Thesis

胃癌の初期浸潤部間質の変化に関する免疫組織化学的研究

埼玉医科大学第二外科学教室
(指導：平山 廉三教授)
藤田 俊造

胃癌の初期浸潤部における間質の変化を明らかにする目的で，浸潤が粘膜下組織までにとどまる胃分化型腺癌の浸潤部（DAC）間質と粘膜下組織内の異所性腺組織（HG）の間質について，細胞骨格タンパク発現からみた間質細胞の形質とプロテオグリカン（PG）発現の形式を比較検討した．三つの細胞骨格タンパク（α-smooth muscle actin（α-SMA)，desmin，vimentin）に対するモノクローナル抗体およびPGに対する三つのモノクローナル抗体（2B1，6B6，3B-3）を用いた免疫組織化学的検索により，DACおよびHGの間質にみとめられたfibroblastic cells（好酸性紡錘形細胞束（EBSC)，傍腺管紡錘間質細胞(PC)）はいずれもα-SMAが陽性であり，myofibroblastic cellと考えられた．好酸性紡錘形細胞束(EBSC)はしばしば粘膜筋板との連続がみられ，粘膜筋板の平滑筋のmyofibroblastic changeに由来することが示唆された．また，DACとHGとの間での顕著な差異としてEBSCの形質があげられた．すなわち，前者のEBSCがα-SMA，desmin−/，vimentinであったのに対し，後者のEBSCはα-SMA，desmin，vimentinであり，DAC間質ではHG間質と比較して，myofibroblastic changeによる粘膜筋板の形質（α-SMA，desmin，vimentin /−）の変化が強くおこっていると考えられた．間質におけるプロテオグリカン発現の点からは，DAC間質ではHG間質と比較して，3B-3で認識されるchondroitin 6-sulfate PGの発現，および6B6で認識されるdermatan sulfate PG（DSPG）の減弱が特徴的であったが，上記の間質細胞（myofibroblastic cell）の形質の違いによってこれらのプロテオグリカン発現の差が生じている可能性が考えられる．一方，2B1で認識されるversicanについてDAC浸潤部間質とHG間質との比較で差がみとめられなかったことから，HGの成立過程でHG間質が一部癌間質に類似した役割を果たしていることが示唆された．

Keywords: differentiated type, gastric adenocarcinoma, heterotopic gland, gastric submucosa, stromal cell, cytoskeletal protein, myofibroblast, proteoglycan, immunohistochemistry

緒 言

癌は原発部位にとどまらず周囲組織へと浸潤する．また，その過程で転移をおこすことが最大の生物学的特徴であり，臨床的にも大問題である．胃において，粘膜内に発生した癌が粘膜筋板をこえて粘膜下組織に浸潤するが，粘膜内癌と比べると，粘膜下組織に浸潤した癌のリンパ節転移や術後再発は有意に高頻度である[1]．したがって，粘膜下組織への癌浸潤は，宿主にとってcriticalな現象である．

癌浸潤は，癌細胞と間質との相互作用によって癌細胞が原発巣周囲組織へ移動していく過程である[2]．癌浸潤に伴って間質に様々な変化が生じ，癌固有の間質の誘導もなされる[3]．胃癌細胞が粘膜筋板を破って粘膜下組織に浸潤を始める初期過程においても，当然，間質変化がおこっていると考えられる．胃癌における初期の浸潤部での間質の変化を明らかにすることは胃癌の浸潤の理解に必要なことと考えられるが，これまで十分な検討がなされたとはいえない．

ところで，切除胃の粘膜下組織にしばしば異所性腺組織を認めるが，これらは，粘膜の炎症やびらんに伴って粘膜内腺上皮が粘膜下組織へ侵入した後天的なものと考えられている[4,5]．そこから，異所性腺組織と胃癌の粘膜下組織浸潤とどのように違うのかという疑問が生じ，逆に，異所性腺組織間質と胃癌の粘膜下組織浸潤部間質を比較することによって，胃癌初期浸潤部間質の特徴的変化を明らかにすることができるものと考えられた．

間質は，間質細胞と細胞外基質から構成されている．したがって，癌浸潤に伴う間質の変化についても，間質細胞の変化および細胞外基質についての変化に2分

医学博士 甲第722号 平成12年12月15日(埼玉医科大学)

して考える必要がある．本研究では，胃粘膜下組織浸潤癌間質および胃粘膜下組織の異所性腺組織間質について，細胞骨格タンパク発現からみた間質細胞の形質および主要な細胞外基質物質であるプロテオグリカンの発現形式を免疫組織化学的に比較検討し，胃癌の粘膜下組織浸潤部の間質の特徴を明らかにすることを試みた．

対　象

胃癌には多様な組織型がみられる[6]．本研究では，粘膜下組織の異所性腺組織との比較を行うことから，腺管構築のうえでこれと類似した分化型の腺癌（胃癌取扱い規約[6]の pap および tub_1 を主体とし，一部 tub_2 を含む）を対象とした．

1986 年 1 月から 1998 年 12 月までの期間に埼玉医科大学病理学教室にて組織学的検索のなされた胃癌 1,152 症例のうち，分化型の腺癌で，浸潤が粘膜下組織までにとどまり，潰瘍や潰瘍瘢痕を伴っていない胃腺癌 47 症例 63 病巣を選び対象とした．また，非癌部の粘膜下組織内異所性腺組織のみとめられた 20 症例 54 病巣を検討した．

分化型胃癌の粘膜下組織浸潤部と粘膜下組織異所性腺組織の組織構築

胃分化型腺癌の粘膜下組織浸潤部（以下，DAC）と粘膜下組織異所性腺組織（以下，HG）の組織構築に類似がみとめられた（図 1 a,b）．すなわち，腺管周囲，および腺管と腺管の間の間質には，紡錘形細胞が孤在性にみられ，他に，平滑筋束および好酸性の紡錘形の細胞束がみとめられた．ここで，癌腺管および異所性腺管の周囲に孤在性にみられる紡錘形の傍腺管紡錘間質細胞を periglandular cell（PC）とし，平滑筋束あるいは好酸性紡錘形細胞束を eosinophilic bundle of spindle cells（EBSC）とした（図 1,2）．EBSC の一部は近傍の粘膜筋板（MM）と連続していた（図 1,2）．これらの呼称と略号を欄外に注として掲げる（表 1）．

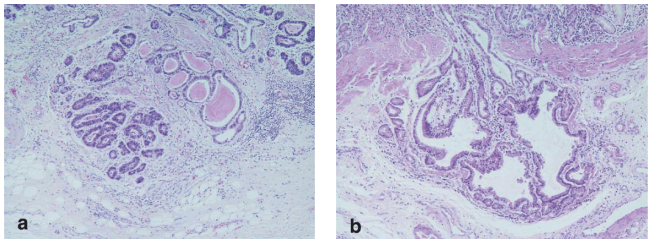

図 1. 胃分化型腺癌（DAC）の粘膜下組織浸潤部および粘膜下組織内異所性腺組織（HG）の組織像（a, b）．a: DAC, H.E., b: HG, H.E.. DAC の粘膜下組織浸潤部と HG の組織構築に類似性をみとめる．

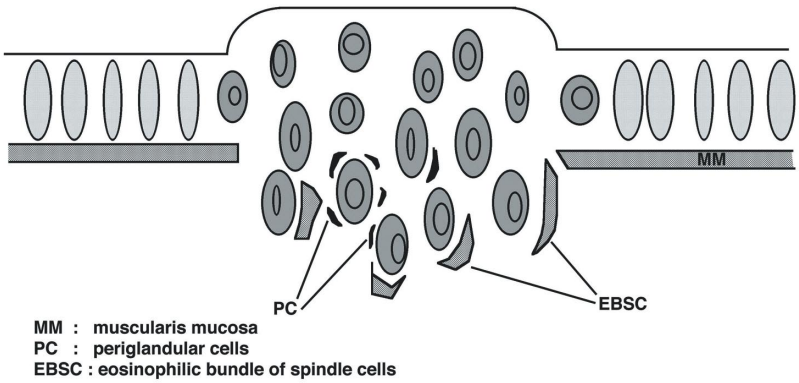

図 2. 胃分化型腺癌の粘膜下浸潤部のシェーマ．

表 1．

胃分化型腺癌	：differentiated adenocarcinoma (DAC)
異所性腺組織	：heterotopic gland (HG)
好酸性紡錘形細胞束	：eosinophilic bundle of spindle cells (EBSC)
傍腺管紡錘間質細胞	：periglandular cell (PC)
粘膜筋板	：muscularis mucosa (MM)

細胞骨格タンパクの発現からみた間質細胞の形質の比較

間質細胞は，主に fibroblast およびそれと類似の spindle cell（以下, fibroblastic cell と呼称）からなる[7]．しかし，癌浸潤部の間質における fibroblastic cell の細胞骨格タンパク発現の変化についての報告は比較的少ない[8,9]．そこで，DAC 間質と HG 間質との間で各間質細胞（PC，EBSC）の細胞骨格タンパクである α-smooth muscle actin（α-SMA），desmin, vimentin の発現を免疫組織化学的に比較検討した．また，EBSC と MM との連続性がみとめられたことから，近傍の MM における細胞骨格タンパクの発現についても同様に評価した．

【方　法】

1. 免疫組織化学染色

各病変のホルマリン固定パラフィン包埋標本から 4 μm の切片を作成した．それらの切片をヘマトキシリン・エオジン（HE）染色，および間接法（Histofine SimpleStain PO，Nichirei，Tokyo，Japan）による免疫組織化学染色した．細胞骨格タンパクに対する一次抗体として，以下のモノクローナル抗体（クローン；供給元；希釈倍率）を使用した：抗 α-SMA（1A4; Dako, Glostrup, Denmark; 1:25），抗 desmin（D33; Immunotech, Marseille, France; 1:25），抗 vimentin（V9; Immunotech, Marseille, France; 1:100）．Desmin および vimentin について，染色前にオートクレーブによる抗原賦活処理（クエン酸 buffer pH6.0 中で 121℃，5 分）を行った．

α-SMA，desmin は固有筋層を，vimentin は正常粘膜下組織の線維芽細胞をそれぞれの内在陽性コントロールとし，免疫染色過程で 1 次抗体を省略した切片を陰性コントロールとした．

2. 免疫染色所見の評価

PC，EBSC，MM における α-SMA，desmin，vimentin の染色の範囲，染色強度を表 2 に揚げた基準に基づいて評価した．さらに，表 3 に基づいてスコア化し，免疫染色スコアとした．ひとつのスコアに決め難いときは，ふたつのスコアの平均値をその免疫染色スコアとした．

3. 統計処理

DAC および HG の 2 群間における免疫染色スコアの差は，Mann - Whitney's U test で検定した．有意水準を $p < 0.01$ とした．

表 2．免疫染色所見の評価基準

cell No. or Area	-	negative
	+	a few cells or small part of area
	++	focal
	+++	almost all cells or area
Intensity	-	negative
	+	control
	++	≧control

表 3．免疫染色スコア

		Intensity		
		-	-	++
Cell No. or Area	-	0		
	+		1	1
	++		2	3
	+++		3	4

【結　果】

1. DAC および HG の間質細胞，粘膜筋板における細胞骨格タンパクの発現

粘膜筋板では DAC および HG ともに α-SMA，desmin が陽性であった．vimentin 陽性像のものもみられたが，発現程度は様々であった．EBSC では DAC および HG ともに α-SMA が陽性であったが，DAC

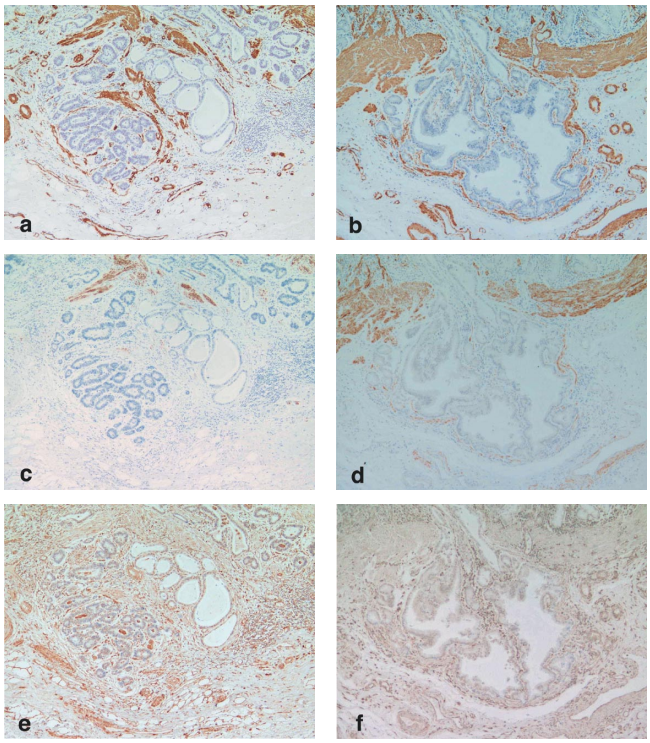

図 3．胃分化型腺癌の粘膜下組織浸潤部（DAC）および粘膜下組織内異所性腺組織（HG）の間質における細胞骨格タンパクの免疫染色像．a：DAC, α-SMA，b：HG, α-SMA，c：DAC, desmin，d：HG, desmin，e：DAC, vimentin，f：HG, vimentin. α-SMA は，DAC，HG ともに，MM，EBSC，PC に陽性像がみられる．Desmin は，DAC の EBSC，PC でほとんど陰性であるが，HG では陽性像がみられる．Vimentin は，DAC，HG ともに，PC が陽性であり，MM，EBSC は陰性～弱陽性を呈している．

で desmin 発現の減弱したものが多かった．DAC , HG ともに vimentin 陽性例がみられたが，発現程度は様々であった．DAC および HG において PC では，α -SMA 陽性であったが，発現程度にはばらつきがみられた．desmin は弱い発現あるいは陰性を示したが，vimentin は陽性で発現程度は様々であった（図 3 a ～ f）．

内在陽性コントロールである正常粘膜下組織の線維芽細胞では vimentin 陽性，α- SMA および desmin 陰性であり，固有筋層では α- SMA および desmin 陽性，vimentin は陰性あるいは弱陽性であった．

2. DAC および HG での免疫染色スコアの差異

DAC および HG について，PC , EBSC , MM それぞれにおける各細胞骨格タンパクの免疫染色スコアを図 4 に示した．MM においては，α- SMA , desmin , vimentin いずれのスコアについても DAC と HG との間で有意差はみとめられなかった．EBSC では，α- SMA および desmin のスコアに有意差がみられ，いずれも HG と比べて DAC でスコアが低い傾向であった．vimentin のスコアに有意差はみとめられなかった．PC では，α- SMA のスコアに有意差はみとめられなかったが，desmin および vimentin のスコアに有意差がみられ，HG と比べて DAC で desmin のスコアが低く，vimentin のスコアが高かった．以上の結果において，HG の EBSC と比べて，DAC の EBSC における desmin のスコアの低いことが注目に値した．

【考　察】

DAC 間質および HG 間質を比較したとき，EBSC における α-SMA の発現, EBSC , PC における desmin の発現，および PC における vimentin の発現に差がみとめられた．このうち，とくに顕著な差を示したのは EBSC における desmin の発現であった．そして, DAC 間質の EBSC では，HG 間質の EBSC に比べて desmin の発現が低下していた．したがって, DAC 間質における EBSC の形質が α-SMA ，desmin−/ ，vimentin であるのに対し，HG 間質における EBSC の形質は α-SMA ，desmin ，vimentin ということができる．Martin らは，大腸癌の浸潤部間質における間質細胞の形質を α- SMA ，desmin−，vimentin としており [10]，われわれの胃の DAC における結果と一致する．

PC や EBSC では様々な程度の α- SMA 発現がみられ，平滑筋の形質を有していることが示唆された．平滑筋の性格を有する間質細胞は，当初，創傷部の肉芽組織内に存在してその収縮に関与する fibroblastic cell として発見され，myofibroblast とよばれた [11]．その後，類似の細胞が正常腸管粘膜や肺胞隔壁などにも存在すること, また, myofibroblastic cell が fibromatosis , 肝硬変や肺線維症の fibrosis , 癌浸潤部の desmoplastic reaction などの様々な病的過程に関与することが明らかにされた [11]．Myofibroblast はそもそも電子顕微鏡による超微形態によって定義されたものであるが [11]，組織化学的には，α- SMA が最良マーカーとされている [12]．その意味では，われわれが PC や EBSC とした fibroblastic cell も myofibroblastic cell としてよいと考えられた．

Myofibroblast（あるいは myofibroblastic cell）の由来に関しては議論のあるところである [8,10,13]．肺胞間質細胞，肝の perisinusoidal cell , 腎のメサンギウム細胞などの特殊なものを除くと，局所の fibroblast 由来のものが最も多く，その他，平滑筋細胞，血管周皮細胞由来のものもある [7,13,14]．われわれが EBSC とした myofibroblastic cell において，しばしば粘膜筋板との連続性がみられたことから，EBSC の少なくとも一部が粘膜筋板の平滑筋細胞由来である可能性が考えられた．Ohtani ら [15] は電顕的検討から，大腸癌浸潤部間質における myofibroblast が粘膜筋板由来あるいは固有筋層の平滑筋由来である可能性を示しており，DAC や HG の間質における myofibroblastic cell も粘膜筋板由来の可能性がある．平滑筋細胞と fibroblastic cell との間では，細胞骨格タンパク発現からみた形質について一連のスペクトラム [8,9] がよみとられるが，この点からも考え得ることであろう．一方，乳癌間質の myofibroblast には血管の平滑筋およびその周囲の細胞由来のものが含まれるという実験的研究もあるが [16]，今回の検討において，EBSC と血管壁とが連絡している像は確認できなかった．

われわれの検討では，粘膜筋板において発現する細胞骨格タンパクは，α- SMA ，desmin ，vimentin /−であった．EBSC が粘膜筋板の平滑筋由来であるとすれば，HG における EBSC（α- SMA ，desmin ，vimentin ）では DAC における EBSC（α- SMA ，desmin−/ ，vimentin ）に比べ粘膜筋板平滑筋の形質がよく保全されているとみなすことができる．逆にいえば，DAC 間質では，粘膜筋板平滑筋細胞の形質が変化し myofibroblastic cell として浸潤にあずかることが特徴的である．その点に関して，大腸癌の初期浸潤部においても同様の粘膜筋板の形質変化が報告されている [17]．

これまで，培養平滑筋細胞による細胞外基質産生報じた研究も多いが [18,19]，動脈の粥状硬化の成立過程や喘息患者での気道壁の改変過程において，形質の変化した血管平滑筋や気道平滑筋による細胞外基質産生が，これらの pathogenesis に大きく関与するといわれている [20–22]．平滑筋細胞に生じた myofibroblastic change がこれらの基質形成に関与するとも考えられるが [21,22]，DAC 間質における間質細胞の形質変化も同様のものとして捉えることができよう．つまり，胃癌の初期浸潤部の間質においては，粘膜筋板由来の myofibroblastic cell , つまり形質の変化した平滑筋細胞が細胞外基質産生を介して浸潤に伴う desmoplastic

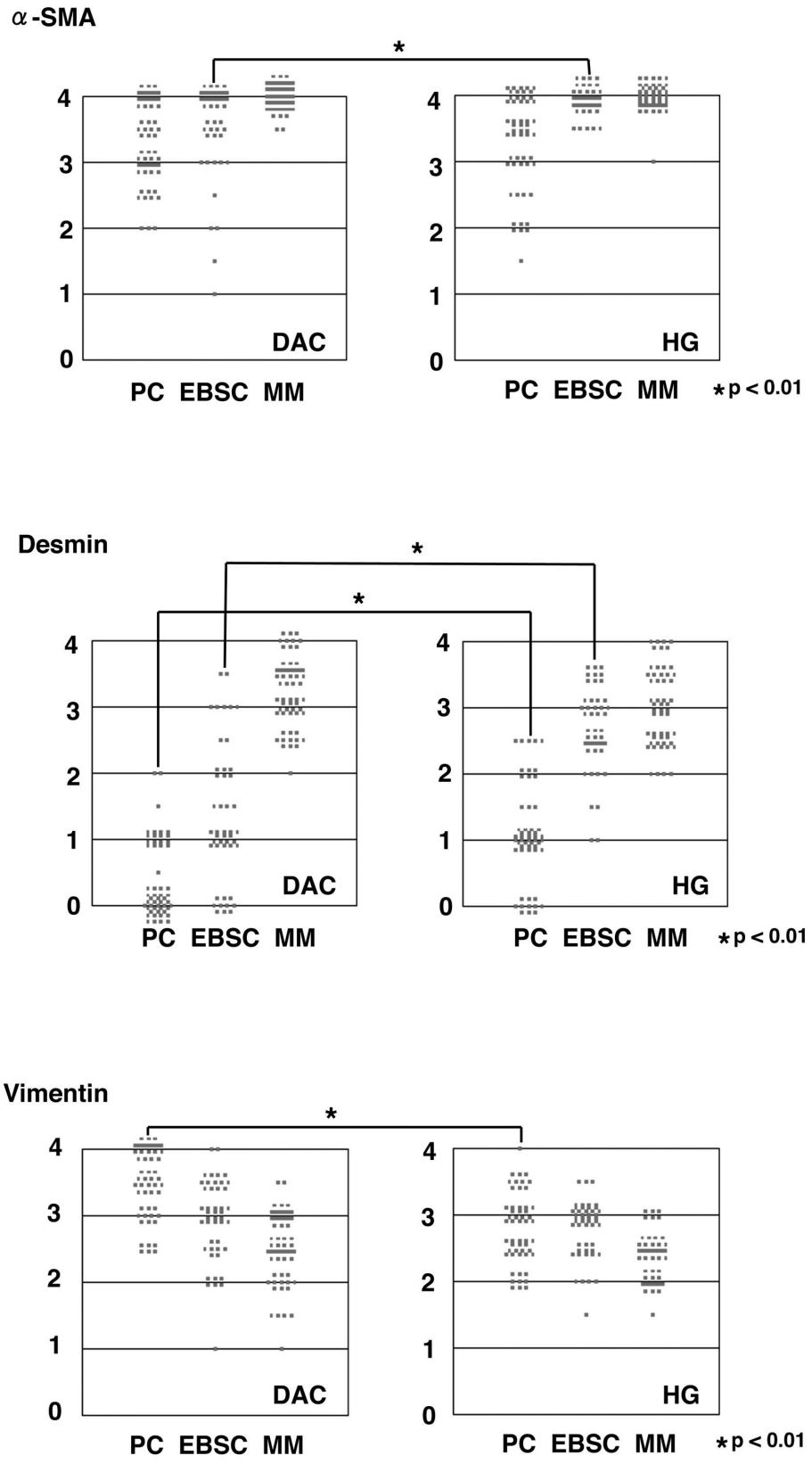

図 4. 胃分化型腺癌の粘膜下組織浸潤部（DAC）と胃粘膜下組織内異所性腺組織（HG）における細胞骨格タンパクの免疫染色スコア散布図．DAC と HG との比較で，EBSC における α- SMA，desmin のスコア，PC における desmin，vimentin のスコアに有意差がみとめられた（$p < 0.01$）．DAC では HG に比し，EBSC における α-SMA，desmin および PC における desmin のスコアが低く，PC における vimentin のスコアが高い．

な間質の形成に関与すると考えられる．事実，腫瘍細胞によって平滑筋細胞に細胞外基質産生が誘導されることも in vitro で証明されている[23]．その意味において，粘膜筋板は癌浸潤に立ち向かうバリアーではなく，浸潤という事象により積極的な役割を担っている可能性も考えられる．

プロテオグリカンの発現からみた細胞外基質の比較

間質組織を構成する細胞外基質は，コラーゲンやエラスチンなどの線維タンパク，フィブロネクチンやラミニンなどの糖タンパク，プロテオグリカンである[24]．プロテオグリカン（PG）は，哺乳類の細胞膜および細胞外基質に普遍的に存在する物質であり，コア蛋白にグリコサミノグリカン（GAG）を共有結合した高分子の複合糖質である[25]．PG については，細胞接着・増殖・分化および形態形成，生物学的フィルターや生体調節分子の制御などの生理的役割とともに，腫瘍の浸潤・増殖への関与も報告されている[25,26]．そのコア蛋白および GAG の違いにより多種の PG が存在するが[25,26]，これらに対して 2B1，3B - 3，6B6 をはじめとする多くのモノクローナル抗体が作製された[27-30]．このうち 2B1 は，large chondroitin sulfate PG のひとつである versican のコア蛋白を認識するもので，悪性腫瘍の間質に陽性であり[30,31,32]，6B6 は dermatan sulfate side chain を有する small PG のコア蛋白を認識し，正常の間質組織において広範に陽性となる[29,33]．また，3B - 3 は，chondroitinase ABC 処理された chondroitin sulfate PG の chondroitin sulfate chain から得られる 6 - sulphated disaccharide unit を認識し[27]，胃癌間質[33]や大腸癌間質[28]で陽性となる．そこでわれわれは，以上の三種のモノクローナル抗体を用いて，DAC 間質および HG 間質における細胞外基質の相違について，免疫組織化学的に検討した．

【方　法】

1. 免疫組織化学染色

各病変部のホルマリン固定パラフィン包埋標本から 4 μm の切片を作成し，ヘマトキシリン・エオジン（HE）染色，および間接法（Histofine SimpleStain PO, Nichirei, Tokyo, Japan）による免疫組織化学染色した．一次抗体として，PG に対する以下のクローン名のモノクローナル抗体（供給元; 希釈倍率）を使用した：2B1（Seikagaku Corp., Tokyo, Japan; 1:300），6B6（Seikagaku Corp., Tokyo, Japan; 1:300），3B - 3（Seikagaku Corp., Tokyo, Japan; 1:80）．いずれも免疫染色の前に chondroitinase ABC（Seikagaku Corp., Tokyo, Japan）処理（0.2 unit/ml in 20 mM Tris - HCl containing 20mM sodium acetate pH8.0，37 ℃，60 分）を行った[29,33]．なお，上記の抗体で染色されるそれぞれの PG について，以下ではその抗体のクローン名で呼ぶこととする．

2B1 については非癌部粘膜下組織の動脈周囲組織[30]，6B6 については非癌部粘膜下組織の線維組織[29]，3B - 3 については非癌部粘膜下組織の動脈壁[33]をそれぞれ内在陽性コントロールとした．また，免疫染色の過程で 1 次抗体を省略した連続切片を陰性コントロールとした．

なお，これまでの報告で，PG の免疫組織化学染色には酢酸エタノール固定がよいとされてきたが[29,30,32,33]，同一の大腸癌から採取した酢酸エタノール固定組織とホルマリン固定組織のパラフィン包埋切片に対し，今回と同様のモノクローナル抗体を用いて PG の免疫染色を行い，両者の間で染色性が大きく異ならないことを確認している[34]．

2. 免疫染色所見の評価

DAC 間質および HG 間質における染色の範囲，染色の強さを表 2 の基準に基づいて評価した．さらに，表 3 に基づいてスコア化し，免疫染色スコアとした．ひとつのスコアに決め難いときは，ふたつのスコアの平均値をその免疫染色スコアとした．

3. 統計処理

DAC と HG の 2 群間における免疫染色スコアに差があるかどうかは，Mann - Whitney's U test で検定した．有意水準を $p < 0.01$ とした．

【結　果】

1. DAC および HG の間質におけるプロテオグリカンの発現

DAC 間質および HG 間質において，2B1，3B - 3，6B6 ともに様々な程度の陽性像がみとめられた．2B1 は, DAC , HG ともにすべての病変の間質に陽性であった（図 5 a,b）．3B - 3 は，DAC ではすべての病変で陽性であったが, HG では陰性の病変がみられた（図 5 c,d）．一方，6B6 は，HG ではすべての病変で陽性であったが, DAC では陰性の病変をみとめた（図 5 e,f）．

内在陽性コントロールとした正常粘膜下組織の線維組織は血管周囲, 固有筋層周囲を除いて 6B6 陽性, 2B1 および 3B - 3 陰性であり，血管周囲（一部，血管壁）および一部の固有筋層周囲のみで 2B1 陽性，血管壁のみで 3B - 3 陽性であった．

2. DAC および HG の間での免疫染色スコアの相違

DAC および HG のそれぞれについて，各 PG の免疫染色スコアを図 6 に示した．2B1 については，DAC と HG との間で免疫染色スコアに有意差はみとめられなかった．3B - 3，6B6 では，DAC と HG との間で統計的有意差がみとめられ，HG 間質に比べると DAC 間質では 3B-3 の免疫染色スコアが高く，6B6 の免疫染色スコアが低いとみなされた．

【考　察】

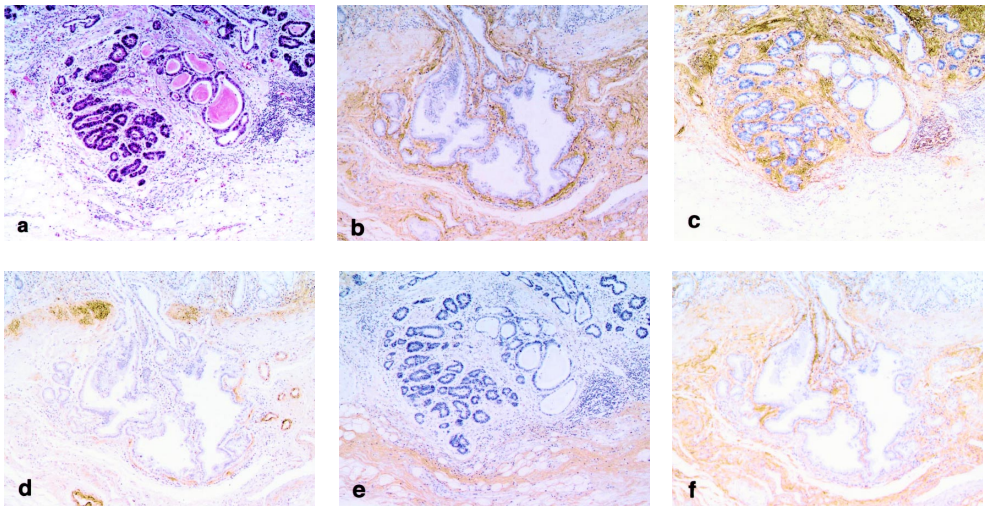

図５. 胃分化型腺癌の粘膜下組織浸潤部（DAC）および粘膜下組織内異所性腺組織（HG）のプロテオグリカン免疫染色像. a: DAC, 2B1, b: HG, 2B1, c: DAC, 3B-3, d: HG, 3B-3, e: DAC, 6B6, f: HG, 6B6. 2B1 は DAC 間質および HG 間質ともに陽性である．3B-3 は HG 間質よりも DAC 間質おいて強い陽性を示し，6B6 は HG 間質で陽性であるが DAC 間質では陰性.

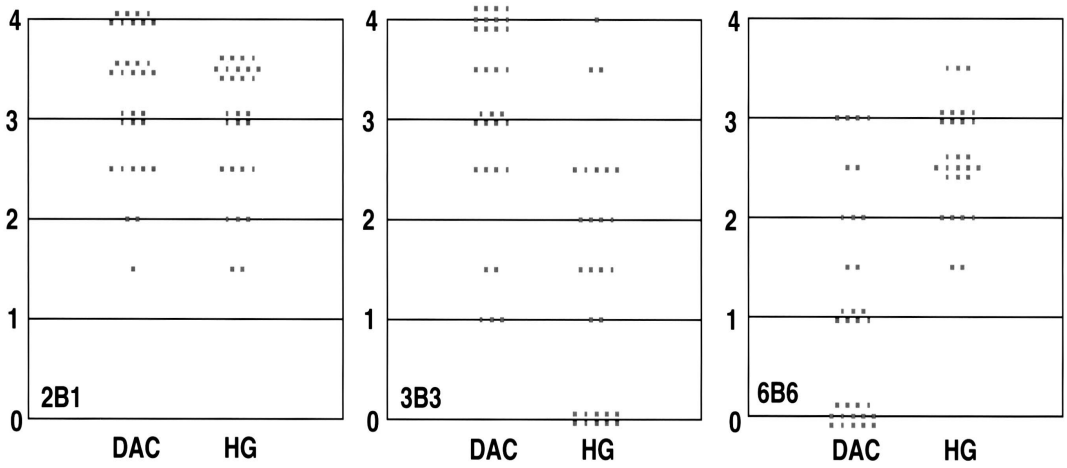

図６. 胃分化型腺癌の粘膜下組織浸潤部（DAC）および胃粘膜下異所性腺組織（HG）におけるプロテオグリカン免疫染色スコア散布図．DAC と HG との比較において，2B1 のスコアに有意差はみとめないが，3B-3 と 6B6 のスコアに有意差がみられる．HG に比し DAC では，3B-3 の発現が強く，6B6 の発現が弱い.

これまで，癌間質における chondroitin sulfate PG（CSPG）の増加が報告されている [25,35-37]. CSPG を認識するモノクローナル抗体である 2B1 は， large CSPG である versican を認識する [31]．2B1 でヒトの正常間質で免疫染色陽性となるのは，ほとんど大動脈および血管・筋周囲組織のみである．これに対し，癌間質は広く陽性となり [30,32,33]，癌間質における CSPG 増加の所見とも一致する．今回の検討でも DAC 間質において 2B1 陽性であった．しかし，HG 間質でも陽性所見がみられ，2B1 発現の点からは DAC 間質と HG 間質との間に差異をみいだすことはできなかった．治癒過程にある皮膚創傷部の肉芽組織や瘢痕組織内でも CSPG の増加が指摘されており，癌間質との類似性がある [36]. 胃粘膜の傷害とそれに続く修復機序が HG 成立に関与するならば [4,5]，HG 間質と DAC 間質において近似した変化がみられることに妥当性がある．HG 多発と胃癌発生との関連を示唆した報告もみられるが [4,38]，HG 間質での versican 発現や，間質変化が癌化に促進的に働くとする実験的事実 [39] を考え併せるとき，HG 間質における PG の変化が胃癌発生に少なからぬ影響を及ぼしている可能性は否定できない.

大腸癌間質にみられる PG についての Adany らの報告では [28]，chondroitin sulfate chain の 6 - sulphated disaccharide unit (chondroitin 6-sulfate)， および chondroitin 4 - sulfate ， chondroitin 0-sulfate のうち，chondroitin 6 - sulfate および chondroitin 0 - sulfate が増加し，モノクローナル抗体 3B-3 を用いた免疫染色で大腸癌間質が特異的に陽性であった [28]. したがって，今回の検討で，正常間質に近いと考えた HG 間質よりも DAC 間質において 3B - 3（chondroitin 6-sulfate）

がより強く陽性であったことは，これまでの報告と矛盾しないものと考えられる．ただし，Fukatsu らは，chondroitin 6-sulfate PG の分布について，血管との関係および癌浸潤に伴う“young connective tissue”での発現を強調しており，すべての癌間質で陽性であったともしていない[33]．今回のわれわれの検索対象は，浸潤が粘膜下組織までの胃癌であり，まさに癌浸潤に伴って形成された“young connective tissue”であると考えられる．

一方，モノクローナル抗体 6B6 を用いた免疫染色では，HG 間質で優位な発現の増強がみとめられ，3B-3 とは逆の所見であった．6B6 は正常間質の線維組織において陽性となるが，癌間質での発現は少ないとされたものである[29,32-34]．6B6 は small dermatan sulfate PG のコア蛋白を認識するが[29,33]，癌間質において dermatan sulfate PG（DSPG）が減少しているという，われわれの結果と同一の報告もある[35,37]．6B6 によって認識される small DSPG の主体は decorin であるが[33]，decorin には，dermatan sulfate chain のみならず chondroitin sulfate chain を含むものもある[26]．Yeo らは，癌間質では small DSPG の免疫染色による発現は弱いが，chondroitinase ABC 処理により染色性が強まることから，抗原性が癌間質に存在する DSPG によってマスクされている可能性を示唆している[36]．しかし，この研究ではポリクローナル抗体が使用されているため[40]，6B6 で認識される以外の dermatan sulfate-chondroitin sulfate PG も認識されている可能性がある[29]．ほかに，大腸癌間質において decorin が増加しているとの報告もあるが，それらは decorin のうち chondroitin sulfate chain を有するものの増加と考えられている[28,41]．

大腸癌細胞によって線維芽細胞および平滑筋細胞から CSPG 産生が誘導されることが報告されているが[42,43]，同時に，大腸癌間質細胞において decorin や versican 遺伝子の hypomethylation がみられるとする報告もあり[28,44]，癌間質においては，平滑筋細胞や間質細胞による PG 産生に大きな変化の生じることが示唆される．Fukatsu らは，胃癌の浸潤部近傍の粘膜筋板に chondroitin 6-sulfate PG が発現するという所見について，平滑筋細胞の関与を推測しているが[33]，今回の検討でも同様の所見がみとめられた（データ未提示）．多くの培養平滑筋細胞によって PG 産生がなされるという報告があり[18,19]，また，今回のわれわれの検討においても，DAC 間質および HG 間質の間には細胞骨格タンパクからみた間質細胞形質の差異がみいだされたが，その中では粘膜筋板の平滑筋細胞由来と考えられる間質細胞の形質変化に注目すべきである．したがって，DAC 間質と HG 間質でみられる PG の差異が，粘膜筋板平滑筋細胞の形質変化と関連している可能性も考えられ，この点に関してさらなる検討が必要である．

総　括

1. 胃分化型腺癌の粘膜下組織浸潤部（DAC）と粘膜下組織異所性腺組織（HG）の間質を比較したとき，細胞骨格タンパクの発現形式（α-SMA，desmin，vimentin）に差がみられた．さらに，間質細胞の形質，および間質のプロテオグリカン（2B1，3B-3，6B6）の発現にも差がみとめられた．
2. DAC および HG の間質に fibroblastic cells（EBSC，PC）がみとめられたが，いずれも α 平滑筋アクチン（α-SMA）が陽性であることから myofibroblastic cell と考えられた．EBSC にはしばしば粘膜筋板との連続がみられ，粘膜筋板の平滑筋が myofibroblastic change を呈したものであることが示唆された．
3. 粘膜筋板の細胞骨格タンパクの発現形式は α-SMA，desmin 9 pt，vimentin /−，HG 間質における EBSC の形質は α-SMA，desmin，vimentin，DAC 間質における EBSC の形質は α-SMA，desmin−/，vimentin であった．DAC 間質と HG 間質を比較すると，前者では myofibroblastic change による粘膜筋板の形質の変化が強くおこっているとみることができた．
4. 間質でのプロテオグリカン発現は，DAC で 2B1，3B-3，6B6−，HG で 2B1，3B-3−，6B6 であった．myofibroblast（あるいは myofibroblastic cell）は細胞外基質産生能をもち，これらの間質細胞の形質の差異がプロテオグリカンの発現に関与している可能性が考えられた．
5. 2B1 については，DCA 間質と HG 間質とで差がみとめられず，HG の成立過程では HG 間質も一部癌間質に類似した変化を伴っていることが示唆された．

結　論

胃分化型腺癌の初期浸潤部の間質と異所性腺組織の間質は異なった性格を有する．そして，胃癌では，粘膜筋板平滑筋細胞の形質変化によって生じた myofibroblastic cell が産生する細胞外基質が浸潤に深く関っている可能性が示唆された．

謝　辞

稿を終えるにあたり，御指導を賜わりました埼玉医科大学第二外科学教室平山廉三教授，御校閲を賜わりました第二病理学教室高濱素秀教授に深謝致します．また，直接の研究指導を賜わりました第二病理学教室伴　慎一講師ならびに教室各位に感謝致します．

本研究の要旨は，第 10 回日本消化器癌発生学会総会（1999 年 9 月，熊本），第 100 回日本外科学会総会（2000 年 4 月，東京），第 11 回日本消化器癌発生学会総会（2000 年 9 月，米子）にて発表した．

文 献

1) 笹子三津留, 木下 平, 丸山圭一. 早期胃癌の予後. 胃と腸 1993;28(3, Suppl.):139-46.
2) Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease 6th ed. Philadelphia: W.S. Saunders Company, 1999:302-5.
3) Iozzo RV. Tumor stroma as a regulator of neoplastic behavior. Lab Invest 1995;73:157-60.
4) Iwanaga T, Koyama H, Takahashi Y, Taniguchi H, Wada A. Diffuse submucosal cysts and carcinoma of the stomach. Cancer 1975;36:606 -14.
5) Yamagiwa H, Matsuzaki O, Ishihara A, Yoshimura H.Heterotopic gastric glands in the submucosa of the stomach. Acta Pathol Jpn 1979;29:347-50.
6) 日本胃癌学会編. 胃癌取扱い規約. 第 13 版. 東京: 金原出版, 1999.
7) Komuro T. Re-evaluation of fibroblast and fibroblast-like cells. Anat Embryol 1990;182:103-12.
8) Sappino AP, Schürch W, Gabbiani G. Biology of disease. Differentiation repertoire of fibroblastic cells:expression of cytoskeletal proteins as marker of phenotypic modulations. Lab Invest 1990;63:144-61.
9) Schmitt-Gräff A, Desmoulière A, Gabbiani G. Heterogeneity of myofibroblast phenotypic features: an example of fibroblastic cell plasticity. Virchows Arch 1994;425:3-24.
10) Martin M, Pujuguet P, Martin F. Role of stromal myofibroblasts infiltrating colon cancer in tumor invasion. Path Res Pract 1996;192:712-7.
11) Schürch W, Seemayer TA, Gabbiani G. The myofibroblast. A quarter century after its discovery. Am J Surg Pathol 1998;22:141-7.
12) Serini G, Gabbiani G. Mechanisms of myofibroblast activity and phenotypic modulation. Exp Cell Res 1999;250:273-83.
13) Gabbiani G. The cellular derivation and life span of the myofibroblast. Pathol Res Pract 1996;192:708-11.
14) Powell DW, Mifflin RC, Valentich JD, Crowe SE, Saada JI, West AB. Myofibroblast. I. Paracrine cells important in health and disease. Am J Physiol 1999;277:C1-C19.
15) Ohtani H, Sasano N. Stromal cell changes in human colorectal adenomas and carcinomas. An ultrastructural study of fibroblasts, myofibroblasts, and smooth muscle cells. Virchows Arch [Pathol Anat] 1983;401:209-22.
16) Rønnov-Jessen L, Petersen OW, Koteliansky VE, Bissell MJ. The origin of the myofibroblasts in breast cancer. Recapitulation of tumor environment in culture unravels diversity and implicates converted fibroblasts and recruited smooth muscle cells. J Clin Invest 1995; 95:859-73.
17) Ban S, Kamada K, Mitsuki N, Goto Y, Shimizu Y, Takahama M, et al. Phenotypic change of muscularis mucosae in early invasive colorectal adenocarcinoma. J Clin Pathol 2000;53:878-81.
18) Hollmann J, Thiel J, Schmidt A, Buddecke E. Increased activity of chondroitin sulfate-synthesizing enzymes during proliferation of arterial smooth muscle cells. Exp Cell Res 1986;167: 484-94.
19) Schönherr E, Järveläinen HT, Sandell LJ, Wight TN. Effects of platelet-derived growth factor and transforming growth factor-beta 1 on the synthesis of a large versican-like chondroitin sulfate proteoglycan by arterial smooth muscle cells. J Biol Chem 1991;266:17640-7.
20) Thyberg J. Phenotypic modulation of smooth muscle cells during formation of neointimal thickenings following vascular injury. Histol Histopathol 1998;13: 871-91.
21) Sobue K, Hayashi K, Nishida W. Molecular mechanism of phenotypic modulation of smooth muscle cell. Horm Res 1998;50 (Suppl 2):15-24.
22) Hirst SJ. Airway smooth muscle cell culture: application to studies of airway wall remodelling and phenotype plasticity in asthma. Eur Respir J 1996;9:808-20.
23) Merrilees MJ, Finlay GJ. Human tumor cells in culture stimulate glycosaminoglycan synthesis by human skin fibroblasts. Lab Invest 1985;53:30-6.
24) Cotran RS, Kumar V, Collins T. Robbins pathologic basis of disease 6th ed. Philadelphia: W.S. Saunders Company, 1999:98-102.
25) Iozzo RV. Biology of disease. Proteoglycans: structure, function, and role in neoplasia. Lab Invest 1985;53:373-96.
26) Iozzo RV. Matrix proteoglycans: from molecular design to cellular function. Annu Rev Biochem 1998;67:609-52.
27) Caterson B, Christner JE, Baker JR, Couchman JR. Production and characterization of monoclonal antibodies directed against connective tissue proteoglycans. Fed Proc 1985;44:386-93.
28) Adany R, Heimer R, Caterson B, Sorrell JM, Iozzo RV. Altered expression of chondroitin sulfate proteoglycan in the stroma of human colon carcinoma. Hypomethylation of PG-40 gene correlates with increased PG-40 content and mRNA levels. J Biol Chem 1990;265:11389-96.
29) Sobue M, Nakashima N, Fukatsu T, Nagasaka T, Katoh

T, Ogura T, et al. Production and characterization of monoclonal antibody to dermatan sulfate proteoglycan. J Histochem Cytochem 1988;36:479-85.
30) Sobue M, Nakashima N, Fukatsu T, Nagasaka T, Fukata S, Ohiwa N, et al. Production and immunohistochemical characterization of a monoclonal antibody raised to proteoglycan purified from a human yolk sac tumour. Histochem J 1989;21:455-9.
31) Isogai Z, Shinomura T, Yamakawa N, Takeuchi J, Tsuji T, Heinegård D, et al. 2B1 antigen characteristically expressed on extracellular matrices of human malignant tumors is a large chondroitin sulfate proteoglycan, PG-M/versican. Cancer Res 1996;56:3902-8.
32) Nara Y, Kato Y, Torii Y, Tsuji Y, Nakagaki S, Goto S, et al. Immunohistochemical localization of extracellular matrix components in human breast tumours with special reference to PG-M/versican. Histochem J 1997;29:21-30.
33) Fukatsu T, Sobue M, Nagasaka T, Ohiwa N, Fukata S, Nakashima N, et al. Immunohistochemical localization of chondroitin sulphate and dermatan sulphate proteoglycans in tumor tissues. Br J Cancer 1988;57:74-8.
34) 伴 慎一，鎌田孝一，満木凡子，後藤義也，清水禎彦，鈴木恵子，他．間質におけるプロテオグリカンの局在からみた大腸 sm 癌の浸潤形態．消化器癌の発生と進展 1997;9:369-73.
35) Alini M, Losa GA. Partial characterization of proteoglycans isolated from neoplastic and nonneoplastic human breast tissues. Cancer Res 1991;51:1443-7.
36) Yeo T-K, Brown L, Dvorak HF. Alterations in proteoglycan synthesis common to healing wounds and tumors. Am J Pathol 1991;138:1437-50.
37) Hinrichs U, Rutteman GR, Nederbragt H. Stromal accumulation of chondroitin sulphate in mammary tumours of dogs. Br J Cancer 1999;80:1359-65.
38) 万代光一，森脇昭介，土井原博義，山上啓太郎，元井 信．胃多発性粘膜下異所性嚢胞 paracancerous lesion としての意義．病理と臨床 1991;9:1217-25.
39) Sakakura T, Sakagami Y, Nishizuka Y. Accelerated mammary cancer development by fetal salivary mesenchyma isografted to adult mouse mammary epithelium. JNCI 1981;66:953-9.
40) Voss B, Glössl J, Cully Z., Kresse H. Immunocytochemical investigation on the distribution of small chondroitin sulfate-dermatan sulfate proteoglycan in the human. J Histochem Cytochem 1986;34:1013-9.
41) Iozzo RV, Cohen I. Altered proteoglycan gene expression and the tumor stroma. Experientia 1993;49:447-55.
42) Iozzo RV. Neoplastic modulation of extracellular matrix: colon carcinoma cells release polypeptides that alter proteoglycan metabolism in colon fibroblasts. J Biol Chem 1985;260:7464-73.
43) Iozzo RV, Sampson PM, Schmitt GK. Neoplastic modulation of extracellular matrix: stimulation of chondroitin sulfate proteoglycan and hyaluronic acid synthesis in co-cultures of human colon carcinoma and smooth muscle cells. J Cell Biochem 1989;39:355-78.
44) AdanyR, Iozzo RV. Altered methylation of versican proteoglycan gene in human colon carcinoma. Biochem Biophys Res Commun 1990;171:1402-13.

© 2001 The Medical Society of Saitama Medical School