Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-12-05

Urokinase type plasminogen activator receptor expression in colorectal neoplasms

鈴木，知志

(Degree)
博士（医学）
(Date of Degree)
1999-03-31
(Resource Type)
doctoral thesis
(Report Number)
甲1992
(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1001992

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

氏名・（本籍）　鈴木知志（すずきさとし）　（愛知県）

博士の専攻分野の名称　博　士（医　学）
学位記番号　博い第1236号
学位授与の要件　学位規則第4条第1項該当
学位授与の日付　平成11年3月31日

学位論文題目　Urokinase type plasminogen activator receptor expression in colorectal neoplasms
（大腸腫瘍におけるウロキナーゼ型プラスミノーゲンアクチベータ受容体の発現意義に関する研究）

審査委員　主査　教授　伊東　宏
教授　前田　盛　　教授　黒田嘉和

論文内容の要旨

序文

大腸癌の発生について癌関連遺伝子の異常が蓄積されるのにともない腺腫から癌に至るというadenoma–carcinoma sequenceの多段階発癌機序が考えられている。浸潤，転移は多段階発癌の最終過程に位置し，その成立には癌細胞の原発巣からの離脱と浸潤，血管への侵入，血管外への脱出，転移臓器への着生と増殖という一連の段階を経る。原発巣からの離脱と浸潤の過程には，細胞外基質の分解，基底膜の破壊といった機構が関与しており，Urokinase type plasminogen activaton system（uPA system）はその中心的役割を果たしていると考えられている。Urokinase type plasminogen activator（uPA）は，plasminogenをplasminへ変換し，多数の蛋白分解酵素を活性化することにより，局所線溶活性をを制御している。uPAは，癌細胞の細胞膜上に存在する特有の受容体uPA receptor（uPAR）と結合することにより，活性化される。uPA,uPARの過剰発現は，様々な悪性腫瘍において報告されている。

我々は，大腸腺腫および癌におけるuPAR mRNAおよび蛋白の発現を手術切除材料を用いて解析し，大腸癌発生機序におけるその発現の意義を検討した。

方法

対象：内視鏡的および手術的に切除された大腸腺腫100例，原発大腸癌80例と肝転巣3例を対象とし，腺腫は病理組織学的に軽度，中等度，高度異型に分類し，癌の臨床病理学的進行度はDukesの分類を用いた。

In situ hybridization法：ホルマリン固定，パラフィン包埋切片に，uPAR cDNAの*Bam*H 1 fragment（585 bp）より*in vitro* transcriptionにて作製したジゴキシゲン標識RNAプローブを用いてハイブリダイズ後，Nucleic Acid Detection Kit（Boehringer Mannheim）にて検出た。

Northern blotting法：凍結組織よりRNAを抽出し，上記fragmentよりPCR法にて作製したジゴキシゲン標識cDNAプローブ（585bp）を用いて，ハイブリダイゼーションを行い，検出はCSPD（Boehringer Mannhiem）を用いた。免疫組織染色法：*In situ* hybridization法で使用した切片の連続切片に抗uPAR

抗体（American Diagnostics Inc.）を用いて，ABC 法にて行った。

Western blottng 法：凍結組織より蛋白を抽出し，SDS-PAGE 解析し，抗 uPAR 抗体を用いた。検出は Chemiluminescence Western blottng detection system（Amersham corp.）にて行った。

統計処理：χ^2検定および Student's t-test にて行い，$p<0.05$を統計学的有意とした。

結果

uPAR mRNA の発現

In situ hybridization 法：腺腫では100例中30例（30%）が，癌では80例中68例（85%）が陽性を示した。uPAR mRNA は異型（悪性）細胞の細胞質に強度に発現しており，周囲の間質細胞にも軽度の発現を認めた。また，癌先進部で発現がより強い傾向が見られた。腫瘍の進行度別の陽性率は，軽度異型腺腫では31例中 6 例（19%），中等度異型腺腫では33例中 7 例（21%），高度異型腺腫では36例中17例（47%），DukesA 癌では29例中21例（72%），DukesB 癌では28例中26例（93%），DukesC 癌では23例中21例（91%）であった。陽性率の有意の差異は，中等度異型腺腫と高度異型腺腫との間，高度異型腺腫と DukesA 癌との間，DukesA 癌と DukesB 癌との間に認められた。

Northern blotting 法：uPAR mRNA の発現は，腺腫では36例中12例（33%），大腸癌では15症例全例（100%），肝転移巣では 3 症例全例（100%）で見られ，その発現量と腫瘍の進行度との相関は，中等度異型腺腫と高度異型腺腫の間，高度異型腺腫と DukesA 癌との間，DukesA 癌と DukesB 癌との間に認められ，特に，DukesA 癌では高度異型腺腫に比べ，著明な発現量の増加が見られた。

uPAR 蛋白の発現

免疫組織染色法：腺腫では100例中14例（14%）が，癌では80例中39例（52%）が陽性であった。uPAR 蛋白の局在は *In situ* hybridization 法の結果と同様の傾向を示した。腫瘍の進行度別の陽性率は，高度異型腺腫と DukesA 癌との間で有意の差異を認めた。

Western blottng 法：uPAR の蛋白の発現は，腺腫では40例中12例（30%），大腸癌では15症例全例（100%），肝転移巣では 3 症例全例（100%）で見られ，その発現量と腫瘍の進行度との相関は，Northern blotting 法の結果と同様の傾向を示した。

考察

大腸癌では多段階発癌に関する様々な遺伝子異常が解明されている。本研究では，uPAR mRNA の発現は，正常大腸粘膜では認められなかったが，腺腫全体では30%に見られ，癌全体では85%と腺腫より有意に高率に見られた。病理組織学的検討では，uPAR mRNA の局在は主に異型細胞に認められ，軽度異型腺腫でわずかな発現が見られ，腺腫および癌の異型度（悪性度）の進行にしたがい，増強することが認められた。また，uPAR 蛋白の発現量も uPAR mRNA と平行するように増強する傾向を示した。これらより，大腸腫瘍において uPAR は腫瘍細胞で産生され，adenoma-carcinoma sequence の比較的早い段階より発癌機序に関与している可能性が考えられる。

大腸癌症例の検討では癌の浸潤度と uPAR 発現に強い相関が見られた。特に，粘膜内癌に比べ，浸潤癌である DukesA 癌では uPAR の著明な発現増強が認められ，更に，固有筋層を貫いて浸潤する DukesB 癌では DukesA 癌より uPAR 発現は有意に増強していた。加えて，uPAR 高発現は，浸潤先進部でより強く認められたことにより，uPAR が多段階発癌過程の後期の大腸癌細胞の浸潤能の獲得，増強に深く関与している可能性が考えられる。これまでに，大腸癌，乳癌，肺癌などでは原発巣の uPAR 発現量が臨床病期および予後と直接的に相関することが報告されている。また，卵巣癌では血清 uPAR 値と予後との関連も報告されている。これらの知見と今回の大腸腫瘍の進展と uPAR 発現量が正の相関を示すという結果を考え合わせると血清 uPAR 値は大腸癌の進行度（浸潤度）を予測しうる可能性

が示唆される。

今回の結果では，転移を有しないDukesB癌，リンパ節転移を有するDukesC癌，３例の肝転移巣の間でいずれもuPAR高発現を見たが発現量に有意な差異を認めず，大腸癌の転移機構にはさらなる他の遺伝子異常の関与が推定されるが，本研究では大腸腫瘍の多段階発癌機構における早期の腫瘍発生過程より後期の浸潤過程までへのuPARの関与を明らかにすることができたと考えられる。

論文審査の結果の要旨

大腸癌の発生機序として，癌関連遺伝子の異常が蓄積されるのにともない腺腫から癌に至るadenoma–carcinoma sequenceが考えられており，浸潤，転移は多段階発癌の最終過程に位置している。Urokinase type plasminogen activaton system（uPA system）は癌の浸潤，転移機構に深く関与していると考えられている。Urokinase type plasminogen activator（uPA）は，plasminogenをplasminに変換し，多数の蛋白分解酵素を活性化することにより，局所線溶活性を制御している。uPAは，癌細胞の細胞膜上に存在する特有の受容体uPA receptor(uPAR)と結合することにより，活性化される。uPA,uPARの過剰発現は，様々な悪性腫瘍において報告されている。本研究者は，大腸腺腫および癌におけるuPAR mRNAおよび蛋白の発現を解析することにより，大腸癌発生機序におけるその発現の意義を検討している。

対象は大腸腫瘍の手術切除材料を用い，uPAR mRNA発現の局在と定量は*In situ* hybridization法およびNorthern blotting法で，uPAR蛋白発現の局在と定量は免疫組織染色およびWestern blottngで解析した。

uPAR mRNAの発現は，正常大腸粘膜では認められなかったが，腺腫全体で30%に見られ，癌全体では85%と腺腫より有意に高率に見られた。その局在は主に異型細胞に求められ，軽度異型腺腫でわずかな発現が見られ，腺腫および癌の異型度（悪性度）の進行にしたがい，増強することが認められた。加えて，uPAR蛋白の発現量もuPAR mRNAと平行するように増強する傾向を示したことにより，uPARは腫瘍細胞で産生され，adenoma–carcinoma sequenceの比較的早い段階より発癌機序に関与している可能性が示唆された。また，大腸癌症例ではuPARは浸潤先進部でより強く発現が認められ，癌の進行度別のuPAR発現量は粘膜内癌に比べ，浸潤癌であるDukesA癌では著明な発現増強が認められ，更に，固有筋層を貫いて浸潤するDukesB癌ではDukesA癌より有意に増強していた。これらより，uPAR発現度は癌の浸潤と強く相関することが示唆された。しかし，転移を有しないDukesB癌，リンパ節転移を有するDukesC癌，３例の肝転移巣の間でいずれもuPAR高発現を見たが発現量に有意な差異を認めず，大腸癌の転移成立には更なる他の遺伝子異常の関与が推定される。

以上の結果より，uPARは大腸腫瘍の多段階発癌機構において早期の腫瘍発生過程より後期の浸潤過程まで深く関与している可能性を明らかにしている。

本研究は大腸癌の発癌，浸潤機序におけるuPARの関与について重要な知見を得たものとして，価値ある集積であると認める。

よって，本研究者は，博士（医学）の学位を得る資格があると認める。