

大腸癌原発巣におけるラミニン発現の臨床病理学的意義

吉田 和弘

癌の浸潤・転移という過程には、癌細胞と基底膜との間の複雑な絡み合いが存在している。大腸癌の癌細胞が作る基底膜が癌の浸潤程度や転移とどのような関係にあるかを明らかにする目的で、197例の大腸癌切除材料を用い、ラミニンの発現を免疫組織学的に調べた。大腸腺癌のラミニンによる基底膜形成能は高分化型で高く、低分化型で低い傾向にあるが明らかな有意差はなかった。また深達度やリンパ節転移の有無、肝転移の有無と基底膜形成能との関係も検討した。前二者の間には有意な関連性がみられたが、肝転移に関しては有意な関連を認めなかった。

(平成 8 年 10 月 23 日採用)

Significance of Laminin Expression in Colon Cancer at its Primary Site

Kazuhiro YOSHIDA

In the process of invasion and metastasis of cancer, complex interactions exist between cancer cells and basement membranes. To clarify the relationship between the basement membrane of colon cancer cells and the depth of invasion and metastasis, 197 cases of colonic cancer removed surgically at Kawasaki Medical School Hospital were immunohistochemically examined for the presence of laminin. The basement membrane production of colonic cancers was strong in the case of well differentiated type, but weak in those that were poorly differentiated. The deeper the invasion extended, the weaker the productivity of the membrane appeared. Membrane productivity was high in cases with lymph node metastasis, but was low in those with liver metastasis. No difference was found in membrane productivity between colon cancers with liver metastasis and those without it. These results suggest that the presence of the basement membrane acts against the stromal invasion of colon cancer and that once invasion reaches the deeper portion, lymphatic invasion is accelerated. The existence of the basement membrane around primary colon cancer glands has no significant effect on its potency for liver metastasis. (Accepted on October 23, 1996) *Kawasaki Igakkaishi* 22(3):129-134, 1996

Key Words ① Colon carcinoma ② Laminin
③ Immunohistochemistry ④ Liver Metastasis

緒 言

癌の持つ最大の生物学的特徴は浸潤・転移にあるといえる。癌腫での血行性転移の過程は、癌細胞の①原発巣での上皮基底膜破壊、②間質への浸潤、③血管基底膜の破壊と血管内への通過、④血管内の移動(運搬)、⑤標的臓器内の血管内皮への着床、⑥血管外への進展と⑦臓器内組織での定着と増殖などのように多段階的である。近年免疫組織学的研究により初期の段階では基底膜の破壊が癌浸潤に必須であると言われていた^{1)~4)}。一方研究者の中には基底膜の存在はある種の癌の転移には有利に働くと推測する者もいる^{5)~13)}。彼らは大腸癌や胃癌では基底膜成分であるラミニンを発現する癌の方が肝転移を起こしやすいと報告している。

ラミニンは基底膜成分の一つで巨大な分子量(約900 kDa)の糖蛋白からなり¹⁴⁾、人体では基底膜以外には存在しない。ラミニンの存在はすなわち基底膜の存在を意味していると考えられる。しかし、ここで考慮しておくべきことは、上皮内で発生した癌がはじめて浸潤する際に破壊する基底膜は正常の上皮細胞が作ったものであり、浸潤した癌の周囲にある基底膜は癌細胞の作ったものである点である。従って、癌と基底膜の関係を見る場合、癌細胞が基底膜を作るまでの過程、あるいは基底膜があるということ自体が浸潤や転移にどのような影響力を及ぼし得るかが問題の対象となっていることを認識しておくべきである。このため両者の関係を調べる研究では基底膜の形成がどの程度であるかを総体的に見ていく必要があるといえよう。

大腸癌原発巣におけるそのラミニンの発現は、肝転移を推測する指標となるのであろうか。今回我々は、大腸癌において、ラミニンの産生能あるいは基底膜の形成能を50%以上の癌腺管がラミニンの発現を示すことで代表させ、癌の浸潤度合いおよび肝転移巣の形成との間にどのような関係があるのかを免疫組織学的に再検討してみることにした。

材料および方法

1988年1月から1990年12月の3年間に川崎医科大学消化器外科教室で切除された初発大腸癌のうち、多臓器癌重複症例を除く197例を対象とした。

ラミニンの染色は免疫染色 avidinbiotinylated peroxidase complex (ABC) 法を用い **Table 1** の手順で行った。すなわち、キシレンにて脱パラフィンした後、0.1mol/l HCl で50倍に希釈した Pepsin (SIGMA (St. Louis, MO, USA) P-6887) で120分間、その後 PBS で500倍希釈した Pronase (SIGMA P-6911) で5~10分間、37°Cで処理した。水洗後、0.3% H₂O₂ により内因性ペルオキシダーゼを不活化し、その後0.5% 正常ヤギ血清にて非特異的抗原抗体反応をブロックした。1次抗体として Bio-Science 社 (Emmenbrücke, Switzerland) のウサギ抗ヒトラミニンポリクローナル抗体を200倍に希釈したものを60分間反応させた。洗浄後、Vector 社 (Burlingame, CA, USA) の ABC キットの二次抗体(ヤギ抗ウサギ IgG 抗体)を30分反応させた。もう一度洗浄後、ペルオキシダーゼ標識 ABC 試薬を30分間反応させ、3-3'diaminobenzidine tetrahydro-chloride (DAB) にて発色させ、最後にヘマトキシリンで核染色を行った¹⁵⁾。線状の褐色の反応色素の形成を持って陽性と判定したが、ラミニンの存在する癌胞巣が腫瘍全

Table 1. Method of immunohistochemical staining

- 1) 大腸癌切除標本をルーチンの病理組織検査を行ったホルマリン固定パラフィン包埋ブロックより4 μmの厚さに薄切
- 2) キシレンによる脱パラフィン
- 3) 酵素消化法による前処置(ペプシンとプロナーゼ E を用いる⁹⁾)
- 4) 0.3% H₂O₂ による内因性ペルオキシダーゼのブロック (30分)
- 5) 0.5% 正常ヤギ血清による非特異性抗原抗体反応のブロック (30分)
- 6) 抗ラミニン抗体 (1次抗体) の反応 (60分)
- 7) 2次抗体の反応 (30分)
- 8) ABC 試薬の反応 (30分)
- 9) DAB による発色
- 10) ヘマトキシリンによる核染色

体の50%以上みられるものを基底膜形成癌であるとした。

術中所見を含めた臨床診断，HE 標本による病理組織診断および所見から，検索対象とした197症例の組織型および分化度，壁深達度，脈

管侵襲，リンパ節転移の有無，病期分類による大腸癌進行度を決定した。この結果を免疫組織化学による基底膜形成癌，非形成癌によって比較した。なお壁深達度は粘膜(m)，粘膜下層(sm)，固有筋層(mp)，漿膜下層とそれに準ず

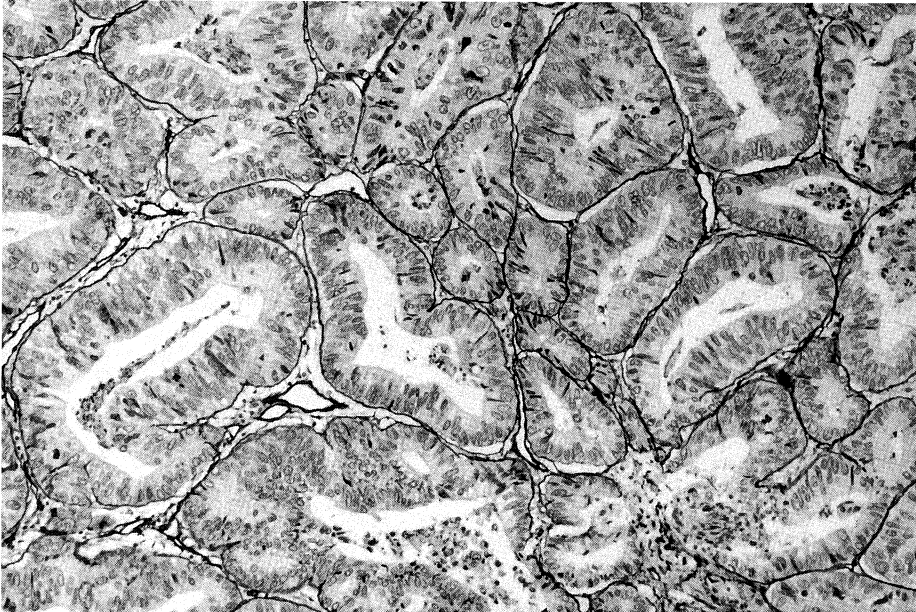


Fig. 1. Immunohistochemistry of laminin in well differentiated adenocarcinoma. This photograph shows linear immunoreactivity surround carcinoma tubules. (ABC, $\times 70$)

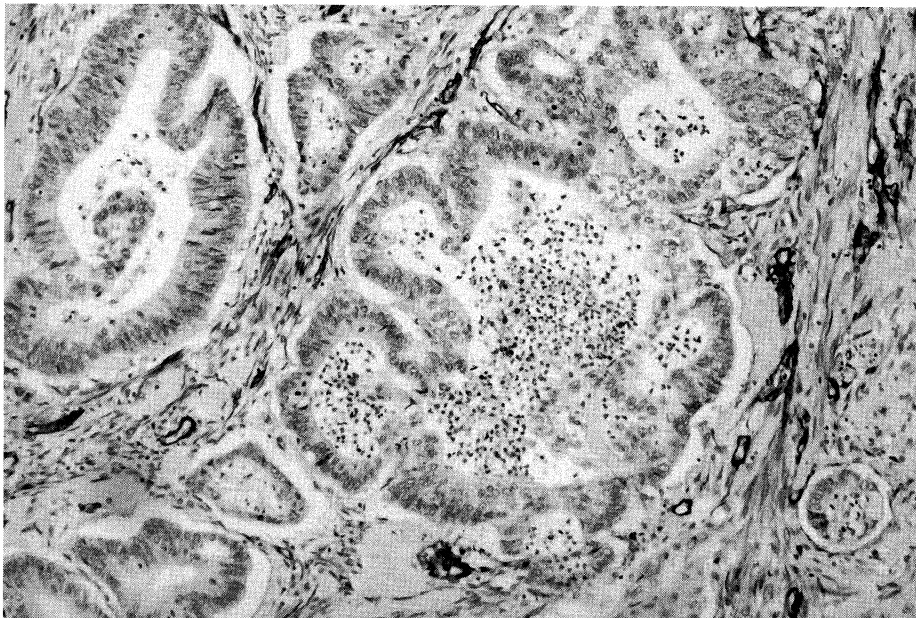


Fig. 2. Immunohistochemistry of laminin in moderately differentiated adenocarcinoma. There is no immunoreaction around carcinoma cells. (ABC, $\times 70$)

る深達度 (ss, a₁), 漿膜とそれに準ずる深達度 (se, a₂), 他臓器への直接浸潤 (si, ai) に分類し, 進行程度分類は大腸癌取り扱い規約¹⁶⁾に基づき分類した. また3年以上の経過を観察し得た137例を使って, 肝転移の有無と原発巣での癌基底膜形成の関係を検討した.

統計学的評価は χ^2 検定で行った.

結 果

今回検討した大腸癌197例には腺癌187例(うち高分化型68例, 中分化型113例, 低分化型6例)と粘液癌7例, 未分化癌3例が存在した. ラミニンの陽性所見をみると, ごく一部に陽性像のあるものを含めるとほとんどの症例に陽性であった. 一般に高分化型腺癌で染色性が強く(Fig. 1), 多くの腺管で陽性であるのに反し, 低分化のものほど弱く, 少数となる(Fig. 2)傾向がみられた. 50%以上の腺管で陽性となった基底膜形成癌は109例55.3%で, 非形成癌は88例44.7%であった. 組織型別にみると, 基底膜形成癌の割合は高分化型腺癌で63.2%, 中分化で54.0%, 低分化で33.3%, その他のもの30.0%(Table 2)で, 高分化のものに基底膜形成癌が多い傾向があった($p=0.07$). 深達度別では粘膜(m)および粘膜下層(sm)に止まる癌では全例に基底膜の形成が見られ, 固有筋層(mp)以下のものでは深達度が深くなる

Table 2. Relation between cell type of colon carcinoma and productivity of basement membrane

組織型	高分化 (n=68)	中分化 (n=113)	低分化 (n=6)	その他 (n=10)	計 (n=197)
基底膜形成癌 の症例数	43	61	2	3	109
形成率(%)	63.2	54.0	33.3	30.0	55.3

Table 3. Relation between the depth of invasion and productivity of basement membrane

深達度	m (n=14)	sm (n=11)	mp (n=46)	ss, a ₁ (n=71)	se, a ₂ (n=42)	si, ai (n=13)	計 (n=197)
形成例数	14	11	26	35	17	6	109
形成率	100	100	56.5	49.3	40.5	46.2	

m: 粘膜, sm: 粘膜下層, mp: 固有筋層,
ss, a₁: 漿膜下層またはそれに準ずる深達度,
se, a₂: 漿膜またはそれに準ずる深達度,
si, ai: 他臓器への直接浸潤

につれ基底膜形成癌数の割合が減少する傾向が見られた($p<0.0001$) (Table 3). m, smに止まる癌は全例が高分化型腺癌であった. 進行程度分類(病期: stage)別の基底膜形成癌の占有率は0期100%, I期45.8%, II期44.2%, III a期71.8%, III b期72.7%, IV期42.9%で, III a期III b期のものに基底膜形成癌が多く, 他期のものとは有意差がみられた($p<0.05$) (Table 4). 3年間の観察が可能であった症例と再発または死亡症例をあわせると137例になる. このうち肝転移は31例22.6%にみられた. 肝転移を来したもののうち基底膜形成癌は19例61.3%あり, 肝転移のないものでは55.7%で有意差は見られなかった (Table 5).

考 察

数年前までは, 癌の浸潤・転移の機構を論じる上で上皮基底膜は癌浸潤の第一のバリアーであるとする考え方が一般的で広く受け入れられていた^{1)~4)}. つまり基底膜を破壊しないと上皮内から間質へ侵入できない. 浸潤した癌でも基底膜の形成の強いものはその場に止まりやすく, 弱いものはどんどん浸潤性に広がり, やがて転移すると言うのである. ところが最近, 癌細胞自体が形成する基底膜を癌は浸潤転移という現象に有利に利用しているとする考え方が, 特に胃癌や大腸癌の肝転移に関してでてきた. 癌細胞が基底膜を産生すると言うことは大腸癌細胞株を用いたコラーゲンゼル内での培養実験でも明らかにされている^{5), 6)}. 一方, この基底膜と癌細胞を結びつける接着因子が正常細胞や細胞外基質と接着し, さらに進展遊走させることも推測されている⁴⁾. 従って癌細胞に基底膜が存在すること自体はなんら浸潤転移のバリアーとはならず, それを存在せしめるに至るさまざまな過程, 微小環境こそが重要な因子である可能性がある. このように考えていくと, 基底膜形成

Table 4. Relation between the stage of colon carcinoma and productivity of basement membrane

stage	0 (n=14)	I (n=48)	II (n=43)	III a (n=39)	III b (n=11)	IV (n=42)	計 (n=197)
形成例数	14	22	19	28	8	18	
形成率	100	45.8	44.2	71.8	72.7	42.9	

Table 5. The presence of hepatic metastasis and productivity of basement membrane

	肝転移		計
	(-)	(+)	
形成例数	59/106	19/31	78/137
形成率	55.7	61.3	56.9
m	8/8	0/0	8/8
sm	7/7	0/0	7/7
mp	11/23	4/6	15/29
ss, a ₁	19/35	8/13	27/48
se, a ₂	10/25	5/9	15/34
si, ai	4/8	2/3	6/11

をこれら各過程の総和としてみていく必要があることが理解できる。今回我々が50%以上の癌腺管でラミニンの形成があることをもって基底膜の形成の著明な癌すなわち基底膜形成癌と捉えたのは、一箇所での判定よりも癌の生物学的態度をより良く反映すると考えたからである。

大腸癌におけるラミニンの発現と癌の転移能や予後との関係についてはすでにいくつかの報告がある。久保^{5),6),9)}らは我々と同様の研究を行い、大腸癌では基底膜形成癌の方が肝転移率が高いとの結論を報告している。彼らの報告によると、大腸癌症例のうちラミニン陽性の基底膜形成癌例は約35%で、今回の我々の検討での1/2以上の形成率とは大きな差がある。これは一つにはラミニンの染色方法によるものと考えられる。ラミニンの免疫組織学的染色法にはさまざまな手法があり、使われている抗体も異なる。我々は以前、健常状態ではラミニンの存在しない肝類洞を検索対象とした、感度の高いラミニンの免疫染色法を開発した^{15),17)}。今回はこの方法に準じて行ったことが関係しているのかもしれない。我々の方法では2種類の消化酵素を用いた。この方法を使うと失活したラミニンの抗原性をより確実に賦活できるようになり、陽性率は増える。また、1次抗体も入手先の違うも

のが使われているのもう一つの原因であろう。さらに基底膜形成の判定方法にも差がある。久保らはmおよびsmに留まるものは基底膜の形成が不安定とし除外した。さら

にmp以下の癌腫を2分し浅層・深層でそれぞれ判定した後、どちらかが陽性であれば基底膜形成癌とみなしている。我々の場合このような症例の選択を行っていない。我々の症例にこの判定方法を適応するとさらに基底膜形成癌が増えることになる。

我々の結果では腺癌で陽性率が高く、分化度が高いほど陽性率も高い。また、筋層まで達しない早期のものはすべて基底膜の形成が著明であった。このことは深達度という因子を全く無視して考えるとm, smに止まる限りは基底膜形成は転移に対して負の働きをなすことを示唆している。病期の面から見るとリンパ節転移の伴うことの多いstage III a, III bで基底膜の形成率が高く、遠隔転移を伴うstage IVで低い。このことは、一旦浸潤するとリンパ管侵襲に対しては癌基底膜の存在あるいはこれに関連したいずれかの過程が促進的に働くが、血行性転移に関しては基底膜の存在はあまり大きな作用を及ぼさないことを意味しているのかもしれない。

久保らは、彼ら自身の方法で判定してラミニン陰性であれば90%以上の確率で肝転移を来さないとの結論を導いた。彼らは基底膜形成癌が転移しやすいのではなく、一旦転移すると基底膜に覆われた癌細胞塊は肝臓の活発な免疫能に抗して増殖し得、そのために生き残り、転移巣を形成すると考察している。我々の検討では、肝転移陽性例で、原発巣が基底膜形成癌である率が高い傾向がみられたが、統計学的に有意差を見出せていない。一旦肝に転移した癌が生着する条件としての基底膜の存在に関しては、大腸癌の肝転移病巣でのラミニンの発現を調べる必要があり、現在この研究を進めている所である。

以上197例の大腸癌切除材料を用いラミニンの発現を免疫組織学的に調べ、転移に関するラミ

ニンの存在意義について考察を加えた。大腸癌の浸潤傾向に対して基底膜の存在は抑制的に働くが、一旦浸潤するとリンパ管侵襲は逆に基底膜の存在が促進的に働くことを示唆していると考えられた。また、肝転移に関しては基底膜の

存在はあまり意味がないように思えた。

本研究の一部は厚生省がん研究助成金(研究課題番号6-9)、および川崎医科大学プロジェクト研究(7-306)の助成による。

文 献

- 1) Burtin P, Chavanel G, Foidart JM, Martin E: Antigens of the basement membrane and the peritumoralstroma in human colonic adenocarcinomas: an immunofluorescence study. *Int J Cancer* 30: 13-20, 1982
- 2) Forster SJ, Talbot IC, Clayton DG, Critchley DR: Tumor basement membrane laminin in adenocarcinoma of rectum: an immunohistochemical study of biological and clinical significance. *Int J Cancer* 37: 813-817, 1986
- 3) Nakajima M, Chop AM: Tumor invasion and extracellular matrix degradative enzyme: regulation of activity by organ factors. *Cancer Biology* 2: 115-127, 1991
- 4) Liotta LA: Tumor invasion and metastasis-Role of the extracellular matrix: Rhoads Medical Award Lecture. *Cancer Res* 46: 1-7, 1986
- 5) 久保隆一, 喜多岡雅典, 赤埴吉高, 待寺則和, 肥田仁一, 田中 晃, 進藤勝久, 安富正幸: 基底膜形成癌と肝転移. *日消外会誌* 26: 2488-2493, 1993
- 6) 安富正幸, 喜多岡雅典, 久保隆一: 大腸癌の基底膜形成と肝転移. *外科* 55: 1104-1110, 1993
- 7) 松田泰次, 阪口隆啓, 肥田仁一: 胃癌における laminin の免疫組織学的検討. *日消外会誌* 22: 2778-2783, 1989
- 8) 久保隆一, 喜多岡雅典, 待寺則和, 大塚浩志, 進藤勝久, 安富正幸: 肝転移における大腸癌基底膜の役割. *外科治療* 71: 172-175, 1994
- 9) 肥田仁一: 大腸癌基底膜における type IV collagen の免疫組織学的研究. *近畿大医誌* 16: 339-351, 1991
- 10) 松田泰次, 赤埴吉高, 足立俊之, 肥田仁一, 森 亘平, 安富正幸: 大腸癌原発巣のラミニン染色と肝転移に関する研究. *日消外会誌* 24: 1137-1142, 1991
- 11) 赤埴吉高, 松田泰次: ヒト腫瘍細胞株と大腸癌組織における laminin の免疫組織学的研究および転移との関連. *近畿大医誌* 17: 249-263, 1992
- 12) 下川邦泰, 稲田 潔: 免疫組織科学の進歩とその応用. *臨床病理* 38: 115-123, 1990
- 13) 迎 徹: 胃癌組織における fibronectin, laminin の免疫組織学的検討. *日癌治* 25: 2468-2476, 1990
- 14) 藤本大三郎: 細胞外マトリックスのバイオサイエンス. 東京, IPC 出版. 1990
- 15) Yoshida K, Tadaoka Y, Manabe T: Use of pronase and pepsin in the restoration of laminin antigenicity. *Kawasaki Med J* 19: 101-105, 1993
- 16) 大腸癌研究会編. 大腸癌取り扱い規約, 第5版. 東京, 金原出版. 1994
- 17) Yoshida K, Tadaoka Y, Manabe T: Expression of laminin in hepatocellular carcinoma: an adjunct for its histological diagnosis. *J Jpn Clin Oncol* 26: 70-76, 1996