

Histochemical Study on the Expression of Pancreatic Trypsinogen in Human Pancreatic Ductal Cancers

メタデータ	言語: jpn 出版者: 公開日: 2017-10-04 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/2297/9303

ヒト膵管癌における膵トリプシノーゲンの発現に関する 組織化学的研究

金沢大学医学部医学科解剖学第一講座 (主任: 井関尚一教授)

俵 友 恵

ヒト膵管癌の外科材料を用いて、癌組織内での膵トリプシノーゲンの発現と局在を免疫組織化学的に検索し、膵トリプシノーゲンの発現程度と癌の進行度との関連について検討した。対象は、1988年1月から1995年6月までの7.5年間に外科的治療が行われた46例の浸潤性膵管癌である。また、最近経験した7症例に対しては全RNAを抽出して遺伝子レベルでの膵トリプシノーゲン発現の検索に供した。抗ヒト膵トリプシノーゲンマウスモノクローナル抗体を用いての免疫染色の結果、膵管癌原発巣46例中44例(96%)に膵トリプシノーゲンに対する軽度から高度の免疫反応が見られた。また、原発巣と同様に転移リンパ節30病巣および神経周囲浸潤25病巣を検索したところ、そのすべての病巣に強い免疫反応が認められた。これらの免疫反応物は微細顆粒状で、おもに癌細胞質内の核上部に見られた。免疫電子顕微鏡法によると癌細胞には酵素原顆粒はなかったが、免疫反応物は細胞質にびまん性に存在するほか、ゴルジ装置部分にも局在した。逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応を用いたmRNAレベルでの膵トリプシノーゲンの検索では、7例の膵管癌全例にmRNAの発現を認めた。以上の結果から、確かに膵管癌細胞がトリプシノーゲンを産生し分泌していることが示された。つぎに、原発巣46例中、膵トリプシノーゲンに対する免疫反応が無発現か軽度発現する低発現群(n=16)と、中程度から高度発現する高発現群(n=30)とに2大別し、膵管癌における膵トリプシノーゲンの発現程度と癌の進行度を示す臨床病理学的諸因子との関連について両群間で比較検討したが、明らかな差異は見られなかった。以上の所見より、膵トリプシノーゲンは浸潤性膵管癌の進行度には無関係に高率に発現しており、細胞外マトリックス分解酵素の一つとして癌の浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。

Key words extracellular matrix degrading protease, immunohistochemistry, pancreatic ductal cancer, pancreatic trypsinogen, polymerase chain reaction

近年、癌細胞の局所浸潤ならびに遠隔転移時における細胞外マトリックス分解酵素の役割が注目されている¹⁾²⁾。なかでも、癌細胞自身によって産生されるセリン系プロテアーゼの1つである、ウロキナーゼプラスミノゲンアクチベーター(urokinase-type plasminogen activator, u-PA)は、マトリックスメタロプロテアーゼ(matrix metalloproteases, MMPs)など、他の細胞外マトリックス分解酵素の活性化に関与すると同時に、自らも細胞外マトリックスを破壊する作用があることで知られている³⁾⁴⁾。さらに最近では、セリン系プロテアーゼの一つである膵トリプシノーゲンが、ヒト浸潤性膵管癌や他の消化器癌さらには婦人科領域癌にも過剰発現していることが報告されている^{5)~9)}。このことから、癌の浸潤や転移に癌細胞自身の産生するトリプシノーゲンが関与する可能性が考えられる。しかし、これらのヒト癌において膵トリプシノーゲンの細胞内局在を電子顕微鏡(電顕)を用いて検討した報告や、膵トリプシノーゲンの発現の程度と臨床病理学的諸因子との関連を検討した報告はない。そこで本研究では、ヒト膵管癌細胞での膵トリプシノーゲンの産生を確認するために、ヒト膵管癌の多数の症例について外科材料を用いて蛋白およびmRNAレベルで検索

し、その局在を免疫電顕法を用いて検討した。さらに、膵トリプシノーゲンの発現程度と癌の進行度に関する臨床病理学的諸因子との関連をも検討した。その結果興味ある二、三の知見を得たので報告する。

対象および方法

I. 対 象

1988年1月から1995年6月までの7.5年間に、金沢大学医学部第二外科学教室において膵管癌と診断されて外科的治療が行われた46例の浸潤性膵管癌症例を対象とした。性別は男性28例、女性18例である。受診時年齢は33から78歳までで平均61±10歳である。これら浸潤性膵管癌の組織学的評価による進行度は膵癌取扱規約¹⁰⁾に従えば、stage IとIIが0例、stage IIIが13例(28%)、stage IVaが19例(41%)、stage IVbが14例(30%)であり、全例がstage III以上の進行例であった。

膵管癌におけるmRNAレベルでの膵トリプシノーゲンの発現の有無をみるため、最近経験した膵管癌7症例の腫瘍の一部を直ちに-80℃に凍結保存し全RNA抽出用に供した。この他、胃癌手術時に合併切除した膵組織ならびに胆嚢癌手術時に合併

平成10年1月14日受付, 平成10年3月30日受理

Abbreviations : DAB, 3,3'-diaminobenzidine; MMPs, matrix metalloproteases; RT-PCR, reverse transcription-PCR; u-PA, urokinase-type plasminogen activator; 光顕, 光学顕微鏡; 電顕, 電子顕微鏡

切除した肝組織の一部も直ちに凍結保存し、それぞれ膵トリプシノーゲン発現の陽性と陰性対照群として用いた。また、膵トリプシノーゲンを発現することで知られているCapan-1ヒト膵管癌細胞株¹¹⁾ (American Type Culture Collection, Rockville, USA) も陽性対照群として使用した。さらに、腫瘍の一部を直ちに4%パラフォルムアルデヒド液で固定し、電顕観察用に供した。

II. 研究方法

1. ヒト膵トリプシノーゲンの免疫組織化学的染色

1) 一次抗体

使用した一次抗体は、抗ヒト膵トリプシノーゲンマウスモノ

クローナル抗体 (Chemicon, Tomecula, USA) である。この一次抗体の抗ヒト膵トリプシノーゲンあるいはトリプシンに対する免疫反応の特異性の解析については、すでにTeradaら¹²⁾により行なわれている。

2) 光学顕微鏡 (光顕) 用染色法

外科的に切除された標本を10%ホルマリンで固定し、腫瘍部分を中心に5mmの階段状切片を作成した。これらの切片をパラフィン包埋して病理組織学的検索に供した。癌の肉眼的ならびに組織学的進展度の診断は前述した膵癌取扱い規約¹⁰⁾に従った。

Table 1. Immunostaining of human pancreatic ductal adenocarcinomas with anti-human pancreatic trypsinogen antibody

Case no.	Age (year)	Sex	Clinical stage ^{a)}	Pancreatic trypsinogen	
				Primary tumor cells	Associated normal acinar cells
1	54	F	III	###	##
2	57	F	III	+	+
3	61	F	III	+	+
4	66	F	III	+	##
5	69	F	III	+	##
6	78	F	III	##	##
7	51	M	III	+	+
8	59	M	III	+	+
9	60	M	III	##	##
10	62	M	III	+	##
11	64	M	III	##	##
12	74	M	III	##	##
13	77	M	III	+	##
14	46	F	IVa	+	+
15	53	F	IVa	##	##
16	65	F	IVa	+	##
17	69	F	IVa	+	+
18	70	F	IVa	+	+
19	70	F	IVa	-	+
20	77	F	IVa	+	+
21	48	M	IVa	##	##
22	49	M	IVa	+	##
23	51	M	IVa	##	##
24	54	M	IVa	##	##
25	55	M	IVa	+	+
26	59	M	IVa	+	##
27	62	M	IVa	+	+
28	62	M	IVa	+	##
29	66	M	IVa	+	+
30	69	M	IVa	##	##
31	71	M	IVa	+	+
32	76	M	IVa	##	##
33	39	F	IVb	+	##
34	61	F	IVb	##	##
35	69	F	IVb	##	##
36	69	F	IVb	##	##
37	77	F	IVb	+	##
38	33	M	IVb	+	+
39	52	M	IVb	##	##
40	57	M	IVb	##	##
41	59	M	IVb	##	##
42	61	M	IVb	+	##
43	62	M	IVb	##	##
44	66	M	IVb	##	##
45	66	M	IVb	+	+
46	67	M	IVb	-	+

Proportion of staining-positive cells: -, less than 5%; +, 5-25%; ++, 25-50%; ###, more than 50%.

^{a)} Clinical stage is evaluated according to the general rules for the study of the pancreatic cancer by the Japanese pancreatic society.

光顕レベルでの免疫染色には、1症例あたり腫瘍部分の検索用に3個の代表切片を、非腫瘍部分の検索用に2個の代表切片を用いた。免疫染色の方法としては、各包埋ブロックより4 μ mの薄切切片を作成し、脱パラフィン後に既報の手順¹³⁾で行った。すなわち、i. 一次抗体の細胞膜透過性を亢進させるため、40 μ g/mlのプロテアーゼK (Boehringer Mannheim, GmbH, Germany) と室温で10分間反応させる。ii. 0.3%過酸化水素加メタノール溶液と室温で30分間反応させる。iii. 正常ヤギ血清 (Dako, Santa Barbara, USA) の20倍希釈液と室温で20分間反応させる。iv. 抗ヒト膵トリプシノーゲン (Chemicon) の100倍希釈液と4℃で一晩反応させる。v. ビオチン標識ヤギ抗マウスIgG (Dako) と室温で60分間反応させる。vi. パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dako) と室温で60分間反応させる。vii. 免疫複合体反応物を0.01%過酸化水素加3,3'-ジアミノベンチジン (3,3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma Chemical,

St Louis, USA) で発色させ、最後にメチルグリーンで核染色し、脱水・封入をして光顕観察を行った。

3) 電顕用染色法

外科的に切除された腫瘍部分をできるだけ小さく採取し、直ちに4%パラフォルムアルデヒド液に4℃で4時間浸し固定した。ついで、10%、20%、30%サッカロース溶液で順次洗浄した。凍結切片作製には、固定標本を-25℃で15 μ mの厚さに切り、ポリ・エル・リジンで表面処理したスライド用プラスチック板 (武藤化学薬品, 東京) を使用して、プレエンベディング法¹⁴⁾により免疫電顕を行った。すなわち、i. 正常ヤギ血清 (Dako) の20倍希釈液と室温で20分間反応させる。ii. 抗ヒト膵トリプシノーゲン (Chemicon) の100倍希釈液と4℃で一晩反応させる。iii. ビオチン標識ヤギ抗マウスIgG抗体 (Dako) と室温で1時間反応させる。iv. パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dako) と室温で60分間反応させる。

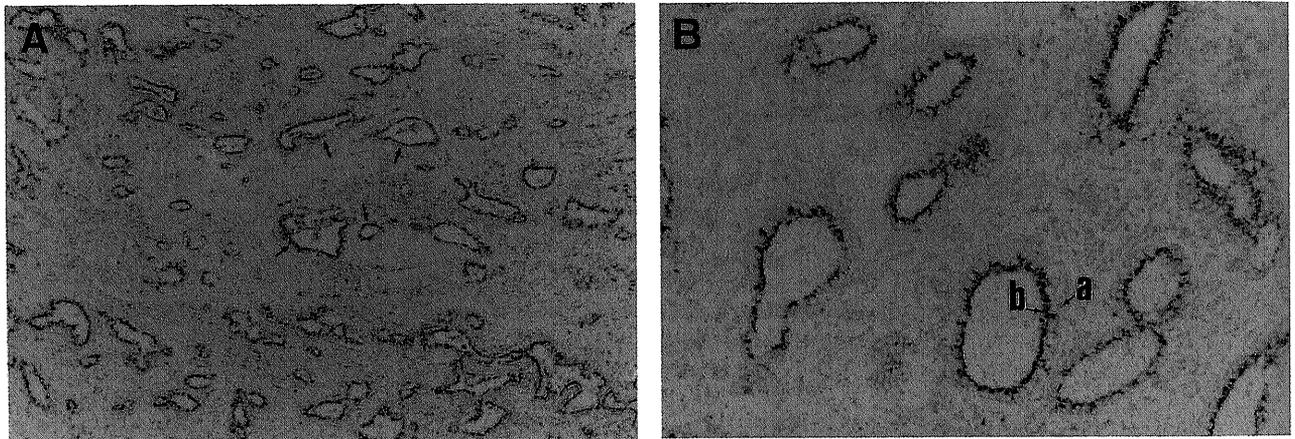


Fig. 1. Immunohistochemical identification of human pancreatic trypsinogen in a primary lesion of the invasive pancreatic ductal adenocarcinomas. (A) Arrows indicate the dark brownish and fine granular pattern, which was seen in almost all the adenocarcinoma cells, that is categorized as the strong immunoreactivity. $\times 40$. (B) Higher magnification of Fig. 1A. The arrow 'a' indicates the nucleus of a cell of the adenocarcinomas. The arrow 'b' indicates dark brownish immunostaining in the fine granular pattern at the supranuclear cytoplasm of the cell. $\times 160$.

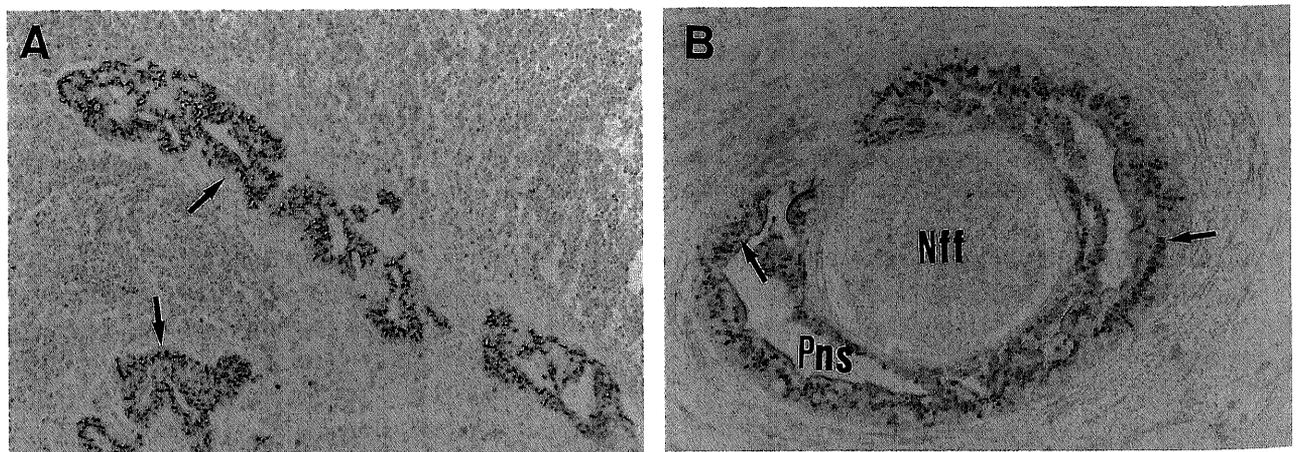


Fig. 2. Immunohistochemical identification of human pancreatic trypsinogen at the metastatic lesions in a peripancreatic lymph node and in an extrapancreatic neural plexus. The strong immunoreactivity was observed as a dark brownish and fine granular pattern at the metastatic lesions (where the arrows indicate) in the center of the peripancreatic lymph node (A, $\times 100$) and in the extrapancreatic neural plexus (B, $\times 120$). Nff, nerve fiber fascicle; Pns, perineural space.

v. 免疫複合体反応物を0.01%過酸化水素加DAB溶液で発色させる。vi. 0.5%チタンオスミウム溶液と室温で60分間反応させた後蒸留水で洗浄後、さらに、0.5%酢酸ウランと室温で20分間反応させる。vii. 最後にエタノールで順次濃度をあげつつ十分に脱水を行った後にエポン812樹脂に包埋し、超薄切片を作製して電顕観察を行った。

4) 光顕レベルでの免疫染色の判定基準

腫瘍部分を含む3枚の代表切片を鏡顕し、腫瘍細胞数の染色率5%未満のものを発現陰性、5%以上を発現陽性とした。また、発現陽性例のうち染色陽性腫瘍細胞の割合が5%以上25%未満を軽度発現例、25%以上50%未満を中等度発現例、50%以上を高度発現例に区分した。さらに、免疫染色無発現例ならびに軽度発現例を低発現群に、中等度ならびに高度発現例を高発現群とに2大別し、両群間における免疫反応陽性率の差と臨床病理学的特徴との関連についてカイ二乗検定を行った。

2. 膵トリプシノーゲンのmRNAレベルでの検索

膵管癌における膵トリプシノーゲンのmRNAレベルでの検討は、膵トリプシノーゲンのアイソフォーム^{15)~17)}の1つである膵トリプシノーゲン-1 (pancreatic trypsinogen-1, cationic isoform) について逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction, RT-PCR) 法で行った。

1) 全RNA抽出法

-80℃に凍結保存した標本から正常膵組織が含まれないように注意深く癌組織のみを分離し、ホットフェノールグアニジウムチオシアネート法¹⁸⁾により全RNAを抽出した。

2) プライマー

ヒト膵トリプシノーゲン-1 (pancreatic trypsinogen-1, cationic isoform) のcDNA塩基配列¹⁹⁾より、センスプライマーとして5'-CCCCCAATACGACAGGAA-3' (塩基番号 294-311)、アンチセンスプライマーとして5'-TTCTGGGCACAGCCATCA-3' (塩基番号 657-674) のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計した。ベクターアクチン (β -actin) に対するmRNA検出用プライマーは、センス側として5'-GAAAATCTGGCACCACACCTT-3' (塩基番号 1299-1319)、アンチセンス側として5'-GTTGAAGGTAGTTTCGTGGAT-3' (塩基番号 2406-2264) のオリゴデオキシリボヌクレオチドを設計した。これらのプライマーの合成は日本バイオサービス株式会社 (新座) に依頼した。なお、これらのプライマーはジーンバンク (GenBank) データベースで他のものとの整合性が全くないことを確認した。

3) RT-PCR法

全RNA 1 μ gを65℃で15分間変性させた後、一本鎖cDNA合成キット (CLONTECH Laboratories Inc, Palo Alto, USA) を使

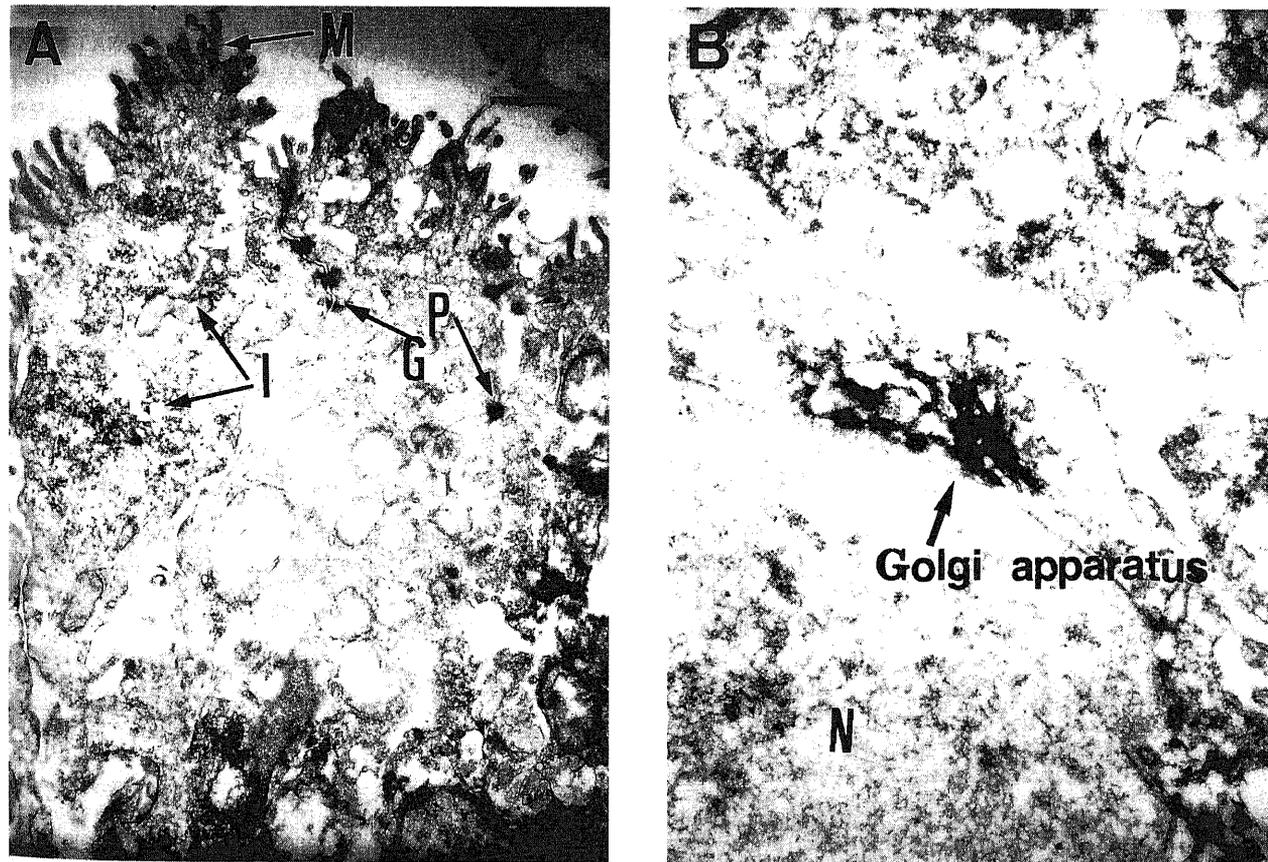


Fig. 3. Electron micrographs of a differentiated type of human pancreatic ductal adenocarcinoma cells with immunohistochemical staining for human pancreatic trypsinogen. (A) The dark fine granular immunoreactive pattern is diffusely present in the supranuclear cytosol. $\times 10000$. I, dark granular immunoreactive pattern; M, microvilli; G, gap junction; P, peroxisomes. (B) The dark granular pattern appears intensely at the Golgi apparatus adjacent to the nucleus. $\times 12000$. N, nucleus.

用して逆転写反応によってcDNAを合成した¹⁷⁾。すなわち、200ユニットのモロネー白血病毒逆転写酵素、0.5mMのオリゴデオキシリボヌクレオチド (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) 混合液、オリゴdTプライマー、RNase阻害因子1単位、Tris塩酸緩衝液 (pH 8.3) 50mM, KCl 75mM, MgCl₂ 3mMの全てを混合し37℃で90分間反応させた。

つぎに、各mRNAに特異的なプライマーとTaq DNAポリメラーゼ (宝酒造, 京都) とを用いて、DNAサーマルサイクラー (Perkin-Elmer Cetus, Norwalk, USA) でDNAを増幅した。PCR反応は1サイクル、熱変性を94℃で30秒間、アニーリングを60℃で1分間、DNAの伸長を72℃で2分間として、膵トリプシノーゲン-1用には30サイクル、ベクターアクチン用には18サイクル行った。増幅されたPCR反応液20 μ lに対し、2 μ lのゲル泳動緩衝液 (0.25%プロモフェノールブルー, 0.25%キシレンシアノールFF, 30%グリセロール) を加えて攪拌し、その10 μ lを1.5%アガロースゲルに注入し、電圧100Vで25分間電気泳動した。泳動後エチジウムブロマイド染色を行い、紫外線照射装置、トランスイルミネーター (フナコシ, 東京) でPCR産物を観察した。

成 績

I. 膵管癌における膵トリプシノーゲンの蛋白レベルでの発現について

1. 光顕レベルでの所見

1) 原発巣での免疫染色所見

46例のヒト膵管癌原発巣の膵トリプシノーゲン免疫染色結果を表1に示した。46例中44例 (96%) の膵管癌原発巣は、膵トリプシノーゲンに対して軽度から高度の免疫反応を示した。図1Aは高度免疫反応を示した症例の光顕所見である。その強拡大写真 (図1B) を見ると、免疫反応物は微細顆粒状におもに癌細胞核上部に存在した。発現陽性癌細胞の組織内分布は、症例間で多少の違いはあるものの、大部分の症例で癌先進部にとくに強く発現が認められた。内部陽性対照群としての非腫瘍部の膵腺房細胞は全症例細胞質が顆粒状に加染した。このことから全ての症例の組織標本で免疫反応性が保たれていること、免疫反応の特異性に問題がないことが示された。

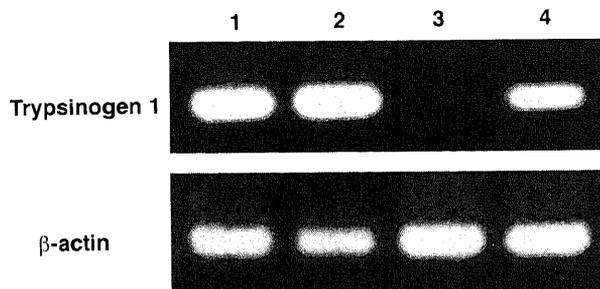


Fig. 4. Expression of mRNA of the human pancreatic trypsinogen-1 (the upper panel), and of β -actin (the lower panel). The mRNA were amplified by RT-PCR, and examined the specificity of the mRNA probes. Pancreatic trypsinogen-1 was expressed in normal pancreas (lanes 1 and 2) and Capan-1 (lane 4), but not in normal liver (lane 3). β -actin was expressed in all the samples.

2) 転移病巣での免疫染色所見

検索した転移リンパ節30病巣および神経周囲浸潤25病巣のすべてに、原発巣と同様に癌細胞内の核上部に膵トリプシノーゲンの発現が認められた (図2)。

2. 電顕レベルでの免疫染色所見

図3は膵管癌細胞 (表1での症例35) の免疫電顕像である。微絨毛が見える部分が癌細胞の管腔側である。免疫反応物は核上部の細胞質にびまん性に見られ、中でも核に隣接するゴルジ装置にも一致して強い免疫反応物が見られたことが特徴的であった。この他、多くの癌細胞内を観察したが、正常膵腺房細胞で見られるような酵素原顆粒は全く観察されなかった。

II. 膵管癌における膵トリプシノーゲンの mRNA レベルでの発現について

まず、使用したプライマーの特異性を確認するため、膵トリプシノーゲン-1発現の陽性対照群としてヒト正常膵組織ならびにCapan-1細胞株から抽出した全mRNAを、陰性対照群としてヒト正常肝組織から抽出した全mRNAを使用してRT-PCR法で検索した。その結果、膵トリプシノーゲンの蛋白レベルでの発現が確認されている膵組織とCapan-1細胞株では、遺伝子レベルでも発現が確認され、蛋白レベルで発現のない肝組織では遺伝子レベルでも発現は見られなかった (図4)。以上の所見より、使用したプライマーの特異性が確認された。

そこで、最近経験した膵管癌7症例 (表1での症例22, 23, 33-35, 41, 42) を対象にして、膵トリプシノーゲン-1について、mRNAレベルでの発現の有無を検討するため、正常膵4症例と前述の膵管癌7症例の癌組織部分から抽出した全mRNAを用いてRT-PCR法で検索したところ、膵管癌全例にmRNAレベルでの膵トリプシノーゲン-1の発現が認められた (図5)。これら7症例はいずれも膵トリプシノーゲンの蛋白レベルでの過剰発現が確認されており、膵トリプシノーゲンの蛋白レベルと遺伝子レベルでの発現はよく相関していた。

III. 膵管癌における膵トリプシノーゲンの発現程度と臨床病理学的諸因子との関連について

表2は、膵管癌における膵トリプシノーゲンの発現率を癌の進行度別に見たものである。その発現は対象群のstage III, IVa, IVbの中では癌の進行度とは無関係に高率に発現していた。つぎに、膵トリプシノーゲンの発現の程度と個々の臨床病理学的

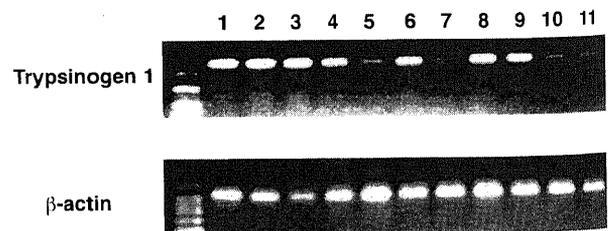


Fig. 5. Detection of RT-PCR amplified products of mRNA of the human pancreatic trypsinogen-1 (the upper panel), and of β -actin (the lower panel) in the normal pancreas and the invasive pancreatic ductal cancers. Pancreatic trypsinogen-1 and β -actin was expressed in lanes 1-11. The first lane from the left, size marker; lanes 1-4, normal pancreas from surgical specimens; lanes 5-11, invasive pancreatic ductal adenocarcinomas from the cases of nos, 22, 23, 33-35, 41, and 42 (listed in Table 1), respectively.

Table 2. Expression of pancreatic trypsinogen and clinical stages of human pancreatic cancers

Clinical stage ^{a)}	No. of patients	No. (%) of patients	
		Pancreatic trypsinogen	
		Negative	Positive
III	13	0	13 (100)
IVa	19	1 (5)	18 (93)
IVb	14	1 (7)	13 (96)

^{a)} Clinical stage is evaluated according to the general rules for the study of the pancreatic cancer by the Japanese pancreatic society.

Table 3. Relationship between levels of pancreatic trypsinogen expression and clinicopathologic features in invasive human pancreatic ductal adenocarcinomas

Variables ^{a)}	No. (%) of patients	
	Pancreatic trypsinogen	
	Low expression group ^{b)} (n=16)	High expression group ^{c)} (n=30)
Tumor size		
≤4.0 cm	4 (25)	11 (37)
>4.0 cm	12 (75)	19 (63)
Tumor location		
Head	8 (50)	19 (63)
Body/tail	8 (50)	11 (37)
Histologic differentiation		
Well/moderate	15 (94)	28 (93)
Poor	1 (6)	2 (7)
Anterior capsular invasion		
Negative	4 (25)	11 (37)
Positive	12 (75)	19 (63)
Retroperitoneal invasion		
Negative	1 (6)	3 (10)
Positive	15 (94)	27 (90)
Lymph node metastasis		
Negative	2 (13)	8 (27)
Positive	14 (87)	22 (73)
Liver metastasis		
Negative	10 (62)	24 (80)
Positive	6 (38)	6 (38)

^{a)} Histologic findings are evaluated according to the general rules for the study of the pancreatic cancer by the Japanese pancreatic society.

^{b)} Proportion of staining-positive cells, 0-25%

^{c)} Proportion of staining-positive cells, more than 25%.

諸因子との関連についての結果を表3に示した。膵トリプシノーゲンの無発現例ならびに軽度発現例を低発現群 (n = 16) に、中等度ならびに高度発現例を高発現群 (n = 30) とに2大別し、腫瘍径、腫瘍の占居部位、分化度、前方被膜浸潤、後面組織浸潤、リンパ節転移および肝転移の有無と両群間との関連についてカイ二乗検定を行ったが、これらすべての指標について両群間には有意の差は認められなかった。

考 察

膵トリプシノーゲンは元来膵の腺房細胞で合成・分泌されて

いる蛋白分解酵素であるが、消化器癌や婦人科領域癌の一部でも過剰発現していることが最近の研究で知られている⁵⁾⁻⁹⁾。今回の研究では、元来膵トリプシノーゲンを発現しない膵管上皮から発生した膵管癌の大部分の症例が、膵トリプシノーゲンを過剰発現することが蛋白ならびにmRNAレベルで確認できた。膵管癌が膵トリプシノーゲンを過剰発現していることについては、1994年にOhtaら⁵⁾がすでに報告している。つまり、浸潤性膵管癌20例中15例(75%)に膵トリプシノーゲンの過剰発現を認めたとしている。ただし、発現を認めなかった5症例はどれも非腫瘍部の膵腺房細胞にも発現が見られず、したがって、

腫瘍部で発現していないのではなく、切除標本を固定するまでに時間がかかり過ぎたり、あるいは固定してから切り出すまでの時間がかかり過ぎたりして、抗原が失活した可能性も否定できないと考えられた。そこで、今回の研究ではさらに対象症例を重ねると共に、一次抗体の膜透過性充進と抗原の賦活化を目的として、新たにプロテアーゼK処理を免疫染色過程の中に加えた。このプロテアーゼK処理に関しては1993年のHughesら²⁰⁾の研究結果を参考にして、プロテアーゼ濃度を種々変えて染色性の程度を検討したところ、前述の濃度および37℃で5分間あるいは室温で10分間の反応が染色性がよく、特異性にも問題がなかったとの結果を得た。この予備実験の結果をもとに、本研究では40 μ g/mlのプロテアーゼKを室温で10分間処理する方法を取り入れて免疫染色を行った。その結果、46例中44例(96%)の膵管癌症例の原発巣に膵トリプシノーゲンの発現が確認された。転移の認められたリンパ節30病巣ならびに神経周囲浸潤25病巣のすべてに、原発巣と同様に膵トリプシノーゲンの過剰発現が認められたことは興味深い。

そこで、免疫電顕法を用いて膵トリプシノーゲンの癌細胞内での局在を見ると、免疫反応物は細胞質だけでなく核に隣接したゴルジ装置にも一致して観察された。すなわち、細胞質内に存在する膵トリプシノーゲンはピノサイトーシスによって細胞外から細胞内に取り込まれたのではなく、癌細胞自身によって合成されたものであると考えられた。

また、膵トリプシノーゲンには現在までに少なくとも3つのアイソフォームが知られている¹⁵⁾⁻¹⁷⁾が、その中でも1本鎖あるいは2本鎖の膵トリプシノーゲン-1 (pancreatic trypsinogen-1, cationic isoform) が胃癌細胞株で発現していることが1994年Koshikawaら²¹⁾により報告されている。そこで、本研究でも最近の7症例の新鮮材料から注意深く分離した癌組織の全mRNAを抽出し、RT-PCR法を用いてmRNAレベルでの膵トリプシノーゲン-1の発現を検討したが、免疫染色の結果と同様に全7例に遺伝子レベルでの発現が確認された。すなわち、電顕の結果と合わせて、膵管癌細胞が確かにトリプシノーゲンを産生することが示された。しかし、癌細胞には膵腺房細胞に見られるような酵素原顆粒は全く観察されなかったことから、癌細胞内で合成された膵トリプシノーゲンは膵腺房細胞とは異なり、長期間細胞内に貯留されることなく速やかに直接細胞外へ分泌される可能性が示唆された。

つぎに、膵トリプシノーゲンの発現程度を2大別し、浸潤性膵管癌の進行度を示す臨床病理学的諸因子との関連について考察を加えてみた。膵トリプシノーゲンはstage III以降のほとんどの膵管癌症例で発現が見られることより、膵トリプシノーゲンの無発現例ならびに軽度発現例を低発現群 (n=16)、中等度ならびに高度発現例を高発現群 (n=30) として個々の臨床病理学的進行度との相関関係を検討したが、現時点では種々の腫瘍の進展度と膵トリプシノーゲンの発現程度との間には明らかな差異は見られなかった。かえって、膵トリプシノーゲンはstage III, IVa, IVbの中では腫瘍の進展度とは無関係に高率に発現していたことから、さらに早期 (stage I, II) から発現してくる可能性があると思われた。このように、膵管癌細胞は癌の進展度とは無関係に比較的早い時期から膵トリプシノーゲンを合成・分泌し、その膵トリプシノーゲンは細胞外マトリックス分解酵素として、癌細胞の局所浸潤時や遠隔転移時に重要な役割を担っている可能性があると考えた。

ところで、癌細胞から分泌される膵トリプシノーゲンは膵トリプシンの前駆体であるが、どのような機序で癌細胞外の間質内で活性型の膵トリプシンに変換されるのであろうか? 最近、Ohtaら¹³⁾は、膵管癌が第3のプロトンポンプである液胞型プロトンポンプ (vacuolar-type H⁺-ATPase, V-ATPase) を過剰に発現していることを報告し、このプロトンポンプを介して排出される陽子が、自動活性化により癌細胞の管腔側で作られる微小環境内で膵トリプシノーゲンをトリプシンに変換するという仮説を立てて、活性化の機序を解明しようとしている。膵トリプシノーゲンのアイソフォームの中でも、陽イオン型の膵トリプシノーゲン-1が酸性 (pH 4.5-5) で効率よく自動活性化されることが、試験管内の実験で証明されているからである²²⁾。さらに、膵管癌組織中の癌細胞のみならず癌巣周囲に見られるマクロファージが産生するカテプシンB³⁾によっても、膵トリプシノーゲン-1が活性化される可能性が考えられる。

一般に、癌が浸潤・転移する際には、MMPs, u-PA, プラスミンなどの細胞外マトリックス分解酵素が特に重要であり、u-PA \rightarrow プラスミン \rightarrow MMPs活性化のカスケード反応が存在すると考えられている²²⁾²³⁾。しかし、MMP-9はトリプシンGで活性化されるが、プラスミンを始めとする他のセリンプロテアーゼでは活性化されないため²⁴⁾²⁵⁾、u-PA \rightarrow プラスミン \rightarrow MMPs活性化のカスケード反応以外のプロセスが存在するものと考えられている。そこで、筆者が注目したのは、今回の研究で明らかにしたように癌細胞内で合成される膵トリプシノーゲンの存在である。すなわち、膵トリプシノーゲンも上述したような機序で活性体に変換されれば、細胞外マトリックス分解酵素としては勿論のこと、u-PAやMMPsなど他の分解酵素の前駆体を直接効率よく活性化することが可能なわけであり、トリプシン \rightarrow MMPsのカスケード反応も充分存在しうものと思われた。

以上、本研究で観察した、浸潤性膵管癌の原発巣ならびに神経周囲浸潤部における膵トリプシノーゲンの過剰発現について、考察を加えた。

結 論

ヒト膵管癌の外科材料を用いて、癌組織内での膵トリプシノーゲンの発現を蛋白およびmRNAレベルで検索し、膵トリプシノーゲンの発現程度と臨床病理学的諸因子との関連について検討し、以下の知見を得た。

- 膵管癌原発巣46例中44例(96%)に膵トリプシノーゲンに対する軽度から高度の免疫反応が見られた。
- 転移リンパ節30病巣および神経周囲浸潤25病巣を検索したところそのすべてに強い免疫反応が認められた。
- 免疫電顕法で膵トリプシノーゲンの癌細胞内局在を見ると、免疫反応物は核上部の細胞質や核に隣接したゴルジ装置に一致して観察されたが、酵素原顆粒は全く観察されなかった。
- 逆転写・ポリメラーゼ連鎖反応を用いたmRNAレベルでの検索では、7例の膵管癌全例に正常膵と同程度の膵トリプシノーゲンの発現を認めた。
- 検索例では、腫瘍の進展度には無関係に高率に膵トリプシノーゲンの発現が見られた。

以上の成績より、膵管癌は比較的早期から膵トリプシノーゲンを合成・分泌し、その膵トリプシノーゲンは細胞外マトリックス分解酵素として、癌細胞の局所浸潤・遠隔転移に重要な役

割を担っている可能性が示唆された。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、ご指導ご校閲を賜りました金沢大学医学部医学科解剖学第一講座井関尚一主任教授および外科学第二講座宮崎逸夫前主任教授に深甚なる謝意を捧げます。さらに、本研究の機会を与えて頂き、終始ご指導ご教示いただきました同学部保健学科永川宅和教授、また、絶大なるご指導ご援助を頂きました同学部医学科外科学第二講座太田哲生講師および惜しみなくご協力ご援助くださいました同学科解剖学第一講座山本美由紀助手はじめ外科学第二講座および解剖学第一講座の諸先生方に深く深く感謝の意を表します。

文 献

- 1) 中島元夫. 転移に関与する細胞外マトリックス分解酵素. 実験医学10: 249-255, 1992
- 2) 岡田保典. マトリックスメタロプロテイナーゼの活性調節. 実験医学10: 256-262, 1992
- 3) Duffy MJ, Reilly D, Sullivan CO, O'Higgins N, Fennelly JJ, Andreasen P. Urokinase plasminogen activator, a new and independent prognostic marker in breast cancer. *Cancer Res* 50: 6827-6829, 1990
- 4) Kogha S, Harvey SR, Weaver RM, Markus G. Localization of plasminogen activators in human colon cancers by immunoperoxidase staining. *Cancer Res* 45: 1787-1796, 1991
- 5) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, Tajima H, Itoh H, Fonseca L, Miyazaki I. Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. *Br J Cancer* 69: 152-156, 1994
- 6) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, Kayahara M, Nishimura G, Tsukioka Y, Taniguchi K, Miyazaki I, Numata M, Yamamoto M, Iseki S, Kanno M. Expression of pancreatic trypsinogen in human extrapancreatic gastrointestinal carcinomas. *Oncol Rep* 1: 759-764, 1994
- 7) Koivunen E, Huhtala ML, Stenman UH. Human ovarian tumor-associated trypsin. *J Biol Chem* 264: 24: 14095-14099, 1989
- 8) Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, Miyazaki K. Multiple secretion of matrix serine proteases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52: 5046-5053, 1992
- 9) Hirahara F, Miyagi Y, Miyagi E, Yasumitsu H, Koshikawa N, Nagashima Y, Kitamura H, Minaguchi H, Umeda M, Miyazaki K. Trypsinogen expression in human ovarian carcinomas. *Int J Cancer* 63: 176-181, 1995
- 10) 日本膵臓学会編. 膵癌取扱い規約, 第4版, 16-17頁, 金原出版, 東京, 1993
- 11) Miszczuk-Jamska B, Merten M, Guy-Crte O, Amouric M, Clemente F, Schoumacher RA, Figarella C. Characterization of trypsinogens 1 and 2 in two human pancreatic adenocarcinoma cell lines; CFPAC-1 and CAPAN-1. *FEBS* 294: 3: 175-178, 1991
- 12) Terada T, Nakanuma Y. Immunohistochemical demonstration of pancreatic alpha-amylase and trypsin in intrahepatic bile ducts and peribiliary glands. *Hepatology* 14: 1129-1135, 1991
- 13) Ohta T, Numata M, Yagishita H, Tsukioka Y, Kitagawa H, Kayahara M, Nagakawa T, Miyazaki I, Yamamoto M, Iseki S, Ohkuma S. Expression of 16kDa proteolipid of vacuolar-type H⁺-ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1511-1517, 1996
- 14) 渡辺慶一, 中根一穂編. 酵素抗体法, 第3版, 249-260頁, 440-443頁, 学際企画, 東京, 1992
- 15) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: a laboratory manual*, 2nd ed, p7.30-7.79, Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989
- 16) Guy O, Lombardo D, Bartelt DC, Amic J, Figarella C. Two human trypsinogens. Purification, molecular properties, and N-terminal sequences. *Biochemistry* 17: 1669-1675, 1978
- 17) Rinderknecht H, Renner IG, Abramson SB, Carmack C. Meso-trypsin: a new inhibitor-resistant protease from a zymogen in human pancreatic tissue and fluid. *Gastroenterology* 86: 681-692, 1984
- 18) Wang TY, Cox RA. Isolation of total nucleic acid. *In* SP Colowick & NO Kaplan (eds), *Methods in enzymology*, Vol 12B, p115-129, Academic Press, New York, 1968
- 19) Emi M, Nakamura Y, Ogawa M, Yamamoto T, Nishide T, Mori T, Matsubara K. Cloning, characterization and nucleotide sequences of two cDNAs encoding human pancreatic trypsinogens. *Gene*, 41: 305-310, 1986
- 20) Hughes SE, Hall PA. Immunolocalization of fibroblast growth factor receptor 1 and its ligands in human tissues. *Lab Invest* 69: 173-182, 1993
- 21) Koshikawa N, Yasumitsu H, Nagashima Y, Umeda M, Miyazaki K. Identification of one- and two-chain forms of trypsinogen 1 produced by a human gastric adenocarcinoma cell line. *Biochem J* 303: 187-190, 1994
- 22) Figarella C, Miszczuk-Jamska B, Barrett AJ. Possible lysosomal activation of pancreatic zymogens. *Biol Chem Hoppe-Seyler* 369: 293-298, 1988
- 23) Mignatti P, Robbins E, Rifkin DB. Tumor invasion through the human amniotic membrane: requirement for a protease cascade. *Cell* 47: 487-498, 1986
- 24) Murphy G, Ward R, Hembry RM, Reynolds JJ, Kuhn K, Tryggvason K. Characterization of gelatinase from pig polymorphonuclear leucocytes. *Biochem J* 258: 463-472, 1989
- 25) Wilhelm SM, Collier IE, Marmer BL, Eisen AZ, Grant GA, Goldberg GI. SV 40-transformed human lung fibroblasts secrete a 92-kDa type IV collagenase which is identical to that secreted by normal human macrophages. *J Biol Chem* 264: 17213-17221, 1989

Histochemical Study on the Expression of Pancreatic Trypsinogen in Human Pancreatic Ductal Cancers
Tomoe Tawara, Department of Anatomy (I), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. Juzen Med Soc., 107, 154 — 162 (1998)

Key words extracellular matrix degrading protease, immunohistochemistry, pancreatic ductal cancer, pancreatic trypsinogen, polymerase chain reaction

Abstract

This study was designed to examine the mRNA and protein levels of pancreatic trypsinogen in surgically resected human pancreatic ductal adenocarcinoma tissues. First, the immunohistochemical staining was used to evaluate the protein levels of pancreatic trypsinogen in 46 cases of invasive pancreatic ductal cancer. Then, the reverse transcription-polymerase chain reaction technique was used to assess the mRNA levels of pancreatic trypsinogen-1 in seven cases of invasive pancreatic ductal cancer and in four normal pancreases.

Immunohistochemically, 44 out of the 46 cases of invasive ductal cancer (96%) expressed pancreatic trypsinogen in a fine granular pattern located in the supranuclear cytoplasm of the carcinoma cells. In addition, all of the associated metastatic lesions including peripancreatic lymph nodes and extrapancreatic neural plexuses also expressed pancreatic trypsinogen strongly. The expression level of mRNA for pancreatic trypsinogen-1 in the seven cases of invasive ductal cancer was roughly the same as that in the normal pancreases. These findings suggest that invasive pancreatic ductal cancers express pancreatic trypsinogen, raising the possibility that pancreatic trypsinogen may play an important role in cancer invasion and metastasis as an extracellular matrix degrading protease.