

学位論文
Doctor's Thesis

論文名 : 大腸上皮性腫瘍における IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖の組織特異的発現
Differential distribution of basement membrane type IV collagen $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 5(IV)$, and $\alpha 6(IV)$ chains in colorectal epithelial tumors

比企 裕
Yutaka Hiki

指導教官
熊本大学大学院医学研究科外科学第二講座
小川 道雄

| | | |
|------|------------------|------|
| 審査員名 | 1) 病理学第一講座担当教授 | 吉永 秀 |
| | 2) 病理学第二講座担当教授 | 竹屋元裕 |
| | 3) 歯科口腔外科学講座担当教授 | 篠原正徳 |
| | 4) 分子病理学講座担当教授 | 山本哲郎 |

2002 年 3 月

目次

| | |
|-----------------------------|-------|
| 要旨 | 1-2 |
| Summary | 3 |
| 発表論文リスト | 4 |
| 謝辞 | 5 |
| 略号 | 6 |
| | |
| 第1章 研究の背景と目的 | 7-14 |
| 1) 基底膜およびIV型コラーゲン | 7-11 |
| 2) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP) | 11 |
| 3) 正常大腸上皮における基底膜 | 12 |
| 4) 大腸癌における日本と欧米の病理診断の差異 | 13-14 |
| 5) 目的 | 14 |
| | |
| 第2章 対象と実験方法 | 15-23 |
| 1) 対象 | 15 |
| 2) 実験方法 | 15-23 |
| i) 組織検体作製 | 15-16 |
| a) 凍結薄切標本 | 15 |
| b) パラフィンブロック薄切標本 | 16 |
| ii) 免疫組織化学 | 16-23 |
| a) 一次抗体 | 16-17 |
| b) パラフィン薄切標本における至適免疫染色条件の設定 | 18 |
| c) 免疫染色の手技 | 18-22 |
| c) 免疫染色結果の判定 | 23 |

| | |
|---------------------------------------------------------------------------|-------|
| 第3章 結果 | 24-32 |
| 1) IV型コラーゲン α 鎖の免疫組織化学的検討 | 24-26 |
| i) 正常大腸組織における $\alpha 1(\text{IV})\sim\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現 | 25 |
| ii) 管状腺腫 (adenoma) における $\alpha 1(\text{IV})\sim\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現 | 25 |
| iii) 大腸癌における $\alpha 1(\text{IV})\sim\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現 | 25-26 |
| 2) 大腸癌における MMP-2・MMP-9・MT1-MMP の発現 | 26 |
| i) MMP-2・MT1-MMP の発現 | 26 |
| ii) MMP-9 の発現 | 26 |
| 第4章 考察 | 33-37 |
| 1) 免疫染色の条件 | 33 |
| 2) 正常大腸粘膜における IV型コラーゲン α 鎖の分布 | 33-34 |
| 3) 大腸新生物における IV型コラーゲン α 鎖の分布 | 34 |
| 4) 大腸癌浸潤・転移における IV型コラーゲン α 鎖の分布と MMP の関係 | 34-35 |
| 5) 日本と欧米における粘膜内癌の病理診断の差異 | 35-37 |
| 6) まとめ (臨床的・病理学的大腸癌の浸潤・転移について) | 37 |
| 参考文献 | 38-42 |

要旨

〔目的〕

基底膜の主要成分であるIV型コラーゲン $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、正常組織の全基底膜に存在するが、新たに $\alpha 3(\text{IV})\sim\alpha 6(\text{IV})$ 鎖より構成される基底膜は、組織特異的分布を示すことが解ってきた。しかし、癌化に伴う基底膜の分子構成に関しては明らかではない。今回、大腸の正常粘膜と上皮性腫瘍について、抗IV型コラーゲン α 鎖の組織特異的局在を免疫組織学的に検討した。

〔方法〕

外科的切除された正常大腸15例、大腸管状腺腫12例、大腸癌58例を対象とし、パラフィン包埋薄切標本による免疫染色法を確立し、ABC法にて抗IV型コラーゲン α 鎖の組織特異的局在を検討した。

〔結果〕

正常大腸及び軽度／中等度異型管状腺腫の全基底膜は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が線状連続性に発現した。 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、上皮と血管平滑筋細胞の基底膜に線状連続性局在を示し、 $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$ 鎖は、正常大腸の表層上皮先端部基底膜にのみ発現した。高度異型管状腺腫と粘膜内癌では、 $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖を連続性に認めたが、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、高度異型管状腺腫で一部不連続陽性を、粘膜内癌で消失傾向を呈した。深達度が粘膜下層から固有筋層の癌巣周囲では $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖より明瞭に消失していた。

〔考察〕

正常大腸上皮基底膜は、大部分が $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖で構成されるが、表層上皮先端部のみ $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$ 鎖を認めた。表層上皮先端部は、全ての $\alpha(\text{IV})$ 鎖を有する高度に分化した基底膜を持ち、栄養吸収時の防御機能や上皮細胞の安定性の保持という重要な機能と関連しているのかもしれない。

$\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の発現動態は、粘膜内癌で連続から不連続、進行癌で不連続に発現し、癌の初期浸潤には特異的でなかった。一方、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、

粘膜内癌で不連続から消失し、粘膜下層から固有筋層内へ浸潤した癌細胞巢基底膜では完全消失を認め、癌の初期浸潤評価に有効であった。また、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖が粘膜内癌で既に消失し始めていたことは、MMP 等による分解機序とは異なり、癌化により上皮-間質相互作用が変化を来し、 $\alpha(\text{IV})$ 鎖構成成分の再構築が密接に関連しているという新たな機序が存在すると考えられる。

〔結論〕

大腸粘膜の基底膜には、 $\alpha 1(\text{IV})/\alpha 2(\text{IV})$ 鎖に加え、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖と一部 $\alpha 3(\text{IV})/\alpha 4(\text{IV})$ 鎖が存在する。大腸癌の初期浸潤および深達度と $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の消失が、密接に関連していたことから、この発現動態の組織学的検討が、より客観的な癌の初期浸潤の評価に有効であると考えられる。

Summary

Recently, differences in histological diagnosis about colorectal neoplasms between Japan and Western countries have been noted. In this study, we examined immunohistochemically the expressions of six genetically distinct type IV collagen α chains, the major component of basement membrane (BM), in colorectal epithelial tumors. We examined the relationship between the histopathological grade and the expressions of these α (IV) chains in normal and neoplastic colorectal tissues by immunohistochemistry. In the normal colorectal mucosa, α 1(IV)/ α 2(IV)/ α 5(IV) and α 6(IV) chains were stained in all BM. However, α 3(IV)/ α 4(IV) chains were restrictively expressed in the BM of the apical surface epithelium. Similar immunostaining profiles for α 1(IV)/ α 2(IV)/ α 5(IV) and α 6(IV) chains were observed in tubular adenomas with mild/moderate atypia. However, in intramucosal carcinomas, both α 1(IV) and α 2(IV) chains were linearly stained in the BM of cancer cell nests, while the assembly of α 5(IV) and α 6(IV) chains into the BM was inhibited in a discontinuous or negatively stained pattern. The colorectal mucosa forms a second network of BM composed of α 5(IV)/ α 6(IV) and α 3(IV)/ α 4(IV) chains, in addition to the classic network of α 1(IV)/ α 2(IV) chains. The differential expressions of the type IV collagen α 5(IV)/ α 6(IV) chains seem to be regulated in association with the invasiveness of colorectal cancer.

発表論文リスト

主論文 1冊

著者名

Yutaka Hiki, Ken-ichi Iyama, Junji Tsuruta, Hiroshi Egami, Takihiro Kamio, Shuji Suko, Ichiro Naito, Yoshikazu Sado, Yoshifumi Ninomiya, and Michio Ogawa

論文題

Differential distribution of basement membrane type IV collagen $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$, and $\alpha 6(\text{IV})$ chains in colorectal epithelial tumors

(大腸上皮性腫瘍における IV 型コラーゲン $\alpha 1$ 鎖、 $\alpha 2$ 鎖、 $\alpha 5$ 鎖、 $\alpha 6$ 鎖の組織特異的発現)

雑誌名

PATHOLOGY INTERNATIONAL

巻、頁、年

in press

謝辞

本研究は熊本大学大学院医学研究科外科学第二講座 小川道雄教授指導の下において行いました。多面に渡り御指導を頂き、深く感謝いたします。

特に熊本大学医学部附属病院病理部助教授、猪山賢一博士には、コラーゲンおよび基底膜についての基礎的な知識については勿論、研究者としての姿勢に及ぶまで、多くのことをご指導頂きました。また、同元助手、鶴田潤二博士には、病理学の基礎から実際の外科病理診断に至るまで、熱心にご指導頂きました。猪山博士、鶴田博士よりご指導頂いた、学問に対する考え方、研究者としての姿勢を学ぶ事が出来た大学院生としての4年間は、私の人生観改めて問い直すことが出来た非常に貴重な時間であったと考えております。ここに深く感謝致しますとともに、お礼申し上げます。

また本研究を遂行するにあたり、IV型コラーゲンに関する共同研究者であり、 α 鎖特異的抗体を御供与して頂きました重井医学研究所免疫部門 佐渡義一博士、岡山大学医学部分子医化学講座 二宮善文教授、および検体を御供与していただきました熊本済生会病院病理部 須古修二博士、神尾多喜浩博士に深く感謝いたします。

略号

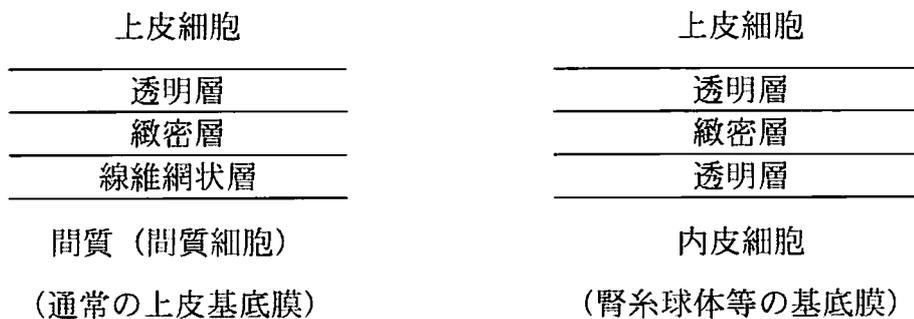
| | |
|------------|----------------------------------------|
| ABC | avidin-biotin complex |
| BM | basement membrane |
| DAB | 3,3'-diaminobenzidine |
| MMP | matrix metalloproteinase |
| MT-MMP | membrane type-matrix metalloproteinase |
| NC1 domain | non-collagenous domain |
| PBS | phosphate-buffered saline |
| PMF | pericriptal myofibroblast |

第1章 研究の背景と目的

1) 基底膜およびIV型コラーゲン

基底膜は、上皮細胞や血管内皮細胞の基底部分を裏打ちし、脂肪細胞、筋細胞、末梢神経ではシュワン細胞周囲をとり囲むシート状膜様構造物であり、実質細胞と間質を隔てる細胞外マトリックス成分の一つである。その生物学的機能は、細胞構築の保持のための細胞接着や、防御機能としての各種分子に対するフィルター作用以外に、細胞の分化・増殖や癌細胞の浸潤・転移機構において重要な役割をはたしていることが知られている (Liotta et al, 1991)。基底膜は、電子顕微鏡学的に透明層 (lamina lucida)、緻密層 (lamina densa)、線維網状層 (lamina fibroreticularis) の3層に分けられる、厚さ 50~300nm の構造物である (図1)。しかし、上皮細胞と間質 (間質細胞) の間にある場合は、透明層・緻密層・線維網状層より成るが、上皮細胞と内皮細胞の間にある場合では構成が異なり、腎糸球体や肺胞壁などでは線維網状層がない。

図1：基底膜の3層構造



基底膜は種々の蛋白質より構成されているが、コラーゲン成分であるIV型コラーゲンが骨格としてのネットワークを形成し、これに糖蛋白質であるラミニン、エンタクチン/ナイドジェン、プロテオグリカンであるパールカンなどの分子が寄り添うように会合し、高分子のネット構造を形成している。

コラーゲンは、現在まで I 型から XIX 型が同定されており、一般に Gly-X-Y の繰り返し構造を有した α 鎖と呼ばれるポリペプチド鎖が、3 本より合わさったトリプルヘリックス（モノマー）を形成したのち、多様な重合体を形成することが知られている。

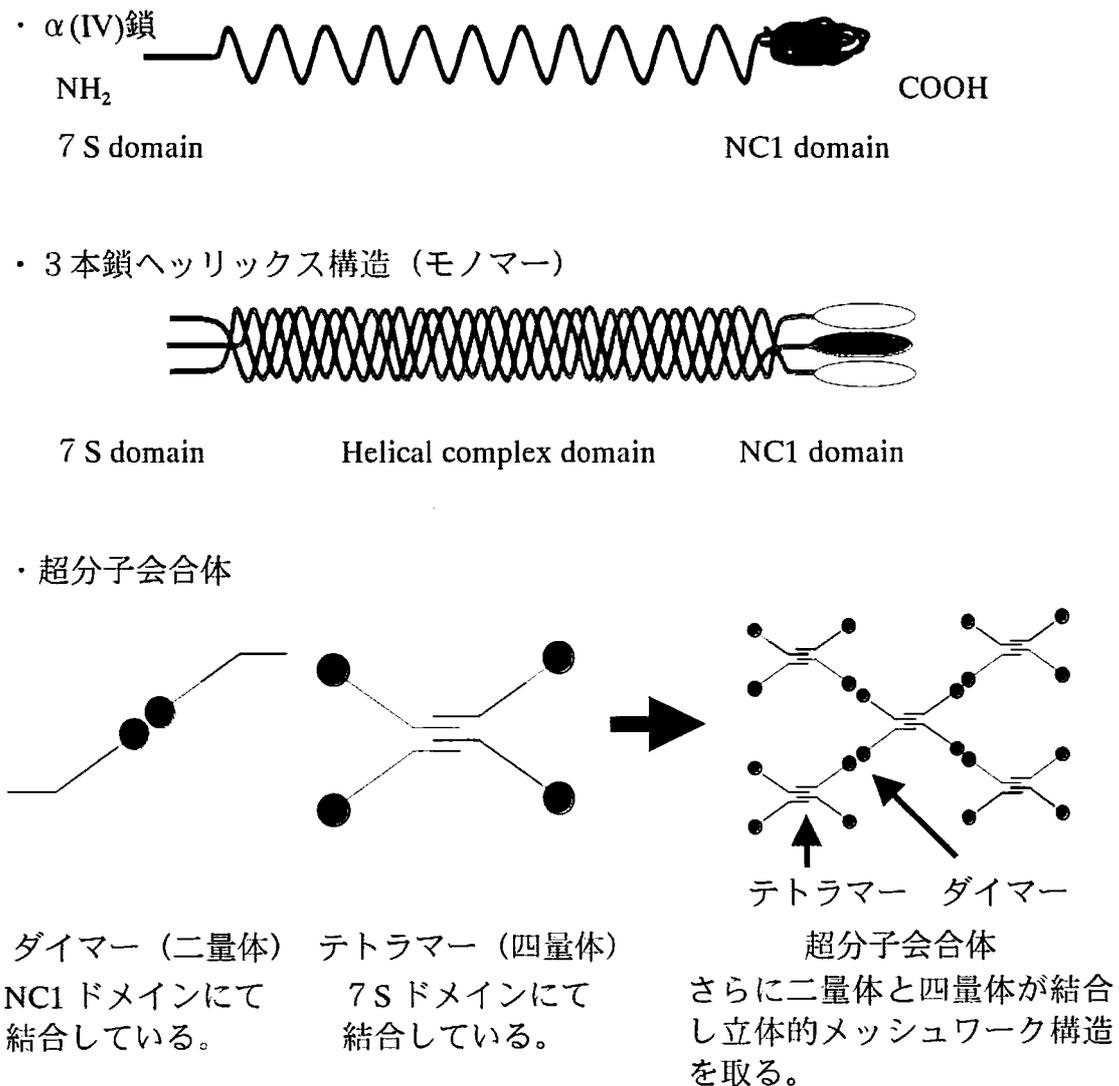
表 1：代表的なコラーゲンの種類と構成鎖の組成

| 分類 | 型 | 構成鎖の組成 |
|-----------|--------------------------------------------|--------------------------------------------|
| 線維束形成型 | I型 | $[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$ |
| | | $[\alpha 1(I)]_3$ |
| | III型 | $[\alpha 1(III)]_3$ |
| | V型 | $[\alpha 1(V)]_3$ |
| | | $[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$ |
| | | $\alpha 1(V), \alpha 2(V), \alpha 3(V)$ |
| | II型 | $[\alpha 1(II)]_3$ |
| XI型 | $\alpha 1(XI), \alpha 2(XI), \alpha 3(XI)$ | |
| FACIT型 | IX型 | $\alpha 1(IX), \alpha 2(IX), \alpha 3(IX)$ |
| | XII型 | $[\alpha 1(XII)]_3$ |
| | XIV型 | $[\alpha 1(XIV)]_3$ |
| シート形成型 | IV型 | $[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$ |
| | | $\alpha 3(IV), \alpha 4(IV), \alpha 5(IV)$ |
| | | $[\alpha 5(IV)]_2 \alpha 6(IV)$ |
| | VIII型 | $[\alpha 1(VIII)]_2 \alpha 2(VIII)$ |
| | X型 | $[\alpha 1(X)]_3$ |
| ビーズ状線維形成型 | VI型 | $\alpha 1(VI), \alpha 2(VI), \alpha 3(VI)$ |
| 係留線維束形成型 | VII型 | $[\alpha 1(VII)]_3$ |

FACIT (fibril-associated collagens with interrupted triple helices)

重合機構に基づき分類した代表的コラーゲンを表 1 に示すが、基底膜の主な構成成分である IV 型コラーゲンは、アミノ末端にある 7s 領域同士が 4 分子で会合（テトラマー）し、またカルボキシ末端にある NC（non-collagenous）領域同士が 2 分子で結合（ダイマー）することによりシート状のネットワークを形成している（図 2）。

図 2 : IV 型コラーゲン分子とその超分子会合体（模式図）



これら IV 型コラーゲンは、1971 年に Kefalides らにより、一次構造の異なるコラーゲンとしてその存在が同定され、蛋白生化学的手法によりその主要な α 鎖組成は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖が 2 本、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が 1 本よりなる、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子であることが明らかとなった (Timpl, 1989)。

近年、蛋白生化学的手法 (Butkowski et al, 1990; Wieslander et al, 1985) および分子生物学的手法 (Mariyama et al, 1994; Oohashi et al, 1994; Soininen et al, 1988; Zhou et al, 1992) により、新たに $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖 \sim $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の 4 種類の IV 型コラーゲンの subtype が同定された。遺伝子解析の結果、これら $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 \sim $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の 6 種類の IV 型コラーゲン遺伝子は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖各々二つずつが、head-to-head の形で隣合わせに対をなしており、それぞれ、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の遺伝子 (COL4A1 と COL4A2) は第 13 染色体 q34 の部位に (Soininen et al, 1988)、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖の遺伝子 (COL4A3 と COL4A4) は第 2 染色体 q36 の部位に (Mariyama et al, 1994)、また $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の遺伝子 (COL4A5 と COL4A6) は、X 染色体 q22 の部位に (Oohashi et al, 1994; Zhou et al, 1993) 存在している。

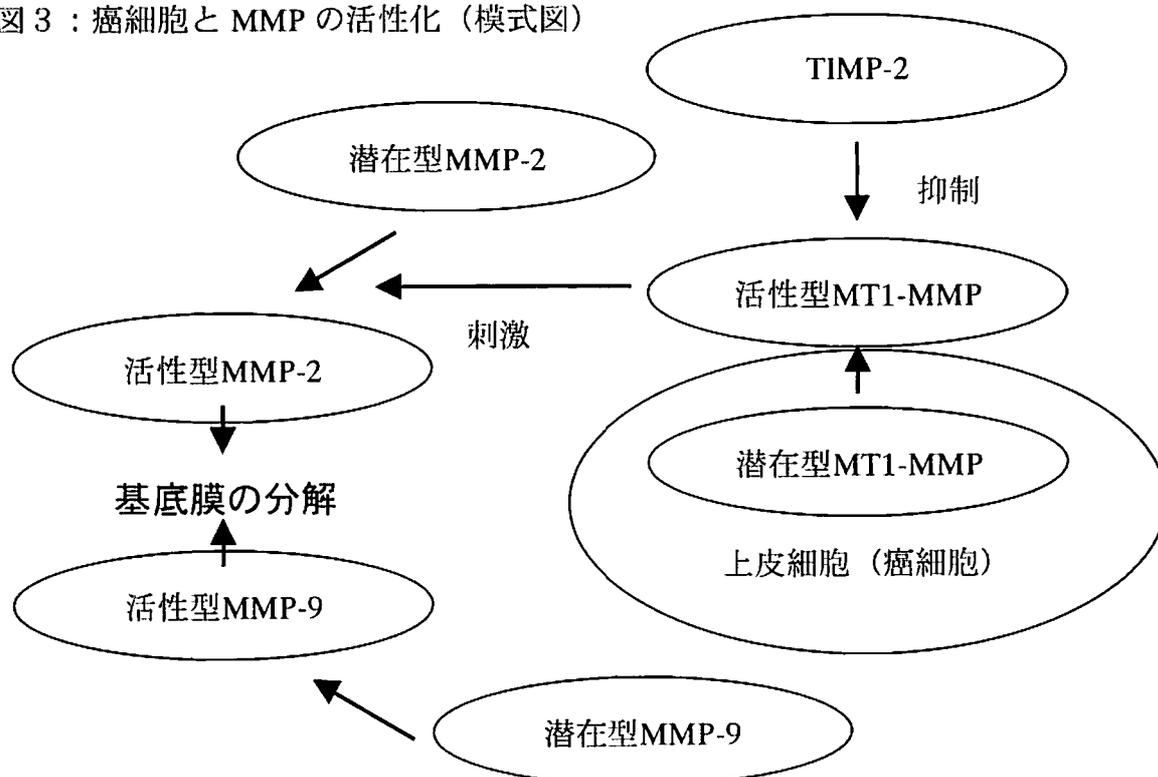
これらの遺伝子産物が構成する分子の組み合わせと、その臓器・組織分布を各 $\alpha(\text{IV})$ 鎖特異的モノクローナル抗体による免疫組織化学にて解析を行うと、 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子とは別に、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖と、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖のヘテロトリマーの組み合わせで構成される 2 種類の基底膜が存在していた。 $[\alpha 1(\text{IV})]_2\alpha 2(\text{IV})$ 分子はすべての基底膜に存在しているのに対し、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖で構成される基底膜は、腎臓糸球体や肺胞基底膜および一部の尿細管基底膜に、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖で構成される基底膜は、皮膚・平滑筋・前立腺・胎児腸管基底膜に存在することがこれまでに明らかとなっている (Dehan et al, 1997; Ninomiya et al, 1995; Mariyama et al, 1994; Sado et al, 1995; Simoneau et al, 1998; Tanaka et al, 1997)。X 染色体上に存在する $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖遺伝子の遺伝子異常が成因である遺伝性腎疾患アルポート症候群では、これらの組織部位の基底膜に $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖や、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖から成る基

底膜が欠損する事が報告されている (Ninomiya et al, 1995)。このことから、IV型コラーゲン α 鎖の組織特異的発現が、より確定的となってきた。

2) マトリックスメタロプロテアーゼ (MMP)

癌細胞が腫瘍から逸脱するためには、先ず基底膜の消失が必要であるが、基底膜中の主要成分である IV 型コラーゲンは、その特有な三重らせん構造を有するために分子自体が非常に安定している。この IV 型コラーゲンを破壊するプロテアーゼとして、現在、MMP-2 と MMP-9 が知られている (Birkedal-Hansen H, et al. 1993; Sato H, et al. 1994)。特に、MMP-2 の活性化機序についての研究は進んでおり、膜型 MMP (MT-MMP) 中の MT1-MMP が、細胞膜上において潜在型 MMP-2 を活性化する事が証明されている (Sato H, et al. 1994) (図 3)。しかし、MMP-9 については、免疫染色にて蛋白発現は認めるものの、活性型 MMP-9 を検出する高感度なザイモグラフィで調べられた結果、ほとんどが潜在型 MMP-9 であるとの報告がなされている。

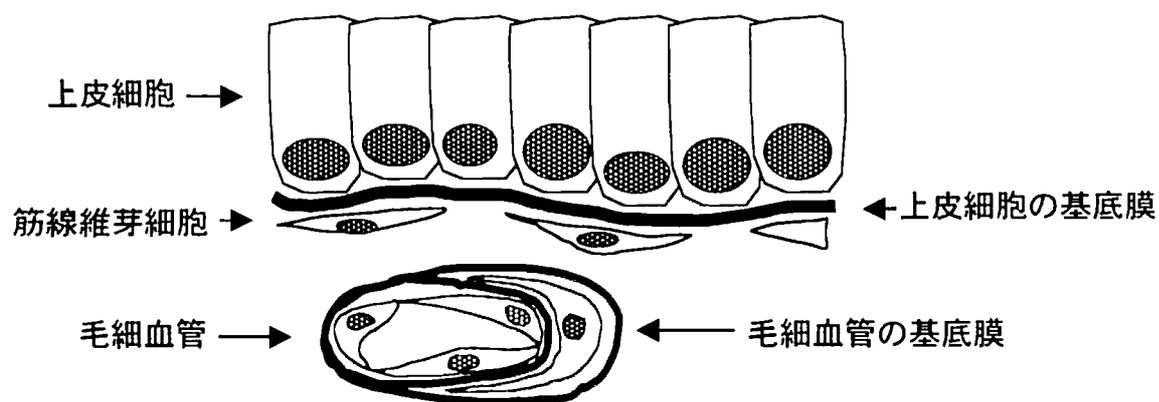
図 3 : 癌細胞と MMP の活性化 (模式図)



3) 正常大腸上皮における基底膜

正常大腸粘膜上皮は、機能的に異なる吸収上皮細胞と粘液産生性の杯細胞よりなり、機能的表面積を増大するため管状腺管構造を保っている。上皮は腺の底部で有糸分裂で増殖する細胞により、管腔面で絶えず入れ替わっている。大腸粘膜の上皮基底膜は、上皮の基底側に位置し、間質細胞の一つである筋線維芽細胞を含む粘膜固有層の間質とを隔てている（図4）。その下層には粘膜筋板があり、機能は粘液腺が詰まることを防止し、粘液を押し出すことである。また、微生物の侵入を防止するために、大腸壁には多数の白血球とリンパ球が存在し、固有層および粘膜下層に集団で存在する。

図4：正常大腸粘膜における基底膜（模式図）



4) 大腸癌における日本と欧米の病理診断の差異

大腸癌は上皮細胞より発生する事は言うまでもないが、この大腸癌を病理組織学的に診断する場合、細胞異型・構造異型および間質浸潤にて診断される。早期癌の中でも明らかに粘膜下層へ浸潤しているものは、診断において特に問題となることはない。しかし、形態的に粘膜内癌の中でも、特に粘膜固有層へ間質浸潤の確定像が得られない上皮内癌の場合、病理診断においてしばしば診断の不一致が生じている。これは、組織的に間質へ浸潤している像が認められないため、細胞異型や構造異型のみで診断することになるのであるが、これが各病理医間における診断のズレを生む主要原因となっている。そのため、これまでに adenoma-carcinoma sequence という概念で扱われている腺腫の中でも高度異型腺腫と、上皮内癌を鑑別するために、様々なマーカーを用いての報告がなされている。しかし、いずれの報告も補助的診断としての有用性はあるものの、特異性に関しては問題点が指摘されている。このような現状から、近年、大腸腫瘍において、特に高度異型腺腫から粘膜内癌の診断に関して、日本と西欧の病理診断の差異が指摘（表2）されており、2000年には、新たにWHOの組織学的分類が報告された。この分類は、「adenocarcinoma in situ」や「intramucosal carcinoma」よりも「high-grade intraepithelial neoplasia」がより適当であると記載されており、「粘膜内癌」という概念が明確には認められていない。

表 2 : TNM 分類+WHO 分類と大腸癌取り扱い規約 (日本)

| TNM分類+WHO分類 | 大腸癌取り扱い規約 |
|---------------------------|----------------|
| Intraepithelial neoplasia | 管状腺腫 |
| Low-grade dysplasia | 軽度・中等度 |
| High-grade dysplasia | 高度 |
| ----- | 腺癌 |
| Adenocarcinoma | m |
| Stage Tis adenocarcinoma | |
| Stage T1 adenocarcinoma | sm1 sm2+sm3 |
| Stage T2 adenocarcinoma | mp |
| Stage T3 adenocarcinoma | ss sc |

← 日本と西欧の病理診断の差異が指摘されている部分

5) 目的

最近、乳癌 (Nakano S et al, 1999) ・皮膚の基底細胞癌 (Tanaka K et al, 1997) ・前立腺癌 (Dehan P et al, 1997) ・腎細胞癌 (Lohi J et al, 1997) 等の癌における IV 型コラーゲン α 鎖分子のネットワークの動態が解明されてきた。しかし、これまでに大腸上皮における IV 型コラーゲンの発現についての報告は認められるものの、抗 $\alpha 1(IV) \sim \alpha 6(IV)$ 鎖抗体を用いた検討はなく、特に早期大腸癌においては、IV 型コラーゲン $\alpha 3(IV) \sim \alpha 6(IV)$ 鎖の免疫組織学的局在について未だ報告されていない。本論文においては、正常大腸、管状腺腫、大腸癌組織を用いて、IV 型コラーゲン $\alpha 1(IV)$ 鎖、 $\alpha 2(IV)$ 鎖、 $\alpha 3(IV)$ 鎖、 $\alpha 4(IV)$ 鎖、 $\alpha 5(IV)$ 鎖、 $\alpha 6(IV)$ 鎖の分子動態を免疫組織学的に解析し、その蛋白の局在と発現を明らかにすると共に、大腸腫瘍の悪性度や組織学的浸潤性との関連について検討を行った。

また、癌細胞が浸潤に密接に関連すると考えられている MMP-2 と MMP-9 および MT1-MMP の蛋白発現部位と IV 型コラーゲン $\alpha 1(IV) \sim \alpha 6(IV)$ 鎖発現消失との関連についても検討を加えた。

第2章 対象と実験方法

1) 対象

1995～2000年間の熊本大学医学部附属病院および1997～1999年に済生会熊本病院において切除された大腸上皮性腫瘍70症例（表3）を検索対象とした。また、癌巣より十分に距離を置いて、病理組織学的に異常の認められなかったものの15症例を正常対照とした。尚、病理組織型分類は大腸癌取り扱い規約（第6版）に基づいて行った。

表3：大腸癌取り扱い規約に則った症例数

| | 症例数 |
|-----------------------|-----|
| 正常粘膜 | 15 |
| 管状腺腫 軽度・中等度異型 | 6 |
| 高度異型 | 6 |
| 腺癌 m（粘膜内） | 21 |
| sm1（粘膜下組織） sm2+sm3 | 13 |
| mp（固有筋層） | 14 |
| ss～se（漿膜下組織～腹膜） | 10 |

（ ）内は、深達度を記載。

2) 実験方法

i) 組織検体作製

a) 凍結薄切標本

切除検体を OCT コンパウンドで包埋後、アセトンドライアイスにて凍結し、3 μ m の凍結連続切片を作製した。

b) パラフィンブロック薄切標本

切除検体を 10%ホルマリン (pH7.0) にて固定し、パラフィンに包埋、4 μm の連続薄切切片を作製した。尚、免疫染色操作過程で薄切切片がスライドガラスから剥離防止する為、シランコートスライド (MATSUNAMI GLASS) を使用した。

ii) 免疫組織化学

a) 一次抗体

IV 型コラーゲン抗体はヒト IV 型コラーゲン $\alpha 1\sim 6$ 鎖の Non-collagenous domain (NC1 domain) の C 末端領域のアミノ酸配列、または Helical domain のアミノ酸配列をもとに作製した合成ペプチドを抗原に、共同研究者である佐渡らが開発したラットリンパ節法により作製した抗ヒトラットモノクローナル抗体を使用した (Sado Y. et al., Histochem Cell Biol, 1995)。 α 鎖特異性、サブクラス、クローン、免疫染色に使用した適正希釈倍率、を表 4 に示す。

抗 MMP-2 ・ MMP-9 ・ MT1-MMP 抗体は、いずれもポリクローナル抗体 (Biogenesis Ltd, UK) を使用した。

表 4 : IV 型コラーゲン α 鎖特異的モノクローナル抗体

| α 鎖特異性 | サブクラス | クローン | 希釈濃度 | | エピトープ |
|------------------------------------|----------|------|--------|---------|-----------|
| | | | 凍結標本 | パラフィン標本 | |
| $\alpha 1(\text{IV}) \text{NC1}$ | IgG2a | H11 | 1 : 50 | 1 : 300 | KKPTPSTL |
| $\alpha 2(\text{IV}) \text{NC1}$ | IgG1, k | H21 | 1 : 50 | 1 : 150 | DTLKAGLIR |
| $\alpha 3(\text{IV}) \text{NC1}$ | IgG2a | H31 | 1 : 10 | 1 : 200 | IPSTVKA |
| $\alpha 4(\text{IV}) \text{NC1}$ | IgG2a, k | H43 | 1 : 10 | 1 : 7 | PAPDTLKE |
| $\alpha 5(\text{IV}) \text{helix}$ | IgG2a, k | H53 | 1 : 20 | 1 : 200 | IDVEF |
| $\alpha 6(\text{IV}) \text{NC1}$ | IgG2a, k | H63 | 1 : 30 | 1 : 50 | GELP |

b) パラフィン薄切標本における至適免疫染色条件の設定

すでに、凍結切片における免疫染色法は確立されていたが、ホルマリン固定パラフィン包埋切片においては、凍結切片と同一の染色法では発色が認められなかった。抗原賦活化として、オートクレーブ法にてクエン酸バッファの pH3.0、3.1、3.3、3.4、3.5、3.7、4.0、6.0 で行ったところ、pH 3.3 にて特異的かつ最も強く陽性所見を認めた。また、オートクレーブ法を行った際、室温まで人為的に急速に冷却すると全く染色されず、2時間かけてゆっくり自然冷却することで染色可能となった。

癌組織を含む大腸組織では、炎症反応が強く、好中球やマクロファージを含む炎症細胞の内因性ペルオキシダーゼを完全に阻害する事が必要であった。100%メタノール 30分、5mM 過ヨウ素酸水溶液 10分、 H_2O_2 加 100%メタノール 30分と 60分で行ったところ、 H_2O_2 加 100%メタノール 60分が最も抑制された。

c) 免疫染色の手技

凍結組織の IV 型コラーゲン α 鎖の免疫染色法

免疫組織化学的染色には avidin-biotin complex (ABC) 法を用いた。

凍結切片はアセトンにて 10 分間固定し、さらに 6M 尿素 (pH 3.5) で 10 分間、抗原の賦活化を行った。その後 1.0% H_2O_2 加 メタノールにて 60 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性の完全除去を行った。PBS (phosphate-buffered saline) 洗浄後、非特異反応のブロッキングとして 5%ウサギ正常血清で 30 分間反応させた。一次抗体の反応は 4°C で一晩行った。

PBS にて洗浄後、ビオチン標識抗ラット IgG を反応させ、再度 PBS にて洗浄し、avidin-biotin complex と反応させた。 H_2O_2 加 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色後、メチルグリーンにて核染色を行い、封入し標本を作製した。以下に各染色ステップの概略を示す。

| |
|-------------------------------|
| IV 型コラーゲン α 鎖染色 (凍結切片) |
|-------------------------------|

| | |
|-------------------------------------------------|--------------|
| 1, PBS | 5分×3回 |
| 2, アセトン | 10分 |
| 3, PBS | 5分×3回 |
| 4, 6M Urea (pH 3.5) | 10分 |
| 5, PBS | 5分×3回 |
| 6, 1% H ₂ O ₂ 加 100%メタノール | 60分 |
| 7, PBS | 5分×3回 |
| 8, 5%ウサギ血清 | 30分 |
| 9, 一次抗体 (希釈倍率・表3に記載) | ~over night~ |
| 10, PBS | 5分×3回 |
| 11, 二次抗体 | 60分 |
| 12, PBS | 5分×3回 |
| 13, ABC (avidin-biotin complex) | 60分 |
| 14, PBS | 5分×3回 |
| 15, 0.05%DAB 溶液 | 7分 |
| 16, D.W. | 5分 |
| 17, メチルグリーン | 5分 |
| 18, 100%エタノール | 3回 |
| 19, キシレン | 5分×3回 |
| 20, 封入 | |

パラフィン包埋組織の免疫染色法

パラフィン切片は脱パラフィンを行った後、5 分間の熱処理（オートクレーブ：3 気圧、クエン酸バッファー）を行い抗原の賦活化を行った。十分に冷却した後、1.0% H_2O_2 加 メタノールにて 60 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼ活性の除去を行った。PBS 洗浄後、非特異反応のブロッキングとして IV 型コラーゲン α 鎖は 5%ウサギ正常血清で、MMP-2・MMP-9・MT1-MMP は 5%ヤギ正常血清で 30 分反応させた。その後各一次抗体の反応は 4℃で一晩行った。

PBS にて洗浄後、ビオチン標識抗ラット IgG あるいはビオチン標識抗ウサギ IgG を反応させ、再度 PBS にて洗浄し、avidin-biotin complex と反応させた。 H_2O_2 加 0.05% 3,3'-diaminobenzidine (DAB) にて発色後、ヘマトキシリンにて核染色を行い、封入し標本を作製した。以下に各染色ステップの概略を示す。

| |
|-----------------------------------|
| IV型コラーゲン α 鎖染色 (パラフィン包埋切片) |
|-----------------------------------|

| | |
|---------------------------------|--------------|
| 1, 孵卵器 (60℃) | 60分 |
| 2, キシレン | 30分+15分+15分 |
| 3, 100%エタノール | 5分×2回 |
| 4, PBS | 5分×3回 |
| 5, 熱処理 (クエン酸バッファー: pH3.3) | 5分 |
| 6, 自然冷却 | 約2時間 |
| 7, PBS | 5分×3回 |
| 8, 1% H_2O_2 加 100%メタノール | 60分 |
| 9, PBS | 5分×3回 |
| 10, 5%ウサギ血清 | 30分 |
| 11, 一次抗体 (希釈倍率・表3に記載) | ~over night~ |
| 12, PBS | 5分×3回 |
| 13, 二次抗体 | 60分 |
| 14, PBS | 5分×3回 |
| 15, ABC (avidin-biotin complex) | 60分 |
| 16, PBS | 5分×3回 |
| 17, 0.05%DAB 溶液 | 7分 |
| 18, D.W. | 3回 |
| 19, Hematoxylin | 2分 |
| 20, D.W. | 3回 |
| 21, PBS | 5分×3回 |
| 22, D.W. | 3回 |
| 23, 100%エタノール | 5分×2回 |
| 24, キシレン | 5分×2回 |
| 25, 封入 | |

MMP-2・MMP-9・MT1-MMP 染色

| | |
|-------------------------------------------------|----------------|
| 1, 孵卵器 (60℃) | 60 分 |
| 2, キシレン | 30 分+15 分+15 分 |
| 3, 100%エタノール | 5 分×2 回 |
| 4, PBS | 5 分×3 回 |
| 5, 熱処理 (クエン酸バッファー: pH6.0) | 5 分 |
| 6, 冷却 | 約 2 時間 |
| 7, PBS | 5 分×3 回 |
| 8, 1% H ₂ O ₂ 加 100%メタノール | 60 分 |
| 9, PBS | 5 分×3 回 |
| 10, 5%ヤギ血清 | 30 分 |
| 11, 一次抗体 (下記希釈倍率) | |
| MMP-2= 1 : 250 | ~over night~ |
| MMP-9= 1 : 100 | |
| MT1-MMP= 1 : 25 | |
| 12, PBS | 5 分×3 回 |
| 13, 二次抗体 | 60 分 |
| 14, PBS | 5 分×3 回 |
| 15, ABC (avidin-biotin complex) | 60 分 |
| 16, PBS | 5 分×3 回 |
| 17, 0.05%DAB 溶液 | 7 分 |
| 18, D.W. | 3 回 |
| 19, Hematoxylin | 2 分 |
| 20, D.W. | 3 回 |
| 21, PBS | 5 分×3 回 |
| 22, D.W. | 3 回 |
| 23, 100%エタノール | 5 分×2 回 |
| 24, キシレン | 5 分×2 回 |
| 25, 封入 | |

c) 免疫染色結果の判定

IV 型コラーゲンは、大腸粘膜上皮基底に沿い、 α (IV)鎖分子の線状かつ連続した陽性反応を示すものを陽性 (+)、完全に消失しているものを陰性 (-)、その中間の陽性反応を不連続 (±) とした。

また、MMP-2・MMP-9・MT1-MMP は、ほぼ全体が陽性のものを (+)、完全に消失しているものを (-)、その中間の陽性反応を (±) とした。

第3章 結果

1) IV型コラーゲン α 鎖の免疫組織化学的検討

α (IV)鎖の免疫染色の結果を表5に示す。

表5：正常粘膜および新生物におけるIV型コラーゲン α (IV)鎖の局在

| | α 1(IV)鎖 | α 2(IV)鎖 | α 3(IV)鎖 | α 4(IV)鎖 | α 5(IV)鎖 | α 6(IV)鎖 |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| 正常粘膜 | + | + | +* | +* | + | + |
| 管状腺腫 軽度・中程度 | + | + | - | - | + | + |
| 高度 | + | + | - | - | + / ± | + / ± |
| 腺癌 早期癌 m | + / ± | + / ± | - | - | ± / - | ± / - |
| Sm1 | + / ± | + / ± | - | - | - | - |
| Sm2+sm3 | ± | ± | - | - | - | - |
| 進行癌 | ± / - | ± / - | - | - | - | - |

線状連続の陽性反応を(+)、完全消失を(-)、その中間の陽性反応を(±)。

* : α 3(IV)鎖・ α 4(IV)鎖は、先端の表層上皮基底膜に限局して染色された。

i) 正常大腸組織 (図5) における $\alpha 1(\text{IV}) \sim \alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現

IV型コラーゲン $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、表層上皮から腺窩上皮にかけて線状連続性に陽性を示した。一方、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖は、表層上皮の先端部分の基底膜においてのみ陽性を示した。さらに、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、粘膜筋板・固有筋層・筋線維芽細胞・血管平滑筋細胞の基底膜にも認められた。しかし、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、一部の血管平滑筋細胞の基底膜において認められたのみであった。

ii) 管状腺腫 (adenoma) における $\alpha 1(\text{IV}) \sim \alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現

軽度・中等度異型管状腺腫 (図6)

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖と $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、正常大腸組織と同様、腺腫腺管の基底膜において線状連続性に陽性を示した。しかし、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖は全く認めなかった。

高度異型管状腺腫

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、腺腫腺管の基底膜において線状連続性に陽性を示した。しかし、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、線状連続性から不連続パターンを示した。この病変において、部分的な構造異型を認めた。

iii) 大腸癌における $\alpha 1(\text{IV}) \sim \alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現

粘膜内癌 (m癌) (図7)

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、腺癌の基底膜において線状連続性から不連続パターンを示し、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、不連続パターンから消失を示した。Carcinoma in adenoma と de novo carcinoma の癌巣は、同一の所見であった。

粘膜下層癌 (sm1癌) (図8)

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、粘膜内癌のパターンと同様、粘膜筋板をわずかに越え浸潤した腺癌の基底膜において線状連続性から明らかに不連続パ

ターンを示した。しかし、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、完全に消失していた。

粘膜下層癌 (sm2+sm3 癌) (図 9)

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、深達度で分類した sm2+sm3 では sm1 と比較すると、腺癌の基底膜において明らかに不連続パターンを示した。 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、完全に消失していた。

浸潤癌

$\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、不連続パターンから消失を示した。 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、完全に消失していた。

2) 大腸癌における MMP-2 ・ MMP-9 ・ MT1-MMP の発現

MMP-2 ・ MT1-MMP の免疫組織化学的検討の結果を表 6 に示す。

表 6 : 大腸癌における MMP-2 ・ MT1-MMP と $\alpha(\text{IV})$ 鎖の局在

| | MMP-2 | MT1-MMP | $\alpha 5 / \alpha 6 (\text{IV})$ 鎖 | $\alpha 1 / \alpha 2 (\text{IV})$ 鎖 |
|----|-------|---------|-------------------------------------|-------------------------------------|
| m | + / - | + / - | ± / - | + / ± |
| sm | + / - | + / - | - | + / ± |
| mp | - / ± | - / ± | - | ± / - |

i) MMP-2 ・ MT1-MMP (図 10) の発現

MMP-2 ・ MT1-MMP の発現は共に相関性を示し、粘膜内癌から進行癌に至るまで、陽性像を認めた。しかし、部分的にわずかに陽性を示す症例や、完全陰性の症例も認めた。さらに、深達度と MMP-2 ・ MT1-MMP の発現に相関性を認めなかった。

ii) MMP-9 の発現

いずれも上皮に強陽性を示し、MMP-2 ・ MT1-MMP との相関は認めなかった。

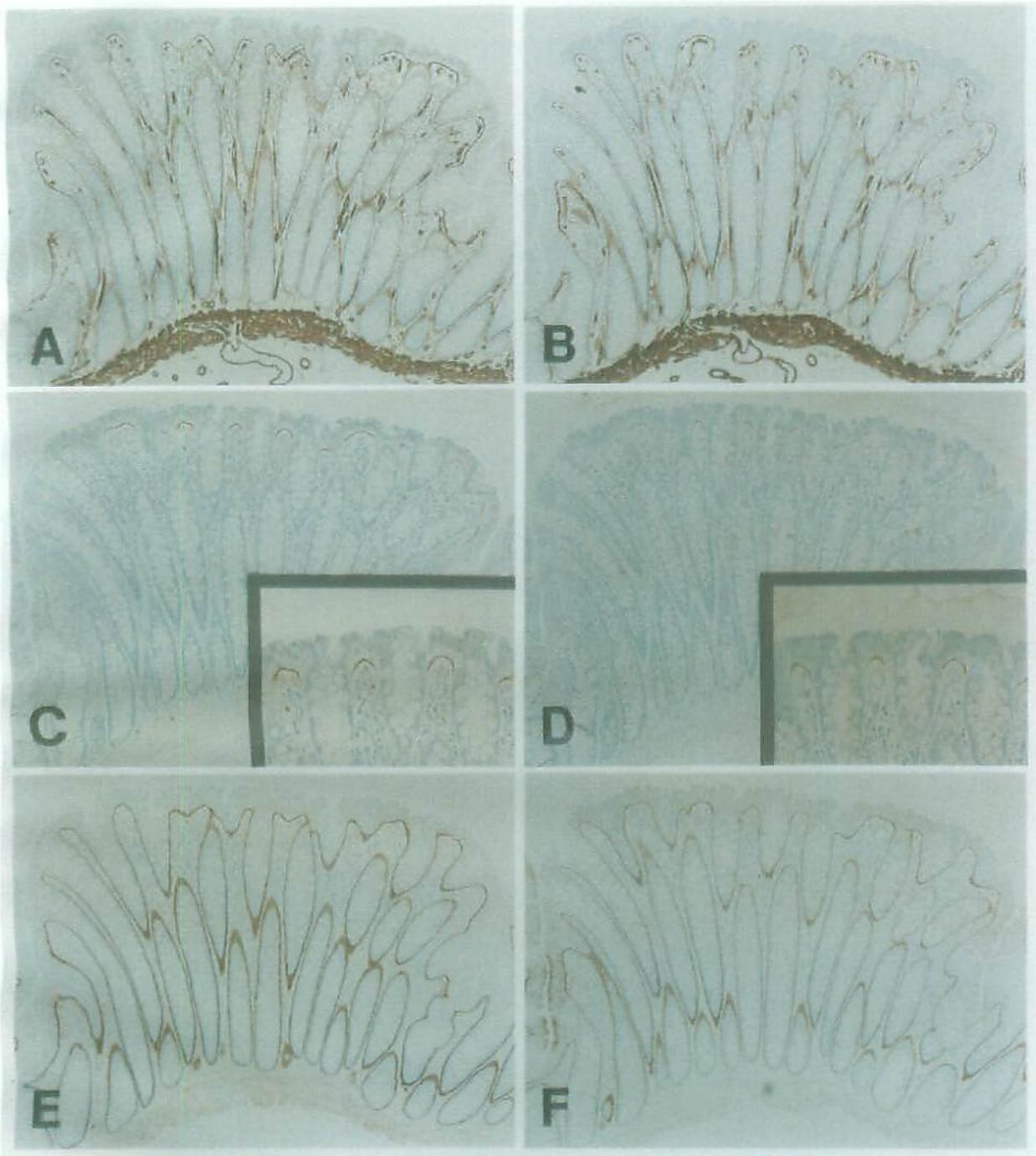


図5. 正常大腸組織における $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 $\sim \alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現：

正常大腸における上皮基底膜は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 (A)・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖 (B)・ $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 (E)・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 (F) が線状連続性に陽性を示した。 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖 (C)・ $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖 (D) は、表層上皮の先端部分にのみ認められた。さらに、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、周囲間質の筋線維芽細胞・平滑筋・血管内皮基底膜においても陽性所見を認めたが、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は小血管平滑筋細胞の基底膜を除き間質細胞には陰性であり、上皮基底膜に特異的であった。
(倍率：A \sim F 56倍、C/D 挿入100倍)

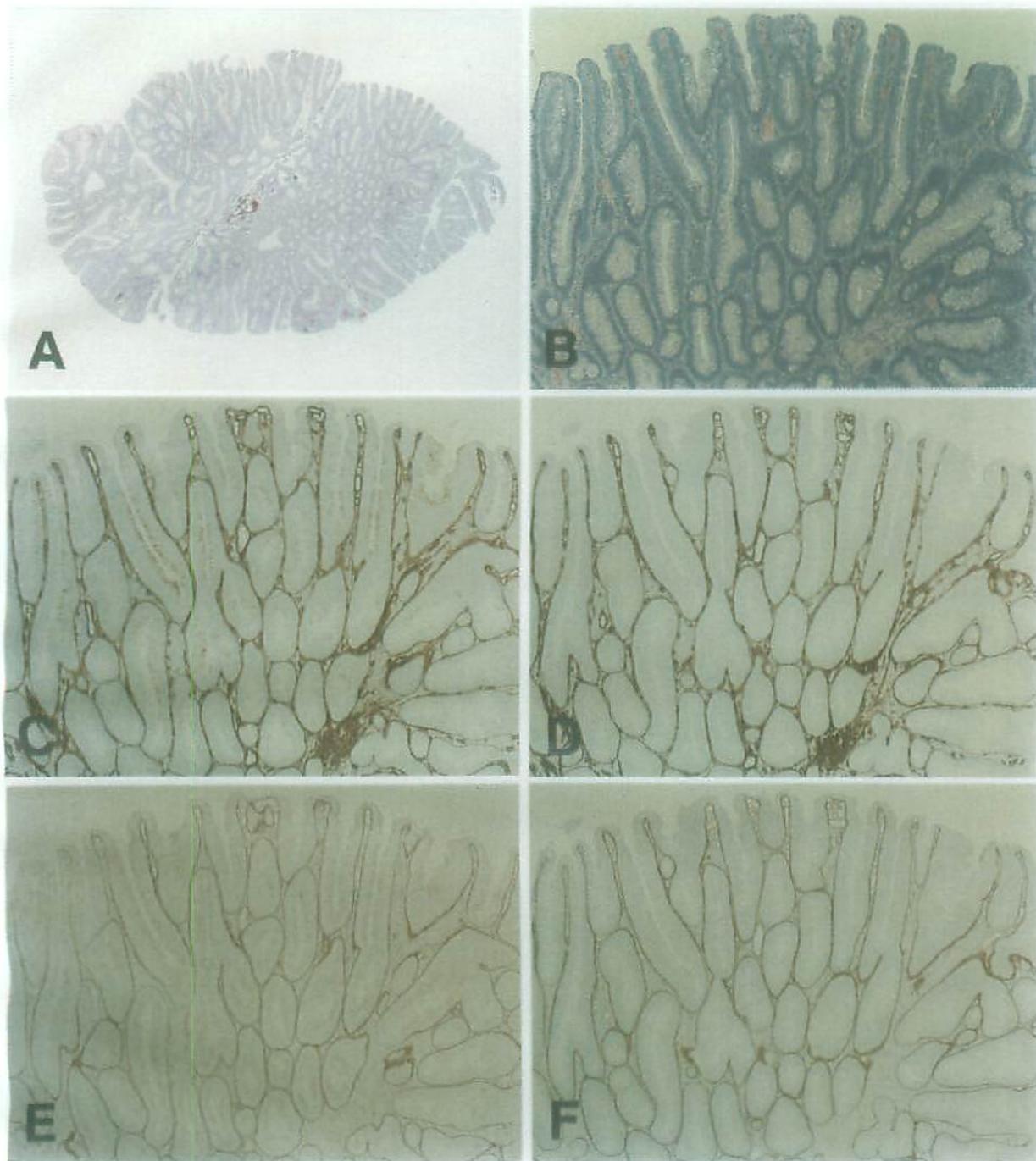


図6. 軽度/中等度異型管状腺腫における $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の
 発現：
 管状腺腫における上皮基底膜は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 (C)・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖 (D)・ $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖
 (E)・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 (F) はいずれも線状連続性に陽性を示した。(A)・(B)はHE染色。
 (倍率：A 10倍、B~F 40倍)

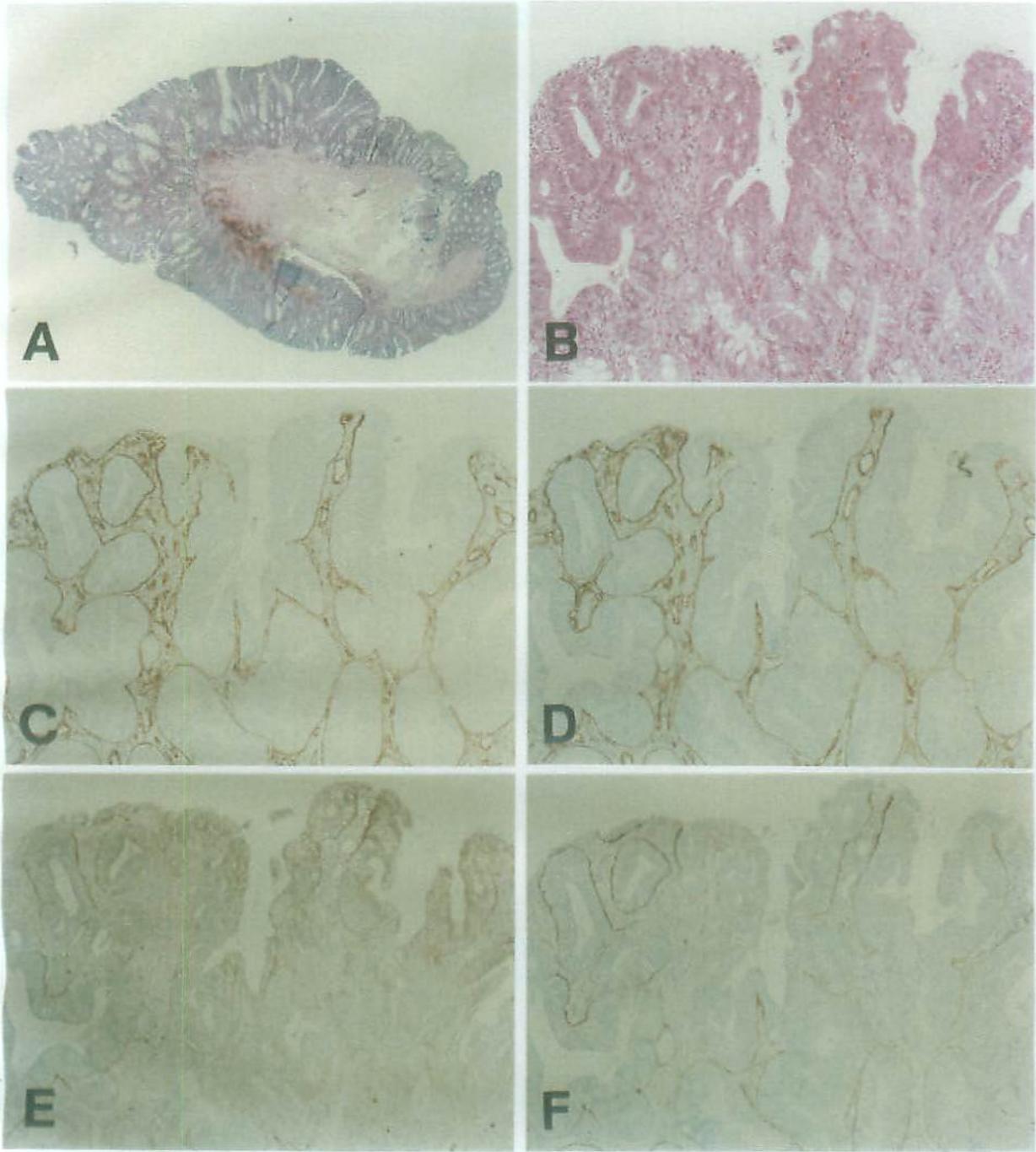


図7. 粘膜内癌 (carcinoma in adenoma, m癌) における $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現：
 癌の上皮基底膜は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 (C) ・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖 (D) が線状連続性パターン、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 (E) ・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 (F) が不連続から陰性パターンを呈していた。 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 ・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖陰性部分では、構造異型が目立っていた。(A) ・ (B) はHE染色。
 (倍率：A 10倍、B~F 100倍)

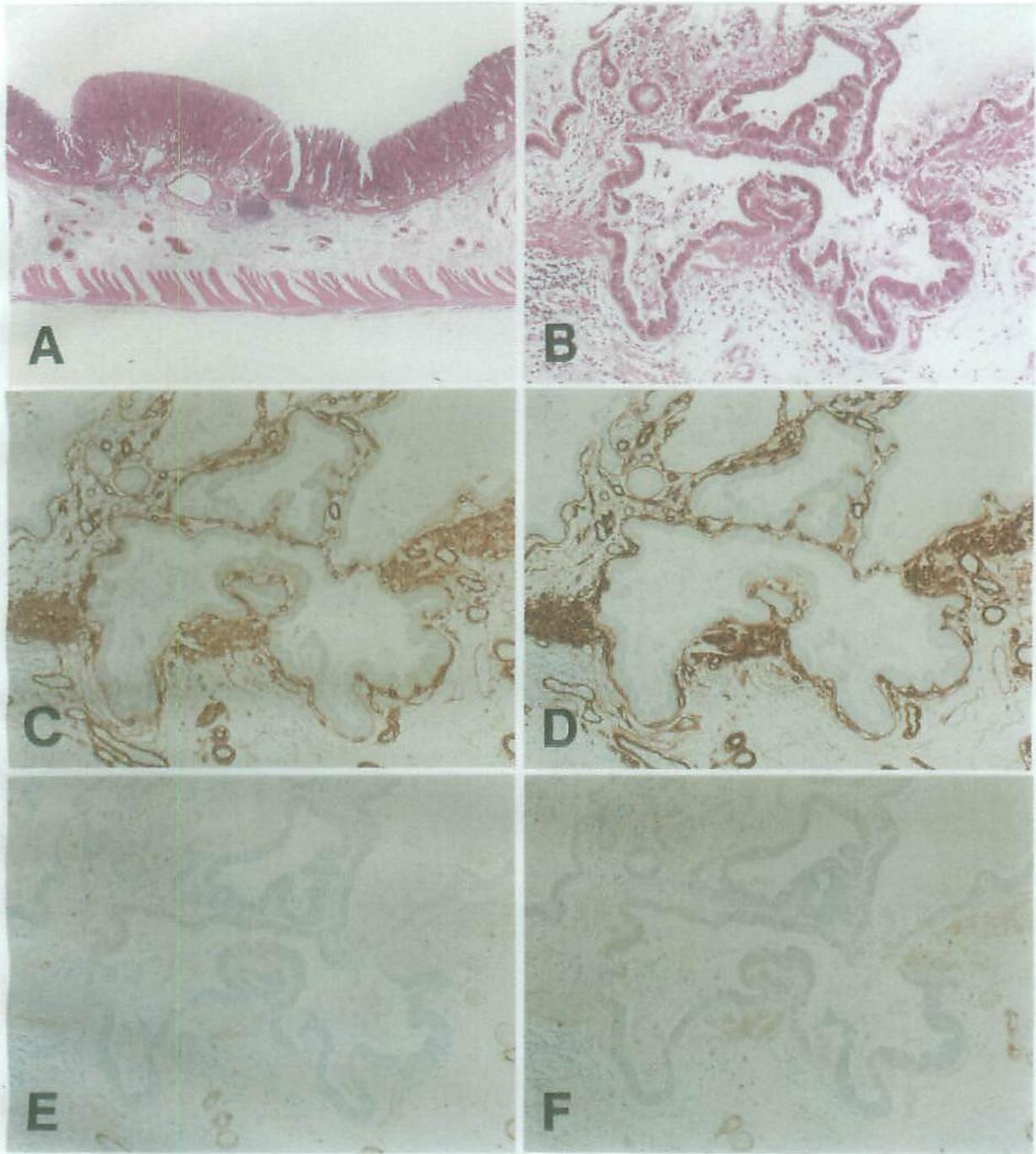


図8. 早期癌 (sm1癌) における $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現：
 癌の上皮基底膜は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 (C)・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖 (D) が連続から不連続パターンを認めた。
 しかし、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 (E)・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 (F) は完全に消失していた。(A)・(B) はHE染色。
 (倍率：A 10倍、B~F 100倍)

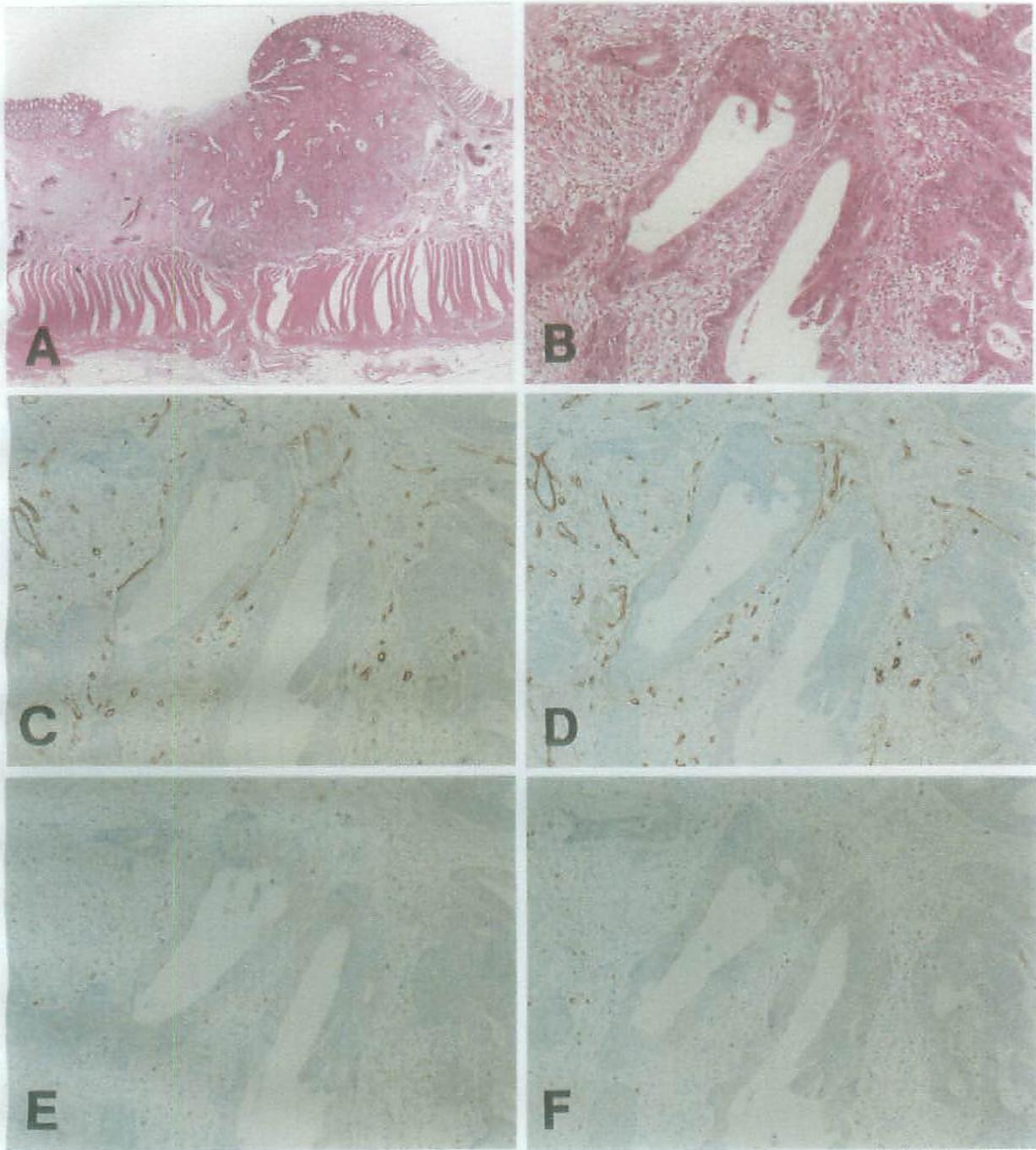


図9. 早期癌 (sm3癌) における $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖、 $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現：
 癌の上皮基底膜は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖 (C) ・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖 (D) が不連続から陰性パターンを認めた。
 しかし、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖 (E) ・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖 (F) は完全に消失していた。(A) ・ (B) はHE染色。
 (倍率：A 10倍、B~F 100倍)

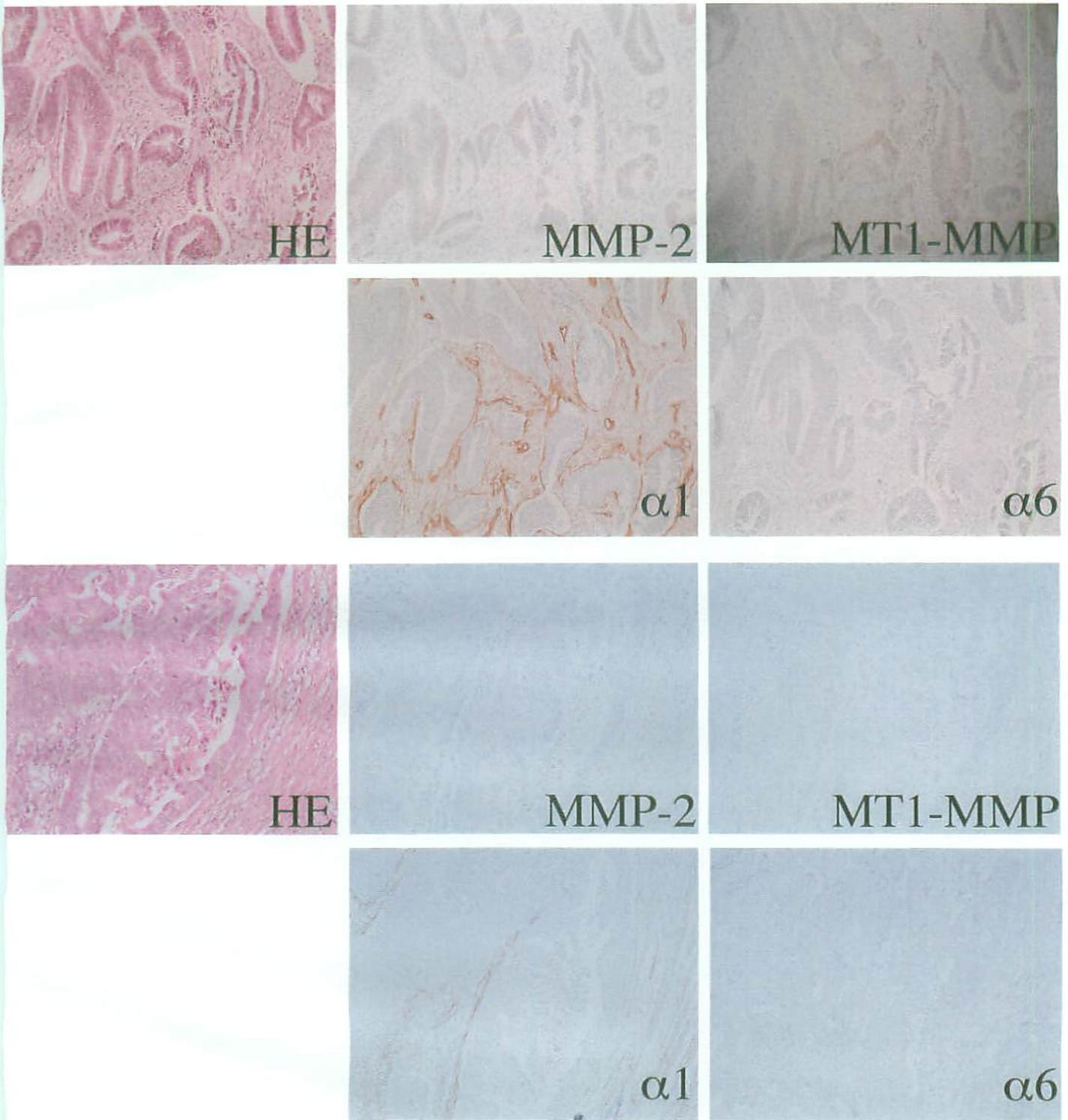


図10. 進行癌におけるMMP-2とMT1-MMPの発現と $\alpha 1$ (IV)鎖 $\alpha 6$ (IV)鎖の発現との比較：

最上列と2列目：一部の癌細胞に、MMP-2とMT1-MMPが共発現していた。しかし、 $\alpha 6$ (IV)鎖発現消失像との間に相関は認めなかった。

3列目と最下列：症例により $\alpha 6$ (IV)鎖が完全消失にもかかわらず、癌細胞にMMP-2とMT1-MMPの発現が認められないものもあった。（倍率：30倍）

第4章 考察

1) 免疫染色の条件

凍結切片を用いた IV 型コラーゲン α 鎖の免疫染色法は、既に確立されていたが、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いての免疫染色法は、ほとんど確立されなかつた。先ず、実験を始めるに当たり、既存の症例を実験材料に加えて症例数を増やすため、ホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた免疫染色法を確立する必要があつた。

陽性コントロール材料として、既に IV 型コラーゲン α 鎖の発現部位が確認されている、腎臓の糸球体を用いた。抗原の賦活化のための熱処理として、オートクレーブ法を行った。この時のクエン酸バッファの pH は、3.3 が最も抗原性が賦活化された。ただし、この至適 pH は、非常に厳密にする必要があり、わずかな pH の誤差で、抗原性を引き出すことができなかつた。また、熱処理後に室温まで冷却するが、これを短時間で急速冷却を行うと全く染色されず、2時間かけ室温下で自然冷却を行うことで染色性が再現性を持って示された。この理由として、急激な温度変化により、一度賦活化された抗原性を持つ蛋白の3次元構造が、再びマスクされる為と考えられる。内因性ペルオキシダーゼブロックには、 H_2O_2 加 100%メタノール 60分が最も抑制され、30分では不十分で、120分では60分と大差がなかつた。免疫染色は、じっくりと手間と時間を惜しまずに行えば、必ず再現性を持ち染色される事が示された。

2) 正常大腸粘膜における IV 型コラーゲン α 鎖の分布

正常大腸粘膜において、 $\alpha 1(IV)$ 鎖・ $\alpha 2(IV)$ 鎖と $\alpha 5(IV)$ 鎖・ $\alpha 6(IV)$ 鎖は、表層上皮と腺窩上皮の基底膜において線状連続性に染色された。 $\alpha 3(IV)$ 鎖・ $\alpha 4(IV)$ 鎖は、先端の表層上皮基底膜においてのみ染色されたが、炎症性変化を伴った粘膜や腺腫・癌においては発現が認められなかつた。現在までに、正常大

腸粘膜における $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖から $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖までの6種類の $\alpha(\text{IV})$ 鎖の分布に関する詳細な報告はなされていない。管腔内に面した先端の表層上皮基底膜には、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖～ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の全てが存在する生体の唯一の基底膜であり、水分や栄養の吸収時における防御システム (Johannes A et al, 1974) としてや、アポトーシスにより絶えず入れ替わる管腔面の上皮細胞の安定性を保つ (Barkla DH et al, 1999)、という重要な機能と密接に関連していると考えられる。この高度に分化した基底膜を保持していくことが、上皮の再生にも必要であり、慢性難治性腸疾患 (潰瘍性大腸炎など) では、この基底膜の保持が乱れている可能性が示唆される。

3) 大腸新生物におけるIV型コラーゲン α 鎖の分布

軽度から高度異型管状腺腫は、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖が連続性に染まった。粘膜内癌の基底膜において $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖の局在は、連続から不連続なパターンを示した。進行癌においても、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖は、癌巣の周囲が不連続に染色されることから、早期の間質浸潤において有効なマーカーとは成り得ない。一方、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖は、軽度から中等度腺腫腺管において線状連続なパターンで染色されるが、粘膜内癌においては不連続な染色から消失を示した。 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の完全な消失は、粘膜下層や固有筋層内への浸潤を示す癌細胞巢の基底膜において明瞭であった。表5に示すように、 $\alpha 1(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 2(\text{IV})$ 鎖と異なる $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の発現は、高度異型管状腺腫と粘膜内癌において認められた。粘膜内癌の基底膜における $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の完全な消失は、癌化に伴う基底膜成分の特異的な再構築によると考えられる。

4) 大腸癌浸潤・転移におけるIV型コラーゲン α 鎖の分布とMMPの関係

腫瘍の浸潤と転移は、宿主細胞の反応や細胞外マトリックスの分解との関連

において、腫瘍細胞を含む多段階の過程が在る。一般的な多段階の過程 (Liotta LA, et al, 1983; Blood CH, et al, 1990) として、1) 癌細胞が基底膜を変性させ原発巣から血管内へ遊離、2) 癌細胞が転移先の血管またはリンパ管内皮細胞に接着、3) 血管またはリンパ管の基底膜を変性、4) 癌細胞の転移部位での発育増殖、が知られている。一般的に、初段階で MMP (Zeng ZS et al, 1999; Ohtani Het al, 1996) により癌化した腺窩上皮の基底膜が分解するとされており、特に MMP-2 と MMP-9 が基底膜の分解に必須であると言われている。今回の MMP の免疫染色の結果から、MMP-2 および MT1-MMP は、粘膜内癌から進行癌に至るまで陽性から陰性までの症例により異なる発現を示したが、MMP-9 は全ての上皮に強発現していた。癌の浸潤程度と MMP-2/MT1-MMP に明確な相関は認められず、MMP-9 に至っては全く関係を認めなかった。IV 型コラーゲン α 鎖は、特に $\alpha 5(IV)$ 、 $\alpha 6(IV)$ 鎖の消失において、癌の進行度と密接な相関性が認められており、MMP-2/MT1-MMP 発現と IV 型コラーゲン α 鎖の消失動態には、何ら相関が認められなかった。むしろ、癌化に伴う IV 型コラーゲン α 鎖の再構築が、不安定な基底膜として MMP により分解されやすくなった状態を示すのかもしれない。

5) 日本と欧米における粘膜内癌の病理診断の差異

表 2 に示したように、近年、大腸腫瘍における日本と西欧の病理診断の差異が指摘 (Schlemper RJ et al, 1998) されており、胃および腸管の上皮新生物についてウィーン分類 (Schlemper RJ et al, 2000) (表 6) が報告された。この分類は、カテゴリー 4.2: Non-invasive carcinoma、カテゴリー 4.3 に Suspicion of invasive carcinoma、カテゴリー 5.1 に Intramucosal carcinoma があり、日本と西欧の診断の相違点をすり合わせた形となっているが、実際の病理診断に用いるにはやや問題点があると考えられる。

表6：ウィーン分類からみた WHO と日本の組織分類の相違点

| TNM 分類 WHO 組織分類 | ウィーン分類 | 大腸癌 取り扱い規約 |
|----------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|
| Tx | Category 1:Negative for neoplasia / dysplasia | |
| T0 | Category 2:Indefinite for neoplasia / dysplasia | |
| Low-grade neoplasia | Category 3:Non-invasive low grade neoplasia (low grade adenoma / dysplasia) | 管状腺腫 軽度異型 中等度異型 高度異型 |
| High-grade neoplasia Adenocarcinoma | Category 4:Non-invasive high grade neoplasia 4.1: High grade adenoma / dysplasia | |
| Tis (intraepithelial neoplasia) (intramucosal neoplasia) | 4.2: Non-invasive carcinoma 4.3: Suspicion of invasive carcinoma | 腺癌 粘膜内癌 |
| | Category 5: Invasive neoplasia 5.1: Intramucosal carcinoma | |
| T 1 | 5.2: submucosal carcinoma | sm |
| T 2 | | mp |
| T 3 | | se / ss |
| T4 | | si |

さらに、これとは別に、リヨンにおいて WHO の国際癌研究協会 (Hamilton RS et al, 2000) 主催の会議が開かれたが、この組織学的分類において、「adenocarcinoma in situ」や「intramucosal carcinoma」よりも「high-grade intraepithelial neoplasia」がより適当な語句である、という国際的なクライテリアが決定された。つまり、WHO は、粘膜内癌と言う概念はあっても、実際に用いることは進めていないと言うことになる。

同じ病変を診断しているのに、なぜこのような差異が生じるのであろうか。その原因として、粘膜下層に浸潤した大腸癌において、最も重要な診断因子として、粘膜筋板を越え間質に浸潤している客観的根拠があるのに対し、粘膜固有層に限局している粘膜内癌においては、粘膜固有層内の間質浸潤の評価が客観性に乏しく、診断因子が細胞異型や構造異型に頼らざるを得ない点にある。この異型度の差異が、病理医間の診断の差異につながる原因をもたらすものと考えられる。本研究では、従来から知られている基底膜の IV 型コラーゲンの、新し

く同定された $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の動態から、大腸の癌化に伴う基底膜の質的変化を証明した点に大きな意義がある。

6) まとめ (臨床的・病理学的大腸癌の浸潤・転移について)

これまでに、早期大腸癌の評価のために多くの研究が報告されている。腺腫と早期癌との有用なマーカーとして、腫瘍径や形態 (Muto T et al, 1975)、拡大内視鏡によるピットパターン (Kudo S et al, 1994) が用いられている。

α -SMA 陽性となる筋線維芽細胞は、正常大腸粘膜の腺管周囲に均一に裏うちして分布している。Yao ら (Yao T et al, 1993) は、大腸癌の粘膜内癌において、癌巣周囲の筋線維芽細胞の完全消失を示した。Higaki ら (Higaki S et al, 1999) は、軽度異型性の腺腫では正常大腸と筋線維芽細胞の分布に違いはないが、高度異型性の腺腫と大腸癌には筋線維芽細胞を認めないと言う腫瘍周囲の筋線維芽細胞の分布異常を指摘した。さらに、Simon-Assmann ら (Simon-Assmann P et al, 1988) は、基底膜の IV 型コラーゲン合成が、ラットの腸管の発育において上皮-間質 (筋線維芽細胞を含む) 相互作用により調節されていると報告した。

今回の研究において、大腸粘膜の基底膜には、従来より知られている IV 型コラーゲン $\alpha 1/\alpha 2$ 鎖よりなる classic network に加え、 $\alpha 3(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 4(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖よりなる second network が存在していた。また、 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖を含む IV 型コラーゲン分子の消失は、癌細胞の増殖および浸潤と密接に関係していた。 $\alpha 5(\text{IV})$ 鎖・ $\alpha 6(\text{IV})$ 鎖の消失した早期大腸癌は、防御機能としての基底膜が不安定性を来した結果、MMP 発現に依存せずとも粘膜固有層への浸潤を開始し得るとも考えられる。このことから、 $\alpha 5(\text{IV})/\alpha 6(\text{IV})$ 鎖よりなる second network の動態は、大腸癌浸潤と密接に関連しており、この動態を免疫組織学的に検討することは、病理診断学的に大腸癌初期浸潤を評価する上で、細胞異型や構造異型に加えて、細胞外マトリックスの異型性を指標とした、客観的な診断マーカーの一つに成り得ると考える。

参考文献

Barkla DH, Gibson PR. The fate of epithelial cells in the human large intestine. *Pathology* 1999;31:230-238.

Birkedal-Hansen H, Moore WG, Bodden MK, et al. Matrix metalloproteinases: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 1993;4(2):197-250

Blood CH, Zetter BR. Tumor interactions with the vasculature: angiogenesis and tumor metastasis. *Biochim. Biophys. Acta.* 1990;1032:89-118.

Butkowski RJ, Shen GQ, Wieslander J, et al. Characterization of type IV collagen NC1 monomers and Goodpasture antigen in human renal basement membranes. *J. Lab. Clin. Med.* 1990;115:365-373.

Dehan P, Waltregny D, Beschin A, et al. Loss of type IV collagen $\alpha 5$ and $\alpha 6$ chains in human invasive prostate carcinomas. *Am. J. Pathol.* 1997;151:1097-1104.

Hamilton RS, Vogelstein B, Kudo S, et al. Tumors of the colon and rectum. In: Stanley, R.H., Lauri, A.A. eds *World Health Organization classification of tumors: Pathology and genetics of tumors of the digestive system.* Lyon, International agency for research on cancer, 2000:103-143.

Higaki S, Tada M, Nishiaki M, et al. Immunohistological study to determine the presence of pericryptal myofibroblasts and basement membrane in colorectal epithelial tumors. *J. Gastroenterol.* 1999;34:215-220.

Japanese Society for Cancer of the Colon and Rectum. General Rules for Clinical and Pathological Studies on Cancer of the Colon, Rectum and Anus, 6th edn. Tokyo, Kanahara, 1998.

Johannes A. G. Rhodin. Histology, A text and atlas. New York, Oxford university press, 1974; 553-577.

Kudo S, Hirota S, Nakajima T, et al. Colorectal tumours and pit pattern. J. Clin. Pathol. 1994;47:880-885.

Liotta LA, Rao CN, Barsky SH. Tumor invasion and the extracellular matrix. Lab. Invest. 1983;49:636-649.

Liotta LA, Stetler-Stevenson WG. Tumor invasion and metastasis: An imbalance of positive and negative regulation. Cancer Res. 1991;51:5054s-5059s.

Lohi J, Korhonen M, Leivo I, et al. Expression of type IV collagen $\alpha 1(\text{IV})$ - $\alpha 6(\text{IV})$ polypeptides in normal and developing human kidney and in renal cell carcinomas and oncocytomas. Int. J. Cancer 1997;72:43-49.

Mariyama M, Leinonen A, Mochizuki T, et al. Complete primary structure of the human $\alpha 3(\text{IV})$ collagen chain. Coexpression of the $\alpha 3(\text{IV})$ and $\alpha 4(\text{IV})$ collagen chains in human tissues. J Biol. Chem. 1994;269:23013-23017.

Muto T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. Cancer 1975;36:2251-2270.

Nakano S, Iyama K, Ogawa M, et al. Differential tissular expression and localization of type IV collagen $\alpha 1(IV)$, $\alpha 2(IV)$, $\alpha 5(IV)$, and $\alpha 6(IV)$ chains and their mRNA in normal breast and in benign and malignant breast tumors. *Lab. Invest.* 1999;79:281-292.

Ninomiya Y, Kagawa M, Iyama K, et al. Differential expression of two basement membrane collagen genes, COL4A6 and COL4A5, demonstrated by immunofluorescence staining using peptide-specific monoclonal antibodies. *J. Cell Biol.* 1995;130:1219-1229.

Ohtani H, Motohashi H, Sato H, et al. Dual over-expression pattern of membrane-type metalloproteinase-1 in cancer and stromal cells in human gastrointestinal carcinoma revealed by in situ hybridization and immunoelectron microscopy. *Int. J. Cancer* 1996;68:565-570.

Oohashi T, Sugimoto M, Mattei MG, et al. Identification of a new collagen IV chain, $\alpha 6(IV)$, by cDNA isolation and assignment of the gene to chromosome Xq22, which is the same locus for COL4A5. *J. Biol. Chem.* 1994;269:7520-7526.

Sado Y, Kagawa M, Kishiro Y, et al. Establishment by the rat lymph node method of epitope-defined monoclonal antibodies recognizing the six different α chains of human type IV collagen. *Histochem. Cell Biol.* 1995;104:267-275.

Sato H, Takino T, Okada Y, et al. A matrix metalloproteinase expressed on the surface of invasive tumour cells. *Nature* 1994;370(6484):61-5.

Schlemper RJ, Itabashi M, Kato Y, et al. Differences in the diagnostic criteria used by Japanese and Western pathologists to diagnose colorectal carcinoma. *Cancer* 1998;82:60-69.

Schlemper RJ, Riddell RH, Kato Y, et al. The Vienna classification of gastrointestinal epithelial neoplasia. *Gut* 2000;47:251-255.

Simon-Assmann P, Bouziges F, Arnold C, et al. Epithelial-mesenchymal interactions in the production of basement membrane components in the gut. *Development* 1988;102:339-347.

Simoneau A, Herring-Gillam FE, Vachon PH, et al. Identification, distribution, and tissular origin of the $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the developing human intestine. *Dev. Dyn.* 1998;212:437-447.

Soininen R, Huotari M, Hostikka SL, et al. The structural genes for $\alpha 1$ and $\alpha 2$ chains of human type IV collagen are divergently encoded on opposite DNA strands and have an overlapping promoter region. *J Biol. Chem.* 1988;263:17217-17220.

Tanaka K, Iyama K, Kitaoka M, et al. Differential expression of $\alpha 1(\text{IV})$, $\alpha 2(\text{IV})$, $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen chains in the basement membrane of basal cell carcinoma. *Histochem. J.* 1997;29:563-570.

Timpl R. Structure and biological activity of basement membrane proteins. *Eur. J. Biochem.* 1989;180:487-502.

Wieslander J, Langeveld J, Butkowski R, et al. Physical and immunochemical studies of the globular domain of type IV collagen. *J. Biol. Chem.* 1985;260:8564-8570.

Yao T, Tsuneyoshi M. Significance of pericryptal fibroblasts in colorectal epithelial tumors: a special reference to the histologic features and growth patterns. *Hum. Pathol.* 1993;24:525-533.

Zhou J, Mochizuki T, Smeets H, et al. Deletion of the paired $\alpha 5(\text{IV})$ and $\alpha 6(\text{IV})$ collagen genes in inherited smooth muscle tumors. *Science* 1993;261:1167-1169.

Zeng ZS, Cohen AM, Guillem JG. Loss of basement membrane type IV collagen is associated with increased expression of metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9) during human colorectal tumorigenesis. *Carcinogenesis* 1999;20:749-755.