日消外会誌　33（4）：523～528，2000年

特集 3

胃癌の腹膜播種性転移能に影響する因子の分子生物学的検討

大阪市立大学第 1 外科
井上　透　八代　正和　西村　重彦　松岡　翼
山下　好人　山田　靖哉　澤田　鉄二　仲田　文造
大平　雅一　平川　弘聖

胃癌腹膜播種転移の形成過程には，癌細胞の胃壁深層への浸潤，漿膜面からの剝離，腹膜への接着・浸潤というステップが必要である．今回，腹膜播種転移の各ステップに関与する因子を，教室で樹立されたスキルス胃癌由来の高腹膜播種転移株，腹膜中皮細胞株，腹膜線維芽細胞株を用い，分子生物学的な観点から *in vivo*，*in vitro* で検討し，以下の結論を得た．すなわち，癌細胞の原発巣からの離脱には，MMP-1産生亢進や E-Cadherin 発現低下が関与し，さらに腹腔内に遊離した癌細胞が腹膜に着床するには，癌細胞の発現する接着分子 CD44H や，α2β1-，α3β1-integrin が関与していることが示された．また，癌細胞により，腹膜に線維芽細胞増生がおこり，この増生が癌細胞の浸潤能や中皮細胞形態に影響を及ぼし，癌細胞の転移に有利に働いていることが示唆された．

はじめに

近年の胃癌治療の進歩により，胃癌患者の QOL は改善してきている．しかし，遠隔転移をきたした患者の予後に関しては明らかな改善は認められていない．胃癌の終末期像といえる腹膜播種転移機序についてまだ未知な部分が多く，その予防や治療方法が確立されていないことも大きな要因と考えられる．腹膜播種転移の形成は，胃癌細胞が原発巣の胃壁を浸潤して漿膜面から遊離腹腔内へ離脱することさらに腹膜中皮へ接着・浸潤することにより生じると考えられる．本稿では臨床的に高率に腹膜播種性転移を形成するスキルス胃癌[1]に注目し，当科で樹立したスキルス胃癌細胞株を用いて腹膜播種転移における各ステップに関与する因子の検討を行った．

検討内容と方法

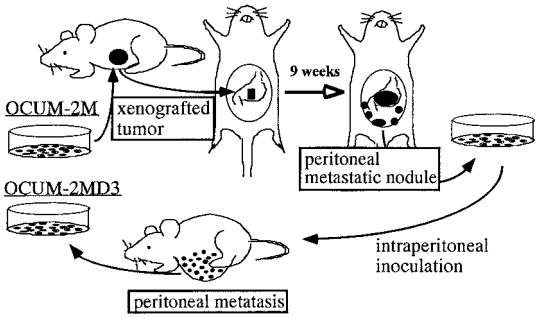
I．高腹膜播種転移株の樹立

教室で樹立されたスキルス胃癌由来胃癌細胞株（OCUM-2M；以下，2M）[2]を用いて高率に播種性腹膜転移を形成する細胞株（OCUM-2MD3；以下，D3）を樹立した．2M 細胞の腫瘍片をヌードマウス胃壁に縫着し，9 週後に開腹すると，腹膜播種転移が認められ，この転移巣を培養系にもどすことで D3が樹立された（**Fig. 1**）．

II．腹膜播種転移の形成機序の検討

①原発巣における浸潤・離脱

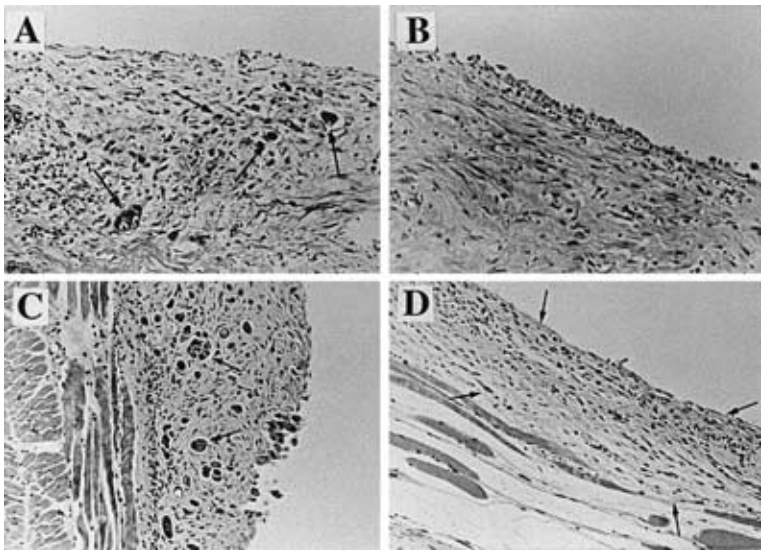
Fig. 1　Establishment of highly peritoneal metastatic cell line OCUM-2MD3. OCUM-2M cells were inoculated subcutaneously into a nude mouse. Four weeks after inoculation, the subcutaneous tumor was implanted to a stomach of another nude mouse. After 9 weeks the tumor grew in the stomach and peritoneal metastasis was found. The metastatic tumor was incubated in a dish and the cells were inoculated intraperitonealy. Six weeks later, peritoneal metastasis with massive ascites were recognized.



＊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：井上　透
〒545-8585　大阪市阿倍野区旭町1―4―3　大阪市立大学医学部第 1 外科

Fig. 2　Histologic findings of peritoneal metastasis.（A, B）Human peritoneum in scirrhous gastric carcinoma with disseminated metastasis（HE ×200）.（A）The peritoneums with carcinomatous peritonitis showing invasion of cancer cells（*arrows*）with extensive proliferation of stromal cells.（B）Fibrosis of the peritoneum in areas with no cancer cell infiltration.（C, D）Histologic findings of peritoneal metastasis of OCUM-2MD3 cells（HE ×200）.（C）Invading metastatic cancer cells（*arrows*）in the thickened peritoneal fibrosis.（D）Fibrosis of the peritoneum in regions with no cancer cell infiltration.



浸潤能に関与する因子として2M および D3の matrix metalloproteinase（以下，MMP）の産生能を ELISA にて検討した．

また，細胞間接着に関与する接着分子 E-Cadherin の発現を Flow cytometry にて検討した．また，スキルス胃癌に伴う胃壁線維芽細胞の増生が胃癌細胞の E-Cadherin 発現に及ぼす影響を検討した．

②腹膜への着床

癌細胞の腹膜への着床過程につき検討した．腹膜は腹膜中皮細胞と中皮細胞下の間質成分から構成される．そこで2M，D3細胞と中皮細胞および細胞外マトリックス成分(Matrigel，Fibronectin，Laminin，Type I collagen）との接着を adhesion assay を用いて検討した．

III．腹膜の組織学的変化と腹膜播種転移

腹膜播種転移を生じた患者の腹膜組織を観察すると，播種巣には癌細胞（矢印）とともに線維芽細胞を中心とする著明な間質増生が見られる(**Fig. 2A**)．播種巣より離れた癌細胞浸潤がない腹膜にも同様に線維芽細胞の増生が認められた(**Fig. 2B**)．D3による腹膜播種転移を生じたヌードマウスにおいても腹膜に同様の変化が認められた．(**Fig. 2C，2D**)．この腹膜間質の線維芽細胞の増生と腹膜播種転移の関連について検討した．

①腹膜線維芽細胞を増生させる因子の検討

癌細胞の培養上清を高速液体クロマトグラフィーにかけ，腹膜間質の線維芽細胞増生を生じる因子について検討した．

②腹膜における胃癌細胞の浸潤能

Modified Boyden chamber を利用した In vitro の腹膜モデル（**Fig. 3A**）を用いて，腹膜線維芽細胞が癌細胞の浸潤能に及ぼす影響を検討した．

③中皮細胞の形態変化

腹膜線維芽細胞培養上清が，中皮細胞の形態におよぼす影響を *in vitro* にて検討した．

統計学的解析

検定は Student 's *t*-test を用いた．$p<0.05$を統計学的に有意差ありとした．

Fig. 3　The effect of peritoneal fibroblasts on the invasiveness of OCUM-2MD3. (A), Modified chambers for the invasion assay. (B), Effect of peritoneal fibroblasts on the invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. Control：the Matrigel coated filters in the absence of mesothelial cells and peritoneal fibroblasts. (a)：in the presence of mesothelial cells onto the Matrigel in the upper well. (b)：in the presence of peritoneal fibroblasts in the lower well. (c)：in the presence of mesothelial cells on the Matrigel in the upper well, and peritoneal fibroblasts in the lower well (shown in Figure A).

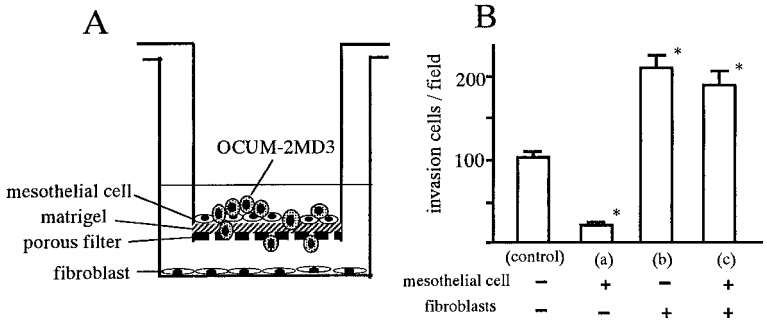
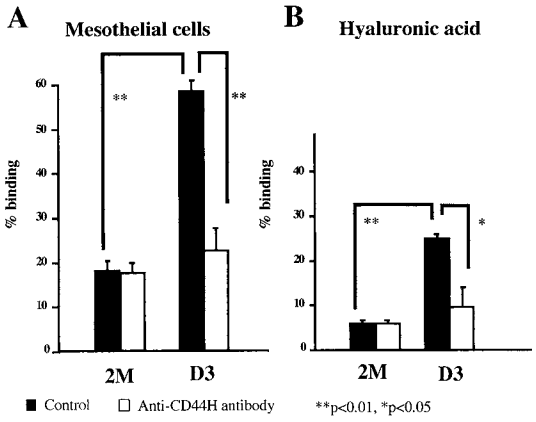


Table 1　Expression of adhesion molecules on the scirrhous gastric cancer cells

Cell line	Adhesion molecule					
	E-Cadherin	Integrin				
		α2β1	α3β1	α4β1	α5β1	α6β1
OCUM-2M	86.6%	47.8%	34.3%	1.5%	3.9%	89.1%
OCUM-2MD3	59.7%	91.6%	93.6%	1.5%	8.9%	96.4%

The expression of the E-cadherin and integrin families was determined by flow cytometric analysis.

Fig. 4　Binding ability of gastric cancer cells to mesotherial cells (A) and hialuronic acid (B). The adhesiveness of OCUM-2MD3 cells and OCUM-2M cells to mesotherial cells to hialuronic acid. The effect of anti-CD44H antibody on the adhesiveness.



結　果

I. 高腹膜播種性転移株の樹立

親株2M の腹腔内接種では腹膜播種の形成はみられないが，D3は腹腔内接種により腸間膜，大網，後腹膜などに多数の播種性転移を高率に形成した．いずれも多数の癌細胞を含む血性腹水を伴っていた．

II. 腹膜播種転移の形成機序の検討

①原発巣における浸潤・離脱

D3では MMP-1の産生が亢進していた（2M：6.2ng/ml，D3：190.0ng/ml）．MMP-2，-3，-9の産生は認めなかった．E-Cadherin の発現は D3が2M に比べ低下していた(**Table 1**)．胃壁線維芽細胞培養上清の添加により2M の E-Cadherin 発現は低下した．

②腹膜との接着

1. 腹膜中皮細胞に対する接着性は D3が2M に比べ有意に亢進していた(**Fig. 4A**)．また，中皮細胞が細胞表面に発現しており CD44H のリガンドであるヒアルロン酸に対する接着性も D3が亢進していた（**Fig. 4B**)．D3細胞の接着能は，抗 CD44H 抗体により有意に低下した．

2. 腹膜マトリックス成分に対する接着性は D3が

Fig. 5　Binding ability of OCUM-2M and OCUM-2MD3 cells to the extracellular matrix. The adhesiveness of OCUM-2MD3 cells and OCUM-2M cells to Matrigel, Fibronectin, Laminin, Type I collagen. The effect of the anti-α2β1-integrin antibody or anti-α3β1-integrin antibody on the adhesiveness.

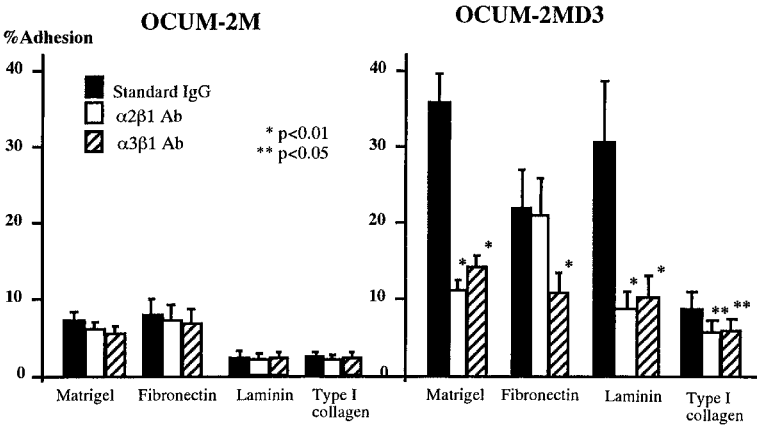
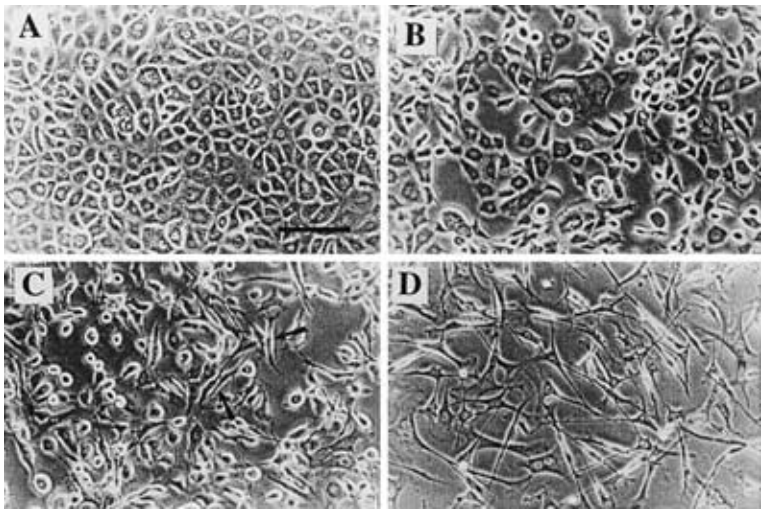


Fig. 6　The effect of peritoneal fibroblasts on the morphologic-changes in cultured mesothelial cells. The morphology of mesothelial cells began to change in the presence of serum free conditioned medium from fibroblasts.（A）Control mesothelial cells still exhibited a semi-round cell shape and formed cobblestone-like monolayer.（B）Mesothelial cells began separating from each other following the addition of peritoneal fibroblast SF-CM after 6 hr of culture.（C）Mesothelial cells rounded up or exhibited a fibroblast-like shape（arrows), after 12 hr.（D）After 120 hr, empty areas in the plate were clearly visible. Scale bar：100μm.



2M に比べ有意に亢進していた(**Fig. 5**)．これらのマトリックスをリガンドとする接着分子である β1-Integrin 発現を比較すると，D3は α2β1-integrin，α3β1-integrin をより強く発現していた（**Table 1**)．さらにD3の接着能は抗 α2β1-integrin 抗体，抗 α3β1-integrin 抗体の添加でそれぞれ抑制された（**Fig. 5**)．

III．腹膜線維化と腹膜播種

①腹膜線維芽細胞を増生させる因子の検討

胃癌細胞培養上清中の25～43kDa の物質に，腹膜線維芽細胞増生活性が認められた．

②腹膜における胃癌細胞の浸潤能

Matrigel のみの control に比し，中皮細胞を被覆した場合は明らかに癌細胞の浸潤抑制が認められ，中皮細胞の転移防御作用が示唆された．ところが，腹膜線維芽細胞が存在することにより癌細胞の浸潤能は強く促進された（**Fig. 3B**）．

③中皮細胞の形態変化

培養中皮細胞は，腹膜線維芽細胞培養上清を添加すると，経時的に円形浮遊性または紡錘形へと形態が変化した（**Fig. 6**）．

考　察

スキルス胃癌は高頻度に腹膜播種転移をきたすことより[1]，腹膜播種転移メカニズムの解明にはスキルス胃癌細胞株を用いた播種性腹膜転移モデルが有用であると考えられる．教室で樹立されたスキルス胃癌原発巣由来細胞株（2M）は腹腔内へ直接胃癌細胞を接種しても腹膜播種を形成しなかったが，2M 細胞の腫瘍片を胃壁に移植する方法により，高率に播種性腹膜転移を形成する細胞株（D3）を樹立した[3]．これは胃の微小環境からの影響などにより，胃壁に移植された2M 細胞のうち転移に有利な性質を持つ胃癌細胞が選択されたと考えられた．そこで，これらの細胞の性質を比較することにより，腹膜転移に関与する因子の検討を行った．原発巣における浸潤では D3は2M に比し有意に MMP-1の産生が亢進していた．胃壁間質の主成分である細胞外マトリックスは，Type I，Type III collagen であり，MMP-1はこれらのマトリックスを分解する酵素である[4]．癌細胞が，胃壁を浸潤して漿膜面に露出するには，MMP-1産生亢進が有利にはたらくと考えられた．さらに，露出した癌細胞が，原発巣から離れ腹腔内に遊離するためには，細胞間接着の低下が重要となる．細胞間接着に関与する接着分子 E-Cadherin の発現は D3が2M に比べ低下しており，原発巣から遊離するのに有利であると考えられた．また，スキルス胃癌にともなう胃壁線維芽細胞の増生が E-Cadherin 発現を低下することが示された．胃壁線維芽細胞は胃癌細胞の浸潤を促進することより[5]，原発巣において胃癌細胞は腹膜転移に有利な環境を作りだしていることが示された．遊離腹腔内へ侵入した癌細胞の腹膜への着床には癌細胞に発現する接着分子 CD44H と中皮細胞上のヒアルロン酸を介した接着メカニズムが考えられた[6]．その後の腹膜中皮下の細胞外マトリックスとの接着には，癌細胞に発現する α2β1-，α3β1-integrin が関与していると考えられた．また，胃癌細胞によってもたらされた腹膜線維芽細胞増生が胃癌細胞の浸潤を促進し，さらに中皮細胞の形態変化を生じることが示された．中皮細胞間隙が開大することで単層敷石状の中皮細胞が有する防御作用が失われ，転移を来たし易い環境を生じたと考えられた．胃癌細胞が腹膜線維芽細胞を増生させ，癌細胞の浸潤転移に適した環境をもたらしたことが推測された．以上，腹膜播種転移に関与する因子として，癌細胞の原発巣からの離脱には，MMP-1産生亢進や E-Cadherin 発現低下が関与し，さらに癌細胞が腹膜に着床するには，癌細胞の発現する接着分子 CD44H や，α2β1-，α3β1-integrin が関与していることが示された．

文　献

1）Sowa M, Kato Y, Nishimura M et al：Clinicohistochemical studies on type 4 carcinoma of the stomach-with special reference to mucopolysaccharides and sialic acid in tumor tissue. Jpn J Surgery **19**：153―157, 1989

2）Yashiro M, Chung YS, Nishimura S et al：Establishment of two new scirrhous gastric cancer cell lines：analysis of factors associated with disseminated metastasis. Br J Cancer **72**：1200―1210, 1995

3）Yashiro M, Chung YS, Nishimura S et al：Peritoneal metastatic model for human scirrhous gastric carcinoma in nude mice. Clin Exp Metastasis **14**：43―54, 1996

4）Inoue T, Yashiro M, Nishimura S et al：Matrix metalloproteinase-1 expression is a prognostic factor for patients with advanced gstric cancer. Int J Molecular Med **4**：73―77, 1999

5）Inoue T, Chung YS, Yashiro M et al：Transforming growth factor-β and hepatocyte growth factor produced by gastric fibroblasts stimulate the invasiveness of scirrhous gastric cancer cells. Jpn J Cancer Res **88**：152―159, 1997

6）Nishimura S, Chung YS, Yashiro M et al：CD44H plays an important role in peritoneal dissemination of scirrhous gastric cancer cells. Jpn J Cancer Res **87**：1235―44, 1996

Analysis of Factors associated with Peritoneal Metastatic Ability of Scirrrhous Gastric Cancer Cells

Tohru Inoue, Masakazu Yashiro, Shigehiko Nishimura, Tasuku Matsuoka,
Yoshito Yamashita, Nobuya Yamada, Tetsuji Sawada, Bunzo Nakata,
Masaichi Ohira and Kosei Hirakawa-YS Chung
First Department of Surgery, Osaka City University Medical School

The mechanisms responsible for peritoneal metastasis are not well understood. We established a high-peritoneal-metastasis cell line（OCUM−2MD3）from a poor-peritoneal-metastasis gastric cancer cell line（OCUM−2M）. Factors associated with peritoneal metastasis were analyzed by comparing the characters of the two cell lines. The process of peritoneal metastasis has comprised several steps. When cancer cells invade through the gastric wall, matrix metalloproteinase−1 is an important factor. When cancer cells escape from primary tumor into peritoneal space, decreased E-cadherin expression is a favorable event for cancer cell dissociation. CD44H was associated with attachment between cancer cells and mesothelial cells. α2β1−integrin and α3β1−integrin were associated with attachment to the matrix of the peritoneal stroma. Peritoneal fibrosis induced by gastric cancer cells was a favorable environment for peritoneal metastasis. The above factors appear to be necessary to the ability to produce peritoneal metastasis.

Key words：scirrhous gastric cancer, peritoneal dissemination, adhesion molecule

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：523—528, 2000〕

Reprint requests：Toru Inoue　First Department of Surgery, Osaka City University Medical School
1−4−3 Asahimachi, Abeno-ku, Osaka, 545−8585 JAPAN