

## 胆管癌組織における細胞接着分子および関連分子の 免疫組織化学的検討

久留米大学医学部外科学講座

酒井 丈典 今山 裕康 橋野耕太郎 蓮田 啓  
福田 秀一 原 雅雄 奥田 康司 木下 寿文  
江里口直文 中山 和道

細胞外基底膜構成成分である Laminin と、細胞外基底膜分解酵素である Matrix metalloproteinase-3 および細胞接着分子である CD44 の胆管癌組織における発現を免疫組織化学的に検索し、胆管癌の各種臨床病理学的因子との関係を検討した。各分子間では、LM と MMP-3 の発現に負の相関を、各種臨床病理学的因子と各分子の発現の間では、組織学的深達度と LM・CD44 発現に負、stage と LM・CD44 に発現に負、stage と MMP-3 発現に正、pn と MMP-3 発現に正、リンパ節転移と LM 発現に負の相関をそれぞれ認め、LM 発現の有無で術後累積生存率に有意差を認めた。他の消化器癌と同様に胆管癌においても、その浸潤・進行に細胞外基質と基底膜分解酵素および接着分子の相互作用が関与する可能性が示唆された。

**Key words:** matrix metalloproteinase, laminin, common bile duct cancer

### はじめに

胆管癌は消化器癌の中では予後の良い癌ではなく、またその浸潤様式に神経浸潤という特異な形態を示す癌として知られている。神経浸潤は胆管癌の予後規定因子の1つであるが、その成立機序についてはいまだ不明な点が多く、その解明は今後の課題であるとともに胆管癌の予後の改善に寄与する可能性も期待される。一方、以前より癌の浸潤・転移には、細胞外基質、特に基底膜の破壊が必須と考えられている。近年多くの施設でそれを裏付けるような研究成果が報告され、癌の浸潤・転移には細胞外基質と基底膜分解酵素および細胞接着分子の関与が重要であると考えられている<sup>1)~6)</sup>。そこで、我々は胆管癌組織における基底膜構成成分であるラミニン(以下、LM と略記)、基底膜分解酵素である matrix metalloproteinase-3(以下、MMP-3)、および細胞接着分子である CD44 の発現と神経浸潤を含む各種臨床病理学的因子の関係を免疫組織化学的染色により検討した。

### 対象と方法

対象：過去20年間に当科において手術施行され、臨床病理学的検討の可能であった症例から無作為に抽出した42例を対象とした。対象の内訳は、男性29例、女性13例、年齢34~81歳(平均：64±9.5歳)、総合的進行度(以下、stage)は stage I 6例、stage II 7例、stage III 8例、stage IV 21例であった。癌の組織型は、乳頭腺癌9例、高分化型管状腺癌11例、中分化型管状腺癌17例、低分化型管状腺癌5例、組織学的深達度(以下、depth)は粘膜層にとどまるもの(以下、m)1例、繊維筋層内にとどまるもの(以下、fm)2例、外膜までにとどまるもの(以下、af)1例、外膜を越えるも漿膜には達していないもの(以下、ss)9例、漿膜面に露出しているもの(以下、se)8例、他臓器に浸潤しているもの(以下、si)21例であった。病理学的診断は胆道癌取扱規程第3版に準じて行った。

染色方法：まず切除標本のパラフィン包埋ブロックから厚さ4μmの薄切切片を作製し、ABC法に従って免疫組織学的染色を行った。対比染色としてヘマトキシリンによる核染色を行った。1次抗体としてはマウス抗人ラミニン抗体、マウス抗ヒトMMP-3抗体(富士薬品工業株式会社製)、およびマウス抗ヒトCD44抗体

\* 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：酒井 丈典

〒830-0011 久留米市旭町67 久留米大学医学部外科

(DAKO 社製) を用いそれぞれ100倍希釈で使用した。

免疫組織化学的染色の評価：各分子の発現は癌先進部での発色の状態を観察し、陰性および陽性の2群に分類した。

1. LM：LMの発現は癌巣周囲に膜状に染色され、全周性に連続したものと、連続性のないものとに大別された。全周性に染色される癌巣がプレパラート上の全視野内（以下、全視野）の50%以上を占めた例を陽性と判定した。

2. CD44：CD44は癌巣の各細胞間と周囲間質の間に発色を認めた。発色例が全視野の50%以上を占めた例を陽性と判定した。

3. MMP-3：MMP-3は癌細胞自体に発色を認めた。発色細胞が全視野の50%以上を占めた例を陽性と判定した (Fig. 1)。

各種臨床病理学的因子の評価：各分子の発現との関係を検討した臨床病理学的因子は、切除標本のH.E染色標本により判定した組織型、depth、静脈浸潤(以下、v)、リンパ管浸潤(以下、ly)、神経浸潤(以下、pn)、リンパ節転移(以下、n)、肝転移およびstageであり、加えて術後累積生存率を比較した。またly、v、pnおよびnに関してはそれぞれ0を陰性群、1以上を陽性群とした。各分子の発現と各種臨床病理学的因子の関

係の検討にはカイ二乗検定を用い、有意水準5%以下を有意差ありと判定した。また、対象の術後累積生存率はKaplan Meier法にて算出し、各群間の比較はLogrank検定を行い、有意水準5%以下を有意差ありと判定した。統計処理演算プログラムにはSPSS Release 6. xJ (SPSS社製) を使用した。

結果

1. 各分子の免疫組織化学的発現

LMの発現は陽性例24例、陰性例18例で陽性率は57%、CD44発現は陽性例18例、陰性例24例で陽性率48%、MMP-3発現は陽性例13例、陰性例29例で陽性率31%であった。各分子間の関係を見ると、LM陽性24例中21例がMMP-3陰性で、MMP-3陽性13例中10例がLM陰性であり、LMとMMP-3の発現に有意な負の相関を認めた (Table 1)。

2. 臨床病理学的因子と各分子の発現の関係

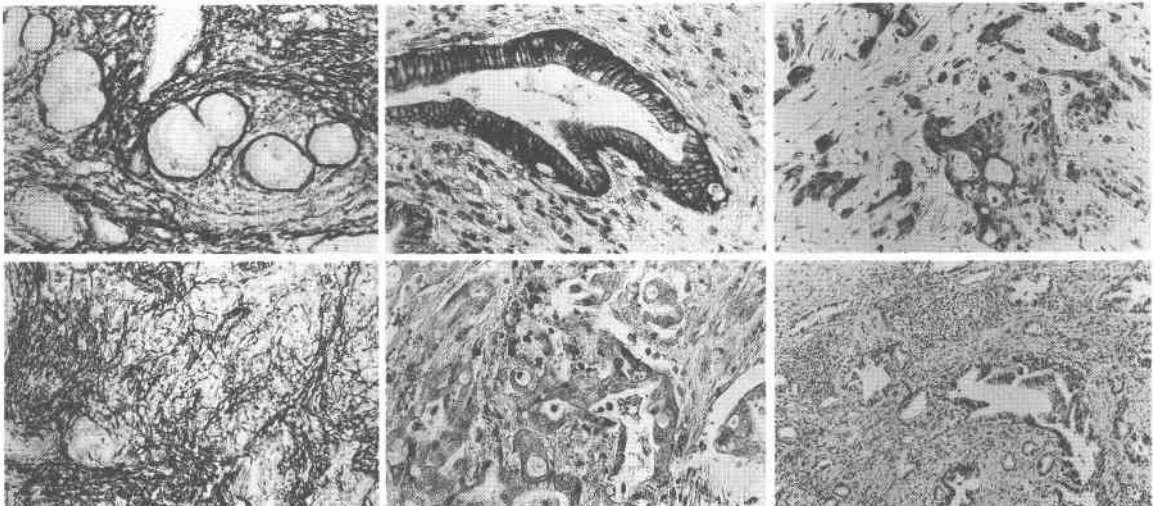
1) ly、v、pnと各分子の発現について検討すると、pnとMMP-3の間でMMP-3陽性13例中12例がpn陽性で、pn陰性12例中11例がMMP-3陰性と有意な正の相関関係を認めた。ly、vはいずれの分子とも有意な相関は認めなかった (Table 2)。

2) 組織学的深達度と各分子の発現について検討すると、深達度m~ssではLM陽性率が高く、LM陰性

Fig. 1 Immunohistochemical staining for lamininn, CD44 and MMP-3 in common bile duct cancer

a) laminin positive case, b) laminin negative case, c) CD44 positive case, d) CD44 negative case, e) MMP-3 positive case, f) MMP-3 negative case

a	c	e
b	d	f



例では深達度の深い例の占める割合が多い傾向があった。深達度がm~ssをs(-)群, se~siをs(+ )群に分類して検討すると, s(-)群でLM陽性率が高く, LM陰性群にs(+ )群が多い有意な負の相関を認め, さらにs(-)群, s(+ )群とCD44との間にも同様に有意な負の相関を認めた (Table 3)。

3) stageと各分子の発現について検討すると, stage I~IIIではLM陽性率が高く, LM陰性例では進行例の占める割合が多い傾向があり, CD44との間にも同様な傾向を認めた。またMMP-3陽性群で進行例の占める割合が高い傾向にあった。stage I~IIIの群とIVの群に分類すると, stage I~III群でLMおよびCD44陽性率が高く, 逆にLMおよびCD44陰性群でstage IV群が多い有意な負の相関を認め, 一方, stageとMMP-3の発現との間には, stage I~III群でMMP-3陰性率が高く, さらにMMP-3陽性群でstage IV群

が多い有意な正の相関を認めた (Table 4)。

4) nと各分子の発現の関係を検討すると, LM陽性群でn(+ )率が低い有意な負の相関を認めた (Table 5)。

5) 各分子の発現の有無による術後累積生存率を検討するとLM陽性群と陰性群の間に有意差を認めた (Fig. 2)。

6) 組織型, 肝転移は, いずれの分子との間にも明らかな相関は認めなかった。

考 察

今回, 胆管癌の進展様式, 特に神経浸潤と細胞接着分子との関係を調べるために, 基底膜構成成分であるLM, 基底膜分解酵素群であるMMP-3および接着因子であるCD44を免疫組織化学的に染色, 観察を行った。胆管癌においてLMはdepth, n, stageとの間に負の相関を有し, LM陽性例は陰性例に比べて予後がよいという結果が得られた。以前よりLM陰性癌は浸潤能やリンパ節転移能が高いという報告<sup>2)</sup>や, それを裏付ける報告<sup>6)</sup>があり, 今回の我々の結果も同様の成績であった。このことから, 胆管癌組織におけるLMの発現は, その浸潤・進展に対して抑制的に作用している

Table 1 Correlation between the expression of laminin and MMP-3 in common bile duct cancer

MMP-3	laminin	positive	negative
positive		3	10
negative		21	8

p<0.01

Table 2 Correlation between MMP-3 expression and perineural invasion

MMP-3	pn	positive	negative
positive		12	1
negative		15	11

p<0.01

Table 3 1) Correlation between laminin expression and depth 2) Correlation between CD44 expression and depth

	depth	s(-)	s(+)
1) laminin	positive	11	13
	negative	2	16
p<0.05			
2) CD44	positive	9	9
	negative	4	20
p<0.05			

Table 4 1) Correlation between laminin expression and stage 2) Correlation between CD44 expression and stage 3) Correlation between MMP-3 expression and stage

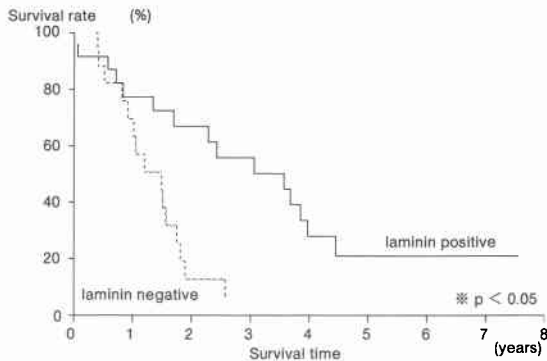
	stage	m~ss	se~si
1) laminin	positive	15	9
	negative	5	13
p<0.05			
2) CD44	positive	12	6
	negative	8	16
p<0.05			
3) MMP-3	positive	3	10
	negative	17	12
p<0.05			

Table 5 Correlation between laminin expression and nodal metastasis

laminin	n	positive	negative
positive		4	16
negative		8	7

p<0.05

**Fig. 2** Survival curves according to expression of laminin



と考えられた。肝転移に関しては、前述の報告と同様に LM 陰性癌で転移率が高いという報告と、それとは反対に大腸癌や胃癌において、LM 陽性例で肝転移能が高いという報告<sup>3)</sup>があるが、今回の検討で肝転移と各分子の関係については有意な所見は得られなかった。MMP-3は、pn および stage と正の相関を有していた。基底膜分解酵素群 (以下、MMP's) の発現陽性癌は浸潤能・転移能が高いという報告<sup>6)</sup>が多いが、今回の我々の検討も同様の成績であり、MMP-3は胆管癌の浸潤に促進的に作用していると考えられた。基底膜分解酵素は癌細胞自体で産生されるとする報告や癌細胞周囲の線維芽細胞などで産生されたものが癌細胞の細胞膜表面で活性化され作用を発現するという報告がある。また一方で MMP's は炎症細胞で多く産生されている。胆管癌はその発見時に閉塞性胆管炎を併発しているものが多く、この胆管炎に伴い集簇した炎症細胞で産生された MMP's が、胆管癌の浸潤・進展を促している可能性もある。我々が用いた MMP-3は一般に癌細胞にはあまり発現しないとされている。今回、MMP-3は癌細胞自体で強い発現を認めているが、その産生が癌細胞自体で行われるのか、周囲線維芽細胞などで産生されたものが癌細胞に付着したものであるかは今後

の検討の課題である。また、LM と MMP-3の発現に負の相関を認めることから、MMP-3による LM の分解が癌の浸潤を促している可能性があると思われた。しかし LM・MMP-3同時陽性例や同時陰性例も認められ、他の基底膜構成成分や MMP's の関与についても検討が必要と考えられた。CD44は LM と同様に depth・stage と負の相関を有していた。CD44の癌局所での作用については、いまだはっきりとした見解は得られていないが、今回の検討では胆管癌組織における CD44の発現は癌の浸潤に対して抑制的に作用していると考えられた。以上の結果を総合すると、胆管癌においては MMP-3などの基底膜分解酵素が LM などの基底膜構成成分を破壊することが浸潤・進展を促す一因であり、CD44などの接着分子の存在がそれを抑制している可能性が示唆された。また MMP 阻害因子は胆管癌の浸潤を抑制し、予後の改善に寄与する可能性もあると推測された。

#### 文 献

- 1) Liotta LA: Tumor invasion and metastases-role of the extracellular matrix: Rhoads memorial award lecture. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986
- 2) Forster SJ, Talbot IC, Critchly DR: Laminin and fibronectin in rectal adenocarcinoma: Relationship to tumor grade and metastasis. *Br J Cancer* 50: 51-56, 1984
- 3) 久保田隆一, 待寺則和, 安富正幸: 細胞外マトリックスと癌転移. *外科* 58: 533-541, 1996
- 4) Orita H, Korenaga D, Maehara Y et al: Laminin distribution patterns are closely related to liver metastasis in gastric Cancer. *Cancer* 71: 1201-1206, 1993
- 5) Hanglund C, Nordling S, Roberts PJ et al: Expression of laminin in pancreatic neoplasms and in chronic pancreatitis. *Am J Surg Pathol* 8: 669-676, 1984
- 6) 斉藤 準, 青木達哉, 小柳泰久ほか: 浸潤性膵管癌組織におけるカテプシン B およびラミニンの免疫組織化学的検討. *脾臓* 12: 1-11, 1997

### **An Immunohistochemical Study of Cell Adhesion Molecules and Related Molecules in Common Bile duct Cancer**

Takenori Sakai, Hiroyasu Imayama, Kotaro Hashino, Akira Hasuda,  
Shyuichi Fukuda, Masao Hara, Koji Okuda, Hisafumi Kinoshita,  
Naohumi Eriguchi and Toshimichi Nakayama  
Department of Surgery, School of Medicine, Kurume University

We conducted an immunohistochemical study on expression of the extracellular basement membrane component laminin (LM), the extracellular basement membrane-degrading enzyme matrix metalloproteinase-3 (MMP-3), and the cell adhesion molecule CD44 in common bile duct cancer tissue and investigated their relationship with clinicopathologic factors for this form of cancer. There was a negative correlation between LM and MMP-3 expression. The relationship between clinicopathologic factors and these molecules was as follows. There was a negative correlation between histologic invasion and LM or CD44 expression, a negative correlation between stage and LM or CD44 expression, a positive correlation between stage and MMP-3 expression, a positive correlation between perineural invasion and MMP-3 expression, and a negative correlation between lymph node metastasis and LM expression. The cumulative postoperative survival rate differed significantly depending on the presence or absence of LM expression. These results suggest that interactions between the extracellular matrix and basement membrane-degrading enzyme and adhesion molecules may play a role in the invasion and progression of common bile duct cancer, as is the case with other gastrointestinal cancers.

**Reprint requests:** Takenori Sakai The Department of Surgery, School of Medicine, Kurume University  
67 Asahi-machi, Kurume-shi, 830-0011 JAPAN

---