日消外会誌　33（4）：533～536，2000年

特集 5

大腸癌の発育進展および転移における vascular endothelial growth factor の意義

京都大学医学研究科腫瘍外科[1)]，同　消化器病態学講座[2)]
近藤　陽子[1)2)]　有井　滋樹[1)]　森　　章[1)]　今村　正之[1)]

大腸腺腫27例，早期大腸癌46例，進行大腸癌60例における vascular endotelial growth factor（VEGF）の発現動態を RT-PCR 法，Northern blot hybridization 法，免疫組織学的染色法で検討した．腫瘍の進展に伴い VEGF 発現陽性症例は増加し，微小血管密度も増加した．進行大腸癌症例では，VEGF 遺伝子発現は肝転移やリンパ節転移と相関関係を有した．さらに，ヒト大腸癌細胞株に VEGF 遺伝子導入を行い，高 VEGF 産生株を樹立し，その増殖能，転移能を検討した．

高 VEGF 産生株は増殖能の亢進，旺盛な血管新生能，転移能を示した．

臨床的検討より，VEGF 遺伝子発現は大腸癌の発育進展および転移に密接に関係し，実験的検討により，これらの事象を実証した．

はじめに

大腸癌は，一般に adenoma-carcinoma sequence に代表される多段階発癌過程を示す[1)]．これらに関与する癌遺伝子，癌抑制遺伝子の研究は，分子生物学的手法により明らかとなっているが，浸潤転移に関与する分子の発現動態に関する検討は少ない．一般に腫瘍が $1mm^3$ 以上に増殖するためには，拡散により血流中から十分な酸素や栄養の供給をうけるための血管新生を必要とする．血管新生のプロセスにおいては，血管内皮細胞が血管新生因子の刺激を受けて，基底膜を破壊しながら遊走し，他方で増殖しながら新たな血管基底膜を産生する．血管新生を誘導する因子として，basic fibroblast growth factor や vascular endothelial growth factor（以下，VEGF）など20種類の生体内物質がこれまでに報告されている[2)]．VEGF は，もっとも強力で特異的な血管内皮増殖因子であり，癌の増殖転移などの形質に大きな影響を与えていると推察される．今回，我々は大腸癌前癌病変と考えられる腺腫，早期大腸癌そして進行大腸癌における VEGF の発現動態と微小血管密度を検討し，腫瘍の進展との関連性を追求した．さらに，大腸癌細胞株に VEGF 遺伝子導入を行い，転移における VEGF の意義を解析した．

対象と方法

1．臨床的検討

1）腺腫27例（mild～moderate dysplasia 23例，severe dysplasia 4例）早期大腸癌46例（m 癌26例，sm 癌20例）を対象とし，RT-PCR 法，免疫組織学的染色法で VEGF 遺伝子発現を，解析し，微小血管密度も評価した．

2）進行大腸癌60症例を対象とし，Northern blot hybridization 法で VEGFmRNA 発現を解析．インターナルコントロールで補正後，癌部（T）非癌部（N）の比で発現量を定量．原発巣における T/N 比と進行度，血管侵襲，同時性肝転移，リンパ節転移等の臨床病理学的事項との相関関係を検討した．

2．実験的検討

Total human VEGFcDNA を作成し plasmid vector である pCAG-BSD に挿入しリポフェクタミン法でヒト大腸癌細胞株 LoVo に導入した．VEGFmRNA 発現を Northern blot 法で，VEGF 蛋白発現を western blot 法で確認し，高 VEGF 発現株とコントロールとなる Vector 株の stable clone を樹立した．両株の細胞増殖能，皮下腫瘍増殖能，dorsal air sac 法での血管新生能，脾注肝転移能，腹膜播種能を検討した．

＊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：近藤　陽子
〒606-8507　京都市左京区聖護院川原町54　京都大学医学研究科腫瘍外科

Table 1　VEGF mRNA and VEGF protein expression in colorectal tumors

	RT-PCR	Immunohistochemistry
	positive case No./total	positive case No./total
Adenoma		
mild to moderate dysplasia	0/20	0/23
severe dysplasia	—	4/4
m carcinoma	8/10	16/26(62%)
sm carcinoma	10/10	20/20(100%)

Table 2　Characteristics of the sense-VEGF transfectants and vectortransfectants

Transfectant	Subcutaneous tumor volume (mean±SD)	Liver metastasis ratio after spleen injection	Peritoneald issemination ratio
S17 cells	5,212±1.61cm^3 (n=10)	5/10(50%)	9/10(90%)
V7 cells	528±0.18cm^3 (n=10)	0/10(0%)	0/10(0%)

S17 cells：sense-VEGF transfectants
V7 cells：vector transfectants

結　果

1．臨床的検討

(1) 腺腫，早期大腸癌における検討

①RT-PCR 法

mild～moderate dysplastic adenoma では，発現を認めず，m 癌，sm 癌の症例には，VEGFmRNA 発現を認めた．

②免疫組織学的染色法

VEGF 蛋白発現は，腫瘍細胞で認められ腺腫では，mild～moderate dysplasia の段階では，VEGF 蛋白発現を認めず，severe dysplasia の段階から認められた．早期癌の段階では，m 癌では16/26症例で発現陽性であり，sm 癌では，全症例で発現陽性であった．

また，CD31を用いた微小血管密度(MVD)の評価では，腺腫，m 癌，sm 癌の順に，3.0±0.55，6.1±1.12，12.0±1.35と増加する傾向にあった．

Table 1に RT-PCR，免疫組織学的染色法の結果を示す．

(2) 進行大腸癌における検討

T/N 比は，性，年齢，腫瘍径，分化度，リンパ管侵襲とは有意な関連性はなく，Dukes 分類 A：2.10±0.35，B：1.86±0.32，C：3.12±0.58，D：7.57±1.67 (p=0.003)，血管侵襲 v0：1.73±0.22，v1：3.68±0.75，v2：6.08±1.54(p=0.045)，肝転移(－)2.57±0.29，(＋) 8.39±1.93 (p<0.0001) リンパ節転移 (－) 2.61±0.72，(＋) 5.18±0.91 (p=0.036) と有意な関連性を示した．ここで対象となった肝転移はすべて同時性肝転移 (n=15) である．

2．実験的検討

(1) 皮下腫瘍増殖能

おのおの細胞3×10^{6}個をヌードマウス 4 週齢右背部皮下に接種した．接種後40日目まで高 VEGF 発現株(S 株)および Vector 株(V 株)の増殖に有意差はなく，40日以降，S 株は旺盛な増殖能を示した．

なお，in vitro での細胞増殖能には，明らかな差は認めなかった．

皮下腫瘍での MVD は，S 株6.63±1.08，V 株2.29±1.08であった．

(2) 血管新生能

Dorsal air sac 法では，S 株で chamber 全域を覆うような激しい出血巣を示すものや，既存血管の拡張，クモの巣状に発育する新生血管を示したが，V 株では，そのような結果は，得られなかった．

(3) 脾注肝転移能

2×10^{6}個の細胞をヌードマウス 4 週齢に脾注し，4 週間後に観察した．S 株の50%に肝転移を認めたが，V 株では，明らかに肝転移したものはなかった．

(4) 腹膜播種能

2×10^{6}個の細胞をヌードマウス4週齢の腹腔内に注入し 4 週間後に観察した．S 株で90%の確率で播種巣

を示したが，V株では，腹水や播種巣を認めなかった．

Table 2に結果のまとめを示す．

考　察

腺腫ではsevere dysplasiaの段階よりVEGF遺伝子発現を認め，m癌の約62%，sm癌の100%に発現を認めた．微小血管密度も進展に伴い増加し，腺腫から癌への進展には血管新生が必要であり，この事象はVEGFの誘導に密接に関係するものと推察された．また，我々の研究では，sm癌20症例での微小血管密度とVEGF染色強度との間には，相関関係を認め，染色強度が強くなるに従い，MVDも増加するという結果も得ている．進行大腸癌症例では，癌部でのVEGF-mRNA発現は，非癌部と比べて，高く，発現強度の比は，さまざまな臨床病理学的因子と相関関係を有している．

VEGFは，腫瘍血管新生の誘導や維持に密接に関係し臨床的検討よりさまざまな腫瘍の予後や転移と相関することが推察された[3]．

Warrenら[4]は，マウスの実験系を用いてVEGF中和抗体が容量依存性に時間依存性に皮下腫瘍の発育を阻害し，肝転移を抑制したことを報告した．また，VEGFアンチセンスやc-srcアンチセンス発現ヴェクターを用いて腫瘍増殖を抑制したという報告もある[5]．

これらの報告は，腫瘍増殖や転移を阻止するためにVEGFは治療標的に成りうることを意味している．我々は臨床的検討をもとに高VEGF産生ヒト大腸癌細胞株を樹立し，VEGFの腫瘍増殖や転移能への直接的作用を解析した．

高VEGF産生株は旺盛な血管新生能により有意な増殖能を示し，脾注肝転移実験では高VEGF産生株は肝転移を生じた．腹膜播種実験でも高率に播種巣を生成した．VEGFは血管内皮の増殖に特異性があるのみでなく血管透過性亢進作用vascular permeability factor（VPF）としての作用も併せもっている[6]．

VEGFが腹水の生成に関与していることは知られており，これはVEGFのVPFとしての作用によるものと考えられる．

我々の腹膜播種実験においても高VEGF産生株はVPFの作用により播種巣の形成に必要な酸素や栄養素を効率よく利用しているものと考えられる．

以上のように臨床学的検討により，VEGF遺伝子発現は腫瘍の進展に大きく関与し転移の予知因子と成りうるものと考えられ，実験的検討によりVEGFが転移の責任分子の一つであることが実証された．

文　献

1) Fearon ER, Vogelstein B：A genetic model for colorectal tumorigenesis. Cell **61**：759—767, 1990
2) Folkman J：What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? J Natl Cancer Inst **82**：4—6, 1990
3) Ishigami S-I, Arii S, Furutani M et al：Predictive value of vascular endothelial growth factor（VEGF）in metastasis and prognosis of human colorectal cancer. Br J Cancer **78**：1379—1384, 1998
4) Warren RS, Yuan H, Matli MR et al：Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. J Clin Invest **95**：1789—1797, 1995
5) Ellis LM, Staley CA, Liu W et al：Down-regulation of vascular growth factor in a human colon carcinoma cell line transfected with an antisense expression vector specific for c-src. J Biol Chem **273**：1052—1057, 1998
6) Senger DR, Galli SJ, Dvorak AM et al：Tumor cells secrete a vascular permeability factor that promotes accumulation of ascites fluid. Science **219**：983—985, 1983

Significance of Vascular Endothelial Growth Factor in Tumor Progression and Metastasis of Human Colorectal Cancer

Yoko Kondo[1)2)], Shigeki Arii[1)], Akira Mori[1)] and Masayuki Imamura[1)]
[1)]Department of Surgery & Surgical Basic Science, Graduate School of Medicine, Kyoto University
[2)]Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
Graduate School of Medicine, Kyoto University

Expression of vascular endothelial growth factor（VEGF）in 133 colorectal tumor specimens comprised of 27 adenomas, 46 early colorectal carcinomas, 60 advanced colorectal carcinomas was evaluated by RT-PCR, Northern blot hybridization, and was immunohistochemistry. Tumor angiogenesis paralleled tumor development, and partially associated with VEGF expression, in colorectal adenomas and the early stages of human colorectal cancer. Expression of VEGF mRNA in advanced colorectal carcinomas was correlated with tumor progression, including metastasis. We attempted to clarify the role of VEGF in the tumor growth, neovascularization, and metastasis of human colon cancer by using cells transfected with the VEGF gene. We found that sense-VEGF transfectants have a growth advantage due to vigorous tumor angiogenesis. We also demonstrated that sense-VEGF transfectants metastasized to the liver and had greater potential to induce peritoneal dissemination. In conclusion, the present study provided clear evidence that VEGF plays an important role in cancer growth by stimulating neovascularization and subsequent metastasis.

Key words：colorectal cancer, vascular endothelial growth factor, angiogenesis

〔Jpn J Gastroenterol Surg 33：533—536, 2000〕

Reprint requests：Yoko Kondo　Department of Surgery & Surgical Basic Science Graduate School of Medicine Kyoto University
54-Shogoin Kawara-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8507 JAPAN