



Title	乳癌の浸潤・転移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ーシステムの活性化の意義
Author(s)	金, 昇晋
Citation	大阪大学, 1997, 博士論文
Version Type	VoR
URL	<a href="https://doi.org/10.11501/3129230">https://doi.org/10.11501/3129230</a>
rights	
Note	

*The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

The University of Osaka



乳癌の浸潤・転移におけるウロキナーゼ型プラスミノゲンアクチ  
ベーターシステムの活性化の意義The Significance of the Activation of Urokinase Type Plasminogen  
Activator System in Breast Cancer Invasion and Metastasis大阪大学医学部附属バイオメディカル教育研究センター腫瘍外科学研究部  
Division of Surgical Oncology, Dept. of Oncology, Biomedical Research Center, Osaka Univ.  
Med. School

金 昇晋

Shoushin Kim

(指導: 高井新一郎教授)

(平成8年10月9日受付)

The aim of this study is to evaluate the significance and the prognostic values of u-PA system in cancer invasion and metastasis. u-PA and u-PAR expression in 94 breast cancers was investigated immunohistochemically using monoclonal antibodies against u-PA and u-PAR with LSAB method. u-PA expression was mainly observed on cancer cells, and u-PAR expressions was both on cancer cells and stromal cells. Patients with high u-PA expression in cancer cells had high relapse rates compared to patients with low u-PA expression by the Kaplan-Meier method ( $p < 0.001$ ). Patients with high u-PAR expression in cancer cells or stromal cells had high relapse rates compared to patients with low u-PAR expression ( $p = 0.013$  and  $0.014$ , respectively). This study has shown that pericellular proteolysis induced by the activation of u-PA system accelerates breast cancer invasion and metastasis.

Key word : u-PA, u-PAR, breast cancer, invasion and metastasis,  
prognostic factor, immunohistochemistry

## 緒言

近年、癌の浸潤・転移にプロテアーゼが深く関与することが乳癌<sup>1,2)</sup>、大腸癌<sup>3,4)</sup>、胃癌<sup>5,6)</sup>などで報告されている。その中でも中心的役割を演じるのが、セリンプロテアーゼの一つである urokinase type plasminogen activator (u-PA) である。u-PA

の大部分は、癌細胞や周囲の間質細胞などから一本鎖の不活性型 u-PA として分泌され、癌細胞や間質細胞の細胞表面に存在する u-PA 特異的受容体 (u-PAR) と結合することにより二本鎖の活性型 u-PA へと変換される。この活性型 u-PA が、plasminogen を分解し plasmin へ変換し、変換さ

れた plasmin が prometallo-protease を分解し、活性型の metalloprotease に変換する。また活性型 u-PA は、直接 metalloprotease をも活性化する。最終的には、これら活性化された metallo-protease が、extracellular matrix を分解して癌の浸潤・転移を促進すると考えられている<sup>2,7,8)</sup>。従って、癌の浸潤・転移にとって u-PA システムの活性化は主要なメカニズムの一つであると推察できる。実際、乳癌組織中の u-PA や u-PAR の抗原量を測定し、高値群は低値群に比べ有意に予後不良であったとする報告がなされている<sup>9,12)</sup>。しかし、免疫組織学的に u-PA システムの役割や予後との関係について検討した報告はない。

今回私達は、乳癌組織中の u-PA、u-PAR の局在を免疫組織学的に明かにし、乳癌の浸潤・転移において u-PA システムがいかに関与するか、また u-PA と u-PAR の発現が乳癌において新規の予後因子となり得るかについて検討した。

#### 患者と方法

対象は、1988年1月～1989年12月の間に当科において乳癌根治術を受け、病理組織検査にて浸潤性乳癌と診断された94人。平均年齢は47.5歳(27～73歳)で、閉経前が69人、閉経後が25人であった。観察中央値は56.9カ月。

染色方法は、パラフィン包埋標本を使用し、labeled streptavidin-biotin method(LSAB法)にて行った。まず4μmの切片を作製し、脱パラフィンの後、マイクロウェーブ処理を行った<sup>13)</sup>。以後の染色は、市販の LSAB 染色キット (Dako Corporation, code no. K681) の手順に従った。一次抗体の反応は、抗ヒト u-PA モノクローナル抗体と、抗ヒト u-PAR モノクローナル抗体 (American Diagnostic Inc., #3689および#3936) を用いて、4℃で16～18時間反応させた。

評価方法は、スライドの任意の4点をモニター上に映し、各視野で約250個の癌細胞をカウントし、その内の陽性の細胞の割合を計算した。u-PA

では、陽性率に染色強度を加味し Staining Intensity Index (SII=無染色率×0+弱陽性率×1+中等度陽性率×2+強度陽性率×3) を算出した。SII < 1.27 の例を低発現群、SII ≥ 1.27 の例を高発現群とした。u-PAR は、癌細胞と間質細胞の両方での発現について評価した。癌細胞では、陽性細胞の割合を計算し10%未満を低発現群、10%以上を高発現群とした。間質細胞では、染色強度から陰性、弱陽性、強陽性の3群に分類した。u-PA と u-PAR のカットオフ値は、それぞれ予後に最も影響を及ぼす値を選んだ。読影に際し、検者には患者背景が分からないように、検体はナンバーリングした。

臨床病理学的因子としては閉経、腋窩リンパ節転移、腫瘍径、estrogen receptor (ER)、progesterone receptor (PgR)、術後補助療法を検討した。ER、PgRは、dextran-coated charcoal法で測定し、カットオフ値はそれぞれ5.0、10.0 f.mol/mg protein であった。

統計学的解析には、ABACUS社のコンピュータソフト (Stat View および Survival Tools) を使用し、u-PA 及び u-PAR の発現と臨床病理学的因子との関係についてはχ<sup>2</sup> test、Mann-Whitney の U 検定で、術後健存率は Kaplan-Meier 法で、単変量と多変量解析は Cox 比例ハザードモデルで行った。有意差検定には、logrank test を用いた。

#### 結果

u-PA は、おもに癌細胞の細胞質に (Fig. 1)、u-PAR は癌細胞と周囲のマクロファージや線維芽細胞などの間質細胞に発現が認められた (Fig. 2)。癌細胞において、u-PA は23%、u-PAR では38%の症例が高発現群であった。間質細胞における u-PAR の発現は、弱陽性、強陽性を合わせると67%で、癌細胞に比べより高率に発現が認められた。各因子の局在に関して、u-PA は癌細胞の細胞質に、u-PAR では癌細胞の細胞質に加え細胞膜

にも認められた。また、u-PAR の間質細胞における発現は、癌の先進部により強く認められた。

u-PA、u-PAR の発現と臨床病理学的因子との関係を Table 1 に示す。u-PA、u-PAR とともに閉経の有無、リンパ節転移の有無、ER、PgR の有無、腫瘍径、術後補助療法とは有意の関係は認めなかったが、再発の有無とのみ有意の相関関係を認めた。観察期間中に再発をきたしたのは、21/94 例

(22.3%) であった。Kaplan-Meier 法による術後健存率の検討では、u-PA の高発現群は低発現群に比べ有意に予後不良であった (p < 0.001)。u-PAR は、癌細胞において高発現例は、低発現例に比べ有意に予後不良であり (p = 0.013)、間質細胞における発現でも強陽性例は、陰性・弱陽性例に比べ有意に予後不良であった (p = 0.014) (Fig. 3)。さらに u-PA と u-PAR の癌細胞での発現を合わせて検討

Table 1 Correlation of u-PA and u-PAR with the clinicopathological features in 94 invasive breast cancer patients

No. of cases	u-PA			u-PAR				
	cancer cells		p value*	cancer cells		stromal cells		
	low	high		low <sup>1)</sup>	high <sup>2)</sup>	p value*		
	72	22		58	36	82	12	
<b>Menopausal status</b>								
pre	53	16	NS	42	27	62	7	NS
post	19	6		16	9	20	5	
<b>Lymph node involvement</b>								
negative	45	9	NS	34	20	47	7	NS
positive	27	13		24	16	35	5	
<b>ER<sup>3)</sup></b>								
negative	24	7		19	12	27	4	
positive	26	12	NS	31	17	40	8	NS
unknown	12	3		8	7	15	0	
<b>PgR<sup>4)</sup></b>								
negative	25	8		22	11	26	7	
positive	25	11	NS	28	18	41	5	NS
unknown	12	3		8	7	15	0	
<b>Tumor size (cm)</b>								
≤2.0	19	3		13	9	19	3	
2.0 < - ≤5.0	45	17	NS	38	24	53	9	NS
>5.0	8	2		7	3	10	0	
<b>Adjuvant therapy</b>								
none	11	2		6	7	10	3	
tamoxifen (TAM)	10	1	NS	7	4	10	1	NS
chemotherapy	16	6		12	10	19	3	
TAM+chemotherapy	35	13		33	15	43	5	
<b>Recurrence</b>								
yes	5	16	p < 0.001	8	13	15	6	p = 0.014
no	67	6		50	23	67	6	

1) a low group was consisted of a negative and a weak expression groups

2) a high group was consisted of a strong expression group

Cutoff points = 3) 5.0 f.mol/mg protein. 4) 10.0 f.mol/mg protein

\* : p values were calculated with the χ<sup>2</sup> test or the Mann-Whitney U test. NS = p > 0.05

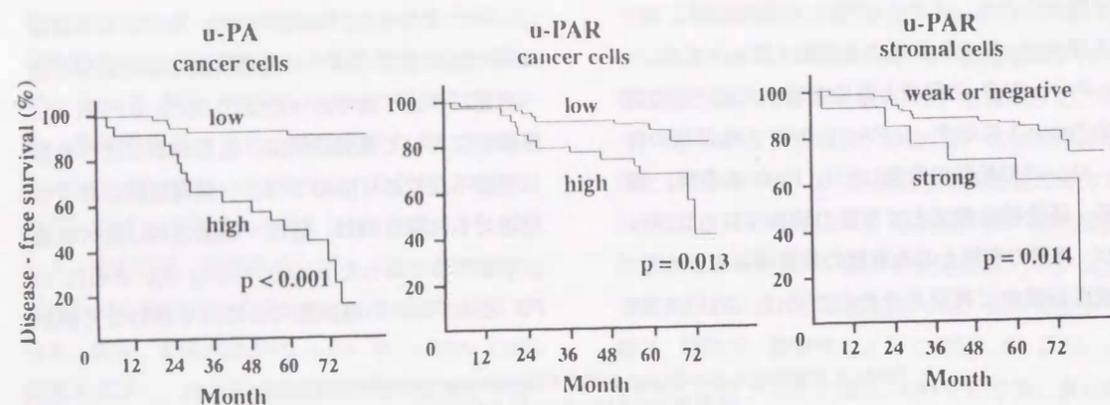


Fig. 3 Disease-free survival (DFS) as a function of u-PA and u-PAR expression in cancer cells and stromal cells in 94 invasive breast cancer patients when tested by the Kaplan-Meier method. Patients with the high u-PA expression in cancer cells had a significantly lower rate of DFS (16 / 72 events) than patients with the low expression (5 / 72 events) (left). Patients with the high u-PAR expression in cancer cells had a significantly lower rate of DFS (13 / 36 events) than patients with the low expression (8 / 58 events) (middle). Patients with the strong u-PAR expression in stromal cells had a significantly lower rate of DFS (6 / 12 events) than patients with the low (negative and weak) expression (15 / 82 events) (right).

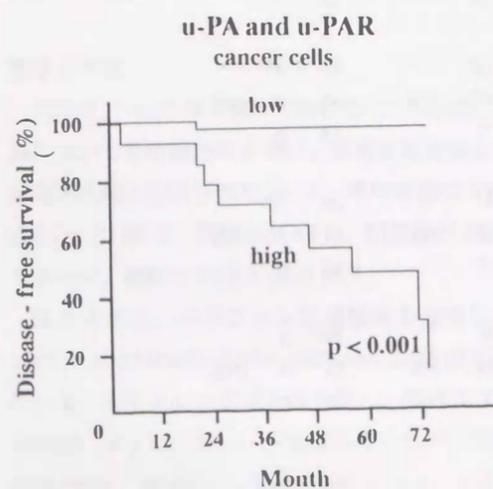


Fig. 4 Evaluating the combination of the u-PA and u-PAR expression in cancer cells, the difference of DFS between patients with the high u-PA and u-PAR expression (9 / 12 events) and patients with the low expression (1 / 48 events) became larger ( $p < 0.001$ ).

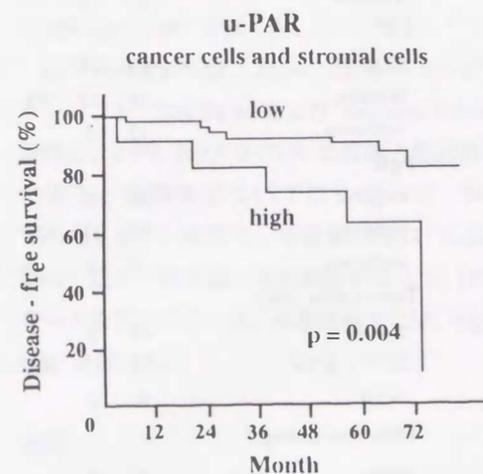


Fig. 5 Evaluating the combination of the u-PAR expression in cancer cells and stromal cells, the difference of DFS between patients with the high expression (both high in cancer cells and strong in stromal cells) (5 / 10 events) and patients with the low expression (both low in cancer cells and weak or negative in stromal cells) (7 / 56 events) became larger ( $p = 0.004$ ). The differences were assessed with the logrank test.

Table 2 The univariate and multivariate regression analysis of the disease-free survival in 94 invasive breast cancer patients

	univariate		multivariate	
	p value	relative risk (95% CI*)	p value	relative risk (95% CI*)
<b>u-PA expression</b>				
cancer cells (high vs low)	<0.001	13.30 (4.85 - 36.47)	<0.001	10.27 (3.65 - 28.90)
<b>u-PAR expression</b>				
cancer cells (high vs low)	0.018	2.90 (1.20 - 7.02)	0.047	2.88 (1.02 - 8.17)
stromal cells (high vs low)	0.020	3.10 (1.20 - 8.00)	0.003	3.19 (1.70 - 14.47)
<b>Hormone receptor</b>				
ER (negative vs positive)	0.434	0.63 (0.20 - 1.99)	0.437	0.632 (0.20 - 2.01)
PgR (negative vs positive)	0.324	0.56 (0.18 - 1.77)	-	-
<b>Lymph node involvement</b>				
(positive vs negative)	0.007	3.73 (1.45 - 9.64)	0.005	5.60 (2.16 - 14.48)
<b>Tumor size</b>				
T2 vs T1	0.741	0.84 (0.30 - 2.38)	0.571	0.74 (0.26 - 2.12)
T3 vs T1	0.096	3.06 (0.82 - 11.44)	0.014	5.00 (1.38 - 18.06)

a; 95% Confidence Interval

すると、両者がともに高発現の症例は12例中9例が再発したのに対し、両者が低発現であった症例では48例中1例にしか再発を認めなかった(Fig. 4)。同様に、u-PARの癌細胞と間質細胞における発現を合わせて検討すると、癌細胞高発現かつ間質強陽性例は10例中5例に再発を認めたのに対し、癌細胞低発現かつ間質陰性・弱陽性例は56例中7例にのみ再発を認めた(Fig. 5)。臨床病理学的因子では、腋窩リンパ節転移を有する症例が、転移の無い症例に比べ有意に予後不良であった( $p = 0.004$ )。しかし、閉経の有無、ER、PgRの有無、腫瘍径、術後補助療法の種類などでは、術後健存率に有意差を認めなかった。

比例ハザードモデルを用いた単変量解析では、リンパ節転移の有無、u-PA、u-PARでの癌細胞および間質細胞における発現が有意のp値を示し、再発に影響を与えた(Table 2)。多変量解析においても、リンパ節転移の有無、u-PA、u-PARの癌細胞と間質細胞における発現の4因子が有意のp値を示し、これらが独立した予後因子であることが判明した(Table 2)。

#### 考察

癌の浸潤・転移には、1) 原発巣からの離脱と浸潤、2) 脈管系への侵入、3) 脈管からの浸出、4) 転移臓器への生着と増殖の過程が考えられるが、各過程において基底膜や細胞外マトリックスの分解が必要である<sup>14)</sup>。そのためには、u-PAによって線溶系が活性化されなければならない。事実、現在までに癌組織中のu-PAの抗原量が高値な症例ほど予後が悪いとする報告が、乳癌を始めとして様々な癌組織でなされている。しかし、u-PAがその機能を発現するためには、u-PARとの結合によって起こるu-PAシステムの活性化が必要不可欠と考えられている<sup>15-18)</sup>。u-PAは実際の組織中では、u-PARやu-PAの特異的インヒビターであるplasminogen activator inhibitor type 1 (PAI-1)と複合体を形成している。これらu-PA/u-PAR、u-PA/u-PAR/PAI-1などの複合体の方が、よりu-PAシステムの活性を反映し、総u-PAやu-PARのレベルよりも、より強く予後と相関すると考えられている<sup>19)</sup>。今回の検討に用いた抗u-PA、抗u-PARモノクローナル抗体は、それぞれfree u-PA、u-PA/u-PAR(一本鎖及び二本鎖)と、free u-PAR、u-PA/u-PAR、u-PA/u-PAR/PAI-1を認識する。従って、この免疫組織学的検討において、u-PAや

u-PAR の高発現例が低発現例に比べ有意に予後不良であったことは、癌の浸潤・転移に u-PA システムが強く関与していることを支持するものである。u-PA はおもに癌細胞に、u-PAR は癌細胞と周囲の間質細胞に局在していたことは、u-PA/u-PAR 結合による u-PA システムの活性化が、癌組織周辺の限局された範囲で起こっていることを証明している。特に、癌の先進部において、間質細胞に u-PAR の強い発現が認められたことは、pericellular proteolysis により効率よく癌の浸潤が生じていることを示している<sup>11, 19, 20)</sup>。さらにこの現象は、最近指摘されているように、癌の浸潤・転移にとって癌細胞と間質細胞の相互干渉が非常に重要であることをも示唆している<sup>21, 23)</sup>。

また今回の結果より、u-PA、u-PAR の免疫組織学的な発現の程度は、各因子単独の検討でも、乳癌の有用な独立した予後因子であることが判明した。また u-PA と u-PAR (いずれも癌細胞)、u-PAR の癌細胞と間質細胞での発現の二者を組み合わせて予後を検討するとさらに強力な予後因子となり得ることが示された。既存の因子では、乳癌において現在最も“有用かつ信頼されている予後因子”である腋窩リンパ節転移が、本検討においても術後生存率、単変量および多変量解析で有用な独立した予後因子であることが証明された。しかし u-PA は、そのインパクトにおいてリンパ節転移にも優っていた。本方法は、癌組織中の抗原量の測定と比較して、微量なサンプルで、さらに retrospective にも検討できるため広く臨床応用できると考える。今後は、prospective な検討で、リンパ節無転移群や有転移群などの亜分類において、u-PA や u-PAR の発現により予後不良群をふるい分け、同群に対して適切な術後補助療法を行うことにより、乳癌の予後を改善できると考えている。

#### 結語

乳癌の浸潤・転移において、u-PA と u-PAR の

結合による u-PA システムの活性化が重要な役割を演じており、u-PA と u-PAR の免疫組織学的な発現の程度は、乳癌の新規の有用な予後因子となり得る。

#### 謝辞

本稿を終えるにあたり、御校閲、御教授を賜りました高井新一郎教授、直接研究の御指導を賜りました芝 英一助教授に深甚なる謝意を表します。また、貴重な御助言と多大なる御協力をいただきました田口哲也助手、後藤多美子女史に厚く感謝いたします。さらに、本研究に御協力頂きました当教室の皆様にご心からお礼を申し上げます。

#### 文献

- Duffy MJ. The role of proteolytic enzymes in cancer invasion and metastasis. *Clin. Exp. Metastasis* 10: 145-155, 1992.
- Schmitt M, Janicke F, and Graeff H. Tumor-associated fibrinolysis: the prognostic relevance of plasminogen activators uPA and tPA in human breast cancer. *Blood Coagul and Fibrinol* 1: 695-702, 1990.
- Sier CFM, Verspaget HW, Griffioen G, Verheijen JH, Quax PHA, Dooijewaard G, De Bruin PAF, and Lamers CBHW. Imbalance of plasminogen activators and their inhibitors in human colorectal neoplasia. Implication of urokinase in colorectal carcinogenesis. *Gastroenterology* 101: 1522-1528, 1991.
- Ganesh S, Sier CFM, Griffioen G, Vloedgraven HJM, Boer A, Welvaart K, van de Velde CJH, van Krieken JHJM, Verheijen JH, Lamers CBHW, and Verspaget HW. Prognostic relevance of plasminogen activators and their inhibitors in colorectal cancer. *Cancer Res* 54: 4065-4071, 1994.
- Nekarda H, Schmitt M, Ulm K, Wenninger A, Vogelsang H, Becker K, Roder JD, Fink U, and Siewert JR. Prognostic impact of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in completely resected gastric cancer. *Cancer Res* 54: 2900-2907, 1994.
- Ganesh S, Sier CFM, Heerding MM, van Krieken JHJM, Griffioen Gerrit, Welvaart K, van de Velde CJH, Verheijen JH, Lamers CBHW, and Verspaget HW. Prognostic value of the plasminogen activators system in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 77: 1035-1043, 1996.
- Moller LB. Structure and function of the urokinase receptor. *Blood Coagul Fibrinol* 4: 293-303, 1993.
- Duffy MJ. Urokinase-type plasminogen activator and malignancy. *Fibrinolysis* 7: 295-302, 1993.
- Foekens JA, Schmitt M, van Putten WLJ, Peters HA, Bontenbal M, Janicke F, Klijn JGM. Prognostic value of urokinase-type plasminogen activator in 671 primary breast cancer patients. *Cancer Res* 52: 6101-6105, 1992.
- Grondahl-Hansen J, Christensen IJ, Rosenquist C, Brunner N, Mouridsen HT, Dano K, and Blichert-Toft M. High levels of urokinase-type plasminogen activator and its inhibitor PAI-1 in cytosolic extracts of breast carcinomas are associated with poor prognosis. *Cancer Res* 53: 2513-2521, 1993.
- Dano K, Behrendt N, Brunner N, Ellis V, and Pyke C. The urokinase receptor. Protein structure and role in plasminogen activator and cancer invasion. *Fibrinolysis* 8: 189-203, 1994.
- 金 昇晋, 芝 英一, 小林哲郎, 弥生恵司, 古川順康, 高塚雄一, 辛 栄成, 小山博記, 稻治英生, 田口哲也, 高井新一郎. n 0 乳癌における新規の予後因子: 乳癌組織中の u-PA および PAI-1 の生化学的検討. *日本癌治療学会誌* (in press).
- Shi SR, Key ME, and Kalra KL. Antigen retrieval in formalin-fixed, paraffin-embedded tissues: An enhancement method for immuno-histochemical staining based on microwave oven heating of tissue sections. *J Histochem Cytochem* 39: 741-748, 1991.
- Liotta LA, Rao N, and Wewer UM. Biochemical interactions of tumor cells with the basement membrane. *Ann Rev Biochem* 55: 1037-1057, 1986.
- Costantini V, Sidoni A, Deveglio R, Cazzato OA, Bellezza G, Ferri I, Buccionelli E, and Nenci GG. Combined overexpression of urokinase, urokinase receptor, and plasminogen activator inhibitor-1 is associated with breast cancer progression. *Cancer* 77: 1079-1088, 1996.
- 金 昇晋, 芝 英一, 田口哲也, 井上共生, 丹治芳郎, 木本安彦, 伊豆蔵正明, 高井新一郎. 乳癌浸潤の新しい分子マーカー: u-PA 受容体の免疫組織学的検討. *乳癌の臨床* 10: 660-661, 1995.
- Pyke C, Ralfkiaer E, Ronne E, Hoyer-Hansen G, Kirkeby L, and Dano K. Immunohistochemical detection of the receptor for urokinase plasminogen activator in human colon cancer. *Histopathology* 24: 131-138, 1994.

18. Heiss MM, Babic R, Allgayer H, Gruetzner KU, Jauch K-W, Loehrs U, and Schildberg FW. Tumor-associated proteolysis and prognosis: New functional risk factors in gastric cancer defined by the urokinase-type plasminogen activator system. *J Clin Oncol* 13: 2084-2093, 1995.
19. 深尾 偉晴. プラスミノゲンアクチベーターのレセプター. *臨床病理* 96: 122-129, 1993
20. 松尾 理. プラスミノゲンアクチベーター. *医学のあゆみ* 160: 639-643, 1992
21. Pepper MS, and Montesano R. Proteolytic balance and capillary morphogenesis. *Cell Diff Develop* 32: 319-328, 1990.
22. Ethier S P. Growth factor synthesis and human breast cancer progression. *J Natl Cancer* 87: 964-973, 1995.
23. Friedlander M, Brooks PC, Shaffer RW, Kincaid CM, Varnier JA, and Cheresch DA. Definition of two angiogenic pathways by distinct  $\alpha v$  integrins. *Science* 270: 1500-1502, 1995.

#### 和文抄録

乳癌組織中の u-PA と u-PAR の免疫組織学的にその発現を調べ、乳癌の浸潤・転移における u-PA システムの意義と、予後因子としての有用性について検討した。対象は、浸潤性乳癌患者 94 例。染色方法は、パラフィン切片を抗 u-PA、抗 u-PAR モノクローナル抗体を用いて LSAB 法で行った。u-PA はおもに癌細胞に、u-PAR は癌細胞と間質細胞にそれらの発現が認められた。間質細胞では、癌の先進部で u-PAR の発現が強く認められた。Kaplan-Meier 法による術後生存率の検討では、u-PA、u-PAR の癌細胞と間質細胞において高発現例あるいは強陽性例は、低発現例や弱陽性・陰性例に比べ有意に予後不良であった。u-PA システムが

強く発現している症例では、pericellular proteolysis の作用により癌の浸潤・転移が促進されていると考えられた。

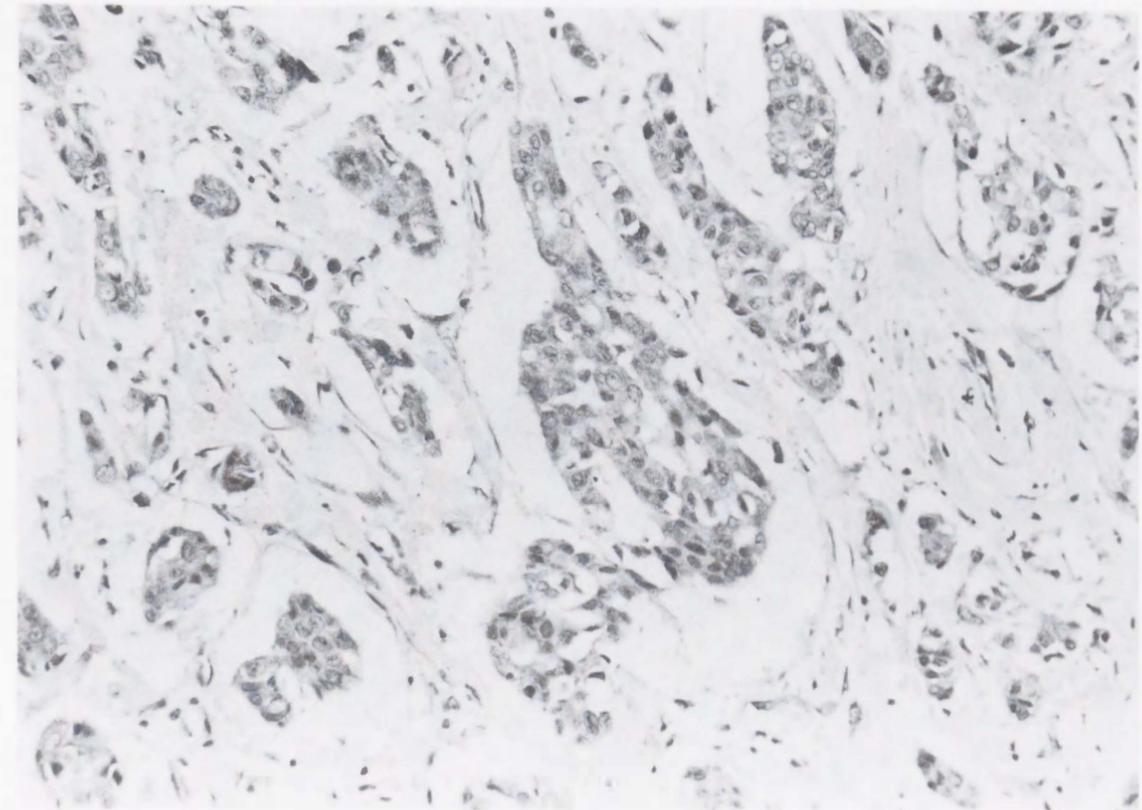


Fig. 1 Immunohistochemical expression of u-PA in invasive breast cancer. Staining of u-PA in cancer cells was strong in the cytoplasm and cell-surface (original magnification:  $\times 50$ ).

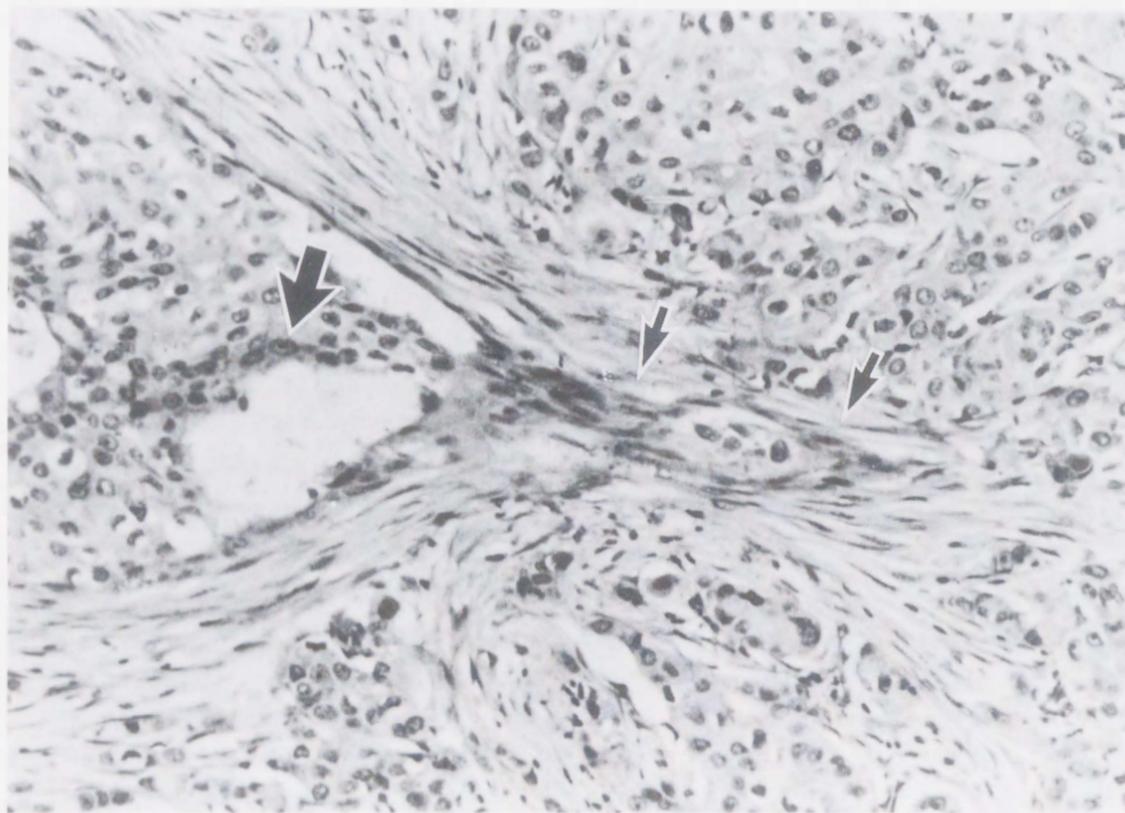


Fig. 2 Staining of u-PAR in stromal cells around the invasive foci was observed strongly ( $\blacktriangleleft$ ), and that in the cytoplasm of cancer cells was weakly stained ( $\triangleleft$ ) (original magnification:  $\times 80$ ).

