

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor In Human Early Colorectal Carcinomas among Different Growth Types and Depths of Invasion

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/2297/9369

大腸早期癌における血管新生および

VEGF, PD-ECGF 発現の検討

—深達度およびPGとNPGの差異—

金沢大学がん研究所外科部 (主任: 磨伊正義教授)

溝 口 雅 之

大腸癌において血管新生ならびに血管内皮増殖因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) や血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF) 等の血管新生因子は、転移や増殖と密接な関係を持っていると報告されている。一方大腸癌は腺腫から転移を伴う癌まで、その発育過程が分子生物学的に明らかにされるとともに腺腫の時期を経ない新規 (*de novo*) 癌の存在も注目されている。今回筆者は大腸早期癌の血管新生の意義を探るべく、深達度や発育形態別にみた血管新生の差異の有無について検討し、大腸癌の発育過程に血管新生がどのように関わっているかについて考察した。対象として教室で摘除された大腸早期癌64例 [粘膜内 (intramucosal carcinomas) (m) 癌35例, 粘膜下層浸潤癌 (submucosal invasive carcinomas) (sm) 癌29例], 固有筋層浸潤癌 (muscularis propria invasive carcinomas) (mp) 癌33例ならびに大腸腺腫25例, 計122例を用いた。このうち大腸癌97例は下田らの分類法に従いポリポイド発育型 (polypoid growth type, PG) と非ポリポイド発育型 (non polypoid growth type, NPG) とに分類した。これら切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋切片においてファクターⅧを用いた微小血管密度 (vessel count, VC) の測定, 血管新生因子としてVEGFと塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF), PD-ECGFの免疫染色を行った。VCはWeidnerらの方法に準じ、最も血管密度の高い部分を200倍で観察し、1視野当たりの血管の数を測定した。VEGFとbFGFについては染色程度に応じて0~3+までに分類して評価した。PD-ECGFの染色強度についても同様に浸潤細胞の染色程度により0~3+で評価した。これらのVCとVEGF, bFGF, PD-ECGFの発現程度と進行度との関係, ならびにPGとNPGの差異に関して検討した。その結果, VCでは、腺腫 12.7 ± 6.7 , m癌 11.8 ± 8.3 , sm癌 35.0 ± 17.5 , mp癌 35.2 ± 18.8 であり, m癌とsm癌のあいだには有意差を認めしたが, 腺腫とm癌, sm癌とmp癌のあいだに差は認められなかった。血管新生因子では, 癌細胞からのVEGFと浸潤細胞からのPD-ECGFの発現程度がVCと良く相関するとともに, やはり同様にm癌とsm癌のあいだで差が認められた他はPD-ECGF発現においてsm癌とmp癌のあいだに有意差を認めた。これに対し, bFGFではVCとの相関関係や, 深達度別での差異を認めなかった。大腸早期癌における発育形態別にPGとNPGの差異をみたところVCにおいては新規発育として注目されるNPGで有意に充進していた (PG = 15.4 ± 12.7 , NPG = 40.1 ± 28.1 , $P < 0.0007$)。VEGF, PD-ECGFの発現についてもNPGで有意に高い成績が得られた ($P < 0.05$, $P = 0.001$)。以上の結果から, 大腸早期癌における血管新生の意義としてm癌からsm癌への移行時に必要性が高いと考えられた。また, 大腸早期新規癌の特徴のひとつとされる, より速い進行癌への移行に血管新生が関与している可能性が強く示唆された。そして大腸早期癌の血管新生は癌細胞からのVEGFの発現と癌細胞周囲の浸潤細胞からのPD-ECGFの発現によって調節されていることが判明した。

Key words early colorectal carcinomas, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, platelet derived endothelial cell growth factor, *de novo* cancer

より早期の大腸癌の肉眼形態に関する研究はこれまで数多く報告され, なかでも表面型腫瘍の存在が急速進展を示す大腸進行癌の形成に重要であるとの意見が相次いで出されている¹⁻⁴⁾。一般に大腸早期癌の発育はその形態からポリポイド発育型 (polypoid growth type, PG) と非ポリポイド発育型 (non

polypoid growth type, NPG) に分けられている^{5,6)}。この分類によって腺腫を含む隆起型起源の癌と表面平坦・陥凹型起源の癌が分けられ, 腺腫-癌腫連鎖 (adenoma carcinoma sequence) による癌と新規 (*de novo*) 癌とを区別できると考えられている⁵⁾。大腸癌の圧倒的多数を占める2型進行癌の多くは新規癌で, 表面

平成9年11月25日受付, 平成10年1月8日受理

Abbreviations : bFGF, basic fibroblast growth factor; ly, lymphatic invasion; NGS, normal goat serum; NHS, normal horse serum; NPG, non polypoid growth type; PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor; PG, polypoid growth type; TP, thymidine phosphoryrase; v, venous invasion; VC, vessel count; VEGF, vascular endothelial growth factor

平坦・陥凹型病変に由来すると推論する研究も少なくない^{9)~10)}。そして、この進行癌において最も重要な問題は転移である。この転移の問題を含めた難治性の癌患者は跡を絶たず、癌の絶対死者数は確実に増加しており、従来の外科的治療や癌化学療法のみでは完治を望めないのが現実である。

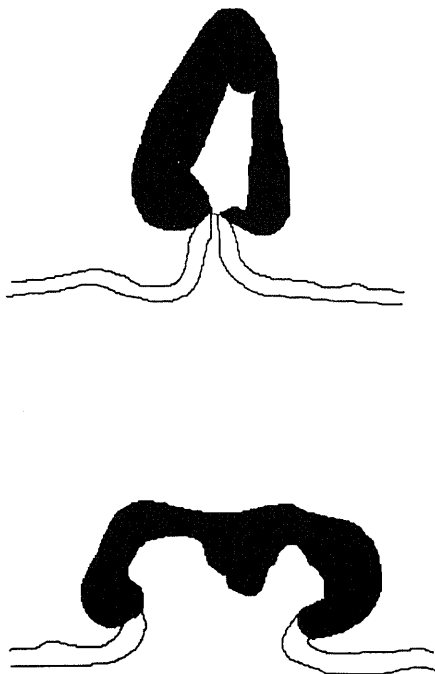
しかし最近の分子生物学の導入により、癌の発生、浸潤、転移機構に新しい局面を迎えつつある。すなわち癌の浸潤、転移の過程には細胞間のみならず、癌細胞と宿主側の間質細胞との情報交換を介しての安定した複合体を形成し、これらの微小環境が癌の浸潤、転移に大きく関与していることが分子レベルで判明している。なかでも癌と血管新生に関するテーマは、今後の分子標的を目的とした腫瘍制御、そして臨床展開に発展しうるものである。なぜなら癌の増殖や転移は、血管新生に依存しているからである。癌細胞は宿主の血管から自分の方に向かって新生血管の形成を促進し、この新生した血管内皮は未成熟で血管透過性も亢進し、自ら血管内侵入を容易にしている。この新生血管網形成には種々の血管新生因子が関わっていることが解明されており、現在では塩基性線維芽細胞増殖因子 (basic fibroblast growth factor, bFGF)、インターロイキン-8 (interleukin-8)、血小板由来増殖因子 (platelet derived growth factor)、血小板由来内皮細胞増殖因子 (platelet-derived endothelial cell growth factor, PD-ECGF)、プロスタグランジン E1、E2 (prostaglandins E1, E2)、変換成長因子アルファ、ベータ (transforming growth factor α , β)、腫瘍壊死因子アルファ (tumor necrosis factor α)、血管内皮増

殖因子/血管透過性因子 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor, VEGF/VPF)、酸性線維芽細胞増殖因子 (acidic fibroblast growth factor)、アンジオゲニン、肝細胞増殖因子 (hepatocyte growth factor) など、数多くの因子が報告されている¹¹⁾¹²⁾。そして乳癌¹³⁾、前立腺癌¹⁴⁾、皮膚癌¹⁵⁾、頭頸部癌¹⁶⁾、肺癌¹⁷⁾¹⁸⁾、食道癌¹⁹⁾、胃癌²⁰⁾や大腸癌^{21)~23)}など種々の腫瘍において、血管新生と転移とは深く結びついていると報告されている。

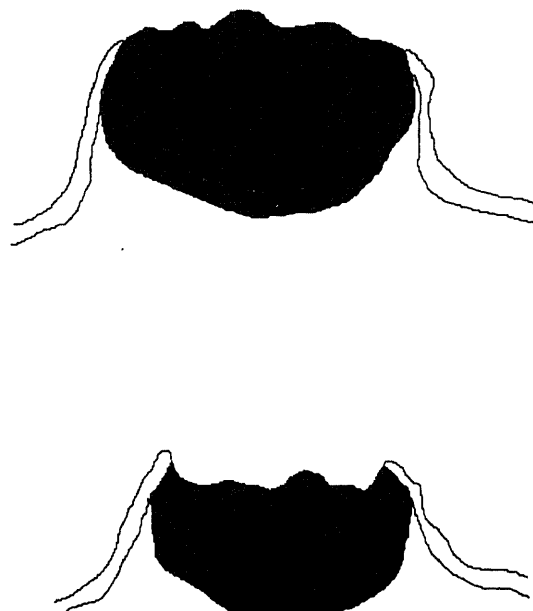
Takahashiら²⁴⁾はヒト大腸癌患者における転移・増殖と、微小血管密度 (vessel count, VC) ならびに VEGF とが強い相関があることを示した。また、PD-ECGF においてもその発現が大腸癌の血管新生に関わっていることを裏付けた²⁵⁾。Frankら²⁶⁾はリンパ節転移陰性大腸癌手術切除症例の追跡調査において、切除標本のパラフィン包埋切片における VC と術後再発率が正の相関をすることを示し、また、VC と術後5年生存率とが逆相関することをつきとめ、これらの結果から血管新生は大腸癌患者の予後を左右する重要なファクターのひとつであると述べている。また Warrenら²⁹⁾は30個のヒト大腸癌肝転移中の VEGF 発現を調べ、VEGF がヒト大腸癌肝転移内でよく見られる血管新生因子であり、VEGF レセプターは肝腫瘍発生に付随して高発現することをつきとめた。しかしこれらの研究は、主に進行性の癌を対象にしており、早期の大腸癌に対する血管新生を論じた論文は皆無である。

癌は1~2mm以上の大きさになるためには血管新生が必要であり、そのために増殖に不可欠な栄養源の補給を得る必要が

PG type



NPG type



Classification of cut-surface of colorectal cancer

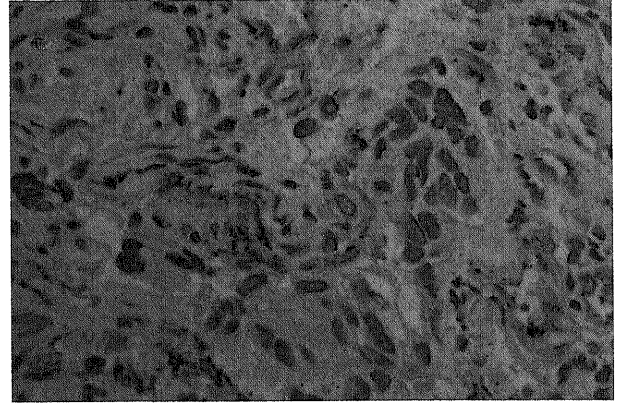
Fig. 1. The materials were divided into two types; polypoid growth type (PG) from intramucosal proliferation of adenoma or carcinoma, and non polypoid growth type (NPG) without intramucosal protuberant growth.

ある²⁰⁾。従って、より早期の大腸癌の発育・進展には血管新生が大きく関わっていることが予想され、また発育進展様式別にみた悪性度を規定する因子としても血管新生の関与は注目されなければならない。

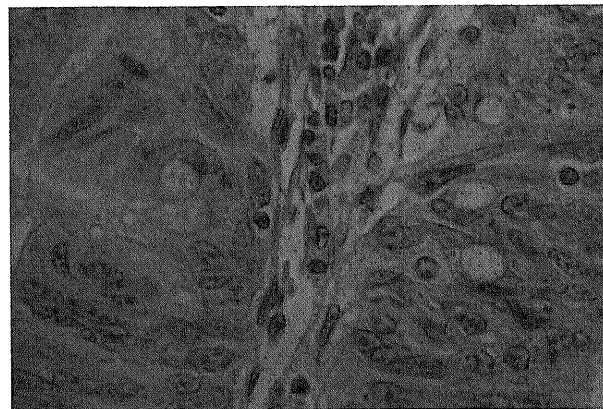
今回の研究で筆者は大腸早期癌の血管新生の意義を探るべく、深達度や発育形態別 (PGとNPG) にみた血管新生の差異の有無について検討し、大腸癌の血管新生がどの様に関連しているかについて考察した。



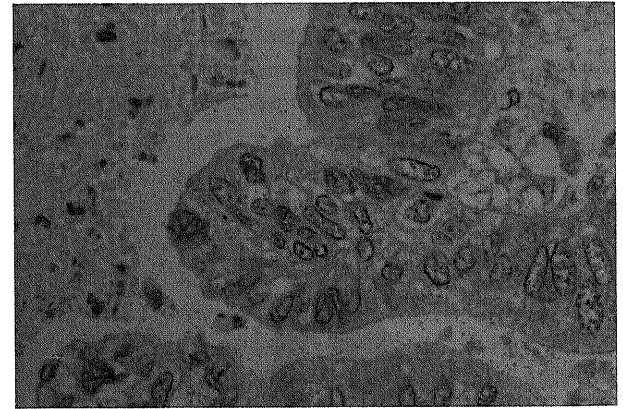
A



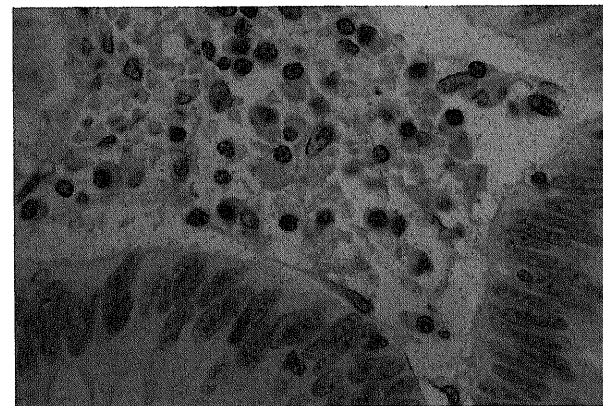
B



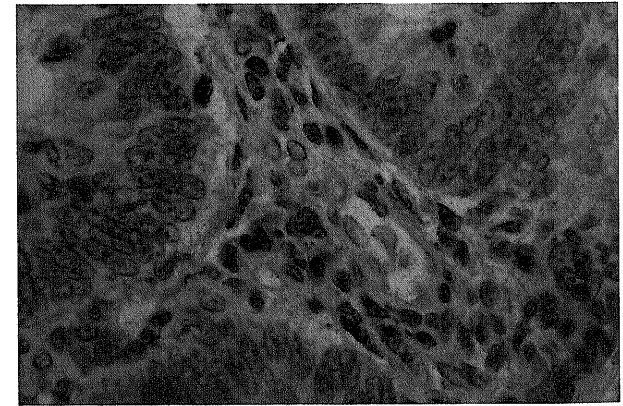
C



D



E



F

Fig. 2. Immunohistochemical staining of intramucosal carcinoma (A, C, and E) and submucosal invasive carcinoma (B, D, and F) with antibody to factor VIII (A and B), VEGF (C and D) and PD-ECGF (E and F). Vessel count in the submucosal invasive carcinoma (B) was higher than the intramucosal carcinoma (A). The submucosal invasive carcinoma (D) showed stronger positive staining for VEGF (3+) than did the intramucosal carcinoma (0; C). The submucosal invasive carcinoma (F) showed positive staining for PD-ECGF on infiltrating cells, whereas there was no PD-ECGF expression in the intramucosal carcinoma (E). (A) - (F) $\times 200$.

対象および方法

I. 実験対象

教室で摘除された大腸癌97例を大腸癌取り扱い規約²⁰⁾による分類法に準じ、深達度別に粘膜内 (intramucosal carcinomas) (m) 癌, 粘膜下層浸潤 (submucosal invasive carcinomas) (sm) 癌, 固有筋層浸潤 (muscularis propria invasive carcinomas) (mp) 癌とに分類した。その内訳はm癌35例, sm癌29例, mp癌33例である。そして大腸腺腫25例を加え、計122例を対象とした。このうちリンパ節転移陽性例をsm癌4例 (13.8%), mp癌5例 (27.3%) の計9例 (14.5%) に認めた。また、リンパ管侵襲 (lymphatic invasion, ly) と静脈侵襲 (venous invasion, v) についてはsm癌ではly陽性症例4例 (13.8%), v陽性症例3例 (10.3%), これに対しmp癌ではly陽性症例9例 (27.3%), v陽性症例4例 (12.1%) であった。大腸癌97例は下田ら²⁾の分類法に従いPGとNPGとに分類した。すなわち癌粘膜部の厚さが辺縁粘膜 (多くは過形成性粘膜) より明らかに丈が高いものをPGとし、癌の粘膜厚が辺縁過形成粘膜と同等かあるいは薄くなっているものをNPGとした (図1)。

II. 免疫組織化学

免疫染色は各症例について最も典型的なパラフィンブロックを用い、4μm厚に薄切連続切片を作製、HE染色の後、以下の抗体を用いて免疫染色を行った。

1. 抗第Ⅷ因子関連因子 (ファクターⅧ) を用いた免疫染色
脱パラフィンを施行した後、0.1%トリプシン溶液にてトリ

プシン処理し、0.3%過酸化水素水にて内因性ペルオキシダーゼを不活化させた後、10%正常ウマ血清 (normal horse serum, NHS) にてブロッキングをし、一次抗体としてモノクローナルネズミ抗ヒトフォンビルブランドファクター (DAKO, Glostrup, Denmark) を5% NHSで40倍に希釈して使用した (4℃, 一昼夜)。二次抗体はビオチン化抗ネズミIgG (Vector, Burlingame, USA) を10% NHSで200倍に希釈して使用 (室温30分)、ストレプトアビジン-ビオチン-ペルオキシダーゼ複合体はヒストファインSAB-PO(R) キット (ニチレイ, 東京) 付属のペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた (室温30分)。発色は0.05M トリス-塩酸バッファー (pH7.6), 過酸化水素水20μl と、3-3'-ダイアミノベンジジン (3-3'-diaminobenzidine) の溶液にて行った (室温5分)。核染色はマイヤーのヘマトキシリンを用いた。

2. 抗VEGF抗体を用いた免疫染色

上記方法と同様に脱パラフィン、トリプシン処理、内因性ペルオキシダーゼの不活化の後、10%正常ヤギ血清 (normal goat serum, NGS) にてブロッキング、ポリクローナルウサギIgG (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA) を5% NGSにて200倍希釈し、4℃で一昼夜インキュベーションした。二次抗体はヒストファインSAB-PO(R) キット (ニチレイ) 付属のビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG、酵素試薬は同様にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた。

3. 抗bFGF抗体を用いた免疫染色

脱パラフィン、トリプシン処理、内因性ペルオキシダーゼの不活化の後、10% NGSにてブロッキング、ポリクローナルウサギIgG (Sigma chemical, St.Louis, USA) を5% NGSにて200倍希釈し、4℃で一昼夜インキュベーションした。二次抗体はヒストファインSAB-PO(R) キット (ニチレイ) 付属のビオチン標識ヤギ抗ウサギIgG、酵素試薬は同様にペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを用いた。

4. 抗PD-ECGF抗体を用いた免疫染色²⁰⁾

脱パラフィン、トリプシン処理、内因性ペルオキシダーゼの不活化の後、0.1M クエン酸緩衝液 (pH 6) を用いてマイクロウェーブを施行した (5分×2回)。10% NHSにてブロッキング、1% スキムミルク含有リン酸緩衝食塩水 (phosphate-buffered saline) で室温にて30分インキュベーションし、モノクローナルマウス抗PD-ECGF抗体 (日本ロシユ社より供与) を5% NHSで1000倍希釈し、4℃で一昼夜インキュベーションした。二次

Table 1. Vessel count in adenomas, intramucosal carcinomas, submucosal invasive carcinomas, muscularis propria invasive carcinomas.

Disease	No. of cases	Vessel count (x̄ ± SD)
Adenomas	25	12.7 ± 6.7
m	35	11.8 ± 8.3
sm	29	35.0 ± 17.5
mp	33	35.2 ± 18.8

m, intramucosal colorectal carcinomas; sm, submucosal invasive colorectal carcinomas; mp, muscularis propria invasive colorectal carcinomas.

* P<0.05.

Table 2. Correlation between expression of VEGF, PD-ECGF, bFGF in human colorectal carcinomas and adenomas

Disease	No. of cases	Expression ^{a)} (x̄ ± SD) of		
		VEGF	PD-ECGF	bFGF
Adenoma	25	0.6 ± 0.4	0.9 ± 0.6	0.7 ± 0.6
m	35	0.9 ± 0.7	1.2 ± 0.8	0.8 ± 0.6
sm	29	1.7 ± 0.9	1.9 ± 0.9	1.1 ± 0.9
mp	33	1.8 ± 0.8	2.5 ± 0.9	1.0 ± 0.6

VEGF, vascular endothelial growth factor; PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; m, intramucosal colorectal carcinomas; sm, submucosal invasive colorectal carcinomas; mp, muscularis propria invasive colorectal carcinomas. ^{a)} Intensity of staining for VEGF, PD-ECGF and bFGF was graded on scale of 0-3+, with 0 representing no detectable stain and 3+ representing the strongest stain.

* P<0.001, **P<0.01.

抗体はビオチン化抗ネズミ IgG (Vector) を 10% NHS で 200 倍に希釈して使用し (室温 30 分), ベクタステイン ABC キット PK-6100 (Vector) のアビジン-ビオチン複合体で室温にて 30 分間インキュベーションした後, DAB にて発色し (5 分), 核洗, 脱水, 封入を行った。

Ⅲ. 免疫染色の評価

染色程度の評価は各切片における腫瘍先進部の最も濃染された部分を用いて行った。VEGF と bFGF の腫瘍細胞での染色強度は 0 から 3+ のスケールで等級化した。すなわち 0 は全く染色されないもの, 3+ は強染色されたもので, その間の 1+ は弱染色, 2+ は中等度染色である。癌細胞周囲の浸潤細胞での PD-ECGF の染色強度もまた同様に 0 から 3+ で表した。すなわち 0 は浸潤細胞に全く PD-ECGF 染色陽性細胞が無いもの, 1+ はわずかに陽性細胞の見られるもの, 2+ は中等度に陽性細胞が見られるもの, 3+ は浸潤細胞の多くが PD-ECGF 陽性となっている

ものである。

Ⅳ. VC の評価

VC は Weidner ら³⁰⁾の方法に準じ, 光学顕微鏡を用い, まず低倍率で腫瘍内の最も血管分布の高い部分を検索し, 次にその部位を 200 倍 (0.73 平方ミリメートル) で観察して 1 視野当たりの血管の数を測定する方法で行った。

Ⅴ. 統計分析

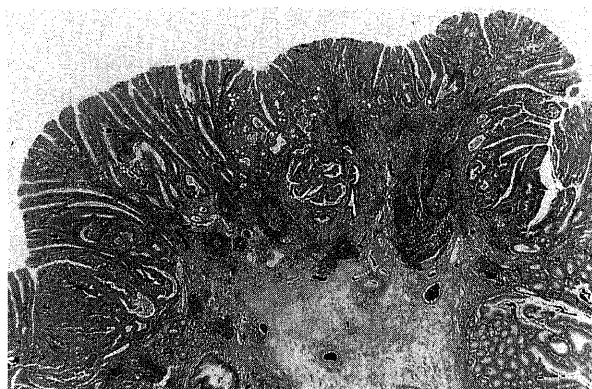
腫瘍の深達度別, 発育形態別による VC の平均値ならびに VEGF, bFGF, PD-ECGF の発現の平均値の比較は Student の t 検定を用いて行った。VC が 30 以上の症例について VEGF が 3+ と 2+ 以下の症例とで PD-ECGF の発現程度の比較を, 対応のある t 検定を用いて行った。VC と VEGF, bFGF, ならびに PD-ECGF の発現強度との相関関係はスピアマン順位相関計数検定によって行った。全ての統計解析について有意差のレベルは危険率 0.05 以下に設定した。これらの統計解析は全て統計用ソフト

Table 3. VEGF, bFGF and PD-ECGF expression, vessel count in non metastatic and metastatic tumors

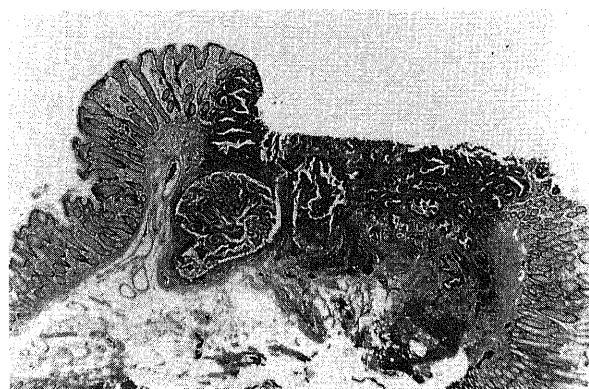
Type of permeation	No. of cases ^{a)}	Vessel count ($\bar{x} \pm SD$)	Expression ($\bar{x} \pm SD$) of			
			bFGF	VEGF	PD-ECGF	
Regional lymph node metastasis	+	9	46.6 ± 27.8	1.1 ± 0.6	2.6 ± 0.7	2.3 ± 0.9
	-	53	32.3 ± 19.1	0.9 ± 0.7	1.6 ± 0.8	2.1 ± 1.1
Lymphatic invasion	+	13	40.0 ± 15.8	0.9 ± 0.6	2.3 ± 0.8	2.3 ± 0.7
	-	49	33.3 ± 22.2	0.9 ± 0.7	1.8 ± 0.7	2.1 ± 0.9
Venous invasion	+	7	30.4 ± 14.8	0.8 ± 0.5	2.2 ± 0.9	2.2 ± 0.6
	-	55	33.9 ± 22.0	1.0 ± 0.7	1.7 ± 0.7	2.0 ± 0.8

VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor. ^{a)} submucosal invasive colorectal carcinomas (sm) and muscularis propria invasive colorectal carcinomas are included. +, positive; -, negative.

* P<0.05.



A



B

Fig. 3. Growth type of submucosal invasive colorectal carcinoma (H&E). (A) Polypoid growth type from intramucosal proliferation of carcinoma. (B) Non polypoid growth type without intramucosal protuberant growth. (A) (B) × 5.

トウエア, スタットビュー (Abacus Concept Inc, Cupertino, USA) を用いて行った。

成 績

I. 深達度別にみたVCの比較

腺腫, m癌, sm癌, mp癌それぞれのVCの平均値を比較した(表1)。VCは腺腫12.7±6.7, m癌11.8±8.3, sm癌35.0±17.5, mp癌35.2±18.8であり, m癌とsm癌の間に有意差を認め(P<0.05)。腺腫とm癌, sm癌とmp癌の間に有意差は認めなかった。図2(A, B)にm癌とsm癌のVCの比較における典型的な症例を提示した。提示症例のうちsm癌症例(B)では腫瘍内微小血管が数多くみられるが, m癌症例(A)ではほとんど観察されない。

II. 深達度別にみたVEGF, bFGF, PD-ECGF染色程度の比較

腫瘍細胞の細胞質でのVEGF発現はm癌0.9±0.7, sm癌1.7±0.9, mp癌1.8±0.8と, m癌とsm癌の間に有意差を認めた(P=0.0008)。一方, bFGF発現はm癌0.8±0.6, sm癌1.1±0.9, mp癌1.0±0.6と, 各深達度別に有意な差は見られなかった。PD-ECGFにおいては腫瘍細胞周囲の浸潤細胞でよく染まるものの腫瘍細胞自体は全く染色されなかった。この腫瘍細胞周囲の浸潤細胞からのPD-ECGF発現はm癌1.2±0.8, sm癌1.9±0.9, mp癌2.5±0.9とm癌とsm癌の間と, sm癌とmp癌との間で有意差が認められた(P=0.01, P=0.02)(表2)。図2(C~F)にm癌とsm癌のVEGF染色とPD-ECGF染色の典型例を提示した。VEGF染色において, ほとんど染色されないm癌症例(C)に対し, sm癌症例(D)は腫瘍細胞質がよく

染まっている。PD-ECGFにおいても同様に, 全く染色されないm癌症例(E)に対し, sm癌症例(F)は腫瘍細胞周囲の浸潤細胞がよく染色されている。

III. VCとVEGF, bFGFならびにPD-ECGFとの相関性

VCはVEGFおよびPD-ECGFと正の相関関係を持っていた(R=0.602, P=0.001, R=0.436, P=0.02)。しかしbFGFとVCとの間に相関は認めなかった。

IV. リンパ節転移, ly因子, v因子の有無によるVCならびにVEGF, bFGF, PD-ECGF発現強度の比較

リンパ節転移陽性症例と陰性症例においてVCとVEGF, bFGF, PD-ECGFの比較を行ったところ, VEGF発現はリンパ節転移陽性症例で有意に高い成績を示した(N+, 2.6±0.7; N-, 1.6±0.8, P<0.05)が, b-FGFとPD-ECGF発現では有意な差は認めなかった。VCにおいては転移陽性症例で高い傾向にあるものの有意差は認められなかった。また, ly因子, v因子はその有無においてVCとVEGF, bFGF, PD-ECGF発現程度に関連は見られなかった(表3)。

V. 大腸早期癌ならびに大腸mp癌の発育形態別にみたVCとVEGF, bFGFならびにPD-ECGF発現の比較(PG: NPG)

大腸早期癌(m癌, sm癌)とmp癌のVCをPGとNPGに分類(図3, 表4)して比較すると, PG 17.5±13.8, NPG 42.6±23.8(P<0.0001)と, NPGの症例はPGの症例に比べ有意に高い成績が得られた。次に血管新生因子の発現を比較すると, VEGFの発現はPG 1.2±0.8, NPG 2.0±0.9(P=0.0003), PD-ECGFの発現はPG 1.6±1.0, NPG 2.2±0.9(P<0.0001)と, 両者共にNPGで有意に高い成績が得られた。しかしbFGFの発現では発

Table 4. VEGF, bFGF and PD-ECGF expression and vessel count in PG and NPG colorectal carcinomas

Disease	No. of cases	Vessel count (x̄ ± SD)	Expression ^{adj} (x̄ ± SD) of		
			VEGF	bFGF	PD-ECGF
PG	63	17.5±13.8	1.2±0.8	1.0±0.5	1.6±1.0
NPG	34	42.6±23.8	2.0±0.9	0.9±0.5	2.2±0.9

VEGF, vascular endothelial growth factor; bFGF, basic fibroblast growth factor; PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor; PG, polypoid growth type; NPG, non polypoid growth type.
* P<0.0001, **P<0.001.

Table 5. PD-ECGF expression in infiltrating cells in the patients with high vessel count*

VEGF staining intensity	No. of cases	No. of cases showing different intensity of PD-ECGF in infiltrating cells				x̄ ± SD
		Negative	1+	2+	3+	
≤2+	39	1	2	10	26	2.5±0.5
3+	21	1	6	6	8	1.6±0.9

PD-ECGF, platelet-derived endothelial cell growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; 1+, slightly positive; 2+, weakly positive; 3+, strongly positive.
* vessel count ≥30 per high power field. ** P<0.05.

育形態別に有意な差は認められなかった。

VI. VCが高い大腸癌症例 (VC \geq 30) における VEGF 発現強度別にみた PD-ECGF 発現程度の比較

VCが30以上の大腸癌症例において VEGFの発現が3+のものに2+以下のものと分けて PD-ECGF 発現程度の比較を行った。その結果 VEGF 発現が2+以下の症例の PD-ECGF 発現が 2.5 ± 0.5 , VEGF 発現が3+の症例では 1.6 ± 0.9 と、VEGF 発現が2+以下の症例で PD-ECGF 発現が有意に高い成績を示した(表5)。

考 察

腫瘍は血管新生によって構築された新生血管網を利用して、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。このことは腫瘍の増殖と転移とが血管新生に依存していることを意味するとともに、腫瘍血管新生の機序を解明しその制御法の確立が癌治療成績の向上をもたらすものと考えられる。

血管新生とは、既存の血管から新しい血管が形成される組織反応である。近年、予後との関係の研究が進められ、乳癌組織の VC と予後とのあいだに明らかな関係のあることが報告された¹⁹。また、他臓器癌においても VC は進行度、リンパ節転移、遠隔転移のあるもので高値を示し、腫瘍の VC は再燃や生存率の子後因子とされ診断的価値が高いと報告されている¹⁰⁻²⁰。この血管新生の過程については次のようなものである。まず血管内皮細胞の周囲にある基底膜をマトリックスメタロプロテアーゼ (matrix metalloproteinase) により分解し、次いで外に遊走し、これらが増殖し、そこで管腔形成に至る。これらの過程が繰り返されることにより多数の新しい血管が網目の様に作られていき、標的細胞への酸素や栄養の移送が豊富になっていく。血管新生を誘導する因子として、bFGF や VEGF など約 20 種類の生体内物質がこれまでに報告されている^{11,12}。これらは、癌細胞自体が転移能や血管新生能と相関して発現分泌している場合と、癌細胞により刺激を受けた肥満細胞やマクロファージなどが産生する場合がある。また基底膜に貯蔵されていた血管新生因子が癌細胞による基底膜の分解によって放出される場合もある。これらの血管新生因子のなかで VEGF は血管内皮細胞特異的、かつ血管新生のすべての過程に関与する強力な内皮増殖因子である。また、ヒスタミンの 50,000 倍の血管透過性を持ち、内皮細胞や腫瘍細胞の増殖の基質となるフィブリンを間質に析出させる³¹。VEGF には 4 つの構造異型があり³²⁻³⁶、VEGF₁₂₁、VEGF₁₆₅ が主に腫瘍細胞から分泌される。VEGF₁₂₁ はヘパリン結合能のない酸性ポリペプチドであり、遊離蛋白として存在する³⁷。VEGF₁₆₅ はヘパリン結合能を有する塩基性ポリペプチドであるが、VEGF₁₈₉、VEGF₂₀₆ よりもその作用は弱い³⁸。VEGF の血管特異性を担うものはその受容体の発現で、VEGF 受容体は血管内皮細胞に特異的に発現している。VEGF はこれらの受容体と結合してその作用を発揮する。また抗 VEGF 抗体により腫瘍の増殖阻害も見られる³⁹⁻⁴¹。Maeda ら⁴² は胃癌において VEGF の発現と VC が相関することをつきとめ、また、リンパ節転移ならびに肝転移と VEGF 発現の相関関係を示すとともに VEGF が胃癌における重要な予後因子であることを証明した。Takahashi ら^{24,43} は大腸癌、胃痛 (intestinal type) では VEGF-Flk-1/ KDR 系が腫瘍の進展に重要であることを示している。また、Kang ら⁴⁴ は大腸癌における VEGF 発現と微小血管密

度との相関関係を示すとともに、VEGF 発現と血行性転移が正の相関関係をもっていることを証明した。今回の筆者の研究において VEGF の発現はリンパ節転移と相関を示したが、リンパ管侵襲ならびに脈管侵襲とは相関関係は見出せなかった。なお、対象症例を m, sm, ならびに mp の一部 (比較的小型で、かつ粘膜内病変部の保たれているもの) に絞ったため血行性転移症例は含まれなかった。他臓器癌においては乳癌^{45,46}、卵巣癌⁴⁷、皮膚癌⁴⁸、頭頸部癌⁴⁹、腎癌⁵⁰、食道癌⁵¹ などにおいて腫瘍内 VEGF 発現と腫瘍の増殖、転移とは深くむすびついていると言われている。また、bFGF は増殖因子としては最も古典的なもののひとつで、その試験管内、生体内の実験系における顕著な血管新生作用も早くから指摘されていた⁵²。免疫組織化学的検索によると、この bFGF は多くの臓器の血管および上皮の基底膜に集中して分布しており、いくつかの癌細胞株の培養上清中および細胞外マトリックスにも FGF 蛋白質が存在している⁵³。また、血管新生の見られない組織も含めほとんどの組織において産生され、血管に乏しい軟骨にも大量に存在することもわかっている。一方 PD-ECGF は核酸代謝に関与する血管新生酵素であり⁵⁴⁻⁵⁶、その機序の 1 つとしてチミジンの代謝産物である 2-デオキシ-D-リボースが血管新生作用を発揮すると考えられている。PD-ECGF は微小血管内皮細胞の増殖促進作用は無いが、ケモタキシスを誘導する。さらに、血管新生部位に集簇するマスト細胞のケモカインネーシスやヒスタミン遊離を促進し、血管透過性にも関与し⁵⁷、血管新生に有利な環境を作り出すと思われる。注目されるのは、これがチミジンフォスホリラーゼ (thymidine phosphorylase, TP) という酵素と同一蛋白質であることが明らかになったことである⁵⁸。TP はポリリジンヌクレオチド代謝に関係する酵素であり、PD-ECGF としての血管新生のためにはこの TP の酵素活性が必要であるとされている。また、PD-ECGF は種々の固形癌に存在することが知られており、血管新生の観点から非常に興味深い因子と考えられている。そしてこの PD-ECGF は腫瘍周囲の間質細胞、特にマクロファージから多く産生され、これが補足的に大腸癌の血管新生に関与していると言われている²⁵。免疫組織化学による PD-ECGF の発現は乳癌においては主に腫瘍細胞に認められる。しかし大腸癌においては腫瘍細胞はほとんど染色されないとする報告もあり²⁶。実際、筆者の今回の実験においても腫瘍細胞の染色は全くみられなかった。

このように大腸癌の増殖や転移と血管新生、特に癌細胞からの VEGF の発現と、浸潤細胞からの PD-ECGF の発現は深い関わりがあることが解明されているが、それでは大腸早期癌において、より悪性度の高い癌、すなわち進行癌に移行しやすい癌の臨床病理学的特徴を血管新生の観点から推測することができないだろうか。そこで筆者は大腸早期癌の血管新生の意義を探るべく、深達度や発育形態別 (PG と NPG) にみた血管新生の差異の有無について検討し、大腸癌の発育過程に血管新生がどの様に絡み合っているかについて考察した。

Muto ら⁵⁹ の報告以来、ほとんどの大腸癌は腺腫から発生するという腺腫-癌腫連鎖説が広く受け入れられてきたが、近年大腸内視鏡の発達により腺腫成分を伴わない小さな大腸癌が発見されるようになり、新規発生説も有力視されるようになってきた。Shimoda ら⁶ は粘膜内癌成分の隆起性発育の有無により PG と NPG の 2 つの発育形態に分類し解析することで、大腸癌の新規発生説を支持した。そして NPG 癌は表面型由来の癌で、

小さいうちからsmに浸潤しやすく、進行癌の初期病変として重要であると報告している。

大腸腫瘍とその発育・進展についてはこのほかにも多施設で研究が盛んに行われている。工藤ら⁶⁰⁾の表面陥凹型病変の業績、微小病変の病理組織学的な研究⁶⁰⁾、分子生物学的な研究、注腸二重造影の逆経過追跡例による検討^{60)~62)}などである。また、Tanakaら⁶³⁾は大腸sm癌を発育形態別(PG, NPG)、組織型別に分類し、リンパ節転移の有無を検討した。このなかで発育形態的にはNPG、組織型では中～低分化型癌にリンパ節転移が多く認められた。しかしこの分類法はあくまでその粘膜面の発育形態が温存された症例に限って適応されるべきものであるとしている。すなわち早期癌および粘膜病変の保たれた小型mp癌に限るとのことである。松井ら⁶⁴⁾は隆起型、表面隆起型と表面陥凹型において深達度がmからmpまでの症例では隆起型と表面隆起型はPG発育し、表面陥凹型癌はNPG発育することを確かめ、更にss以深に浸潤した癌においては粘膜病変部が崩壊してしまうために初発病変の推定は困難となるとしている。

今回筆者は大腸癌97例(m癌35例, sm癌29例, mp癌33例)を下田ら³⁾の分類法に従いPGとNPGに分類し、VCとVEGF, PD-ECGF, bFGF発現程度をPG, NPG間で比較した。その結果、大腸早期癌において新規発育として注目されているNPG癌で、m癌, sm癌, mp癌のいずれの癌においても血管新生が亢進していたことから新規癌の特徴のひとつとされる、より速い進行癌への移行に血管新生が関与している可能性が強く示唆された。また筆者は大腸早期癌の血管新生を深達度別に比較し考察した。その結果、大腸早期癌における血管新生の意義として、m癌からsm癌への移行時に必要性が高いものと考えられた。すなわち大腸早期癌においても進行癌と同様に、血管新生が重要な役割を担うとともに、この血管新生を制御する血管新生因子としてVEGFが有力な候補であることが判明した。またPD-ECGFについてもVEGFと同様に大腸早期癌における重要な血管新生因子のひとつであることが証明されたが、VEGF発現との間に相関性は見られなかった。更に筆者の実験ではPD-ECGFの癌細胞からの発現は全く見られなかった。そしてVCの高い症例を、VEGFの発現が低いものと高いものに分けて検討したところ、VEGFが低いものでPD-ECGFの発現が有意に高い傾向が認められた。すなわちVCが高いのにVEGFが低い症例では、PD-ECGFが大腸癌の血管新生を制御している、換言すればVEGFをPD-ECGFが補足する様に働いている可能性が示唆された。一方、Takebayashiら⁶⁵⁾は大腸癌細胞の42.9%までがPD-ECGF陽性であったと報告している。またPD-ECGFとVEGFの発現が相関するというものも少なからず存在する。このような矛盾が生じる原因は未だ解明されていないが、これから十分に検討され、論議されるべき問題である。

筆者は大腸早期癌の血管新生とリンパ節転移ならびに脈管侵襲との関係についても検討を加えた。大腸癌においては血管新生がリンパ管新生にも関与するとされ、VCとリンパ節転移の相関関係を示した研究も多いが²³⁾²⁴⁾、筆者の実験においてもVEGF発現とリンパ節転移のあいだに有意な相関が認められ、リンパ節転移陽性症例でVCが高い傾向にあった。しかし、血管新生とリンパ管侵襲や静脈侵襲とのあいだに相関関係は認められなかった。

今回の研究で筆者は大腸早期癌と血管新生との関わり合いを深達度別、発育形態別に検討した。その結果、大腸早期癌の悪

性を判定するうえで、さらに予後を推測するにおいても血管新生と種々の血管新生因子の検索はよい判定材料のひとつと考えられた。すなわち進行度が速いとされる新規発育を呈するNPGで血管新生が亢進していたことから、悪性度判定上、また予後因子として血管新生が重要であることが確認された。またm癌とsm癌との間で血管新生に大きな開きがあったということは大いに興味深いものであった。すなわち、現在の大腸癌における内視鏡的切除術の適応が壁深達度がmにとどまるものという条件を血管新生の面から裏付けるものであった。これらの結果をふまえた大腸早期癌の注意深い観察は、大腸早期癌の治療法選択の一助になるとともに、切除後の定期的な術後検索を行ううえでもその選択上重要な因子のひとつになるものと考えられた。

結 論

大腸早期癌における血管新生の意義を探るべく、VEGF, bFGF, PD-ECGFの免疫染色を行い、その染色程度を深達度別、発育形態別に比較検討し、大腸癌の発育過程に血管新生がどのように関わっているかについて検討を行った結果以下の成績を得た。

1. 大腸癌の深達度別にVC, VEGF, bFGFならびにPD-ECGFの免疫染色の比較を行った結果、VC, VEGFならびにPD-ECGFの発現においてm癌とsm癌のあいだで有意な差が認められたことから、大腸早期癌における血管新生の意義として、m癌からsm癌への移行時に必要性が高いものと考えられた。

2. 大腸早期癌の発育形態別にVC, VEGF, bFGFならびにPD-ECGF発現の比較を行った結果、VC, VEGF, ならびにPD-ECGF発現において新規発育として注目されているNPGで血管新生が亢進していたことから、新規癌の特徴のひとつとされるより速い進行癌への移行に血管新生が関与している可能性が強く示唆された。

以上の結果から、大腸早期癌においても進行癌と同様にその発育進展に血管新生が重要な役割を担うとともに、この血管新生を制御する血管新生因子としてVEGFとPD-ECGFが有力な候補であることが判明した。

謝 辞

本稿を終えるにあたり、終始御指導と御校閲を戴いた恩師伊正義教授に深甚の謝意を表します。また本研究の遂行に際し、直接御指導戴いた金沢大学がん研究所外科部高橋豊助教授に深謝致します。病理学的所見に関して御協力を戴いた金沢大学医学部病理学第一教室川嶋篤弘博士に感謝致します。さらに、本研究に御協力戴いた当教室員各位に感謝の意を表するとともに、病理標本作製に協力を惜しまれなかった清水敦子技官、横村律子氏に感謝致します。

文 献

- 1) Jelinek G, Nava HR, Nime F. Small primary *de novo* adenocarcinoma of the colon with mesenteric lymphatic metastasis. J Surg Oncol 23: 185-188, 1983
- 2) 下田忠和, 池上雅博. 早期大腸癌の病理学的検討. 胃と腸 22: 967-975, 1987
- 3) Herrera L, Hanna S, Castillo N, Petrelli NJ. Primary *de novo* adenocarcinoma of the colon measuring 8mm in diameter with lymph node metastasis. Dis Colon Rectum 34: 275-279, 1991
- 4) Tada S, Yao T, Iida M, Hizawa K, Fujishima M. A

clinicopathologic study of small flat colorectal carcinoma. *Cancer* 74: 2430-2435, 1994

- 5) Ikegami M. A pathological study on colorectal cancer. *Acta Pathol Jpn* 37: 21-37, 1987
- 6) Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J. Early colorectal carcinoma with special reference to its development *de novo*. *Cancer* 64: 1138-1146, 1989
- 7) 工藤進英, 林 俊一, 三浦宏二. 平坦陥凹型早期癌の内視鏡診断と治療. *胃と腸* 20: 317-330, 1989
- 8) 中村恭一, 大倉康男. *de novo* 癌—大腸癌の発生母地は腺腫か? 大腸粘膜か? 早期大腸癌—発生から診断・治療まで. 医学書院: 155-182, 1993
- 9) 岡 譽子. 遺伝子異常からみた大腸癌のメインルート. *消化器癌* 4: 115-119, 1995
- 10) 中村恭一, 渋谷 進, 西沢 護. 大腸癌の組織発生とその早期における発育過程. *胃と腸* 20: 877-888, 1985
- 11) Folkman J, Klagsburn M. Angiogenic factors. *Science* 235: 442-447, 1987
- 12) Sifacca K. Angiogenesis in malignancy. *Future Oncol* 1: 185-199, 1995
- 13) Weidner N, Semple J P, Welch W R, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis : correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 14) Weidner N, Carroll PR, Flax J, Bulmenfeld W, Folkman J. Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma. *Am J Pathol* 143: 401-409, 1993
- 15) Graham CH, Rivers J, Kervel RS, Stankiewicz KS, White WL. Extent of vascularization as a prognostic indicator in thin (<0.76mm) malignant melanomas. *Am J Pathol* 145: 510-514, 1994
- 16) Smith MKK, Weidner N. Demonstration and characterization of the angiogenic properties of cervical neoplasia. *Cancer Res* 54: 800-804, 1994
- 17) Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletty CA. Relation of neovascularization to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 340: 145-146, 1992
- 18) Strieter RM, Polverini PJ, Arenberg DA, Walz A, Opendakker G, Van DJ, Kunkel SL. Role of C-X-C chemokines as regulators of angiogenesis in lung cancer. *J Leukoc Biol* 57: 752-762, 1995
- 19) Tanigawa N, Matsumura M, Amaya H, Kitaoka A, Shimomatsuya t, Lu C, Muraoka R, Tanaka T. Tumor vascularity correlates with prognosis of patients with esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 79: 220-225, 1997
- 20) Tannigawa N, Amaya H, Matsumura M, Shimomatsuya T, Horiuchi T, Muraoka R, Ike M. Extent of tumor vascularization correlates with prognosis and hematogenous metastasis in gastric carcinomas. *Cancer Res* 56: 2671-2676, 1996
- 21) Frank RE, Saclarides TJ, Leurgans S, Speziale NJ, Drab EA, Rubin DB. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence and survival in patients with node-negative colon cancer. *Ann Surg* 222: 695-699, 1995
- 22) Saclarides TJ. Angiogenesis in colorectal cancer. *Surg Clin North Am* 77: 253-260, 1997

- 23) Tanigawa N, Amaya H, Matsumura M, Lu C, Kitaoka A, Matsuyama K, Muraola R. Tumor angiogenesis and mode of metastasis in patients with colorectal cancer. *Cancer Res* 57: 1043-1046, 1997
- 24) Takahashi Y, Kitadai Y, Bucana CD, Cleary KR, Ellis LM. 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
- 25) Takahashi Y, Bucana CD, Liu BW, Yoneda J, Kitadai Y, Cleary KR, Ellis LM. Platelet-derived endothelial cell growth factor in human colon cancer angiogenesis: Role of infiltrating cells. *J Natl Cancer Inst* 88: 1146-1151, 1996
- 26) Warren RS, Yuan H, Malti MR, Gillet NA, Ferrara N. 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
- 27) Folkman J. How is blood vessel growth regulated in normal and neoplastic tissue? G. H. A Clowes Memorial Lecture. *Cancer Res* 46: 467-473, 1986
- 28) 大腸癌研究会編. 大腸癌取り扱い規約 改訂第5版: 6-10, 1994
- 29) Nishida M, Hino A, Mori K, Matsumoto T, Yoshikubo T, Ishikawa H. Preparation of anti-human thymidine phosphorylase monoclonal antibody useful for detecting the enzyme levels in tissues. *Biol Pharm Bull* 19: 1407-1411, 1996
- 30) Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J. Tumor angiogenesis and metastasis correlation in invasive breast carcinoma. *N Engl J Med* 324: 1-8, 1991
- 31) Dvorak HR, Brown LF, Detmar M. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am J Pathol* 146: 1029-1039, 1995
- 32) Leung DW, Cachianes G, Kugang WJ. Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* 246: 1306-1309, 1989
- 33) Keck PJ, Hauser SD, Krivi G. Vascular permeability factor, and endothelial cell mitogen related to platelet derived growth factor. *Science* 246: 1309-1312, 1989
- 34) Tisher E, Mitchell R, Hartmann, T. The human gene for vascular endothelial growth factor. *J Biol Chem* 266: 11947-11954, 1991
- 35) Houck KA, Ferrara N, Winer J. The vascular endothelial growth factor family : Identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol Endocrinol* 5: 1806-1814, 1991
- 36) Ferrara N, Houch KA, Jakeman LB, Leung DW. Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr Rev* 13: 18-32, 1992
- 37) Houck KA, Leung DW, Rowland AM. Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genesis and peoteolytic mechanisms. *J Biol Chem* 267: 26031-26037, 1992
- 38) Park JE, Keller GA, Ferrara N. The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms. Differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of ECM-bound

- VEGF. *Mol Biol Cell* 4: 1317-1326, 1993
- 39) Kim KJ, Li B, Winer J, Armanini M, Gillet N, Ferrara N. Inhibition of vascular endothelial growth factor induced angiogenesis suppresses tumor growth in vivo. *Nature* 362: 841-844, 1993
- 40) Ferrara N. The role of vascular endothelial growth factor in pathological angiogenesis. *Breast Cancer Res Treat* 36: 127-137, 1995
- 41) Asano M, Yukita A, Matsumoto T, Kondo S, Suzuki H. Inhibition of tumor growth and metastasis by an immunoneutralizing monoclonal antibody to human vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor 121. *Cancer Res* 55: 5296-5301, 1995
- 42) Maeda K, Chung YS, Ogawa Y, Takatsuka S, Kang SM, Ogawa T, Sowa M. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* 77: 858-863, 1995
- 43) Takahashi Y, Cleary KR, Mai M, Kitadai Y, Bucana CD, Ellis LM. Significance of vessel count, vascular endothelial growth factor, and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. *Clinic Cancer Res* 2: 1679-1684, 1996
- 44) Kang SM, Maeda K, Chung YS. Vascular endothelial growth factor expression correlates with hematogenous metastasis and prognosis in colorectal carcinoma. *Oncol Report* 4: 381-384, 1997
- 45) Toi M, Inada K, Suzuki H, Tominaga T. Tumor angiogenesis in breast cancer: Its importance as a prognostic indicator and the association with vascular endothelial growth factor expression. *Breast Cancer Res Treat* 36: 193-204, 1995
- 46) Relf M, Lejeune S, Scott PA, Fox S, Smith K, Leek R, Moghaddam A, Whitehouse R, Bicknell R, Harris AL. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor beta-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotropin in human primary breast cancer and its relation to angiogenesis. *Cancer Res* 57: 963-969, 1997
- 47) 石井康徳. ヒト卵巣腫瘍ならびに類腫瘍病変における血管内皮増殖因子 (VEGF) の発現とそのサブタイプの発現様式およびその受様体について. *日本産科婦人科学会雑誌* 47: 133-140, 1995
- 48) Kevin PC, Lawrence FB, Luice FDA, Kathi T, Kiang TY, Eleanor JM, Harold FD. Expression of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor by melanoma cells increases tumor growth, angiogenesis, and experimental metastasis. *Cancer Res* 56: 172-181, 1996
- 49) Takano S, Yoshii Y, Kondo S, Suzuki H, Maruno T, Shirai S, Nose T. Concentration of vascular endothelial growth factor in serum and tumor tissue of brain tumor patients. *Cancer Res* 56: 2185-2190, 1996
- 50) Nicol D, Hii SI, Walsh M, Teh B, Thompson L, Kennett C, Gotley D. Vascular endothelial growth factor expression is increased in renal cell carcinoma. *J Urol (Paris)* 157: 1482-1486, 1997
- 51) Inoue K, Ozeki Y, Suganuma T, Sugiura Y, Tanaka S. Vascular endothelial growth factor expression in primary esophageal squamous cell carcinoma. Association with angiogenesis and tumor progression. *Cancer* 79: 206-213, 1997
- 52) Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L. Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 7297-7301, 1986
- 53) 吉田輝彦. 血管新生と FGF ファミリー. *実験医学* 12: 997-1003, 1994
- 54) Ishikawa F, Miyazono K, Hellman U, Drexler H, wernstedt C, Hagiwara K, Usuki K, Takaku F, Risau W, Heldin CH. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338: 557-562, 1989
- 55) Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S, Fukui K, Ishihkawa M, Yamada Y. Angiogenic factor. *Nature* 356: 668 1992
- 56) Moghaddam A, Zhang HT, Fan TP, Hu DE, Lees VC, Turley H, Fox SB, Gatter KC, Harris AL, Bicknell R. Thymidine phosphorylase is angiogenic and promotes tumor growth. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 998-1002, 1995
- 57) Gruber BL, Marchese MJ, Kew R. Angiogenic factors stimulate mast-cell migration. *Blood* 86: 2488-2493, 1995
- 58) Miyadera K, Sumizawa T, Haraguchi M. Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* 55: 1687-1690, 1995
- 59) Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evaluation of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 36: 2251-2270, 1975
- 60) 工藤進英, 武藤輝一. 大腸 IIc 型早期癌の検討. *Gastroenterol Endosc* 28: 2811-2813, 1994
- 61) 工藤進英. 早期大腸癌—平坦・陥凹型へのアプローチ. 医学書院: 1993
- 62) 下田忠和, 池上雅博, 田中知行. 表面型大腸上皮性腫瘍の肉眼分類とその病理学的問題—特に微小癌について. *胃と腸* 29: 19-26, 1994
- 63) 和田了, 大谷花世, 須田耕一. 大腸癌の組織発生と進展—微小癌から進行癌へ. *大腸肛門誌* 46: 259-264, 1993
- 64) Spratt JS Jr, Ackerman LV. The growth of colonic carcinoma. *Am Surg* 27: 23-28, 1961
- 65) 松井敏幸, 八尾建史, 竹中国明. 表面型大腸癌の発育進展—X線学的検討. *胃と腸* 30: 191-206, 1995
- 66) 牛尾恭輔, 石川勉, 宮川国久. X線像による表面型大腸腫瘍の発育進展. *胃と腸* 30: 179-189, 1995
- 67) Tanaka S, Haruma K, Teixeira CR, Tatsuta S, Ohtsu N, Hiraga Y, Yoshihara M, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F. Endoscopic treatment of submucosal invasive colorectal carcinoma with special reference to risk factors for lymph node metastasis. *J Gastroenterol* 30: 710-717, 1995
- 68) Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T. Clinico-pathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* 88: 1110-1117, 1996

Expression of Vascular Endothelial Growth Factor and Platelet-Derived Endothelial Cell Growth Factor in Human Early Colorectal Carcinomas among Different Growth Types and Depths of Invasion Masayuki Mizoguchi, Department of Surgery, Cancer Research Institute, Kanazawa University, Kanazawa 920 - J. Juzen Med Soc., **106**, 666 - 676 (1997)

Key words early colorectal carcinomas, angiogenesis, vascular endothelial growth factor, platelet-derived endothelial cell growth factor

Abstract

This study was performed to determine whether different growth types and depths of invasion of colorectal carcinoma types are related to different staining intensity of some angiogenic factors in these tumors. Immunohistochemical analysis using antibodies against vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF), platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), and factor VIII were carried out on archival specimens of 96 human colorectal carcinomas (35 intramucosal carcinomas, 29 submucosal invasive carcinomas, 33 muscularis propria invasive carcinomas) and 25 adenomas. Vessels were quantitated by light microscopy ($\times 200$), and the intensity of staining for VEGF, bFGF, and PD-ECGF were assessed on a scale of 0-3+. Histologically, the cases of carcinomas were divided into two types; polypoid growth type (PG) from intramucosal proliferation of carcinoma, and non polypoid growth type (NPG) without intramucosal protuberant growth. VEGF and bFGF were expressed in tumor epithelium. On the contrast, PD-ECGF was expressed in infiltrating cells in all of the colon carcinoma specimens. The results indicate that the mean vessel count, intensity of VEGF and PD-ECGF staining were not significantly greater in patients with intramucosal carcinomas than in those with adenomas. The same result revealed that the mean vessel count, intensity of VEGF and PD-ECGF staining between submucosal invasive carcinomas and muscularis propria invasive carcinomas. PD-ECGF staining as significantly greater in patients with muscularis propria invasive carcinomas than in patients with submucosal invasive carcinomas. However, the mean vessel count, intensity of VEGF and PD-ECGF staining were significantly greater in patients with submucosal invasive carcinomas than in patients with intramucosal carcinomas. Vessel count, intensity of VEGF and PD-ECGF staining were greater in NPG carcinomas than in PG carcinomas. The mean vessel count was not significantly greater in patients with node positive colorectal carcinomas than in those with node negative colorectal carcinomas. In contrast, a correlation was noted between VEGF expression and regional lymph node metastasis. But the lymphatic invasion and the venous invasion was not correlated with the mean vessel count, intensity of VEGF, bFGF and PD-ECGF staining. These results suggest that the proliferation of microvessels and these angiogenic factors are necessary at the time of submucosal invasion. Furthermore, these findings support the hypothesis that NPG early colorectal carcinomas progress to advanced carcinomas more easily than PG early colorectal carcinomas.