日消外会誌　31（10）：2162～2166，1998年

特集10

胃癌のリンパ管侵襲におけるE-cadherin, autocrine motility factor receptorの関与について

大阪大学第2外科，総合加納病院外科*

土岐祐一郎　塩崎　均　川西　賢秀　五福　淳二*
矢野　雅彦　辻仲　利政　井上　雅智　門田　守人

癌細胞の細胞接着能をE-cadherin（ECD）で運動能をautocrine motility factor receptor（AMFR）にて評価し，胃癌のリンパ管侵襲（ly），リンパ節転移（n）の術前予測が可能であるかどうかを検討した．ECD，AMFRの発現は切除標本および術前生検標本の免疫染色にて評価し，同時に末梢血中のE-cadherin可溶性fragment（SECD）をELISAにて測定した．

分化型の胃癌ではECDの発現はly，nの有無と負の相関を示したが，低分化型では関連を認めなかった．AMFRの発現は深達度と相関を示すが，ly，nとは相関を認めなかった．また，ECDとAMFRの発現は負の相関を示し，両者の共発現パターンで分けるとECD（－）/AMFR（＋）の症例が最も悪性度が高いと考えられた．nとlyの有無が一致しない症例が21％に認められたが，ECD，AMFRの発現性では不一致症例を予測できなかった．しかし，SECDはnまたはlyが陽性の症例で高値を示しており，n，lyの術前予測の指標として今後臨床応用が期待された．

Key words: E-cadherin, autocrine motility factor receptor, lymphatic involvement in gastric cancer

緒　言

リンパ節転移（以下，nと略記）は腹膜播種，血行性転移と並び，胃癌の最も重要な進展経路の1つである．原発巣におけるリンパ管侵襲（以下，lyと略記）は，リンパ節転移の際に必須のステップであり，病理学的にlyを検索することは，nの補助診断として癌の進行度の判定において有効であると考えられてる．一方，癌細胞が浸潤，転移能を獲得するためには，細胞接着，蛋白分解，運動能など様々な細胞生物学的特性が関与しており，数多くの遺伝子の変化が必要であると考えられる．今回，特に細胞接着としてE-cadherin（以下，ECDと略記）を，細胞運動性としてautocrine motility factor receptor（以下，AMFRと略記）を選び，これらの胃癌における発現の変化を免疫組織学的に検討し，lyのメカニズムを明らかにしようと試みた．また，臨床応用の可能性について，術前生検標本でlyの予測が可能であるかどうか，nとlyの不一致例についてどう解釈するかについて考察した．

対象と方法

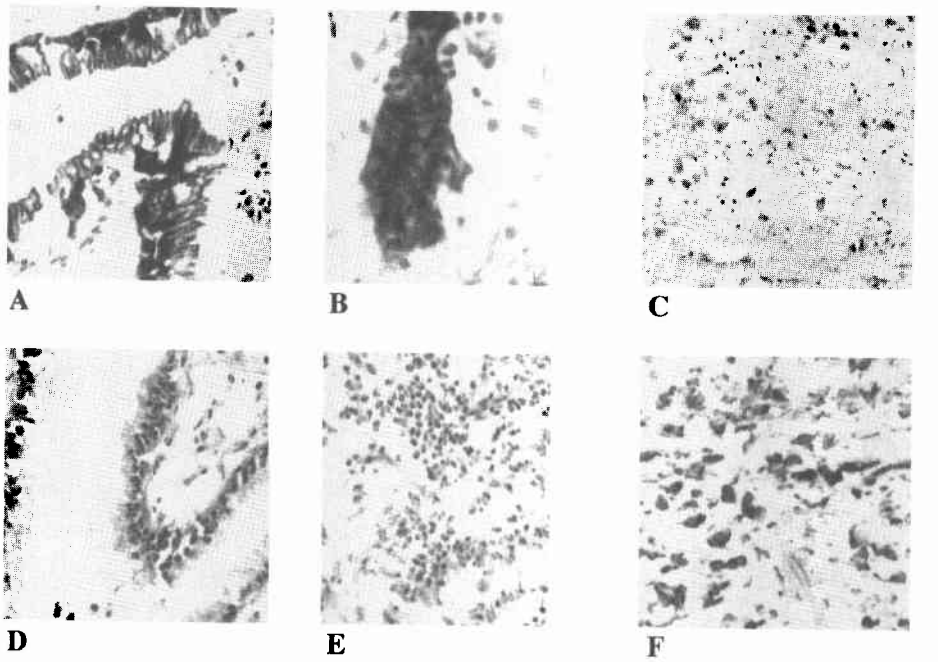
1993年12月より1996年10月までの間に大阪大学第2外科で根治切除術を受けた術前未治療の胃癌症例137例を対象とした．正常上皮を含む癌の先進部の新鮮凍結切片を作成し，4％parafolmardehydeにて固定した後，ABC法による免疫組織染色を行った．1次抗体として抗ヒトECD抗体（HECD1，宝酒造），抗ヒトAMFR抗体（3F3A，群馬大，渡辺先生より供与）を使用した．染色性の評価はECDに関しては，正常と同様にECDを膜に発現する症例を陽性（＋）とし，ECDの発現が減弱または，消失する症例を陰性（－）とした．AMFRに関しては染色陽性細胞が全体の50％以下の症例を陰性（－），50％以上の症例を陽性（＋）とした．また，末梢血より血清中E-cadherin Fragment（以下，SECDと略記）の測定をサンドイッチELISA法（宝酒造）にて行った．コントロールとして健常人20名より血清サンプルを得た．

ECD，AMFRの発現性およびSECD値とn，lyを含めた臨床病理学的因子との関連を検討した．また，

＊第51回日消外会総会シンポ3・胃癌における脈管侵襲の意味

＜1998年7月22日受理＞別刷請求先：土岐祐一郎
〒565-0871　吹田市山田丘2－2　大阪大学医学部第2外科

Fig. 1 Immunohistochemistry of ECD and AMFR in normal and cancerous tissue: The expression of E-cadherin (A.B.C.) and AMFR (D.E.F.) was shown by dark staining. Normal epithelium: (A.D.), Moderately differentiated tubular adenocarcinoma with ECD (+)/AMFR (−): (B.E.) and poorly differentiated adenocarcinoma with ECD (−)/AMFR (+): (C.F.).



ECD, AMFRの相互関係も調べた．統計解析には統計解析用ソフトウエアパッケージ（statview ver. 4.1）を用い，t検定およびスピアンの順位相関検定にて危険率5％以下（$p<0.05$）を有意であると判定した．

結　果

(1) ECDの染色性と臨床病理学的因子

正常胃粘膜では上皮細胞間に一致してECDの発現を認めた（**Fig. 1A**）．癌では正常と同様に膜に強く染まるECD（+）症例を46％（63例）に，減弱消失するECD（−）症例を54％（74例）に認めた（**Fig. 1B, C**）．ECDの発現と深達度，組織型，n，lyとの間に有意な関係は認めなかったが，組織型別にECDの発現とn，lyとの関係を再検討する（**Fig. 2**）と，分化型（tub, pap）では，ECD（−）がECD（+）に比べて有意に高頻度にリンパ管侵襲陽性ly（+）を示した（$p<0.05$）．しかし，低分化型ではECD発現の違いによるlyの有無に差は認めなかった．同様の傾向はリンパ節転移nにたいしても見られ，分化型においてのみECD発現とnとの間に逆相関関係が認められた．

(2) AMFRの染色性と臨床病理学的因子

正常腺上皮にはAMFRの染色を認めなかった（**Fig. 1D**）．一方，胃癌では癌細胞の細胞質にAMFRの発現を認めたが，染色陽性細胞の割合はさまざまであった．50％をcut offとすると59例(43％)がAMFR（+）に78例（57％）がAMFR（−）に分類された（**Fig. 1E, F**）．臨床病理学的因子と比較するとn，lyとAMFRの発現性との間に有意な関連は認めなかった．しかし，深達度の深いもの，低分化型のものにAMFR（+）が多く存在し，両者の間には統計学的に有意な（$p<0.05$）関係が存在した（**Fig. 3**）．

(3) ECDとAMFRの発現の相関について

ECDとAMFRの発現の相関を検討すると，ECD（+）症例にはAMFR（−）が多く（46/63, 73％），逆に，ECD（−）症例にはAMFR（+）が多く（42/74, 57％），両者の間には負の相関が存在した（$p<0.01$）（**Table 1**）．つまり，これらの蛋白は両方とも正常か，両方同時に異常パターンを示すことが多いことが示された．ECDとAMFRの共発現パターンとlyとの関係を検討すると正常と同じ発現パターンであるECD（+）/AMFR（−）症例では，両蛋白に異常の見

Fig. 2 The association of ECD expression with ly and n in differentiated (A) and undifferentiated (B) cancers. The numbers in each bar indicate the percentage of each group.

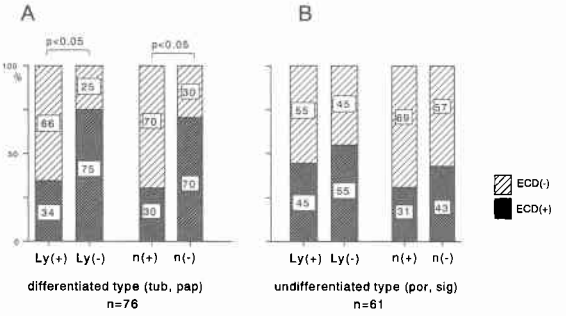


Fig. 3 The relationship of AMFR with clinicopathological features. The numbers in each bar indicate the percentage of each group.

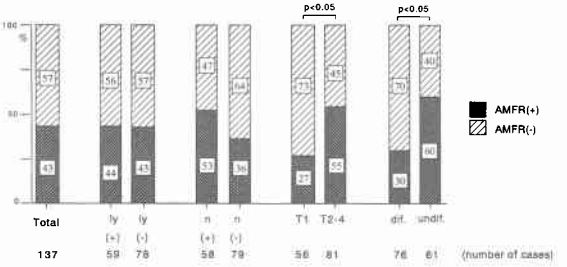


Table 1 Correlation between the expressions of ECD and AMFR

		ECD expression (+)	ECD expression (−)	total
AMFR expression	(+)	17	42	59
	(−)	46	32	78
	total	63	74	137

(p<0.01)

られる ECD (−)/AMFR (+) に比べて ly (+) の頻度が低いことが示された (p<0.05) (**Table 2**).

(4) ECD 発現減弱と血清中 E-cadherin Fragment

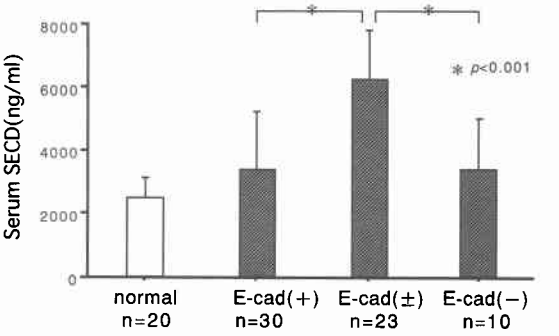
癌組織における ECD の発現減弱と SECD との関係を検討した (**Fig. 4**). ECD (−) は細分化し, ECD は減弱するが多少とも発現するものを (±) 全く発現消失するものを (−) とした. SECD 値は ECD (+) 群で平均3,522ng/ml, また ECD (−) 群で平均3,610ng/ml と, 健常者の平均2,517ng/ml と比較すると軽度上昇を示すのみで有意な差は認めなかった. 一方, 胃癌

Table 2 Association of Co-expression pattern of ECD and AMFR with lymphatic invasion

E-cadherin/AMFR	+/+	+/−	−/+	−/−
ly(+)	7	11	24	16
ly(−)	10	35	18	16

p<0.05

Fig. 4 The association of serum SECD amount with the expression of E-cadherin in gastric cancer patients.



症例の37%は ECD (±) に分類されるが, SECD の平均は6,225ng/ml と著明に上昇していた (p<0.001).

(5) n, ly の不一致例

n と ly の有無は一致することが多いが, 17例で n (−)/ly (+), 12例で n (+)/ly (−) と, 合計29例 (21%) で n と ly の一致を見なかった. ECD と AMFR の発現性より, n または ly 陽性を同時に予測することが可能であるかどうかを検討したが, 有意な結果は得られなかった. 一方, 組織型別に SECD より検討すると, 分化型において SECD 濃度は n (−)/ly (−) 症例では平均3,158ng/ml と正常に比べて軽度上昇を示すのに対し, n または ly が (+) の症例では著明に上昇していた [n (+)/ly (+) : 平均4,789ng/ml, n (+)/ly (−) : 平均7,219ng/ml, n (−)/ly (+) : 平均5,211ng/ml]. しかし, 低分化型では n, ly の有無に関係なく SECD の上昇を示した (**Fig. 5**).

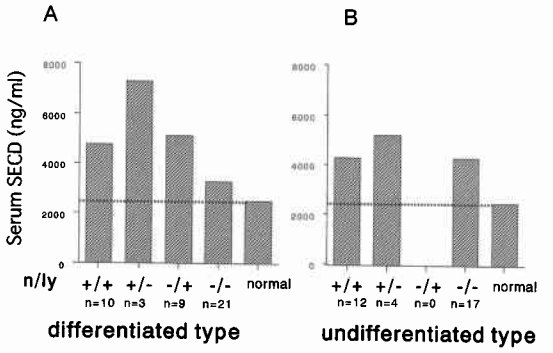
(6) 術前生検による評価

今回検討した中の20例を用いて切除標本と術前生検における ECD と AMFR 染色性を比較検討した. 今回の基準で陽性, 陰性を規定した場合, 染色の一致率は ECD 90%, AMFR 85%であった.

考　察

癌細胞は原発巣でリンパ管内に侵入し, リンパ節で

Fig. 5 The association of serum SECD amount with ly and n in differentiated (A) and undifferentiated (B) cancers.



転移巣を形成する．この過程には癌細胞の様々な細胞生物学的特性が関与しているが，細胞間接着の減弱と運動能の亢進は最も重要な因子と考えられる．

癌におけるECDの発現低下はnおよびlyをきたしやすい傾向にあったが，単独では有意差を得るには至らなかった．興味深いことに，症例を癌の分化度で分けると分化型ではECDの発現減弱はly，nと相関関係にあったが，低分化型では有意な関係は存在しなかった．これは低分化型の癌ではECDの蛋白発現が認められても遺伝子の変異や細胞質内の関連蛋白のリン酸化などのためそれらは殆ど機能していないため，つまり低分化癌ではECD発現の有無に関わらず細胞間接着が障害されているためと考えられる[1]．最近，低分化癌を生じる家族性胃癌の原因遺伝子がECDであることが報告されており[2]，ECDは癌の進展のみならず，癌化そのものに関わっている可能性が示唆されている．一方，分化型の癌では，ECDの発現性は細胞間接着の強さに比例すると考えられる．ECD発現減弱のメカニズムはほとんど解明されていないが，遺伝子の変異だけではなく，プロモーター領域のメチレーション[3]や低分子G蛋白の関与[4]も最近取り沙汰される．我々は，これとは別にプロテアーゼによる分解を有力な候補と考えている．実際，多くの症例で原発巣におけるECDの発現減弱と末梢血中のSECD上昇を示したことは，この考えを支持する有力な傍証と考えられた．最近，癌細胞の培養上清中にECD分解活性を見いだしており，ECD分解酵素の同定を急いでいるところである．

AMFRの癌の浸潤転移における働きは絨毛癌，膀胱癌，食道癌，前立腺癌，大腸癌さらには胃癌でも報告されている[5]．しかし，今回の検討ではAMFRの発現性とn, lyとの間に有意な関係は存在しなかった．培養細胞による基礎実験でECDによる細胞間接着は，mRNA転写レベルでAMFRの発現を抑制すると報告されており[6]，実際の臨床材料でもこのECDとAMFRの負の相関は確認されている[7]．今回の結果もこれに合致していた．また，低分化癌でAMFRの発現が上昇しているという事実は，前述した低分化癌ではECD発現の有無に関わらず細胞間接着が障害されるという仮説にもよく一致しており興味深いところである．

nとlyは本来一致すべきものであるが，約2割の症例で一致しなかった．最も大きな要因は，組織の割面をHEで染色し顕微鏡で観察するという病理組織検査の限界があると考えられる．これに対し最近では割面を増やしサイトケラチンで免疫染色する方法やRT-PCRによる方法[8]などで検出感度を上げると，新たにn, lyが検出されるという報告が多くある．即ち，n(−)/ly(+)やn(+)/ly(−)という症例はtechnical false negativeである可能性が大きいと考えられ，リンパ節転移診断の補助診断としてのリンパ管侵襲の実用性を考えると，n(+)またはly(+)のすべての症例を検出しうるような指標が必要だと考えられる．SECDは原発巣のECDの発現をよく反映しており，n, lyと相関すると考えられる．今回の結果では，SECDはnまたはlyに対してECDの免疫染色より優れた指標であった．これは，免疫染色によるECDの評価は腫瘍の一部分に過ぎないのに対しSECDは腫瘍全体の性格を反映しているためかもしれない．

臨床応用を考えるとn, lyとも手術後時間が経過してから結果が得られるものであり，手術術式に還元することは不可能である．術前生検で切除標本のECD, AMFRの発現性を予想することは可能であったが，やはり腫瘍のごく一部しか見ておらず，サンプルの採取も，免疫染色もやや煩雑で，評価法も主観的で再現性に乏しいところがある．SECDは術前に評価可能であるうえに，採血で簡単に測定され，評価も客観的で再現性にも優れているという利点を持っている．今後幅広い臨床応用が期待される．

このような生物学的特性による検索は，現在のところ肉眼的，顕微鏡的な形態学の補助的な診断にとどまっている．しかし，形態を規定するのは生物学的特性にほかならず，近い将来両者の関係が逆転し，腫瘍を生物学的特性で表現し形態学は補助診断として併記

されるような時代が来るものと思われる.

文 献

1) Shiozaki H, Oka H, Inoue M et al: E-cadherin mediated adhesion system in cancer cells. Cancer 77: 1605—1613, 1996
2) Guilford P, Hopkins J, Harraway J et al: E-cadherin germline mutations in familial gastric cancer. Nature 392: 402—405, 1998
3) Yoshiura K, Kanai Y, Ochiai A, et al: Silencing of the E-cadherin invasion suppressor gene by CpG methylation in human carcinomas. Proc Natl Acad Sci USA 92: 7416—7419, 1995
4) Braga VM, Machesky LM, Hall A et al: The small GTPases Rho and Rac are required for the establishment of cadherin-dependent cell-cell contacts. J Cell Biol 137: 1421—1431, 1997
5) Maruyama K, Watanabe H, Shiozaki H et al: Expression of autocrine motility factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. Int J Cancer 64: 316—321, 1995
6) Simard D, Nabi IR: Inverse relation of autocrine motility factor receptor and E-cadherin expression following MDCK epithelial cell transformation. Biochem Biophys Res Commun 219: 122—127, 1996
7) Otto T, Bex A, Schmidt U et al: Improved prognosis assessment for patients with bladder carcinoma. Am J Pathol 150: 1919—1923, 1997
8) Noguchi S, Hiratsuka M, Furukawa H et al: Detection of gastric cancer micrometastases in lymph nodes by amplification of keratin 19 mRNA with reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Jpn J Cancer Res 87: 650—654, 1996

Implication of E-cadherin and Autocrine Motility Factor Receptor in Lymphatic Involvement of Human Gastric Cancers

Yuichiro Doki, Hitoshi Shiozaki, Kenshu Kawanishi, Junnji Gofuku*, Masahiko Yano, Toshimasa Tsujinaka, Masatoshi Inoue and Morito Monden
Department of Surgery II, Osaka University Medical School
*Department of Surgery, Kano Comprehensive Hospital

Lymphatic involvement (ly) and lymph node metastasis (n) were predicted by immunohistochemical evaluation of the expression of E-cadherin (ECD), a representative cell adhesion molecule, and autocrine motility factor receptor (AMFR) in gastric cancer patients. Soluble fragments of E-cadherin (SECD) in the peripheral blood were simultaneously measured by the ELISA method. In the differentiated type of gastric cancers (tub, pap), ECD expression was negatively correlated with ly and n, but there was no such correlation in the undifferentiated type (por, sig). AMFR expression was carrelated with depth of invasion and tumor differentiation, but not with ly nor n. Interestingly, expression of ECD and AMFR was negatively correlated, and the ECD(−)/AMFR(+) tumors showed the highest incidence of ly and n. There was inconsistency in the evaluation of n and ly in 21% patients, and predictions could not be made on the basis of either ECD or AMFR expression. However, elevation of SECD levels was more sensitively associated with the presence of either ly or n than ECD or AMFR expression. Thus, the immunohistochemical expression of ECD and AMFR can partly predict the presence of ly and n. SECD were easily measured preoperatively, and the measurements were reproducible, objective, and more sensitive in predicting ly nad n. Thus, clinical application of SECD is expected in the future.

Reprint requests: Yuichiro Doki Department of Surgery II, Osaka University Medical School
2-2 Yamadaoka, Suita, Osaka, 565-0871 JAPAN