

Integrin Distributions in Gastric Carcinoma and its Significance

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/2297/8440

胃癌におけるインテグリンの分布とその意義

金沢大学医学部病理学第一講座 (主任: 中西功夫教授)

浅田 康行

(平成5年3月3日受付)

本研究は、胃癌の浸潤・進展に伴って、細胞接着分子であるインテグリンの発現がどのように変化し、主要リガンドであるⅣ型コラーゲン、ラミニン、フィブロネクチンの沈着や臨床病理学的諸因子とどのように関連するかを検討したものである。Periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP) 固定胃癌組織34例、メタカルン固定10例について、細胞増殖能を増殖細胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) の陽性率で評価し、基底膜成分の沈着状態をⅣ型コラーゲン、ラミニン、ヘパラン硫酸プロテオグリカン、フィブロネクチン免疫染色で、同時に代表的なインテグリン3種類の $\alpha_5\beta_1$ (フィブロネクチンレセプター, fibronectin receptor, FNR), α_6 (ラミニンレセプターサブユニット, laminin receptor subunit, LMRS), $\alpha_v\beta_3$ (ヴィトロネクチンレセプター, vitronectin receptor, VNR) を銀増感法を加えた免疫染色で染め出し、比較検討し、推計学的な処理を行った。その結果、FNR の発現はフィブロネクチン陽性症例に、LMRS はラミニンの沈着陽性症例に認められた。VNR については、VNR 陽性胃癌は陰性のそれに比べ細胞増殖能が高く ($p < 0.05$)、乳頭腺癌では陰性、中分化型管状腺癌では陽性の傾向を示し、とくにVNR は大きい細胞集団に比べて小さい個々ばらばらな細胞集団に発現していた ($p < 0.05$)。FNR はリンパ節への広汎な転移を示した症例では陽性を示したが ($p < 0.05$)、組織型との間には特に関連はなかった。LMRS は中分化型管状腺癌で陽性分布を示したが他の因子との間には一定の傾向は認められなかった。小型細胞集団では間質増生が伴われていたが、インテグリンの分布と間質増生群の胃癌との間には特定の関連は認められなかった。従って、胃癌の特性をインテグリンの発現という面からみると、VNR の発現が小型細胞集団に陽性で、おそらく局所の浸潤性に関連していること、および FNR は間質への足場を確保して定着し、広汎にリンパ節へ進展した進行癌に発現しやすいことを示唆している。

Key words integrin, gastric carcinoma, basement membrane, cell proliferative rate, immunohistochemistry

胃癌は大腸癌と同様に癌遺伝子と癌抑制遺伝子の異常が共同的に働き、多段階を経て発生することが知られるようになった¹⁾。しかし、癌細胞の最も重要な形質は浸潤・転移能を有することである。癌細胞のこのような形質には、細胞接着能、間質分解酵素活性、細胞移動能および細胞増殖活性など多数の因子が複雑に発現されているものと推定されている^{2,3)}。このうち癌細胞の浸潤、転移に関与する接着分子群については、細胞同志の接着にかかわる E-カドヘリンの減少⁴⁻⁶⁾とか、基質蛋白との接着にかかわる細胞側レセプターであるインテグリンの種類と発現が、癌細胞の浸潤に連動して変化すること⁷⁻¹⁰⁾などが報告されている。

インテグリンは、1987年 Hynes によって、フィブロネクチンレセプターに類似している α 鎖と β 鎖から成る膜貫通性細胞表面レセプターを総称して命名されたものである¹¹⁾。現在、少なくとも14種類の α 鎖、8種類の β 鎖が知られている¹²⁾。また、その機能より β 鎖に注目して、 β_1 群 (very late activation antigen, VLA 群)、 β_2 群 (leucocyte adhesion, 白血球接着群)、 β_3 群 (cytoadhesion, 細胞接着群) およびその他の群に亜分類されている¹³⁾。このうち悪性形質と関連するインテグリンについ

ては、主に培養細胞を用いた解析が進められている。たとえば、フィブロネクチンレセプター (fibronectin receptor, FNR) の $\alpha_5\beta_1$ インテグリンは腫瘍化に伴ってその発現が減少消失すること⁷⁾、ラミニンレセプター (laminin receptor, LMR) はメラノーマ細胞の転移巣でその発現が増加すること¹³⁾、ヴィトロネクチンレセプター (vitronectin receptor, VNR) である $\alpha_v\beta_3$ インテグリンは浸潤・転移能の高いメラノーマ細胞で強く発現すること¹⁴⁾などが指摘・報告されている。一方、これらインテグリンの主要リガンドである基質蛋白 (細胞外マトリックス蛋白) からみると、悪性化や腫瘍化に伴ってフィブロネクチン (fibronectin, FN) の減少、主にⅣ型コラーゲン (type Ⅳ collagen, ⅣC)、ラミニン (laminin, LM)、ヘパラン硫酸プロテオグリカン (heparan sulfate proteoglycan, HSPG) より成る基底膜の断裂¹⁵⁻¹⁷⁾など、腫瘍細胞周囲に分布する基底膜領域の接着蛋白はインテグリンと連動して変化していると言われている。おそらく、生体内では、癌細胞は多くの接着分子の発現・消失とそのリガンドである基質蛋白の沈着・分散化と連動しながら、巧みに細胞接着機構を利用し使い分けて、浸潤・転移という悪性態度を示しているようにみえる。一方、胃癌の性質を予

Abbreviations: AB, alcian blue; ABC, avidin-biotin-peroxidase complex; BrdU, bromodeoxyuridine; BSA, bovine serum albumin; CHO, Chinese hamster ovary; DAB, diaminobenzidine; EVG, elastica van Gieson; FG, fibrinogen; FN, fibronectin; FNR, fibronectin receptor or $\alpha_5\beta_1$ integrin; GRGDS, glycine-arginine-glycine-aspartic acid-serine; H·E, hematoxylin·eosin; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; ICAM-1, intercellular

後の面からみると、細胞の分化に基づく形態分類、組織型、深達度の程度、および進行病期が信頼されている悪性度の指標である。しかしながら、生検からより正確な予後の推定や、高危険群の設定など病理形態学に寄せられる課題が残っている¹⁸⁾。

最近、Cheresh は、メラノーマ(悪性黒色腫)の中で予後の悪性なグループは垂直方向へ浸潤するタイプであり、この際にはメラノーマ細胞は $\alpha_v \beta_3$ インテグリン(VNR)を発現し、RGD(arginine-glycine-aspartic acid)のアミノ酸配列を含む基質蛋白と接着していることを報告した¹⁴⁾。また、Korhonenらは、腎癌の悪性度とインテグリンの関連を免疫組織学的に検討し、 α_6 サブユニットが高悪性度(G-3)の腎癌に、 α_6 サブユニットが低悪性度(G-1)の腎癌に多く発現していることを示し、インテグリンの発現と悪性度とは密接に関連する可能性を指摘した¹⁷⁾。

そこで、本研究では、粘膜下組織に浸潤している胃癌組織について、細胞増殖活性を増殖細胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)で、代表的インテグリンとして $\alpha_6 \beta_1$ (FNR)、 α_6 サブユニット(laminin receptor subunit, LMRS)、 $\alpha_v \beta_3$ (VNR)の免疫組織学的局在を、また、基底膜領域の基質蛋白の沈着状態を各々免疫組織学的に評価して、従来の臨床病理学的諸因子と比較検討した。その結果、 $\alpha_v \beta_3$ インテグリン(VNR)は、特に浸潤性格の癌細胞集団に発現され、小型細胞集団をとり、細胞増殖活性が高かった。従って、VNRは、予後関連因子となりうると考えられたので、ここに報告する。

対象および方法

I. 対象

1987年2月から1990年12月までに福井県済生会病院外科で手術的に切除され、肉眼的に進行癌と思われた胃癌44症例を対象とした。胃切除後直ちに皮膚科用トレパン(直径0.5cm)にて胃癌組織の一部を採取し、34例は periodate-lysine-paraformal-

dehyde (PLP) 固定液¹⁹⁾、10例はメタカルン固定液²⁰⁾に一晩浸して固定した。残りの切除標本は10%緩衝ホルマリン液にて固定し、胃癌取扱い規約²¹⁾に従って病理組織学的診断用に標本の切り出しを行ない、通常のパラフィン包埋、ヘマトキシリン・エオジン(hematoxylin-eosin, H:E)染色と、静脈侵襲の判定用にエラスチカ・ワンギーソン(elastica van Gieson, EVG)染色を行った。44症例の臨床病理学的事項については胃癌取扱い規約²¹⁾に準じて記載分類し、表1、2に示した。

II. 方法

1. 癌巣の大きさおよび間質反応の検索

PLP 固定およびメタカルン固定材料は共にパラフィン包埋し、H-E染色、EVG染色、periodic acid Schiff-alcian blue (PAS-AB, pH2.5)染色、high iron diamine-alcian blue (HID-AB, pH2.5)染色、アザン(azan)染色、鍍銀染色を行ない、更に、I型、III型、V型、VI型コラーゲン免疫染色を行ない、癌細胞巣の大きさ、間質反応の程度を判定した。

コラーゲン免疫染色：型別コラーゲンの免疫組織化学的局在はアビジン・ビオチン・ペルオキシダーゼ(avidin-biotin-peroxidase-complex, ABC)法にて検索した。PLP およびメタカルン固定パラフィン切片を脱パラフィン後、0.05%プロテアーゼ Type XXIV (Sigma, St. Louis, MO, USA)で30分前処理し、ついで0.03%過酸化水素加無水メタノールにて30分間反応させ、内因性ペルオキシターゼを阻止した。一次抗体として教室にて作成した型特異的抗ヒトコラーゲン抗体^{22,23)}(I型、III型、V型、VI型)を用い、抗I型、III型は10倍に、抗V型は5倍に、抗VI型は200倍に希釈して使用した。一次抗体を冷室、一晚反応させた後、リン酸緩衝食塩水(phosphate buffered saline, PBS)にて10分間3回洗浄し、ついで二次抗体としてビオチン化ウサギ抗ラット IgG 抗体(Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)またはビオチン化ヤギ抗ウサギ IgG 抗体(Vector

Table 1. Clinicopathological features and proliferative activity of tumor cells in 10 cases of gastric carcinoma, in methacarn-fixed tissues

Case No.	Clinicopathological features								PCNA labeling index (%)
	Age/Sex	Histology subtype	Depth of invasion	Cell cluster	Condition of stroma	Lymph node metastasis	Blood vessel invasion	Stage	
1	55/M	por	ss	small	D	n1 (+)	v0	II	23.58
2	66/M	por	se	small	D	n2 (+)	v1	III	49.84
3	59/M	tub1	sm	large	ND	n (-)	v0	I	39.78
4	73/M	por	se	large	ND	n2 (+)	v0	III	57.31
5	65/F	muc	ss	large	ND	n (-)	v0	II	25.33
6	71/M	por	ss	small	D	n2 (+)	v0	III	40.85
7	59/M	por	se	small	D	n3 (+)	v0	IV	61.18
8	76/M	por	ss	small	D	n1 (+)	v0	II	55.32
9	55/M	tub2	ss	small	D	n2 (+)	v0	III	77.57
10	67/F	tub2	se	small	ND	n1 (+)	v0	III	22.13

Abbreviations: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; M, male; F, female; por, poorly differentiated adenocarcinoma; tub1, tubular adenocarcinoma, well differentiated; muc, mucinous adenocarcinoma; tub2, tubular adenocarcinoma, moderately differentiated; ss, tela subserosa; se, serosa exposed; sm, tela submucosa; n, lymph node; D, desmoplasia; ND, non-desmoplasia; v, venous invasion; according to the General Rules for the Gastric Cancer Study by Japanese Research Society for Gastric Cancer.

adhesion molecule-1; IGSS, immunogold silver staining; LFA-1, leucocyte function antigen-1; LM, laminin; LMR, laminin receptor; LMRS, laminin receptor subunit or α_6 subunit; MNNG, N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; muc, mucinous adenocarcinoma; OP, osteopontin; PAS, periodic acid Schiff; PBS, phosphate

Laboratories) を200倍に希釈して30分間反応させ、アビジン・ビオチン複合体 (Vector Laboratories) に、30分間反応させた。発色はジアミノベンチジン (diaminobenzidine, DAB) にて行ない、ヘマトキシリンで核染色を行った。

以上の染色を参考に、粘膜下層に浸潤した代表的癌細胞集の大きさより、大型細胞集団 (large cluster) と小型細胞集団 (small cluster) の2群に、間質の多寡より間質増生群 (desmoplasia, D) と間質非増生群 (non-desmoplasia, ND) に大別し、表1, 2に示した。

2. 増殖細胞核抗原 (PCNA) 免疫染色による胃癌細胞増殖能の検索

PCNA 免疫染色: PLP 固定およびメタカルン固定材料の脱パラフィン切片につき、0.1%アザイドと0.03%過酸化水素水で非特異的反応を阻害した。次に、抗 PCNA モノクローナル抗体 (メタカルン固定切片については 19A2, マウス IgM, American Biotech, Plantation, FL, USA; PLP 固定切片については PC10, マウス IgG, Dakopatts, Glostrup, Denmark) をそ

れぞれ8,000倍, 1,000倍に希釈した一次抗体に冷室で一晩浸漬した。二次抗体はビオチン化抗マウス IgM, またはビオチン化抗マウス IgG (Vector Laboratories) を400倍に希釈して30分間浸漬後ついでストレプトアビジン・ビオチン・ペルオキシターゼ複合体 (streptoavidin-biotin-peroxidase complex, SBC, Vector Laboratories) に30分間浸漬し、DAB で発色させた。核染色はメチルグリーンを用いた。

PCNA 免疫染色性の良否は、胃粘膜腺頸部上皮細胞核またはリンパ濾胞の明中心芽細胞が同一切片において強陽性を示す場合を染色良好と判定した。とくに癌細胞核の染色性については同一切片上でも濃淡のバラツキが若干認められたが、濃淡に関係なく弱陽性を含めて陽性と判定した。

癌細胞の PCNA 陽性率の算定: 粘膜下層へ浸潤している代表的組織型の癌細胞集団を選び、PCNA 陽性細胞を少なくとも100個以上数え、陽性癌細胞数を集団の総癌細胞数で除し、PCNA 陽性率 (%) を算出した (表1, 2)。

3. 基底膜領域における基底膜成分沈着の検索

Table 2. Summary of clinicopathological features, proliferative activity of tumor cells, and immunohistochemistry in 34 cases of gastric carcinoma, in PLP-fixed tissues

Case No.	Clinicopathological features								PCNA labeling index (%)	Immunohistochemistry						
	Age/Sex	Histology subtype	Depth of invasion	Cell cluster	Condition of stroma	Lymph node metastasis	Blood vessel invasion	Stage		Integrins			Basement membrane			
										VNR	FNR	LMRS	FN	LM	IVC	HSPG
1	78/F	por	se	small	ND	n 1 (+)	v 2	III	38.19	±	+	+	+	+	+	+
2	73/M	tub2	se	small	D	n 3 (+)	v 1	IV	37.40	±	±	+	±	+	+	+
3	41/F	por	se	small	D	n 2 (+)	v 0	III	55.24	±	±	±	±	±	±	-
4	68/M	tub2	ss	small	ND	n 3 (+)	v 0	IV	22.52	±	+	±	+	+	+	+
5	59/M	tub1	ss	large	D	n 1 (+)	v 0	II	19.41	-	-	-	±	±	±	±
6	69/M	por	se	small	D	n 2 (+)	v 0	III	27.51	±	±	±	±	±	±	-
7	61/M	tub2	si	small	D	n 1 (+)	v 0	IV	50.60	±	±	±	±	+	±	±
8	61/F	muc	sm	large	ND	n 2 (+)	v 0	III	18.85	-	-	-	±	±	±	-
9	68/M	tub2	ss	small	D	n 1 (+)	v 0	II	57.50	±	±	+	±	+	+	+
10	54/M	muc	ss	large	ND	n (-)	v 0	I	0.68	-	-	-	±	-	-	-
11	65/M	tub2	se	small	ND	n 2 (+)	v 0	III	64.30	±	+	±	+	±	±	±
12	72/M	pap	se	large	ND	n 2 (+)	v 2	III	46.58	-	+	±	+	+	+	+
13	83/M	pap	se	large	D	n (-)	v 0	III	13.88	-	-	-	±	+	+	+
14	71/M	tub2	se	small	D	n 2 (+)	v 0	III	45.30	-	+	±	+	±	-	-
15	76/M	tub2	se	small	D	n 1 (+)	v 2	III	19.14	-	±	±	±	±	±	±
16	54/M	tub1	ss	large	ND	n 1 (+)	v 0	II	38.49	±	+	+	-	+	+	+
17	57/M	pap	ss	large	ND	n (-)	v 0	I	14.50	-	+	+	+	+	+	+
18	75/F	tub2	ss	small	D	n 1 (+)	v 1	II	18.63	-	±	-	±	±	±	-
19	74/F	tub2	se	large	ND	n 1 (+)	v 0	III	19.60	±	±	±	±	+	+	+
20	70/F	por	pm	small	ND	n 2 (+)	v 1	III	14.28	+	±	-	+	±	±	-
21	50/M	por	ss	small	D	n 1 (+)	v 0	II	31.86	-	-	-	-	-	-	-
22	64/M	tub1	ss	large	ND	n 1 (+)	v 0	II	5.32	-	-	-	±	±	±	±
23	53/M	pap	se	large	ND	n (-)	v 0	III	22.75	-	±	±	±	±	+	±
24	45/M	muc	se	large	ND	n (-)	v 0	III	0.93	-	-	-	±	±	±	-
25	56/M	por	se	small	D	n 2 (+)	v 0	III	21.66	-	±	-	±	-	-	-
26	80/F	por	se	small	D	n (-)	v 0	III	6.25	-	-	-	-	-	-	-
27	61/M	pap	pm	large	ND	n 1 (+)	v 0	II	29.96	-	±	±	±	±	+	±
28	65/F	pap	se	large	ND	n 1 (+)	v 0	III	18.97	-	±	±	±	±	±	±
29	72/M	por	ss	small	ND	n 1 (+)	v 0	II	48.46	-	+	±	+	±	-	-
30	53/M	tub2	se	large	ND	n 2 (+)	v 0	III	6.87	-	±	±	±	±	±	-
31	79/F	tub2	ss	small	ND	n 1 (+)	v 0	II	60.95	±	-	-	±	-	-	±
32	35/M	muc	pm	large	ND	n 1 (+)	v 0	II	1.47	-	-	-	-	-	-	-
33	63/M	muc	ss	large	ND	n (-)	v 0	I	3.70	-	-	-	-	-	-	-
34	61/M	por	ss	small	D	n (-)	v 0	I	73.80	±	±	-	±	±	±	±

Abbreviations: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; VNR, vitronectin receptor; FNR, fibronectin receptor; LMRS, laminin receptor subunit; FN, fibronectin; LM, laminin; IVC, type IV collagen; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; F, female; M, male; por, poorly differentiated adenocarcinoma; tub2, tubular adenocarcinoma, moderately differentiated; tub1, tubular adenocarcinoma, well differentiated; muc, mucinous adenocarcinoma; pap, papillary adenocarcinoma; se, serosa exposed; ss, tela subserosa; si, serosa infiltrating; sm, tela submucosa; pm, tunica muscularis propria; ND, non-desmoplasia; D, desmoplasia; n, lymph node; v, venous invasion. Symbols: +, distinctly or continuously positive; ±, faintly or discontinuously positive; -, negative.

buffered saline; PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; pap, papillary adenocarcinoma; por, poorly differentiated adenocarcinoma; RGD, arginine-glycine-aspartic acid; SBC, streptoavidin-biotin-peroxidase complex; TGFβ, transforming growth factor β; TSP, thrombospondin;

PLP 固定材料に対して FN, LM, VC, HSPG の局在を免疫組織学的に検索した。一次抗体として、抗フィブロネクチンポリクローナル抗体 (ウサギ, Dakopatts, Glostrup, Denmark), 抗ラミニンモノクローナル抗体 (Immunotech, Marceille, France), 抗Ⅳ型コラーゲンモノクローナル抗体 (資生堂, 東京), 抗ヘパタン硫酸プロテオグリカンモノクローナル抗体 (Chemicon, EL Segundo, CA, USA) を用い、それぞれ8,000倍, 300倍, 8,000倍, 20倍に希釈して使用、SBC 法で免疫染色を行った。即ち、脱パラフィン切片を 0.01N 塩酸に溶かした 0.4% ヘプシン (Sigma) に 20 分間前処理し、0.1% アザイドと 0.03% 過酸化水素水に 37°C 10 分間浸漬し、非特異的反応を阻止した。次に各一次抗体に 4°C 冷室、一晚反応させた。二次抗体はビオチン化抗ウサギ IgG, またはビオチン化抗マウス IgG (Vector Laboratories) を 200 倍に希釈して 30 分間、ついで SBC に 30 分間浸漬後、DAB で発色させた。核染色はメチルグリーンを用いた。

以上の染色結果から、各基底膜成分の沈着度を胃癌細胞巢の基底膜領域において線状に強く染まる場合を陽性+, 断続的に弱く染まる場合を弱陽性士, 不染の場合を陰性-に分け、表 2 に示した。

4. 胃癌細胞におけるインテグリンの発現・分布の検索

PLP 固定材料に対し、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン (VNR), フィブロネクチンレセプターである $\alpha_5\beta_1$ インテグリン (FNR), およびラミニンレセプター (LMR) である $\alpha_6\beta_1$ インテグリンや $\alpha_6\beta_4$ インテグリンの α_6 サブユニット (LMRS) の局在を免疫組織化学的に検索した。一次抗体として、抗 $\alpha_v\beta_3$ ポリクローナル抗体は Bruce Vogel 博士 (LaJolla Cancer Research Institute, CA, USA) より、抗 α_6 モノクローナル抗体 (GOH₃)²⁰ は Arnoud Sonnenberg 博士 (Netherland Red Cross, Amsterdam) より恵与を受けた。抗 $\alpha_5\beta_1$ ポリクローナル抗体は Telios 社 (Telios, San Diego, CA, USA) より購入した。FNR の免疫染色は酵素前処理を行わず、1,000倍希釈で SBC 法で前述の基底膜成分の染色の手順で行った。VNR および LMRS 免疫染色については、以下の前処理後、immunogold silver staining (IGSS) 法²⁰で染色した。即ち脱パラフィン切片につき、VNR については 0.05M トリス・塩酸緩衝液 (pH7.6) に溶かした 0.04% トリプシン (Sigma), LMRS については、0.01% アクチナーゼ E (科研製薬, 東京) に 37°C, 10 分間それぞれ前処理を行った。次いでブロッッキング緩衝液 [20倍希釈の羊血清, 0.8% 牛血清アルブミン (bovine serum albumin, BSA), 0.1% ゼラチン, 2mM 窒化ナトリウムを含む PBS, pH7.4] に 30 分、室温、続いて洗浄緩衝液 (0.8% BSA, 0.1% ゼラチン, 2mM 窒化ナトリウムを含む PBS, pH7.4) に 10 分 3 回、室温に浸漬し、その後、一次抗体の VNR は 1,000 倍, LMRS は 1 倍希釈で 4°C, 冷室一晚反応させ、洗浄後、金コロイド標識抗ウサギ IgG または金コロイド標識抗マウス IgG (5nm 大, Amersham, Buckinghamshire, UK) を 50 倍に希釈して 60 分室温、次いで 2% グルタルアルデヒドで 10 分間後固定をし、銀増感法を silver enhancing kit (Intense M, Amersham) を用いて 15 分間作用させた。核染色はヘマトキシリンで行った。

以上の免疫染色の良否については、VNR は平滑筋細胞、

FNR は血管内皮細胞, LMRS は正常上皮細胞の細胞膜に沿って陽性を示す場合を染色良好と判定し、各症例の胃癌細胞巢におけるインテグリンの発現程度を陽性+, 弱陽性士, 陰性-に分け表 2 に示した。

5. 統計学的解析

各症例の臨床病理学的事項、ならびに免疫組織学的結果に関して、各群間の PCNA 陽性率の差の検定には Welch 法を、またインテグリン発現程度、基底膜成分の沈着状態、組織型や臨床病理学的事項の各群間の有意差の検定には Fischer の直接確率計算法もしくはカイ二乗検定法を用い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。

成 績

1. 胃癌の細胞増殖能

1. PCNA 陽性率の各臨床病理学的項目における解析

メタカルン固定胃癌組織における PCNA 陽性率は 22.13% ~ 77.57%, 平均 45.29% ± 17.37, また、PLP 固定組織における PCNA 陽性率は 0.68% ~ 73.80%, 平均 28.10% ± 19.82 であり、このうち、とくに膠様腺癌 5 例の PCNA 陽性率が著しく低値であった。代表的組織における PCNA 免疫染色を H-E 染色像と対比して、図 1 Ma-b に高分化型管状腺癌 (tubular adenocarcinoma, well differentiated type, tub₁) (症例 3, メタカルン固定), 図 1 Mc-d に中分化型管状腺癌 (tubular adenocarcinoma, moderately differentiated type, tub₂) (症例 10, メタカルン固定), 図 1 Me-f に低分化型腺癌 (poorly differentiated adenocarcinoma, por) (症例 7, メタカルン固定), 図 1 PLPa-b に膠様腺癌 (mucinous adenocarcinoma, muc) (症例 8, PLP 固定), 図 1 PLPc-d に乳頭腺癌 (papillary adenocarcinoma, pap) (症例 12, PLP 固定), 図 1 PLPe-f に低分化型腺癌 (por) (症例 34, PLP 固定) を示した。各臨床病理学的項目のうち最も注目される項目 (胃癌の組織型, 組織学的リンパ節転移程度 n, 肉眼的進行程度) についての PCNA 陽性率の平均値と標準偏差はメタカルン固定, PLP 固定別に表 3 に示した。組織型別では PLP 固定症例においても膠様腺癌 (muc, n=5) の PCNA 陽性率 (5.12% ± 6.92) が他の型の胃癌 (n=29, 32.06% ± 18.59) より低値であった ($p < 0.01$)。さらに、膠様腺癌 (muc) と乳頭腺癌 (pap) の間、膠様腺癌 (muc) と中分化型管状腺癌 (tub₂) との間にも有意差がみられた ($p < 0.01$)。また組織型の違いにかかわらず症例ごとの PCNA 陽性率のばらつきが大きく、癌細胞の不規則、不均等な増殖がうかがわれた。リンパ節転移程度 (n) 別ではメタカルン固定症例において、組織学的に第 2 群以上のリンパ節に転移が認められたリンパ節転移高進展群 n₂(+) + n₃(+) は、それ以外のリンパ節転移低進展群 n(-) + n₁(+) に比べ、PCNA 陽性率が高かった ($p < 0.05$)。しかし進行病期 (Stage) 別に比べると、Stage III + IV 群の PCNA 陽性率は Stage I + II 群よりも高値の傾向を示すものの両群間に有意差はなかった。また、膠様腺癌 (muc) 5 例を除いた PLP 固定 29 症例について同様の検定を行ったが、リンパ節転移程度別でも進行病期別でも一定の傾向は認められなかった。

tub₁, tubular adenocarcinoma, well differentiated type; tub₂, tubular adenocarcinoma, moderately differentiated type; VLA, very late activation antigen; VN, vitronectin; VNR, vitronectin receptor or $\alpha_v\beta_3$ integrin; VWF, von Willebrand factor; VC, type V collagen

2. インテグリンの発現程度と胃癌細胞の PCNA 陽性率との関係

PLP 固定組織のうち、膠様腺癌 (muc) 5 例と染色不良症例 3 例 (症例 22, 26, 30) を除いた 26 症例につき、VNR の発現、

FNR の発現、LMRS の発現と基底膜成分の染色性の組合せのうち、VNR 陽性の群は VNR 陰性群に比べ PCNA 陽性率が高値であった ($p < 0.05$)。その他の組合せ、たとえば FNR 陽性で FN 陽性群と FNR 弱陽性で FN 弱陽性の群の間には差は認

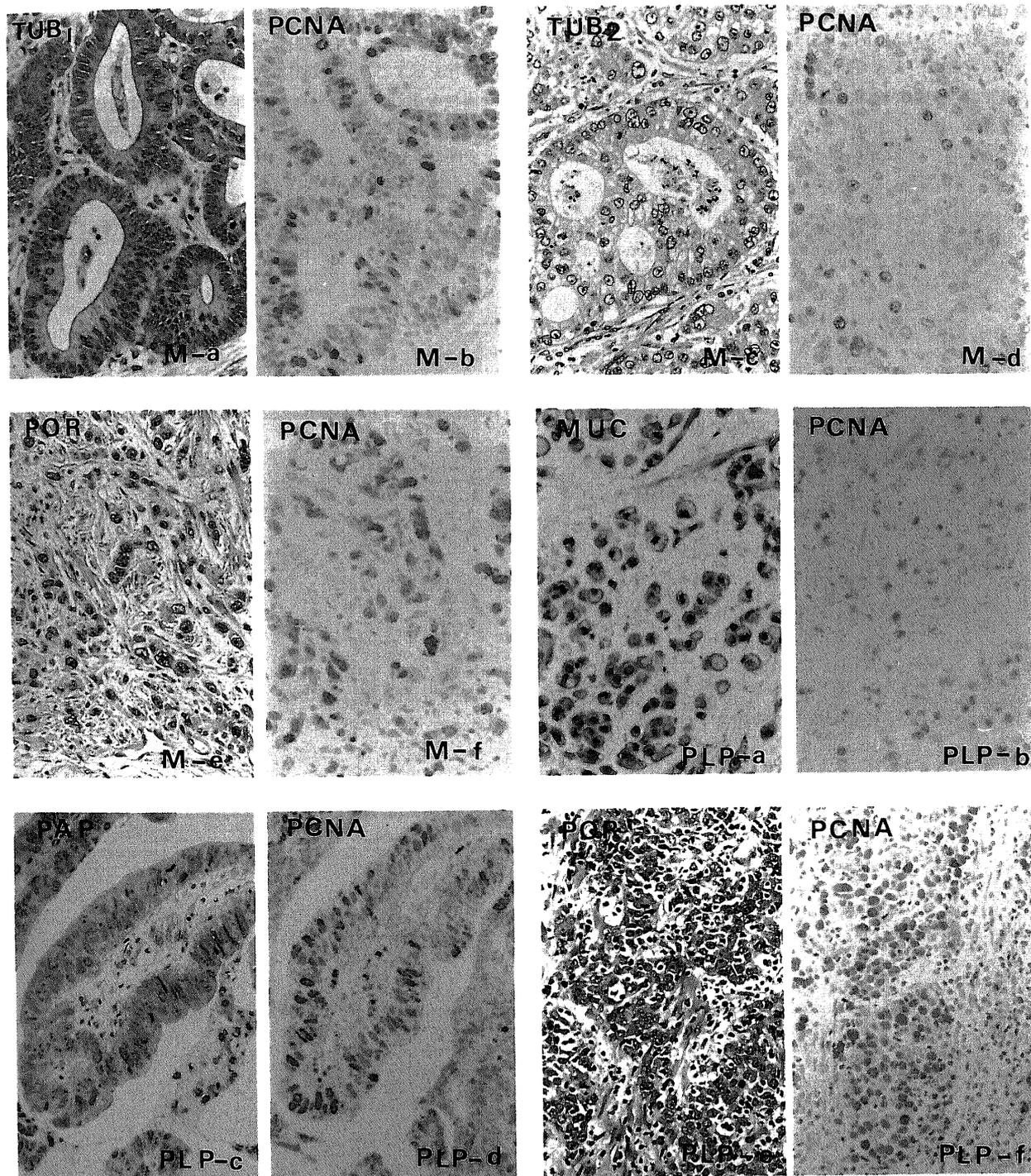


Fig. 1. Representative photomicrographs showing cell proliferative activity by immunohistochemistry of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in methacarn (M)-fixed and periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)-fixed tissues of gastric carcinoma. M-a and b are tubular adenocarcinoma, well differentiated (TUB 1) in methacarn (M)-fixed tissues (Case 3); M-c and d, tubular adenocarcinoma, moderately differentiated (TUB 2) (Case 10); M-e and f, poorly differentiated adenocarcinoma (POR) (Case 7); PLP-a and b are mucinous carcinoma (MUC) in periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)-fixed tissue (Case 8); PLP-c and d, papillary adenocarcinoma (PAP) (Case 12); PLP-e and f, poorly differentiated adenocarcinoma (POR) in PLP-fixed tissue (Case 34). $\times 162.5$

められなかった (表 4)。

II. インテグリンと基底膜成分

1. インテグリンの発現と基底膜成分の沈着, 分布の関係

PLP 固定材料の代表的組織の基底膜領域における VNR, FNR, LMRS 免疫染色を H・E 染色像と対比して, 図 2 a-d に高分化型管状腺癌 (tub₁) (症例16), 図 2 e-h に中分化型管状腺癌 (tub₂) (症例 7), 図 2 i-l に低分化型腺癌 (por) (症例6) を示した. 同様に FN, LM, VC, HSPG 免疫染色を図3 a-d に乳頭腺癌 (pap) (症例12), 図 3 e-h に高分化型管状腺癌 (tub₁) (症例16), 図 3 i-l に中分化型管状腺癌 (tub₂) (症例 7), 図 3 m-p に低分化型腺癌 (por) (症例 6) を示した. 基底膜成分のうち LM, VC, HSPG の染色性はほとんど一致した. 即ち, LM, VC,

HSPG の沈着程度はほぼ同一に変動した. FN と上記 3 成分との関係については, LM, VC, HSPG の沈着が不連続な場合には FN も基底膜領域で弱陽性を示した ($p < 0.05$).

インテグリンの発現とその主要なリガンドである基底膜成分沈着との関係については, FNR と FN, LMRS と LM について, それぞれ免疫染色の程度より陽性群と弱陽性群に分け, 各群間の関連を Fischer の直接確率計算法を用いて検定した. FNR 陽性群は FN が陽性であり, FNR 弱陽性群では FN が弱陽性を示すこと ($p < 0.01$), および, LMRS 陽性群では LM は陽性を示し, LMRS 弱陽性群では LM は弱陽性であった ($p < 0.05$) (表 5). しかし, VNR と LM, VC, HSPG や FN との間には一定の関連はみられなかった.

Table 3. Correlation of PCNA labeling index with clinicopathological variables of gastric carcinoma, in both methacarn-fixed and PLP-fixed tissues

Clinicopathological variables	PCNA labeling index (mean±S.D.)
Methacarn-fixed tissue	
n ₂ (+) + n ₃ (+) group (n=5)	57.35±12.27
n (-) + n ₁ (+) group (n=5)	33.23±12.72
Stage III + IV group (n=6)	48.87±17.44
Stage I + II group (n=4)	36.00±12.80
PLP-fixed tissue	
mucinous carcinoma (n=5)	5.12± 6.92
non-mucinous carcinoma (n=29)	32.06±18.59
papillary carcinoma (n=6)	24.44±11.28
tubular adenocarcinoma, well differentiated (n=3)	21.07±13.59
tubular adenocarcinoma moderately differentiated (n=11)	36.61±19.23
poorly differentiated adenocarcinoma (n=9)	27.05±21.63
n ₂ (+) + n ₃ (+) group (n=10)	34.16±17.65
n ₁ (+) + n (-) group (n=19)	30.96±18.97
Stage III + IV group (n=18)	29.50±16.58
Stage I + II group (n=11)	36.26±20.68

Abbreviations: PCNA, proliferating cell nuclear antigen; PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; n, lymph node; *, significant difference by t test with Welch's correction ($P < 0.05$); **, ($P < 0.01$).

Table 4. Correlation between proliferative activity of tumor cells and immunohistochemical stainings of integrins or basement membrane components in PLP-fixed tissues of gastric carcinoma

Stainability of integrins and basement membrane	PCNA labeling index (mean±S.D.)
VNR (±, +) group (n=13)	43.10±18.07
VNR (-) group (n=13)	27.00±11.89
FNR (+) and FN (+) group (n=8)	39.79±14.50
FNR (±) and FN (±) group (n=14)	32.83±16.50

Abbreviations: PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; VNR, vitronectin receptor; FNR, fibronectin receptor; FN, fibronectin.
Symbols: +, distinctly or continuously positive; ±, faintly or discontinuously positive; - negative; *, significant difference by t test with Welch's correction ($P < 0.05$).

2. 組織型別におけるインテグリンの発現と基底膜成分の沈着程度に関連

VNR, FNR, LMRS, FN, LM, VC, HSPG の染色性について、表6に示すように各々2群に分け、それぞれの組織型間でFischerの直接確率計算法で検定を行なうと、乳頭腺癌(pap)ではVNR陰性、中分化型管状腺癌(tub₂)ではVNR陽性であ

り、また、LMRSも陽性であった(p<0.05)。また、膠様腺癌ではLM, VC, HSPGやFNの沈着、インテグリンの発現は検出できなかった。

3. インテグリンの発現と基底膜成分の沈着程度の各臨床病理学的項目における解析

膠様腺癌(muc)5例を除くPLP固定胃癌29症例について、

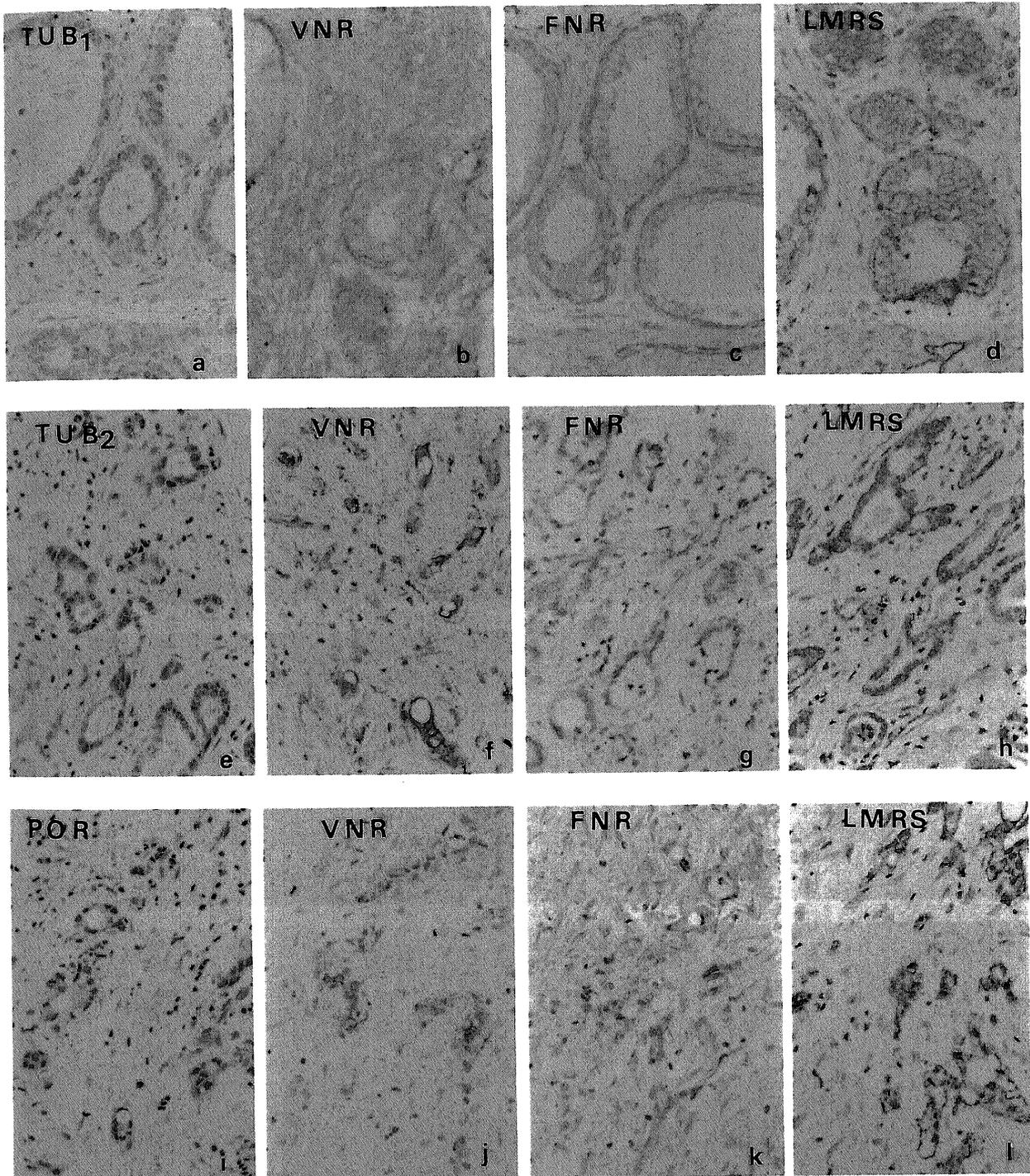


Fig.2. Representative photomicrographs showing the expression of integrins in various histological subtypes of gastric carcinoma. a to b are tubular adenocarcinoma, well differentiated (TUB 1) in Case 16 of periodate-lysine-paraformaldehyde (PLP)-fixed tissue; e to h are tubular adenocarcinoma, moderately differentiated (TUB 2) in Case 7 of PLP-fixed tissue; i to l are poorly differentiated adenocarcinoma (POR) in Case 6 of PLP-fixed tissue. Abbreviations are VNR for vitronectin receptor; FNR, fibronectin receptor; LMRS, laminin receptor subunit. $\times 162.5$

各症例を大型細胞集団群 (large cluster) と小型細胞集団群 (small cluster), 間質増生群 (desmoplasia) と間質非増生群 (non-desmoplasia), リンパ節転移低進展群 $n(-)+n_1(+)$ とリンパ節転移高進展群 $n_2(+)+n_3(+)$, 静脈侵襲の有無の各 2 群に分け, インテグリンの発現程度と基底膜成分の沈着程度を, 組織型別における解析と同様に 2 群に分け, それぞれ 2×2 分割

表を作成しカイ二乗検定を行った. その結果, 小型細胞集団群 (small cluster) での NC が弱陽性ないし陰性, 大型細胞集団群 (large cluster) での VNR 陰性, 間質増生群 (desmoplasia) での FN 弱陽性ないし陰性, リンパ節転移高進展群 $n_2(+)+n_3(+)$ での FNR 陽性の傾向を示した ($p < 0.05$) (表 7). 以上のことは, VNR は小さい癌巣に発現されやすく, 逆に NC は小

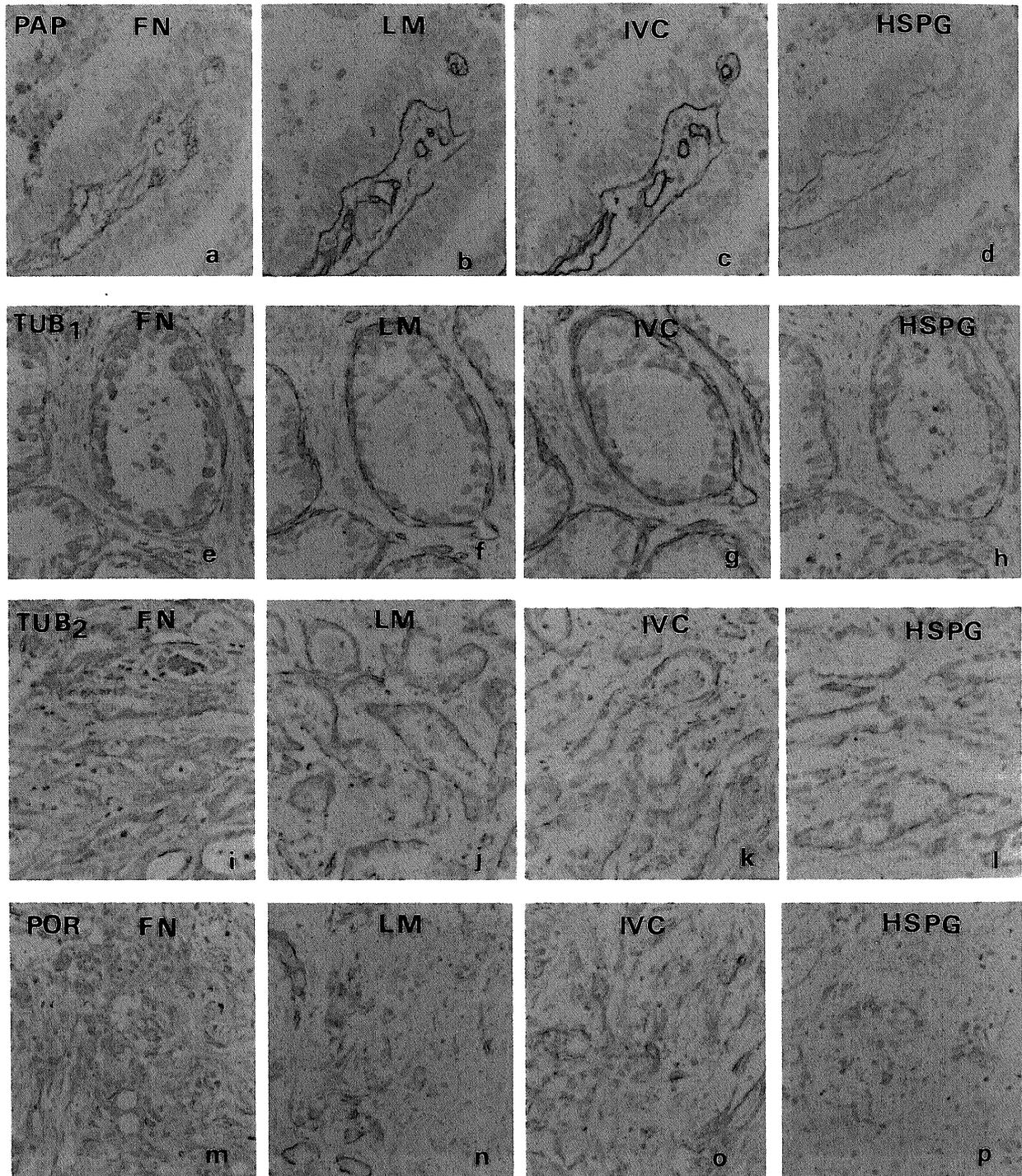


Fig. 3. Representative photomicrographs showing immunohistochemical stainings of fibronectin (FN), laminin (LM), type IV collagen (IVC) and heparan sulfate proteoglycan (HSPG). a to d are papillary adenocarcinoma (PAP) in Case 12 of PLP-fixed tissue; e to h are tubular adenocarcinoma, well differentiated (TUB 1) in Case 16; i to l are tubular adenocarcinoma, moderately differentiated (TUB 2) in Case 7; m to p are poorly differentiated adenocarcinoma (POR) in Case 6. $\times 162.5$

さい癌巣では不連続を示すこと、硬癌の場合にはFNの沈着が基底膜領域に少なく、リンパ節転移の広汎な場合にはFNRの発現をみるということの意味している。また、小型細胞集団 (small cluster) の胃癌では間質増生の傾向が認められた ($p < 0.05$)。

考 察

インテグリンは細胞と細胞間および細胞と細胞外マトリック

Table 5. Immunohistochemical correlations between FNR and FN (A), and between LMRS and LM (B) expressions in PLP-fixed gastric carcinoma tissues

A			
	FN (+)	FN (±)	Total
FNR (+)	8 *	0	8
FNR (±)	1	14 *	15
Total	9	14	23 cases

*, significant difference by Fischer's exact probability test ($P < 0.01$).

B			
	LM (+)	LM (±)	Total
LMRS (+)	5 *	0	5
LMRS (±)	4	10 *	14
Total	9	10	19 cases

*, significant difference by Fischer's exact probability test ($P < 0.05$).

Abbreviations and symbols:

FN, fibronectin; FNR, fibronectin receptor; LMRS, laminin receptor subunit; LM, laminin; +, distinctly or continuously positive; ±, faintly or discontinuously positive.

Table 6. Correlation between histological subtypes and immunohistochemical stainings of PLP-fixed tissues in 34 cases of gastric carcinoma

Histology subtype	Integrins						Basement membrane							
	VNR		FNR		LMRS		FN		LM		IVC		HSPG	
	+~±	-	+~±	-	+~±	-	+	±~-	+	±~-	+	±~-	+	±~-
pap	0	6 *	5	1	5	1	2	4	3	3	5	1	3	3
tub1	2	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	2	1	2
tub2	7 *	4	10	1	9 *	2	3	8	5	6	4	7	4	7
por	5	4	7	2	4	5	3	6	1	8	1	8	1	8
muc	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5	0	5
	14	20	24	10	20	14	9	25	10	24	11	23	9	25

Abbreviations:

PLP, periodate-lysine-paraformaldehyde; VNR, vitronectin receptor; FNR, fibronectin receptor; LMRS, laminin receptor subunit; FN, fibronectin; LM, laminin; IV C, type IV collagen; HSPG, heparan sulfate proteoglycan; pap, papillary adenocarcinoma; tub1, tubular adenocarcinoma, well differentiated; tub2, tubular adenocarcinoma, moderately differentiated; por, poorly differentiated adenocarcinoma; muc, mucinous carcinoma.

Symbols:

+, distinctly or continuously positive; ±, faintly or discontinuously positive; -, negative,

*, significant difference by Fischer's exact probability test ($P < 0.05$).

ス成分との接着に関与する細胞表面レセプターである^{9,11}。この接着分子は非共有結合のα鎖とβ鎖から成るヘテロダイマーであり、βサブユニットの種類でβ₁, β₂, β₃, およびその他のβ鎖群に亜分類されている。β₁群にはα₁β₁, α₂β₁, α₃β₁, α₄β₁, α₅β₁, α₆β₁, α₇β₁, α_vβ₁, α_xβ₁が含まれており、これらのインテグリンは細胞と間質・基底膜成分との接着に主要な役割をはたしている。β₂群にはα_Lβ₂, α_Mβ₂, α_Xβ₂があり、主に細胞と細胞同志、たとえば白血球のα_Lβ₂ (leucocyte function antigen 1, LFA-1) と内皮細胞の接着分子 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1) との接着結合のように、白血球に発現する接着分子である。β₃群にはα_{1b}β₃, α_vβ₃が知られ、血小板に代表される細胞と血漿蛋白や接着性糖蛋白、たとえばフィブリノーゲン (fibrinogen, FG), フィブロネクチン (FN), ヴィトロネクチン (vitronectin, VN), フォンウィルブランド因子 (von Willebrand factor, VWF), トロンボスポンジン (thrombospondin, TSP), オステオポンチン (osteopontin, OP) との結合に働く接着分子である。その他のβ群としてはα₅β₄, α_vβ₅, α_vβ₆, α_{IIIb}β₇, α₄β₇, α_vβ₈が同定されている¹²。近年、これらのインテグリンのうち、腫瘍の浸潤・転移や腫瘍原性に関連するものとしてβ₁群とβ₃群のインテグリンやそのサブユニットが注目されている。今回、フィブロネクチンレセプターのα₅β₁インテグリン (FNR), ラミニンレセプターのα₆サブユニット (LMRS) およびヴィトロネクチンレセプターのα_vβ₃インテグリン (VNR) の分布を、その特異抗体を用いて胃癌組織において検討しところ、次の結果が得られた。① FNR は癌細胞集団周囲 (基底膜領域) のFNの免疫染色陽性症例に発現しているのみならず、リンパ節転移高進展群においてもその発現が認められたこと。② LMRS は癌細胞の基底膜成分であるLMの沈着と関連して発現、組織型のうちでは中分化型管状腺癌に発現する傾向があったこと。③ VNRについては、細胞増殖活性の高い胃癌に陽性であり、更に小型細胞集団または個々バラバラに浸潤する癌細胞に発現していたことである。

α₅β₁インテグリンは古典的なFNRである²⁶。このインテグリンはもっぱらFNの細胞接着ドメインのうち、RGDの最小

細胞接着認識アミノ酸配列と結合し、基質との局所接着 (focal contact) に働くレセプターとして知られている^{32,33}。従って、今回、FNR の発現と FN の局在とが同じように変動していたことはきわめて当然の結果と考えられる。しかし、一般には FNR の発現、消失およびそのリガンドである FN の産生、沈着を悪性細胞株や腫瘍組織で観察すると、悪性形質とともに FNR は消失し、FN はびまん性に分布すると言われている⁷。Christensen ら²⁷はヒト乳癌で、FN 陽性基質に囲まれた乳癌は浸潤・転移能が低いこと、Plantefaber ら²⁸は Rous 肉腫ウイルスで悪性形質転換をした細胞には $\alpha_5\beta_1$ インテグリン (FNR) の低下と FN への接着能の低下が起こること、Akiyama ら²⁹はヒト線維芽細胞の悪性化と共に $\alpha_5\beta_1$ インテグリン (FNR) の分布はびまん性になり集合体 (clustering) を作らなくなること、Roman ら³⁰も同様に FN の消失と FNR のびまん化 (disorganization) が悪性形質に関係していることを報告した。最近では $\alpha_5\beta_1$ (FNR) 発現の乏しい Chinese hamster ovary (CHO) 細胞株はヌードマウスに移植後の発育がきわめて早いこと³¹、および CHO 細胞へ $\alpha_5\beta_1$ cDNA をトランスフェクト (導入) すると移動能の低下とヌードマウス移植腫瘍の発育低下が起り、FN はむしろ蓄積されると報告されている^{32,33}。従って今回の研究成績、即ち FNR の発現とリンパ節高転移群との関係は一見矛盾しているように見える。これは、おそらく、今回の研究では抗 $\alpha_5\beta_1$ ポリクローナル抗体を用いて解析したことによるものと思われる。最近、Oda ら³⁴は同様のポリクローナル抗体を用いて乳癌での発現を検討し、リンパ節高転移症例にトランスフォーミング成長因子ベータ (transforming growth factor β , TGF β) の発現のみならず、FNR、細胞周囲の FN の免疫染色性が高いことを示し、FNR の発現と乳癌の浸潤性・リンパ節転移能とは関連があると推定した。一方、合成ペプチドや特異抗体を用いた実験では、フィブロネクチン細胞接着ドメインの細胞接着認識ペプチド GRGDS (glycine-arginine-glycine-aspar-

tic acid-serine) 投与でメラノーマ細胞のコロニー形成能は低下すること³⁵、抗 β_1 モノクローナル抗体投与によってヒト癌細胞株の接着・浸潤・転移性およびヌードマウス移植腫瘍の発育が低下すること^{36,37}などが報告されている。おそらく、今回用いた抗 $\alpha_5\beta_1$ ポリクローナル抗体は細胞表面の $\alpha_5\beta_1$ (FNR) のみならず、 β_1 サブユニットをも認識し、このために β_1 群の発現を陽性としてとらえたものとも考えられる。組織の腫瘍細胞ではしばしば β_1 サブユニットが不均等に分布局在すること³⁸、大腸組織では β_1 サブユニットの発現が腺腫に 100% であるが癌では 80% に低下すること³⁹、抗 β_1 抗体によって細胞の接着・伸展は阻害されること⁴⁰、また、ヒト癌細胞株は FN, LM, コラーゲンの基質上で共通に抗 β_1 抗体によってその移動・浸潤性を低下させること³⁹、 $\alpha_5\beta_1$ (FNR) は乳癌で低下するが β_1 サブユニットの発現と低分化腺癌とは関連があること⁴¹など、 β_1 サブユニットと腫瘍悪性形質との関連を示唆する報告が多い。従って、今回の FNR 陽性胃癌がリンパ節高転移性を示すことについては β_1 サブユニットに対する反応も重複していることによると推定されるが、この点については、再度抗体の精度を確認する必要がある。しかし、これまでの報告のように、おそらく細胞株や組織の違いによって FNR は異なった発現をすることも十分考えられる。

次に悪性腫瘍における LM および LMR の発現についてである。LM は基底膜の主要構成成分であり、A 鎖、B₁ 鎖、B₂ 鎖より成る巨大糖蛋白である¹⁹。LM との細胞接着レセプターとして現在、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_3\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ 、 $\alpha_7\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ 、 $\alpha_6\beta_4$ 、が知られている¹²。古典的な LMR は $\alpha_5\beta_1$ インテグリンであるが、 $\alpha_6\beta_4$ インテグリンが上皮細胞に発現し半接着斑に局在すること⁴²や、低分化乳癌では $\alpha_6\beta_4$ の減少が特徴的である⁴³ことを考慮して、今回は LMR の α_6 サブユニット (LMRS) に対するモノクローナル抗体^{24,44}を用いて検索した。また、高浸潤性の大腸癌細胞株は $\alpha_5\beta_1$ を発現せず $\alpha_6\beta_4$ を発現すること⁴⁵も参考にした。一般にこ

Table 7. Analysis of immunohistochemical stainings of PLP-fixed tissues and clinicopathological variables of 29 cases of gastric carcinoma

Clinico-pathological items	Integrins						Basement membrane							
	VNR		FNR		LMRS		FN		LM		IV C		HSPG	
	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±	+	±
Small cluster	11	7	15	3	11	7	7	11	5	13	4	14*	4	14
Large cluster	2	9*	8	3	8	3	3	8	5	6	7	4	5	6
Desmoplasia	6	8	10	4	7	7	1	13*	4	10	3	11	3	11
Non-desmoplasia	7	8	13	2	12	3	8	7	6	9	8	7	6	9
n (-)+n ₁ (+)	7	12	13	6	10	9	4	15	7	12	8	11	6	13
n ₂ (+)+n ₃ (+)	6	4	10*	0	8	2	5	5	3	7	3	7	3	7
v ₁ - v ₃	3	3	6	0	4	2	3	3	3	3	3	3	3	3
v ₀	10	13	17	6	15	8	6	17	7	16	8	15	6	17

Symbols:

+, distinctly or continuously positive; ±, faintly or discontinuously positive; -, negative,

*, significant difference by Chi-square test (P<0.05).

Abbreviations:

n (-)+n₁, represents early stage of lymph node metastasis and n₂+n₃, advanced stage of lymph node metastasis; v₁-v₃ represents positive venous invasion and v₀, no venous invasion; according to the General Rules for the Gastric Cancer Study by Japanese Research society for Gastric Cancer.

れまでは LM および LMR の発現は浸潤性・転移能と関連するという研究が多い。たとえば、Dedhar ら⁴⁸⁾はヒト骨肉腫細胞株を N-methyl N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) によってより悪性な性格の細胞株に変えると、 $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ の発現が増加し、これは抗 α_6 抗体を投与することによってマトリゲルにおける浸潤性を75%阻害することができると報告した。Mortarini ら⁴⁹⁾は原発巣に比べ転移巣由来のヒトメラノーマ細胞に $\alpha_1\beta_1$ 、 $\alpha_2\beta_1$ 、 $\alpha_6\beta_1$ の発現が高いこと、Guirguis ら⁴⁸⁾は腫瘍細胞の伸展先端部には LMR の局在・発現があること、また、Iwamoto ら¹³⁾による報告では、転移性癌細胞では LMR の発現は高く、LM で処理した癌細胞株はヌードマウスに静脈注射すると肺への転移が著しく増加する¹³⁾ことなどである。しかし、大腸癌で肝転移の有無とインテグリン発現の関連を調べると、 α_6 サブユニット (LMRS) の発現は変動せずむしろ $\alpha_2\beta_1$ の発現が低下していること⁵⁰⁾が報告されており、組織の中でのインテグリンの発現とくに LMR については一定の見解は得られていない。本研究では、 α_6 サブユニット (LMRS) の免疫染色性は主要リガンドである LM の沈着・連続性と関連していた。これは基底膜の形成とも関連するものであった。しかし、浸潤性・転移進展度・細胞増殖活性など他の因子との間には特に関連を認めることはできなかった。おそらく LMR は生体内では腫瘍の進展過程でその程度・時期など複雑にからみ合って発現・消長するものであり、このことが今回中分化型管状腺癌に最もよく発現していたことを説明しているように思われる。

$\alpha_v\beta_3$ インテグリンは RGD ペプチドを認識して VN, FG, VWF, FN, TSP, DP, LM をリガンドとしているヴィトロネクチンレセプター (VNR) である⁵¹⁾。最近、メラノーマ細胞を用いた解析で、腫瘍細胞は FN, FG, VN と接着し移動して浸潤・転移能と関連して発現するインテグリンであると言われるようになった¹⁴⁾。とくに、 $\alpha_v\beta_3$ インテグリン (VNR) を発現しないヒト膀胱癌細胞に β_3 cDNA を導入して $\alpha_v\beta_3$ を発現誘導すると VN や FG に接着して移動するようになること⁴⁹⁾や、 α_v 遺伝子欠損メラノーマ細胞はヌードマウスでの腫瘍増殖能が低く、この現象は α_v 遺伝子を導入することで回復すること⁵⁰⁾などが証拠として提示されている。また、未分化表皮細胞の ndk 細胞では、浸潤性格と共に $\alpha_v\beta_1$ 、 $\alpha_v\beta_3$ の発現増加がみられること⁵¹⁾、ヒト破骨細胞のポドゾームの先端には β_3 サブユニットが集在すること⁵²⁾も知られている。組織内では、ヒトメラノーマの悪性病巣では垂直に浸潤・進展する場合に β_3 サブユニットが発現されること⁵³⁾、メラノーマの進展と $\alpha_v\beta_3$ の発現はよく関連すること⁵⁴⁾などが知られている。乳癌では α_v サブユニット発現とともに基底膜の断裂、不連続化が起ること⁵⁵⁾、腎癌の高悪性度群 (G-3) は低悪性度群 (G-1) に比べ α_6 サブユニット (LMRS) の減少と α_v サブユニットの発現をみること¹⁷⁾が報告されている。以上のような観点から今回の $\alpha_v\beta_3$ (VNR) の発現状態を検討してみると、VNR 陽性の胃癌は小型細胞集団をとり、間質の増生を伴いやすく、細胞増殖活性が高いという特徴をもっていた。今回、VN 免疫染色は施行しなかったが、VNR は VN のみならず FG, FN を接着リガンドとする、つまり血漿成分をリガンドとするインテグリンであることが注目される。つまり、血漿成分のびまん性に広がる間質、すなわち、組織の改築に相当する間質に適応して VNR は発現され、細胞の伸展、移動に関与し、ついで増殖に連動しているのではなからうか。VNR 陽性胃癌では FN はびまん性で基底膜の連続性は保たれ

ていないことが多い。メラノーマ細胞では VNR は FNR と共同して FN と結合すること⁵⁶⁾、また、 α_6 欠損 CHO 変異細胞株を用いた実験では FNR と VNR が共同に働いて接触走化性 (haptotaxis) を示すこと⁵⁷⁾などから、固相の組織内を腫瘍細胞が移動する際には複数のインテグリンの組合せが必要であり、これは細胞種類、組織、分化程度と組み合わせられて発現されるものと考えられる。この中で胃癌における局所浸潤性と VNR の発現はかなり関連のある現象としてとらえることができよう。VNR 陽性の胃癌細胞集団が PCNA 免疫染色で評価される細胞増殖能が高いことは浸潤・進展と結びつけて考えられることができる。接着分子は接着ということを通して、細胞増殖の調節にも関与していることが十分考えられるからである。たとえば、 α_v 遺伝子を $\alpha_v\beta_3$ 陰性の M21-L 細胞に導入しヌードマウスでの腫瘍発育状態をみると、 $\alpha_v\beta_3$ の発現とともに再び高腫瘍形成能を獲得することが観察されている⁵⁸⁾。

今回、細胞増殖能をメタカルン固定組織と PLP 固定組織で PCNA 免疫染色で検討した所、VNR 陽性群と陰性群の間 (PLP 固定組織) の他に、メタカルン固定組織の原発巣粘膜下層に浸潤する癌細胞でみるとリンパ節高転移群が低転移群に比べて細胞増殖活性が高かった。同様の検索を PLP 固定組織で行ったが、同様の傾向はみるものの、PCNA 陽性率のばらつきが大きく、有意の差は認められなかった。一般にメタカルン固定における PCNA 免疫染色は PLP 固定の場合に比べて染色性が鮮明で陽性陰性の判定が容易である²⁰⁾⁵⁸⁾⁵⁹⁾。また、正確に細胞周期の S 期を同定する bromodeoxyuridine (BrdU) のとりこみによる増殖活性に比べて、今回の PCNA の核内蓄積を指標とする細胞増殖活性はかなり幅の広い G₁後期から G₂期にかけての細胞を識別しているにすぎない⁶⁰⁾⁶¹⁾。従って、腫瘍の進展に伴って、胃癌は不規則、不均等な増殖を示し、ばらつきが大きく、全体としては進展に伴って細胞増殖が加速していると考えべきであろう。細胞増殖活性は膠様腺癌ではとくに低値であった。このような粘液産生能の強い癌では粘液内に浮んで長く生存していること⁵⁵⁾や胃癌の印環細胞癌でも同様の結果が得られていること⁶²⁾、また、内分泌細胞へ分化した胃癌細胞にはほとんど増殖活性がなく、おそらく G₀期に留まっていること⁶³⁾などから、膠様腺癌はもっぱら粘液の産生という高度に分化した機能の細胞群と考えるべきだと思われる。

結 論

PLP 固定胃癌組織34例、メタカルン固定胃癌組織10例につき、増殖細胞核抗原 (PCNA) にて細胞増殖能を、基底膜成分の沈着とインテグリンの発現・分布を指標として接着性を評価し、とくにインテグリンの分布とその意義について検討し、次の結論を得た。

1. 腫瘍細胞はリンパ節への腫瘍進展度とともに不規則に増殖するという特徴があった。組織型別には膠様腺癌の細胞増殖能は他の型に比べ有意に低値であった ($p < 0.01$)。
2. $\alpha_v\beta_3$ インテグリン (VNR) の陽性の胃癌では VNR 陰性のそれに比べ細胞増殖能が高かった ($p < 0.05$)。
3. $\alpha_6\beta_1$ インテグリン (FNR) の発現症例ではフィブロネクチン陽性、 α_6 サブユニット (LMRS) 発現胃癌ではラミニン陽性であった ($p < 0.05$)。
4. 組織型別の VNR, FNR, LMRS の発現については、VNR は pap で陰性、 tub_2 で陽性、LMRS は tub_2 で陽性で

あった ($p < 0.05$). FNR には一定の傾向はなかった. その他の組織学的所見との関連では, VNR は大きい腫瘍細胞群に発現が少なく, 小さく個々ばらばらな浸潤性格の腫瘍細胞に陽性であった ($p < 0.05$).

5. フィブロネクチンは基底膜領域において間質増生型胃癌(硬癌)で断続的または陰性であり, FNR はリンパ節への広汎な転移症例において陽性を示した. 基底膜成分のⅣ型コラーゲンは, 小さい腫瘍細胞群で不連続のことが多かった.

6. 間質増生群の胃癌とインテグリンの分布発現との間には特定の関連はなかったが, Ⅳ型コラーゲン, フィブロネクチンは陰性の傾向を示した.

以上より, 胃癌は癌の進展に伴って不規則な増殖を示すが, この中で VNR が小型細胞集団に発現されて局所の浸潤性に関連していること, および FNR の発現は腫瘍が間質への足場を確保してリンパ節へ進展し定着したことを示唆するものと考えられる.

謝 辞

稿を終えるに際し, 御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学第一病理学講座中西功夫教授に, 深く感謝の意を表します. また, 終始御指導, 御助言を頂きました第一病理学講座河原 栄講師ならびに第一病理学教室各位に厚く御礼申し上げます. 統計解析には, 金沢大学医療技術短期大学部理学療法学科灰田信英教授に御指導をいただき感謝いたします. さらに貴重な手術材料を提供して下さいました福井県済生会病院藤沢正清院長, 三浦将司診療部長をはじめ外科諸先生方に感謝いたします. 最後に本研究に御協力を頂きました第一病理学教室の技術員の皆様に感謝いたします.

文 献

- 1) 田原栄一: ヒト胃癌の発生・増殖・進展—分子病理学的アプローチ—. 日病会誌, 81, 21-49 (1992).
- 2) Liotta, L. A., Rao, C. N., & Barsky, S. H.: Tumor invasion and the extracellular matrix. *Lab. Invest.*, 49, 636-649 (1983).
- 3) Liotta, L. A.: Tumor invasion and metastasis: Role of the basement membrane. *Am. J. Pathol.*, 117, 339-348 (1984).
- 4) Behrens, J., Marul, M. M., Van Roy, F. M. & Birchmeier, W.: Dissecting tumor cell invasion: Epithelial cells acquire invasive properties after the loss of uvomorulin-mediated cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.*, 108, 2435-2447 (1989).
- 5) Frixen, U. H., Behrens, J., Sacks, M., Eberle, G., Voss, B., Warda, A., Löchner, D. & Birchmeier, W.: E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J. Cell Biol.*, 113, 173-185 (1991).
- 6) Shimoyama, Y. & Hirohashi, S.: Expression of E- and P-cadherin in gastric carcinomas. *Cancer Res.*, 51, 2185-2192 (1991).
- 7) Rouslahti, E. & Giancotti, F. G.: Integrins and tumor cell dissemination. *Cancer Cells*, 1, 119-126 (1989).
- 8) Albelda, S. M. & Buck, C. A.: Integrins and other cell adhesion molecules. *FASEB J.*, 4, 2868-2880 (1990).
- 9) Rouslahti, E.: Integrins. *J. Clin. Invest.*, 87, 1-5 (1991).
- 10) 済木育夫・米田純也: 細胞接着分子と癌転移. *実験医学*, 10, 66-72 (1992).
- 11) Hynes, R. O.: Integrins: A family of cell surface receptors. *Cell*, 48, 549-554 (1987).
- 12) Hynes, R. O.: Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion. *Cell*, 69, 11-25 (1992).
- 13) Iwamoto, Y., Robey, F. A., Graf, J., Sasaki, M., Kleinman, H. K., Yamada, Y. & Martin, G. R.: YIGSR, a synthetic laminin pentapeptide, inhibits experimental metastasis formation. *Science*, 238, 1132-1134 (1987).
- 14) Chersesh, D. A.: Structure, function and biological properties of integrin $\alpha_v \beta_3$ on human melanoma cells. *Cancer Metastasis Rev.*, 10, 3-10 (1991).
- 15) Bosman, F. T., Havenith, M. & Cleutjens, J. P. M.: Basement membranes in cancer. *Ultrastruct. Pathol.*, 8, 291-304 (1985).
- 16) Martin, G. R. & Timpl, R.: Laminin and other basement membrane components. *Annu. Rev. Cell Biol.*, 3, 57-85 (1987).
- 17) Korhonen, M., Laitinen, L., Ylännne, J., Koukoulis, G. K., Quaranta, V., Juusela, H., Gould, V. E. & Virtanen, I.: Integrin distributions in renal cell carcinomas of various grades of malignancy. *Am. J. Pathol.*, 141, 1161-1171 (1992).
- 18) Wright, P. A., Quirke, P., Attanoos, R. & Williams, G. T.: Molecular pathology of gastric carcinoma: progress and prospects. *Hum. Pathol.*, 23, 848-859 (1992).
- 19) Mclean, I. W. & Nakane, P. K.: Periodate-lysine-paraformaldehyde fixative. A new fixative for immunoelectron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 22, 1077-1083 (1974).
- 20) Garcia, R. L., Coltrera, M. D. & Gown, A. M.: Analysis of proliferative grade using anti-PCNA/cyclin monoclonal antibodies in fixed embedded tissues. Comparison with flow cytometric analysis. *Am. J. Pathol.*, 134, 733-739 (1989).
- 21) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約, 第11版, 42-47頁, 金原出版, 東京, 1985.
- 22) Minamoto, T., Ooi, A., Okada, Y., Mai, M., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Desmoplastic reaction of gastric carcinoma: A light and electron-microscopic immunohistochemical analysis using collagen type-specific antibodies. *Hum. Pathol.*, 19, 815-821 (1988).
- 23) Oda, Y., Kawahara, E., Minamoto, T., Ueda, Y., Ikeda, K., Nagai, Y. & Nakanishi, I.: Immunohistochemical studies on the tissue localization of collagen types I, III, IV, V and VI in schwannomas. Correlation with ultrastructural features of the extracellular matrix. *Virchows Arch. B Cell Pathol.*, 56, 153-163 (1988).
- 24) Sonnenberg, A., Modderman, P. W. & Hogervorst, F.: Laminin receptor on platelets in the integrin VLA-6. *Nature*, 336, 487-489 (1988).
- 25) Holgate, C. S., Jackson, P., Cowen, P. N. & Bird, C. C.: Immunogold-silver staining: New method of immunostaining with enhanced sensitivity. *J. Histochem. Cytochem.*, 31, 938-944 (1983).

- 26) Rouslahti, E.: Receptors for the RGD sequence and the integrin superfamily. *Science*, **238**, 492-497 (1987).
- 27) Christensen, L., Nielsen, M., Andersen, J. & Clemmensen, I.: Stromal fibronectin staining pattern and metastasizing ability of human breast carcinoma. *Cancer Res.*, **48**, 6227-6233 (1988).
- 28) Plantefaber, L. C. & Hynes, R. D.: Changes in integrin receptors on oncogenically transformed cells. *Cell*, **56**, 281-290 (1989).
- 29) Akiyama, S. K., Larjava, H. & Yamada, K. M.: Differences in the biosynthesis and localization of the integrin receptor in normal and transformed cultured human cells. *Cancer Res.*, **50**, 1601-1607 (1990).
- 30) Roman, J., LaChance, R. M., Broekelmann, T. J., Kennedy, C. J. R., Wayner, E. A., Carter, W. G. & McDonald, J. A.: The fibronectin receptor is organized by extracellular matrix fibronectin: Implications for oncogenic transformation and for cell recognition of fibronectin matrices. *J. Cell Biol.*, **108**, 2529-2543 (1989).
- 31) Schreiner, C., Fisher, M., Hussein, S. & Juliano, R. L.: Increased tumorigenicity of fibronectin receptor deficient Chinese hamster ovary cell variants. *Cancer Res.*, **51**, 1738-1740 (1991).
- 32) Giancotti, F. & Rouslahti, E.: Elevated levels of the $\alpha_5\beta_1$ fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell*, **60**, 849-859 (1990).
- 33) Bauer, J. S., Schreiner, C. L., Giancotti, F. G., Rouslahti, E. & Juliano, R. L.: Motility of fibronectin receptor-deficient cells on fibronectin and vitronectin: collaborative interactions among integrins. *J. Cell Biol.*, **116**, 477-487 (1992).
- 34) Oda, K., Hori, S., Itoh, H., Osamura, Y., Tokuda, Y., Kubota, M. & Tajima, T.: Immunohistochemical study of transforming growth factor β , fibronectin, and fibronectin receptor in invasive carcinoma. *Acta Pathol. Jpn.*, **42**, 645-650 (1992).
- 35) Humphries, M. J., Olden, K. & Yamada, K. M.: A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science*, **233**, 467-470 (1986).
- 36) Yamada, K. M., Kennedy, D. W., Yamada, S. S., Gralnick, H., Chen, W-T. & Akiyama, S. K.: Monoclonal antibody and synthetic peptide inhibitors of human tumor cell migration. *Cancer Res.*, **50**, 4485-4496 (1990).
- 37) Fujita, S., Suzuki, H., Kinoshita, M. & Hirohashi, S.: Inhibition of cell attachment, invasion and metastasis of carcinoma cells by anti-integrin β_1 subunit antibody. *Jpn. J. Cancer Res.*, **83**, 1317-1326 (1992).
- 38) Peltonen, J., Larjava, H., Jaakkola, S., Gralnick, H., Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Yamada, K. M. & Uitto, J.: Localization of integrin receptors for fibronectin, collagen, and laminin in human skin. Variable expression in basal and squamous cell carcinomas. *J. Clin. Invest.*, **84**, 1916-1923 (1989).
- 39) Koretz, K., Schlag, P., Bounsell, L. & Möller, P.: Expression of VLA- α_2 , VLA- α_6 , and VLA- β_1 chains in normal mucosa and adenomas of the colon, and in colon carcinomas and their liver metastases. *Am. J. Pathol.*, **138**, 741-750 (1991).
- 40) Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Chen, W-T. & Yamada, K. M.: Analysis of fibronectin receptor function with monoclonal antibodies: Role in cell adhesion, migration, matrix assembly, and cytoskeletal organization. *J. Cell Biol.*, **109**, 863-875 (1989).
- 41) Zutter, M. M., Mazoujian, G. & Santoro, S. A.: Decreased expression of integrin adhesive protein receptors in adenocarcinoma of the breast. *Am. J. Pathol.*, **137**, 1863-1870 (1990).
- 42) Sonnenberg, A., Calafat, J., Janssen, H., Daams, H., van der Raaij-Helmer, L. M. H., Falcioni, R., Kennel, S. J., Aplin, J. D., Baker, J., Loizidou, M. & Garrod, D.: Integrin $\alpha_6\beta_4$ complex is located in hemidesmosomes suggesting a major role in epidermal cell-basement membrane adhesion. *J. Cell Biol.*, **113**, 907-917 (1991).
- 43) Pignatelli, M., Cardillo, M. R., Hanby, A. & Stamp, G. W. H.: Integrins and their accessory adhesion molecules in mammary carcinomas: Loss of polarization in poorly differentiated tumors. *Hum. Pathol.*, **23**, 1159-1166 (1992).
- 44) Sonnenberg, A., Linders, C. J. T., Dreams, J. H. & Kennel, S. J.: The $\alpha_6\beta_4$ (VLA-6) and $\alpha_6\beta_4$ protein complexes: Tissue distribution and biochemical properties. *J. Cell Sci.*, **96**, 207-217 (1990).
- 45) Lee, E. C., Lotz, M. M., Steele, G. D. & Mercurio, A. M.: The integrin $\alpha_6\beta_4$ is a laminin receptor. *J. Cell Biol.*, **117**, 671-678 (1992).
- 46) Dedhar, S. & Saulmier, R.: Alternations in integrin receptor expression on chemically transformed human cells: Specific enhancement of laminin and collagen receptor complex. *J. Cell Biol.*, **110**, 481-489 (1990).
- 47) Mortarini, R., Anichini, A. & Parmiani, G.: Heterogeneity for integrin expression and cytokine-mediated VLA modulation can influence the adhesion of human melanoma cells to extracellular matrix proteins. *Int. J. Cancer*, **47**, 551-559 (1991).
- 48) Guirguis, R., Margulies, I., Taraboletti, G., Schiffmann, E. & Liotta, L.: Cytokine-induced pseudopodial protrusion is coupled to tumor cell migration. *Nature*, **329**, 261-263 (1987).
- 49) Leavesley, D. I., Ferguson, G. D., Wayner, E. A. & Cheresch, D. A.: Requirement of the integrin β_3 subunit for carcinoma cells spreading or migration on vitronectin and fibronogen. *J. Cell Biol.*, **117**, 1101-1107 (1992).
- 50) Felding-Habermann, B., Mueller, B. M., Romerdall, C. A. & Cheresch, D. A.: Involvement of integrin α_V gene expression in human melanoma tumorigenicity. *J. Clin. Invest.*, **89**, 2018-2022 (1992).
- 51) Adams, J. C. & Watt, F. M.: Expression of β_1 , β_3 ,

