

# 論文の内容の要旨

論文題目 大腸癌および炎症性腸疾患における PD-ECGF  
(Platelet-derived Endothelial Cell Growth Factor) 発現の臨床病理学的意義

指導教官 名川弘一 教授

東京大学大学院医学系研究科

平成 10 年 4 月入学

医学博士課程  
外科学専攻  
氏名 齋藤晋祐

## 研究の背景と目的

近年、血小板由来の血管新生促進因子である PD-ECGF (Platelet-derived endothelial growth factor) が 5'-DFUR を活性型の 5-FU に変換する酵素 dThdPase (Thymidine Phosphorylase) と同一であることが判明し、抗癌剤の代謝と血管新生促進作用の二つの働きを併せ持つ蛋白として PD-ECGF が腫瘍の生物学的悪性度に密接に関与している可能性が注目されている。

PD-ECGF の発現パターンは組織によって異なるが、大腸癌では癌細胞に発現するという報告と間質細胞に発現するという報告が存在し、統一した見解は得られていない。そして、PD-ECGF 発現は大腸癌の深達度、リンパ節転移および Dukes 分類と相関し、予後を悪化させる因子であるとされてきたが、根拠となる報告の多くが転移などの可能性がないとされる早期癌症例も含む検討の結果である。以上より、転移の可能性が極めて低い早期癌症例を除外した客観的な検討が必要と考えた。

また PD-ECGF の強発現が、腫瘍組織以外にも、創傷治癒過程、さらに関節リウマチや乾癬などの炎症性組織でも認められることが報告され、炎症性の血管新生においても重要な役割を果たす可能性が示唆されている。しかし、腸管の非特異的慢性炎症性疾患であるいわゆる炎症性腸疾患 IBD (inflammatory bowel disease) における PD-ECGF の発現と臨床的意義に関してはこれまで報告されていない。

本研究の第 1 章では大腸癌における PD-ECGF 発現の臨床病理学的意義を明らかにする目的で、進行大腸癌における PD-ECGF の発現を免疫組織学的に検討し、臨床病理学的因子、転移及び血管新生との関連について解析をした。

第2章では、炎症性腸疾患 (IBD, inflammatory bowel disease) における PD-ECGF 発現の臨床病理学的意義、特に血管新生との関係について明らかにすることを目的とした。

第3章では、血管内皮細胞における PD-ECGF の発現変化について、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) を用いた *in vitro* の系で検討を行った。

## 方法・結果

### 1) 大腸癌における PD-ECGF 発現の臨床病理学的意義に関する検討

大腸癌 86 例の切除標本の免疫染色により PD-ECGF の発現をしらべると、PD-ECGF 発現の主体は間質細胞であり、癌細胞に発現を認めたものは 2.3% に過ぎなかった。同一症例の連続切片の抗 CD68 抗体染色標本では、PD-ECGF とほぼ同様のパターンの発現を認め、主に腫瘍間質中のマクロファージ (M $\phi$ ) が PD-ECGF を発現していた。なお、正常大腸組織にも M $\phi$  が多く存在しているが PD-ECGF 発現はほとんど認めなかった。また、M $\phi$  の浸潤はあるが、PD-ECGF が低発現の大腸癌組織も存在したことから、PD-ECGF を発現する M $\phi$  は活性化 M $\phi$  であると考えられた。腫瘍周囲の血管内皮細胞に PD-ECGF 発現を認めなかった。

PD-ECGF 発現を画像解析装置により測定し、高発現群 56 例 (65.1%) と低発現群 30 例 (34.9%) に分けて検討した。PD-ECGF 発現と年齢、性別、腫瘍の占拠部位、組織型、深達度、リンパ管浸潤および脈管浸潤との間に有意な相関を認めなかったが、リンパ節転移は PD-ECGF 高発現群で転移率が有意に低かった。また血行性肝転移例に限って無再発生存率を検討した結果、PD-ECGF 高発現群は低発現群に比して有意に血行性転移の発生率が低かった。

### 2) 炎症性腸疾患 IBD (inflammatory bowel disease) における PD-ECGF の発現に関する検討

正常大腸粘膜や炎症のない IBD 粘膜には PD-ECGF が発現していなかったが、炎症の強い IBD 粘膜では間質の M $\phi$  や線維芽細胞に PD-ECGF の高度の発現を認め、その発現は炎症の程度に比例していた。また、炎症部位の血管内皮細胞にも PD-ECGF の強い発現を認めた。潰瘍性大腸炎とクローン病との間に発現の差を認めなかった。CD31 染色による微小血管密度の検討により、正常腸管組織や炎症のない IBD 腸管組織に比べ高度の炎症を伴う IBD 腸管組織において有意に微小血管密度が高値であった。

### 3) 内皮細胞における PD-ECGF 発現変化に関する検討

HUVEC に炎症性サイトカイン (interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )) および血管新生因子 (vascular endothelial growth factor (VEGF), basic fibroblast growth factor (bFGF)) を作用させると、HUVEC における PD-ECGF 発現はいずれも増強した。一方、血管新生因子による刺激の場合、VEGF は PD-ECGF 発現を増強させたが、bFGF は逆に発現を低下させた。

次に、大腸癌細胞が血管内皮細胞の PD-ECGF に与える影響については、大腸癌細胞株と HUVEC が直接接触した状態で培養する系では、HUVEC の PD-ECGF 発現が有意に低下した。他方、大腸癌細胞株と HUVEC を膜で隔て、直接接触させずに培養した系では、

PD-ECGF 発現の低下は軽度であった。

## 考察

これまでの報告によると大腸癌においては、腫瘍細胞そのものが強く発現するという報告がある一方、腫瘍間質の浸潤細胞が PD-ECGF 発現の主体であるという報告もあり、見解が統一されていない。本研究第 1 章において、最近、日本ロシユ(株)により作製された抗体を用いた検討により、PD-ECGF が主に腫瘍間質のMφおよび線維芽細胞に強く発現しており、腫瘍細胞に発現が認められる症例はわずかであることを確認した。また、上記日本ロシユ(株)の抗体を用いた胃癌における検討報告でも、PD-ECGF を発現する細胞の大部分がMφであると判明している。

腫瘍組織における PD-ECGF 発現の臨床病理学的意義として、乳癌、大腸癌、および胃癌において微小血管密度と相関し、主要な腫瘍血管新生促進因子である可能性がいくつかの報告で指摘されている。さらに、PD-ECGF の発現が腫瘍血管新生を誘導することにより大腸癌、胃癌において予後不良因子となると報告されている。しかし、これまでの報告が、転移の可能性が極めて低い早期癌を検討に含んでおり、また免疫染色の評価に客観性が得られていない点で、PD-ECGF 発現の臨床病理学的意義の解析には不十分であると考えた。検討の対象から早期癌を除外し、また免疫染色の評価に客観性を持たせるため、画像解析装置を用いて染色面積の数値化した本研究では、これまでの報告とは異なり、PD-ECGF の発現が大腸癌のリンパ節および血行性転移と逆相関するという、これまでの報告と異なる結果が得られた。すなわち、PD-ECGF 発現の強い症例では、有意にリンパ節及び血行性転移が低いという結果であった。

Mφ が腫瘍組織や炎症部位の免疫反応に重要な役割を果たすと従来考えられてきたが、本研究より、PD-ECGF 強発現のMφが活発に免疫反応を誘導することにより、転移が抑制される可能性が示唆された。

本研究第 2 章においては、IBD 患者の腸管組織の炎症を有する粘膜では、Mφや線維芽細胞などの間質細胞に PD-ECGF の発現を認めた。また腸管の炎症強度に伴って PD-ECGF の発現が強くなる傾向を認めた。興味深いことに、IBD 腸管粘膜においては血管内皮細胞にも PD-ECGF の発現が強く見られ、腸管の炎症強度に比例して増強する傾向がみられた。また、炎症の強度に相関して微小血管密度も増加しており、間質細胞や内皮細胞における PD-ECGF 発現が炎症性血管新生の進展に重要な役割を果たしていることが示唆された。血管内皮細胞が PD-ECGF を自己産生し自己分泌することは、炎症性血管新生作用において自己組織を再構築する上で重要な現象であり、IBD の病態形成に何らかの関与の可能性が考えられる。

本研究第 3 章では、炎症性サイトカイン (IL-1β、TNF-αおよび IFN-γ) が、いずれも HUVEC の PD-ECGF 発現を増強させた。これらのサイトカインは炎症性疾患の病態形成において重要な役割を果たすことが知られている。特に TNF-αが注目され、組織中の TNF-α陽性Mφが微小血管の内皮細胞配列を障害して血管透過性を亢進させ、炎症細胞の組織への移動を増加させることから、TNF-αに対する中和抗体が IBD に対する新しい治療戦略として期待されている。今回確認された炎症性サイトカインによる血管内皮細胞

の PD-ECGF 発現増強も、IBD の病態形成過程における重要なステップの一つである可能性が考えられた。一方、血管新生因子である bFGF による刺激や大腸癌細胞株との共培養によって、HUVEC の PD-ECGF 発現は有意に低下した。これらの結果は、本研究第一章で確認された、癌周囲の微小血管内皮細胞が PD-ECGF を発現しない所見と一致するものであった。しかし、VEGF 刺激では、HUVEC の PD-ECGF 発現が増強した。したがって、血管新生因子は HUVEC における PD-ECGF 産生に対して正と負の異なった作用を有することが考えられる。

## 結語

大腸癌では抗腫瘍免疫反応において、炎症性腸疾患では炎症性血管新生において PD-ECGF がそれぞれの病態形成に重要な役割を担っていると考えられた。PD-ECGF に関するさらなる研究によりこれらの疾患の制御が期待されると思われる。