

大腸癌における MMP 7, type IV collagen の 免疫組織発現からみた肝転移予測

東京慈恵会医科大学外科

小川 匡市 池内 健二 渡部 通章
金子 靖 衛藤 謙 藤川 亨
高尾 良彦 穴澤 貞夫 山崎 洋次

大腸癌症例中、同時性肝転移群(S群)36例、異時性肝転移群(M群)30例、対照群(C群)として病理組織学的に有意差を認めず術後5年間肝転移再発を認めない137例を対象とし、MMP 7, type IV collagenを用い免疫組織学的に3群間の比較検討を施行した。MMP 7の発現率は、最深部位でS群26/36(72%), M群14/30(47%), C群17/37(46%)と有意差を認めなかったが、リンパ管内発現率では、S群32/36(89%), M群19/30(63%), C群12/37(32%), 静脈管内でS群28/32(87%), M群13/19(69%), C群6/37(16%)と肝転移群と対照群間に有意差を認めた。type IV collagenの発現減弱率では、S群18/36(50%), M群10/19(53%), C群14/37(38%)と有意差を認めなかった。したがって、リンパ管内のMMP 7発現率が臨床的に肝転移予測に有用なパラメーターであることが示唆された。

緒 言

大腸癌の肝転移に対する第1の治療法は現在のところ外科的切除である。肝切除の術式はすでに確立されているので、治療成績を向上させるためには、大腸癌術後の異時性肝転移をいかに早期に拾い上げるかにかかっているとよい。したがって、肝転移のハイリスク群をしばらくこんでサーベイランスを重点的に行うことが、cost-effectivenessの面からも重要である。

癌細胞の転移巣形成は原発巣からの離脱、浸潤、血管内移動、生着、転移巣形成とさまざまな段階を経て成立する。この浸潤過程において中心的役割を果たすと考えられているものにマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)とよばれる酵素群がある。近年、MMP中最小の分子量をもつ(Mw: 28000)マトリライシン(matrilysin; MMP 7)が、他のMMPが主として間質細胞から産生されているのに対し、癌細胞そのものに発現を認めることが報告され、IV型コラーゲン、フィブロネクチン、ラミニンなどの基底膜成分の分解に必須の酵素であり、癌の進展過程に重要な役割を担っていることが解明されてきた^{1)~4)}。われわれは、大腸癌

肝転移に関し、病理組織学的な背景因子に有意差を認めない3群間(同時性肝転移群、異時性肝転移群、対照群(術後5年間以上無再発生存例中臨床病理学的因子をマッチングさせた群))に対して、MMP 7, type IV collagenの免疫組織学的検討からMMP 7, type IV collagenが肝転移予測の有用なパラメーターとなり得るか否かを検討した。

1. 対象および方法

1. 対象

対象とした症例は1982年から1996年に東京慈恵会医科大学外科学講座第1において切除された大腸直腸癌症例中、同時性肝転移を認めた36例、および異時性肝転移30例を対象とした。術後5年間以上無再発生存例中、臨床病理学的因子をマッチングさせた37例を対照群とした(Table 1)。

2. 方法

免疫染色: 脱パラフィン後、0.3H₂O₂加メタノールにて30分内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。さらに、正常ウマ血清を20分反応後、1次抗体として抗ヒトMMP 7抗体(141 7B2, Fuji-chemi.co.)および抗type-IV collagen抗体(COL 94, SIGMA Co.)を50倍希釈し室温で1時間反応させ4にて一晚反応させた。Avidin-biotin peroxidase complex method(Vectastain

Table 1 Comparison of clinicopathological factors

	C	S	M	test
gender				
male	29	26	21	N.S
female	8	10	9	
age(average)	54.6	63.5	57.9	N.S
location				
Right colon	10	15	9	N.S
Left colon	17	9	8	
Rectum	10	12	13	
diameter	48.57	57.4	50.6	N.S
macro scopic finding				
1	1	1	0	N.S
2	32	25	25	
3	4	10	5	
micro scopic well	28	29	21 *	N.S
moderate	8	6	9	
poor	1	1	0	
depth				
ss, a1	7	11	8 **	N.S
s, a2	25	18	19	
si, ai	5	7	3	
v factor				
v +	37	32	19	N.S
v -	0	4	11	
ly factor				
ly +	37	36	30	N.S
ly -	0	0	0	
N factor				
n +	19	29	19	N.S
n -	18	7	11	
Total	37	36	30	N.S

C; control group

S; synchronous liver metastasis group

M; metachronous liver metastasis group

*: included mucinous carcinoma

**: 2 case is mp

ABC kit. Vector Lab, USA)により, DAB-H₂O₂溶液内で10分間呈色させ水洗後, hematoxylin-eosin で核染色をし, 脱水, 逸徹, 封入した。

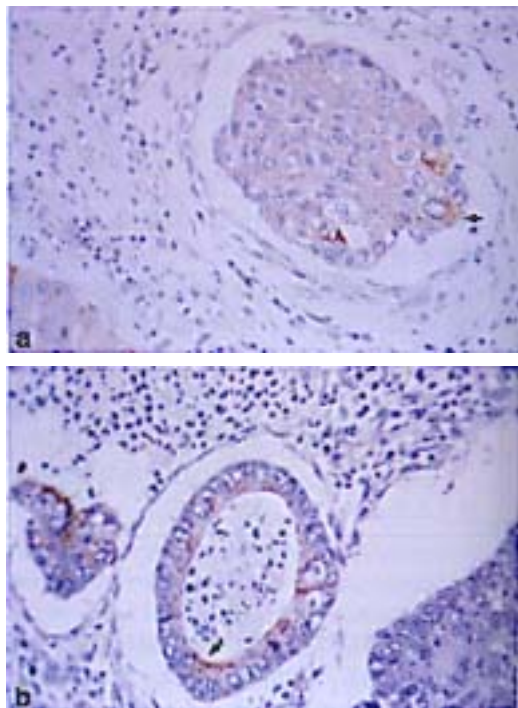
判定: 各症例において癌最深部を有する切片をもちい, MMP 7は最深部位および脈管内での発現(Fig. 1)を type-IV collagen は脈管内での基底膜減弱を陽性とした(Fig. 2)。

なお, 用語および臨床病理学的所見は大腸癌取扱い規約⁵⁾に従い, 統計学的処理は χ^2 検定および T 検定, log rank test を用いて行い, $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

II. 結 果

1. MMP-7の発現

Fig. 1 Tissues were immunostained with antibodies against MMP 7, as described in material and methods. Note positive staining for MMP 7 in adenocarcinoma. Hematoxylin counter-stain($\times 100$) (a) in the lymph channel (b) in the vessel



同時性肝転移群を S 群, 異時性肝転移を M 群, 対照群を C 群とした。

最深部位での発現: S 群は36例中26例(72%)に MMP 7の発現を認め, M 群30例中14例(47%)および C 群37例中17例(51%)に対して有意に高い発現を認めた ($p < 0.05$)(Fig. 3)。

脈管内(リンパ管内)での発現: S 群は36例中32例(89%), M 群30例中19例(63%)に MMP 7の発現を認め, C 群37例中12例(37%)に対して有意に高い発現を認めた ($p < 0.05$)(Fig. 4)。

脈管内(静脈管内)での発現: S 群は32例中28例(87%), M 群19例中13例(69%)に MMP 7の発現を認め, C 群37例中6例(18%)に対して有意に高い発現を認めた ($p < 0.05$)(Fig. 5)。

2. type IV collagen の発現減弱

S 群は32例中19例(59%)に type IV collagen の発現減弱を認め, M 群19例中10例(53%)および C 群37例中14例(38%)と有意差は認めなかった(Fig. 6)。

Fig. 2 Tissues were immunostained with antibodies against type IV collagen, as described in material and methods. Note improved staining for type IV collagen on the vessel basal membrane. Hematoxylin counter-stain(×100)

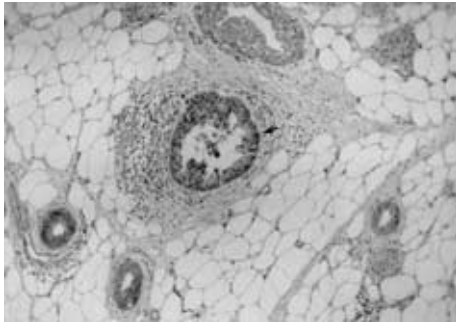


Fig. 3 Expression rate of MMP 7

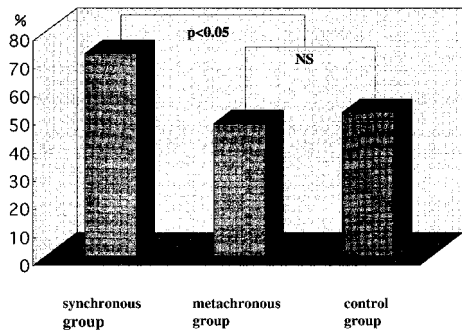
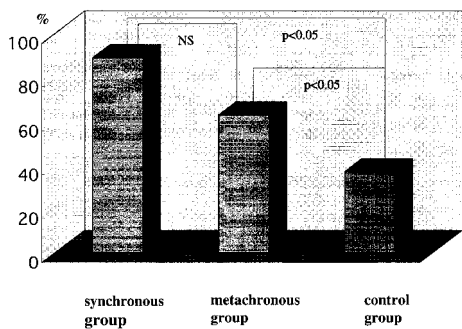


Fig. 4 Expression rate of MMP 7 in the lymph channel



3. MMP 7と type IV collagen の相関

脈管内で MMP 7が発現し type IV collagen 発現減弱を認めた例は, S 群は32例中18例 (56%), M 群19例中 6 例 (32%) の発現を認め, C 群37例中 6 例 (16

Fig. 5 Expression of MMP 7 in the vessel

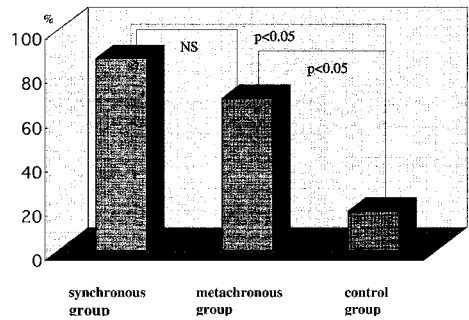


Fig. 6 Decreased rate of type IV collagen

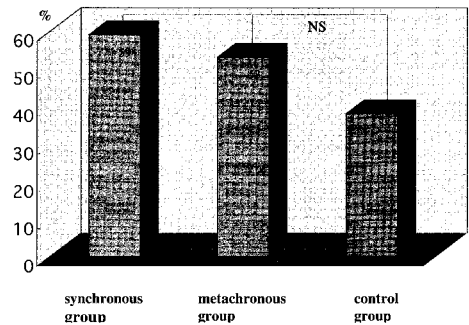
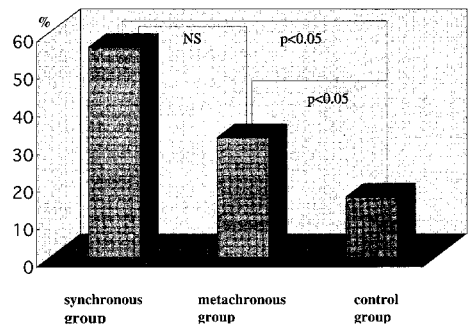


Fig. 7 Correlation between the expression rate of MMP-7 and decreased rate of type IV collagen



%) に対して有意差を認めた (p < 0.05)(Fig. 7).

III. 考 察

癌の浸潤過程においては, Liotta ら⁶⁾により提唱された癌細胞の基底膜への接着, 基底膜成分の分解, 癌細胞の運動の 3 段階を経て成立するという three step theory がこの研究の指針となっている. 近年では, 各

過程における接着因子, 血管新生因子, 増殖因子, 分解酵素と各シグナル伝達機構が関与していることが解明され, その中心的役割をマトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) が果たすと考えられ報告されている。しかしながら, 脈管内の癌細胞の MMP 7発現に着目し比較検討した報告はない。本研究は, 前述の脈管内への侵入までの過程において, 3群ともさまざまな侵入過程の後, 最終的に病理組織学的には有意差を認めない3群間の比較検討であり, 対照群においても脈管因子 (Iy, v) は転移群と比較し病理組織学的有意差は認めない。したがって, 本検討により認められた脈管内における MMP 7発現の有意差は, すくなくとも脈管内移動, 脈管外脱出, 転移臓器への生着と増殖の過程における MMP 7の関与として考察することが可能であると思われる。われわれが脈管内の癌細胞の MMP-7発現に着目した理由は, 癌細胞が転移すなわち転移臓器への生着と増殖を成立させるには, 血管基底膜分解能を癌細胞自身が有する必要がある, 癌細胞膜表面での MMP 7の活性の存在が必須であるはずであると考えたからである。

MMP 7は腫瘍細胞自身にみられることは, in situ hybridization により明らかになっている⁴⁾。また, Mori ら⁷⁾, Ishikawa ら⁸⁾は, Northern blot 法, PT-PCR 法を用いて Dukes' stage の進行とともに発現が増加し, 肝転移において最も亢進していることを報告している。また, Nagashima ら⁹⁾は, 免疫染色で MMP 7陽性癌細胞に隣接する血管内皮細胞における MMP 7の発現を報告し, 癌細胞の血管浸潤を容易にしていることをのべた。最深部位での発現においては, 同時性肝転移群 (72%), 異時性肝転移群 (47%), 対照群 (51%) と, 同時性肝転移群が異時性肝転移群と対照群に対し高値を示したが, 肝転移群と対照群の間に有意差は認めず, 浸潤および脈管内への侵入に関する肝転移群と対照群の間に差はないことが示唆される。しかしながら, リンパ管内の発現率に着目すると, 同時性肝転移群 (89%), 異時性肝転移群 (63%), 対照群 (37%) と対照群の発現率が低下し有意差を認めた。さらに, 静脈管内の発現率となると, 同時性肝転移群 (87%), 異時性肝転移群 (69%), 対照群 (18%) と対照群の発現率の著明な低下を認めた。つまり, 肝転移群においては MMP 7陽性癌細胞は脈管内侵入後も活性を有し, 非転移群になると MMP 7陽性癌細胞は脈管内侵入後その活性を消失すると考察された。したがって, 静脈管内での MMP 7活性を検討することが肝転

移に対する有効な手法であることが示唆された。ただし, 静脈管陰性例にも肝転移例を認め, なおかつ, すべての例でリンパ管侵襲陽性であることを考えると, 臨床的に肝転移を予測するための最も有用なパラメーターとなりえるのは, リンパ管内の MMP 7の発現率であると考えられた。

type IV collagen は基底膜を形成する細胞外マトリックスであり, 基底膜の局在は, 上皮細胞や血管内皮細胞の基底膜を裏打ちするように存在し, 間質のマトリックスとの間をつなぐとともに上皮細胞や内皮細胞の足場となっている。基底膜は末梢血管の周囲をシート状に包んでおり癌細胞が脈管内に入るまたは脈管外にでる際には基底膜を通過しなくてはならない^{6,10)}。

本研究では, 癌細胞の存在する脈管における血管内皮細胞の基底膜は, 癌細胞の侵入により type IV collagen の発現異常をきたしているか否かの検討を施行し, type IV collagen の発現異常と MMP 7の発現の相関を検討した。同時性肝転移群 (59%), 異時性肝転移群 (53%), 対照群 (38%) と3群間の type IV collagen の発現減弱率に有意差は認めなかった。つまり, 癌細胞が脈管内に侵入する際には, 正常の脈管でほぼ100% type IV collagen の発現が認められることを考えれば, type IV collagen の発現異常をきたすことは示唆されたが, 発現減弱率と肝転移との間に相関は認めなかった。また, type IV collagen の発現減弱と MMP 7の発現の相関に関しては, 同時性肝転移群で type IV collagen の発現減弱を認めた32例中19例 (59%) のうち18例 (95%) に MMP 7活性を認めた。同様に, 異時性肝転移群では19例中10例 (53%) 中6例 (60%), 対照群37例中14例 (38%) 中6例 (43%) に MMP 7活性を認めた。したがって, type-IV collagen の発現減弱43例中30例 (69%) に MMP 7活性を認めた。この結果は, Fig. 5でしめした静脈管内での MMP 7活性の極めて高い発現率の結果から導かれたものであり, type-IV collagen の発現減弱率と MMP 7活性との相関は認めないと考察された。

われわれは, 大腸癌肝転移に関し, カドヘリン, ラミニンの免疫組織学的検討を施行し, 基底膜上のラミニンの発現が肝転移に必要であることを確認し, 肝転移予測の有用なパラメーターとして MMP 7とともに検討している。現在, MMP 7の阻害薬における Phase II study が施行されており著効例の報告も散見される¹¹⁾⁻¹³⁾, われわれは, 本研究において明かとなったり

ンバ管内の MMP 7 の発現率をもとに prospective study を計画しており、今後 MMP 7 の阻害薬の成績を検討報告したい。

文 献

- 1) Wilson CL, Matrisian LM : Matrilysin : An epithelial matrix metalloproteinase with potentially novel functions. *Int J Biochem Cell Biol* 28 : 123-136, 1996
- 2) Yamamoto H, Itoh F, Imai K et al : Expression of matrilysin mRNA in colorectal adenomas and its induction by truncated fibronectin. *Biochem Biophys Res Commun* 201 : 657-664, 1994
- 3) Yamamoto H, Itoh F, Imai K et al : Suppression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion in vitro. *Int J Cancer* 61 : 1, 1995
- 4) McDonnell S, Navre M, Coffey RJ. Jr et al : Expression and localization of the matrix metalloproteinase pump-1 (MMP 7) in human gastric and colon carcinomas. *Mol Carcinog* 4 : 527-533, 1991
- 5) 大腸癌研究会編 : 大腸癌取り扱い規約 .改訂第 6 版 . 金原出版 , 東京 , 1994
- 6) Liotta LA, Tryggvason K, Garbisa H et al : Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen. *Nature* 284 : 67-68, 1980
- 7) Mori M, Barnard GF, Mimori K et al : Over expression of matrix metalloproteinase 7 mRNA in human colon carcinomas. *Cancer* 75 : 1516-1519, 1995
- 8) Ishikawa T, Ichikawa Y, Mitsuhashi M et al : Matrilysin is associated with progression of colorectal tumor. *Cancer Lett* 107 : 5-10, 1996
- 9) Nagashima Y, Hasegawa S, Koshikawa N et al : Expression of matrilysin inhibits colon cancer cell invasion in vitro. *Int J Cancer* 61 : 218-222, 1995
- 10) Stetler-Stevenson WG, Aznavoorian S, Liotta LA : Tumor cell interactions with the extracellular matrix during invasion and metastasis. *Annu Rev Cell Biol* 9 : 541-573, 1993
- 11) Poole C, Adams M, Barley V et al : A dose-finding study of marimastat, an oral matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with advanced ovarian cancer. *Ann Oncol* 7 : 68 (abstract) 1996
- 12) Millar A, Brown P : 360 patient metaanalysis of studies of marimastat, a novel matrix metalloproteinase inhibitor. *Ann Oncol* 7 (abstract) : 123, 1996
- 13) Primose JN : Marimastat in recurrent colorectal cancer : exploratory evaluation of biological activity by measurement of carcinoembryonic antigen. *Br J Cancer* 79 : 509-514, 1999

Expression of Matrix Metalloproteinase 7 and type IV collagen Associated with Liver Metastasis in Human Colorectal Cancer : An Approach from immunohistochemistry

Masaichi Ogawa, Kenji Ikeuchi, Michiaki Watanabe, Yasushi Kaneko,
Ken Etoh, Toru Fujikawa, Yoshihiko Takao,
Sadao Anazawa and Yoji Yamazaki
Department of Surgery, The Jikei University School of Medicine

The significance of MMP-7 and type IV collagen expression in human colorectal cancer was investigated by immunohistochemical assay, and its correlation with liver metastasis was analyzed. In the synchronous metastasis group, 26 of 36 cases (72%) showed positive staining of MMP-7 : 32 cases (89%) in the lymph channel, 28/32 (87%) in the vessel, and 19/32 (59%) a decreased rate of type IV collagen. In the metachronous metastasis group, 14 of 30 cases (47%) showed positive staining of MMP-7 : 19 cases (63%) in the lymph channel, 13/19 (69%) in the vessel, and 10/19 (53%) a decreased rate of type IV collagen. In the control group, which is a 5-year disease-free group, in spite of no significant clinicopathological factors compared with the other two groups, 17 of 37 cases (51%) showed positive staining of MMP-7 : 12 cases (37%) in the lymph channel, 6/37 (18%) in the vessel, and 14/37 (38%) a decreased rate of type IV collagen. Thus the metastatic groups show significantly higher expression of MMP-7 in the lymph channel than the control group. The expression of MMP-7 in the lymph channel is the most useful parameter to predict liver metastasis in colorectal cancer.

Key words : colorectal cancer, liver metastasis, immunohistochemistry, MMP-7, type IV collagen

[*Jpn J Gastroenterol Surg* 33 : 309-313, 2000]

Reprint requests : Masaichi Ogawa Department of Surgery 1, The Jikei University School of Medicine
3-25-8 Nishi-shinbashi, Minato-ku, Tokyo, 105-8461 JAPAN