原著

大腸癌組織におけるトリプシノーゲン蛋白の発現について

金沢大学第2外科

尾 山 勝 信	太 田 哲 生	西 村 元 一
二 宮 致	伏 田 幸 夫	北 川 裕 久
萱 原 正 都	清 水 康 一	八 木 雅 夫
三 輪 晃 一		

Trypsinogen Expression in Human Colon Cancers

Katsunobu OYAMA, Tetsuo OHTA, Genichi NISHIMURA,
Sachio FUSHIDA, Itasu NINOMIYA, Hirohisa KITAGAWA,
Masato KAYAHARA, Kouichi SHIMIZU, Masao YAGI
and Koichi MIWA

Department of Surgery II, Kanazawa University School of Medicine

近年、肝癌や胃癌などの消化器癌細胞が膵腺房細胞由来のトリプシノーゲンを過剰発現していることが報告されている。しかし、大腸癌組織におけるトリプシノーゲンの発現について検討した報告はない。そこで、今回われわれは外科的に切除された大腸癌症例154例を対象に、抗ヒトトリプシノーゲンマウスモノクローナル抗体を用いて、大腸癌組織におけるトリプシノーゲン蛋白の発現程度を評価した。154例中68例(44.2%)の癌細胞内にトリプシノーゲン蛋白の発現を認めた。トリプシノーゲン蛋白は癌細胞の核上部細胞質内に粗顆粒状に分布していた。発現癌細胞にはheterogeneityがみられ、とくに癌先進部で強く発現していた。大腸癌細胞においてトリプシノーゲン蛋白の発現程度と臨床病理学諸因子の間には明かな相関はみられなかった。以上の所見よりヒト大腸癌細胞においても、トリプシノーゲンの過剰発現が確認され、浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。

索引用語：トリプシノーゲン (trypsinogen), 大腸癌 (colorectal cancer), 浸潤 (invasion), 転移 (metastasis)

はじめに

近年、癌細胞の局所浸潤ならびに遠隔転移における細胞外マトリックス分解酵素の役割が注目されている¹⁾。トリプシノーゲンの活性体であるトリプシンはセリン系プロテアーゼの1つであり、マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMPs) などのマトリックス分解酵素の活性化に関与するだけでなく、自身もゼラチン分解能を有することが知られている²⁾³⁾。元来、膵腺房細胞より分泌される消化酵素であるトリプシノーゲンが膵・胆道癌

や胃癌などの消化器癌や卵巣癌などに過剰発現していることが報告されており^{4)~7)}、癌の浸潤・転移への関与が示唆されている。しかし、これまでにヒト大腸癌組織におけるトリプシノーゲンの発現について検討した報告はない。

そこで、今回われわれは免疫組織化学的手法を用いて、ヒト大腸癌症例におけるトリプシノーゲンの発現ならびにその発現程度と、癌の進行度に関する臨床病理学的諸因子との関連について検討し、興味ある二、三の知見を得たので報告する。

対 象

当科で外科的切除が行われた原発性大腸癌症例のなかから無作為に抽出した154例を対象とした。大腸癌症例の内訳は、男性97例、女性57例、年齢は28歳から86歳で平均69.7歳であった。組織学的病期では0期8例、I期12例、II期51例、IIIa期24例、IIIb期26例、IV期33例であった。

方 法

1) 免疫組織化学的染色

一次抗体には抗ヒトトリプシノーゲンマウスモノクローナル抗体 (Chemicon, USA) を用い、ホルマリン固定パラフィン包埋された腫瘍部代表切片の2～5個 (平均3個) のブロックより4mの薄切切片を作成し、脱パラフィン後に既報の手順⁸⁾で免疫染色を行った。

①一次抗体の細胞膜透過性を亢進させるため、40 g/m l のプロテアーゼK (Boehringer Mannheim, Germany) と室温で10分間反応させる。②0.3%過酸化水素加メタノール溶液と室温で30分間反応させる。③Protein Block Serum-Free (Dako, USA) と室温で30分間反応させる。④正常ヤギ血清 (Dako) の20倍希釈液と室温で20分間反応させる。⑤抗ヒトトリプシノーゲンマウスモノクローナル抗体 (Chemicon, USA) の300倍希釈液と4℃で一晩反応させる。⑥ビオチン標識ヤギ抗マウスIgG (Dako) と室温で60分間反応させる。⑦パーオキシダーゼ標識ストレプトアビジン (Dako) と室温で60分間反応させる。⑧免疫複合体反応物を0.01%過酸化水素加3, 3'-ジアミノベンチジン (3, 3'-diaminobenzidine, DAB) (Sigma Chemical, USA) で発色させ、最後に核染色を行った。なお、使用した一次抗体の抗ヒ

Fig. 1 The expression of trypsinogen in normal pancreas and normal colon mucosa.

A: Normal pancreas. In normal pancreas, trypsinogen was expressed in acinar cells but not in centroacinar cells, islet cells or secretory duct epithelia.

B: Normal colon mucosa. There was no positive staining in normal colon mucosa. (A: $\times 100$, B: $\times 400$)

トトリプシノーゲンに対する免疫反応の特異性は、すでにTeradaら⁹⁾により報告されている。また、陽性対照として正常膵組織(**Fig. 1a**)、陰性対照として正常乳腺組織のホルマリン固定パラフィン包埋切片を用いた。

2) 臨床病理学的因子との統計学的検討

発現陰性例と陽性例の2群間における免疫反応陽性率と臨床病理学的因子との関連についてカイ二乗検定を用い、危険率5%未満を有意差ありとした。

成 績

大腸癌症例154例中68例(44.2%)の癌細胞中にトリプシノーゲンの発現が認められた。発現例では、トリプシノーゲンは核上部細胞質内に粗顆粒状に存在した(**Fig. 2**)。正常大腸粘膜・間質にも発現はみられなかった(**Fig. 1b**)。発現陽性細胞に

は、組織間、症例間でheterogeneityがみられるものの、癌先進部において発現が強い傾向がみられた(**Fig. 3**)。正常膵の腺房細胞にトリプシノーゲンの発現がみられたが、腺房中心細胞、導管上皮にはみられなかった(**Fig. 1a**)。正常乳腺細胞においては全く発現を認めなかった。

臨床病理学的諸因子との関連においては、トリプシノーゲンは進行度とは無関係に早期より発現していた。組織分類、壁浸達度、リンパ節転移、肝転移、腹膜播種などの因子との関連についても、いずれも有意差はみられなかった(**Table 1**)。

また、17例のリンパ節転移巣についても検討を行った。原発巣において発現陽性であった13例中10例において、検索したリンパ節転移巣全てに原発巣と同程度の発現を認めた(**Fig. 4**)。しかし、残り3例においては発現は認められなかった。また、原発巣が陰性であった4例はいずれも、リン

Fig. 2 The expression of trypsinogen in colon cancer.

Immunoreactivity was observed as a dark brownish and coarsely granular pattern at the supranuclear cytoplasm of the tumor cells. N, Normal colon mucosa adjacent to cancer. T, Tumor cells. (A: $\times 40$ B: $\times 100$ C: $\times 400$ D: $\times 1000$)

Fig. 3 Trypsinogen expression at the invasive front of the tumor.

The intensity of trypsinogen immunoreactivity in the tumor area varied from specimen to specimen, as well as from area to area within the same specimen. In most cases, trypsinogen immunoreactivity was more pronounced at the invasive front of the tumor. (A: $\times 40$ B: $\times 400$)

パ節転移巣においても発現を認めなかった。

考 察

癌の浸潤・転移に対して種々の蛋白質分解酵素が重要な役割を演じていることが明らかとなっている。なかでも、MMPsによる細胞外マトリックスの破壊が重要視されている。癌細胞から分泌されるMMPsは不活性なproenzymeとして存在しており、活性化される必要がある¹⁾。urokinase-type plasminogen activator (u-PA) を代表とする癌細胞によって産生されるセリン系プロテアーゼは、MMPsの活性化に関与していることが明らかとなっている。さらに、この活性化過程にセリン系プロテアーゼの1つで、トリプシノーゲンの活性体であるトリプシンが重要な役割を演じていることが示唆されている。また、トリプシン自身もゼラチン分解能を有し、基底膜や

細胞膜を破壊する作用を持ち²⁾、近年その働きが解明されてきている。

トリプシノーゲンは元来膵の腺房細胞で合成・分泌されている酵素であるが、1988年にStenman UHらが卵巣粘液性腫瘍の囊胞内容液にトリプシノーゲン様物質が含まれていることを報告⁴⁾して以来、種々の癌培養細胞株や臨床症例の切除標本において検討がなされている。卵巣腫瘍以外にも膵癌、胃癌、肺癌⁵⁾⁻⁸⁾¹⁰⁾においてトリプシノーゲンの異常発現が報告されており、培養細胞株では、卵巣癌、胃癌、乳癌、神経膠眼腫、大腸癌など、多様な細胞株における発現が報告されている¹¹⁾⁻¹⁴⁾。さらに、卵巣癌においては癌の進行度とトリプシノーゲンの発現には相関がみられ¹⁵⁾、胃癌においても腹膜播種例や予後不良例に高率に発現がみられた⁷⁾と報告されている。また、腫瘍から分泌されるトリプシノーゲンと膵腺房細胞より分

Table 1 Relationship between trypsinogen expression and clinicopathological features.

Variables	No. (%) of patients		p-value
	Expression of trypsinogen		
	Positive (n =68. 44.8%)	Negative (n =86. 55.2%)	
Clinical stage			
stage 0	4 (50)	4 (50)	
stage I	7 (59)	5 (41)	
stage II	25 (49)	26 (51)	
stage IIIa	7 (29)	17 (71)	
stage IIIb	12 (46)	14 (54)	
stage IV	13 (49)	20 (61)	N.S.
Histologic differentiation			
well	23 (34)	39 (45)	
moderate	37 (54)	40 (46)	
poor	8 (12)	7 (9)	N.S.
Depth of tumor invasion			
<mp	21 (31)	32 (37)	
mp±	47 (69)	54 (63)	N.S.
Lymph node metastasis			
Negative	35 (51)	35 (51)	
Positive	33 (49)	33 (49)	N.S.
Liver metastasis			
Negative	53 (77)	65 (76)	
Positive	15 (23)	21 (24)	N.S.
Peritoneal metastasis			
Negative	64 (94)	82 (95)	
Positive	4 (6)	4 (5)	N.S.

泌されるトリプシノーゲンが同一であることも報告されている¹¹⁾。われわれはこれらの知見をもとに、治療への応用も検討しており、セリンプロテアーゼのinhibitorであるFOY-305が実験モデルにおいて膵癌の肝転移を有意に抑制したことを既に報告した¹⁶⁾。

本報告以外に大腸癌症例におけるトリプシノーゲンの発現を検討した報告はなく、今回の検討によりヒト大腸癌組織においても癌細胞に発現していることが確認された。また、大腸癌では病期に関係なく早期より発現がみられており、癌細胞が間質への浸潤をはじめる初期段階よりトリプシノーゲンが過剰発現し、癌の浸潤・転移に深く関わっているものと考えられた。

ところで、癌細胞より分泌されるトリプシノーゲンはトリプシンの前駆体であるが、トリプシノーゲンの活性化機序についても、近年論議されている。膵トリプシノーゲンは通常、エンテロキナーゼにより活性化されるが、酸性環境下(pH4.5-5)ではエンテロキナーゼの関与なしでもトリプシノーゲンからトリプシンへautoactivationされることも明らかとなってきた¹⁷⁾。以前、われわ

れはトリプシノーゲンの3つのisoformの1つであるトリプシノーゲン-1は酸性環境下でautoactivationされることを報告した⁵⁾¹⁸⁾。癌の細胞外は正常組織と比べ酸性環境にあることも知られており⁴⁾¹⁹⁾、癌細胞周囲にはトリプシノーゲンを活性化する微小環境が存在することが予想される。これら、近年の知見により、癌組織においてはエンテロキナーゼの関与なしでもトリプシノーゲンがautoactivationされ、MMPsの活性化など、癌の浸潤・転移に関与する可能性がある。われわれは、膵癌におけるmRNAおよび蛋白レベルでのトリプシノーゲンの発現とそのautoactivationの可能性を報告²⁾しており、今後大腸癌においても培養細胞株を用いて検索する予定である。

結 語

今回われわれは大腸癌症例154例を対象に、抗ヒトトリプシノーゲンマウスモノクローナル抗体を用いて、大腸癌細胞におけるトリプシノーゲン蛋白の発現を評価した。154例中68例(44.2%)の癌細胞内にトリプシノーゲン蛋白の発現を認められ、ヒト大腸癌細胞においても、トリプシノーゲ

Fig. 4 The expression of trypsinogen in metastatic lymph node.

Trypsinogen was expressed in the metastatic lymph node. Expression of trypsinogen was positive in metastatic lymph node in 10/13 cases in which trypsinogen was expressed in primary lesions. (A: $\times 40$ B: $\times 400$)

ンの過剰発現が、浸潤・転移に関与している可能性が示唆された。

参考文献

- 1) 中島元夫：転移に関する細胞外マトリックス分解酵素。実践医10：249-255, 1992
- 2) Ohta T, Tajima H, Fushida S, et al: Cationic trypsinogen produced by human pancreatic ductal cancer has the characteristics of spontaneous activation and gelatinolytic activity in the presence of proton. *Int J Mol Med* 1: 689-692, 1998
- 3) 越川直彦, 平原史樹, 宮城洋平他：細胞外マトリックス分解酵素と癌の浸潤。GI Reserch 3: 476-482, 1995
- 4) Stenman UH, Koivunen E, Vuento M: Characterization of a tumor-associated serine protease. *Biol Chem Hoppe Seyler* 369: suppl: 9-14, 1988
- 5) Ohta T, Terada T, Nagakawa H, et al: Pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human pancreatic carcinomas and associated metastatic lesions. *Br J Cancer* 69: 152-156, 1994
- 6) Koshikawa N, Yasumitsu H, Umeda M, et al: Multiple secretion of matrix serine proteinases by human gastric carcinoma cell lines. *Cancer Res* 52: 5046-5033, 1992
- 7) Ohta T, Terada T, Nagakawa T, et al: Differential expression of pancreatic trypsinogen and cathepsin B in human scirrhus-type and intestinal-type gastric cancer. *Oncol Rep* 1: 203-208, 1994
- 8) 俵 友恵：ヒト膵管癌における膵トリプシノーゲンの発現に関する組織学的研究。金沢大十全医

会誌107:154-162, 1998

- 9) Terada T, Nakamura Y: Immunohistochemical demonstration of pancreatic alpha-amylase and trypsin in intrahepatic bile ducts and peribiliary glands. *Hepatology* 14:1129-1135, 1991
- 10) Kawano N, Osawa H, Ito T, et al: Expression of gelatinase A, tissue inhibitor of metalloproteinases-2, matrilysin, and trypsin (ogen) in lung neoplasms: an immunohistochemical study. *Hum Pathol* 28:613-622, 1997
- 11) Koshikawa N, Yasumitsu H, Nakajima Y, et al: Identification of one- and two-chain forms of trypsinogen 1 produced by a human gastric adenocarcinoma cell line. *Biochem J* 303:187-190, 1994
- 12) Koivunen E, Saksela O, Itkonen O, et al: Human colon carcinoma, fibrosarcoma and leukemia cell lines produce tumor-associated trypsinogen. *Int J Cancer* 47:592-596, 1991
- 13) Koivunen E, Ristimäki A, Itkonen O, et al: Tumor-associated trypsin participates in cancer cell-mediated degradation of extracellular matrix. *Cancer Res* 51:2107-2112, 1991
- 14) Bernard-Perrone F, Carrere J, Moriscot C, et al: pancreatic trypsinogen 1 expression during cell growth and differentiation of two human colon cells. *Am J Physiol* 274:G1077-1086, 1998
- 15) Miyagi E, Yasumitsu H, Hirahara F, et al: Characterization of matrix-degrading proteinases and their inhibitors secreted by human gynecological carcinoma cells. *Jpn J Cancer Res* 92:568-576, 1995
- 16) Ohta T, Futagami F, Tajima H, et al: Inhibitory effect of a serine protease inhibitor, FOY-305 on the invasion and metastasis of human pancreatic cancers. *Int J Oncol* 11:813-817, 1997
- 17) Brodric JW, Largman C, Johnson JH, et al: Human cationic trypsinogen. Purification, characterization, and characteristics of autoactivation. *J Biol Chem* 253:2732-2736, 1978
- 18) 北川裕久, 太田哲生, 萱原正都他: 膵胃吻合術後のtrypsin活性について. *胆と膵* 19:795-797, 1998
- 19) Stubbs M, McSheehy PM, Griffiths JR, et al: Causes and consequences of tumor acidity and implications for treatment. *Mol Med Today* 6:15-19, 2000