

モノクローナル抗体 SF-25 を用いた大腸腫瘍性病変 に対する免疫組織化学的検討

東京慈恵会医科大学内科学講座消化器肝臓内科

稲玉英輔 鳥居明 松岡美佳
和泉元善 有廣誠二

東京慈恵会医科大学総合医科学研究センター臨床医学研究所

高橋 弘

(受付 平成 13 年 11 月 16 日)

IMMUNOHISTOCHEMICAL EXAMINATION OF SF-25 ANTIGEN IN COLORECTAL ADENOMA AND CARCINOMA

Eisuke INADAMA, Akira TORII, Mika MATSUOKA,
Motoyoshi IZUMI, and Seiji ARIHIRO

*Division of Gastroenterology and Hepatology, Department of Internal Medicine,
The Jikei University School of Medicine*

Hiroshi TAKAHASHI

Institute of Clinical Medicine and Research, The Jikei University School of Medicine

Monoclonal antibody SF-25 recognizes a 125-kDa glycoprotein highly expressed on the cell surface of a transformed human cell line (FOCUS cells). Using the avidin-biotin complex method, we examined the expression of SF-25 antigen in colorectal adenoma, carcinoma, and normal mucosa. All cases of advanced colorectal carcinoma ($n=11$), both well-differentiated ($n=5$) and moderately differentiated ($n=6$), expressed SF-25 antigen. All 27 cases of intramucosal adenocarcinoma expressed SF-25 antigen. In 31 cases of colorectal adenoma, positive staining was observed in 7 of 12 cases with mild dysplasia and 17 of 19 cases with moderate dysplasia. No morphologic differences were found between SF-25-positive and SF-25-negative samples of mildly and moderately dysplastic colorectal adenomas. No samples of normal colon mucosa ($n=34$) or hyperplastic polyp ($n=7$) were positive for SF-25 antigen. These results suggest that monoclonal antibody SF-25 is highly specific for tumorous lesions of the colon and rectum. Furthermore, the SF-25 antigen is expressed at an early stage of cellular transformation and the level of SF-25 antigen progressively increases as the malignant potential of the cell increases.

(Tokyo Jikeikai Medical Journal 2002; 117: 63-9)

Key words: monoclonal antibody SF-25, immunohistochemical examination, colorectal tumor

I. 緒 言

現在, 大腸癌の発現に関する genetic pathway

として, adenoma-carcinoma sequence¹⁾, および *de-novo* 癌説⁴⁾⁻⁶⁾ の 2 つが考えられている。また 1988 年に Vogelstein らが大腸癌の多段階発癌モ

デル⁴⁾を提唱して以来、癌関連遺伝子の存在が多く確認されている。adenoma-carcinoma sequenceにおいては、APC (adenomatous polyposis coli) に始まり、K-ras, p53, DCC等の段階的な関与が確認され、それぞれの遺伝子異常について現在研究がされている⁸⁾。しかし現在までのところ、既知の癌関連遺伝子のみで、正常粘膜から腺種を経て発癌に至る腫瘍性変化の全てのメカニズムを説明することは疑問の残る点であり、現在も多方面にわたる研究が続けられている。

今回著者らが用いたモノクローナル抗体SF-25は、元来ヒト肝癌細胞培養株である、FOCUS cellの細胞膜表面上に存在する125 kDaの糖蛋白抗原を認識する抗体である。Takahashiらの実験においてSF-25を用いた非固定状態での癌細胞培養株との免疫染色では、染色陽性域は細胞膜に限局することが確認されている⁹⁾⁻¹¹⁾。また各種癌細胞株との免疫学的検索では、肝細胞癌64.0%、胆嚢癌100%、胃癌80%、大腸癌100%、大腸癌肝転移100%と各種腺癌において高い陽性率を示している。一方ヒト正常組織を対照とした検索では、ヒトの遠位尿管に抗原抗体反応を認める以外、他のいずれの正常組織とも反応は認められていない⁹⁾⁻¹¹⁾。

以上の結果をふまえ、今回著者らは前癌病変としての腺腫から癌に至る異型度の進行、分化度の低下に伴う腫瘍性変化に対し、モノクローナル抗体SF-25を用いた免疫組織化学的検討を行った。その結果より、本抗体の認識する糖蛋白抗原の発現時期、発現様式、および腫瘍特異性について考察を加えた。

II. 対象と方法

1. 対象

当院および関連施設で切除された大腸癌手術標本、および経内視鏡的に採取した標本を用いた。内訳は、進行癌11例(高分化腺癌5例, 中分化腺癌6例), 粘膜内癌27例, 腺腫31例(軽度異型腺腫12例, 中等度異型腺腫19例)である。対照として過形成性ポリープ7例, 正常粘膜34例を用いた。なお、今回対照とした正常粘膜は、ポリペクトミー、手術等で採取した標本上の正常粘膜部を用いている。今回高度異型腺腫は池上らの分類¹²⁾に

従い、低異型度粘膜内癌 low grade intramucosal carcinoma (LGm-Ca) として扱い、その他の分化型粘膜内癌を高異型度粘膜内癌 high grade intramucosal carcinoma (HGm-Ca) として分類した。また、今回 adenoma-carcinoma sequence に従った腫瘍性病変を対象としたため、LGm-Ca, HGm-Ca ともに Ikegami らの分類¹³⁾¹⁴⁾ に従い、PGtype (polypoid growth) を対象とした。また進行癌では未分化癌、低分化腺癌は除外した。

2. 方法

採取した組織を直ちに OCT-compound を用い包埋凍結し、4-6 μm の連続切片を作成した。これを 4°C にて 4% paraformaldehyde (PHA) で 30 分間固定後、0.3% H_2O_2 溶液で内因性ペルオキシダーゼ活性を失活させた。1次抗体としてモノクローナル抗体 SF-25 (マウス IgG) (Harvard Medical School にて高橋弘作成) を phosphate buffer saline (PBC; 0.01 M. pH 7.4) にて 200~400 倍希釈し、4°C で 24 時間反応させた。その後 Vectastain 社製 ABCkit を利用した酵素抗体法の手順に従い¹⁵⁾ 免疫組織化学的染色を行った。呈色は VECTOR VIP で行い、核染色にはヘマトキシリンを使用した。染色の評価としては、染色陽性例は染色のパターンより以下の 2 群に分類した。

(1) cytoplasmic pattern; 細胞質内を含む腫瘍細胞全体に、びまん性に染色陽性像を認めるもの。

(2) membranous pattern; 細胞膜表面に比較的強く染色陽性を認めるもの。

III. 結果

大腸進行癌 11 例(高分化腺癌 5 例, 中分化腺癌 6 例)において、全例に染色陽性像を認めた。染色パターンは、高分化腺癌で cytoplasmic pattern 80% (4/5), 中分化腺癌では全例 cytoplasmic pattern であった。分化度の低下とともに、cytoplasmic pattern の増加する傾向を認めた (Fig. 1)。

粘膜内癌 27 例(LGm-Ca 8 例, HGm-Ca 19 例)において、LGm-Ca, HGm-Ca ともに全例に染色陽性像を認めた。染色パターンは、LGm-Ca で

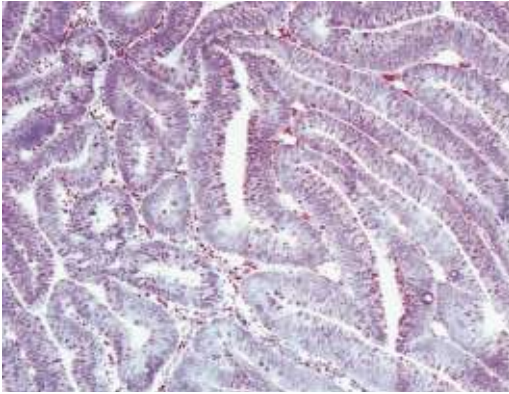


Fig. 1. A case of well differentiated adenocarcinoma which shows positive staining. It showed cytoplasmic staining pattern.

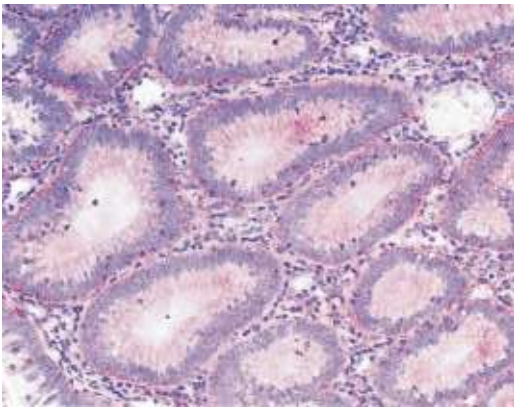


Fig. 2. A case of tubular adenoma, which shows positive staining on cytoplasmic pattern.

cytoplasmic pattern 75.0% (6/8), membranous pattern 25.0% (2/8)であった。HGm-Caでは cytoplasmic pattern 52.6% (10/19), membranous pattern 47.4% (9/19)であった。

腺腫病変 31 例（軽度異型腺腫 12 例，中等度異型腺腫 19 例）では，全体で 80.6% (25/31) に染色陽性像を認めた (Fig. 2)。軽度異型腺腫において 67.0% (8/12) に陽性像を認め，染色パターンは cytoplasmic pattern 12.5% (1/8), membranous pattern 87.5% (7/8) であった。中等度異型腺腫では 89.4% (17/19) に陽性像を認め，染色パターンは cytoplasmic pattern 47.0% (8/17), membranous pattern 53.0% (9/17) であった。腺腫病変では，異型度の進行とともに染色陽性率は増加し，かつ cytoplasmic pattern が増える傾向を認めた。また軽度異型腺腫，中等度異型腺腫ともに染色陽性例と陰性例，また cytoplasmic pattern と membranous pattern を示す腺管を比較検討したが，両者間に明らかな組織形態学的な違いは見出せなかった。また，全ての組織型において，染色陽性例，陰性例ともに今回の検討では，同一標本上では一様な染色パターンを呈していた。正常粘膜 34 例，過形成性ポリープ 7 例では全例染色陰性であった (Table 1)。さらにいずれの腫瘍組織においても，染色陽性腺管と染色陰性の周囲組織との境界部，あるいは陽性腺管の管腔側において染色陽性域の染み出し様所見は認められなかった。すなわち，SF-25 染色の特徴として，染色境界が明瞭である点が挙げられる (Fig. 3)。

Table 1

Histological grade	Numbers of positive stain (%)	Immunostaining pattern	
		cytoplasmic (%)	membranous (%)
advanced Ca. well diff.	11/11 (100)	4/5 (80.0)	1/5 (20.0)
moderately diff.	5/5 (100) 6/6 (100)	6/6 (100)	0
intramucosal Ca.	27/27 (100)		
high grade Ca.	19/19 (100)	10/19 (52.6)	9/19 (47.4)
low grade Ca.	8/8 (100)	6/8 (75.0)	2/8 (25.0)
adenoma	25/31 (80.6)		
moderate dysplasia	17/19 (89.4)	8/17 (47.0)	9/17 (53.0)
mild dysplasia	8/12 (67.0)	1/8 (12.5)	7/8 (87.5)
hyperplastic polyp	0/7 (0)		
normal mucosa	0/34 (0)		

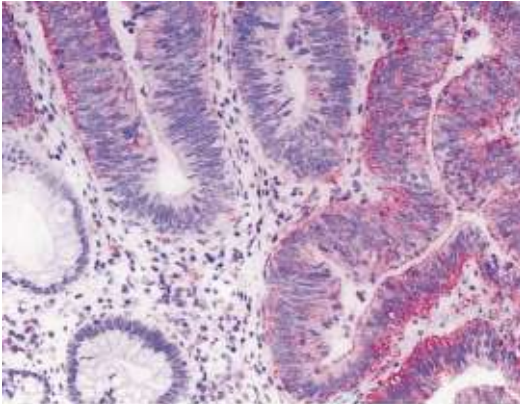


Fig. 3. The specimen which contains adenocarcinoma and normal mucosa. The area of adenocarcinoma showed strong positive staining, but no staining was observed in normal tissue area.

IV. 考 察

現在、大腸癌の発生に関する分子生物学的研究は、1988年のVogelsteinらの大腸癌多段階発癌モデル⁴⁾の提唱以来、数多くの施設から癌関連因子にまつわる発表が行われている。adenoma-carcinoma sequenceに関与する癌関連因子として、これまでにAPC, K-ras, p53, DCCなどの存在が確認されている。その働きは、まず本来癌抑制遺伝子であるAPC遺伝子に異常が生じ、正常細胞から腺腫が発生する¹⁶⁾。ついで癌遺伝子であるK-ras遺伝子の変異が加わり、腺腫細胞の増殖、異型度の進展が生じ、これにp-53遺伝子変異が加わり癌化を起こす¹⁷⁾。さらにDCC遺伝子変異により、癌が進展すると考えられている¹⁸⁾¹⁹⁾。このように、APC, K-ras遺伝子は多段階発癌の比較的初期の腫瘍性変化に関与し、p53, DCC遺伝子は発癌、および癌の進行に関する、いわば後期の腫瘍性変化に関与していると考えられている。また現在も大腸癌の発癌、進展に関する分野では、上記の癌関連因子以外にも、HNPCC (hereditary non-polyposis colorectal cancer)の原因遺伝子として同定されたhMSH2²⁰⁾, hMLH1²¹⁾に代表されるTBR2TGF- β の作用消失²²⁾²³⁾、また癌の浸潤、転移に関連するとされるカドヘリン、インテグリン、セレクチンなどの接着分子²⁴⁾など、さまざまな癌関連因子に関する発表が行われてい

る。これらの報告の多くは、adenoma-carcinoma sequence, またde-novo癌説を裏付ける事実であるが、現時点ではこれら既知の癌関連因子のみで大腸癌の発癌を説明するには、特異度、出現率などの点で疑問が残る。早期腫瘍性変化に関与すると考えられるAPCにおいて、FAP患者におけるAPC遺伝子異常は約70%に認められるのに対し、sporadicな腺腫病変でのLOHは約50%と低い²⁵⁾。またK-rasの出現率は、軽度異型腺腫23%、中等度異型腺腫52%、大腸癌組織で50~70%²⁶⁾程度である。また最近ではヒト大腸粘膜に見られるaberrant crypt fociにおいても約60%に変異が見られるとの報告もあり、発癌経路における役割はいまだ不明な点が多い。またp53, DCCのように癌化に関与すると言われている因子においても、大腸癌で100%の出現率は認められていない。さらに、現在も臨床の場で腫瘍マーカーとして用いることの多いCEA, CA19-9など、その性質から正常細胞の段階で出現を認めるなど²⁷⁾²⁸⁾、腫瘍特異性は低いと言わざるをえない。

今回我々が用いたモノクローナル抗体SF-25は、Takahashiらにより、胃癌、大腸癌、肝癌、胆嚢癌、膵癌などの内胚葉由来の各種癌細胞株に対し高い腫瘍特異性を示すことが報告されている^{9)~11)}。著者らはこのSF-25の高い腫瘍特異性に着目し、腺腫から癌に至る各腫瘍細胞に対し、SF-25を用いた免疫組織学的検討を行い、本抗体の持つ意義、臨床応用の可能性について検討した。

非腫瘍性病変である対照群と、腫瘍性病変の早期にあたる軽度異型腺腫、中等度異型腺腫を比較した。対照群では全例染色陰性であった。これに対し、軽度異型腺腫、中等度異型腺腫では70%~80%の陽性率を認めた。また染色標本上で、腫瘍性組織と周囲非腫瘍性組織の境界はいずれにおいても明瞭であった。この結果からは、SF-25により認識される糖蛋白抗原の出現は、早期の腫瘍性変化の段階に一致すると考えられる。すなわち、正常細胞を含めた非腫瘍性組織においては、同抗原は存在しない、もしくは他の因子の関与がない限り、活性型としては存在できない可能性が考えられる。この事を既知の癌関連因子と比較すると、SF-25は早期腫瘍性変化において、APC出現の後に関与し、陽性率の点からはK-rasと同様に腫

瘍細胞の異型度の進行、増殖と何らかの関連をもつことが示唆された。このことは、Takahashiらの報告にもあるように⁹⁾¹⁰⁾、PHAにより幼若化されたリンパ球の75%にSF-25陽性細胞が認められることから、同抗体に認識される抗原の増加は、細胞のトランスフォーメーションと親密な関連を持っていることが示唆された。この幼若化されたリンパ球の陽性所見は、本検討でも同様に認められた。

次に腺腫病変、および癌組織について検討を行った。染色陽性率については、腺腫病変では異型度の進行に伴い陽性率の増加を認め、粘膜内癌に至る段階でLGm-Ca, HGm-Caともに100%の陽性率を示した。また染色様式に関しては、腺腫、癌組織ともに異型度の進行、分化度の低下に従いcytoplasmic patternの増加を認めた。これと同様な報告はCEAを用いた大腸腫瘍性病変に対する検討や²⁸⁾、小井戸らの行ったp53を用いた同様の検討²⁹⁾においても認められている。その原因として、諸家らは、腫瘍組織の異型度の進行、分化度の低下に伴う抗原産生量の増加をあげている。今回のSF-25による検討でも、腫瘍細胞内に染色像の認められるcytoplasmic patternは、軽度異型腺腫の12.5%に始まり、中分化腺腫において100%を示し、その染色様式の増加は腫瘍細胞の悪性度の進行に相関していた。この結果からはCEA, p53等の検討と同様に、SF-25に認識される糖蛋白抗原が腫瘍細胞の悪性度の進行に伴って増加し、細胞質内にまで染色陽性域が拡大するのではないかと推測された。しかし、当教室の加藤らの行った胃腫瘍性病変に対するSF-25による検討³⁰⁾では、異型度、分化度の進行に伴う染色性に明らかな違いは認められていない。このことは、胃と大腸における発癌形式の違い、また腺腫病変に対する分類法の違いなど考慮する点はあるが、更に比較検討が必要と考えられた。

以上より、SF-25は大腸腫瘍性病変の早期より陽性像を呈し、その染色様式は、腫瘍細胞の悪性度の進行に伴い、細胞質内にまで強く染色陽性が拡大する傾向が認められた。この特徴は早期の腫瘍性病変から、進行癌に至るまで連続的に観察された。すなわち、SF-25抗体は既知の癌関連因子と比較して、大腸腫瘍性病変全般にわたり標的抗

原の出現を捕らえられる特性を有していると考えられた。

今後の課題は、低分化腺癌、未分化癌を含めた基礎研究の充実とともに、本抗体の持つ特性を生かした臨床応用の可能性が挙げられる。現在、癌関連因子を用いた臨床応用の研究として、腫瘍診断、遺伝子治療など試みられている。本検討で明らかのように、モノクローナル抗体SF-25は、ヒト大腸腫瘍性病変に対し、優れた特異性、高い感度を有している。また、大腸癌腫瘍株を移植したマウスでは、腫瘍組織への選択的取り込みを確認している⁹⁾。このように、モノクローナル抗体SF-25は、実験動物を用いた*in vivo*の検討においても、ヒト大腸腫瘍組織切片と同様な特性を示すことが確認されている。以上より、モノクローナル抗体SF-25の持つこれらの特性は、今後盛んになる遺伝子関連物質を用いた腫瘍診断、癌治療の分野で有用に応用されると考えられた。

V. 結 語

モノクローナル抗体SF-25を用い、大腸分化型腺癌、腺腫、正常粘膜、過形成性ポリープに対し、免疫組織学的検討を行った。

1. 分化型腺癌では100%に染色陽性であった。染色パターンは、細胞の悪性度の進行に伴いcytoplasmic patternの増加傾向を認めた。

2. 腺腫病変では、中等度異型腺腫で89.4%、軽度異型腺腫で67.8%に陽性像を認めた。染色パターンは、異型度の進行に伴いcytoplasmic patternの増加傾向を認めた。

3. 正常粘膜、過形成性ポリープでは全例染色陰性であった。

以上より、モノクローナル抗体SF-25は大腸分化型腺癌および腺腫病変に対し高い腫瘍特異性を有し、その認識する糖蛋白抗原は、腫瘍性変化の初期より出現し、腫瘍細胞の悪性度の進行に伴い、その産生量は増加すると考えられた。

文 献

- 1) Morson BC. The polyp-cancer sequence in the large bowel. Proc R Soc Med 1974; 67: 451-7.
- 2) Morson BC. Precancerous and early malignancy in the large bowel. Proc R Soc Med 1974; 67: 458-62.

- nant lesions of the large intestine. *Br J Surg* 1968; 55: 725-31.
- 3) Mount T, Bussey HJR, Morson BC. The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* 1975; 36: 2251-70.
 - 4) Spratt JS, Ackerman LV, Moyer CA. Relationship of polyps of the colon to colonic cancer. *Ann Surg* 1958; 148: 682-98.
 - 5) Ackerman LV, Spratt JS. Do adenomatous polyps become cancer? *Gastroenterology* 1963; 44: 905-8.
 - 6) Castleman B, Krickstein HI. Do adenomatous polyps of the colon become malignant? *Gastroenterology* 1962; 267: 469-75.
 - 7) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, et al. Genetic alterations colorectal tumor development. *N Engl J Med* 1988; 319: 525-32.
 - 8) 崎田隆一, 永山剛久. adenoma-carcinoma sequence に関する免疫組織科学的研究. *Gastroenterol Endosc* 1989; 31: 2573-83.
 - 9) Takahashi H, Wilson B, Ozturk M, Motte P, Strauss W, Isselbacher KJ, et al. In vivo localization of human colon adenocarcinoma by monoclonal antibody binding to a highly expressed cell surface antigen. *Cancer Res* 1988; 48: 6573-9.
 - 10) Takahashi H, Carlson R, Ozturk M, Sun S, Motte P, Strauss W, et al. Radioimmunolocalization of hepatic and pulmonary metastasis of human colon adenocarcinoma. *Gastroenterology* 1989; 96: 1317-29.
 - 11) Takahashi H, Nakada T, Puisieux I. Inhibition of human colon cancer growth by antibody-directed human LAK cells in SCID mice. *Science* 1993; 259: 1460-3.
 - 12) 池上雅博, 下田忠和, 松井隆明, 大野直人, 牛込新一郎. 形態計測から見た 10 mm 以下大腸癌の発生と進展. *消化器内視鏡* 1989; 1: 703-15.
 - 13) Ikegami M. A pathological study on colorectal cancer. From de-novo carcinoma to advanced carcinoma. *Acta Pathol Jpn* 1987; 37: 21-37.
 - 14) Shimoda T, Ikegami M, Fujisaki J, Matsui T, Aizawa S, Ishikawa E. Early colorectal carcinoma with special reference to its development de novo. *Cancer* 1989; 64: 1138-46.
 - 15) Hus SM, Raine L, Fanger H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques. *J Histochem Cytochem* 1981; 29: 577-80.
 - 16) Powell SM. APC mutations occur early during colorectal tumor in genesis. *Nature* 1992; 359: 235-7.
 - 17) Kikuchi-Yanoshita R, Konishi M, Ito S, Seki M, Tanaka K, Maeda Y, et al. Genetic change of both p53 alleles associated with the conversion from colorectal adenoma to early carcinoma in familial adenomatous polyposis and non-familial adenomatous polyposis patients. *Cancer Res* 1992; 52: 3965-71.
 - 18) 中村祐輔. 遺伝子より見た大腸癌の発生. 長廻敏編. 早期大腸癌—発生から診断・治療まで. 東京: 医学書院; 1993. p. 183-206.
 - 19) Miyaki M, Seki M, Okamoto M, Yamanaka A, Maeda Y, Tanaka K, et al. Genetic change and histopathological types in colorectal tumors from patients with familial adenomatous polyposis. *Cancer Res* 1990; 50: 7166-73.
 - 20) Fishel R, Lescoe MK, Rao MRS, Copeland NG, Jenkins NA, Gerber J, et al. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary non-polyposis colon cancer. *Cell* 1993; 75: 1027-38.
 - 21) Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe MK, et al. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994; 368: 258-61.
 - 22) Markowitz S, Wang J, Myeroff L, Paesons R, Sun L, Lutterbaugh J, et al. Inactivation of the type II TGF- β receptor in colon cancer cells with microsatellite instability. *Science* 1995; 268: 1336-8.
 - 23) Massague J. The transforming growth factor- β family. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 597-603.
 - 24) 藤田 伸. 大腸癌転移における接着分子の関与. *最新医学* 1996; 51: 1436-41.
 - 25) Miyoshi Y, Nagase H, Ando H, Horii A, Ichii S, Nakatsuru S, et al. Somatic mutations of the APC gene in colorectal tumors: mutation cluster region in the APC gene. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 229-33.
 - 26) 富田尚裕, 門田卓士, 大植雅之, 大西 直, 門田守人. 大腸癌遺伝子変異モデル: 大腸腺腫内癌の分子生物学. *最新医学* 1996; 51: 1398-407.

- 27) 多田 誠. 大腸癌, 大腸ポリープにおける上皮性 Marker antigen の免疫組織学的研究. 京府医大誌 1983; 92: 2051-9.
- 28) 奥田康一, 小平 進, 渡辺昌彦, 高見 博, 寺本龍生, 安部令彦. 大腸癌における CA19-9 と CEA の腫瘍マーカーとしての意義. J Jpn Soc Cancer Ther 1986; 21: 969-77.
- 29) 小井戸薫雄, 下田忠和. 大腸癌における p53 遺伝子および p53 蛋白の病理診断学的意義. 胃と腸 1993; 28: 1324-33.
- 30) 加藤慎一, 鳥居 明, 稲玉英輔, 美田敏宏, 穴見美佳, 浅川 博 ほか. モノクローナル抗体SF-25 を用いた胃腫瘍性病変に対する免疫組織化学的検討. Gastoroenterol Endosc 1998; 40: 645-50.