断への応用である。例えば、原発巣切除後に補助療法が必要かどうかを判断する基準として利用できる。手術時に肝転移が明らかでなかったにもかかわらず、原発巣でこれら分子が高発現であった症例は、すでに転移巣が形成されているか、あるいは将来、肝転移を来す可能性が高いであろうと予測できる。また、リンパ節転移巣におけるVEGFやMMP-9の遺伝子発現を検討することで、micro metastasisの存在を明らかにすることが出来るかもしれない。2つ目は、治療への応用である。転移にかかわる主たる分子がわかれば、これに対する阻害剤や中和抗体を用いたり、あるいは癌細胞や線維芽細胞に、その分子に対するアンチセンスを導入し、原因分子の発現を抑制することができる。しかし実際には、発現している浸潤・転移関連分子は単一でなく、しかも時事刻々と変化している可能性が高いので、その時々で使用する薬剤を変える必要があるかもしれない。

以上のように、原発巣と転移巣におけるVEGF、MMPsの発現動態は必ずしも同一ではなかった。この事実は、癌の形質発現が転移先の臓器の環境要因によって左右されること、そして転移という現象が、癌細胞とそれを取り巻く間質との相互関係、あるいは癌細胞と肝細胞や炎症細胞との相互関係によって成立することを示唆しているものと考えられた。現在までのところ、術後の転移・再発を早期に察知する方法はない。これら浸潤・転移関連分子の発現を詳細に検討すれば、リンパ節転移や肝転移を繰り返すような症例の選別や、新たな治療の開発に役立てることが出来るようになるかもしれない。

文 献

- 1) Liotta LA, Steeg PS, Stetler-Stevenson WG : Cancer metastasis and angiogenesis : an imbalance of positive and negative regulation. *Cell* 64 : 327—336, 1991
- 2) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD et al : Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and its receptors, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55 : 3964—3968, 1995
- 3) Sato H, Kida Y, Mai M et al : Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. *Oncogene* 7 : 77—83, 1992
- 4) Sato H, Takino T, Okada Y et al : A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumor cells. *Nature* 370 : 61—65, 1994
- 5) Ueno H, Nakamura H, Inoue M et al : Expression and tissue localization of membrane-types 1, 2, and 3 matrix metalloproteinases in human invasive breast carcinomas. *Cancer Res* 57 : 2055—2060, 1997
- 6) Sato H, Takino T, Kinoshita T et al : Cell surface binding and activation of gelatinase A induced by expression of membrane-type-1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP). *FEBS Lett* 385 : 238—240, 1996

The Different Expression of Metastasis Related Molecules in the Primary and Metastatic Tumors of Human Colorectal Cancer —Interrelationship between Cancer Cells and Stromal Tissues—

Shun-ichi Ishigami, Shigeki Arii, Tomika Harada, Masaki Mizumoto,
Akira Mori, Kouji Hanaki, Yoshihisa Takeda,
Hisashi Onodera and Masayuki Imamura
First Department of Surgery, Faculty of Medicine, Kyoto University

The expression of vascular endothelial growth factor (VEFG), matrix metalloproteinase (MMP)-2, -9, and membrane type matrix metalloproteinase (MT1-MMP) in surgical specimens of 74 colorectal cancer patients were evaluated by Northern hybridization and immunohistochemistry, and the difference between primary tumors and metastatic tumors was investigated. The expression of mRNA of these 4 molecules in the primary tumors with liver metastasis tended to be higher in those without liver metastasis. But gene expression in metastatic tumors of the liver was not always higher than in the primary tumors. The VEGF gene expression in the primary tumors with lymph node metastasis tended to be higher than in those without lymph node metastasis. Both VEGF and MMP-9 mRNA expression in the metastatic lymph nodes tended to be higher than in the primary tumors. Immunohistochemical staining for metastatic liver tumors showed that the expression of VEFG or MMP-2 protein was not observed in the cancer cells but in hepatocytes neighboring the metastatic nodules. These results suggest that the expression of VEGF or MMPs may be changed by the circumstances of target organs, and that cancer metastasis may be brought into being through an interrelationship among cancer, cells, stromal cells and hepatocytes.

Reprint requests: Shun-ichi Ishigami Otsu Red Cross Hospital
1 - 1 - 35 Nagara, Otss city, 520-0046, JAPAN