日消外会誌　33（4）：512～516，2000年

特集 1

分子生物学的および免疫組織化学的側面よりみた大腸癌肝転移高危険群抽出の試み

岐阜大学第 2 外科
国枝　克行　　鴻村　　寿　　佐野　　純　　山口　和也
青木信一郎　　北村　文近　　杉山　保幸　　佐治　重豊

【目的】分子生物学的側面より大腸癌肝転移高危険群の抽出を行った．【対象と結果】①大腸癌48例における，RT-PCR による MMP-9，uPA，TIMP 遺伝子発現と肝転移との関連をみると，転移群では MMP-9と uPA 発現率が有意に高率でった．②異時性肝転移33例と非転移66例における PCNA，CD44，nm23，p53免疫染色による検討では，転移群で PCNA-LI が有意に高く，CD44（＋），nm23（－）が有意に多かった．③肝転移65例，無再発66例における検討では，肝転移群で MVD が有意に高値で，VEGF 染色性が有意に高かった．④大腸癌52例での CEA と CK-20を用いた RT-PCR による癌細胞の検索では，病期の進行とともに検出率が増加した．遠隔転移（－）例でも16%（7/43）が陽性で，うち 2 例(29%)に異時性肝転移が認められた．【結語】大腸癌肝転移には MMP-9，uPA，TIMP，VEGF，MVD，PCNA，nm23，CD44などが関連しており，これらの検索が RT-PCR による環流血中の癌細胞検出法とともに高危険群抽出に有用であると推察された．

1．はじめに

大腸癌は他癌に比べ，比較的予後良好な疾患であるが，肝転移を伴う症例の予後は不良である．そのため異時性肝転移を的確に予測し，早期に補助療法を施行することが重要と考えられる．異時性肝転移の予測に関する検討は，従来組織型，深達度，脈管侵襲などの臨床病理学的因子との関連から行われてきたが，癌悪性化と遺伝子異常の関係や，肝転移のメカニズムが解明されるに伴い，癌遺伝子や関連抗原との関連から検討されるようになった．今回，著者らは大腸癌肝転移の高危険群を抽出する目的で，肝転移と癌の増殖能，浸潤能，血管新生に関わる因子との関係を分子生物学的および免疫組織的手法を用いて検討した．

（1）matrix metalloproteinase-9（MMP-9），urokinase type plasminogen activator（uPA），tissue inhibitor of metalloproteinase（TIMP）の発現と肝転移との関係

対象：大腸癌48例（結腸癌28例，直腸癌20例）を対象とした．病期進行程度は stageI 5例，stageII 17例，stageIIIa+IIIb 18例, stageIV 8例であり, 同時性肝転移陽性例は 8 例であった．

方法：新鮮癌組織から total RNA を抽出後，逆転写法にて complementary DNA（以下 cDNA）を合成した．これを鋳型として MMP-9，uPA，TIMP に特異的なプライマーを用いて polymerase chain reaction（PCR）を行った．PCR には thermal cycler（Takara 社）を用い，DNA denaturation；94℃，60秒，primer extension；72℃, 60秒を 1 サイクルとし, MMP-9では35サイクル，uPA では30サイクル，TIMP では25サイクル行った. MMP-9，uPA，TIMP のプライマーは既報に記載された塩基配列をもとに合成されたものを使用した．増幅 DNA の同定は2.0%アガロースゲル電気泳動法により行った．なお，統計学的有意差検定は，χ2検定あるいは Mann-Whitney の U 検定を行い, 期待値が 5 未満の場合は Fisher の直接確率検定法を用いて行った．危険率 5%未満を有意差ありと判定した．

結果：全症例での MMP-9発現率は54.2%，uPA は70.8%，TIMP は89.6%であった．各遺伝子発現の有無と年齢，性別，占居部位，組織学的病期，組織型，組織学的壁深達度との間に明らかな関連は認められな

＊第54回日消外会総会シンポ 4・消化器癌転移能の分子生物学的側面（消化管）
＜1999年12月22日受理＞別刷請求先：国枝　克行
〒500-8705　岐阜市司町40　岐阜大学医学部第 2 外科

かった．同時性肝転移陽性群のMMP-9発現率は100%で，陰性群の45.0%に比べ有意に高値を示した．uPA発現率は転移陽性群では100%で，陰性群の65.0%に比べ有意に高率であった．TIMP発現率は転移陽性群が75%に対して陰性群は92.5%であったが両群間に有意差は認められなかった．MMP-9とuPAを組合わせた発現率と肝転移との関係をみると，MMP（＋）uPA（＋）群では30.8%（8/26）に肝転移がみられたのに対し，その他群〔MMP（＋）uPA（－），MMP（－）uPA（＋），MMP（－）uPA（－）〕では0%（0/22）であり，MMP（＋）uPA（＋）群で有意に肝転移発現率が高かった．MMP-9とTIMPの組合せでは，MMP（＋）TIMP（＋）群の肝転移率が100%であったのに対し，その他群〔MMP（＋）TIMP（－），MMP（－）TIMP（＋），MMP（－）TIMP（－）〕では13.0%であり，MMP（＋）TIMP（＋）群で有意に肝転移率が高率であった．

（2）p53，PCNA，CD44，nm23，c-erbB-2の発現性と異時性肝転移との関係

対象：大腸癌異時性肝転移33例（以下，転移群）と術後５年以上経過した無再発生存例中，転移群と占居部位，組織型，壁深達度を1：2で度数マッチングさせた66例（以下，対照群）を対象とした．転移群の病期進行程度はstageI 1例，stageII 6例，stageIIIa+IIIb 26例であり，非転移例ではstageI 6例，stageII 14例，stage IIIa+IIIb 46例であったが，両群間の症例の偏りに有意差は認められなかった．

方法：切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4μmの薄切切片を作製し，脱パラフィン後，p53，c-erbB-2，CD44，nm23はABC法で，PCNAはEPOS法で染色した．1次抗体としてp53はDO-7，PCNAはPC10，CD44はDF1485，nm23，c-erbB-2はpolyclonal antibodyを使用した．判定法は，p53は癌細胞の核が集簇的に染色されるものを，c-erbB-2とCD44は細胞膜が染色されたものを，nm23は細胞質が正常細胞以上に濃染されたものを陽性とした．PCNAは核が染色されたものを陽性とし，腫瘍最深部における癌細胞500個中の陽性細胞数の割合を百分率で表示し，PCNA LIとした．PCNA LIはreceiver operating characteristic（ROC）曲線を描き，左上隅に最も近い値，すなわち60をカットオフ値とし高値群，低値群の２群に分類した．また，転移群と対照群の各因子の染色陽性率より，単独および組み合わせによる検査陽性時の異時性肝転移確率を算定した．検査前確率は本研究期間における異時性肝転移発生率とした．

結果：転移群ではPCNA-LI高値群が63.6%にみられ，対照群の28.8%に比べ，有意に高率であった．CD44は対照群で33.3%であったのに対し，転移群では66.7%と有意に高率であった．一方，nm23発現率は対照群の71.2%に対し，転移群では45.5%と低率であった．

p53，c-erbB-2については両群間で差がみられなかった（**Fig. 1**）．有意差が認められたPCNA高値，CD44陽性，nm23陰性の組合せによる異時性肝転移の確率をVecchioら[1)]の方法を用いて算定した．単独ではPCNA≧60が0.23と最も高い確率であったが，２項目ではPCNAとnm23の組合せが0.62と最高値を示した（**Table 1**）．

（3）血管新生関連因子（VEGF，PD-ECGF，MVD）と肝転移との関係

対象：同時性肝転移例30例（同時性群），異時性肝転

Fig. 1　A comparison of positive rates for CD44, nm 23, p53, c-erbB-2 and PCNA-LI evaluated by immunohistochemical staining between the metachronous metastasis group and the control group. metachro：metachronous metastasis

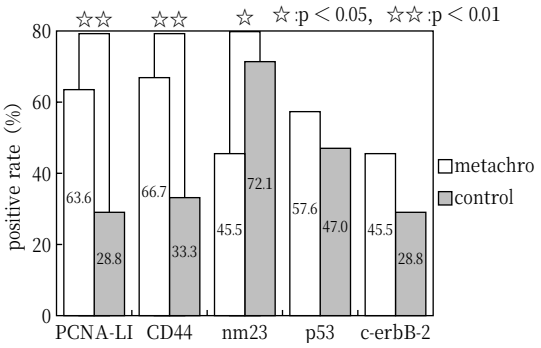


Table 1　Acomparison of immunohistochemical staining positive predictive value for metachronous liver metastasis ammong negative nm23, positive CD44 and PCNA LI≧60.

	metachro	control	p-value	sencitivity	specificity	pp-value
nm23	18	19	0.0228	0.55	0.71	0.21
CD44	22	22	0.0033	0.67	0.67	0.22
PCNA LI≧60	21	19	0.0018	0.64	0.71	0.23
and						
PCNA, nm23	12	2	0.0001	0.36	0.97	0.62
CD44,nm23	12	4	0.0003	0.36	0.94	0.45
PCNA,CD44	15	9	0.0008	0.45	0.86	0.3
PCNA, CD44,nm23	8	1	0.0006	0.24	0.98	0.62

incidence 33/276=0.12
metachro : metachronous,　pp-value : positive predictive value

Fig. 2　a）Relationship between the time of appearance of liver metastasis and MVD. b）Relationship between the time of appearance of liver metastasis and VEGF. synchro：synchronous metastasis, metachro：metachronous metastasis, no meta：no metastasis

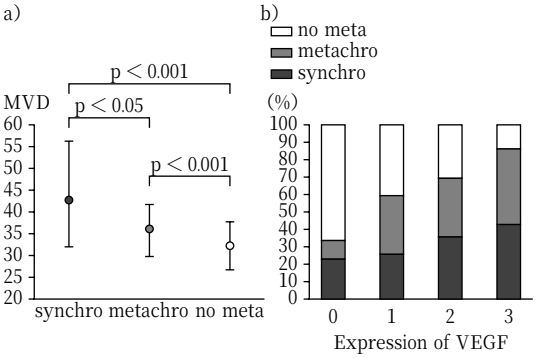
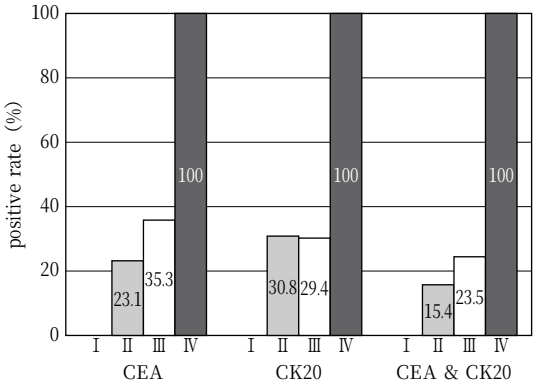


Fig. 3　The relationship between free cancer cells detected by RT-PCR in mesentric vein blood draining from tumors and the histological stage.



移例35例（異時性群）および術後5年以上経過した無再発生存例66例（非転移群）を対象とした．

方法：原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋標本より薄切切片を作製し，von Willebrand Factor（VWF），VEGF，PD-ECGF を ABC 法で免疫組織染色した．VEGF はプレパラート全体の染色陽性率と細胞質の染色性から4段階に評価し，PD-ECGF は判定部位を間質と癌細胞に分けて評価した．また MVD は VWF にて染色された腫瘍内微小血管の200倍視野による hot spot 5 視野の平均断面数で表示した．

結果：同時性群の MVD は他群より有意に高く，また異時性群では非転移群より有意に高値を示した（**Fig. 2a**）．MVD はリンパ節転移や静脈侵襲とも正の相関を認めた．また VEGF との関係では，VEGF の染色性が増強するとともに同時性，異時性群が増加し，非転移群は減少した（**Fig. 2b**）．一方，MVD と VEGF との間には有意な相関は認められなかった．

（4）RT-PCR 法による腫瘍還流血中の遊離癌細胞検出

対象：対象は大腸癌42例（結腸30, 直腸12例）で，進行程度の内訳は stageI 4例，stageII 13例，stageIIIa+IIIb 17例，stageIV 8例であった．また経過観察期間の中央値は1年6か月であった．

方法：手術時に腫瘍還流静脈血を10ml 採取し，比重分離液にて単核球層を分離後，total RNA を抽出した．cDNA を抽出後，CEA と CK-20に特異的プライマーを用い，nested RT-PCR を CEA は20サイクル，CK-20は30サイクルで行った．

結果：CEA，CK-20がともに陽性例は stage I で0％，stage II で15.4%，stage III で23.5%，stage IV で100%と病期の進行とともに高率となった（**Fig. 3**）．CEA と CK-20がともに陽性であった根治度 B の7例中，stageIIIb の2例で異時性肝転移が認められた．

考　察

（1）MMP-9，uPA，TIMP の発現性と肝転移との関係について

癌転移の基底膜破壊の段階には MMP が不可欠であり，とくに MMP-9は基底膜の主要構成部分である IV 型コラーゲンに対する強い分解能を有することから[2]，転移の初期段階で重要な役割を演ずると考えられている．uPA はセリンプロテアーゼのひとつで，非活性型 MMP-9を活性化する作用を有する[3]．一方，TIMP は MMP の特異的 inhibitor であるが，現在3種類同定されており，とくにTIMP-1，TIMP-2のMMP-9活性に対する強い抑制作用が知られている[4]．今回の検討では，肝転移と MMP-9，uPA との間には有意の相関が認められ，両者が肝転移に関与している可能性が推察された．しかし，TIMP に関しては大部分の症例で発現がみられ，単独では肝転移との関連は乏しかった．緒方ら[5]は TIMP と MMP-9産生のバランスが肝転移を規定すると報告している．

（2）p53，PCNA，CD44，nm23，c-erbB-2の発現性と異時性肝転移との関係について

検討した5項目中，非転移群との間に有意差が認められたのは，PCNA，CD44，nm23の3項目であった．

PCNA はG1後期からS期前半に存在する細胞増殖期関連核蛋白であり，そのカットオフ値は平均値や中央値を用いた報告が多い．

著者らは各PCNA-LI値における異時性肝転移の感度と特異度からROC曲線を用いて解析し，カットオフ値を60とした．この値は大腸癌のDukes分類やDNA ploidyを有意に判別する値と同一値であり[6]，妥当な値と考えられた．そしてPCNA-LIが60以上の高値例では有意に異時性肝転移が多かった．

CD44はstandard form（CD44s）とvariant form（CD44v）が存在し，CD44vの発現は癌の進展に関連すると報告されている[7]．著者らはCD44sを検索したが，転移群のCD44陽性率は66.7%と有意に高率であり，Ichikawaら[8]と同様の結果であった．マウスメラノーマ細胞から単離されたnm23は，癌抑制遺伝子の1つと理解されている[9]．著者らの検討では異時性肝転移例で有意の染色性低下を示し，肝転移に対しても抑制的に働いていることが示唆された．しかし，腺腫から進行癌まで一貫して発現が認められるとの報告[10]もあり，進行過程により作用が異なる可能性が推察される．有意差の得られた3項目を用いて異時性肝転移予測確率を算出したところ，1項目ではPCNA LIが，2項目ではPCNA LIとnm23の組み合わせが最も高い確率を示し，異時性肝転移の予測手段としての有用性が示唆された．

（3）血管新生関連因子と肝転移との関係について

腫瘍の転移，増殖には血管新生は不可欠であり，種々の血管新生因子の関与が報告されている．VEGFはKDR receptorを介して血管内皮細胞に対しmitogenとして働き[11]，PD-ECGFはThymidine Phospholilaseと同一物質で，血管内皮細胞の成長と遊走を促し，血管新生を誘導すると考えられている[12]．MVDおよびVEGF発現と同時性肝転移，異時肝転移，非転移との間には，それぞれ経時的に有意な相関が認められた．MVDとVEGFとの間にも有意の相関がみられるとの報告が多いが[13]，著者らの検討では明らかな相関は得られなかった．同一症例での検討でも，VEGFの発現は血管密度の高い部位よりも，新生血管が未発現の腫瘍先進部で高発現しており，腫瘍増殖能に差が存在する可能性が示唆された．またVEGFにより血管新生が誘導された後に，VEGFが逆に枯渇した状況となる可能性が推察された．

（4）RT-PCR法による腫瘍還流血中の癌細胞検出について

RT-PCR法を用いて癌の微小転移を検索する試みが多く報告されているが[14]，その精度や臨床的意義については議論も多い．著者らは客観性を持たせる目的で2種の上皮性マーカーとされるCEAとCK-20を用い，腫瘍還流血中の癌細胞の検出を行った．その結果，検出率は病期の進行とともに上昇し，stageIV症例では全例で陽性であった．今後予後との関係を明らかにすることが重要であるが，現時点で，根治度Bの陽性例7例中，stageIIIbの2例に肝再発が認められた．

以上の結果，大腸癌肝転移にはMMP-9，uPA，PCNA，nm23，CD44が関与していることが示唆され，これら因子の発現性の検索とRT-PCRによる腫瘍灌流血中の癌細胞検出法は，肝転移高危険群の抽出法として有用であると推察された．

文　献

1）Vecchio TJ：Predictive value of a single diagnostic test in unselected population. N Eng J Med **274**：1171—1173, 1966

2）Nagase H, Ogata Y, Suzuki K et al：Substrate specificities and activation mechanisms of matrix metalloproteinases. Biochem Soc Trans **19**：715—718, 1991

3）Juarez J, Clayman G, Nakajima M et al：Role and regulation of expression of 92-kDa Type-IV colagenase（MMP-9）in 2 invasive squamous cell carcinoma cell line of the oral cavity. Int J Cancer **55**：10—18, 1993

4）Stetler-Stevenson WG, Brown PD, Onisto M et al：Tissue inhibitor of metalloproteinases-2（TIMP-2）mRNA expression in tumor cell lines and human tumor tissue. J Biol Chem **265**：13933—13938, 1990

5）緒方　裕, 大北　亮, 掛川暉夫：大腸癌肝転移におけるMMP-9およびTIMP-1産生の意義．日臨 **57**：1811—1815, 1995

6）Lazaris AC, Davaris P, Nakopoulou L et al：Correlation between immunohistochemical expression of proliferating cell nuclear antigen and flow cytometry parameters in colorectal neoplasia. Dis Colon Rectum **37**：1083—1089, 1994

7）Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA et al：Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. Cancer Res **53**：4754—4756, 1993

8）Ichikawa W：Positive relationship between expression of CD44 and hepatic metastases in colorectal cancer. Pathobiology **62**：172—179, 1994

9）Ayhan A, Yasui W, Yokozaki H et al：Reduced expression of nm23 protein is associated with ad-

vanced tumor stage and distant metastases in human colorectal carcinomas. Virchows Archiv B cell Pathol **63**：213—218, 1993
10) Haut M, Steeg PS, Willson JKV et al：Induction of nm 23 gene expression in human colonic neoplasms and equal expression in colon tumors of high and low metastatic potential. J Natl Cancer Inst **83**：712—716, 1991
11) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana 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
12) Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T：Angiogenic factor. Nature **356**：668—668, 1992
13) Obermair A, Kohlberger P, Bancher TD et al：Influence of microvessel density and vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor expression on prognosis in vulvar cancer. Gynecol Oncol **63**：204—209, 1996
14) Mori M, Mimori K, Inoue H et al：Detection of cancer metastases in lymph nodes by reverse transcriptase-polymerase chain reaction. Cancer Res **55**：3417—3420, 1995

Study of a High Risk Group for Liver Metastasis of Colorectal Cancer Evaluated by Molecular Biology and Immunohistochemistry Approach

Katsuyuki Kunieda, Hisashi Kohmura, Jun Sano, Kazuya Yamaguchi, Shinichiro Aoki, Fumichika Kitamura, Yasuyuki Sugiyama and Shigetoyo Saji
The Second Department of Surgery Gifu University School of Medicine

［Purpose］ To facilitate identification of a high risk group of colorectal cancer patients with liver metastasis, we studied the relationship between gene products and liver metastasis by the PCR method and immunohistochemical staining. ［Results］ 1) Expression of MMP-9, uPA, and TIMP mRNA as assessed by RT-PCR was studied in relation to liver metastasis in 48 colorectal cancer patients. The incidence of gene expression of MMP-9 and uPA was significantly higher in cases with liver metastasis, and MMP-9 (+) and uPA (+), and MMP (+), and TIMP (−), were significantly linked to metastatic spread to the liver. 2) Immunohistochemical expression of p53, c-erbB-2, CD44, nm23, and PCNA-LI was compared in 33 cases with metachronous liver metastasis (metastasis group) and 66 cases without liver metastasis (control group), and the incidences of CD44 (+), nm23 (−), and PCNA-LI≧60 were found to be significantly higher in the metastasis group than in the controls. 3) Study of angiogenic factors also showed VEGF and MVD to be significantly associated with liver metastasis. 4) Detection of free cancer cells in mesenteric veinous blood draining tumors by PCR using CEA and CK-20 primers showed that the positive rates increased with clinical stage. Seven patients in the group without obvious liver metastasis were positive, and metachronous liver metastasis was observed in 2 of them. ［Conclusions］ MMP-9, uPA, TIMP, VEGF, PCNA, nm23, and CD44 have significant correlations with liver metastasis by colorectal cancer, and analyzing them is considered useful for identification of cases at high risk of liver metastasis along with use of the PCR method to detect free cancer cells in the mesenteric veins draining tumors.

Key words：liver metastasis of colorectal cancer, angiogenic factor, MMP-9

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：512—516, 2000〕

Reprint requests：Katsuyuki Kunieda　The Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
40 Tsukasa-machi, Gifu-city, 500-8705 JAPAN