

消化器癌転移における plasminogen activator の役割

浜松医科大学第2外科, * 同 第2生理

西野 暢彦 中村 昌樹 青木 克憲
今野 弘之 馬場 正三 高田 明和*

癌細胞由来の plasminogen activator (以下 PA) が消化器癌の浸潤, 転移にどのように関わっているかを検討した。免疫組織染色で胃癌の先進部や脈管侵襲部で urokinase (以下 UK) が強く染色された。胃癌および転移リンパ節で UK 値がそれぞれの健常組織に対して有意に増加していた (胃癌原発巣: 10.59 ± 10.61 unit/g vs 1.03 ± 0.72 n=17 p<0.01, リンパ節: 5.08 ± 1.72 vs 1.39 ± 0.50 n=9 p<0.05)。腹膜組織の UK 値は腹膜因子 P₀でも主病巣の深達度が se 以上では高値を示し, 逆に tissue-PA (以下 t-PA) 値は低値を示した。胃癌原発巣組織中の plasminogen activator inhibitor-I (以下 PAI-I) 値が高い症例ではリンパ節転移例が高い傾向を示した。食道, 胃, 大腸癌患者の血漿中 t-PA 値は control に対して低下していた。

癌組織局所での UK の活性化, 全身臓器での t-PA の低下など, PA が癌の浸潤や転移に深く関わることを示唆された。

Key words: cancer of digest organs, plasminogen activator, metastasis

はじめに

担癌生態において線溶活性が亢進すること¹⁾は古くから知られているが, 最近癌細胞由来の plasminogen activator (以下 PA) による線溶活性がこの現象の原因の1つとして注目されている²⁾。PA は凝固線溶系において plasminogen を plasmin に転換する線溶活性酵素であるが, この線溶活性作用により PA が癌の周囲浸潤, 遠隔転移などに直接的な役割を演ずることが推察されている^{2)~4)}。また最近 PA を特異的に抑制する plasminogen activator inhibitor (以下 PAI) の存在や癌との関係⁵⁾、PAI には I 型から III 型の 3 つの type があることやそれらの特性も明らかにされてきている⁶⁾。

腫瘍産生性の PA は urokinase (以下 UK), tissue plasminogen activator (以下 t-PA) の 2 つが知られているが最近では癌組織の浸潤にかかわる PA はおもに UK であることが判明している⁷⁾。われわれは食道, 胃, 大腸癌などの消化器癌が UK を産生していることをすでに報告した⁸⁾。今回の研究では, UK だけでなく

t-PA や PAI 特に PAI-I が癌の転移にどのようにかかわっているかを知る目的で消化器癌患者の血漿, 癌組織, および健常粘膜組織, リンパ節, 腹膜組織中の PA, PAI-I 量を測定し, stage や転移に伴う UK, t-PA, PAI-I の変化について検討した。

研究材料および方法

1) 血漿サンプル: 健康人および食道, 胃, 大腸癌患者の早朝空腹時の血液を 3.8% クエン酸ナトリウム入り採血管にて採取した後, 4℃ 3,000rpm 10分間遠沈し血漿を採取した。

2) 組織サンプル: 手術により摘出された胃癌組織および周辺健常粘膜, 転移および非転移リンパ節, 腹膜組織を 0.5g 採取し, 生理食塩水にて洗浄, 血液, 脂肪を除去した後に濾紙にて水分を除き, 細断, 10% NaCl, 0.1M Tris buffer とともに homogenize (4℃ 15分) し抽出液を 4℃, 12,000rpm で 30分遠沈し上澄をとりホモジネートを作製した。

これらの血漿, 組織サンプルは測定までマイナス 70℃ に凍結保存した。

3) UK, t-PA の測定: Takada ら⁹⁾の開発した高感度 enzyme immunoassay 法を用いた。この際使用した抗 UK ポリクローナル抗体は純化 UK (ミドリ十字社より供与) で家兎を免疫し作製した。また抗 UK モ

* 第36回日消外会総会シンポ I・消化器癌転移のメカニズム

<1990年12月12日受理> 別刷請求先: 西野 暢彦

〒431-31 浜松市半田町3600 浜松医科大学第2外科

Fig. 1 Amount of UK and t-PA in main stomach tumors and healthy gastric mucosa

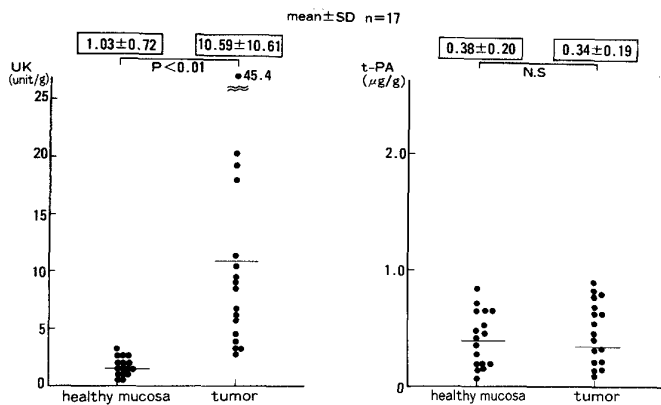


Fig. 2 Immunohistochemical staining of UK in tissue of stomach cancer (×200)



ノクローナル抗体は Fusi Chemical Industries 社製のものを用いた。抗 t-PA ポリクローナル抗体は t-PA (第一製薬, 東洋紡) にて家兎を免疫して作製した。また抗 UK モノクローナル抗体は Imco 社 (Sweden) のものを使用した。

4) 組織中 PAI-I: Tintelize PAI-I Kit を用いて測定した。

5) UK, PAI-I の免疫組織染色: Dako Apaap Kit を用いた。1 次抗体は抗 UK および抗 PAI-I モノクローナル抗体 (American diagnostica inc.) を使用した。

胃癌の病期は胃癌取扱い規約¹⁰⁾にもとづき行った。統計学的処理は Student-t 検定にて施行した。

結 果

1) 組織中 plasminogen activator

胃癌組織中 UK 値は健常胃粘膜 1.03 ± 0.72 unit/g に対し 10.59 ± 10.61 unit/g と有意に高値を示したが、

Fig. 3 Amount of UK and t-PA in lymph node

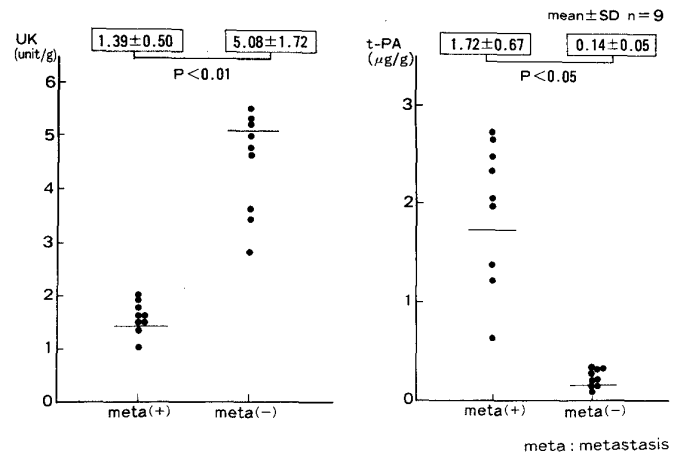


Fig. 4 Amount of UK and t-PA in peritoneum Horizontal axis shows depth of main stomach tuors. P (+) shows peritoneal metastasis.

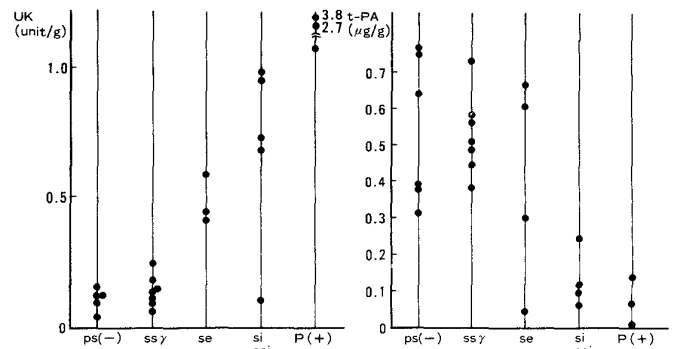
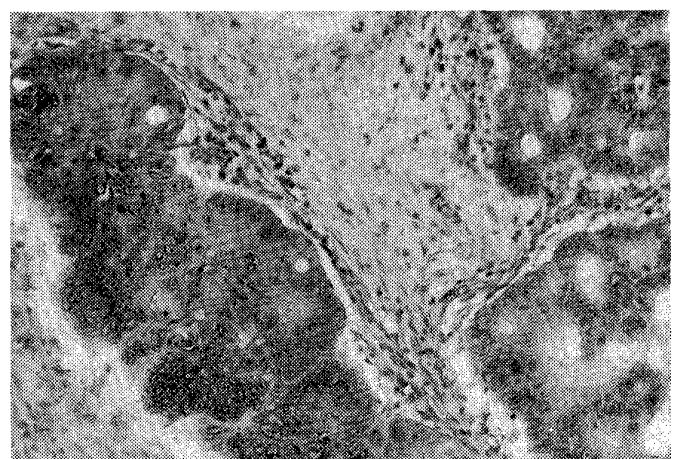


Fig. 5 Immunohistochemical staining of PAI-I in tissue of stomach cancer (×200)



t-PA 値は周辺健常粘膜と差を認めなかった (Fig. 1)。免疫組織学的の検討においても胃癌細胞内に瀰漫性に UK が認められた (Fig. 2)。リンパ節中の UK 値は、非転移リンパ節に対し転移リンパ節で有意に高値を示

し, また t-PA 値は逆に有意に低値を示した(Fig. 3).

次に, 予後の漿膜面因子 PS (+) 群の腹膜組織中の PA が PS (-) 群と差を認めるかどうかを検討した.

Fig. 4 は胃癌症例の腹膜組織中の UK 値を原発巣の深達度別に検討した結果を示す. 腹膜組織中の UK 値は原発巣の深達度が進むに従い高値を示し, 特に PS (+) のものの内, 原発巣の深達度が se, sei, si のもので肉眼的腹膜因子が P₀ でもすでに UK が高値を示し

た. さらに P (+) の腹膜では, UK はそれ以上の高値を示した. 逆に腹膜組織中の t-PA 値は, 深達度が進むに従い低値を示すようになり, 特に深達度 sei, si で P₀ のもの, また P (+) のものでは全例低値を示した.

2) 組織中 plasminogen activato inhibitor

抗 PAI-I 抗体を用いた胃癌組織の免疫組織染色では胃癌細胞に一致して瀰漫性に PAI-I が認められた(Fig. 5).

Fig. 6 に胃癌原発巣組織中の PAI-I 値とリンパ節転移との関係を示す. 胃癌原発巣組織の PAI-I 値が高い例では有意にリンパ節転移が高かった. また原発巣の UK 値とリンパ節転移の間には相関は認められ

Fig. 6 Amount of PAI-I in main stomach tumors. n₀: no lymph node metastasis, n (+): lymph node metastasis (+)

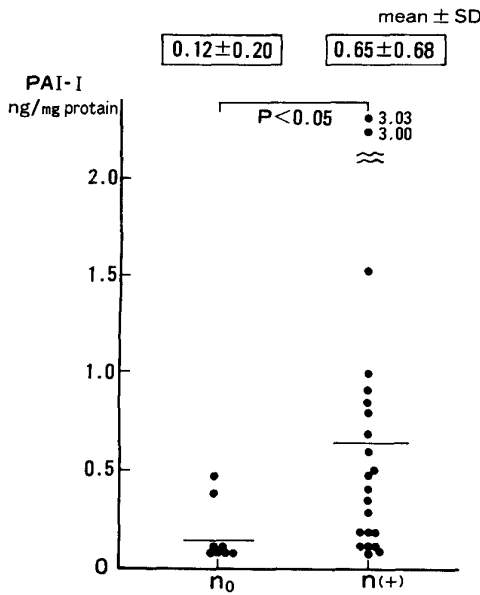


Fig. 7 Amount of t-PA in plasma of patients with cancer

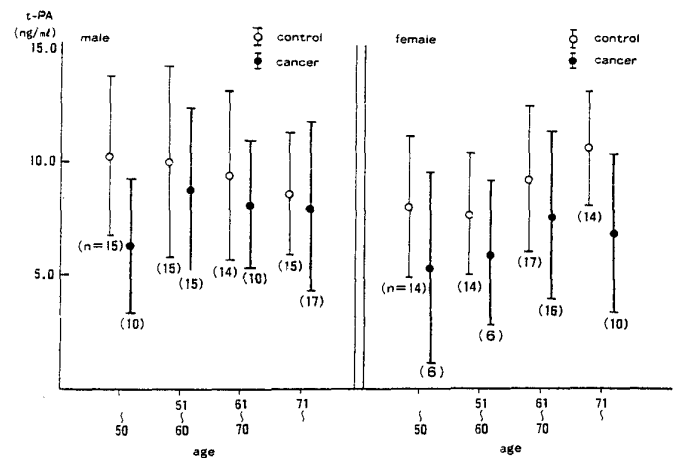
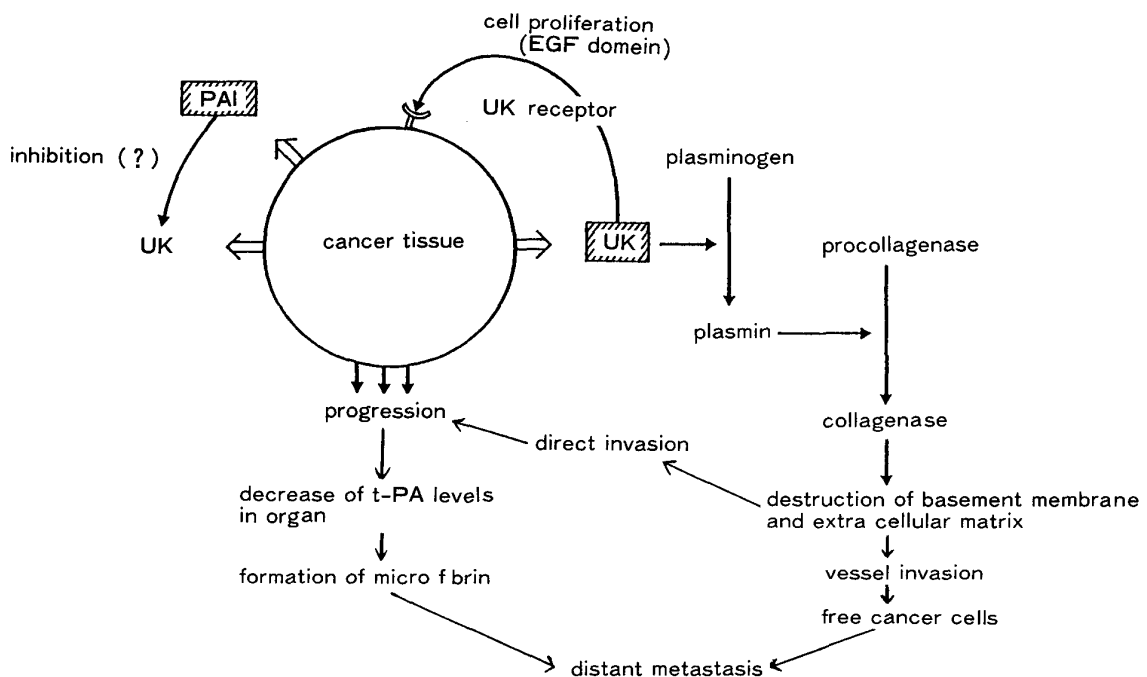


Fig. 8



なかった。

3) 食道, 胃, 大腸癌患者の血漿中 t-PA 値

Fig. 7に示されるようにこれらの消化器癌患者の血漿中の t-PA 値は control に対して低下する傾向を認めた。

考 察

1970年の後半から欧米で, 癌と plasminogen activator (以下 PA) に関する論文が発表され, 特に tissue plasminogen activator (以下 t-PA) の発見¹¹⁾をもとに, その報告が毎年増加している。これまでに培養細胞や直接腫瘍組織を用いて腫瘍細胞の持つ PA の種類や性質が検討されてきた¹²⁾¹³⁾結果, 腫瘍が持つ PA に違いがあること^{14)~16)}, すなわちその発生臓器によって UK を有するもの, t-PA を有するもの, また両者を有するものがあること, 加えて腫瘍が持つ PA の量や種別により予後に差を認める¹⁷⁾こと, PA 自体が細胞増殖作用を有する¹⁸⁾ことなどが報告されている。最近では腫瘍の浸潤や転移に関わる PA はおもに UK であることが判明してきた⁷⁾。さらにこれらの PA の inhibitor である plasminogen activator inhibitor (以下 PAI) の存在やこれらの性質, 癌との関係の研究も進んできている。われわれも食道癌, 胃癌, 大腸癌はすべて UK を有す腫瘍であること, これに伴いこれらの癌患者の尿中で UK が増加し, 尿中 UK 量の測定は癌再発の1つの指標になりうることを報告した⁸⁾。

今回の検討では, 腹膜組織における PA の動態に興味ある新知見を得た。すなわち腫瘍組織中の UK 値は ps (-) 群ではまったく増加していないのに対して, 腹膜因子 P(+) の腹膜で有意に増加しており, さらに P₀でも深達度 se, sei, si では腹膜中の UK 値が増加する症例を認めた。この増加が癌細胞由来の UK とするならば, P₀でも micro level での腹膜播種の危険が想定される。逆に t-PA は P(+) の腹膜では全例低下しており, また P₀で深達度 se, sei, si の症例でも低値例を認めた。t-PA は血管内皮で産生されるが, 広範囲の腹膜では血管成分が減少するという事は考えにくく, 癌の進展に伴い腹膜中の組織線容が低下し, それに伴う microfibrin の形成などにより腹膜播種準備状態がじゃっ起されているとも考えられる。

Fig. 8は癌の転移のメカニズムに対する PA や PAI の役割の仮説を模式化したものである。今回の検討より, 癌の原発巣や転移巣において癌細胞から活発に産生, 分泌された UK は, plasmin, collagenase を介して基底膜や間質を破壊し周囲組織へ浸潤を助長す

る。さらに血管内へ遊離癌細胞を送り込み, 一方全身臓器の t-PA の低下は micro fibrin の形成など遊離癌細胞の着床に有利な状態を形成しており, 以上の機序は遠隔転移の成立に深く関与すると考えられる。一点 UK の inhibitor である PAI-I は, UK 誘導性の癌の浸潤を抑制するであろうという予想に反して, PAI-I 高値の癌ではリンパ節転移率が高いという結果を得た。PAI の増加は癌産生性の UK を抑制するというよりは他のメカニズムで転移に関与していると考えられ, 今後の検討課題と考えている。

本研究の一部は文部省科学研究費一般研究 (C) 課題番号 01570752 より援助を受けた。

文 献

- 1) Rennie JAN, Ogston D: Fibrinolytic activity in malignant disease. *J Clin Pathol* 28 : 872—874, 1975
- 2) Dano K, Andreasen PA, Grondahl-Hansen J et al: Plasminogen activator, tissue degradation and cancer. *Cancer Res* 44 : 140—240, 1985
- 3) Carlsen SA, Ramshaw IA, Warrington RC: Involvement of plasminogen activator production with tumor metastasis in a rat model. *Cancer Res* 44 : 3012—3016, 1984
- 4) Duffy MJ, Grady PO: Plasminogen and cancer. *Eur J Cancer Clin Oncol* 20 : 577—582, 1984
- 5) Feinberg RF, Kao L-C, Haimowitz JE et al: Plasminogen activator inhibitor type 1 and type 2 in human trophoblasts. *Labo Invest* 61 : 20—26, 1989
- 6) Kruithof EKO: Plasminogen activator inhibitors—A review. *Enzyme* 40 : 20—26, 1988
- 7) Laiho M, Keski-Oja J: Growth factors in regulation of peri cellular proteolysis: A review. *Cancer Res* 49 : 2533—2553, 1989
- 8) Nishino N, Aoki K, Tokura Y et al: The urokinase type of plasminogen activator in cancer of digestive tracts. *Thromb Res* 50 : 527—535, 1988
- 9) Takada A, Shizume K, Ozawa T: Characterization of various antibody against tissue plasminogen activator using highly sensitive enzyme immunoassay. *Thromb Res* 42 : 63—72, 1986
- 10) 胃癌研究会編: 胃癌取扱い規約. 第11版. 金原出版, 東京, 1985
- 11) Kucinski CS, Fletcher AP: Effect of urokinase antiserum on plasminogen activators; demonstration of immunologic dissimilarity between plasma plasminogen activator and urokinase. *J Clin Invest* 47 : 1238—1253, 1968

- 12) Naito S, Sueishi K, Hattori F et al: Immunological analysis of plasminogen activators from cultured human cancer cells. *Virchows Arch [A]* 387: 251—257, 1980
- 13) Kohga S, Harvey SR, Weaver RM: Localization of plasminogen activators in human colon cancer by immuno peroxidase staining. *Cancer Res* 45: 1787—1796, 1985
- 14) Wilson EL, Dowdle E: Secretion of plasminogen activator by normal reactive and neoplastic human tissue cultured in vitro. *Int J Cancer* 22: 390—399, 1978
- 15) Tucker WS, Kirsch WM, Hernandez AM et al: In vitro plasminogen activator activity in human brain tumors. *Cancer Res* 38: 297—392, 1978
- 16) Szczepanski M, Lucer C, Zawadzki J et al: Procoagulant and fibrinolytic activities of gastric and colorectal cancer. *Int J Cancer* 30: 329—333, 1982
- 17) Wilson EL, Jacobs P, Dowdle EB: The secretion of plasminogen activators by human myeloid leukemic cells in vitro. *Blood* 61: 568—574, 1983
- 18) Kirchheimer JC, Wojta J, Christ G et al: Proliferation of a human epidermal tumor cell line stimulated by urokinase. *FASEB J* 1: 125—128, 1987

The Role of Plasminogen Activator for Metastasis in Cancer of Digestive Organs

Nobuhiko Nishino, Masaki Nakamura, Katsunori Aoki, Hiroyuki Konno,
Syozo Baba and Akikazu Takada*

Second Department of Surgery, Second Department of Physiology* Hamamatsu University School of Medicine

The relationship between plasminogen activator derived from cancer cell and metastasis in cancer of digestive organs was investigated. Immunohistochemical staining showed strong stain of urokinase (UK) and plasminogen activator inhibitor (PAI-I) in tumor cells, especially advanced site of main tumor. Main tumor and metastatic lymph node showed higher levels of UK than normal tissues of stomach and lymph node. In contrast to UK levels, the amount of tissue plasminogen activator (t-PA) were not different between tumor tissues and normal tissues in stomach, and decreased in metastatic lymph node. UK levels in peritoneum showed higher rate in case which depth of main tumor was deeper than superficial (s exposed) even though there was no peritoneal metastasis grossly, in contrast t-PA levels in peritoneum were lower in such case. High PAI-I levels of main gastric tumors showed high tendency of lymph node metastasis. Plasma t-PA levels in patients with cancer of esophagus, stomach and colorectum tended to show lower rate than those of healthy controls. It was speculated that activation of UK derived from cancer cells and systemic decrease of t-PA related to local invasion and metastasis of cancer.

Reprint requests: Nobuhiko Nishino Department of Surgery II, School of Medicine, Hamamatsu Medical University
3600 Handa-cho, Hamamatsu, 431-31 JAPAN