

原 著

術後肝転移のリスク要因としての大腸癌間質における osteopontin 陽性 tumor-associated macrophage の局在

近畿大学医学部外科

石丸英三郎 今野 元博 奥野 清隆
塩崎 均 大柳 治正

はじめに：進行大腸癌術後の異時性肝転移発生は予後を大きく左右するため、その high risk 群を選別することが重要である。Osteopontin (以下、OPN) は腫瘍の転移・増殖などに関与する細胞接着配列を有するリン酸化糖タンパクである。そこで、大腸癌における肝転移と OPN の発現の関連について免疫組織化学的に検討した。対象と方法：進行大腸癌切除症例を同時性肝転移群 30 例、異時性肝転移群 17 例と非肝転移群 54 例の 3 群に対して抗 OPN, CD68, CD105 抗体を用いた免疫組織化学的染色を行った。結果：OPN の主な発現は腫瘍細胞ではなく、腫瘍周囲間質に浸潤するマクロファージ (tumor associated macrophage ; 以下、TAM) の一部に認められた。TAM における OPN 陽性 TAM の割合 (OPN/TAM) , ならびに微小血管密度 (以下、MVD) を腫瘍周囲間質の局在別に検討したところ、異時性肝転移群を対象とした単変量解析の結果、中心部の MVD ならびに先進部と中心部の OPN/TAM の 3 因子に有意差を認めた。この 3 因子を用いた多変量解析では、先進部間質および中心部間質の OPN/TAM が異時性肝転移の危険因子である可能性が示唆された。考察：進行大腸癌術後異時性肝転移発症の high risk 群選別の一助として、切除標本の腫瘍先進部間質ならびに中心部間質の OPN/TAM の検討の有用性が示唆された。

緒 言

進行大腸癌に対して根治手術が行われても 40% の患者に再発が生じ、その中でも特に肝転移の発生は 33% にも及ぶ¹⁾。肝転移巣に対する最も有効な治療法は肝切除であるが、肝切除後の残肝再発は 40~50% で²⁾、また 5 年生存率はおおむね 25~40% である^{2)~6)}。しかし、最近では大腸癌肝転移に対する肝切除後の 5 年生存率が 50% を超える報告も散見される⁷⁾⁸⁾。したがって、今後大腸癌の予後をより向上させるためには肝転移のハイリスク群を選別し、厳重な観察を行う必要がある。

Osteopontin (以下、OPN と略記) は GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) 細胞接着配列を有するリン酸化糖タンパクであり⁹⁾、その働きは細胞接着や

細胞遊走活性、骨代謝など多岐にわたる¹⁰⁾。また、Vascular Endothelial Growth Factor (以下、VEGF と略記) と協調して働くことで血管新生に関わっていることでも注目されている¹¹⁾。OPN は胃・大腸・乳腺・肺など種々の腫瘍細胞でも発現している^{12)~14)}。最近、これら腫瘍細胞が産生する OPN は腫瘍の転移・増殖に関連していると報告されている^{15)~17)}。さらに、腫瘍細胞以外での OPN の発現は主に腫瘍間質に浸潤するマクロファージであるとされている¹³⁾¹⁸⁾。このマクロファージは tumor associated macrophage (以下、TAM と略記) と呼ばれ、腫瘍の増殖に関連する因子を産生する¹⁹⁾。

しかし、OPN を発現した TAM と癌の悪性度との関連についての研究は、Pub Med で 1985 年から 2005 年までの発表論文を対象に「Osteopontin」, 「colorectal cancer」, 「liver metastasis」, 「macrophage」をキーワードに文献検索したとこ

<2007 年 1 月 31 日受理>別刷請求先：今野 元博
〒589-8511 大阪狭山市大野東 377-2 近畿大学医学部外科

Table 1 Characteristics of the patients

		n = 101
Sex	male	59
	female	42
Location	(Mean ± SD)	63.01 ± 11.18
	Cecum	8
	Asc.	6
	Trans.	10
	Des.	2
	Sigmoid	34
Histological type	Rectum	41
	well	39
	mod	55
Depth of tumor invasion	por, muc	7
	mp	17
	ss, a1	51
	se, a2	30
Lymph node metastasis	si, ai	3
	n (-)	56.38%
Lymphatic invasion	n (+)	43.61%
	ly (-)	33.67%
Venous invasion	ly (+)	66.32%
	v (-)	64.58%
Pathological stage	v (+)	35.42%
	stage I	12
	stage II	33
	stage III	24
	stage IV	32

ろ、皆無である。

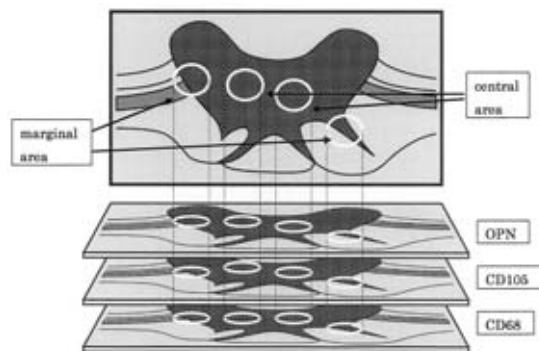
そこで、TAMにおけるOPNの発現が、大腸癌切除後の肝転移のリスク要因となることを明らかにするために本研究を行った。

対象と方法

1) 症例

1990年より1999年の間に進行大腸癌の診断で原発巣の切除手術を施行した101症例を対象とした。対象症例は男性59例、女性42例で平均年齢 63.0 ± 11.2 歳、組織型は高分化腺癌39例、中分化腺癌55例、低分化腺癌とその他が7例、腫瘍占居部位は結腸癌60例(盲腸8例、上行結腸6例、横行結腸10例、下行結腸2例、S状結腸34例)、直腸癌41例であった。これらの症例を手術時にすでに肝転移が存在した同時性肝転移群(synchronous hepatic metastasis群；以下、S群と略記)30例、術後に肝転移を発症した異時性肝転移群(metachronous hepatic metastasis群；以下、M群と

Fig. 1 Macroscopic features at the cut section containing the deepest site of tumor penetration in colorectal cancer. We showed the marginal area and central area in the figure 1. CD105 and CD68 chose a field of view the same as OPN in consecutive cut sections.



略記) 17例と、術後5年を経過しても再発・転移を認めない非肝転移群(non-hepatic metastasis群；以下、N群と略記) 54例の3群に分けて検討した。肝転移の有無は腹部CTまたは超音波検査のいずれでも診断できる症例とした。また、大腸癌取扱い規約第6版²⁰⁾による組織学的病期分類ではstage I 12例、stage II 33例、stage III 24例、stage IV 32例であった(Table 1)。

2) 免疫組織化学染色方法

手術摘出標本を10%中性ホルマリンに12~24時間固定後、パラフィン包埋し4 μ mの連続切片を作成した。この連続切片について、通常のヘマトキシリン・エオジン(HE)染色に加え、抗OPN抗体と主にマクロファージを認識する抗CD68抗体はEnvision+法²¹⁾、腫瘍増殖に伴って新生した微小血管を認識する抗CD105抗体にはCSA System法²²⁾に基づく免疫組織化学染色を行った。1次抗体であるマウス抗CD68モノクローナル抗体(DAKO JAPAN, Kyoto, JAPAN)は100倍に希釈、抗OPNポリクローナル抗体は700倍に希釈し4 $^{\circ}$ C, overnightで反応させた。抗CD105抗体は2,000倍に希釈し、15分間反応させた。また、腫瘍間質部でOPNを発現している細胞を同定するために、抗OPN抗体と抗CD68抗体、両者を用いたENVISION+, ENVISION/AP法²³⁾に基づく2重

Fig. 2 Immunohistochemical staining for OPN antigen in cancer tissue of the colorectal cancer. For OPN positive cells (white arrows) infiltrated cancer stroma, we counted the number of immunoreactive cells with a microscopic field of $\times 200$.

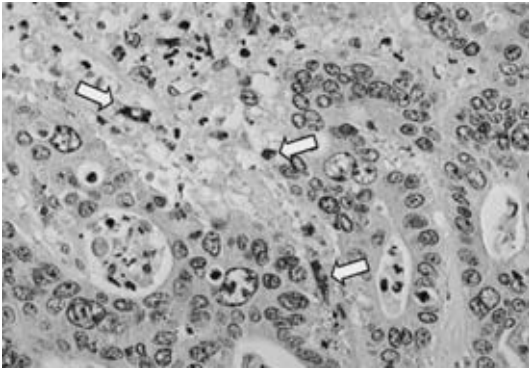
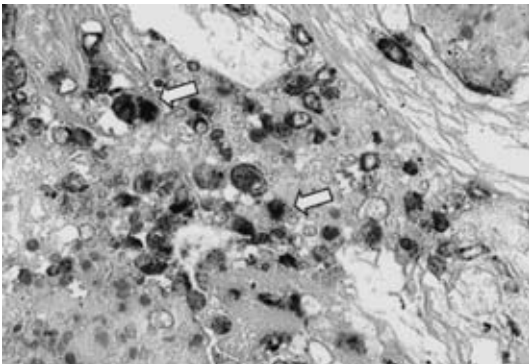


Fig. 3 Double immunohistochemistry for OPN and CD68. Double staining with OPN and CD68 antibody demonstrated revealed the OPN positive cells were also CD68 positive macrophages. The white arrows showed CD68 positive macrophages.



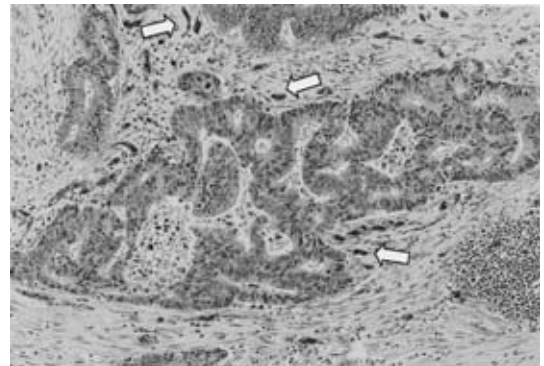
免疫組織化学染色を施行した。

3) 測定方法

1: 腫瘍間質部の OPN 発現細胞数の測定

腫瘍先進部間質 (marginal area; 以下, MA と略記) ならびに腫瘍中心部間質 (central area; 以下, CA と略記) で OPN 発現が多く認められる部位はそれぞれ 2~4 か所存在した。その部分の画像をコンピュータに取り込み, 単位面積 (0.045 mm^2) 当たりの OPN 発現細胞数を計測した (Fig. 1)。

Fig. 4 Immunohistochemical staining for CD105 antigen in cancer tissue of the colorectal cancer. Expression of CD105 (white arrows) was shown by dark brown staining at microvessels.



2: 腫瘍間質部の CD68 発現細胞数の測定

連続切片を抗 CD68 抗体を用いて染色し, OPN 検討部位と同一部位の単位面積 (0.045 mm^2) 当たりの CD68 発現細胞数を測定した (Fig. 1)。

3: 上記で得られた結果をもとに各測定部位における CD 68 発現細胞マクロファージに占める OPN 発現細胞の割合 (%) (以下, OPN/TAM と略記) を求めた。

4: 腫瘍間質部の微小血管密度の測定

抗 CD105 抗体を用いて連続切片を染色し, 標識された微小血管をカウントすることにより, 単位面積 (0.045 mm^2) 当たりの微小血管密度 (Microvessel density; 以下, MVD と略記) を計測した (Fig. 1)。

4) 検討項目

免疫組織化学染色の結果は, 以下の項目を腫瘍内局在部位 (MA と CA) に分け, 各群間で比較検討した。

1: 2重免疫組織化学染色による間質浸潤 OPN 発現細胞の同定

2: 腫瘍間質における CD105 陽性新生血管

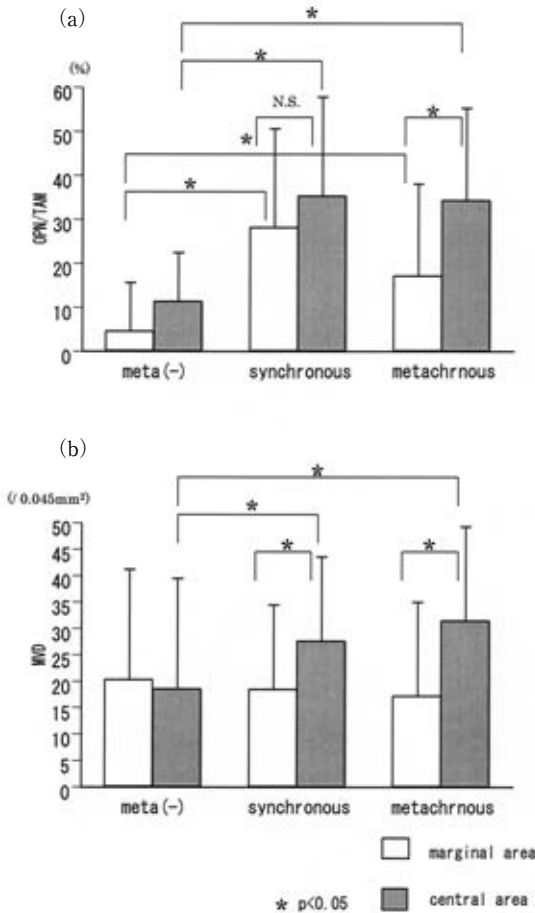
3: OPN/TAM と肝転移との関連

4: MVD と肝転移との関連

5: MVD と OPN/TAM との関連

6: 単変量解析および多変量解析による肝転移危険因子の選別

Fig. 5 The relationship between OPN/TAM(%) (a), MVD(b) and hepatic metastasis.



5) 統計処理

2群間の比較には Mann-Whitney-U 検定を、相関分析には Spearman の相関分析を用いた。単変量・多変量解析にはロジスティック回帰分析を用いた。いずれの検定においても危険率5%未満で統計学的に有意差ありと判断した。

結 果

切除標本での OPN の主たる発現は大腸癌細胞そのものではなく、主に間質に存在するマクロファージ様細胞の細胞質に、微細または粗な顆粒像として観察された (Fig. 2)。

1) OPN 発現細胞の同定

HE 染色および OPN と CD68 による 2 重免疫組織化学染色の結果、OPN を標識する DAB とマ

クロファージのマーカーである CD68 を標識する Fuchsin は同一細胞内に観察された。したがって、腫瘍間質部で OPN を発現している細胞の大部分が CD68 陽性マクロファージと推測された (Fig. 3)。

2) 腫瘍間質における CD105 陽性新生血管
CD105 抗体で認識される新生血管は、微小で主に腫瘍近傍間質に存在した (Fig. 4)。

3) OPN/TAM と肝転移との関連

OPN/TAM (平均±標準偏差) を MA と CA で比較すると、N 群では CA に有意に高値であった (MA : 4.4 ± 4.8 · CA : 11.2 ± 11.2)。S 群では両者間 (MA : 28.0 ± 23.4 · CA : 35.2 ± 22.6) に差は認めなかったが、M 群では有意に CA で高値 (MA : 17.0 ± 18.0 · CA : 34.2 ± 21.1) であった ($p < 0.05$)。

N 群と S 群を比較すると、MA, CA とともに S 群に有意に高値であった。N 群と M 群の比較でも MA, CA とともに M 群に有意に高値であった。しかし、S 群と M 群を比較すると、MA ならびに CA とともに両群間には差は認められなかった (Fig. 5a)。

M 群 17 例の中で肝転移を術後 1 年以上経過した後に発症した症例は 11 例であった。この 11 例での OPN/TAM は MA : 15.8 ± 11.9 , CA : 36.5 ± 25.0 で、N 群との比較では MA, CA とともに有意に高値であった ($p < 0.05$)。

また、M 群 17 例中 stage I, II の症例は 10 例であった。この 10 例の OPN/TAM は MA : 10.9 ± 6.4 , CA : 38.5 ± 25.8 で、N 群との比較では MA, CA とともに有意に高値であった ($p < 0.05$)。

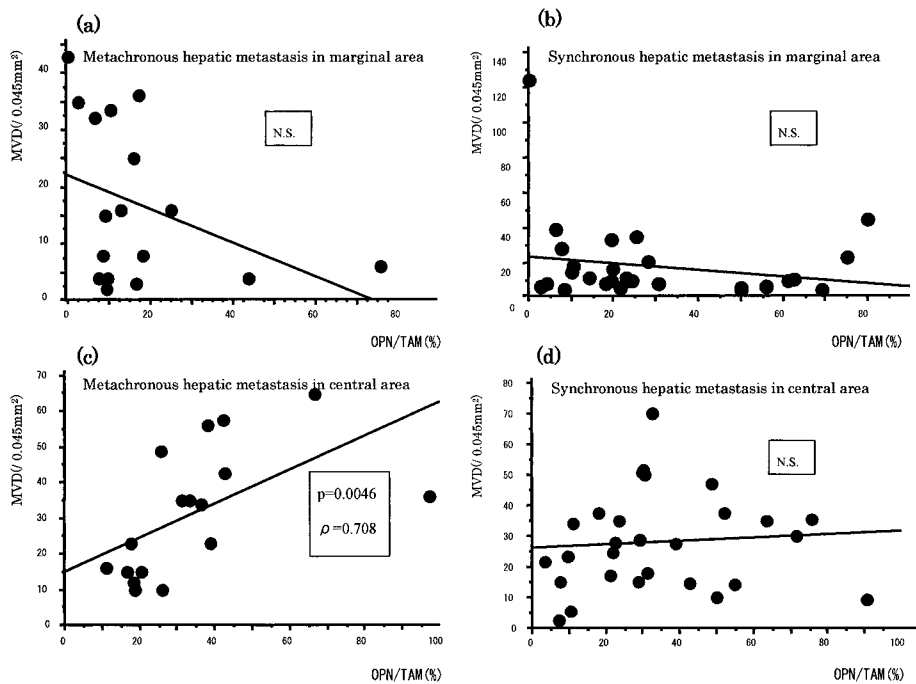
4) MVD と肝転移との関連

各群の MA の MVD と CA の MVD を比較すると、MA (S 群 : 18.4 ± 23.4 · M 群 : 17.1 ± 14.0 · N 群 : 20.2 ± 25.1)、CA (S 群 : 27.5 ± 16.1 · M 群 : 31.4 ± 17.9 · N 群 : 18.5 ± 21.0) と S 群と M 群の CA での MVD が有意に多く認められた ($p < 0.05$)。

また、CA の MVD を S 群と N 群で比較すると、S 群に有意に多く認められ、M 群と N 群の比較でも M 群で有意に多く認められた ($p < 0.05$) (Fig. 5b)。

Fig. 6 Correlation between OPN/TAM and MVD (a ~ b)

There is a significant correlation between OPN/TAM and MVD in metachronous hepatic metastasis in central area. ($\rho = 0.708$, $p < 0.05$) (number of vessels/0.045mm²)



5) MVD と OPN/TAM との相関

S 群, M 群に関わらず MA では OPN/TAM と MVD の間に相関を認めなかったが (Fig. 6a, b), OPN/TAM が高い CA では M 群のみに相関係数 $\rho=0.708$, $p=0.0046$ で正の相関が認められた (Fig. 6c, d).

6) 単変量解析および多変量解析による肝転移危険因子の選別

進行大腸癌術後肝転移に影響を及ぼす因子を選別するため, M 群を対象にロジスティック回帰分析を用いた単変量・多変量解析を行った. 単変量解析では臨床病理学的因子に有意なものはなく, CA の MVD ならびに MA の OPN/TAM と CA の OPN/TAM, 計 3 因子に有意差を認めた. さらに, この 3 因子を多変量解析で検討したところ, MA の OPN/TAM は $p=0.0077$, odds 比 1.204, CA の OPN/TAM は $p=0.0083$, odds 比 1.121 となり, これらは異時性に肝転移を来す危険因子である可能性が示唆された (Table 2, 3).

考 察

腫瘍の転移には血管新生が大きく関与し²⁴⁾, Folkman ら²⁵⁾は固形腫瘍が 2mm を超えて増殖するためには血管新生が不可欠であると述べている. 大腸癌が肝転移を引き起こすにも血管新生は不可欠であり, Takahashi ら²⁶⁾は大腸癌においては血管新生に関わる MVD と血行性転移の発生頻度は相関すると報告している.

大腸癌の血管新生には癌細胞そのものだけではなく癌周囲間質も大きな役割を担っているとされている. 一般に, 固形腫瘍は腫瘍細胞と周囲の血管内皮細胞や線維芽細胞などの間質を含んだ細胞外マトリックスにより成り立っている. ここにはリンパ球, 好中球, マクロファージなどの炎症細胞も浸潤している. 特に, マクロファージは多くの腫瘍間質においてかなりの割合で存在し, これらのマクロファージは TAM と呼ばれている²⁶⁾. 大腸癌, 乳癌などいくつかの腫瘍において腫瘍間質に浸潤する TAM は血管新生に関連すると報告

Table 2 Univariate analysis of risk factors by logistic regression

Variables	Odds ratio	p value	95%CI
Histological type well+mod vs por, muc	5.319e	0.9706	2.918e-9.694e
Depth of tumor invasion mp, ss vs se, si	1.72	0.3652	0.532-5.566
Lymph node metastasis negative vs positive	1.433	0.5345	0.461-4.457
Lymphatic invasion negative vs positive	3.448	0.0773	0.873-13.621
Venous invasion negative vs positive	1.429	0.5711	0.416-4.908
OPN marginal area	1.042	0.4855	0.929-1.168
central area	1.32	0.0004	1.131-1.541
MVD marginal area	0.993	0.6255	0.966-1.021
central area	1.028	0.0335	1.002-1.055
OPN/TAM marginal area	1.217	0.0005	1.090-1.359
central area	1.110	0.0002	1.051-1.172

Table 3 Multivariate analysis of risk factors by logistic regression

Variables	Odds ratio	p value	95%CI
MVD central area	1.001	0.9785	0.952-1.052
OPN/TAM marginal area	1.204	0.0077	1.050-1.380
OPN/TAM central area	1.121	0.0083	1.030-1.219

されており²⁷⁾²⁸⁾, TAMにより産生される血管新生因子は VEGF²⁹⁾, bFGF³⁰⁾, TNF α ³¹⁾などが報告されている。

一方, OPNは分子量58から62kDaのリン酸化糖蛋白質で, 分子のほぼ中央に(Gly-Arg-Gly-Asp-Ser)GRGDS細胞接着配列を有しており⁹⁾, リガンドとして $\alpha v\beta 3$ ³²⁾を代表とする種々の integrin³³⁾のほかに CD44³⁴⁾などが報告されている。OPNは骨芽細胞, 腎尿細管, マクロファージ, 活性化T細胞, 平滑筋などで発現しており³⁵⁾, その働きとして細胞接着や細胞遊走活性, 骨代謝ならびに VEGFと協調して働くことで血管新生に関わっていることでも注目されている¹¹⁾。さらに, 大腸, 胃, 十二指腸, 膵臓, 乳腺, 肺などのヒト癌組織での発現も報告されている¹³⁾。

我々はこの両者に注目し, その関連について検討した。まず, 大腸癌間質に浸潤する OPN 発現細

胞の同定を HE 染色および2重免疫組織化学染色を行うことにより試みた。その結果, これらの細胞はマクロファージ由来と考えられた。続いて OPN/TAM と肝転移との関連につき検討した。

腫瘍間質は宿主との関わりが最も密接に表われる tumor-host interface と称される腫瘍の先進部と, その関わりが最も少ない腫瘍中心部に分類することができる。大腸癌において TAM は宿主との関わりに大きく左右され, Ohtaniら³⁶⁾の報告にもあるように, その局在に差が存在する。したがって, 大腸癌の TAM を検討する際には, 宿主との関わりを考慮し腫瘍先進部と中心部に分けて検討することが肝要と考えられる。

また, 一般的に形態学的手法を用いて得られた結果を半定量化する場合には, 組織より数個の部位を選択し, その部位で研究者の用いたパラメーターに則った計測が行われる。この結果は, 検討

サンプルであるプレパラート上の組織すべてを測定して得られたものではなく、当然、選択か所により異なる成績が出る可能性がある。そこで、我々は連続切片を異なる1次抗体を用いて染色し、同じ部位での測定を行い、おのおのの標本から得られた結果の絶対値ではなく比率を用いて検討した。この方法を用いることにより、抗OPN抗体で染色した標本以外の標本(抗CD68, CD105抗体を用いて染色した標本)の測定部位決定に研究者の意向は反映されない。さらに、比率を用いて検討することにより、生じるかもしれない結果に対する研究者のバイアスをより軽減できると考えた。

我々の結果から、切除時に肝転移がない症例で間質(特に中心部)のOPN/TAMが高値ならば、異時性の肝転移発症が高率に疑われた。M群の中で、本来、肝転移の可能性が低いstage IとIIの10症例を比較検討しても同様の結果を得たことは、症例数が少ないながらもこの結論をより支持していると考えられる。また、肝転移の確認は腹部CTと超音波検査で行ったが、M群の中で、これらの検査で臨床的に指摘できない転移を有する症例が存在する可能性が考えられた。そこで、肝転移が術後1年以上経過した後に出現した11例での比較検討を行ったが同様の結果であった。これは、M群には画像診断では描出できない微小な肝転移が原発巣切除時にすでに存在していた可能性が考えられた。

次に、OPN/TAMと血管新生の関連を検討した。MVD測定に必要な微小血管内皮細胞の検出には、第VIII因子関連抗原やCD34に対するモノクロナール抗体を用いた免疫組織化学染色法が行われてきた。しかし、第VIII因子関連抗原や抗CD34抗体を用いた染色では正常粘膜に認められる微小血管も染色されてしまう。腫瘍の転移に関わる血管新生(angio genesis)とは、何らかの刺激により主に細静脈の血管内皮細胞が反応して、既存の血管から新しい血管網を形成する現象である。腫瘍が誘導した新生血管は基底膜が薄く、分断されやすいなど血管形成が未熟なため、腫瘍細胞の血管内侵入を容易にすることで、血行性転移経路として重要と考えられている³⁷⁾。さらに、血管

新生によって構築された新生血管網を利用して、腫瘍は増殖に必要な栄養や酸素の供給、あるいは遠隔臓器への転移を行っている³⁸⁾。

そこで、我々は腫瘍増殖に伴って新生した微小血管を特異的に同定することができる抗endo-glin (CD105)モノクロナール抗体を用いてCSA systemに基づく免疫組織化学染色³⁹⁾を行い、MVDを測定した。過去における第VIII因子関連抗原やCD34に対するモノクロナール抗体を用いた報告ではMVDは肝転移と相関すると報告されているが、これは腫瘍間質全体を測定したものであり、先進部や中心部など間質の局在につき検討したものは見当たらない。もちろん、腫瘍増殖に伴って新生した微小血管を特異的に同定することができる抗体を用いた検討はない。

今回の検討ではMVDはN群と比較して、M群ならびにS群のCAで有意に高値であった。また、同部位でのOPN/TAMとMVDの関係をSpearmanの順位相関法で検討したところM群のCAでのみ正の相関が認められた($p < 0.05$, $\rho = 0.708$)。これは、肝転移の成立には血管新生が不可欠であるが、同時性肝転移症例では血管新生はすでに完成しており、CD105で認識されるような幼弱な血管は少なく、今回測定したMVDとの関連が認められないと考えられた。一方、原発巣切除時に肝転移を発症するポテンシャルを持つ群、つまりM群にはすでにCD105で認識されるような幼弱な新生微細血管が増生しており、これを中心部に存在するOPN/TAMが促進している可能性が考えられた。

続いて、進行大腸癌術後に肝転移を引き起こす危険因子を選別するため、これらの因子に臨床病理組織学的因子を加えて、M群に対してロジスティック回帰分析を用いた単変量・多変量解析を行った。大腸癌の肝転移発生に関する危険因子として深達度や静脈侵襲などが諸家により報告されているが^{40)~42)}、本研究での単変量解析では臨床病理組織学的因子に有意なものではなく、MAならびにCAのOPN/TAMおよびCAのMVDで有意差を認めた。これら三つのパラメーターに対し多変量解析を行った結果、MA ($p = 0.0077$, odds

比 1.204) ならびに CA ($p=0.0083$, odds 比 1.121) の OPN/TAM に有意差を認めた。よって、この二つの因子は進行大腸癌根治術後の異時性肝転移発生の独立した危険因子と考えられた。

一方、大腸癌の予後を規定する他の因子であるリンパ節転移について検討した。N 群 54 例を病理組織学的リンパ節転移陽性群: 19 例, 陰性群: 35 例に分け, 各群の CA ならびに MA の OPN/TAM を比較した。また, リンパ節転移陽性 19 例を転移が 1 群リンパ節にとどまるもの: 10 例, 2 群リンパ節以上に及ぶもの: 9 例に分類し同様に検討した。その結果, OPN/TAM は CA ならびに MA とも, リンパ節転移の有無, リンパ節転移の程度に関わらず, 各群間で有意な差は認めなかった(データ非表示)。したがって, リンパ節転移と OPN/TAM との間には関連性が少ない可能性が示唆された。しかし, 限られた症例の解析結果であり, さらなる検討が必要と考えられる。

肝転移を伴う大腸癌患者の予後は向上してきたが, 一般的には肝切除術後でも 5 年生存率はおおよそ 25~40% である。しかし, 我々は肝転移巣切除後に Interleukin 2, mitomycin (MMC), 5-fluorouraci (5-FU) を用いた肝動注療法を付加することにより 5 年生存率を約 80% に向上せしめた⁴³⁾。本研究より, 術後標本の OPN/TAM が高値で異時性の肝転移発症が高率に疑われる症例に対し, 厳重な経過観察を行うことができる。つまり, 肝転移を早期に診断・治療することで, さらなる予後の向上を図ることができると考えられる。

今回の我々の検討結果から, 術後肝転移発症のハイリスク群選別の一助として, 大腸癌切除標本の腫瘍先進部間質ならびに中心部間質の OPN/TAM の検討が有用であると考えられた。

稿を終えるにあたり, 終始熱心な御助言を賜りました加藤道男博士に深甚なる謝意を表しますとともに, 本研究に御協力いただきました近畿大学外科学教室の諸先生方, 実験助手の鎌田房子女史に心から感謝致します。

文 献

1) Galandiuk S, Wieand HS, Moertel CG et al : Patterns of recurrence after curative resection of carcinoma of the colon and rectum. *Surg Gynecol*

Obstet **174** : 27—32, 1992

2) Wanebo HJ, Chu QD, Avradopoulos KA et al : Current perspective on repeat hepatic resection for colorectal carcinoma : a review. *Surgery* **119** : 361—371, 1996

3) Nordlinger B, Guiguet M, Vaillant J et al : Surgical resection of colorectal carcinoma metastases to the liver : a prognostic scoring system to improve case selection, based on 1,568 patients. *Cancer* **77** : 1254—1262, 1996

4) Sugihara K, Hojo K, Moriya Y et al : Pattern of recurrence after hepatic resection for colorectal metastases. *Br J Surg* **80** : 1032—1035, 1993

5) Fong Y, Fortner J, Sun RL et al : Clinical score for predicting recurrence after hepatic resection for metastatic colorectal cancer. *Ann Surg* **230** : 309—321, 1999

6) Minagawa M, Makuuchi M, Torzilli G et al : Extension of the frontiers of surgical indications in the treatment of liver metastases from colorectal cancer : long-term results. *Ann Surg* **231** : 487—499, 2000

7) Choti MA, Sitzmann JV, Tiburi MF et al : Trends in long-term survival following liver resection for hepatic colorectal metastases. *Ann Surg* **235** : 759—766, 2002

8) 安井健三, 清水泰博, 平井 孝ほか : 大腸癌肝転移の外科治療, 多施設における根治的肝切除例の検討. *癌と治療* **31** : 690—694, 2004

9) Oldberg A, Franzen A, Heinegard D : Cloning and sequence analysis of rat bone sialoprotein (osteopontin) cDNA reveals an Arg-Gly-Asp cell-binding sequence. *Proc Natl Acad Sci USA* **83** : 8819—8823, 1986

10) Denhardt DT, Lopez CA, Rollo EE et al : Osteopontin-induced modifications of cellular functions. *Ann N Y Acad Sci* **760** : 127—142, 1995

11) Senger DR, Ledbetter SR, Claffey KP et al : Stimulation of endothelial cell migration by vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor through cooperative mechanisms involving the α v β 3 integrin, osteopontin, and thrombin. *Am J Pathol* **149** : 293—305, 1996

12) Denhardt DT, Guo X : Osteopontin : a protein with diverse functions. *FASEB J* **7** : 1475—1482, 1993

13) Brown LF, Papadopoulos-Sergiou A, Berse B et al : Osteopontin expression and distribution in human carcinomas. *Am J Pathol* **145** : 610—623, 1994

14) Shijubo N, Ueda T, Kon S et al : Vascular endothelial growth factor and osteopontin in stage I lung adenocarcinoma. *Am J Respir Crit Care Med* **160** : 1269—1273, 1999

15) Tuck AB, O'Malley FP, Singhal H et al : Osteo-

- pontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients. *Int J Cancer* **79** : 502—508, 1998
- 16) Maki M, Hirota S, Kaneko Y et al : Expression of osteopontin messenger RNA by macrophages in ovarian serous papillary cystadenocarcinoma : a possible association with calcification of psammoma bodies. *Pathol Int* **50** : 531—535, 2000
 - 17) Gaumann A, Petrow P, Mentzel T et al : Osteopontin expression in primary sarcomas of the pulmonary artery. *Virchows Arch* **439** : 668—674, 2001
 - 18) Zhang J, Takahashi K, Takahashi F et al : Differential osteopontin expression in lung cancer. *Cancer Lett* **171** : 215—222, 2001
 - 19) Mantovani A : Tumor-associated macrophages in neoplastic progression : a paradigm for the in vivo function of chemokines. *Lab Invest* **71** : 5—16, 1994
 - 20) 大腸癌研究会編 : 大腸癌取扱い規約. 第6版. 金原出版, 東京, 1998
 - 21) Sabattini E, Bisgaard K, Ascani S et al : The EnVision™+system : a new immunohistochemical method for diagnostics and research. Critical comparison with the APAAP, ChemMate, CSA, LABC, and SABC techniques. *J Clin Pathol* **51** : 506—511, 1998
 - 22) Bobrow MN, Harris TD, Shaughnessy KJ et al : Catalyzed reporter deposition, a novel method of signal amplification. Application to immunoassays. *J Immunol* **125** : 279—285, 1989
 - 23) ダコ・ジャパン株式会社 : ENVISION+, ENVISION/APを使用した二重染色法. Immunohistochemistry. [http : // www.dako.jp/ihc/tec/dbsp.htm](http://www.dako.jp/ihc/tec/dbsp.htm). 2007-01-16
 - 24) Folkman J : How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G.H.A Clowes Memorial Award Lecture. *Cancer Res* **46** : 467—473, 1986
 - 25) Folkman J, Klagsbrun M : Angiogenic factors. *Science* **235** : 442—447, 1987
 - 26) 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
 - 27) Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R et al : Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer Res* **56** : 4625—4629, 1996
 - 28) Polverini PJ : Role of the macrophage in angiogenesis-dependent diseases. *EXS* **79** : 11—28, 1997
 - 29) Leek RD, Harris AL, Lewis CE : Cytokine networks in solid human tumors : regulation of angiogenesis. *J Leukoc Biol* **56** : 423—435, 1994
 - 30) Baird A, Mormede P, Bohlen P : Immunoreactive fibroblast growth factor in cells of peritoneal exudate suggests its identity with macrophage-derived growth factor. *Biochem Biophys Res Commun* **126** : 358—364, 1985
 - 31) Pusztai L, Clover LM, Cooper K et al : Expression of tumour necrosis factor alpha and its receptors in carcinoma of the breast. *Br J Cancer* **70** : 289—292, 1994
 - 32) Ross FP, Chappel J, Alvarez JI et al : Interactions between the bone matrix proteins osteopontin and bone sialoprotein and the osteoclast integrin $\alpha\beta3$ potentiate bone resorption. *J Biol Chem* **268** : 9901—9907, 1993
 - 33) Smith LL, Cheung HK, Ling LE et al : Osteopontin N-terminal domain contains a cryptic adhesive sequence recognized by alpha9beta1 integrin. *J Biol Chem* **271** : 28485—28491, 1996
 - 34) Weber GF, Ashkar S, Glimcher MJ et al : Receptor-ligand interaction between CD44 and osteopontin (Eta-1). *Science* **271** : 509—512, 1996
 - 35) Brown LF, Berse B, Van de Water L et al : Expression and distribution of osteopontin in human tissues : widespread association with luminal epithelial surfaces. *Mol Biol Cell* **3** : 1169—1180, 1992
 - 36) Ohtani H, Naito K, Saito K et al : Expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 by macrophages along invasive margin of colon cancer : a possible antitumor immunity? *Lab Invest* **77** : 231—243, 1997
 - 37) Hanahan D, Folkman J : Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell* **86** : 353—364, 1996
 - 38) Blood CH, Zetter BR : Tumor interactions with the vasculature : angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta* **1032** : 89—118, 1990
 - 39) Akagi K, Ikeda Y, Sumiyoshi Y et al : Estimation of angiogenesis with anti-CD105 immunostaining in the process of colorectal cancer development. *Surgery* **131** : 109—113, 2002
 - 40) Shirouzu K, Isomoto H, Kakegawa T et al : A prospective clinicopathologic study of venous invasion in colorectal cancer. *Am J Surg* **162** : 216—222, 1991
 - 41) Adachi Y, Inomata M, Kakisako K et al : Histopathologic characteristics of colorectal cancer with liver metastasis. *Dis Colon Rectum* **42** : 1053—1056, 1999
 - 42) Yamada H, Kondo S, Okushiba S et al : Analysis of predictive factors for recurrence after for colorectal liver metastases. *World J Surg* **25** : 1129—1133, 2001
 - 43) Okuno K, Yasutomi M, Hida J et al : Longterm ef-

fects of hepatic arterial interleukin-2-based immunotherapy after potentially curative re-

section of colorectal liver metastases. *Am Coll Surg* **187** : 271—275, 1998

Local Existence of Osteopontin Positive Tumor-Associated Macrophages in Colorectal Cancer Stroma as Risk Factors of Postoperative Hepatic Metastasis

Eizaburo Ishimaru, Motohiro Imano, Kiyotaka Okuno,
Hitoshi Shiozaki and Harumasa Ohyanagi
Department of Surgery, Kinki University School of Medicine

Introduction : Metachronous hepatic metastasis following radical surgery for advanced colorectal cancer has a decisive influence on prognosis, thus screening of high risk patients is important. Osteopontin (OPN) is a phosphorylated glycoprotein with a cell adhesion sequence that is associated with tumor metastasis and proliferation. In the present study, we investigated the relationship between the incidence of hepatic metastasis and OPN expression using an immunohistochemical method in patients with colorectal cancer. **Subjects and Methods** : Patients with advanced colorectal cancer who underwent radical surgery were divided into 3 groups : those with synchronous hepatic metastasis (n = 30), those with metachronous hepatic metastasis (n = 17), and nonmetastatic cases (n = 54). Immunohistochemical staining was performed using anti-OPN, CD68, and CD105 antibodies. **Results** : OPN expression was mainly observed in tumor associated macrophages (TAM) that had infiltrated the tumor surrounding the stroma, whereas it was not seen in the tumor cells. The ratios of OPN-positive TAM (OPN/TAM) and microvessel density (MVD) were determined for each location. As a result of univariate analysis in the metachronous hepatic metastasis group, significant differences were observed for the following 3 factors : MVD in the central area of the cancer stroma, and OPN/TAM ratios in the marginal and central areas. Results of multivariate analyses of those 3 suggested that the OPN/TAM ratios in the marginal and central areas of the cancer stroma might be risk factors for metachronous hepatic metastasis. **Discussion** : We concluded that OPN/TAM ratios in the cancer stroma in the marginal and central areas of excised colorectal specimens are useful for screening patients with a high risk of postoperative hepatic metastasis.

Key words : colorectal cancer, liver metastasis, osteopontin, tumor-associated macrophage

[*Jpn J Gastroenterol Surg* **40** : 695—704, 2007]

Reprint requests : Motohiro Imano Department of Surgery, Kinki University School of Medicine
377-2 Ohno-higashi, Osaka-sayama, 589-8511 JAPAN

Accepted : January 31, 2007