家兎 VX2 舌癌におけるフィブロネクチンの動態に関する研究

里見 貴史

A study on the dynamics of fibronectin in rabbit VX2 tongue cancer

Takafumi SATOMI

Abstract: In a rabbit tongue cancer model, prepared by transplantation of VX2 carcinoma, the dynamics of fibronectin (FN) with the passage of times was investigated in two groups: an untreated group with active tumor proliferation a group in which tumor proliferation was suppressed by anticancer treatment. The response of FN surrounding the transplanted tumor was strongly positive reaction on day 7 after transplantation in contrast, strongly positive reaction tended to persist when tumor proliferation was suppressed. Cervical lymph node metastases were observed about the time when the FN response surrounding the transplanted tumor decreased. Furthermore, the cellular FN (cFN) response (Extra Domain A; ED-A expression) was negative reaction on day 7 after transplantation, and was thereafter expressed gradually. The expression in the group with suppressed tumor proliferation was greater than that in the group with active tumor proliferation. The FN/cFN response at metastasized lymph nodes were observed only in small case of cancer tissue which appeared to represent initial metastasis formation; all sites showing FN response also showed cFN response. Increased FN concentration in blood is not due to tumor bearing status, and it doesn't increase until tumor proliferation is active, and its measurement with the passage of times can therefore serve as a parameter of tumor proliferation activity. FN concentration in blood which increased during tumor proliferation was attributed to increase in either intact plasma FN (pFN) or ED-A free FN fragment by western blotting analysis of FN in plasma. For FN, there was no relation between the response surrounding the tumor and the blood concentration. The cFN response surrounding the tumor was therefore considered to be one of cancerous stroma reactions that had an inhibitory effect on the cancer. It was suggested that monitoring FN, especially cFN response surrounding the tumor, can serve as a useful parameter for evaluating treatment regimens and prognoses.

Key words: fibronectin (フィブロネクチン), cellular fibronectin (細胞血フィブロネクチン), plasma fibronectin (血漿型フィブロネクチン), Extra Domain-A (エキストラドメイン-A), fibronectin concentration in blood (血中フィブロネクチン濃度)

緒 言

細胞外マトリックスの1つであるフィブロネクチン

(fibronectin: 以下 FN と略す) は, 細胞の接着因子としての基本的性質をもち, 細胞表面や組織, 体液中に存在する高分子糖蛋白質である. 特に1978年 Yamada ら¹⁾ は培養線維芽細胞の発癌ウイルスや発癌物質による悪性

東京医科大学口腔外科学講座
(主任: 内田安信教授)
Department of Oral Surgery, Tokyo Medical

College (Chief: Prof. Yasunobu Uchida)
受付日: 平成5年9月20日

FNの構造: FNは3つのモジュール(I型, II型, III型)の反復によって構成されている。

ED-A, ED-B, IIICSは、可変的スプライシングにより調節を受ける領域である。

図1 フィブロネクチンのドメイン構造

変化とともに細胞表面のFNが消失し、無秩序な発育が出現すると述べ、さらに Yamada ら²⁾ は FN が形質転換した細胞に対して正常な形態に回復させる効果を有すると報告し大きな注目を集めた。その生理機能として、細胞の接着、伸展、移動、増殖、分化など細胞の基本的活動に関与することが挙げられ、また、食作用を促すオプソニンとして、細胞遊走因子として作用することや、止血、血栓にも関係することが知られている³⁾。

FN は、分子量約24万 (α 鎖)と約23万 (β 鎖)の2本のサブユニットがS-S結合された2量体として存在する血漿型FN (plasma FN: 以下pFNと略す)とpFNより分子量が2~3万ほど大きく、いくつものS-S結合からなる多量体として存在する細胞性FN (cellular FN: 以下cFNと略す)に大別される^{3,4)}。また、cFNには、pFNに存在しない特有な2つのExtra Domain (以下ED, ED-A, ED-B)領域が存在している^{5,6)}(図1)。この2つのED領域は、胎児組織や癌組織において発現が増加することが報告されている⁷⁾。癌患者におけるFNの動態は今だ不明な点が多く、血中FN濃度は、担癌状態で上昇するという報告^{23,27-34,36)}がある一方で、病期の進行が進んだ症例では、逆に低下するという報告³¹⁾もあり統一的な見解はない。また、担癌患者の原発巣におけるFNについても基底膜で断裂および消失するという報告⁸⁾と癌間質でび慢性に認められるという報告^{9,10)}などさまざまである。最近では、癌間質のFN陽性症例が陰性症例に比して予後が良好であるとの報告もみられている¹¹⁻¹³⁾。

今回、著者は、VX2癌移植による家兔舌癌モデルを用いて、癌増殖が活発な状態と癌増殖が抑制された状態とで、両者の経時的なFNの血中濃度と腫瘍周囲発現および頸部リンパ節転移との関連性を検索すると同時に、移植腫瘍周囲と転移リンパ節における癌胎児性エビトープであるED領域(ED-A)の発現の推移も検索した。また、血中FN濃度が上昇を来した場合、その血中濃度は何を反映しているのか、癌組織において発現の増加が

確認されているED-A領域に注目して血漿中のFNをウェスタンブロット解析し、担癌状態におけるFNの動態およびその意義について詳細な検討を行った。

実験材料ならびに方法

1. 実験材料

1) 実験動物

実験動物は、体重約2.5kgの雄性日本白色家兔60羽を用いた。家兔は恒温調節を施した動物室にて固形飼料と水で飼育し、環境に十分ならした後、異常がないことを確認して実験に供した。

2) 実験腫瘍

ヒトの口腔癌の組織型の多くが扁平上皮癌を示すことから、実験腫瘍には、それに類似した特徴を多く備えている家兔に可移植性なVX2癌を使用した。

3) 使用薬剤

使用薬剤は、アンスラサイクリン類の抗腫瘍性抗生物質であるアドリアシン(協和発酵株式会社製、以下ADR)で、投与量は、実験動物の種類、体重および薬剤許容量などを考慮した予備実験の成績から0.5mg/kg/dayとした。

2. 実験方法

1) 移植方法および抗癌剤投与方法

移植用癌細胞浮遊液は、外山ら¹⁴⁾の方法に準じて作製し、最終的に生理食塩液にて、容積比で10%とし、家兔の舌尖より後方1/3の左舌側縁から深さ約3mmの部位に0.1ml移植した。

ADRは、移植後7日目から0.5mg/kg/dayを連日7日間および14日間、耳静脈より静脈内注射により投与した。

2) 実験群

実験群は、移植後7日目群、移植後14日目群、移植後21日目群、移植後7日目よりADR連日7日間投与群、移植後7日目よりADR連日14日間投与群とし、各群そ

れぞれ10羽を実験に供した。また、対照群として正常家兎10羽を用いた。各群とも、実験終了後屠殺し、舌、頸部リンパ節を切除した。舌では、硬結の触知できる範囲を腫瘍の大きさとし、長径、幅径、厚径を可及的正確に計測し、腫瘍体積を求めた。摘出物である舌の移植腫瘍は、半割し一方を凍結とし、もう一方を10%ホルマリン液に固定後、パラフィン切片とし H-E 染色を施した。また、頸部リンパ節摘出物においては、すべて H-E 染色を施し、転移の有無を検索した。

3) 免疫染色

FN および cFN の組織局在は、抗家兎 FN 抗体 (ポリクローナル抗体) および抗家兎 cFN 抗体 (モノクローナル抗体: ED-A 領域認識) を使用した酵素抗体法 (PAP 法および SAB 法) で観察した。頸部転移リンパ節のパラフィン切片に限り、通法に従って、脱バラ、アルコール脱水後、0.1%トリプシン溶液 (Sigma 社) で、37°C、30 分間前処理を行った。その後、移植腫瘍の凍結切片同様、内因性ペルオキシダーゼ活性の阻止 (0.3% H₂O₂ メタノール溶液で10分間)、非特異反応阻止 (4% 正常ウシ血清で室温 40 分間) 後、1 次抗体に、ヤギ抗家兎 FN 抗体 (Cappel 社) およびマウス抗家兎 cFN (ED-A 領域認識) 抗体 (Locus 社) を使用し、湿箱内で 4°C、24 時間反応させた。その後、抗ヤギ PAP Kit (DAKO 社) および抗マウス LSAB Kit (DAKO 社) を用いて使用法通りに行った。しかし、発色には、3-3 ジアミノベンチジン (DAB-H₂O₂ 溶液) を使用し、その後ヘマトキシリンにて核染色を施した。使用した各抗体の希釈倍率は表 1 に示す。抗家兎 FN 抗体の反応の判定は、強陽性、弱陽性、陰性とし、抗家兎 cFN 抗体の反応の判定は、陽性、陰性とした。また、この 2 種類の抗体を用いることにより、FN 陽性で cFN 陰性の場合を pFN 陽性と判断した。なお、免疫反応の対照には、ヤギ正常血清およびマウス正常血清を 1 次抗体として用い、他の反応は前記のとおりに行った。

4) 血漿中の FN 濃度測定法

移植後 21 日目群、移植後 7 日目より ADR 連日 14 日間投与群の 2 群に限り移植前 (正常時)、移植後 7、14、21 日目におおのの家兎の耳静脈より採血して分離した血漿を用いた。また、ADR 連日投与での血漿中の FN (以下血中 FN と略す) 濃度へ与える影響を調べるため対照群である正常家兎 10 羽中 5 羽に ADR を連日 14 日間投与し、その 7 日目と 14 日目に採血して得られた血漿も用いた。血漿は、測定日まで -80°C で凍結保存した。なお、測定時の凍結溶解は、1 回限りとした。血中 FN 濃度測定は、ロケット免疫電気泳動法で行った。すなわち、1% 抗家兎 FN 抗体 (ポリクローナル抗体: Cappel 社) 含有のゲルプレートを作製し、ゲルポンチにてサンプルウェルを開け、そこに被検血漿を 10 μ l ずつ注入し、電気泳動槽 (アトー社製) にて、16 時

表 1 酵素抗体法に使用した抗家兎抗体と希釈倍数

免疫動物	抗家兎抗体	希釈倍数
ヤギ	抗家兎 FN (ポリクローナル抗体)	1/20
マウス	抗家兎 cFN (モノクローナル抗体) (ED-A 領域認識)	1/2

間、6 mA/1 プレートで電気泳動し、その後、脱蛋白液 (Triton X-100: 和光純薬社、NaCl 1,584 g, NaN₃ 320 g/20 l) にて 2 時間 30 分脱蛋白した後、染色液 (クマシーブリリアントブルー R 250 1.25 g: Kodak 社、メタノール 227 ml, 氷酢酸 46 ml, 純水 227 ml) にて染色し、ロケットの高さ 0.1 mm をまで測定した。そして、正常時の血漿のロケットの高さを 100% とし、これに対する各血漿のロケットの高さを % で示して、血中 FN 濃度の変化を検索した。

5) 腫瘍増殖時 (抗癌剤非投与群) における血漿中の FN のウェスタンブロット解析

移植後 7、14、21 日目群の各々の血漿を SDS-ポリアクリルアミドゲル (7.5% Tris-HCl ゲル: ACI ジャパン社) にて 24 mA・3 時間電気泳動後、ニトロセルロース膜に 30 分間・120 mA で転写した。4°C・24 時間非特異反応阻止 (4% 正常ウシ血清) を施した後、1 次抗体に 3,000 倍希釈マウス抗家兎 cFN 抗体 (モノクローナル抗体: ED-A 領域認識: Locus 社) を使用し、37°C・1 時間反応させた。そして、2 次抗体であるビオチン標識抗マウス IgG を 37°C・10 分間、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンを 37°C・10 分間反応後、3-3 ジアミノベンチジン (DAB-H₂O₂ 溶液) で発色させた。その後、画像解析装置を用いて経時的な intact cFN および ED-A 領域を含む FN フラグメントの濃度を検索し、その有意性について検討するため t 検定により統計学的検索を行った。

実験結果

1. 腫瘍増殖 および 頸部リンパ節転移の推移 (抗癌剤非投与群と抗癌剤投与群との比較)

抗癌剤非投与群での移植腫瘍は、移植後 7 日目から急速に増殖し、特に移植後 14 日目から移植後 21 日目にかけて著しく腫瘍は増殖していた。一方、抗癌剤投与群では、移植後 7 日目より ADR 連日投与 14 日間群の腫瘍体積は、抗癌剤非投与群の移植後 14 日目群の腫瘍体積より小さく、腫瘍の増殖は抑制されていた (図 2, 写真 3~6)。

頸部リンパ節転移については、抗癌剤非投与群の移植後 14 日目群において 10 羽中 4 羽に認められ、移植後 21 日目群においては、10 羽すべてに認められた。一方、抗癌

図2 移植部(舌)における腫瘍体積の変化と頸部リンパ節転移形成

図3 移植部(舌)における腫瘍体積の変化

写真1 ロケット免疫電気泳動法による VX2 癌移植家兎における血中 FN

サンプルは、左から正常家兎、正常家兎 ADR 連日投与7日目、正常家兎 ADR 連日投与14日目、移植後7日目、移植後14日目、移植後21日目、移植後7日目より ADR 連日投与7日目、移植後7日目より ADR 連日投与7日目、移植後7日目、正常家兎。

剤投与群の移植後7日目より ADR 連日7日間投与群では、10羽すべてに頸部リンパ節転移は認められなかったが、移植後7日目より ADR 連日14日間投与群においては、10羽中4羽に頸部リンパ節転移が認められ、その移

植腫瘍は頸部リンパ節転移を認めなかった6羽に比較して若干腫瘍増殖が認められた(図2, 3, 写真7)。

2. FN 反応の変化

1) 正常家兎組織(舌, 頸部リンパ節)

正常家兎の舌では、FN, cFN とも血管内皮細胞にわずかに認められるのみであった。また、頸部リンパ節では、FN は被膜部、梁柱部、血管内皮細胞にごくわずかに認められ、cFN 反応(ED-A の発現)は、血管内皮細胞にごくわずかに認められた。

2) 移植腫瘍周囲

(1) 抗癌剤非投与群

抗癌剤非投与群においては3群とも全例に FN は腫瘍周囲でび慢性に認められ、また3群とも全例に腫瘍実質および腫瘍周囲(癌間質)の血管内皮細胞が陽性を呈していた。腫瘍周囲の FN 反応は、腫瘍増殖が緩慢な移植後7日目群の全例に強陽性として認められたが、腫瘍増殖が活発になる移植後14日目群では10羽中8羽が強陽性となり強陽性が著しく減少し、このころより頸部リンパ節転移が10羽中4羽に認められ、その後の移植後21日目群においては、全例が弱陽性として認められ、頸部リンパ節転移も全例に認められた。腫瘍増殖が活発になると腫瘍周囲 FN の反応は、弱陽性を呈していた。腫瘍細胞は、3群とも全例が FN 陰性であった(図4, 写真8, 9)。

cFN 反応 (ED-A の発現) は, 移植後7日目群においては全例が陰性であったが, 移植後14日目群で10羽中2羽, 移植後21日目群で10羽中4羽と移植後後期に陽性

が認められた。反応は, FN の反応と比較すると著しく弱いものであった。また, cFN 反応 (ED-A の発現) 部は, FN 反応部にほぼ一致していた。また, cFN 陽性細胞が腫瘍周囲に認められた。腫瘍実質および腫瘍周囲 (癌間質) の血管内皮細胞は3群とも全例に cFN 反応 (ED-A の発現) は陽性であったが, 腫瘍細胞は, 3群とも全例が cFN 反応 (ED-A の発現) は陰性であった (図5, 写真10~12)。

(2) 抗癌剤投与群

抗癌剤投与群においても2群とも全例に FN は腫瘍周囲でび慢性に認められ, また2群とも全例に腫瘍実質および腫瘍周囲 (癌間質) の血管内皮細胞が陽性を呈していた。腫瘍周囲の FN 反応は, 移植後7日目より ADR 連日7日間投与群で10羽中8羽が強陽性, 移植後7日目より ADR 連日14日間投与群でも10羽中5羽が強陽性として認められた。頸部リンパ節転移に関しては, 移植後7日目より ADR 連日14日間投与群において10羽中4

写真2 血中 FN のウェスタンブロット解析
(抗癌剤非投与群)

Control: intact cFN (還元時 220 KDa).
Normal: 移植前 (正常家兎) の血漿.
VX2 Ca 1W: 移植後7日目の血漿.
VX2 Ca 2W: 移植後14日目の血漿.
VX2 Ca 3W: 移植後21日目の血漿.
220 KDa の band が intact cFN また, 100 KDa 付近の1つ, 55 KDa 付近の2つの band が ED-A 領域を含む FN フラグメント。

写真3 VX2 舌癌 (移植部), 舌前額断
抗癌剤非投与群 (移植後14日目)
病理組織像 (H-E 染色, ×2)

写真4 VX2 舌癌 (移植部)

左から, 移植後7日目, 移植後14日目, 移植後21日目, 移植後7日目より ADR 連日投与7日間, 移植後7日目より ADR 連日投与14日間

写真 5 抗癌剤非投与群（移植後14日目群）の移植部病理組織像（H-E 染色，×200）

腫瘍組織は角化の認められない腫瘍細胞より構成された充実性胞巣と少量の間質からなっていた。個々の腫瘍細胞は比較的大型の多角形を呈し、核は類円形で比較的大きく、ヘマトキシリンに濃染する一個ないし数個の核小体を有し、核分裂像もしばしば観察された。

写真 6 抗癌剤投与群（移植後7日目より ADR 7日間投与群）の移植部病理組織像（H-E 染色，×200）

個々の腫瘍細胞は染色性が低下し、細胞の輪郭が不明瞭となり胞体が膨化したり空胞変性が認められる細胞が増加していた。核分裂像の出現頻度は少なく細胞間の間隙が著明であった。

羽に認められ、その4羽の腫瘍周囲 FN の反応は弱陽性を呈していた。抗癌剤投与により腫瘍増殖を抑制すると移植後後期においても FN 反応は強陽性を呈している症例が多かった。腫瘍細胞は全例が FN 陰性であった（図4，写真8，9）。

cFN 反応（ED-A の発現）は、移植後7日目より ADR 連日7日間投与群では10羽中5羽、移植後7日目より ADR 連日14日間投与群では10羽中7羽が陽性を呈していた。移植後後期において、抗癌剤非投与群に比較して cFN 反応（ED-A の発現）陽性の割合が多く認められた。反応は、FN の反応と比較すると著しく弱いものであった。また、cFN 反応（ED-A の発現）部は、FN 反応部にほぼ一致していた。また、cFN 陽性細胞が腫瘍周囲に著しく存在していた。腫瘍実質および腫瘍周囲（癌間質）の血管内皮細胞は2群とも全例が cFN 反応（ED-A の発現）陽性であったが、腫瘍細胞は2群とも全例が cFN 反応（ED-A の発現）陰性であった（図5，写真10～12）。

（3）頸部転移リンパ節

FN は、移植後14日目群の頸部リンパ節転移を認めた4例中2例および移植後7日目より ADR 連日14日間投与群の4例中1例のみの計3羽に FN の反応を認めた。移植後21日目群では10羽すべてに頸部リンパ節転移が認められたが、FN 反応は、その全例の転移リンパ節において陰性であった。FN 反応を認めた3例とも、転移形成初期と思われるような癌組織が非常に小さな転移リンパ節であった。FN は、癌胞巣を取り囲むように存在し、また、細胞質が陽性を呈する FN 陽性細胞も認められた。すべての転移リンパ節において癌細胞は、FN 陰

写真 7 転移リンパ節、抗癌剤非投与群（移植後21日目）病理組織像（H-E 染色，×2）

性であった（写真13，14）。

cFN（ED-A）は、FN 反応が認められた3例の転移リンパ節においてのみ反応が認められた。移植後7日目群の移植腫瘍周囲のような、FN 陽性で cFN 反応（ED-A の発現）陰性という所見は認められなかった。cFN 反応（ED-A の発現）陽性部は腫瘍周囲で細胞質が陽性を呈する cFN 反応（ED-A の発現）陽性細胞であった。FN 同様、すべての転移リンパ節の癌細胞が cFN 反応（ED-A の発現）陰性であった（写真15）。

3. 血中 FN 濃度の変化

正常家兎に、ADR を 0.5 mg/kg/day で連日7，14日間投与しても血中 FN 濃度に変化は認められなかった。

担癌状態における血中 FN 濃度は、腫瘍移植後7日目

全群でnegativeは0%

C7-移植後7日目群

C14-移植後14日目群

C21-移植後21日目群

A14-移植後7日目よりADR連日投与7日間群

A21-移植後7日目よりADR連日投与14日間群

図4 移植部(舌)におけるFN反応の変化

より徐々に上昇し始め、移植後14日目で約18%の上昇が認められ、移植後21日目においては約31%の上昇が認められた。しかし、抗癌剤投与にて腫瘍増殖が抑制された群においては、移植後7日目(抗癌剤投与前)で移植前(正常時)に比較して上昇した値が、移植後7日目よりADR連日投与にて腫瘍増殖を抑制するとはほぼ正常値へと回復していた(写真1, 2)。よって担癌状態だから血中FN濃度が上昇するというのではなく、腫瘍増殖が非常に活発な状態において血中FN濃度は上昇していた。また、頸部リンパ節転移と血中FN濃度とは、抗癌剤を用いて腫瘍増殖を抑制し、血中FN濃度に上昇を認めないものの中にも頸部リンパ節転移を認めたものと認めないものが存在することより、関連性は認められなかった(図8)。

4. 腫瘍増殖時(抗癌剤非投与群)における血漿中のFNのウェスタンブロット解析

cFNは、血漿中に存在しないものなのか、それとも、

C7-移植後7日目群

C14-移植後14日目群

C21-移植後21日目群

A14-移植後7日目よりADR連日投与7日間群

A21-移植後7日目よりADR連日投与14日間群

図5 移植部(舌)におけるcFN反応(ED-A発現)の変化

存在するとしたら腫瘍増殖時(抗癌剤非投与群)において、経時的に上昇する血中FN濃度に何か影響を及ぼすものなのかということを明らかにするため、ED-A領域に注目して血漿中のFNをウェスタンブロット解析した。

その結果、正常家兎の血漿中においても intact FN (還元時 220 kDa: 以下血中 cFN と略す) の存在が認められた。担癌状態においては、正常家兎の血中 cFN 濃度を100%とすると、移植後7日目群においては $12.0 \pm 7.4\%$ ($P < 0.05$), 移植後14日目群では $17.8 \pm 6.4\%$ ($P < 0.02$), 移植後21日目群では $50.0 \pm 2.0\%$ ($P < 0.02$) と正常時に比較して減少していた。また、ED-A領域を含むFNフラグメントに関しては正常家兎においても存在し、100 kDa 付近に1つおよび55 kDa 付近に2つ認められ、これらに関しては正常時と担癌状態との間に有意な差は認められなかった(写真2, 図8)。以上のことより、担癌状態で腫瘍増殖が活発な時(抗癌

図 6 VX2 癌移植家兎における血中 FN 濃度の変化

図 7 VX2 癌移植家兎における血中 FN 濃度の変化

図 8 VX2 癌移植家兎（抗癌剤非投与群）における血中 cFN 濃度の変化

剤非投与群)に上昇する血中 FN 濃度は, intact cFN が減少し, ED-A 領域を含む FN フラグメントにも変化が認められないことから intact pFN の上昇もしくは ED-A 領域を含まない FN フラグメントの上昇が考えられた。

5. 腫瘍周囲 FN と血中 FN 濃度との関連性について

腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群における腫瘍周囲 FN の反応は, 移植後 7 日目で強陽性を呈していたが,

その後は, 腫瘍増殖が活発になるにつれて減弱していた(図 4)。一方, 血中 FN 濃度は, 経時的に上昇していた(図 6)。また, 腫瘍増殖を抑制した抗癌剤投与群では, 腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群に比較して, 腫瘍増殖が緩慢なためか経時的な腫瘍周囲 FN の反応は強陽性として認められる割合が多い傾向を示していたが(図 4), 血中 FN 濃度は, 経時的に上昇を認めないことより(図 7), 腫瘍周囲 FN と血中 FN 濃度とは関連性が

認められなかった。

血中 cFN 濃度に関しては、血中 FN 濃度の上昇が認められる腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群に限って検索した結果、正常時に比較して担癌状態で有意に減少していた（図8）。腫瘍周囲 cFN 反応（ED-A の発現）は、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群において、移植後7日目では全く認められないが、移植後14日目以降に徐々に発現していた（図5）。よって、腫瘍周囲の cFN 反応（ED-A の発現）は、腫瘍移植後早期では全く存在せず、移植後後期に徐々に発現してくること、および、血中 cFN 濃度は、正常時に比較して担癌状態で減少していることより、この腫瘍周囲の cFN 反応（ED-A の発現）は、腫瘍周囲反応（癌間質反応）によるものと考えられた。腫瘍周囲 cFN 反応（ED-A の発現）は、腫瘍増殖を抑制された抗癌剤投与群の方が腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群より発現する割合が多かった。

考 察

1. 移植腫瘍周囲および転移リンパ節における FN の反応の変化

FN のサブユニット鎖の構造は、すでに蛋白質と DNA の両方のレベルから解明されている。FN は、I 型、II 型、III 型、とよばれる三種の繰り返し構造単位（モジュールとよばれる）の重複により構成されており、これらのモジュールが集合して生理活性の異なる6つの機能ドメインを形成している（図1）。FN の主要な細胞接着活性は分子中央のIII型モジュールの1つにあり、このモジュール内に存在する Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) 配列が、細胞接着活性の最小機能単位となっている^{15,16)}。これ以外のドメインは、コラーゲン、ヘパリン、フィブリンなどの他の細胞外基質成分に特異的に結合する活性を有する³⁾。

FN は、サブユニットがC末端部でS-S結合で架橋された二量体として存在する血漿型 FN (cFN) とこれらがさらにS-S結合で架橋された多量体として存在する細胞性 FN (cFN) との2つに大別され、そのサブユニット鎖の大きさが若干異なるため分子量にわずかながら違いをもつ³⁾。FN のこのような分子多様性は、ED-A、ED-B、III CS とよばれる3つの領域の完全あるいは部分的な欠失により生じることが遺伝子レベルの研究から明らかにされた⁴⁾。特に ED-A と ED-B の2領域は、どちらもIII型モジュール1個分に相当し、pFN ではこのどちらも欠失している。このような特定領域の欠失は、単一の遺伝子 DNA から転写された mRNA 前駆体がスプライシングし成熟 mRNA に加工される際、ED-A や ED-B をコードしているエクソンが場合によってはイントロンの一部として除去されてしまう (alternative splicing とよばれる) ために生じるといわれている^{4,7)}。

この2つの ED 領域を含む FN は、正常細胞、癌細胞を問わず多くの培養細胞により産生されるが、ED を含む FN の ED を含まない FN に対する割合は、正常細胞に比べて癌細胞のほうが高く、また、胎児組織においても抗 ED-A、ED-B 抗体の反応性が増加することが認められることより、ED を含む FN が胎児や癌組織で選択的に発現していることは、とりもなおさず FN mRNA の alternative splicing が癌胎児性の制御を受けていることを意味するといわれている⁷⁾。伊勢村¹⁷⁾は、ED 陽性のものは胎児組織や肉芽組織のような反応性組織の多くに認められることから、この型の FN (cFN) が発生や組織修復、癌化などにおいて特別な役割を担っていることかを担ら考えて、pFN の組織成分への寄与は少ないと考えられると報告している。また、生理活性の強さを比較すると、cFN の癌細胞を配向させる活性は、pFN の約50倍という報告もある¹⁸⁾。

癌組織における FN の組織局在に関しては、一般に、癌組織では癌細胞の基底膜部での局在が減少あるいは消失し、間質部に局在を示すとされ、さらに、癌の組織型により変化が認められている¹⁹⁾。癌間質における FN の局在に関しては、前田²⁰⁾が胃癌で、大山²¹⁾が乳癌で、また、大竹²²⁾が頭頸部扁平上皮癌で観察し、FN が癌間質の線維化に深く関与し、癌の増殖に対して抑制的に働いていると報告している。また、永井²³⁾が VX2 癌移植による家兎舌癌モデルにて、FN は癌間質や癌巣周囲での線維化を促進し、癌の浸潤や増殖あるいは転移に対して防御的な役割を果たしているという報告もみられる。しかし、癌の増殖が活発な時と癌の増殖を抑制した時の両面で、経時的に、その腫瘍周囲の FN の反応を観察した報告はなく、また、腫瘍周囲の FN において、その中の pFN と cFN (ED-A 発現) の占める割合等を観察した報告もみられていない。

そこで、今回の実験においては、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群と抗癌剤によって腫瘍増殖を抑制した群、両者の経時的な腫瘍周囲の FN の反応をポリクローナル抗体を用いて観察し、また、同時期の腫瘍周囲の cFN の反応をモノクローナル抗体 (ED-A 領域認識) で観察した。この2種類の抗体を用いることによって、FN 陽性で cFN 反応 (ED-A 発現) 陰性の場合を pFN 陽性と判断した。結果として、VX2 癌移植後7日目においては、FN は腫瘍周囲で慢性に強陽性であるが、cFN 反応 (ED-A 発現) 陰性であることから pFN 陽性であった。その後、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群においては、経時的に FN 反応は減弱し、移植後14日目より cFN 反応 (ED-A 発現) が徐々に認められた。また、腫瘍増殖を移植後7日目より抗癌剤で抑制した群においては、経時的な FN 反応は減弱するものの、その割合は、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群に比して少なかっ

た。cFN 反応 (ED-A 発現) に関しては、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群に比べて、経時的に、その発現頻度が多くなる傾向が認められた。よって、腫瘍周囲の FN 反応、特に cFN 反応 (ED-A 発現) は、生体の防御反応の 1 つであり、癌増殖に対しては抑制的に作用していると考えられた。

血管内皮細胞での FN の反応については、Clark ら²⁴⁾ はヌードマウスに移植したラットの組織片で血管内皮細胞の増殖や遊走が血漿由来の FN ではなく、血管内皮細胞自身より産生される FN に大きく影響されると報告し、また Bowersox ら²⁵⁾ はウシの血管内皮細胞を用いた遊走試験で、FN が血管内皮細胞の遊走を促進することから、腫瘍組織における血管新生においても重要な役割を果たしていると報告している。著者の結果においても、腫瘍周囲の血管内皮細胞および癌実質内の腫瘍血管はすべて FN、cFN 陽性であった。このように腫瘍周囲や癌実質内での血管内皮細胞における FN の反応は、血管内皮細胞由来の FN が増加し、これらが血管内皮細胞自身の増殖や遊走、しいては新生腫瘍血管にも関与していると推測された。

転移リンパ節における FN の局在に関しては、Burtin ら²⁶⁾ が、大腸癌患者および乳癌患者において FN は、原発巣においては強い反応を示したが、転移リンパ節においては、非常に弱い反応しか示していなかったと報告している。今回の実験においては、FN 反応、cFN 反応 (ED-A 発現) 陽性転移リンパ節は、転移形成を認めた 18 羽中 4 羽のみであった。FN 反応、cFN 反応 (ED-A 発現) 陽性転移リンパ節は、すべて転移形成初期と思われる癌組織の小さなものであった。このことより、FN 反応、cFN 反応 (ED-A 発現) は、癌細胞のリンパ節への着床と、それに続く増殖という段階において、癌細胞と何らかの相互作用をし、その後、癌細胞の産生する各種分解酵素による破壊もしくは FN 産生細胞の FN 産生停止といったようなことで消失すると推測される。

2. 抗癌状態における血中 FN 濃度

FN は、現在、種々の悪性腫瘍患者において、その血中濃度の測定がなされ、その血中濃度の変動を癌の早期発見に役立たせようと試みられている^{23, 27~34, 36)}。一般的に、抗癌状態においては、血中 FN 濃度は上昇するという報告が多い^{23, 27~34, 36)}。Mosher ら³¹⁾ は乳癌患者について、Blumenstock ら³²⁾ は肺癌患者について血中 FN 濃度の上昇を報告し、また、動物実験においては、Zardi ら³³⁾ が乳癌から得られた Ehrlich 腹水癌を用いての担癌マウスについて、その血中 FN 濃度の上昇を報告している。Choate ら³⁴⁾ は、担癌患者の血中 FN 濃度は、強力な治療中でなく、また敗血症などの合併症がない状態では正常あるいは高値を示すものと考えている。この FN の上昇に関して、Saba ら³⁵⁾ は、担癌患者における FN のオプソニン作用による単球-マクロファージ系の抗腫

瘍反応と想定している。また、Puricelli ら³⁶⁾ は転移形成能力の異なる 2 種類の腺癌細胞を用いた担癌マウスの実験において血中 FN 濃度は腫瘍増殖率に対してすぐれた生物学的マーカーであると報告している。

著者の VX2 癌移植による家兎舌癌モデルでの血中 FN 濃度の測定結果では、腫瘍増殖が非常に活発な状態において、その血中濃度の上昇を認めたが、抗癌剤によって腫瘍増殖を抑制すると上昇した血中濃度は、ほぼ正常値まで回復した。このことより、担癌状態だから血中 FN 濃度は上昇するというものではなく、腫瘍増殖が非常に活発な状態において上昇をきたすということが判明した。この腫瘍増殖が活発な状態において上昇する血中 FN 濃度とは、癌増殖に伴う癌周囲組織の破壊や癌が産生するといわれる各種分解酵素による FN フラグメンテーションの促進、FN 産生細胞の産生量の増加といったような生体側のレスポンスなどにより影響を受けているものと推測される。しかし、血中 FN 濃度は、実際の臨床においては癌患者の加齢²⁹⁾や合併症などにより大きく左右されることが予想される。たとえば、播種性血管内凝固症候群 (D.I.C.)³¹⁾、感染症³⁷⁾、敗血症^{38, 39)}、外傷⁴⁰⁾、手術後⁴¹⁾、炎症時には、血中 FN 濃度は減少し、妊娠⁴¹⁾、膠原病⁴²⁾、糖尿病⁴³⁾では、逆に増加するといわれている。武市ら⁴¹⁾は、血漿 FN 値は FN 産生と消費、代謝との動的平衡の結果であり、血漿 FN 値を評価する場合には、どうしても代謝動態をとらえることが必要であると報告している。よって、臨床の担癌患者において、その血中 FN 濃度の経時的変化で腫瘍増殖の活動性を判断するには、合併症の有無や加齢等を正確に把握しておくことが不可欠であることはいうまでもない。

頸部リンパ節転移と血中 FN 濃度に関しては、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群においては、血中 FN 濃度が上昇して頸部リンパ節転移が認められたが、抗癌剤にて腫瘍増殖を抑制した群においては、血中 FN 濃度は、ほぼ正常値であるにもかかわらず頸部リンパ節転移を認めたものと認められないものが存在することより、血中 FN 濃度と頸部リンパ節転移とは関連性を見出すことはできなかった。

3. 腫瘍増殖時の血漿中の FN のウェスタンブロット解析

著者は、担癌状態 (抗癌剤非投与) において腫瘍増殖とともに上昇してくる血中 FN は、VX2 癌移植後後期で腫瘍周囲に発現してくる cFN 反応 (ED-A 発現) と関連しているのではないかと予測した。また、Parsons ら²⁹⁾ は一部の癌患者の血中に MAD-2 と呼ばれる FN フラグメントが上昇していると報告している。そこで今回著者は ED-A 領域に注目して血漿中の FN をウェスタンブロット法にて解析した。ところが、移植前 (正常時) に比較して、担癌状態で腫瘍増殖が活発な時で intact FN は有意に減少していた。また、ED-A 領域を

含む FN フラグメントは、移植前（正常時）にも認められ、担癌状態で腫瘍増殖が活発な時と比較しても、その濃度に有意な差は認められなかった。よって、腫瘍増殖とともに上昇してくる血中 FN は、intact pFN もしくは ED-A 領域を含まない FN フラグメントであることが示唆された。この pFN (ED-A 領域を含まない) は、主に肝細胞で産生しているといわれ⁴⁴⁾、関口⁴⁵⁾は肝細胞の FN mRNA には ED 領域が存在しなかったと報告している。著者の結果において担癌状態でかつ腫瘍増殖が活発な状態で上昇していると推測された intact pFN もしくは ED-A 領域を含まない FN フラグメントは、非特異的オプソニンとして網内系細胞による貪食作用を高める働きによってであるかどうかは全く不明ではあるが、おそらく何らかの生体反応で肝細胞の pFN (ED 領域を含まない) 産生が亢進しているのではないかと推測される。また担癌状態で腫瘍増殖が活発な時の血中 cFN 濃度の減少は、おそらく、VX2 癌移植による生体側のレスポンスによる FN 産生細胞の FN mRNA のスプライシングにおける何らかの制御による cFN 産生量の低下が原因となっていると推測される。

4. 腫瘍周囲 FN と血中 FN 濃度との関連性について

腫瘍周囲の FN と血中 FN 濃度について、Joffé ら⁴⁶⁾は、肺癌患者において関連性は認められなかったと報告している。

著者の実験結果においても、腫瘍周囲の FN と血中 FN 濃度との関連性は認められず、cFN に関しても FN 同様、その腫瘍周囲の反応と血中濃度との関連性は認められなかった。よって、腫瘍周囲の FN は癌実質に対する癌間質反応の FN であり、VX2 癌移植後後期の腫瘍周囲の FN においては、癌間質反応の cFN 反応 (ED-A 発現) の割合が増加していると考えられた。この腫瘍周囲 (癌間質) における FN の由来については、癌間質反応の FN であるため、FN を産生するといわれている線維芽細胞^{47,48)}、血管内皮細胞⁴⁹⁾、マクロファージ⁵⁰⁾が腫瘍周囲 (癌間質) において産生を亢進したものであると考えられる。また、これら間葉系の細胞以外にある種の癌細胞が FN を産生するという報告^{51,52)}も認められ、癌に関しても吉川⁵³⁾はその培養液中より腫瘍増殖因子を抽出し、この物質中に FN が含まれていたと報告しているが、著者の結果では VX2 癌細胞はすべて陰性であり癌細胞由来の FN は否定的であった。しかし、VX2 癌移植後 7 日目においては、血中 FN 濃度の上昇および腫瘍周囲の FN が pFN であることから、血中よりの pFN の腫瘍周囲への集積が推測された。これは、今回の実験に用いた VX2 癌が移植癌であるため、異物肉芽腫^{23,54)}における pFN の動態同様の集積をきたしたものであると推測された。

5. 臨床における FN の診断および治療への応用

癌間質の FN が癌増殖に対して促進的か、もしくは抑

制的かという点で予後との関係が注目されている。西岡ら^{11,12)}は、頭頸部領域の癌患者において FN 陽性症例が予後良好であったと報告し、また、当教室の渡辺ら¹³⁾も、舌癌患者において治療前の癌間質の FN 陽性症例が陰性症例に比して有意に 5 年生存率が上昇すると報告している。

著者の実験結果においても、腫瘍増殖が抑制されている方が、腫瘍増殖が活発なものに比して、腫瘍周囲の FN 陽性を持続し、また、cFN 反応 (ED-A 発現) 陽性を増していたことから、癌間質反応の FN 反応、特に cFN 反応 (ED-A 発現) が担癌状態においては重要であると考えられた。癌間質の FN 反応、特に cFN 反応 (ED-A 発現) が癌患者の予後を判定する上で重要であるということは、癌間質における FN 反応、特に cFN 反応 (ED-A 発現) を癌診断の上で考慮に入れば、患者個々の治療方針の決定に役立つ 1 つの指標となりうる可能性が示唆された。

近年、FN の細胞接着機構に対する解析により、FN は、その細胞結合部位に RGD (Arg-Gly-Asp) 配列をもったペプチドが存在することが明らかになり^{15,16)}、このペプチドが癌細胞の FN との結合を競合的に阻害することが実験的に証明され、癌細胞の転移を抑制する物質として脚光を浴びている。高転移癌細胞を使用した動物実験において、Humphries ら^{55,56)}は GRGDS (Gly-Arg-Gly-Asp-Ser) ペプチドが、また、Saiki ら^{57,58)}は RGD 配列のポリペプチドが癌細胞の血行性転移を抑制したと報告している。いずれにしても、FN の細胞接着部位に存在する RGD ペプチドが実験的に血行性転移を抑制した事実は、化学療法や免疫療法以外有効な治療法がない現状では、血行性転移を防止する新しい物質としての期待は大きい。

また、FN は T 細胞上の FN レセプターである VLA-5 にリガンドすると、そのシグナルが IL-2 遺伝子の発現を調節する核内因子 (転写因子) の 1 つである AP-1 を誘導するといわれており⁵⁹⁾、その IL-2 がキラー細胞である LAK 細胞を誘導し、しいては標的腫瘍細胞を死滅させることが可能となる。著者は、未発表ではあるがマウス同系腫瘍である Gsq-1 癌細胞を移植した担癌マウスにおいて免疫療法剤であるレンチナンと FN (腫瘍周囲に局注) を併用し有意な抗腫瘍効果を認めている。今後、癌間質における FN は癌に対する抑制的因子として、また FN という物質は抗腫瘍効果を増強し、転移を抑制するものとして捉え、その分子学的構造および機能を詳細に検討していきたいと考えている。

結 語

1. 移植腫瘍周囲における FN の反応は、腫瘍移植後 7 日目において、び慢性に強陽性として認められるが、

その後は、腫瘍増殖が活発になると減弱する傾向にあった。一方、抗癌剤投与群においては、腫瘍増殖を移植後7日目より抑制すると移植後7日目の強陽性を、より持続する傾向が認められた。また、頸部リンパ節転移は、この移植腫瘍周囲のFNの反応が減弱する頃に認められた。

2. 移植腫瘍周囲のcFN反応(ED-Aの発現)は、腫瘍移植後7日目において陰性であったが、移植後14日目以降に徐々に発現が認められた。腫瘍増殖を抑制した抗癌剤投与群の方が、腫瘍増殖が活発な抗癌剤非投与群より、cFN反応(ED-Aの発現)陽性の割合は多かった。

3. 転移リンパ節におけるFN反応、cFN反応(ED-Aの発現)は、転移形成初期と思われる比較的小さな転移癌組織においてのみ認められた。FNの反応が認められるものは、すべてにおいてcFN反応(ED-Aの発現)も認められた。

4. 血中FN濃度は、腫瘍増殖が非常に活発な状態である移植後21日目群で移植前の正常時と比較すると約31%上昇するが、腫瘍増殖を抑制するとほぼ正常値まで回復していた。また、腫瘍増殖時において上昇してくる血中FN濃度は、血漿中のFNのウェスタンブロット解析により、intact cFNが減少し、ED-A領域を含むFNフラグメントにも変化が認められないことから、intact pFNの上昇もしくはED-A領域を含まないFNフラグメントの上昇であると考えられた。

5. 腫瘍周囲のFNの反応と血中FN濃度とに関連性は認められなかった。また、腫瘍増殖時における腫瘍周囲のcFN反応(ED-Aの発現)と血中cFN濃度との間にも関連性が認められないことより、腫瘍周囲のFN、特にcFNは、腫瘍周囲反応(癌間質反応)のものであると考えられた。

以上の結果より、血中FN濃度は担癌状態で上昇するというものではなく、腫瘍が非常に活発な増殖をして初めて上昇するもので、腫瘍マーカーとしての有用性は見い出せなかった。しかし、経時的な血中FN濃度の測定は、癌の増殖の活動性を判断できる生物学的マーカーとなりうる可能性が示唆された。

腫瘍周囲のFN特にcFNは、癌実質に対する癌間質反応の1つであり、癌に対しては抑制的に作用していると考えられた。したがって、腫瘍周囲のFN反応、特にcFN反応(ED-Aの発現)の観察は、治療方針や予後の評価に有用の1つの指標となりうることが示唆された。

本論文の要旨は、第36回日本口腔外科学会総会(平成3年10月、大阪)、第37回日本口腔外科学会総会(平成4年11月、横浜)、第17回日本頭頸部腫瘍学会(平成5年7月、東京)において発表した。

稿を終えるに臨み、終始ご懇篤なるご指導とご校閲を賜りました恩師内田安信教授に深甚なる感謝の意を捧げ

ますとともに、ご教示とご校閲を賜りました成田令博教授に深謝いたします。また、本研究の遂行にあたり終始多大なるご指導とご教示をいただきました金子忠良講師ならびに渡辺裕之助手に心より感謝いたします。そしてご理解ご尽力下さいました教室員各位に対して謝意を表します。

本研究の一部は平成3年度文部省科学研究費(一般研究C、課題番号03670958)により行われたものであり、ここに付記して謝意を表します。

引用文献

- 1) Yamada, K.M. and Olden, K.: Fibronectins-Adhesive glycoproteins of cell surface and blood. *Nature* 275: 179-184 1978.
- 2) Yamada, K.M., Olden, K., et al.: Transformation-sensitive cell surface protein: Isolation, characterization, and role in cellular morphology and adhesion. *Ann N Y Acad Sci* 312: 256-277 1987.
- 3) 林 正男, 平野英保: フィブロネクチンの構造と機能. 蛋白質, 核酸, 酵素 28: 169-181 1983.
- 4) 関口清俊: フィブロネクチンの分子多様性とがん性変化. 生化学 61: 89-93 1989.
- 5) Hynes, R.: Fibronectins genetics GE amino acid sequence binding sites cell adhesion evolution genes. structural macromolecular systems RNA splicing structure activity relationship. *Ann Rev Cell Biol* 1: 67-90 1985.
- 6) Zardi, L., Carnemolla, B., et al.: Transformed human cells produce a new fibronectin isoform by preferential alternative splicing of a previously unobserved exon. *EMBO J* 6: 2337-2342 1987.
- 7) 関口清俊, 小山文隆: 細胞接着分子と細胞外基質. 病理と臨床 8: 186-198 1990.
- 8) Stenman, S., Vaheri, A., et al.: Fibronectin in solid tumors. *Int J Cancer* 27: 427-435 1981.
- 9) Nelson, D.L., Little, C.D., et al.: Distribution of fibronectin and laminin in basal cell epitheliomas. *J Invest Dermatol* 80: 446-452 1988.
- 10) Lordon-Rosa, B., Vielh, P., et al.: Comparative distribution of fibronectin and vitronectin in human breast and colon carcinomas. *Am J Clin Pathol* 90: 7-16 1988.
- 11) 西岡明人, 小川恭弘, 他: 癌組織中のフィブロネクチンの免疫組織化学的検討. 日本医放会誌 50: 1454-1456 1990.
- 12) 西岡明人, 小川恭弘, 他: 放射線治療前および治療中における癌組織中フィブロネクチンの免疫組織化学的検討. 日本医放会誌 51: 1087-1097 1991.
- 13) 渡辺裕之, 金子忠良, 他: 口腔扁平上皮癌間質

- におけるフィブロネクチンの免疫組織化学的検討(抄). 日口外誌 38: 2271 1992.
- 14) 外山勤吾: VX2 癌移植による家兎舌癌の病理組織学的研究. 九州歯会誌 32: 340-356 1978.
 - 15) Pierschbacher, M.D., Ruoslahti, E., et al.: Cell attachment activity of fibronectin can be duplicated by small synthetic fragments of the molecule. *Nature* 309: 30-33 1984.
 - 16) Ruoslahti, E., Pierschbacher, M.D., et al.: New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* 238: 491-497 1987
 - 17) 伊勢村 護: フィブロネクチン. 生体の科学 39: 299-302 1988.
 - 18) 林 正男: フィブロネクチンの細胞, 発生, 神経, 蛋白質, 核酸, 酵素 29: 1964-1980 1984.
 - 19) 大橋昌彦: ヒト肺癌組織におけるフィブロネクチンの局在に関する免疫組織化学的研究. 信州医誌 38: 107-117 1990.
 - 20) 前田 守: 胃癌組織における fibronectin および関連血漿蛋白の分布—胃癌間質線維形成に関する考察. 日外会誌 85: 1454-1463 1984.
 - 21) 大山 泉: 乳癌間質の線維形成機序に関する免疫組織化学的研究. 聖マリアンナ医大誌 13: 492-500 1985.
 - 22) 大竹英夫: 頭頸部扁平上皮癌症例における間質反応の臨床的意義. 日耳鼻会報 88: 1178-1192 1985.
 - 23) 永井省二: 口腔癌におけるフィブロネクチンおよびフィブリノーゲンの動態に関する実験的研究. 日口外誌 36: 465-483 1990.
 - 24) Clark, R.A.F., Quinn J.H., et al.: Fibronectin is produced by blood vessels in response to injury. *J Exp Med* 156: 646-651 1982.
 - 25) Bowersox, J.C. and Sorgente, N.: Chemotaxis of aortic endothelial cells in response to fibronectin. *Cancer Res* 42: 2547-2551 1982.
 - 26) Burtin, P., Chavanel, G., et al.: Alterations of the basement membrane and connective tissue antigens in human metastatic lymph nodes. *Int J Cancer* 31: 719-726 1983.
 - 27) 河村研一, 田中正信, 他: 各種癌患者における血漿フィブロネクチンの測定. 最新医 38: 416-418 1983.
 - 28) Parsons, R.G., Aldenderfer, P.H., et al.: Detection of a human serum DNA-binding protein associated with malignant disease. *J Natl Cancer Inst* 63: 43-47 1979.
 - 29) Ruelland, A., Kerbrat, P., et al.: Level of plasma fibronectin in patients with breast cancer. *Clinica Chimica Acta* 178: 283-288 1988.
 - 30) Gallurt, P., Rodriguez, P., et al.: Plasmatic fibronectin in malignancies. *Int J Biol Markers* 7: 240-243 1992.
 - 31) Mosher, D.F., Williams, E.M., et al: Fibronectin concentration is decreased in plasma of severely ill patients with disseminated intravascular coagulation. *J Lab Clin Med* 91: 729-735 1978.
 - 32) Blumenstock, F.A., McKneally, M., et al.: Quantification of immunoreactive opsonic alpha-2-surface binding (α -SB) glycoprotein in lung cancer patients. (Abstr.) *J Reticuloendothel Soc* 24 (Abstr. Suppl.): 18a 1978.
 - 33) Zardi, L., Cecconi, C., et al.: Concentration of fibronectin in plasma of tumor-gearing mice and synthesis by Ehrlich ascites tumor cells. *Cancer Res* 39: 3774-3779 1979.
 - 34) Choate, J.J. and Mosher, D.F.: Fibronectin concentration in plasma of patients with breast cancer, colon cancer and acute leukemia. *Cancer* 51: 1142-1147 1983.
 - 35) Saba, T.M. and Antikatzides, T.G.: Human mediated macrophage response during tumor growth. *Br J Cancer* 32: 471-482 1975.
 - 36) Puricelli, L., Bal de Kier Joffe, E., et al.: Levels of plasmatic fibronectin in mice bearing adenocarcinomas of different metastasizing ability. *Cancer Lett* 29: 189-195 1985.
 - 37) Richard, W.O., Scovill, W.A., et al.: Opsonic fibronectin deficiency in patients with intra-abdominal infection. *Surgery* 94: 210-217 1983.
 - 38) Saba, T.M., Blumenstock, F.A., et al.: Cryoprecipitate reversal of opsonic α -surface binding glycoprotein deficiency in septic surgical and trauma patients. *Science* 201: 622-624 1978.
 - 39) Scovill, W.A., Saba, T.M., et al.: Opsonic surface binding glycoprotein during sepsis. *Ann Surg* 188: 521-529 1978.
 - 40) Scovill, W.A., Saba, T.M., et al.: Deficients in reticuloendothelial humoral control mechanism in patients after trauma. *J Trauma* 16: 898-904 1976.
 - 41) 武市俊彰, 平井祐二郎, 他: 各種疾患患者における血漿フィブロネクチンの動態とその臨床的意義. 四国医誌 42: 121-130 1986.
 - 42) 松本美富士, 若園清行: 膠原病における血漿中 Fibronectin の検討. 医学のあゆみ 120: 1122-1124 1982.
 - 43) 松田文子, 葛谷 健, 他: 糖尿病患者における血漿フィブロネクチンの増加. 医学のあゆみ 121: 31-32 1982.
 - 44) Tamkun, J.W. and Hynes, R.O.: Plasma fibronectin is synthesized and secreted by hepatocytes. *J Biol Chem* 258: 4641-4647 1983.
 - 45) 関口清俊: フィブロネクチン—その細胞接着因子としての分子の基礎—, 細胞工学 4: 485-

- 497 1985.
- 46) Bal de Kier Joffé, E., Puricelli, L., et al.: Fibronectin and laminin expression in breast cancer and lymph node metastases. Lack of correlation with fibronectin plasmatic levels. *MEDICINA* 48: 499-505 1988.
- 47) Couchman, J.R., Rees, D.A., et al.: Fibronectin has a dual role in locomotion and anchorage of primary chick fibroblasts and can promote entry into the division cycle. *J Cell Biol* 93: 402-410 1982.
- 48) 熊崎 努, Smith, J.R., 他: ヒト培養線維芽細胞の老化とフィブロネクチン遺伝子の発現—*in situ hybridization* による解析, 基礎老化研究 14: 105-106 1990.
- 49) Jaffe, E.A. and Mosher, E.F.: Synthesis of fibronectin by cultured human endothelial cells. *J Exp Med* 601: 1779-1791 1978.
- 50) Alitalo, K., Hovi, T., et al: Fibronectin in produced by human macrophages. *J Exp Med* 151: 602-613 1980.
- 51) Grimwood, R.E., Huff, J.C., et al.: Fibronectin in basal cell epithelioma: Sources and significance. *J Invest Dermatol* 82: 145-149 1984.
- 52) Grimwood, R.E., Ferris, C.F., et al.: Basal cell carcinomas grown in nude mice produce and deposit fibronectin in the extracellular matrix. *J Invest Dermatol* 87: 42-46 1986.
- 53) 吉川文弘: VX2 癌細胞の運動性に関する細胞生物学および生化学的研究, 大阪大歯誌 30: 87-109 1985.
- 54) Kurkiken, M., Vaheri, A., et al.: Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue. *Lab Invest* 43: 47-51 1980.
- 55) Humphries, M.J., Olden, K., et al: A synthetic peptide from fibronectin inhibits experimental metastasis of murine melanoma cells. *Science* 233: 467-470 1986.
- 56) Humphries, M.J., Murata, J., et al.: Investigation of the biological effects of anti-cell adhesive synthetic peptides that inhibit experimental metastasis of B16-F10 murine melanoma cells. *J Chin Invest* 81: 782-790 1988.
- 57) Saiki, I., Iida, J., et al.: The inhibition of the metastases of murine malignant melanoma by means of synthetic polymeric peptides containing core sequence of cell adhesive molecules. *Cancer Res* 49: 3815-3822 1989.
- 58) Saiki, I., Murata, J., et al: The inhibition of murine lung metastasis by synthetic polypeptides (poly (arg-gly-asp) and poly (tyr-ile-gly-ser-arg)) with a core sequence of cell adhesion molecules. *Bri J Cancer* 59: 194-197 1989.
- 59) Yamada, A., Nikaido, T., et al.: Activation of human CD4 lymphocytes: interaction of fibronectin with VLA-5 receptor on CD4 cells induces the AP-1 transcription factor. *J Immunol* 146: 53-56 1991.

写真説明

写真 8 FN 強陽性像, $\times 200$ (移植後 7 日目)

腫瘍周期にび漫性な FN の反応が認められる。

写真 9 FN 弱陽性像, $\times 200$ (移植後 21 日目)

腫瘍周囲での反応は減弱している。

写真 10 血管内皮細胞の cFN 陽性 (ED-A 発現) 像, $\times 100$ (移植後 21 日目)

写真 11 cFN 陽性 (ED-A 発現) 像, $\times 100$ (移植後 14 日目)

腫瘍周囲に線状な cFN 反応 (ED-A 発現) が認められる。

写真 12 cFN 陽性 (ED-A 発現) 像, $\times 60$ (移植後 7 日目より ADR 連日投与 7 日目)

腫瘍周囲に cFN 陽性 (ED-A 発現) 細胞が認められる。

写真 13 転移リンパ節の FN 陽性像, $\times 40$ (移植後 14 日目)

転移形成した癌組織周囲に FN の反応が認められる。

写真 14 転移リンパ節の FN 陽性像, $\times 200$ (移植後 14 日目)

癌細胞を取り囲むように FN の反応が認められる。

写真 15 転移リンパ節の cFN 陽性 (ED-A 発現) 像, $\times 40$ (移植後 14 日目)

転移形成した癌組織周囲および癌組織より離れた部位にも cFN 陽性 (ED-A 発現) 細胞が認められる。

写真 8

写真 9

写真 10

写真 11

写真 12

写真 13

写真 14

写真 15