

原 著

進行胃癌における *c-erbB-2*, nm23 H-1/NDP Kinase, CD44 Variant Exons 8-10発現の臨床的有用性の検討

東京女子医科大学 医学部 消化器外科学 (主任: 高崎 健教授)

イシヅカ	ナオキ	ナカムラ	ツトム	キ	タムラヨウイチ
石塚	直樹	中村	努	喜多村	陽一
オグマ	ヒデトシ	スズキ	ヒロヨシ	タカサキ	ケン
小熊	英俊	鈴木	博孝	高崎	健

(受付 平成10年5月1日)

Clinical Evaluation of *c-erbB-2*, nm23 H-1/NDP Kinase and CD44 Variant Exons 8-10 Expression in Advanced Gastric Carcinoma

Naoki ISHIZUKA, Tsutomu NAKAMURA, Yoichi KITAMURA,
Hidetoshi OGUMA, Hiroyoshi SUZUKI and Ken TAKASAKI

Department of Gastroenterological Surgery (Director: Prof. Ken TAKASAKI),
Tokyo Women's Medical University

Immunohistochemical study for the expression of *c-erbB-2*, nm23 and CD44v8-v10 was examined in tumor specimens taken from 107 patients who underwent gastrectomy for primary advanced gastric carcinoma. The expression of both *c-erbB-2* and nm23 was correlated with the differentiated stage of gastric carcinoma. The expression of *c-erbB-2* was also significantly correlated with the degree of tumor invasion and venous permeation. However, the expression of these three molecules was not correlated with either the histologic stage or the presence of metastases. Twenty-four patients with *c-erbB-2* positive tumor had significantly lower survival rate than 46 patients with no *c-erbB-2* positive tumor did. The expression of both nm23 and CD44 v8-v10 expression was not associated with patient survival. No significant correlation was observed between *c-erbB-2* expression and the incidence of recurrence. These results suggest that immunohistochemical study of *c-erbB-2* expression in tumor tissue seems to be one of important prognostic indicators in advanced gastric carcinoma patients.

緒 言

胃癌において根治手術後の再発形式は血行性転移, 腹膜播種性転移, リンパ節転移が多くそれらを予知し対策を講ずる必要がある。胃癌手術後生存期間に及ぼす要因として, 肉眼型, 漿膜浸潤, リンパ節転移個数, リンパ節転移度などが重要とされている。しかし, 早期胃癌を除いた進行癌症例では同一の stage でも早期再発死亡する症例と長期生存する症例が存在する。そこで進行胃癌切除例において転移に関連する増殖因子 *c-erbB-2*,

転移抑制遺伝子 nm23, 接着分子 CD44v8-v10に着目しこれらの臨床的有用性を検討した。

*c-erbB-2*は上皮増殖因子受容体をコードする癌遺伝子として同定された遺伝子¹⁾で, 癌の増殖機構に深く関与し, すでに乳癌における予後因子として報告^{2,3)}され, 胃癌においても転移あるいは予後因子として報告⁴⁾がある。nm23は癌転移抑制遺伝子として報告⁵⁾され, その遺伝子を転移能力の高い癌細胞株に導入すると転移能が抑制されることから, nm23に転移抑制作用があることが確認さ

れている⁶⁾。CD44は細胞膜貫通型の糖蛋白で、標準型CD44のほかに幾多もの変異型CD44が存在し癌細胞の転移に関連していると報告⁷⁾されている。CD44v8-v10と胃癌血行性転移との有意な関連が報告⁸⁾されており、転移を司る因子の一つと考えられている。

今回、進行胃癌切除例におけるこれらの発現を免疫組織化学的に検索し、病理組織学的所見および予後との関係を検討した。

対象および方法

1. 対象

1988年に東京女子医科大学病院消化器外科で、術前未治療の原発進行胃癌で幽門側胃切除術(n=39)、噴門側胃切除術(n=1)あるいは胃全摘術(n=67)を施行し、術後5年以上を経過し予後が判明している107例を対象とし、臨床病理学的に検討した。男女比は76:31、平均年齢は59.6歳であった。

各臨床病理学的因子の表記は胃癌取り扱い規約改訂第12版⁹⁾に準じて行った。病理組織型のうち、乳頭腺癌(pap)、高分化型管状腺癌(tub1)、中分化型管状腺癌(tub2)を分化型、低分化腺癌(por)、印環細胞癌(sig)、粘液癌(muc)を未分化型と分類したところ、分化型は47例、未分化型は60例であった。深達度別では、mp癌14例、ss癌12例、se/sei癌81例であった。総合的根治度の評価別では根治度A、B、Cはそれぞれ21、49、37例であった。根治度A、B症例70例の5年生存率は49%であった。また、術後再発死亡した26例中、再発形式の明らかな23例(重複再発を含む)の内訳は血行性転移5例、腹膜播種性転移8例、リンパ節転移10例であった。

2. 方法

1) 免疫組織化学的染色

腫瘍先進部周辺の原発巣パラフィン包埋標本を抗*c-erbB-2*抗体(CB11, Novocastra社, 50倍希釈)、抗nm23 H-1抗体(clone 37.6, Novocastra社, 100倍希釈)、抗CD44v9抗体(441v, 生化学工業株式会社, 400倍希釈)の各モノクローナル抗体を一次抗体としてlabelled streptavidin biotin (LSAB)法で次のように免疫染色を行った。染色にはDAKO社LSABキットを用いた。

10%ホルマリン固定パラフィン包埋標本より病巣の4 μ m厚切片を作製し、脱パラフィン後、0.3%過酸化水素水加メタノールと13分反応させ内因性ペルオキシダーゼ活性の阻害を行った。Phosphate buffered saline(PBS)で洗浄し、ウシ正常血清アルブミンで15分反応させた。各一次抗体を用い、4°Cで一晩反応させた。PBSで洗浄後、二次抗体としてビオチン二次抗体を用い、0.1% H₂O₂加3'-3' diamino-benzidine tetrahydrochlorideで発色させhematoxylinで核染後脱水封入し、光学顕微鏡で検索した。コントロールとして一次抗体と同じ正常家兎血清またはPBSで処理したものをを用いたがすべて陰性であった。

2) 染色陽性の判定基準

*c-erbB-2*は、正常組織での発現が認められないことから癌組織の10%以上が染色される場合を陽性とした。nm23は正常組織でも発現が認められ、癌組織における特異性が低いことから50%以上を陽性とした。CD44v8-v10では、Yamaguchiら⁸⁾と同様に25%以上を陽性とした。

3. 統計処理

各産物の陽性率と臨床病理学的諸因子との関連を χ^2 検定を用いて検索した。各種臨床病理学的因子は、胃癌取り扱い規約⁹⁾に従い検討した。生存率曲線はKaplan-Meier法により描出し、検定は一般化Wilcoxon法により危険率5%未満を有意の相関ありとした。

結 果

1. 免疫組織化学的所見

c-erbB-2、CD44v8-v10は細胞膜が、nm23は細胞膜・細胞質が褐色に染色された(図1)。

2. 発現陽性率と臨床病理学的因子との関係

進行胃癌107例における*c-erbB-2*、nm23、CD44v8-v10の各陽性率は、38.3、67.2、60.7%であった。各発現陽性率と総合的進行程度、および総合的根治度の評価との関連はなかった(表1)。

*c-erbB-2*の陽性率と肝転移、腹膜播種性転移、リンパ節転移との有意の関連はなかった。分化型別では未分化型癌に比べ分化型癌で有意に陽性率が高かった。また漿膜浸潤、静脈浸潤症例での*c-erbB-2*陽性率は46%(se 29例、sei 8例の計37例)。

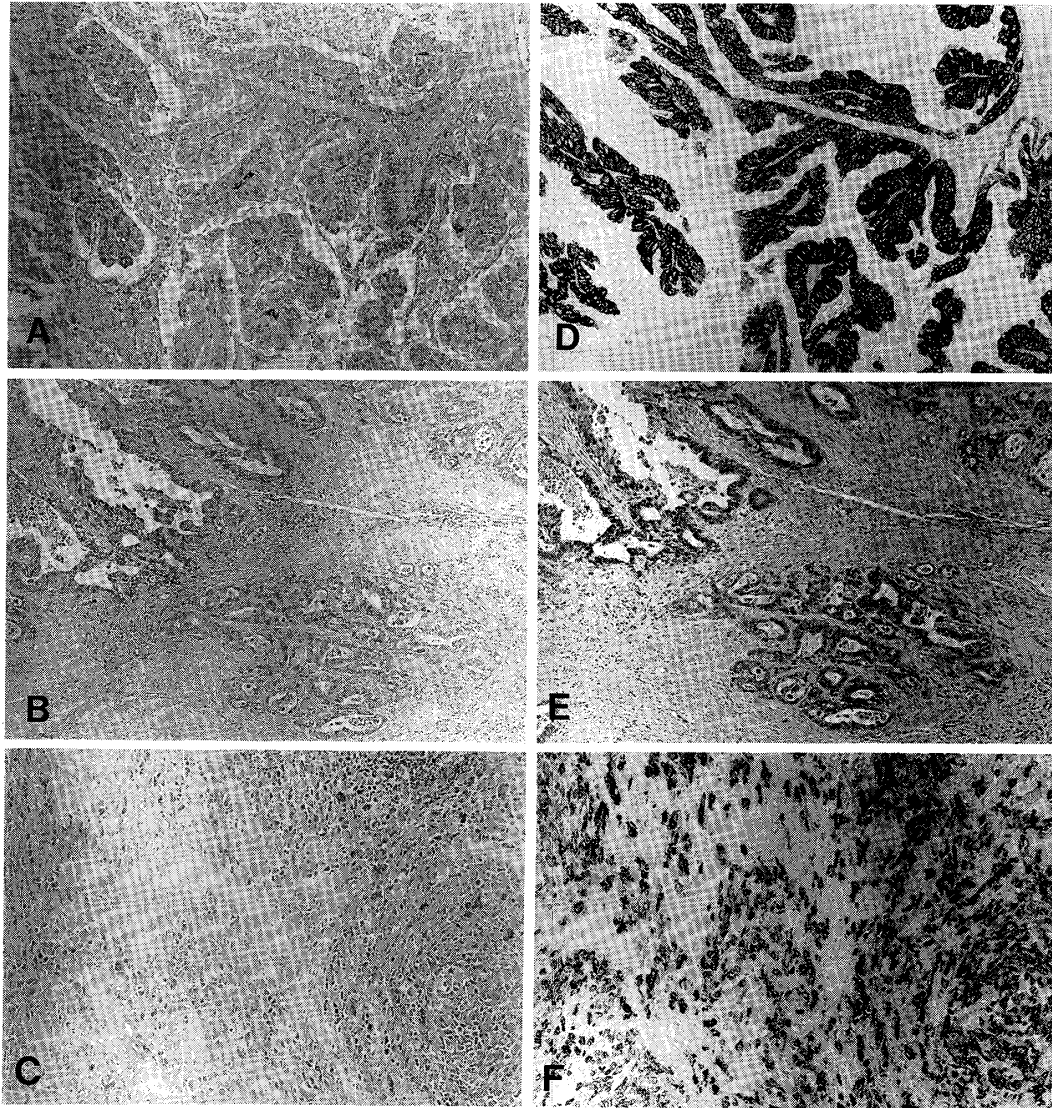


図1 *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10の免疫組織化学的所見 (×25)
 A, B, C: *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10の各陰性コントロール症例,
 D, E, F: *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10の各陽性症例。
 それぞれ癌組織の10, 50, 25%以上が染色されるものを陽性とした。

表1 *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10発現と進行程度, 根治度評価と関係

	総合的進行程度						総合的根治度			
		I b	II	III a	III b	IV a	IV b	A	B	C
症例数	107	12	17	18	20	16	24	21	49	37
<i>c-erbB-2</i> 陽性例 (%)	41 (38)	3 (25)	6 (35)	4 (22)	8 (40)	9 (56)	11 (46)	4 (19)	20 (41)	17 (46)
nm23陽性例 (%)	72 (67)	6 (50)	11 (65)	13 (72)	15 (75)	8 (50)	19 (79)	11 (52)	34 (69)	27 (73)
CD44v8-v10陽性例 (%)	65 (61)	3 (25)	12 (71)	13 (72)	12 (60)	9 (56)	16 (67)	10 (48)	32 (65)	23 (62)

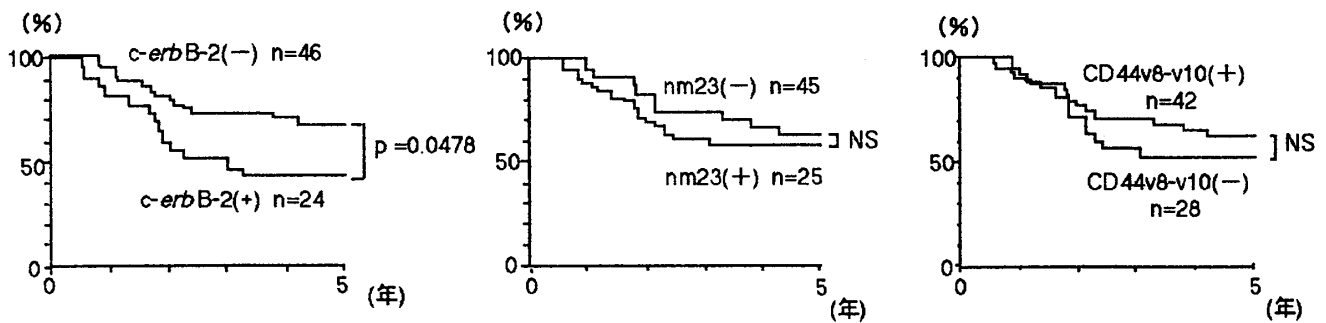
47% (28例) であり有意に陽性率が高かった。
 nm23の陽性率と転移との有意な関連はなかつ

た。肝転移症例の83% (10例), リンパ節転移症例
 の69% (61例) に陽性発現を認めいずれも非転移

表2 *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10発現と臨床病理学的因子との関係

	組織型		肝転移		腹膜播種性転移		リンパ節転移		漿膜浸潤		リンパ管侵襲		静脈侵襲	
	分化型	未分化型	H ₀	H ₁₋₃	P ₀	P ₁₋₃	n ₀	n ₁₋₃	mp, ss	se, sei	ly ₀	ly ₁₋₃	v ₀	v ₁₋₃
症例数	47	60	95	12	84	23	19	88	26	81	16	91	48	59
<i>c-erbB-2</i> 陽性例 (%)	27 (57)	14 (23)	34 (36)	7 (58)	31 (37)	10 (43)	7 (37)	34 (39)	4 (15)	37 (46)	3 (19)	38 (42)	13 (27)	28 (47)
	*								*				*	
nm23陽性例 (%)	40 (85)	32 (53)	62 (65)	10 (83)	57 (68)	15 (65)	11 (58)	61 (69)	15 (58)	57 (70)	7 (44)	65 (71)	28 (58)	44 (75)
	*										*			
CD44v8-v10陽性例 (%)	33 (70)	32 (53)	57 (60)	8 (67)	52 (62)	13 (57)	7 (37)	58 (66)	12 (46)	53 (65)	5 (31)	60 (66)	25 (52)	40 (68)
											*			

* : p<0.05.

図2 根治度 A, B における *c-erbB-2*, nm23, CD44 v8-v10 の発現別生存率曲線 (Kaplan-Meier 法)

症例に比べ有意差はなかったが高率に発現を認められた。分化型別では、未分化型癌に比べ分化型癌で有意に陽性率が高かった。リンパ管侵襲症例の71% (65例) に有意な陽性発現を認めた。

CD44v8-v10の陽性率と転移との有意な関連は認めなかった。リンパ管侵襲症例の66% (60例) に有意な陽性発現を認めた (表2)。

3. 発現と予後との関係

根治度 A, B 症例70例を対象に、各陽性群、陰性群別に5年生存率の比較を行った。*c-erbB-2*陽性群 (5年生存率44%) は陰性群 (同62%) に比べ有意に生存率が低かった ($p=0.0478$)。nm23では陽性群の方が陰性群に比し生存率が不良の傾向にあったが、有意差はなかった。CD44v8-v10では有意差はないが陰性群で生存率が不良であった (図2)。

再発死亡した23症例の再発形式 (重複再発を含む) は、血行性転移5例、腹膜播種性転移8例、リンパ節転移10例であり、*c-erbB-2*, nm23, CD44

v8-v10の各発現と再発形式との間に有意な関連はなかった。また、*c-erbB-2*陽性例の再発死亡例は11例であり、その内訳は血行性転移2例、腹膜播種性転移4例、リンパ節転移5例であった (表3)。

考 察

進行胃癌において拡大郭清を含めた術式の進歩にもかかわらず治癒切除術後の再発率は28%であり¹⁰⁾、つまり手術を受けた約4人に1人は何らかの再発をきたす結果となっている。そして、再発が予想される患者に対しては厳重に経過観察し、補助療法などの対策が必要である。

胃癌の再発形式は腹膜播種性転移42%、血行性転移31%、局所再発15%、遠隔リンパ節再発8%、残胃再発4%と多様であり¹⁰⁾、いずれの転移・再発も画像診断・血清学的診断で捕らえにくいいため再発の早期発見を困難にしていると考えられる。また、胃癌の再発に関わる重要な因子として深達度、リンパ節転移度、年齢、肝・腹膜播種性転移、リンパ節郭清があげられており¹¹⁾、これらの因子の

表3 根治度A, Bにおける *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10発現と再発形式との関係

		再発形式					
		血行性転移		腹膜播種性転移		リンパ節転移	
		+	-	+	-	+	-
症例数	23	5	18	8	15	10	13
<i>c-erbB-2</i> 陽性例 (%)	11 (48)	2 (40)	6 (33)	4 (50)	2 (13)	5 (50)	2 (15)
nm23陽性例 (%)	15 (65)	3 (60)	9 (50)	5 (63)	7 (47)	7 (70)	4 (31)
CD44v8-v10陽性例 (%)	10 (43)	2 (40)	7 (39)	3 (38)	6 (40)	5 (50)	4 (31)

うち胃癌取り扱い規約で規定された深達度, リンパ節転移度, 肝・腹膜播種性転移によって stage に分類し患者の予後をある程度推測することが可能である。しかし, 胃癌切除例の約3分の1を占める stage II, IIIの進行胃癌での5年生存率はそれぞれ70, 45%であり¹¹⁾, 同一の stage であっても早期再発死亡する症例と長期生存する症例とが相半ばしており, 予後を推測するのは必ずしも容易ではない。

近年, 癌の転移機構における分子生物学的解析が進歩し, 多数の遺伝子または蛋白が発見されている。そこで, 進行胃癌において転移に関連する *c-erbB-2*, nm23, CD44v8-v10を免疫組織学的に検討し, 転移・再発の予知に有用であるかを検討した。

1. 発現と臨床病理学的因子との関係

*c-erbB-2*は上皮増殖因子 (EGF) と類似の乳癌など主に腺癌で発現している進展因子である。*c-erbB-2*遺伝子の増幅および蛋白発現は, 分化型胃癌で認められ未分化型胃癌で認められないことから分化型胃癌の増殖に関与する因子とされている⁴⁾¹²⁾。本研究でも分化型胃癌で高率に発現が認められ, 漿膜浸潤や静脈侵襲をきたすもので高率に発現していた。*c-erbB-2*陽性例とリンパ節転移との関連が報告されているが¹³⁾, 本研究では有意な関連は認められなかった。

nm23は転移抑制遺伝子として発見され, 乳癌において発現減弱例で転移が多く認められたと報告されている。胃癌においての免疫組織化学的検討ではリンパ節転移, 肝転移症例で有意な nm23発現減弱が認められている¹⁴⁾。本研究では分化型癌

において発現率が有意に高いことが示されたが, 転移との有意な関連はなく非転移症例に比べ転移症例で陽性率が高い傾向となった。Uraら¹⁴⁾の研究と異なる結果となった原因として, 抗体の特異性が関与しているものと推察された。nm23は nm23 H-1と H-2という2種類の蛋白に分けられ, これらは高い相同性を有することから, 同一の H-1モノクローナル抗体を使用したとしても交叉反応の度合いにより染色結果が異なる可能性が考えられた。また, 適切な共通の陽性判定基準はなく, 判定基準の設定によっても結果が左右されるものと推察された。

CD44は膜貫通型の接着分子であり, CD44変異型の発現が癌の進展や転移に関連していると考えられている¹⁵⁾。標準型 CD44の免疫組織化学的検討では, 浸潤性の強い胃癌で高度の発現が認められているが¹⁶⁾, 本研究において CD44v8-v10発現とリンパ管侵襲の関連を認めたのみでその他の病理学的因子との関連はなく, 浸潤性を示す因子としては *c-erbB-2*の方が有用と思われた。Yamaguchiら⁸⁾は, 胃癌血行性転移と CD44v8-v10発現との有意な関連を報告している。しかし, 本研究では同一の抗体を使用したが発現との関連は認めなかった。

2. 発現と予後との関係

*c-erbB-2*と予後との関連については, 乳癌¹⁷⁾, 胃癌¹³⁾¹⁸⁾, 大腸癌¹⁹⁾などですでに予後因子となることが報告されている。本研究でも, *c-erbB-2*陽性例は陰性例より有意に術後生存率が低く, 予後因子となりうる可能性が示唆された。

nm23は乳癌において強陽性例で予後不良であ

文 献

るが²⁰⁾、肺癌においては予後との関連は認められていない²¹⁾。胃癌においてはnm23減弱例でリンパ節転移・漿膜浸潤が多いが、予後との関連は認められておらず²²⁾、本研究でも生存率との関連は認められなかった。

CD44変異型の陽性例で予後不良なことが卵巣癌²³⁾、乳癌²⁴⁾で報告され、胃癌においてはCD44v9陽性例の生存率が陰性例に比し低いことが報告されたが²⁵⁾、本研究ではCD44v8-v10陽性例の生存率が陰性例に比し高い傾向を示した。一方、Songunらは変異型CD44のうちCD44v5、CD44v6発現を免疫組織化学的に検討し、本研究と同様に有効な予後因子とならないとしている²⁶⁾。

根治度A、B後の再発形式を調べたところ、*c-erbB-2*、nm23、CD44v8-v10の各発現と再発形式の間には有意な関連が認められなかった。*c-erbB-2*陽性例の再発形式について、Yonemuraらはリンパ節再発との有意な関連を報告しているが¹³⁾、本研究ではリンパ節再発との関連はなかった。

ま と め

進行胃癌における*c-erbB-2*、nm23、CD44v8-v10の発現の臨床的有用性を検討した。

1) *c-erbB-2*の発現は、分化型癌、漿膜浸潤、静脈侵襲症例で有意に高率に認められたが、肝転移・腹膜播種性転移・リンパ節転移との関連はなかったことから、*c-erbB-2*は主病巣での腫瘍の増殖・進展を示す一つの要因と考えられた。根治度A、B症例において*c-erbB-2*陽性例は陰性例に比べ有意な生存率低下を示したことから、胃癌予後因子となる可能性が示唆された。*c-erbB-2*陽性例の再発形式では、リンパ節再発が多い傾向を示した。

2) nm23の発現は、分化型胃癌で有意に高率に認められた。nm23と転移および生存率との関連はなかった。CD44v8-v10と転移および生存率との関連は認められなかった。

本研究の要旨は第48回日本消化器外科学会総会(1996年7月、東京)にて報告した。

- 1) Yamamoto T, Ikawa S, Akiyama T et al: Similarity of protein encoded by the human *c-erbB-2* gene to epidermal growth factor receptor. *Nature* 319: 230-234, 1986
- 2) Wright C, Angus B, Nicholson S et al: Expression of *c-erbB-2* oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* 49: 2087-90, 1989
- 3) Tsuda H, Hirohashi S, Shimosato Y et al: Immunohistochemical study on overexpression of *c-erbB-2* protein in human breast cancer: its correlation with gene amplification and long-term survival of patients. *Jpn J Cancer Res* 81: 327-332, 1990
- 4) 島田悦司: 胃癌における*c-erbB-2*蛋白発現についての免疫組織化学的研究. *日外会誌* 94: 33-40, 1993
- 5) Steeg PS, Bevilacqua G, Kopper L et al: Evidence for a novel gene associated with low tumor metastatic potential. *J Natl Cancer Inst* 80: 200-204, 1988
- 6) Leone A, Flatow U, King CR et al: Reduced tumor incidence, metastatic potential, and cytokine responsiveness of nm23-transfected melanoma cells. *Cell* 65: 25-35, 1991
- 7) Seiter S, Arch R, Reber R et al: Prevention of tumor metastasis by anti-variant CD44. *J Exp Med* 177: 443-455, 1993
- 8) Yamaguchi A, Mitsugi S, Goi T et al: Expression of CD44 variant exons 8-10 in gastric cancer. *Jpn J Cancer Res* 86: 1166-1171, 1995
- 9) 胃癌研究会編: 胃癌取り扱い規約 改訂第12版. 金原出版, 東京 (1993)
- 10) 中島聰總, 太田恵一郎, 石原 省ほか: 生存に及ぼす胃癌予後要因の多変量解析. *癌と化療* 21: 1768-1774, 1994
- 11) 岡島一雄: 胃癌患者の予後因子—多変量解析による検討—. *日消外会誌* 30: 700-711, 1997
- 12) Yokota J, Yamamoto T, Toyoshima K et al: Amplification of *c-erbB-2* oncogene in human adenocarcinoma in vivo. *Lancet* 1: 765-767, 1986
- 13) Yonemura Y, Ninomiya I, Yamaguchi A et al: Evaluation of immunoreactivity for *erbB-2* protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res* 51: 1034-1038, 1991
- 14) Ura H, Denno R, Hirata K: Correlation between nm23 protein and several cell adhesion molecules in human gastric carcinoma. *Jpn J*

- Cancer Res 87 : 512-517, 1996
- 15) **Screaton GR, Bell MV, Bell JI et al**: Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. Proc Natl Acad Sci USA 89 : 12160-12164, 1992
 - 16) **Washington K, Gottfried MR, Telen MJ**: Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. Hum Pathol 25 : 1043-1049, 1994
 - 17) **Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA et al**: Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. Science 244 : 707-712, 1989
 - 18) **Parks BJ, Rhim JS, Parks SC et al**: Amplification, overexpression, and rearrangement of the *erbB-2* protooncogene in primary human stomach carcinomas. Cancer Res 49 : 6605-6609, 1989
 - 19) **Tal M, Wetzer M, Josephberg Z et al**: Sporadic amplification of the HER/neu protooncogene in adenocarcinoma of various tissues. Cancer Res 48 : 1517-1520, 1988
 - 20) **Hirayama R, Sawai S, Takagi Y et al**: Positive relationship between expression of anti-metastatic factor (nm23 gene product or nucleotide diphosphate kinase) and good prognosis in human breast cancer. J Natl Cancer Inst 83 : 1249-1250, 1991
 - 21) **Higashiyama M, Doi O, Yokouchi H et al**: Immunohistochemical analysis of nm23 gene product/NDP kinase expression in pulmonary adenocarcinoma: lack of prognostic value. Br J Cancer 66 : 533-536, 1992
 - 22) **Kodera Y, Isobe K, Yamauchi M et al**: Expression of nm23 H-1 RNA levels in human gastric cancer tissues. Cancer 73 : 259-265, 1994
 - 23) **Uhl SM, Muller HE, Zeimet AG et al**: Prognostic value of CD44 splice variant expression in ovarian cancer. Oncology 52 : 400-406, 1995
 - 24) **Dall P, Heider KH, Sinn HP et al**: Comparison of immunohistochemistry and RT-PCR for detection of CD44v-expression, a new prognostic factor in human breast cancer. Int J Cancer 60 : 471-477, 1995
 - 25) **Mayer B, Jauch KW, Gunthert U et al**: De-novo expression of CD44 and survival in gastric cancer. Lancet 342 : 1019-1022, 1993
 - 26) **Songun I, van de Velde CJ, Hermans J et al**: Expression of oncoproteins and the amount of eosinophilic and lymphocytic infiltrates can be used as prognostic factors in gastric cancer. Br J Cancer 74 : 1783-1788, 1996