

学 位 論 文 題 名

早期胃癌基底膜のラミニン，フィブロネクチンと
腫瘍進展過程との関係
—免疫組織化学的検討—

学位論文内容の要旨

研究目的

これまで胃癌と基底膜の構成成分であるLaminin（以下LN）とFibronectin（以下FN）との関係については、主に進行癌を中心とした検討が多く、その成績も一定してはいない。胃癌細胞が浸潤していく過程において、基底膜の変化が重要な役割を演じていることが予想されるが、早期胃癌を対象とした詳細な検討はほとんど行なわれていない。本研究は、陥凹型早期胃癌IIcを対象に、胃癌細胞の基底膜におけるLNとFNの局在を免疫組織化学的に検討し、これらの変化と胃癌の組織型、周囲への進行度、浸潤形態との関係について考察した。対象と方法

研究材料には北海道大学第一内科及び北海道対がん協会にて1987年から1990年の間に発見され、切除されたIIc型早期胃癌78例（粘膜内癌-以下m癌36例、粘膜下層癌-以下sm癌42例）を用いた。材料とした78例は同期間に北海道対がん協会で見られた全IIc型早期胃癌292例の表面積を算出、平均値±標準偏差以内のものを選出した。男女比は1.7:1、平均年齢は 58.9 ± 11.0 歳、平均表面積は 3.7 ± 0.7 cm²であった。

切除標本を固定後、パラフィン包埋ブロックを作成し、厚さ4 μ mの連続切片を作成した。免疫組織化学的染色は脱パラフィン後、ABC法により行なった。一次抗体はウサギ抗ラットLN抗体とウサギ抗ヒトFN抗体を用い、ビオチン化抗ウサギIgGを二次抗体として反応させ、DABにて発色させた。

LN、FNの染色性の評価は、癌-間質境界部において、連続的に全周性に染色されたものをcontinuous pattern（C pattern）、断片的に認めるものをdiscontinuous pattern（D pattern）、染色性を全く示さないものをnegative pattern（N pattern）とした。

切除標本の病理学的検討は「胃癌取扱い規約」に従って行なった。組織型は管状腺癌（tub1, tub2）、低分化腺癌（por）に分類した。また、sm胃癌の粘膜下層における浸潤増殖様式を、Expansive type（Inf α , Inf β ）とInfiltrative type（Inf γ ）に分けて検討した。統計処理は、 χ^2 検定を行ない、 $p=0.05$ 以下を有意差ありと判定した。

結果

（1）組織型と基底膜の染色性

癌-間質境界部におけるLNの染色性は、管状腺癌ではC patternが51.9%、D patternが44.2%、N patternは3.9%であった。一方、低分化腺癌ではD patternは38.5%、N patternは61.5%でC patternは存在せず、LNの染色性は低分化腺癌で有意に低下していた（ $p<0.01$ ）。

FNは管状腺癌でC patternが25.0%, D patternが50.0%, N patternが25.0%であった。低分化腺癌ではD patternが19.2%, N patternが80.8%でC patternは存在せず, LNと同様に低分化腺癌でFNの染色性が有意に低下していた ($p<0.05$)。また同一標本においてLNとFNの染色性を比較すると, LNに比べFNの染色性が低下している例が多かった ($p<0.05$)。

(2) 粘膜内病巣におけるm癌とsm癌の基底膜の染色性

粘膜内病巣においてm癌とsm癌がその基底膜の性格を異にするかを検討した。m癌とsm癌の粘膜内病巣での基底膜の染色性はLN, FNともに差は認めなかった。組織型別の検討でも同様の結果であった。

(3) sm癌における粘膜層と粘膜下層における基底膜の染色性

sm癌について, 粘膜内病巣と粘膜下層での基底膜の染色性を比較した。LNは粘膜内病巣ではC patternが33.3%, D patternは47.7%, N patternは19.0%であったのに対し, 粘膜下層ではC patternが11.9%, D patternは31.0%, N patternは57.1%と, 粘膜下層で染色性が有意に低下していた ($p<0.01$)。これに対し, FNは粘膜内病巣と粘膜下層で染色性に有意な差は認めなかった。

またsm癌42例中, 粘膜内病巣と粘膜下層で組織型が変化している例が16例 (38.1%) に存在した。分化度の低下が基底膜の評価に影響があると考えられるため, LNについて組織が一致していた26例について検討したところ, 先の結果と同様に粘膜下層で染色性の有意な低下を認めた ($p<0.05$)。

(4) 周囲への浸潤増殖様式と基底膜の染色性

sm胃癌42例についてExpansive type (17例) とInfiltrative type (25例) に分けて, 基底膜の染色性を検討した。LNはExpansive typeでC patternが23.5%, D patternは53.0%, N patternは23.5%であったのに対し, Infiltrative typeではC patternが4.0%, D patternは28.0%, N patternは68.0%と, Infiltrative typeで有意に染色性が低下していた ($p<0.05$)。FNは浸潤増殖様式とは明らかな相関を認めなかった。

考案

胃癌と基底膜構成成分であるLN, FNの臨床病理学的関係を明らかにすべく, II c型早期胃癌を対象に免疫組織化学的に検討した。

II c型早期胃癌の各組織型とLN, FNの基底膜部の染色性との関係は, 正常胃腺組織に比べ, どの組織型においてもLN, FNの染色性は低下していたが, 管状腺癌に比べ低分化腺癌で染色性の有意な低下を認めた。これは乳癌, 大腸癌, また直腸癌で報告されたものと同様である。このことは, 管状腺癌に比べ, 低分化腺癌では明瞭な腺管形成を伴わないという病理学的所見を反映しているものと思われる。

m癌とsm癌について, 粘膜内病巣での基底膜の染色性の比較では両者に差は認めなかったが, sm癌の粘膜内病巣と先進部の比較では, 先進部で有意に基底膜部でのLNの染色性が低下していた。さらに粘膜下層への浸潤増殖様式とLNの染色性の検討では, Expansive typeに比べ, Infiltrative typeで有意なLNの染色性の低下を認めた。このことは, 基底膜からのLNの消失が細胞間の接着性の低下をもたらし, その結果として粘膜下層への進展を容易にし, さらにinfiltrativeな発育形態を示したものと考えている。

LNの基底膜における染色性が断裂, 消失していた例で予後が不良であったとの報告は直腸癌, 膀胱癌でもされており, LNの存在が癌の浸潤に対し防御的に働いているとしている。転移が成立するためにはその第一段階として上皮内癌から間質へ浸潤する過程が必要である。一般に胃癌にかかわらず癌組織は多彩な組織系を呈することが多く, また同一組織内でも腫瘍細胞の細胞間結合, 基底膜の破壊・形成不全などにおいて多様性を示すことが予想される。基底膜, 特に接着能を有するLNの染色性が先進部において低下, 消失していたという今回の結果は, その発育過程で間質浸潤能を獲得した集団の出現を意味し, 予後不良因子

の1つであったとする先の結果を裏付けるものと思われた。

さらにFNの染色性も検討したが、胃癌の浸潤性発育との間には明らかな相関は認めなかった。その理由としてFNの染色性が粘膜内病巣の段階で既に失われる傾向にあったことが挙げられる。Martinez-Hernandezらは基底膜構成成分の中でも、LN, type IV collagenやHeparinは細胞により作られることより”intrinsic components”とし、一方FNは細胞外に由来することより”extrinsic components”と分けて呼ぶことを提唱している。このような生理学的、形態学的な差異が基底膜におけるLNとFNの染色性の差として現われていると考えられる。

結語

基底膜の構成成分の1つであるLNはその接着活性の存在から胃癌細胞の浸潤に対してバリアーとして働いており、その破壊は胃癌細胞が浸潤能を獲得したことを意味すると思われた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 川 上 義 和

副 査 教 授 吉 木 敬

副 査 教 授 浅 香 正 博

学 位 論 文 題 名

早期胃癌基底膜のラミニン，フィブロネクチンと

腫瘍進展過程との関係

－免疫組織化学的検討－

これまで胃癌と基底膜の構成成分であるラミニン（以下 LN）とフィブロネクチン（以下 FN）との関係については，主に進行癌を中心とした検討が多く，早期胃癌を対象とした詳細な検討はほとんど行なわれていない。本研究は，陥凹型早期胃癌 IIc を対象に，胃癌細胞の基底膜における LN と FN の局在を免疫組織化学的に検討し，これらの変化と胃癌の組織型，周囲への進行度，浸潤形態との関係について考察した。研究対象は北海道大学第一内科及び北海道対がん協会にて 1987 年から 1990 年の間に発見され，切除された II c 型早期胃癌 78 例（粘膜内癌-以下 m 癌 36 例，粘膜下層癌-以下 sm 癌 42 例）を用いた。材料とした 78 例は同期間に北海道対がん協会で見られた全 II c 型早期胃癌 292 例の表面積を算出，平均値±標準偏差以内のものを選出した。男女比は 1.7 : 1，平均年齢は 58.9（平均値）±11.0（標準偏差）歳，平均表面積は $3.7 \pm 0.7 \text{cm}^2$ であった。切除標本の免疫組織化学的染色は脱パラフィン後，ABC 法により行なった。一次抗体はウサギ抗ラット LN 抗体とウサギ抗ヒト FN 抗体を用いた。基底膜の染色性の評価は，連続的に全周性に染色されたものを continuous pattern，断片的に認めるものを discontinuous pattern，染色性を全く示さないものを negative pattern とした。切除標本の病理学的検討は「第 12 版胃癌取扱い規約」に従って行なった。組織型は管状腺癌（tub1, tub2），低分化腺癌（por）に分類した。また，sm 胃癌の粘膜下層における浸潤増殖様式を，Expansive type（Inf α ，Inf β ）と Infiltrative type（Inf γ ）に分けて検討した。統計処理は， χ^2 検定を行ない， $p=0.05$ 以下を有意差ありと判定した。結果は，胃癌細胞の腺管基底膜における LN，FN の染色性は，管状腺癌に比べ，低分化腺癌で低下していた。m 癌と sm 癌の粘膜内病巣で比較すると，基底膜の染色性は LN，FN とともに差はなかった。sm 癌の粘膜内病巣と粘膜下病巣で比較すると，LN の染色性が粘膜下層で有意に低下していた。FN の染色性には差を認めなかった。sm 癌の粘膜下層への浸潤形態との比

較では、Expansive type に比べ Infiltrative type で基底膜における LN の染色性が低下していた。LN の基底膜における染色性が断裂、消失していた例で予後が不良であったとの報告は直腸癌、膀胱癌でもされており、LN の存在が癌の浸潤に対し防御的に働いているとしている。転移が成立するためにはその第一段階として上皮内癌から間質へ浸潤する過程が必要である。一般に胃癌にかかわらず癌組織は多彩な組織系を呈することが多く、また同一組織内でも腫瘍細胞の細胞間結合、基底膜の破壊・形成不全などにおいて多様性を示すことが予想される。基底膜、特に接着能を有する LN の染色性が先進部において低下、消失していたという今回の結果は、その発育過程で間質浸潤能を獲得した集団の出現を意味し、予後不良因子の 1 つであったとする先の結果を裏付けるものと思われた。結論として、LN は基底膜の構成成分であるとともにそれ自身が生理機能として細胞接着に強く関係していることから、その量的、質的変化は早期胃癌の進行、浸潤形態に影響を与えていることを明らかにした。

審査に当たって、主査川上教授より、基底膜の染色性の定量的評価の判定基準と客観性についての質問があった。

副査吉木教授からは 1. ラミニンの消失と 4 型コラーゲンなどの他の基底膜構成成分との関係、2. ラミニンの消失と悪性度としての生物学的予後との関係、3. 細胞外マトリックス分解酵素の関与について質問があった。

副査浅香教授からは、1. ラミニンの活性低下と間質からの分解酵素の関係、2. フィブロネクチンとラミニンの染色性の差について、3. 非特異的反応について抗原アッセイを用いた検討、4. 培養細胞を用いた細胞外マトリックス活性の検討について質問があった。申請者はこれらに対しておおむね適切な解答を行った。

この研究は、胃癌の進行ならびに浸潤形態と基底膜におけるラミニンの染色動態の関係を考察し、早期胃癌の進展過程を解明する上で貴重なものと評価される。

審査員一同は早期胃癌の進展過程と基底膜の関係を解明した研究として高く評価し、博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。