

平成 21 年 4 月 15 日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19590368

研究課題名(和文) 消化管癌の間質浸潤と脈管侵襲との遷移領域における分子病理学的解析

研究課題名(英文) Histopathological analyses of stromal and vessel invasion in the gastrointestinal cancer.

研究代表者

石川 由起雄 (ISHIKAWA YUKIO)

東邦大学・医学部・准教授

研究者番号：30276894

研究成果の概要：

胃癌・結腸癌において、間質浸潤及び脈管侵襲に関与する蛋白の癌細胞発現を検討し、さらに血管とリンパ管の内皮細胞に特異的なマーカー(vWF 抗体及び LYVE-1 抗体)を用いて、客観的に脈管識別を行った上でリンパ管侵襲とリンパ節転移の関連を組織学的に解析した。胃癌では、癌先進部における claudin-3, claudin-4, β -catenin, MMP-1, MMP-2 の発現の内、MMP-1 発現程度のみがリンパ節転移と有意な関連を示し、癌細胞の接着因子よりも間質浸潤能が脈管侵襲や転移に強く関与していることが示唆された。また、結腸癌では、癌先進部の腫瘍型の性状が、リンパ節転移に強く関わっていた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：リンパ管、脈管侵襲、胃癌、結腸癌、LYVE-1 抗体、接着因子、MMP

1. 研究開始当初の背景

消化管癌の病理組織判定において、脈管侵襲、すなわち、リンパ管侵襲と血管侵襲の鑑別は困難をきわめていた。近年、リンパ管内皮細胞に特異的に発現する LYVE-1 に対する抗体を作製したが、本抗体はホルマリン固定・パラフィン包埋組織において、良好な染色性を有し、両脈管の客観的識別に有用であった。癌のリンパ節転移と消化管壁のリン

パ管侵襲の関連については、これまでも指摘されてきたが、正確な脈管識別をもとにしたリンパ管侵襲の研究はなされてこなかった。

また、消化管癌の間質浸潤から脈管侵襲にいたる過程において種々の癌細胞発現蛋白の役割が報告されてきたが、客観的な脈管識別を行ったうえで、それぞれの脈管侵襲に与える役割を検討した研究はない。

これら背景から、LYVE-1 抗体の大量作製とそれを利用した消化管癌の浸潤・脈管侵襲を

病理組織学的に検討することとした。

2. 研究の目的

以下の3点について明らかにすることを目的とした。

- 1) 早期から進行癌までの種々の段階にある胃癌・結腸癌において、リンパ管侵襲は真にリンパ節転移の組織学的規定因子と成り得るか。
- 2) 早期結腸癌において、リンパ管侵襲・先進部の組織型・接着因子の発現・間質膠原線維分解酵素の発現が、真にリンパ節転移の危険因子であるか。
- 3) 胃癌において、先進部の組織型・接着因子の発現・間質膠原線維分解酵素の発現が、脈管侵襲にどの程度関与しているか。

3. 研究の方法

1) リンパ節転移のあった105例の胃癌摘出例、リンパ節転移のない105例の摘出例の病理組織を使用。各群は早期癌35例、mp癌35例、ss癌35例からなる。全組織を、LYVE-1抗体、vWF抗体、claudin-3抗体、claudin-4抗体、 β -catenin抗体、MMP-1抗体、MMP-2抗体、VEGF-C抗体で免疫染色し、さらにEVG染色及びVictoria-Blue染色を施した。

光顕観察により、胃癌組織内のリンパ管密度及び癌周囲のリンパ管密度を計測。リンパ節転移のあった105例と無い105例とを統計学的比較した。LYVE-1陽性リンパ管への侵襲、vWF染色標本とVictoria-Blue染色標本の観察から血管侵襲を観察し、これらの有無とリンパ節転移の関連を検討。また、各種免疫染色による癌細胞の発現程度とリンパ節転移の関連を統計学的に検討した。

2) 早期結腸癌について、リンパ節転移のある28例、リンパ節転移のない43例を手術摘出例から蒐集し、全組織切片をLYVE-1抗体、vWF抗体、claudin-3抗体、claudin-4抗体、 β -catenin抗体で免疫染色した。静脈侵襲確認のため、EVG染色及びVictoria-Blue染色を施した。

癌の組織型、先進部の性状(budding)、先進部における接着因子発現程度、LYVE-1陽性のリンパ管への侵襲の有無、vWF陽性の血管への侵襲の有無、粘膜下固有層の浸潤の深さと、リンパ節転移との関連を検討。

4. 研究成果

1) 胃癌におけるリンパ節転移の組織学的規定因子(論文②)

リンパ節転移の有無によって、各因子を比較検討した。両群の年齢、男女比、胃内発生部位には差異を認めなかった。

LYVE-1陽性のリンパ管への癌侵襲は、主にsm層の癌巣周囲に接して認められ、その他癌先進部に観察された。しかし、癌病巣内には認められなかった。すなわち、sm層や静脈周囲に分布していた既存のリンパ管は、癌浸潤により破壊され、消失したものと考えられた。一方、vWF抗体で確認した血管侵襲は、癌周囲のみならず、癌病巣内にも散見されたが、多くは静脈壁構造を有していた。癌病巣内の静脈侵襲の存在から、静脈はリンパ管に比較して壁構造が強固であり、癌浸潤拡大による破壊が生じにくいことを示している。

癌周囲のリンパ管密度と癌細胞のVEGF-C発現程度との関連を検討したが、有意な関連を認めなかった。また、リンパ節転移の有無とリンパ管密度の関連を統計学的検討を行ったが、これも有意な関連を認めなかった。この結果から、癌細胞の発現するVEGF-Cは、局所的なリンパ管内皮細胞増殖に関与しているかも知れないが、癌周囲全体のリンパ管増生には至っていないと考えられた。また、リンパ管内皮細胞の増殖能力は、血管内皮細胞のそれより弱くて遅いと報告されており、今回の結果は、VEGF-Cによるリンパ管内皮細胞増殖よりも、癌組織の拡大の方が凌駕しているためかも知れない。

リンパ節転移の組織学的規定因子の検討では、腫瘍径及びリンパ管侵襲の2因子が、独立した危険因子であった。癌の浸潤程度による検討では、ss癌においてのみ、リンパ管密度が有意な関連を認めた(表1)。

表 1.
多変量解析による組織学的規定因子

	オッズ比	P値
全例(n=210)		
腫瘍径	1.044	0.0038
リンパ管侵襲	4.328	0.00092
sm癌(n=70)		
腫瘍径	1.043	0.0192
リンパ管侵襲	5.222	0.0242
VEGF-C発現	3.312	0.0497
mp癌(n=70)		
腫瘍径	1.046	0.0118
リンパ管侵襲	6.174	0.0032
ss癌(n=70)		
リンパ管侵襲	3.036	0.0344
リンパ管密度	0.977	0.0429

2) 胃癌細胞の発現する接着因子と MMPs のリンパ節転移に与える影響(論文③)

消化管癌の臓器壁内の浸潤過程において、癌細胞の発現する接着因子 (claudin-3, claudin-4, β -catenin) 及び間質膠原線維分解酵素 (MMP-1, MMP-2) は、癌細胞の胞巣からの分離、間質の浸潤、脈管壁浸潤に大きな役割を演じている。しかし、これら蛋白発現程度とリンパ節転移との関連について、正確なリンパ管同定を行った上での検討はなされていない。

本研究では、胃癌の浸潤先進部におけるこれら5種の蛋白発現とリンパ節転移及び癌の組織型との関連を検討した。MMP-1の高発現は、リンパ節転移群に有意に多く、その他の蛋白発現はリンパ節転移の有無に関与していなかった(表2)。しかし、これとは逆に、MMP-1高発現は、組織型とは関連せず、その他の4種の蛋白の高発現は、組織型と有意に関連していた(表3)。

表 2.
先進部の蛋白発現とリンパ節転移の関連
(多変量解析の結果：n=210)

	オッズ比	P 値
腫瘍径	1.0191	0.0136
リンパ管侵襲	3.4476	0.0001
Claudin-3	0.7245	0.4551
Claudin-4	0.9448	0.9190
β -catenin	0.8791	0.7409
MMP-1	2.4356	0.0298
MMP-2	0.8429	0.6621

表 3.
先進部の蛋白発現と組織型

	Low grade malignancy (n=71)	High grade malignancy (n=139)	P 値
claudin-3			<0.0001
高発現	31	15	
低発現	40	124	
claudin-4			0.0001
高発現	17	8	
低発現	54	131	
β -catenin			<0.0001
高発現	33	17	
低発現	38	122	
MMP-1			0.1448
高発現	59	103	
低発現	38	36	
MMP-2			0.0201
高発現	60	97	
低発現	11	42	

今回の結果では、胃癌先進部の組織型により接着因子の発現態度に差異が認められたが、逆に、これら接着因子の発現低下が腫瘍細胞の接着能を低下させ、低分化型 (high grade malignancy) への分化に寄与していると思われる。また、脈管侵襲部では、これら接着因子の発現は認められず、脈管侵襲には接着因子の低発現が直接的に関与している可能性が示唆された。MMP-1 及び MMP-2 の発現に関しては、前者はリンパ節転移の危険因子であったが、後者は組織型と関連を示した。すなわち、MMP-1 は間質内の浸潤のみならず脈管壁への浸潤にも寄与しており、本蛋白発現は消化管壁内の浸潤能のみならず、脈管自体への侵襲と深く関わっていると思われる。

胃癌のリンパ管侵襲の有無は、直接的にリンパ節転移の規定因子であり、LYVE-1 抗体を用いた免疫染色は、大いに活用すべきであると思われる。

3) 早期結腸癌の解析(論文①)

近年、縮小手術の発展により、早期結腸癌に対し内視鏡的摘出が増加した反面、所属リンパ節の郭清術を追加するか否かについての議論が生じてきた。病理組織の観察からのリンパ節転移の予測の重要性が増してきたわけである。

多変量解析によると、先進部の budding 形成、リンパ管侵襲の有無の2因子が、独立した規定因子であった(表4)。一方、claudin-3, claudin-4, β -catenin の発現は、リンパ節転移との関連を示さなかった。

表 4.
早期結腸癌のリンパ節転移の危険因子
(多変量解析の結果：n=71)

	オッズ比	P 値
腫瘍径	1.067	0.058
浸潤の深さ	0.922	0.725
組織型	2.758	0.237
Budding の有無	5.014	0.045
リンパ管侵襲	5.354	0.041

LYVE-1 抗体や vWF 抗体を使用した客観的な脈管識別は、より正確なリンパ管侵襲の同定に直結し、早期結腸癌のリンパ節転移危険因子の研究に役立つと思われる。事実、HE 染色標本の観察より、LYVE-1 抗体染色標本の観察の方が、リンパ節転移への意義に関して、P 値の上昇をみた。Budding 形成は、癌先進部の癌細胞の性状を示していると思われ、癌細胞が孤立性に浸潤する場合には、間質のみならず脈管への侵襲も高度になると思われた。

4) 総括

胃・結腸癌のリンパ節転移は、壁内のリンパ管侵襲を起点とするが、病理組織標本の観察には限界がある。しかし、本研究の如く、免疫染色による客観的な脈管識別は、正確なリンパ管侵襲の判定に有用であり、これら消化管癌におけるリンパ節転移の予測の研究に重要な方法であると考えられた。

胃癌の壁内浸潤・転移の過程では、接着因子の発現よりも、MMP-1 発現がリンパ節転移に大きく関わっていた。これは癌細胞の間質内浸潤や脈管壁浸潤が、リンパ節転移により直接的に関与しているためと思われる。今後は、癌の転移能に関する研究の際には、これら事実を考慮する必要がある。

早期結腸癌におけるリンパ節転移予測因子として重要な因子は、リンパ管侵襲と budding 形成である。しかし、他の因子の組み合わせを考慮しても、100%の正確さは得られず、今後のさらなる研究が要求される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

①Kamata I, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Uzuki M, Fujimoto A, Morita H, Tamai S, Maehara T, Ogata K, Shimokawa R, Igarashi Y, Miki K, Ishii T. Significance of lymphatic invasion and cancer invasion-relating proteins on lymph node metastasis in gastric cancer. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009; in press. (査読あり)

②Morita H, Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Nishimura C, Igarashi Y, Miki K, Ishii T. Histopathological predictor for regional lymph node metastasis in gastric cancer. *Virchows Arch*, 2009;454:143-151. (査読あり)

③Ishikawa Y, Akishima-Fukasawa Y, Ito K, Akasaka Y, Yokoo T, Ishii T, and the Toho Study Group for Cancer Biological Behavior. Histopathological determinants of regional lymph node metastasis in early colorectal cancer. *Cancer*, 2008;112:924-933. (査読あり)

[学会発表] (計4件)

①鎌田至、石川由起雄、森田宏、伊藤金次、赤坂喜清、五十嵐良典、三木一正、石井壽晴. LYVE-1 抗体、細胞接着因子・MMP抗体を用いた免疫組織化学による胃癌のリンパ節転移の組織学的規定因子. 第97回日本病理学会総会(2008.5. 石川県立音楽堂)

②石川由起雄、秋嶋一深澤由里、伊藤金次、山崎一人、下川伶子、藤原美恵子、鈴木高祐、一瀬晃洋、木口英子、緒方謙太郎、新野史、海老原善郎. LYVE-1 抗体を使用した早期結腸癌のリンパ節転移の組織学的規定因子. 第97回日本病理学会総会(2008.5. 石川県立音楽堂)

③森田宏、三木一正、石川由起雄、伊藤金次、赤坂喜清、石井壽晴. LYVE-1 抗体を用いた胃癌における所属リンパ節転移の組織学的規定因子. 第61回東邦医学会総会(2007.11. 東邦大学医学部5号館地下第1講義室)

④Kamata I, Ishikawa Y, Morita H, Ito K, Akasaka Y, Igarashi Y, Miki K, Ishii T. Predictors for regional lymph node metastasis in gastric cancer through immunohistochemistry using LYVE-1 antibody combined with cell-adhesion proteins and matrix metalloproteinases antibodies. 15th United European Gastroenterology Week “UEGW” 2007 (2007.10. Palais des Congres de Paris)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石川由起雄 (ISHIKAWA YUKIO)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：30276894

(2) 研究分担者

石井壽晴 (ISHII TOSHIHARU)
東邦大学・医学部・教授
研究者番号：30101893

伊藤金次 (ITO KINJI)
東邦大学・医学部・准教授
研究者番号：40057758

(3) 連携研究者

なし