



子宮内膜癌における細胞外マトリックス 分解酵素の免疫組織化学的研究

阿部州雄 井上芳樹

近畿大学医学部産科婦人科学教室

Immunohistochemical studies on the extracellular matrix
proteinase in endometrial carcinoma

Kunio Abe and Yoshiki Inoue

Department of Obstetrics and Gynecology, Kinki University School of Medicine, Osaka, Japan

ABSTRACT

Destruction of the extracellular matrix is one of the most important events in the course of invasion or metastasis of carcinoma. In 95 cases of endometrial carcinoma, Cathepsin-D and MMP-9 which are respectively proteinases of Laminin and type IV collagen were evaluated. Immunohistochemical staining was performed by an ABC method. The relationship between these proteinase and histopathological findings; histopathological extent of primary tumor, pathological grading of cancer cells, muscle invasion, lymph node metastasis, vessel permeation, peritoneal washing cytology, and the percent area of Laminin and type IV collagen were studied. Cases with a higher histopathological extent of the primary tumor showed a high positive ratio of Cathepsin-D, and significant differences were noted between the pT1 and pT3 cases ($p < 0.05$), and between the pT2 and pT3 ($p < 0.01$). Cases with a lower grading showed a tendency of a high positive ratio of Cathepsin-D. Cases with a deeper invasion showed a high positive ratio of Cathepsin-D, demonstrating a significant difference in the cases with invasion of less than 1/3 and those with invasion of more than 2/3 ($p < 0.05$). Cases with lymph node metastasis showed a high positive ratio of Cathepsin-D ($p < 0.05$). Cases with vessel permeation showed a high positive ratio of Cathepsin-D ($p < 0.05$). Positive cases with peritoneal washing cytology showed a high positive ratio of Cathepsin-D ($p < 0.05$). Cases with a lower grading showed a tendency of a high positive ratio of MMP-9. Cases with a deeper invasion showed a high positive ratio of MMP-9, and a significant difference was observed between the cases with invasion of less than 1/3 and those with invasion of more than 2/3 ($p < 0.05$). Cases with lymph node metastasis and cases with vessel permeation showed a tendency of a high positive ratio of MMP-9. No correlation was seen between the percent area of Laminin and Cathepsin-D, or between the percent area of type IV collagen and MMP-9. The survival rate of Cathepsin-D negative cases was favorable compared with the positive cases, and the difference was significant. No difference in prognosis was observed between the MMP-9 positive and negative cases. These findings suggested the usefulness of Cathepsin-D and MMP-9 as indicators of the invasion and metastasis of carcinoma in endometrial carcinoma.

Key words: endometrial carcinoma, extracellular matrix, proteinase, Cathepsin-D, MMP-9, invasion, metastasis

結 言

癌の浸潤や転移形成の過程における細胞外マトリックスの破壊は、その構成成分の分解を伴う癌進展の、最も積極的な過程の一つである。癌細胞による細胞外マトリックスの破壊のメカニズムとしては、Liotta¹⁻²らの培養細胞を用いた研究から ①癌細胞のもつ Laminin receptor による基底膜 Laminin への結合、② type IV collagenase など分解酵素の分泌と基底膜 collagen の化学的分解、③癌細胞の間質への移動の過程が推測されている。さらに、細胞外マトリックスの破壊には多様な細胞外マトリックス分解酵素の作用が必須であることが明らかになってきている³。すなわち、細胞外マトリックス分解酵素には、Cathepsin-D などのアスパルギン酸プロテイナーゼ、MMP-2, MMP-9 などのメタロプロテイナーゼ、uPA, tPA などのセリンプロテイナーゼなど種々のものがあり、それらがそれぞれ基質特異性を持ち、酵素自身の活性化を含めて互いに補い合い、また酵素の産生は癌細胞と間質細胞の相互作用により調節制御されていることが明らかとなってきた⁴。

このような細胞外マトリックス分解酵素の産生、分泌、活性化の調節機構を解明することは癌転移の早期診断、治療および予防を考える上で重要であると考えられる。

肺癌¹¹、乳癌¹²、膀胱癌¹³、肝癌¹⁴、大腸癌¹⁵においては細胞外マトリックスとその分解酵素について、いくつかの報告がみられるが、子宮内膜癌においては細胞外マトリックスとその分解酵素に関する報告は少ない。そこで今回、子宮内膜癌において、基底膜 Laminin の分解酵素である Cathepsin-D および type IV collagen の分解酵素である MMP-9 に注目し、それらと臨床病理学的所見、すなわち原発病巣の拡がり、組織分化度、筋層浸潤、リンパ節転移、脈管侵襲、腹腔洗浄液細胞診などの関連性について検討することを目的として研究を行った。

対象と方法

1. 対象

1979年から1992年まで近畿大学医学部産科婦人科学教室で経験した子宮膜癌95症例を対象とした。そのうちわけは pTNM 分類で、pT1 症例62例、pT2 症例12例、pT3 症例18例、pT4 症例3例である。

2. 方法

2.1. 染色

手術により摘出した標本を10%ホルマリン液で48時間固定後、パラフィン包埋ブロックを作製、引き

続いて4 μ mの連続切片を作製した。各切片について Laminin 染色、type IV collagen 染色、Cathepsin-D 染色、MMP-9 染色を施行した。

免疫組織化学的染色はABC法を用いた酵素抗体法により行った。前処理として Laminin 染色では1.3%ペプシンを用い、type IV collagen 染色では0.1%アクチナーゼを用い37°Cで30分間、Cathepsin-D 染色では1.3%ペプシンを用い37°Cで60分間、MMP-9 染色では0.1%トリプシンを用い37°Cで20分間それぞれ酵素処理を行った。一次抗体として、Laminin 染色では PBS にて100倍に希釈したウサギ抗ヒト Laminin モノクロナール抗体 (Bio Makor 社) を type IV collagen 染色では PBS にて、100倍に希釈したマウス抗ヒト type IV collagen モノクロナール抗体 (資生堂) を、Cathepsin-D 染色では PBS にて100倍に希釈したマウス抗ヒト Cathepsin-D モノクロナール抗体 (Novocasta Laboratories 社) をそれぞれ60分間室温でインキュベートした。また、MMP-9 染色は PBS にて2倍に希釈したマウス抗ヒト MMP-9 モノクロナール抗体 (Oncogene Science 社) を4°Cで over night インキュベートした。次に、それぞれ PBS で洗浄後、二次抗体としてビオチン化抗体を用いて30分間室温でインキュベートした。次に PBS で洗浄後、ABC 試薬を用い30分間室温でインキュベートした。PBS で洗浄後 DAB にて発色させ、マイヤーヘマトキシリンにて核染色を行った。

2.2. 染色評価

Cathepsin-D、MMP-9 はそれぞれ染色後、200倍3視野にて癌細胞が5%以上染色されているものを陽性とした。Laminin、type IV collagen に関しては小畑⁷の方法に従い、癌巣の3視野で写真を撮り、キルビメーター (内田洋行製) を使用し、(Laminin あるいは type IV collagen 染色部分の長さの総計) / (癌上皮と間質との境界部分の長さの総計) の値を上記3カ所で計算し、それらの平均値を個々の症例の Laminin、あるいは type IV collagen の存在部分の割合として検討した。

2.3. 予後の評価

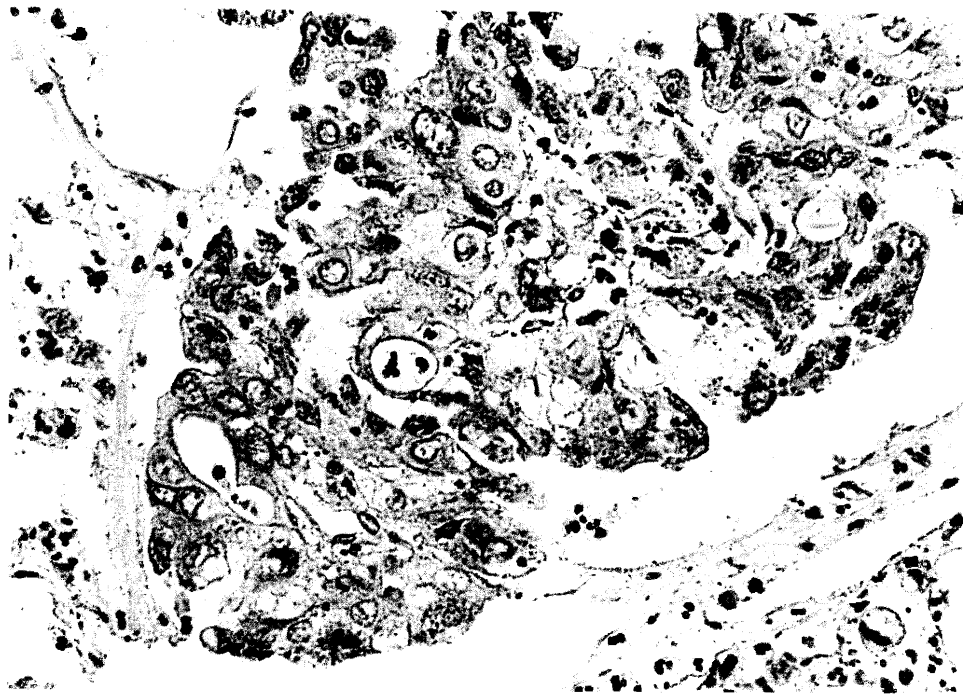
生存率の検討は Kaplan-Meier 法にて行った。

結 果

1. 子宮内膜癌における Cathepsin-D と臨床病理学的所見との関連性について

Cathepsin-D は癌細胞の細胞質に顆粒状に染色された (Fig. 1)。

子宮内膜癌における臨床病理学的所見、すなわち原発病巣の拡がり、組織分化度、筋層浸潤、リンパ

Fig. 1 Cathepsin-D staining ($\times 200$)**Table 1** Relationship between histopathological extent of primary tumor (pTNM) and Cathepsin-D staining

		Cathepsin-D		
		+	-	
pT1	n=61	22(36.1%)	39(63.9%)	* **
pT2	n=12	6(50.0%)	6(50.0%)	
pT3	n=16	14(87.5%)	2(12.5%)	
pT4	n=3	3(100%)	0(0%)	

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ **Table 2** Relationship between pathological grading of cancer cells and Cathepsin-D staining

		Cathepsin-D	
		+	-
G1	n=53	22(41.5%)	31(58.5%)
G2	n=31	16(51.6%)	15(48.4%)
G3	n=6	5(83.3%)	1(16.7%)

Table 3 Relationship between muscle invasion and Cathepsin-D staining

		Cathepsin-D		
		+	-	
$\leq 1/3$	n=46	18(39.1%)	28(60.9%)	*
$> 1/3, \leq 2/3$	n=18	9(50.0%)	9(50.0%)	
$> 2/3$	n=28	18(63.4%)	10(35.7%)	

* $p < 0.05$

節転移, 脈管侵襲, 腹腔洗浄液細胞診と Cathepsin-D との関連性について次の成績を得た。

まず, pTNM 分類における原発病巣の拡がりとして Cathepsin-D の関連性においては, 子宮体部に限局する pT1 症例では61例中22例, 36.1%, 子宮頸部に拡がる pT2 症例では12例中6例, 50.0%小骨盤腔に拡がる pT3 症例では16例中14例, 87.5%, 膀胱, 直腸への浸潤, あるいは遠隔転移をおこした pT4 症例では3例中3例, 100%が Cathepsin-D 陽性であり, 原発病巣の拡がりの高度なものほど陽性率が高く, pT1 症例と pT3 症例, また, pT2 症例と pT3 症例の間の有意差を認めた (Table 1)。

組織分化度と Cathepsin-D との関連性においては, 高分化型の G1 症例では53例中22例, 41.5%, 中等分化型の G2 症例では31例中16例, 51.6%, 低分化型の G3 症例では6例中5例, 83.3%が Cathepsin-D 陽性であり, 組織分化度の低いものほど陽性率が高い傾向にあった (Table 2)。

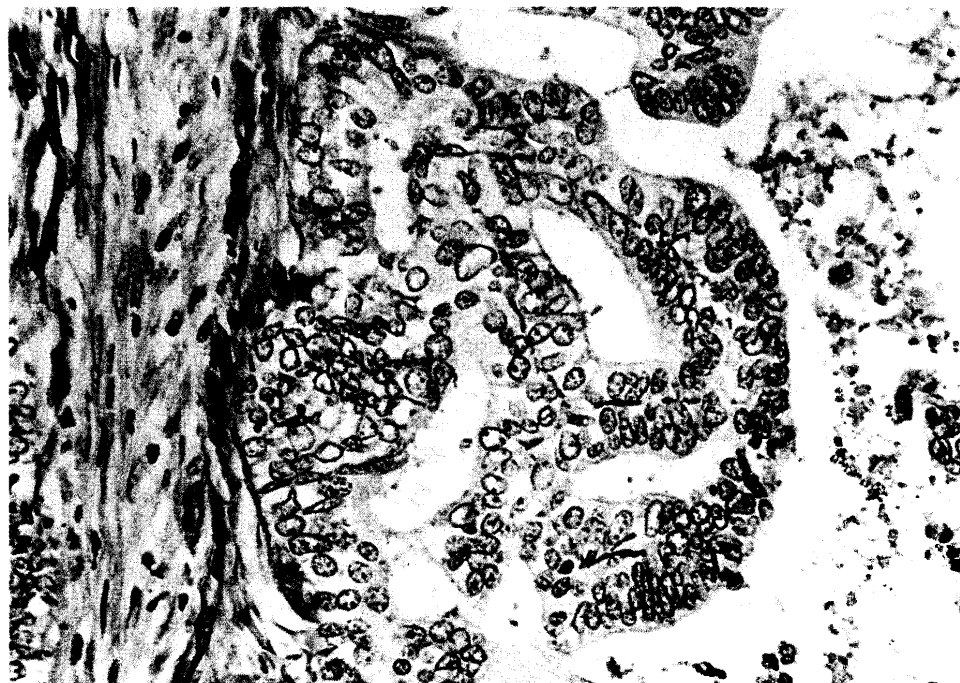
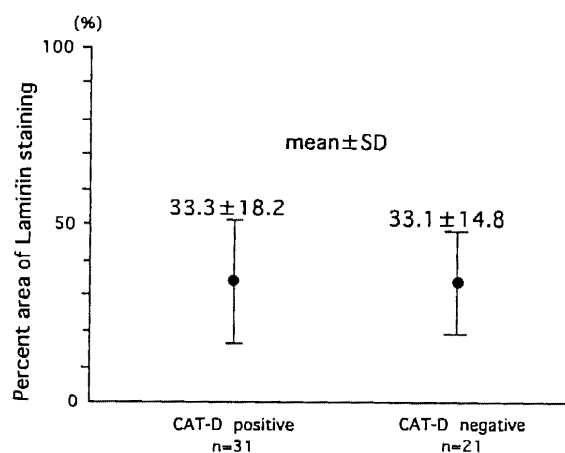
筋層浸潤と Cathepsin-D との関連性については, 筋層浸潤1/3以下の症例では46例中18例, 39.1%, 1/3から2/3の症例では18例中9例, 50.0%, 2/3以上の症例では28例中18例, 63.4%が Cathepsin-D 陽性であり, 筋層浸潤の深いものほど陽性率が高く, 1/3以下の症例と2/3以上の症例の間に有意差を認めた (Table 3)。

リンパ節転移と Cathepsin-D との関連性では, リンパ節転移を認めた症例では13例中10例, 76.9%,

Table 4 Relationship between lymph node metastasis, vessel permeation and Cathepsin-D staining

			Cathepsin-D		
			+	-	
metastasis	-	n=70	27(38.5%)	43(61.4%)]*
metastasis	+	n=13	10(76.9%)	3(23.1%)	
vessel permeation	-	n=61	24(39.3%)	37(60.7%)]*
vessel permeation	+	n=29	21(72.4%)	8(27.6%)	

* p<0.05

**Fig. 2** Laminin staining (200)**Fig. 3** Relationship between percent area of Laminin and Cathepsin-D

リンパ節転移を認めなかった症例では70例中27例、38.5%が Cathepsin-D 陽性であり、リンパ節転移を認めたものの方が高い陽性率を示し、その両者間に

は有意差を認めた (Table 4).

次に、脈管侵襲と Cathepsin-D との関係性では、脈管侵襲を認めた症例では、29例中21例、72.4%、脈管侵襲を認めなかった症例では、61例中24例、39.3%が Cathepsin-D 陽性であり、脈管侵襲を認めたものの方が高い陽性率を示し、その両者間に有意差を認めた (Table 4).

腹腔洗浄液細胞診と Cathepsin-D との関係性では、細胞診陽性例では21例中14例、66.7%、細胞診陰性例では60例中26例、43.3%が Cathepsin-D 陽性であり、細胞診陽性例に高い陽性率を示し、その両者間に有意差を認めた (p<0.05).

2. Cathepsin-D と Laminin の関連性

Figure 2 に示すごとく、Laminin は、一部、断裂や欠損がみられた。

Cathepsin-D 陽性症例の原発病巣における基底膜 Laminin の存在率は33.3±18.2%で、Cathepsin-D 陰性症例では、その存在率は33.1±14.8%であっ

た。両者間には有意差は認められなかった (Fig. 3)。

3. Cathepsin-D 陽性症例, 陰性症例の生存率の検討

生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検討したが, Cathepsin-D 陰性例は陽性例に比較し予後良好であった, Cathepsin-D 陽性例と陰性例との間に有意差を認めた ($p < 0.05$) (Fig. 4)。比較的予後の不良な pT2, pT3 症例に限るなど, 背景を揃えて検討すると Cathepsin-D 陰性例は陽性例に比較し予後良好な傾向を認めた (Fig. 5)。

4. MMP-9 と臨床病理学的所見との関連性について

MMP-9 は, 癌細胞の細胞質に細顆粒状に染色された (Fig. 6)。

子宮内膜癌における MMP-9 と臨床病理学的所見, すなわち原発病巣の拡がり, 組織分化度, 筋層浸潤, リンパ節転移, 脈管侵襲, 腹腔洗浄液細胞診と MMP-9 との関連性について次の成績を得た。まず, pTNM 分類における原発病巣の拡がり と MMP-9 との関連性をみると, pT1 症例では 53 例中 11 例, 20.8%, pT2 症例では 11 例中 5 例, 45.5%, pT3 症例では 14 例中 3 例, 21.4% が MMP-9 陽性であった。pT4 症例では陽性例はなかった (Table 5)。

組織分化度と MMP-9 との関連性においては, G1 症例では 70 例中 14 例, 20.0%, G2 症例では 32 例中 8 例, 25.0%, G3 症例では 10 例中 4 例, 40.0% が MMP-9 陽性であり, 組織分化度の低分化のものほど陽性率が高い傾向にあった (Table 6)。

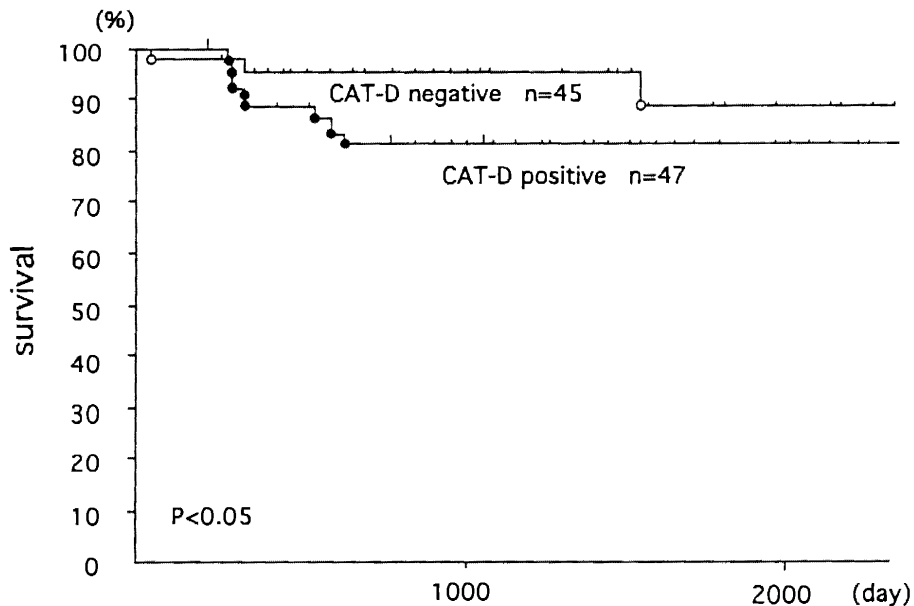


Fig. 4 Prognosis in endometrial carcinoma

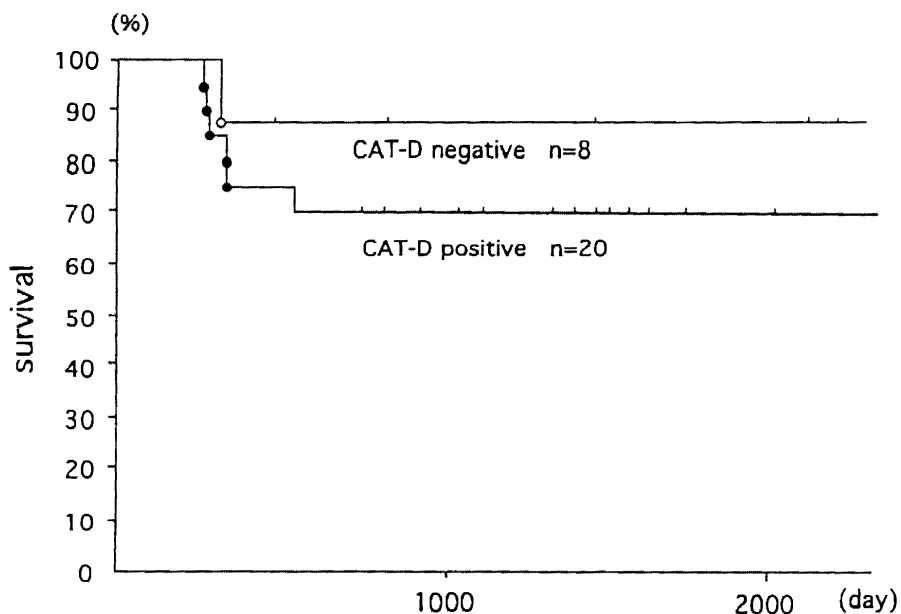


Fig. 5 Prognosis of pT2 and pT3 in endometrial carcinoma

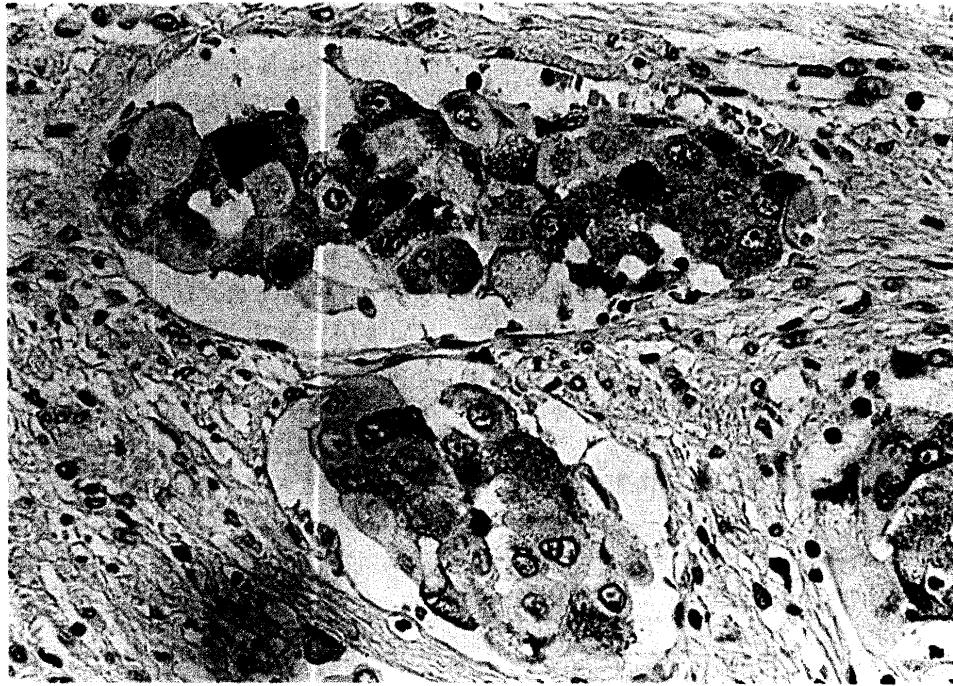


Fig. 6 MMP-9 staining (×200)

Table 5 Relationship between histopathological extent of primary tumor (pTNM) and MMP-9 staining

		MMP-9	
		+	-
pT1	n=53	11 (20.8%)	42 (79.2%)
pT2	n=11	5 (45.5%)	6 (54.5%)
pT3	n=14	3 (21.4%)	11 (78.6%)
pT4	n= 2	0 (0 %)	2 (100 %)

Table 6 Relationship between pathological grading of cancer cells and MMP-9 staining

		MMP-9	
		+	-
G1	n=70	14 (20.0%)	56 (80.0%)
G2	n=32	8 (25.0%)	24 (75.0%)
G3	n=10	4 (40.0%)	6 (60.0%)

筋層浸潤と MMP-9 との関連性において、筋層浸潤1/3以下の症例では40例中 5例, 12.5%, 1/3から2/3の症例では15例中 5例, 33.3%, 2/3以上の症例では25例中 9例, 36.0%が MMP-9 陽性であり、筋層浸潤の深いものほど陽性率が高く、1/3以下の症例と2/3以上の症例の間で有意差を認めた (Table 7).

リンパ筋転移と MMP-9 との関連性では、リンパ

Table 7 Relationship between muscle invasion and MMP-9 staining

		MMP-9	
		+	-
≤1/3	n=40	5 (12.5%)	35 (87.5%)
>1/3, ≤2/3	n=15	5 (33.3%)	10 (66.7%)
>2/3	n=25	9 (36.0%)	16 (64.0%)

* p<0.05

Table 8 Relationship between lymph node metastasis, vessel permeation and MMP-9 staining

		MMP-9		
		+	-	
metastasis	-	n=63	15 (23.8%)	48 (76.2%)
metastasis	+	n=10	4 (40.0%)	6 (60.0%)
vessel permeation	-	n=54	9 (16.7%)	45 (83.3%)
vessel permeation	+	n=25	9 (36.0%)	16 (64.0%)

節転移を認めた症例では10例中4例, 40.0%, リンパ節転移を認めなかった症例では63例中15例, 23.8%がMMP-9陽性でありリンパ節転移を認めたものの陽性率が高い傾向にあった (Table 8).

次に, 脈管侵襲とMMP-9との関連性では, 脈管侵襲を認めた症例では25例中9例, 36.0%, 脈管侵襲を認めなかった症例では54例中9例, 16.7%がMMP-9陽性であり, 脈管侵襲を認めた症例の陽性率が高い傾向にあった (Table 8).

腹腔洗浄液細胞診とMMP-9との関連性では, 細胞診陽性例は22例中5例, 22.7%, 陰性例は48例中12例, 25.0%がMMP-9陽性であり, 両者間に差は認められなかった.

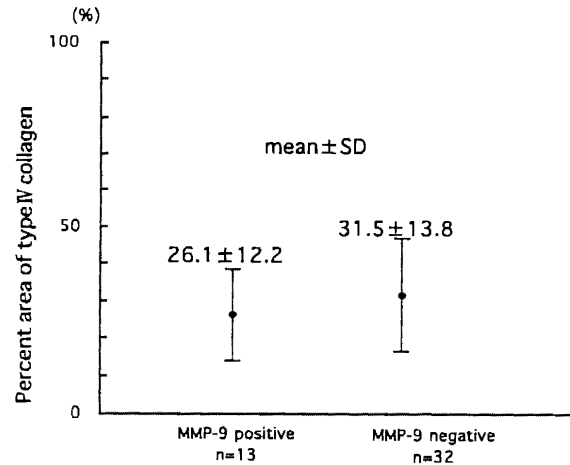


Fig. 8 Relationship between percent area of type IV collagen and MMP-9

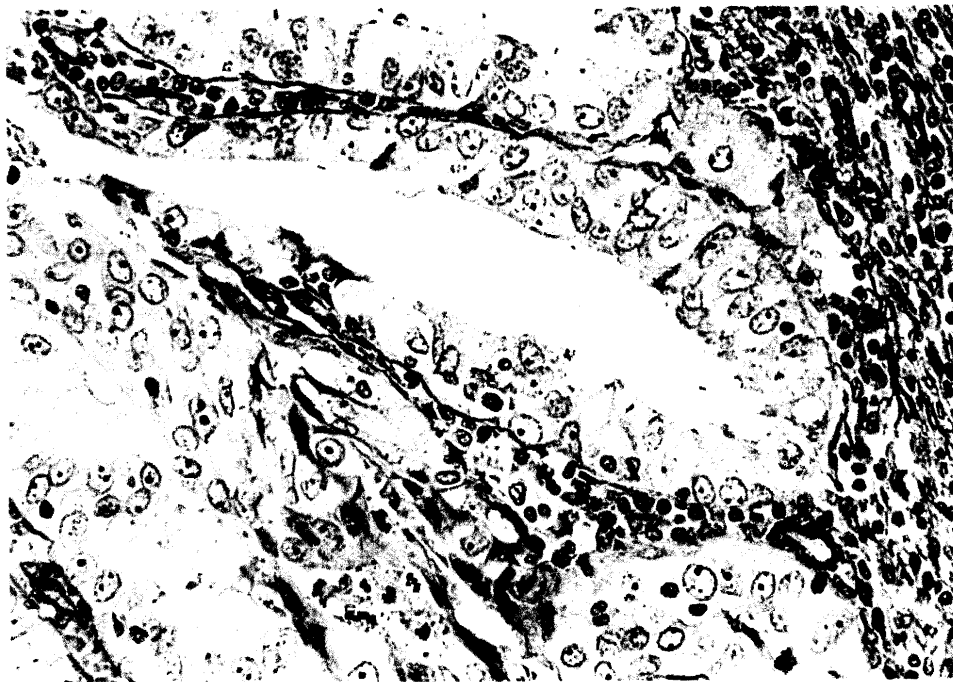


Fig. 7 Type IV collagen staining ($\times 200$)

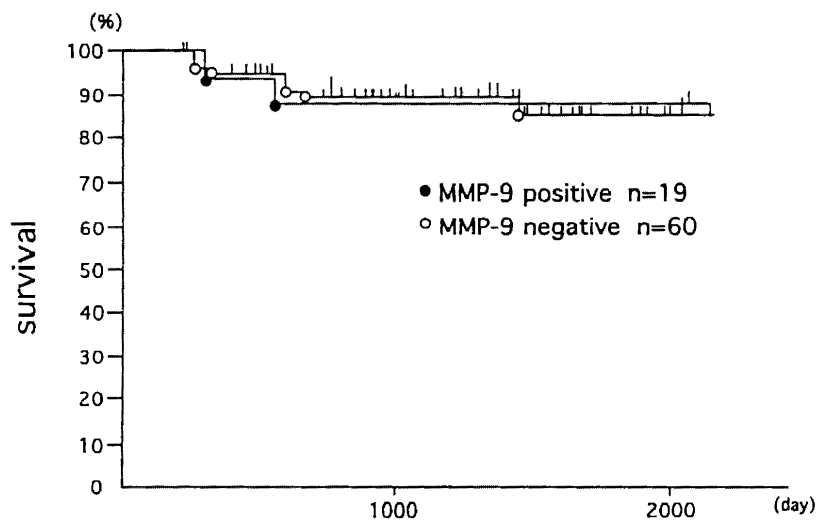


Fig. 9 Prognosis in endometrial carcinoma

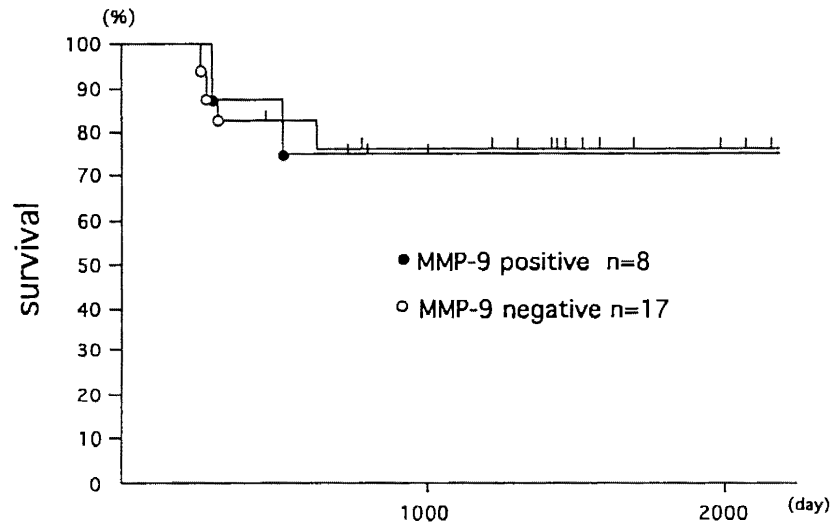


Fig. 10 Prognosis of pT2 and pT3 in endometrial carcinoma

5. MMP-9 と type IV collagen の関連性

Figure 7 に示すごとく, type IV collagen は, 一部, 断裂や欠損がみられた。

MMP-9 陽性症例と原発病巣における基底膜 type IV collagen の存在率は $26.1 \pm 12.2\%$ で, MMP-9 陰性症例では, その存在率は $31.5 \pm 13.8\%$ であった。両者間には有意差は認められなかった (Fig. 8)。

6. MMP-9 陽性症例, 陰性症例の生存率の検討
生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検討したが, MMP-9 陽性例, 陰性例両者間に差は認められなかった (Fig. 9)。pT2, pT3 症例に限って検討しても両者間に差は認められなかった (Fig. 10)。

考 察

癌細胞が浸潤・転移するには ①原発病巣での癌細胞の増殖・遊離, ②基底膜への浸潤とリンパ管, 血管など脈管内への移動, ③標的臓器への接着, ④血管壁, 基底膜および間質の貫通, ⑤標的臓器実質への浸潤・増殖と言った過程が必要である⁸。その過程で細胞外マトリックスへの浸潤はその構成成分の分解を伴う最も積極的な過程の一つである。

1983年 Liotta ら¹⁻² は癌細胞と基底膜の研究から three step hypothesis を提唱している。すなわち, ①癌細胞の Laminin receptor による基底膜 Laminin への結合, ② type IV collagenase など分解酵素の分泌と基底膜 collagen の分解, ③癌細胞の間質への移動である。

type IV collagenase を活性化する酵素にはプロエンザイムの分子量が 72 kD と 92 kD のメタロプロテイナーゼがあり, それぞれ, 72 kD type IV collagenase (MMP-2), 92 kD type IV collagenase (MMP-9) と呼ばれているが⁴, 最近では, MMP-9

がその活性の強さから, 最も注目を集めている。MMP-9 は, マクロファージや顆粒球のゼラチナーゼと同一の酵素であるが, 肺癌, 乳癌, 大腸癌など, ほとんどの上皮由来の癌細胞と血液系腫瘍細胞で高いレベルの発現がみられ, 大腸癌では明確な転移性との相関が得られたとの報告がある^{3,5}。

細胞外マトリックス分解酵素にはこれらメタロプロテイナーゼの他に, uPA, tPA などのセリンプロテイナーゼ, Cathepsin-D などのアスパラギン酸プロテイナーゼなどがある。

Cathepsin-D は分子量 42 kD のプロテイナーゼであり, エストロゲン依存性に癌細胞から産生され⁶, また, プロゲステロンによってその合成が制御されており, 月経期での内膜剝脱に大きな役割を果たしていると言われている⁹。癌の浸潤・転移や細胞外マトリックスとの関連については最近口腔扁平上皮癌¹⁰, 肺癌¹¹, 乳癌¹², 膀胱癌¹³, 肝癌¹⁴, などでその関連が注目されてきている。特に乳癌では腫瘍中の Cathepsin-D の濃度の高値例は低値例に比べて有意に予後不良で, リンパ節転移や腫瘍径とは独立した予後因子である事が指摘されている¹²。

今回, 我々は, 子宮内膜癌における Cathepsin-D と MMP-9 の浸潤・転移の役割について, 免疫組織化学的手法を用い検討した。

Cathepsin-D は口腔扁平上皮癌¹⁰, 肺癌¹¹, 乳癌¹², 肝癌¹⁴ などと同様に, 癌細胞の細胞質に顆粒状に染色された。染色された症例を陽性例として臨床病理学的所見との関係を検討してみると, 原発病巣の拡がりの高度な症例, 組織分化度の低い症例, 筋層浸潤の深い症例, リンパ節転移, 脈管侵襲の認められる症例, 腹腔洗浄液細胞診陽性症例などで, Cathepsin-D の陽性を示す症例が多かった。すなわち, 原発

病巣の拡がりでは pT1 と pT3, 及び pT2 と pT3 症例の間で, また筋層浸潤では 1/3 以下と 2/3 以上の症例の間で, Cathepsin-D 陽性率にそれぞれ有意差を認めた。さらにリンパ節転移, 脈管侵襲を認めた症例と認めなかった症例との間で, また腹腔洗浄液細胞診陽性例と陰性例との間で, Cathepsin-D 陽性率に, それぞれ有意差を認めた。

子宮内膜癌において, 佐藤ら⁹ は, 増殖期の Cathepsin-D は間質細胞で若干見られ, 分泌期で腺管にも認められるが, 子宮内膜増殖症, 特に異型増殖症では, 腺管に著明に発現され, さらに子宮内膜癌では G1 から G3 へと低分化になるにつれ発現が増強すると報告している。我々の検討でも, G1 から G3 へと低分化になる程, 発現が増強した。さらに, 今回の我々の検討から組織分化度以外にも, 原発病巣の拡がり, 筋層浸潤, リンパ節転移, 脈管侵襲, 腹腔洗浄液細胞診などと Cathepsin-D との関連性が明らかとなった。このことは, 子宮内膜癌において Cathepsin-D はその浸潤・転移に深く関わることを示唆する。

MMP-9 を酵素抗体法を用いて染色すると, 大腸癌¹⁵ などと同様に癌細胞の細胞質に細顆粒状に染色された。染色された症例を陽性例として臨床病理学的所見との関連性を検討してみると, 組織分化度の低い症例, 筋層浸潤の深い症例, リンパ節転移, 脈管侵襲の認められる症例で MMP-9 の陽性を示す症例が多く認められた。特に, 筋層浸潤では 1/3 以下と 2/3 以上の症例の間で有意差を認めた。

MMP-9 は肺癌, 乳癌などいくつかの上皮由来の癌細胞で検討されており, 特に, 大腸癌においては, 転移との相関が報告されている³。緒方ら¹⁵ は, 大腸癌において MMP-9 を免疫組織化学染色にて検討しているが, 肝転移陽性例の癌細胞における MMP-9 の陽性率は, 転移陰性例にくらべて有意に高かったとしている。婦人科癌においては, MMP-9 を使った免疫組織化学染色にて検討した報告はみられていない。今回我々が検討した結果からは MMP-9 は Cathepsin-D と同じく, 組織分化度の低いもの, リンパ節転移, 脈管侵襲のあるものなどで高い陽性率を示し, 子宮内膜癌において, 癌の浸潤・転移に深く関わっていると思われる。

子宮内膜癌の予後因子として組織分化度, 筋層浸潤の程度, リンパ節転移は以前より知られているが, 脈管侵襲の臨床的意義については不明な点が多い。井上¹⁶ は, 原発病巣の拡がりの高度な症例, 組織分化度の低い症例, 筋層浸潤の深い症例では脈管侵襲を認める症例が有意に多く, また, リンパ節転移は脈管侵襲を認める症例に有意に多かったことから, 脈

管侵襲は予後との関連性があり, 予後推定因子として重要であると述べている。今回の検討では, Cathepsin-D, MMP-9 とともに, 脈管侵襲のある症例において, それぞれ陽性率が高く, Cathepsin-D においては, 脈管侵襲のある症例とない症例の間で有意差を認めた。脈管侵襲は癌細胞が他臓器に浸潤・転移する際の初期の過程として重要な意味を持つといわれ, このような事から, Cathepsin-D, MMP-9 は子宮内膜癌において脈管侵襲と言う癌の浸潤・転移の比較的初期の段階に関与していると考えられる。

通常, type IV collagen は Laminin と結合し, Laminin は上皮細胞と結合して上皮細胞の直下に基底膜層を形成し, 細胞の支持および barrier として働いている¹⁷。癌が浸潤・転移するうえで, まず, この barrier である基底膜が破壊されなければならない。基底膜の形態と浸潤・転移に関して, 浸潤能, 転移能の強い癌に基底膜成分の減少や消失が強くみられる, つまり, 基底膜の破壊が強くと, 広範囲であるほどその癌は浸潤能, 転移能が高いという報告がなされている⁷。

Stenback¹⁸ らは子宮内膜癌において type IV collagen と Laminin の免疫組織化学的検討から, 癌巣の基底膜には欠損, 断裂がみられ, 低分化のものほどその欠損, 断裂の程度が強くなると報告している。波江野¹⁹ は大腸癌原発巣と肝転移巣における Laminin の局在に関する免疫組織化学的検討を行い, 肝転移陽性群では肝転移陰性群に比べて原発巣での Laminin 陽性率が有意に高率であり, また, 肝転移巣においては Laminin 染色反応が enhance されていると報告し, Laminin の役割を次のように説明している。すなわち, type IV collagenase を始めとする細胞外マトリックス分解酵素の分泌は癌細胞膜表面に存在する Laminin receptor が Laminin と結合する事で起こるとし, 原発病巣周囲あるいは脈管内への癌細胞の浸潤には Laminin の存在が必要であると考え, また標的臓器では Laminin が癌細胞と標的臓器内の脈管基底膜 type IV collagen とを接着させ, それにより癌細胞から type IV collagenase が分泌され, その結果, 脈管基底膜が破壊され標的臓器の組織内に浸潤すると考え, Laminin の存在が転移をむしろ促進させるとしている。また, 肥田²⁰ は大腸癌基底膜における type IV collagen の免疫組織化学的検討を行い, 肝転移は癌先進部の type IV collagen 陽性症例に高率にみられ, また, 肝転移巣にも type IV collagen は染色され, 腺管構造の明らかな分化型で, type IV collagen 強陽性のものが多かったことから, 癌細胞の浸潤の過程において基底膜の破壊, type IV collagen の消失は必ず

しも必要でない」と述べている。

今回、我々は、基底膜 Laminin, type IV collagen とその分解酵素である Cathepsin-D, MMP-9 との関連性に関して検討したが、Cathepsin-D 陽性症例の原発病巣における基底膜 Laminin の存在率と Cathepsin-D 陰性症例のそれとの両者間には関連性は認められず、また、MMP-9 陽性症例の原発病巣における基底膜 type IV collagen の存在率と MMP-9 陰性症例のそれとの両者間にも関連性は認められなかった。

一方、小畑らは、原発病巣の Laminin, type IV collagen は分化度の低いものほどその存在率が低くなると報告している。Laminin, type IV collagen などの基底膜構成成分は癌細胞、間質細胞の共同作業によりたえず、産生と破壊が繰り返されている事が推定されるが、今回の我々の検討によると、原発病巣での基底膜 Laminin, type IV collagen の存在率とその分解酵素である Cathepsin-D, MMP-9 との間に関連性はなかったことから、原発病巣の基底膜においては、産生と破壊が絶えず起こっているものの産生の方が役割が大きく、Cathepsin-D, MMP-9 などの細胞外マトリックス分解酵素の役割は相対的に低いものである事が示唆される。

予後については、Kaplan-Meier 法を用いて検討をしたが、Cathepsin-D 陰性例は陽性例に比較し予後良好であり、陽性例と陰性例との間に有意差を認めた。比較的予後の不良な pT2, pT3 症例に限るなど、背景を揃えて検討しても Cathepsin-D 陰性例は陽性例に比較し予後が良好な傾向であった。

MMP-9 でも同様の検討をしたが、陽性例、陰性例両者間に差は認められなかった。また、pT2, pT3 症例に限って検討しても、両者間に差は認められなかった。マトロプロテナーゼは、組織内では分子量 28 kD の TIMP-1 や分子量 21.6 kD の TIMP-2 により、その活性の制御を受け、それら inhibitor が癌細胞の基底膜浸潤を阻害していると考えられ²⁾、TIMP と MMP の発現のバランスの異常が、癌細胞の浸潤を左右する要因の一つであると考えられている³⁾。今回、MMP-9 において生存率の検討をしても、差が認められなかったのは、TIMP により MMP-9 の活性が制御された可能性があるものと考えられる。

結 論

子宮内膜癌において、細胞外マトリックス分解酵素である Cathepsin-D, MMP-9 を酵素抗体法で染色し、臨床病理学的所見との関連性について検討し、また、基底膜 Laminin, type IV collagen を酵素抗

体法で染色し、それらの存在率と Cathepsin-D, MMP-9 との関連性について検討した結果、次の結論を得た。

1. 子宮内膜癌において、原発病巣の拡がりの高度の症例、組織分化度の低い症例、筋層浸潤の深い症例、リンパ節転移、脈管侵襲の認められる症例、腹腔洗浄液細胞診陽性症例で Cathepsin-D の陽性例が多く、特に、原発病巣の拡がりでは、pT1 と pT3、及び pT2 と pT3 症例の間で、筋層浸潤では 1/3 以下と 2/3 以上の症例の間で、それぞれ有意差を認めた。さらにリンパ節転移、脈管侵襲を認める症例と認めない症例との間で、また腹腔洗浄液細胞診陽性例と陰性例との間で、有意差を認めた。
2. 組織分化度の低い症例、筋層浸潤の深い症例、リンパ節転移、脈管侵襲の認められる症例で MMP-9 の陽性を示す症例が多い傾向が認められた。特に、筋層浸潤では 1/3 以下と 2/3 以上の症例の間で、有意差を認めた。
3. Cathepsin-D 陽性症例の原発病巣における基底膜 Laminin の存在率と Cathepsin-D 陰性症例のそれとの両者間には関連性は認められなかった。
4. MMP-9 陽性症例の原発病巣における基底膜 type IV collagen の存在率と MMP-9 陰性症例のそれとの両者間にも関連性は認められなかった。
5. 生存率を Kaplan-Meier 法を用いて検討したが、Cathepsin-D 陰性例は陽性例に比較し予後良好であり、陽性例と陰性例との間に有意差を認めた。比較的予後の不良な pT2, pT3 症例に限るなど、背景を揃えて検討しても Cathepsin-D 陰性例は陽性例に比較し予後良好な傾向がみられた。
6. MMP-9 でも同様に予後との関係を検討したが、陽性例、陰性例両者間に予後の差は認められなかった。
7. 子宮内膜癌において、Cathepsin-D, MMP-9 と基底膜の存在率とは関連性がない事が明らかになった。
8. 以上の成績から、Cathepsin-D, MMP-9 は子宮内膜癌の浸潤・転移と密接に関連していることが示唆された。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導、御校閲を賜りました野田起一郎教授に深甚の謝意を捧げます。さらに、御指導、御協力頂きました小畑孝四郎助手、産科婦人科学教室の諸兄ならびに研究室の方々に心より感謝いたします。

文 献

1. Liotta LA, Rao CN, Wener UM, et al. Tumor inva-

- sion and the extracellular matrix, *Lab. Invest* 1983; 49: 636-649.
2. Liotta LA. Tumor invasion and metastasis-role of the extracellular matrix. *Cancer Res* 1986; 46: 1-7.
 3. 中島元夫. 転移における癌細胞と宿主細胞のマトリックスメタロプロテイナーゼの役割. *実験医学* 1994; 12: 971-979.
 4. 中島元夫. 細胞外マトリックス分解酵素. 清水元治編. 癌の悪性化と転移—悪性形質発現に関する因子—. 東京: 中外医学社, 1993; 124-136.
 5. Ogata Y, Enghild JJ, Nagase H. Matrix metalloproteinase 3 (stromelysin) activates the precursor for the human matrix metalloproteinase 9. *J Biol Chem* 1992; 267: 3581-3584.
 6. Tanaka Y, Himeno M, Kato K. Release of acid phosphatase from lysosomal membranes by Cathepsin-D. *J Biochem* 1990; 108: 287-291.
 7. 小畑孝四郎, 井上芳樹. 子宮内膜癌における基底膜の免疫組織学的研究. *産婦の進歩* 1992; 44: 143-156.
 8. Nicolson GL. Cancer metastasis organ colonization and the cell surface properties of malignant cells. *Biochim Biophys Acta* 1982; 695: 113-176.
 9. 佐藤信二. 癌関連遺伝子異常, 細胞増殖能および細胞外マトリックスの検索による子宮体癌・子宮内膜増殖症の生物学的悪性度の評価. *日産婦誌* 1993; 45: 776-788.
 10. 佐々木勲, 松村智弘, 上山吉哉ら. 口腔扁平上皮癌におけるカテプシンの発現に関する免疫組織化学的研究. *日口外誌* 1993; 39: 1150-1155.
 11. Thorpe SM, Rochefort H, Garcia M, et al. Association between high concentration of Mr 52,000 cathepsin-D and poor prognosis in primary human breast cancer. *Cancer Res* 1989; 49: 6008-6014.
 12. Spyrtos F, Mandelonde T, Brouillet JP, et al. Cathepsin-D an independent prognostic factor for metastasis breast cancer. *Lancet* 1989; 2: 1115-1118.
 13. 佐々 敏, 後藤孝司, 安藤千秋ら. 膀胱癌における Cathepsin-D の局在様式について. *医学検査* 1993; 42: 503.
 14. 佐々 敏, 中野 哲, 能田 卓ら. 肝細胞癌における Cathepsin-D の免疫組織学的局在及びその病理学的検討. *肝臓* 1993; 34: 150.
 15. 緒方 裕, 大北 亮, 諸富立寿ら. 大腸癌組織における Matrix Metalloproteinase 9 と Tissue Inhibitor of Metalloproteinase 1 の発現. 第 3 回がん転移研究会誌 1994; 74.
 16. 井上芳樹, 脈管侵襲 (リンパ管・血管) の組織診断とその意義. 森脇昭介, 杉森甫編. 取扱い規約に沿った腫瘍鑑別診断アトラス「子宮体部」—総論—. 東京: 文光堂, 1993; 84-88.
 17. Stanley JR. Structure and function of basement membrane. *J. invest. Derm.* 1982; 79: 69-72.
 18. Stenback F. Basement membrane laminin and type IV collagen in endometrial adenocarcinoma: Relation to differentiation and treatment. *Oncology* 1985; 42: 370-376.
 19. 波江野善昭. 大腸癌原発巣と肝転移巣における Laminin の局在に関する免疫学的検討. *近畿大医誌* 1989; 14: 361-372.
 20. 肥田 仁. 大腸癌基底膜における type IV collagen の免疫組織学的研究. *近畿大医誌* 1991; 16: 339-351.
 21. Schultz RM, Siberman S, Persky B, et al. Inhibition by human recombinant tissue inhibitor of metalloproteinase of human amnion invasion and lung colonization by murine B 16-F 10 melanoma cells. *Cancer Res* 1988; 48: 5539-5545.