

## 進行胃癌 ( Stage II , III ) における u-PA family および 血管内皮細胞増殖因子の発現に関する免疫組織学的検討

日本大学第 1 外科

森 健一郎 天野 定雄 福澤 正洋

癌の浸潤，転移機構の中でプロテアーゼ，血管内皮増殖因子は重要な役割を果たしていることが示唆されている。今回我々は進行胃癌における u-PA family の意義を検討するために，治癒切除された Stage II , III の胃癌50例において u-PA , PAI 1 , u-PAR と VEGF の免疫組織学的発現，腫瘍血管密度，および臨床病理学的因子について検討した。u-PA の発現は48% , PAI 1 の発現は58% , u-PAR の発現は56% にみられ，VEGF の発現は64% に陽性であった。u-PA の発現群，血管密度の高密度群では，u-PA の非発現群，血管密度の低密度群に比較して有意に累積生存率が不良であった。Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析では u-PA の発現の有無が stage に次いで生存率に対して最も強い影響を与える独立した予後因子であった。u-PA は進行胃癌の新しい悪性度の指標になりうることが示唆された。

### 緒 言

癌の浸潤転移は原発巣からの癌細胞の遊離，基底膜の分解，癌細胞の遊走，血管新生の誘導など複雑な過程を完遂して成立する。その中で我々はこれまで腫瘍細胞の産生する血管内皮増殖因子に注目して研究してきた<sup>1)</sup>。腫瘍が産生する vascular endothelial growth factor (以下，VEGF) などの増殖因子は間質の血管内皮細胞にバラクリンのように作用し，腫瘍局所の微小血管を増加させ腫瘍に血中の酸素と栄養分を供給する。他方，腫瘍の浸潤に際して腫瘍細胞の産生するプロテアーゼが引き金となり腫瘍組織の細胞外マトリックスを消化して腫瘍細胞の遊離，分散を促し，転移を促進する。これまで乳癌や消化器癌などにおいて血管密度と血管内皮増殖因子について検討した報告は散見されてきたが<sup>2)-5)</sup>，胃癌治癒切除例で腫瘍血管とプロテアーゼおよびその阻害物質やレセプターについて多面的に検討された報告はない。そこで我々は，これらの血管増殖因子と血管密度の検討に加えて，腫瘍が産生する urokinase-type plasminogen activator (以下，u-PA) family [ plasminogen activator inhibitor 1 ; 以下，PAI 1 , urokinase-type plasminogen activator receptor ; 以下，u-PAR ] に着目し，その発現と従来の臨床

病理学的因子との関連性を検討した。またさらにこれらの因子の予後に与える影響について多変量解析を行ったので報告する。

### 対 象

1984年から1995年の間に当教室で手術を行った stage II , III の進行胃癌で治癒切除後36か月以上経過し，予後の判明している50例を対象とした。男女比は男性は39例，女性11例で，年齢分布は，22歳から78歳，平均63歳であった。

胃癌取扱い規約<sup>6)</sup>に従ったこれらの背景因子を Table 1 に示したが，病期別では，stage II が21例，III が29例であった。また癌の組織学的深達度の分類では，t1 ( sm ) 2例，t2 ( mp 14例，ss 13例 ) 27例，t3 ( se ) 17例，t4 ( si ) 4例であった。組織型に関しては乳頭腺癌，管状腺癌を高分化型，低分化腺癌，膠様腺癌，印環細胞癌を低分化型として大別した。予後に関しては，死亡例は10例ですべて胃癌による死亡であった。

### 方 法

#### 1. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色法は streptoavidin-biotin-peroxidase complex ( SAB 法 ) を用いた間接免疫酵素抗体法で行った。通常の病理検索の後，腫瘍の先進部および辺縁部の10%ホルマリン固定，パラフィン包埋標本を用いて4μの連続切片を作成し，段階的にキシレンアルコールで脱パラフィンを行い，0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加無水

エタノールにて内因性のペルオキシダーゼ活性をブロックした。リン酸緩衝液(PBS)に漬出し10%正常ヤギ血清に室温30分漬け、非特異的結合をブロックした。

反応の1次抗体として抗 u-PA monoclonal 抗体 (American Diagnostic 社), 抗 VEGF polyclonal 抗体 (VEGF-A 20; Santa Kruz 社) 抗 PAI 1 抗体 (American Diagnostic 社), 抗 u-PA-R 抗体 (American Diagnostic 社) を使用した。血管密度の測定については von Willebrand 因子 (Dako 社) の抗体を1次抗体として用いた。抗 VEGF 抗体, 抗 u-PA 抗体は100倍希釈, 抗 PAI 1 抗体は200倍希釈, 抗 u-PA-R 抗体は50倍希釈, 抗 von Willebrand 因子抗体は150倍希釈とし薄切切片上でそれぞれ4 , over night で反応させた。次に VEGF は biotin 化ラビット抗ヤギ IgG, その他はビオチン化ヤギ抗マウス IgG で室温30分反応させ, さらに peroxidase 標識 streptavidin (ニチレイ, ヒストファイン社) で室温30分反応させた。発色は, 0.1% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 加 diaminobenzidine-tetrahydrochloride 溶液で切片を漬析しておこなった。最終的には切片はヘマトキシリンで核染色を行ったあと, 脱水し通常の方法でマウントした。negative control として rabbit immunoglobulin fraction を用いた。

## 2. 染色性の判定

染色結果の判定は光学顕微鏡下で癌先進部5視野を観察し, u-PA, PAI 1, u-PAR, VEGF 染色陽性癌細胞を1,000個以上計測した。平均して癌細胞の細胞質が10%<sup>7)</sup>以上染色されているものを陽性と判定した。

von Willebrand 因子染色標本の判定では200倍の視野で腫瘍先進部の一定面積 (0.624mm<sup>2</sup>) あたりの血管個数を計測したが, その際腫瘍先進部の血管密度が特に高い, いわゆる vascular hot spot といわれる5視野を測定しその平均値を血管密度とした (Fig. 1 a)。

統計学的各群間の比較は, ANOVA 法および  $\chi^2$  検定を用い,  $p < 0.05$  を有意差ありとした。また生存率の検討は Kaplan Meier 法, logrank 法, 一般化 Wilcoxon 法により検定を行い,  $p$  が 0.05 以下を有意とした。

Cox の比例ハザードモデルでは, stage (II, III), 組織型 (高分化, 低分化), v 因子の有無, n 因子の有無, ly 因子の有無, 血管密度, u-PA, PAI 1, u-PAR, または VEGF の発現の有無により10項目について検討した。

## 結 果

### 1. 免疫組織化学染色

u-PA の発現は胃癌の腫瘍細胞の細胞質にびまん性

に, あるいは管腔を形成する癌細胞の内腔に接する部分に局在して認められた (Fig. 1 b)。一方, PAI 1, u-PAR の発現は腫瘍細胞の細胞質にびまん性に観察された (Fig. 1 c, d)。u-PA は胃癌組織の先進部では, 中心部と比較して強く染色される傾向があったが, 腫瘍の間質部分には発現は認められなかった。

VEGF の発現は胃癌の腫瘍細胞の細胞質にびまん性に認められ, u-PA と同様に癌の先進部に強く発現する傾向があった (Fig. 1 e)。また間質の血管内皮細胞やマクロファージにも発現していた。今回の検討では間質細胞の発現に関しては行っていない。

u-PA の発現は胃癌症例50例中24例48%に認められ PAI 1は50例中29例58%に陽性, u-PAR は50例中28例56%に陽性, VEGF は50例中32例64%に陽性であった。

### 2. u-PA の発現と臨床病理学的因子

u-PA の発現と, 臨床病理学的因子との関係は, Table 1に示すごとく低分化癌では u-PA 染色 (+) 例が 68.0% と多いのに比べ, 高分化癌では陽性例が 28.0% と少なく, 低分化癌で u-PA の発現が多い傾向にあった ( $p=0.041$ )。

また, 間質量では u-PA 陽性症例は medullary type, 44.4%, intermediate type, 24.0%, scirrhous type, 87.5% であり, scirrhous type に発現率が高かった ( $p=0.004$ )。浸潤増殖様式 (INF) では  $\alpha, \beta, \gamma$  の順に段階的に u-PA の発現が有意に多くなる傾向があった ( $p=0.0029$ )。

その他の因子においては, 明らかな関連性はみられなかった。

### 3. PAI 1 と臨床病理学的検討

PAI 1 の発現も間質の増加にともない増加する傾向があったが統計学的に臨床病理学的因子とは明らかな相関関係は認められなかった。

### 4. u-PAR と臨床病理学的検討

u-PAR の発現と臨床病理学的因子とは明らかな相関は認められなかった。

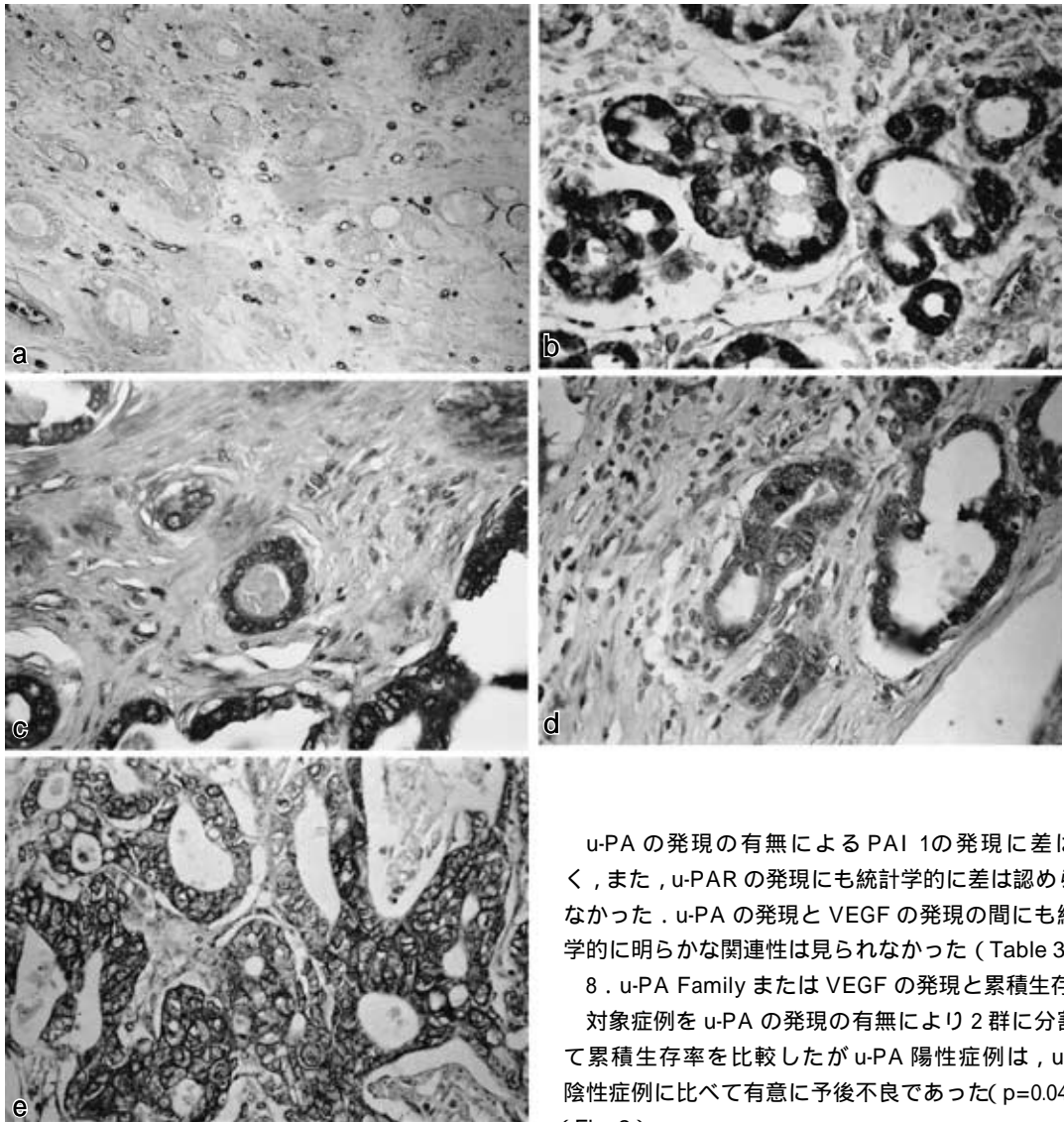
### 5. VEGF と臨床病理学的因子

VEGF の発現と組織型における比較では, 低分化癌では, 48.0%, 高分化癌では 80.0% と高分化癌で VEGF の発現が高い傾向にあったが ( $p=0.0184$ ) , その他の因子との検討では推計学的に明らかな関連性はみられなかった (Table 2)。

### 6. 血管密度と臨床病理学的因子

血管密度は, 最小19.7, 最大72.7の間に分布しており,

Fig. 1 Immunohistochemistry of u-PA families and VEGF in cancerous tissue : the expression of von Willebrand factor ( a ) was shown by dark staining at microvessels (  $\times 200$  ) The expression of u-PA ( b ) PAI 1 ( c ) uPAR ( d ) and VEGF ( e ) was shown by dark staining in the cytoplasm of the cancer cells (  $\times 200$  )



u-PA の発現の有無による PAI 1 の発現に差はなく、また、u-PA の発現にも統計学的に差は認められなかった。u-PA の発現と VEGF の発現の間にも統計学的に明らかな関連性は見られなかった ( Table 3 ) .

8 . u-PA Family または VEGF の発現と累積生存率対象症例を u-PA の発現の有無により 2 群に分割して累積生存率を比較したが u-PA 陽性症例は、u-PA 陰性症例に比べて有意に予後不良であった (  $p=0.0424$  ) ( Fig. 2 ) .

PAI 1 , u-PA , u-PA , VEGF の発現の有無と累積生存率においては明らかな有意差を認めなかった .

#### 9 . 血管密度と累積生存率

血管密度を平均値 + SD の 55 を cut off 値として 55 未満の群と 55 以上の群に分けて累積生存率を検討すると 55 以上の群は、55 未満の群に比べて有意差をもって予後不良であった (  $p=0.037$  ) ( Fig. 3 ) .

#### 10 . Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析

平均  $42.7 \pm 12.9$  であった . 血管密度と臨床病理学的因子の関係では高分化型胃癌の症例において微小血管密度が多い傾向にあったが統計学的に有意差はなく、その他の臨床病理学的因子においても推計学的に明らかな関係はみられなかった ( Table 2 ) .

7 . u-PA の発現と他の u-PA Family および VEGF の発現における各因子の発現との関連

Table 1 Relations between clinicopathological factors and the expression of u-PA families

The expressions of u-PA were more prominent in undifferentiated carcinoma, low amount of stroma tissue (scirrhus type) and high INF (INF  $\gamma$ ) in comparison with those in well differentiated carcinoma, high amount of stroma tissue, and low INF, respectively. The probability values were calculated by  $\chi^2$  model.

Factor	Case	u-PA( + )	PAI-1( + )	u-PAR( + )
histologic type				
differentiated	n = 25	7( 28.0% )	15( 60.0% )	18( 72.0% )
undifferentiated	n = 25	17( 68.0% )	12( 48.0% )	12( 48.0% )
depth of invasion				
t1	n = 2	0( 0% )	1( 50.0% )	1( 50.0% )
t2	n = 27	13( 48.1% )	14( 51.9% )	19( 70.4% )
t3	n = 17	9( 52.9% )	9( 52.9% )	8( 47.2% )
t4	n = 4	2( 50.0% )	3( 75.0% )	2( 50.0% )
lymph node metastasis				
negative	n = 9	5( 55.5% )	4( 44.4% )	6( 66.7% )
positive	n = 41	19( 46.3% )	23( 56.1% )	24( 58.5% )
stage				
stage II	n = 21	9( 42.9% )	10( 47.6% )	13( 61.9% )
stage III	n = 29	15( 51.7% )	17( 58.6% )	17( 58.6% )
amount of stroma tissue				
medullary type	n = 9	4( 44.4% )	2( 22.2% )	6( 66.7% )
intermediate type	n = 25	6( 24.0% )	15( 60.0% )	14( 56.0% )
scirrhus type	n = 16	14( 87.5% )	10( 62.5% )	10( 62.5% )
INF				
INF $\alpha$	n = 5	1( 20.0% )	3( 60.0% )	3( 60.0% )
INF $\beta$	n = 24	7( 29.2% )	14( 58.3% )	13( 54.2% )
INF $\gamma$	n = 21	16( 76.2% )	10( 47.6% )	14( 66.7% )
lymphatic invasion				
negative	n = 4	2( 50.0% )	1( 25.0% )	2( 50.0% )
positive	n = 46	22( 47.8% )	26( 56.5% )	27( 60.9% )
venous invasion				
negative	n = 31	16( 51.6% )	17( 54.8% )	19( 61.3% )
positive	n = 19	8( 42.1% )	10( 52.6% )	11( 57.9% )

\* ; p = 0.041    \*\* ; p = 0.004    \*\*\* ; p = 0.0029

Cox の比例ハザードモデルにより生存に寄与する因子10項目を検討した結果, Table 4に示すごとく u-PAの有無と stage の p 値が0.05以下で予後因子として独立したものであることが示された.

考 察

癌の転移は原発巣からの遊離, 間質内の移動, 脈管への定着, 脈管への侵入, 再接着, 増殖という複雑な過程を経て転移巣が形成される. Folkman らの報告<sup>8)</sup>以来, 癌の発育, 増殖には血管新生が必要であり, 腫瘍先進部血管密度の高いものでは血管新生が亢進し, 一方で癌の血管侵襲をきたし, 血行性転移を起こしやすく, 予後不良であるという成績が多い. 自験例では stage II, III 胃癌における腫瘍血管密度の検討では,

血管密度の cut off 値を平均値 + SD にとることにより累積生存率に有意差が認められた. この成績は血管密度が乳癌において報告された<sup>9)</sup>ように胃癌においても予後因子としての重要性があることを示唆したものである.

血管密度を規定する因子として特異的な血管増殖因子に注目し, VEGF の発現が, 胃癌の生存率に影響を与える因子になり得るかどうかを検討したが VEGF の発現の有無と生存の間には推計学的に有意な関連性が見られなかった.

一方, 本邦の胃癌の再発形式では腹膜再発が最も多く, 予後に与える影響は血行性転移よりも局所の漿膜浸潤である可能性が高いと考え, 基底膜や細胞外マト

Table 2 Relations between clinicopathological factors and the expression of VEGF and blood vessel density

The expressions of VEGF were more prominent in differentiated carcinoma in comparison with those in undifferentiated carcinoma. The probability values were calculated by  $\chi^2$  model.

Factor	Case	VEGF( + )	Blood vessel density $\pm$ SD
histologic type			
differentiated	n = 25	20( 80.0% )	44.8 $\pm$ 15.0
undifferentiated	n = 25	12( 48.0% )	40.6 $\pm$ 9.5
depth of invasion			
t1	n = 2	2( 100% )	48.7 $\pm$ 7.5
t2	n = 27	18( 66.7% )	42.5 $\pm$ 10.4
t3	n = 17	11( 64.7% )	43.8 $\pm$ 16.5
t4	n = 4	1( 25.0% )	36.2 $\pm$ 10.0
lymph node metastasis			
negative	n = 9	5( 55.6% )	46.2 $\pm$ 12.9
positive	n = 41	27( 65.9% )	41.9 $\pm$ 12.6
stage			
stage II	n = 21	13( 61.9% )	42.2 $\pm$ 11.2
stage III	n = 29	19( 65.5% )	43.0 $\pm$ 13.7
amount of stroma tissue			
medullary type	n = 9	4( 44.4% )	45.2 $\pm$ 15.1
intermediate type	n = 25	17( 68.0% )	41.8 $\pm$ 13.1
scirrhous type	n = 16	11( 68.7% )	42.6 $\pm$ 10.9
INF			
INF $\alpha$	n = 5	3( 60.0% )	40.6 $\pm$ 12.0
INF $\beta$	n = 24	17( 70.8% )	43.0 $\pm$ 14.6
INF $\gamma$	n = 21	12( 57.1% )	42.8 $\pm$ 10.7
lymphatic invasion			
negative	n = 4	4( 100% )	51.4 $\pm$ 10.8
positive	n = 46	28( 60.9% )	41.9 $\pm$ 12.6
venous invasion			
negative	n = 31	21( 67.7% )	43.8 $\pm$ 13.3
positive	n = 19	11( 57.9% )	40.8 $\pm$ 11.4

\* ; p = 0.0184

Table 3 Correlation between the expressions of u-PA and VEGF

	VEGF negative( % )	VEGF positive( % )
u-PA negative	8( 31% )	18( 69% )
u-PA positive	10( 42% )	14( 58% )

リックスを分解するプロテアーゼのうち u-PA family に着目し, u-PA, u-PAR や阻害物質 PAI 1 についても予後との関連性をあわせて検討した.

u-PA は, Serine protease の一つで Plasminogen の活性化により細胞外マトリックス構成蛋白の分解を促

進するとされている. 最近 u-PA が癌細胞からも産生されることが乳癌, 大腸癌などで報告がある<sup>10)</sup>. u-PA は腫瘍細胞にも間質の内皮細胞にも発現しているが, 今回は予後と関連したのは癌細胞における u-PA の発現であったという Mulcahy ら<sup>11)</sup>の報告に従って腫瘍細胞の発現のみに注目して解析した. u-PA はまた腫瘍先進部において特に優位に発現しておりこれは他の報告<sup>12)-15)</sup>にも見られるように腫瘍が進展, 播種してゆくために合目的であると思われた.

u-PA の発現頻度に関しては, 我々の検討においては48.0%の発現を認めたが伊藤ら<sup>16)</sup>は65%, 前田ら<sup>17)</sup>は56.9%と報告しており, 胃癌においては約50%に発現しているものと考えられた.

これらのパラメーター発現のその陽性の基準に関しては Ito<sup>7)</sup>, 前田ら<sup>17)</sup>は癌組織中の陽性範囲が10%以上のものを陽性としており, 我々も10%以上を陽性と判定して検討した.

u-PA と組織型に関しては, 我々の検討では, 低分化癌で u-PA の発現が多い傾向にあった (p=0.041) が伊藤ら<sup>16)</sup>は組織型では有意な相関はなく, また前田ら<sup>17)</sup>は高分化型に発現が多いが有意差はなかったと報告している. これら各報告者による相違に関しては, その背景因子において, 我々は Stage II, III を対象としたが他の報告者は, 肝転移症例, 腹膜播種性転移症例も

対象となっているものもあり, また, 免疫組織染色の評価の基準などの違いが関係していると推察される. 一方, 教室の西尾ら<sup>18)</sup>の報告では u-PA と腹水産生胃癌との関連性も含め, 低分化型腺癌に u-PA の発現が多いことを報告し, 一定の見解に至っていない.

u-PA の発現と間質量の比較では u-PA は scirrhous type でその発現が高い傾向があり u-PA の発現が癌の間質への浸潤に強く影響を与えているものと考えら

Fig. 2 Survival rate for u-PA expression. Survival rate was significantly worse in the patients with u-PA positive tumors than in those with u-PA negative tumors. The probability value were calculated by Generalized Wilcoxon test.

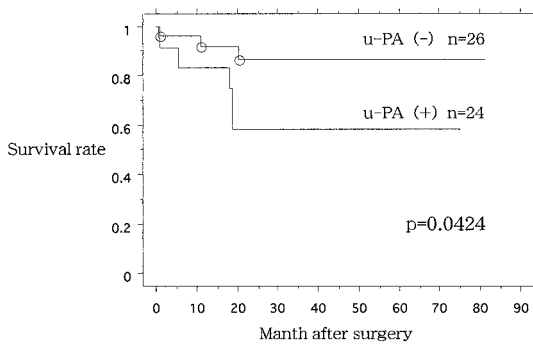


Fig. 3 Survival rate for microvessel density. The patients were divided into two groups: high microvessel density ( ≥ 55 per unit area ) and low microvessel density ( < 55 per unit area ). Survival rate was significantly worse in the patients with high microvessel density tumors than in those with low microvessel density tumors. The probability value were calculated by Generalized Wilcoxon test.

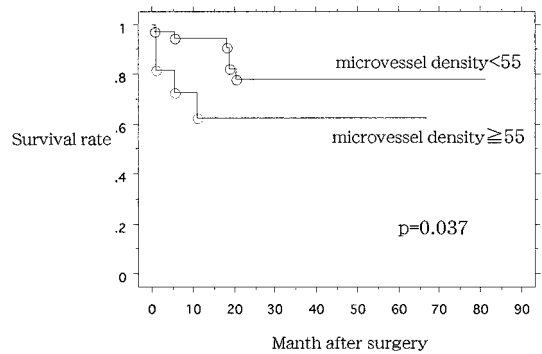


Table 4 The results of the multivariate analysis of each prognostic factors

	95% C.I.	Hazard ratio	p-value
Stage( II , III )	1.748 250.0	20.00	0.0159
u-PA ( negative, positive )	1.403 500.0	28.50	0.0293
PAI-1 ( negative, positive )	0.461 19.68	3.012	0.2495
u-PAR ( negative, positive )	0.357 9.553	1.848	0.4637
VEGF ( negative, positive )	0.733 3.448	5.260	0.0998
blood vessel density ( over 55 , under 55 . )	0.212 1.0638	1.500	0.6832
histologic type ( differentiated, undifferentiated )	0.171 11.10	1.376	0.7644
lymph node metastasis ( negative, positive )	0.084 16.01	1.160	0.9118
lymphatic invasion ( negative, positive )	0.221 30.99	2.617	0.4457
venous invasion ( negative, positive )	1.123 132.4	12.19	0.0598

れる。

u-PA と INF に関して、我々の検討では、 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  の順に段階的に u-PA の発現が有意に高くなる傾向があった ( $p=0.0029$ ) が、Ito<sup>7)</sup>、前田ら<sup>17)</sup> は深達度との関連性を報告しており胃癌の胃壁内進展浸潤に密接に関連しているものと思われる。

u-PA と VEGF の発現に関しては、VEGF が内皮細胞における u-PAR の発現を促進し u-PA の活性を増加させるとも言われているが、今回の我々の検討では VEGF の発現と u-PA の発現の間に相関はみられなかった。

胃癌の予後と u-PA の発現に関する検討では、我々の結果は、u-PA 陽性症例は、u-PA 陰性症例に比べて有意に累積生存率が不良であったが、Nekarda ら<sup>19,20)</sup> が胃全摘症例において胃癌組織中の u-PA と PAI 1 を同時に ELISA で測定した報告で、PAI 1 は統計学的に有意な予後因子とされたが u-PA は独立した予後因子とはならなかった。また、胃癌の予後と u-PA Family の免疫染色による発現の関連性を検討した報告<sup>7,21)-24)</sup> には単変量解析では u-PA も有意な予後因子として挙げられている。

一方、PAI 1 の発現は、u-PA を阻害する役割からも予後良好の指標としている報告も多く、PAI 1 の発現と予後との関連性には一定の見解が得られていない。自験のように stage を限定した場合には PAI 1 の発現と生存率は関連する傾向がみられたが、統計学的有意差はなかった。

u-PAR についても、その発現と予後との関連性において、一定の見解は得られておらず、自験例においても統計学的に有意な関連性は認められなかった。

PAI 1 陰性例において血管密度が高いという成績は u-PA などの浸潤転移促進因子を阻害できない場合、血管増生が一層促進されることを示唆している。これは Ito<sup>7)</sup> が PAI 1 陰性例に肝転移例が多いと報告していることを裏付けるものと考えている。

今回の stage II, III の進行胃癌の予後の検討で Kaplan Meier 法では血管密度、u-PA の発現が有意差をもって生存率に影響を与えていたが多変量解析では u-PA だけが統計学的に有意な指標として選択された。u-PA 発現は血管密度に比べて判定も容易で予後を推定できるすぐれたパラメーターといえる。胃癌再発の多くは腹膜播種再発であり、今後 u-PA の発現を術前、術中に判定して術後の再発予防の方略をたてるのがこのパラメーターを測定する意義につながるも

のと考えられる。

以上、Stage II, III 胃癌を対象に u-PA, PAI 1, u-PAR, VEGF, 腫瘍血管密度について検討した。多変量解析の結果 u-PA の発現の有無が生存率に対して最も強い影響を与える独立した予後因子であり u-PA は進行胃癌の新しい悪性度の指標になりうる事が示唆された。

なお、本論文の要旨は第2回日本胃癌学会(平成10年, 東京), 第53回日本消化器外科学会総会(平成11年2月, 京都)で発表した。

## 文 献

- 1) 森健一郎, 天野定雄: 胃癌組織における Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) と Urokinase-type Plasminogen Activator (u-PA) の免疫組織学的検討とその意義について. *Biotherapy* 12: 396-403, 1998
- 2) 戸井雅和, 山本 豊, 富永 健: 癌と血管新生 最近の進歩 乳癌の予後と腫瘍血管. *癌治療と宿主* 9: 180-188, 1997
- 3) 星名聖剛: 乳癌の腫瘍血管新生に関する研究. *聖マリアンナ医大誌* 23: 650-659, 1995
- 4) Maeda K, Chung Y-S, Ogawa Y et al: Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77: 858-863, 1996
- 5) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucano CD et al: Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res* 55: 3964-3968, 1995
- 6) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 改訂第11版. 金原出版, 東京, 1985
- 7) Ito H, Yoneyama Y, Fujita H et al: Prognostic relevance of urokinase-type plasminogen activator (u-PA) and plasminogen activator inhibitors PAI 1 and PAI 2 in gastric cancer. *Virchows Arch* 427: 487-496, 1996
- 8) Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 9) Toi M, Hosina S, Takayanagi T et al: Association of vascular endothelial growth factor expression with tumor angiogenesis and with early relapse in primary breast cancer. *Jpn J Cancer Res* 85: 1045-1049, 1994
- 10) 西野暢彦, 中村昌樹, 青木克憲: 消化器癌における plasminogen activator の役割. *日消外会誌* 24: 1096-1100, 1991
- 11) Mulcahy HE, Duffy MJ, Gibbons D et al: Urokinase-type plasminogen activator and outcome in Duke's B colorectal cancer. *Lancet* 344: 583-584, 1994
- 12) Nakamura M, Konno H, Tanaka T et al: Possible role of plasminogen activator inhibitor 2 in the prevention of the metastasis of gastric cancer tis-

- sues. *Thromb Res* 65 : 709-719, 1992
- 13) Oka T, Ishida T, Nisino T : Immunohistochemical evidence of urokinase-type plasminogen activator in primary and metastatic tumors of pulmonary adenocarcinoma. *Cancer Res* 51 : 3522-3525, 1991
- 14) Reilly D, Christensen L, Duch M et al : Type 1 plasminogen activator inhibitor in human breast carcinomas. *Int J Cancer* 50 : 208-214, 1992
- 15) Yonemura Y, Ninomiya I, Nojima N : Prognostic value of urokinase-type plasminogen activators in gastric cancer. *Oncol Rep* 1 : 765-772, 1994
- 16) 伊藤 博, 米村 豊, 土原一哉 : 胃癌における Urokinase-type Plasminogen Activator, E-cadherin の発現と悪性度. *癌と化療* 22(Suppl II) : 124-129, 1995
- 17) 前田 清, 鄭 容錫, 沢田鉄二 : 胃癌の進展, 転移におけるプラスミノゲンアクチベーター発現の意義. *日消外会誌* 27 : 1015-1020, 1994
- 18) 西尾 知, 天野定雄, 福澤正洋 : 胃癌における癌性腹水再発予測因子に関する免疫組織学的検討. *Biotherapy* 12 : 1149-1156, 1998
- 19) Nekarada H, Schmitt M, Ulm K et al : Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI 1 incompletely resected gastric cancer. *Cancer Res* 154 : 2900-2907, 1994
- 20) Nekarada H, Siewert JR, Schmitt M et al : Tumor-associated proteolytic factors uPA and PAI 1 and survival in totally resected gastric cancer. *Lancet* 343 : 117, 1994
- 21) Allgayer H, Babic R, Grutzner KU et al : Tumor-associated proteases and inhibitors in gastric cancer : analysis of prognostic impact and individual risk protease patterns. *Clin Exp Metastasis* 16 : 62-73, 1998
- 22) Ganesh S, Sier CF, Heerding MM et al : Prognostic value of the plasminogen activation system in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 77 : 1035-1043, 1996
- 23) Heiss MM, Babic R, Allgayer H et al : The prognostic impact of the urokinase-type plasminogen activator system is associated with tumour differentiation in gastric cancer. *Eur J Surg Oncol* 22 : 74-77, 1996
- 24) Heiss MM, Babic R, Allgayer H et al : Tumor-associated proteolysis and prognosis : new functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol* 13 : 2084-2093, 1995

#### Immunohistochemical Analysis of u-PA Families and VEGF Expression in Resectable Advanced Gastric Cancers

Ken-ichiro Mori, Sadao Amano and Masahiro Fukuzawa  
First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine

The aim of our study was to identify prognostic factors in advanced resectable gastric cancer patients. We investigated 50 advanced gastric cancer surgical specimens by immunohistochemical methods. Measurements of microvessel density, expression of urokinase-type plasminogen activator (u-PA), plasminogen activator inhibitor 1 (PAI 1), urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR) and vascular endothelial growth factor (VEGF) were made by the streptoavidin-biotin complex staining method. We then compared these parameters with the survival, and clinicopathological factors. Microvessel density was between 19.7 and 72.7 (mean  $42.7 \pm 12.9$ ). Expression of u-PA, PAI 1, u-PAR, or VEGF in cancer cells was detected in 24 (48%), 29 (58%), 28 (56%), and 32 (64%), respectively. Monovariate analysis showed that u-PA expression and microvessel density had a significant influence on survival after surgery. The other two u-PA families had no impact on survival. Ten variables were entered into the Cox proportional hazard regression model to identify factors that independently influenced survival. Multi-variate analysis revealed that clinical stage and the expression of u-PA independently influenced survival in patients. In conclusion, it is suggested that the u-PA expression is useful as a new prognostic factor in advanced gastric cancer patients.

Key words : urokinase-type plasminogen activator, plasminogen activator inhibitor 1, urokinase-type plasminogen activator receptor, vascular endothelial growth factor, gastric carcinoma

【*Jpn J Gastroenterol Surg* 33 : 286-293, 2000】

Reprint requests : Ken-ichiro Mori First Department of Surgery, Nihon University School of Medicine  
30-1 Ooyaguchi-kamimachi, Itabashi-ku, Tokyo, 173-8610 JAPAN