

例、3: 5例、リンパ節転移 (pN) 0: 15例、1: 7例、2: 8例、3: 5例であった。組織型の内訳は、乳頭腺癌 (pap): 3例、管状腺癌 (tub): 20例、低分化腺癌 (por): 7例、印環細胞癌: 3例、粘液癌 (muc): 2例であった。Scirrhou carcinoma は本研究の対象から除外した。また、病理組織学的記載は胃癌取り扱い規約第13版¹⁴⁾に従った。また、本研究は東京医科大学の倫理規定に則って行われた。

2. フローサイトメトリー法

胃切除後直ちに腫瘍部および非腫瘍部より検体を採取、保存 (4°C FBS 加 PBS 液) の後、24時間以内に細切後、単離細胞を採取、PBS 液にて洗浄し、細胞数を 1×10^7 個/ml に調整した。Lysing Solution, Permeabilizing Solution を添加後、1次抗体として抗 TdRPase 抗体 (日本ロッシュ) を用い、反応後2次抗体 (BECTON DICKINSON 社 FITC 標識 propidium iodide (以下 P.I. と略) を添加し、フローサイトメトリー (BECTON DICKINSON 社 FACScan) により、PyNPase の発現率および発現量を測定した。腫瘍組織には腫瘍細胞の他に非腫瘍細胞のコンタミネーションが考慮されるため、Fig. 1 のごとく縦軸

(P.I. の反応) の 200 チャンネルに diploidy 細胞を設定し、それ以上 (aneuploidy 領域) に存在する細胞を腫瘍細胞として DNA 量より両者を分類し腫瘍細胞内の PyNPase を測定した。一方、非腫瘍組織からは、縦軸の 200 チャンネルに限定された 2n 期細胞 (diploidy 細胞) を対象とし PyNPase を測定した (Fig. 1)。

3. 検討項目

- 1) 腫瘍細胞と非腫瘍細胞における PyNPase 発現率の比較
- 2) 腫瘍細胞と非腫瘍細胞における PyNPase 発現量の比較
- 3) 腫瘍細胞における PyNPase 発現量と組織学的因子 (pT, ly, v, pN) との関連性
- 4) 腫瘍細胞における PyNPase 発現量の予後に及ぼす影響

4. 統計学的解析方法

腫瘍細胞と非腫瘍細胞における PyNPase の発現率および発現量の比較には、対応のある t 検定を用いた。腫瘍細胞における PyNPase の発現量と組織学的因子との関連を評価するために相関係数 (r) を求め、相関

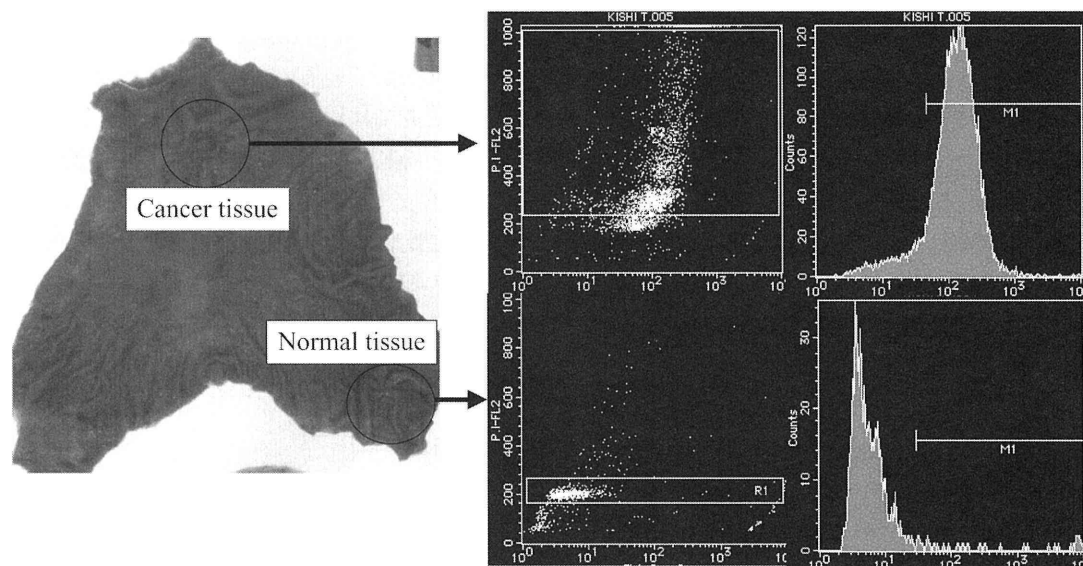


Fig. 1 Expression of PyNPase as measured by flow cytometric DNA analysis and by immunofluorescence
Specimens were obtained from tumor and non-tumor tissues immediately after gastrectomy, as shown on the left side of Fig. 1. They were placed in PBS with FBS and stored at 4°C. Within 24 hours, the samples were cut into strips, and the cells suspended in PBS with FBS added before being washed with PBS. FACScan flow cytometry was performed using a monoclonal antibody, anti-dThdPase (Rosche Japan) as the primary antibody followed by the addition of FITC-labeled secondary antibody and propidium iodide (PI). The frequency and quantity of PyNPase expression in 10,000 to 30,000 cells were determined. Considering the possible contamination of cancer cells with non-cancer cells in a grossly appearing malignant lesion, the channel number for diploid cells was set to 200 as shown on the longitudinal axis (reaction with PI) in the center of Fig. 1. Only cells with a channel number greater than 200 were regarded as the cancer cell fraction (aneuploid cells). Thus cancer cells were separated from non-cancer cells according to the amount of DNA. Only diploid cells (2n phase cells) with a channel number of under 200 were regarded as normal cells in grossly normal gastric tissue. The result of each measurement were summarized in histograms as shown on the right side of Fig. 1.

係数が0であるとする帰無仮説に対する検定を行った。また、PyNPase 発現量を組織学的進行度別に群間比較をするために一元配置分散分析 (one-way layout ANOVA) を利用し、各群間の比較は Student-Newman-Keul (SNK) 検定により行った。生存率の算出は Kaplan-Meier 法を適用し、PyNPase 値の予後に及ぼす影響を Log-rank 検定および一般化 Wilcoxon 検定を用いて評価した。また、術後生存期間は、手術日を観察期間の起点とし overall survival の期間とし

た。なお、いずれの検定も両側検定とし、有意水準は便宜的に 0.05 に設定した。

結 果

1. 腫瘍細胞と非腫瘍細胞における PyNPase 発現率 (平均値±標準偏差) の比較 (Fig. 2)

腫瘍細胞における PyNPase 平均発現率 $83.5 \pm 1.3\%$ と、非腫瘍細胞の平均発現率 $82.3 \pm 2.1\%$ の間に有意差を認めなかった。

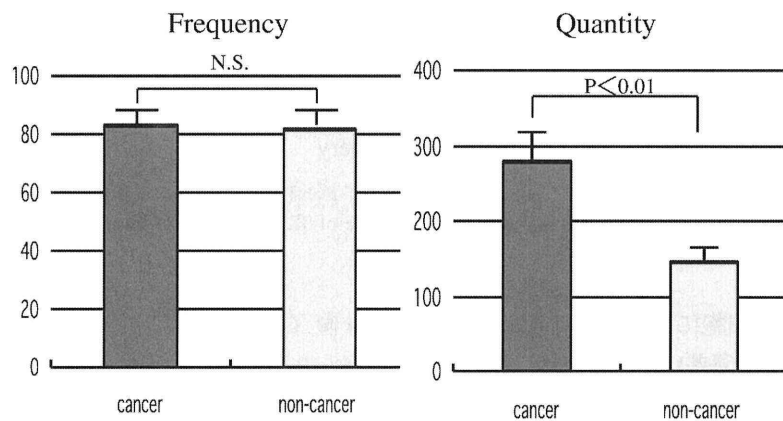


Fig. 2 Comparison of expression of PyNPase in gastric cancer cells and non-cancer cells. No significant difference in the frequency of PyNPase was seen in gastric cancer cells and non-cancer cells. The quantity of PyNPase in gastric cancer cells was significantly higher than in non-cancer cells ($p < 0.01$).

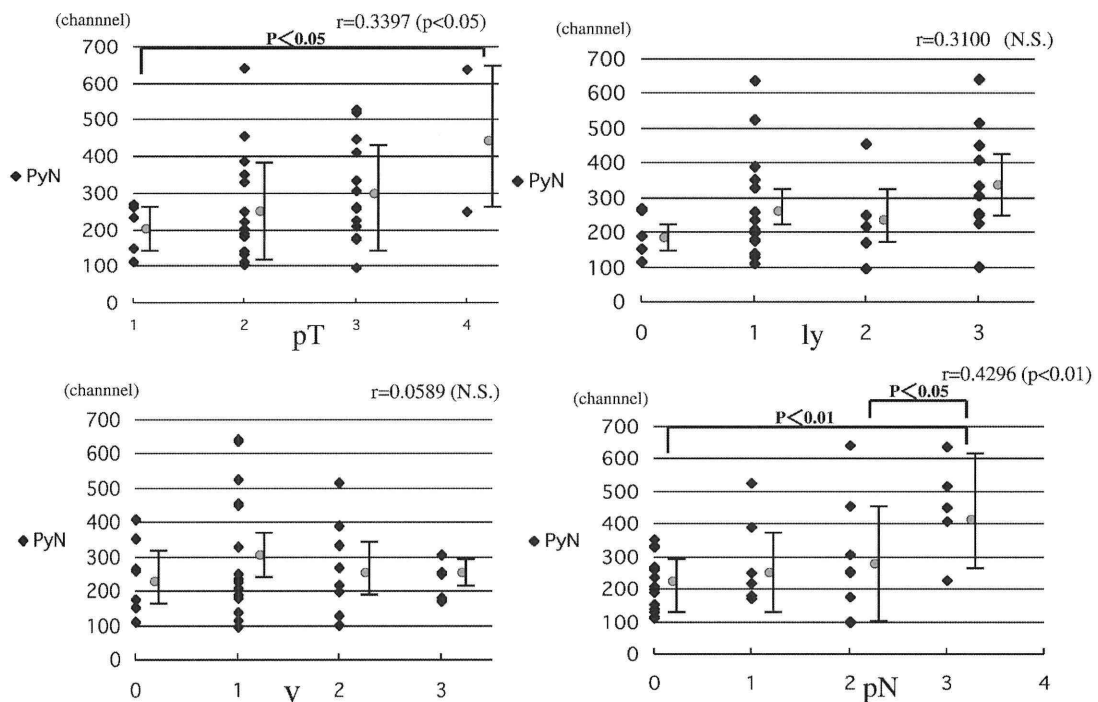


Fig. 3 Correlation between the quantity of PyNPase in gastric cancer cells and histopathological factors. Significant relationships were seen between the quantity of PyNPase in gastric cancer cells and pT ($p < 0.05$) and pN ($p < 0.01$). The quantity of PyNPase in pT3 cases was significantly higher than in pT0 ($p < 0.05$). The quantity of PyNPase in pN3 cases was significantly higher than those in pN0* and pN2 ($p < 0.01$ *, $p < 0.05$). No significant relationship was seen between the quantity of PyNPase in gastric cancer cells and v and ly.

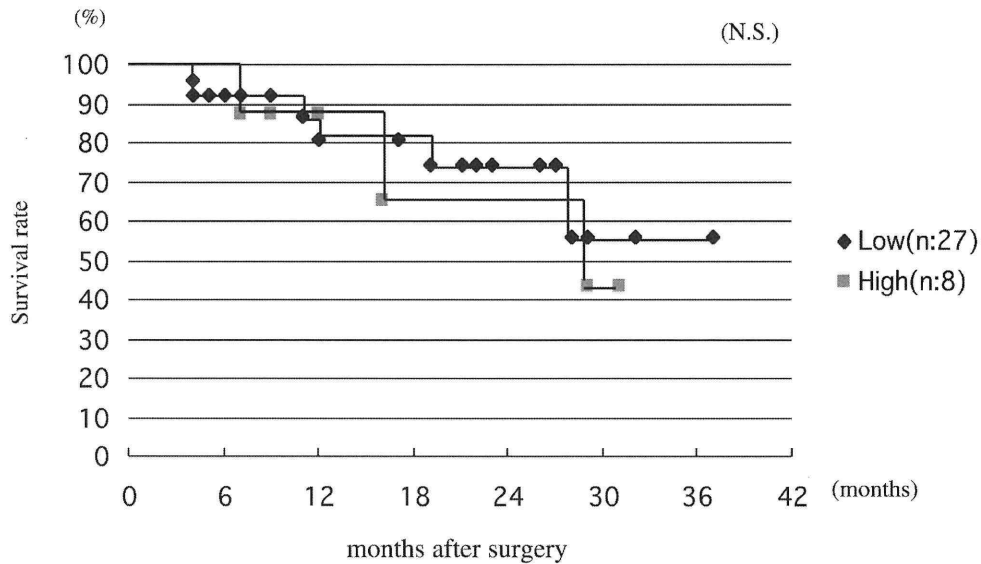


Fig. 4 Cumulative survival curves in patients high or low values of PyNPase (Kaplan-Meier method)
When the cutoff value of PyNPase was set at a channel value of 383.3, no significant difference was seen in survival rate in patients above or below this value.

2. 腫瘍細胞と非腫瘍細胞における PyNPase の発現量 (平均値±標準偏差) の比較 (Fig. 2)

腫瘍細胞における PyNPase 平均発現量 279.4 ± 24.7 チャンネルは、非腫瘍細胞の平均発現量 147.3 ± 14.0 チャンネルと比較して有意 ($p < 0.01$) に高値であった。

また、組織型別の腫瘍細胞における PyNPase 発現量を比較したが、pap: 288.1 ± 33.4 チャンネル、tub: 280.0 ± 25.4 チャンネル、sig: 274.5 ± 48.3 チャンネル、muc: 277.3 ± 29.3 チャンネルと有意差を認めなかった。

3. 腫瘍細胞における PyNPase 発現量と組織学的因子 (pT, ly, v, pN) との関連性 (Fig. 3)

腫瘍細胞における PyNPase 発現量と pT との間に有意な正の相関 ($r = 0.3397, p = 0.0459$) を認め、pT3 (5例) の平均値 (445.96 ± 274.73) は pT0 (15例) の平均値 (206.95 ± 70.87) と比較して有意 ($p < 0.05$) に高値であった。また、pN との間に有意な正の相関 ($r = 0.4296, p = 0.0039$) を認め、pN3 (5例) の平均値 (450.04 ± 151.74) は pN0 (15例) の平均値 ($220.37 \pm 81.48^*$) および pN2 (8例) の平均値 (287.06 ± 184.40) と比較して有意 ($*p < 0.01, p < 0.05$) に高値であった。また、PyNPase 発現量と v ($r = 0.0589, p = 0.7366$) および ly ($r = 0.3100, p = 0.0699$) との間に有意な相関はみられなかった。しかし、v (+) (28例) の平均値 (287.45 ± 155.20) は v (0) (7例) の平均値 (247.37 ± 108.63) に比べ高い傾向を示し、ly (+) (30例) の平

均値 (292.99 ± 152.31) は ly (0) (5例) の平均値 (198.10 ± 68.48) と比較して有意 ($p < 0.05$) に高値であった。

4. 腫瘍細胞における PyNPase 発現量の予後に及ぼす影響 (Fig. 4)

リンパ節転移の無い症例 (pN0 15例) の平均値よりカットオフ値を 383.33 チャンネル (pN0 の平均値 + $2 \times$ 標準偏差) に設定し、カットオフ値より低い患者集合 (低値群) 27例と、高い患者集合 (高値群) 8例の両群間で予後におよぼす影響を評価した (観察期間: 160日~1120日、平均観察期間: 492.4 ± 308.4 日) が、二群間の累積生存率に有意差は認められなかった。

考 察

PyNPase は pyrimidine 系の nucleoside を加リン酸分解する酵素の総称で、TdRPase および uridine phosphorylase の 2 種類からなり、前者はヒト後者はマウスに多い。5'-DFUR はその構造が thymidine や uridine に類似しているために、両方の酵素により 5-FU に変換される²³⁾。Haraguchi ら¹⁵⁾ は、精製した TdRPase を含むゼラチンスポンジをマウスの皮下に移植し、14日後にスポンジを摘出しこのなかの Hb 含量を定量的に測定し、TdRPase に血管新生活性のあることを確認した。また、TdRPase の推定基質結合部位のアミノ酸を 1 個置換した酵素活性のない変異 TdRPase3 種類には、すべて血管新生活性がみられないとした。さらに、

TdRPaseの活性阻害剤が血管新生を阻害する¹⁶⁾ことから、TdRPaseの酵素活性が血管新生に必須であるといえる。PyNPaseはアミノ酸配列においてPD-ECGFと同一蛋白であると報告⁴⁾され、Sumizawaら⁵⁾はPD-ECGFのcDNAをCOS細胞にtransfectしたところ高いPyNPase活性が出現し、この活性はPD-ECGFに対する抗体で免疫沈降させ得たと報告している。PyNPaseの遺伝子を導入したDLDI細胞ではPyNPase活性および5'-DFUR感受性が上昇し、DLDI細胞の*in vitro*の増殖速度はvectorおよび遺伝子導入細胞間で差は認められなかったが、マウス移植腫瘍の増殖は遺伝子導入腫瘍細胞で上昇し、さらに遺伝子導入腫瘍では腫瘍壊死が少なく、腫瘍血管数に有意の増加が認められたとしている¹⁷⁾。また、PyNPaseによってthymidineはthymineと2-deoxyribose-1-リン酸に分解されるが、thymidine分解による組織内のthymidine濃度低下が血管内皮細胞の増殖を促進するとの報告もある¹⁸⁾。これらの成績はPD-ECGF/PyNPaseが血管新生を介して腫瘍細胞に対して促進的に働くことを示唆し、PyNPase発現と癌の悪性度と関連性について従来の報告を支持するものである^{8)~12)}。さらに、腫瘍組織内のPyNPaseはtumor necrosis factor (TNF- α), interleukin-1 α (IL-1 α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-6 (IL-6)などのサイトカインによって誘導されるとの報告¹⁹⁾²⁰⁾がある。また、これらサイトカインは進行した癌組織に多く検出され癌細胞の転移に対し促進的に関与する²¹⁾ことより、腫瘍組織内のPyNPase発現と癌の悪性度との関連を間接的に裏付けている。しかし、これまで免疫染色によるPyNPase発現の報告は多数みられるものの、腫瘍細胞内のPyNPase活性値を定量的に測定し、病理組織学的因子との関連性を検討した報告は少ない。また、5'-DFURを基質とした酵素反応を行い生成された5-FU量をhigh performance liquid chromatograph (HPLC)法で定量する方法²²⁾や、ELISA法による報告²³⁾などもみるが、PyNPaseは腫瘍細胞のみならず正常細胞や間質細胞にも発現することから、これらの方法では腫瘍細胞内のPyNPase発現量をどの程度正確に反映しているのか明らかでない。

本研究ではフローサイトメトリー法を利用し、腫瘍細胞および正常細胞におけるPyNPase発現の定量的な差異を明らかにした。通常、腫瘍組織には腫瘍細胞のみならず非腫瘍細胞が混在するため、両者を分類するにあたりフローサイトメトリー法は極めて有用で

あった。同法は2本鎖DNAと定量的に結合するP.I.染色により、DNA量が2nのdiploidy細胞と、それ以上に増加しているaneuploidy領域の腫瘍細胞を分離しうる。一般的に、腫瘍組織内における非腫瘍細胞のコンタミネーションは、DNA量よりdiploidy細胞群に存在すると考えられる。また、aneuploidy領域には腫瘍細胞と増殖期の非腫瘍細胞が含まれるが後者の割合は極めて少なく、aneuploidy領域においてはほとんど腫瘍細胞を反映しているとして差し支えない。一方、正常組織におけるdiploidy細胞群は全て正常細胞(2n期細胞)と考えられることから、フローサイトメトリー法により腫瘍細胞と正常細胞を分類し測定することが可能となった。フローサイトメトリー法により測定した蛍光強度は細胞に反応した抗体の量に比例するため、間接的に細胞内の抗原量(PyNPase量)を反映すると言える。

PyNPaseは、様々な腫瘍組織において正常組織より多く存在することが報告されている²³⁾。本研究のフローサイトメトリー法を用いた検討でも、腫瘍細胞内のPyNPase発現量は正常細胞に比べて有意に高値であった。

PyNPaseと組織学的因子との関連性について、従来抗モノクローナル抗体を用いた免疫組織化学的検索により、PyNPaseと癌の浸潤、転移、予後との関連を示唆する報告が散見される^{8)~12)}。児山ら²²⁾は、胃癌組織におけるPyNPase活性値を測定し、ss以深症例で高値を示し、静脈侵襲、リンパ管侵襲、肝転移陽性例においても陰性例と比較して有意に高値であったと報告している。小川ら²⁴⁾も、静脈侵襲陽性例で腫瘍組織内のPyNPase値が有意に高値であったと報告している。本研究では、胃癌細胞のPyNPase発現量と深達度およびリンパ節転移度間に有意な正の相関を認めた。また、リンパ管侵襲陽性例、静脈侵襲陽性例のPyNPase発現量が陰性例に比べて高い傾向を示し、リンパ管侵襲において有意差を認めた。これらの結果は、腫瘍細胞内のPyNPase発現量が悪性度因子となりうる可能性を示唆するものであり、PyNPaseが血管新生を介して腫瘍細胞の浸潤・転移に促進的に関与すると考えられる⁴⁾⁵⁾。また、腫瘍細胞の発育・進展はIL-1, TNF- α , IL-6などのサイトカインの分泌により促進され、これらがPyNPase発現を誘導する²¹⁾とする報告を支持するものである。

最後に、リンパ節転移の無い症例(pN0 15例)の平均値よりカットオフ値を383.33チャンネル(pN0の

平均値+2×標準偏差)に設定し、それ以上を陽性とした場合のリンパ節転移診断能は、sensitivity 40% (8/20)、positive predictive value 100% (8/8)、negative predictive value 55.6% (15/27)、specificity 100% (15/15)、accuracy 65.7% (23/35)であった。sensitivityは決して十分とはいえないがspecificityが高く、特異度の面からPyNPase発光量の測定は臨床的に有用と考えられる。

また、今回腫瘍細胞におけるPyNPase発現量の予後に及ぼす影響について検討し、PyNPase高値群と低値群との間に有意差は認めなかったが、観察期間も短かったため、今後の検討課題と思われる。

結 論

胃癌細胞のPyNPase発現量は正常細胞と比較して有意に高く、PyNPase発現量とリンパ節転移の間に有意な相関を認め、胃癌の悪性度因子となりうる可能性が示唆された。

本論文の要旨は第12回日本消化器癌発生学会(2001年)において発表した。

文 献

- 1) Friedkin D, Roberts D: The enzymatic synthesis of nucleosides. *J Biol Chem* **207**: 245-256, 1954
- 2) Kono A, Hara Y, Sugata S, Karube Y, Mastushima Y, Ishitsuka H: Activation of 5'-deoxy-5-fluorouridine by thymidine phosphorylase in human tumors. *Chem Pharm Bull* **31**: 175-178, 1983
- 3) Ishitsuka H, Miwa M, Takemoto K, Fukuoka K, Itoga A, Maruyama H: Role of uridine phosphorylase for antitumor activity of 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Gann* **71**: 112-123, 1980
- 4) Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguti M, Akiyama S, Akiyama S: Angiogenic Factor. *Nature* **356**: 668, 1992
- 5) Sumizawa T, Furukawa T, Haraguti M, Yoshimura A, Takayasu A, Ishizawa M, Yamada Y, Akiyama S: Thymidine phosphorylase activity associated with platelet-derived endothelial cell growth factor. *J Biochem* **114**: 9-14, 1993
- 6) 藤本 香, 田村澄江, 松本武久: マウス結腸癌26由来の悪液質誘導株、非誘導株の比較。日癌会51回総会記 **319**, 1992
- 7) 渡辺信一, 江田浩幸, 藤本 香: Ha-ras変異遺伝子導入細胞の5'-DFURに対する増殖抑制効果の増強。日癌会51回総会記 **408**, 1992
- 8) Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S, Hokita S, Yamada K, Akiba S, Yamada Y, Sumizawa T, Aikou T: Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **87**:

288-295, 1996

- 9) 前田 清, 鄭 容錫, 小川佳成, 高塚 聡, 澤田鉄二, 小野田尚佳, 新田敦範, 有本裕一, 曾和融生: Thymidine phosphorylaseの発現からみた胃癌の悪性度。癌と化学療法 **22**: 679-682, 1995
- 10) Takebayashi Y, Akiyama S, Akiba S, Yamada K, Miyadera K, Sumizawa T, Yamada Y, Murata F, Aikou T: Clinicopathologic and prognostic significance of an angiogenic factor, thymidine phosphorylase, in human colorectal carcinoma. *J Natl Cancer Inst* **88**: 1110-1117, 1996
- 11) Imazono Y, Takebayashi Y, Nishiyama K, Akiba S, Miyadera K, Yamada Y, Akiyama S, Ohi Y: Correlation between thymidine phosphorylase expression and prognosis in human renal cell carcinoma. *J Clin Oncol* **15**: 2570-2578, 1997
- 12) Koukourakis MI, Giatromanolaki A, O'Byrne KJ, Compley M, Whitehouse RM, Talbot DC, Gatter KC, Harris AL: Platelet-derived endothelial cell growth factor expression correlates with tumor angiogenesis and prognosis in non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer* **75**: 447-481, 1997
- 13) Ashizawa T, Shimizu H, Aoki T, Yamazaki T, Katayanagi S, Koyanagi Y: The clinical significance of Sialyl Lewis antigen expression in spread of gastric cancer. Flow cytometric DNA analysis. *J Exp Clin Cancer Res* **22**: 191-98, 2003
- 14) 日本胃癌学会編:胃癌取り扱い規約、第13版、金原出版、東京、1999
- 15) Haraguti M, Miyadera K, Uemura K, Sumizawa T, Furukawa T, Yamada K, Akiyama S: Angiogenic activity of enzymes. *Nature* **368**: 198, 1994
- 16) Miyadera K, Sumizawa T, Haraguti M, Yoshida H, Konstany W, Yamada Y, Akiyama S: Role of thymidine phosphorylase activity in the angiogenic effect of platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase. *Cancer Res* **55**: 1687-1690, 1995
- 17) 江田浩幸, 長谷川雅己, 辰野健二: TdRPase/血小板由来血管内皮細胞増殖因子遺伝子導入ヒト大腸癌細胞の性質。日癌治誌抄録集 **29**: 1992, 1994
- 18) Finnis C, Dodsworth N, Politil C.E, Carr G, Sleep D: Thymidine phosphorylase activity of platelet-derived endothelial cell growth factor is responsible for endothelial cell mitogenicity. *Eur J Biochem* **212**: 201-210, 1993
- 19) Eda H, Fujimoto K, Watanabe S: Cytokine induce uridine phosphorylase in mouse colon 26 carcinoma cells and make the cells more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Jpn J Cancer Res* **84**: 341-347, 1993
- 20) Eda H, Fujimoto K, Watanabe S, Ura M, Hino A, Tanaka Y, Wada K, Ishitsuka H: Cytokine induce thymidine phosphorylase expression in tumor cells and make the cells more susceptible to 5'-deoxy-5-fluorouridine. *Cancer Chemother Pharmacol* **32**:

- 333-338, 1993
- 21) 葦沢龍人、大沼 忍、岡田了祐、鈴木芳明、高木真人、山崎達之、寿美哲生、青木利明、富岡英則、青木達哉、小柳泰久：胃癌の浸潤における IL-6 の意義。胃癌学会雑誌 **17** : 123, 2003
- 22) 児山 新、寺西 亨、寺島信也、星野 豊、菅野智之、今野 明、井上 仁、元木良一：胃癌組織における PyNPase 活性の意義—臨床病理学的因子、予後との関連。日癌治療会誌 **32** : 743, 1997
- 23) 山崎芳郎、桑田圭司、日置紘士郎、曾和融生、平川弘聖、岡島邦雄、磯崎博司、岩永 剛、古河 洋、中野博重、渡辺明彦、高見元弥、塚原康生、松永征一、吉川宣輝、後藤 司、徳田 一、高橋 滋、豊原雅司、八木正弓、竹林 淳、中島徳郎、宮崎 治、桑田博文、藤本高義、牧 英明、藤村 隆、島野高志、畑埜武彦、松村一隆、鈴木隆一郎、中里博昭：胃癌の組織学的進行度因子別 Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase 値の検討。癌と化学療法 **25** : 1549-1556, 1998
- 24) 小川健治、三浦一浩、勝部貴男、勝部隆男、我妻美久、今野宗一、若杉慎司、渡辺俊明、島川 武、石川信也、成高義彦、矢川祐一、梶原哲郎：胃癌組織における Pyrimidine Nucleoside Phosphorylase (PyNPase) 活性測定の意義。癌と化学療法 **22** : 1191-1196, 1995

Pyrimidine nucleoside phosphorylase expression in gastric cancer evaluated by Flow cytometric DNA analysis

Hirohisa SHIMIZU, Tatsuto ASHIZAWA, Tatuya AOKI
and Yasuhisa KOYANAGI

Department of Surgery, Tokyo Medical University

Abstract

In 35 patients with gastric cancer, we compared the frequency and quantity of pyrimidine nucleoside phosphorylase (PyNPase) in gastric cancer cells and non-cancer cells by flow cytometric DNA analysis and evaluated the correlation between the quantity of PyNPase in gastric cancer cells and histopathological factors (depth of tumor invasion (pT), lymphatic invasion (ly), venous invasion (v), lymph node metastasis (pN)).

Results : No significant difference in frequency of PyNPase expression was seen in gastric cancer cells and non-cancer cells.

However, the quantity of PyNPase expression in gastric cancer cells was significantly higher than those in non-cancer cells ($p < 0.01$).

In addition, significant relationships were seen between the quantity of PyNPase expression in gastric cancer cells and pT ($p < 0.05$) and pN ($p < 0.01$).

We suspect that the increased quantity of PyNPase, which is released from gastric cancer cells, is involved in the depth of invasion and lymph node metastasis.

<Key words> Gastric cancer, PyNPase, Flow cytometric DNA analysis, Lymph node metastasis, Depth of tumor invasion
