

DNA ploidy・ras p21の発現からみた

Borrmann 4型胃癌の予後の検討

金沢大学第2外科

米村 豊 杉山 和夫 鎌田 徹 松本 尚
大山 繁和 山口 明夫 三輪 晃一 宮崎 逸夫

STUDIES ON THE PROGNOSIS OF BORRMANN TYPE 4 GASTRIC CARCINOMA FROM THE ASPECT OF DNA PLOIDY AND EXPRESSION OF RAS P21

Yutaka YONEMURA, Kazuo SUGIYAMA, Toru KAMATA, Hisashi MATSUMOTO,
Shigekazu OHYAMA, Akio YAMAGUCHI, Koichi MIWA and Itsuo MIYAZAKI
Surgery II, School of Medicine, Kanazawa University

Borrmann 4型胃癌76例を対象としDNA ploidy, ras p21の組織内発現を検索し、以下の成績を得た。

DNA ploidy patternはdiploid 26例, aneuploid 50例で、diploidの5生率28%, aneuploid 8%と有意にaneuploidで予後不良であった。ras p21活性は24例、32%にみられ、ras p21陰性胃癌の5生率27%、陽性癌で6%で両群間に有意差を認めた。またdiploid, aneuploidともにras p21陽性例では陰性例にくらべ有意に予後不良であった。DNA ploidy, ras p21の発現と組織型、腹膜播種の有無、stageとの関係はなかったが、aneuploidでras p21陽性癌では静脈侵襲が高率に認められた。

以上よりDNA ploidy pattern, ras p21発現の状態を検索することはBorrmann 4型胃癌の予後指標になると考えられた。

索引用語：Borrmann 4型胃癌, ras p21, DNA ploidy

Borrmann 4型胃癌はさまざまな遺伝子発現がみられ、この多様な形質発現がBorrmann 4型胃癌の高い悪性度と関連していることが最近明らかとなった¹⁾²⁾。また発癌遺伝子の産生タンパクが増殖因子レセプターやシグナル伝達機構に重要なはたらきかけをし、癌の転移・進展に関与している可能性も報告されている³⁾。そこでわれわれは胃癌のなかでも最も悪性度が高いBorrmann 4型胃癌のDNA ploidyと、癌遺伝子rasの産物であるp21の発現状態から、この胃癌の生物学的特性を検討した。

I. 対象および方法

昭和48年4月から62年4月までの間に教室で切除されたBorrmann 4型胃癌76例を対象とした。これら症

例の原発巣パラフィン包埋ブロックを連続的に4 μ および10 μ に薄切し、前者はras p21発現の、後者はDNA ploidy patternの検索に使用した。ras p21の発現をみるためSchlom (NIH)より入手したmonoclonal抗体(RAP-5)を用い、免疫組織学的に検討した。すなわち脱パラした切片を1%H₂O₂加メタル、0.114%過ヨウ素酸、0.0114%ホウ素化水素ナトリウムで内因性ペロキシダーゼをブロック後、ウマ血清(×10)で20分処理し、RAP-5(×1,000)を4℃、12時間反応させた。PBSで洗浄し、ビオチン化抗マウスIgG、ウマIgG(Vector社, USA)で2時間反応後、ABC試薬(Vector社, USA)で1時間反応させた。PBSで洗浄後H₂O₂加3-3'-diaminobenzidineで発色させ、ヘマトキシリンで染色後検索した。

DNA ploidy patternは切片上のM期細胞のDNA量を測定し検索した。方法は既に報告したごとく⁴⁾、脱

表1 DNA ploidy・ras p21と病理所見

	A ; diploid p21 (-)	B ; diploid p21 (+)	C ; aneuploid p21 (-)	D : aneuploid p21 (+)	計
組 織 型					
分化型	0	0	2	1	3
未分化型	17	9	33	14	73
リンパ節転移					
陰 性	2	2	5	1	10
陽 性	15	7	30	14	66
リンパ管侵襲					
陰 性	6	5	10	3	24
陽 性	11	4	25	12	52
静脈侵襲					
陰 性	9	8	18	3	38
陽 性	8	1	17	12	38
腹膜播種					
陰 性	6	4	13	2	25
陽 性	11	5	22	13	51
ステージ					
I	0	0	0	0	0
II	3	0	1	0	4
III	1	3	6	1	11
IV	13	6	28	14	61

バラ後1mg/ml RNase (Sigma 社, USA) で12時間反応後0.005%propidium iodide で染色し、顕微蛍光測光装置でM期細胞核を30~50個測光し、DNA ploidy patternを決定した。

Borrmann 4型胃癌76例をDNA ploidyとras p21発現状態から以下の4群に分けた。

A群: diploidでras p21陰性

B群: diploidでras p21陽性

C群: aneuploidでras p21陰性

D群: aneuploidでras p21陽性

文中の用語はすべて第10版胃癌取扱い規約にしたがった⁶⁾。統計処理は χ^2 検定 Student t testを用いた。生存率の算出はKaplan-Meier法によりもとめ、generalized Wilcoxon testで群間の差を検定した。

II. 成 績

ras p21の局在は胃粘膜でもみられ、幽門腺や腸上皮化生の一部で認められた。癌では細胞質および細胞膜に局在がみられた(図1)。ras p21陽性胃癌は76例中24例(32%)であった。DNA ploidy patternは図2のごとくdiploidとaneuploidに分類した。このうちdiploidは26例、aneuploidは50例であった。DNA ploidyとras p21の発現をみるとA群17例、B群9例、C群35例、D群15であった。この4群における病理組織所見は表1に示すごとくである。

図1 ras p21の癌巢内局在

A) 細胞質に顆粒状・びまん性にras p21活性をみとめる。B) 細胞膜上にras p21の局在をみとめる。

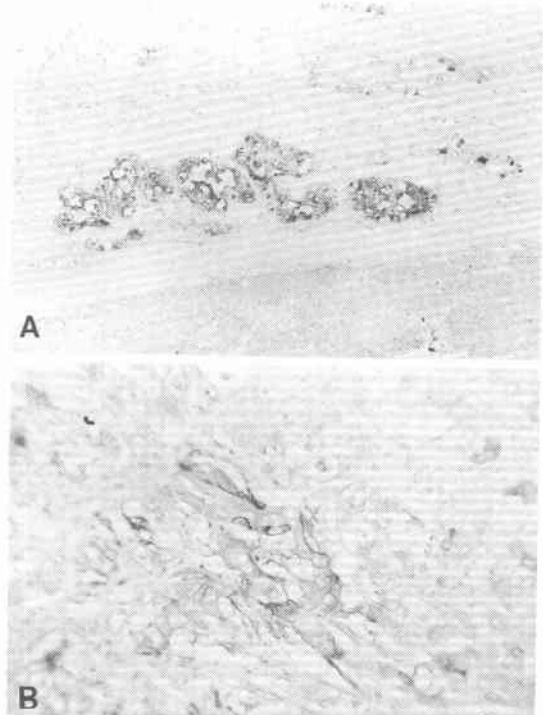


図2 DNA ploidy pattern の分類

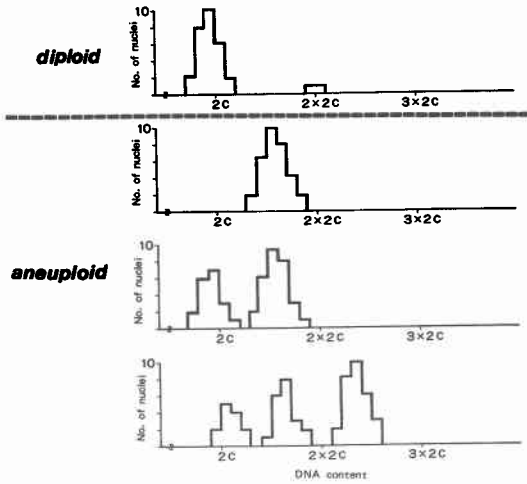


図3 DNA ploidy pattern と予後

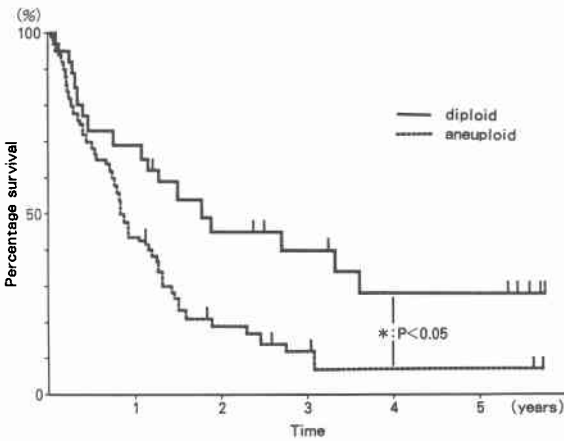


図4 ras p21の発現と予後

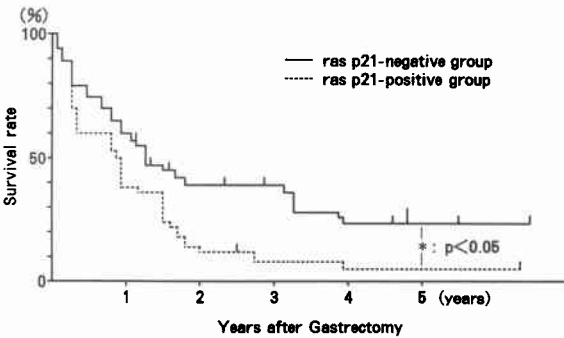


図5 DNA ploidy pattern, ras p21活性からみた Borrmann 4型胃癌の予後

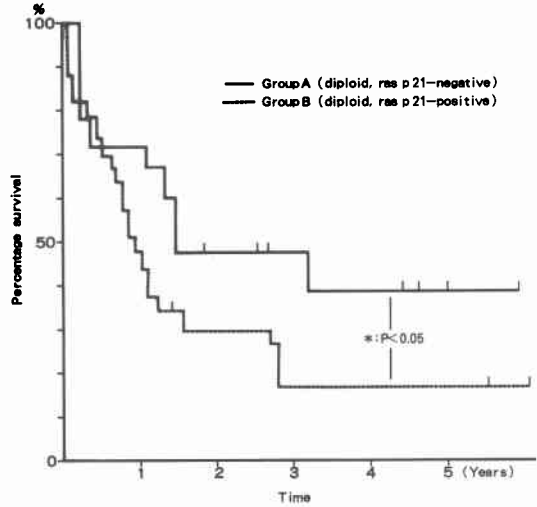
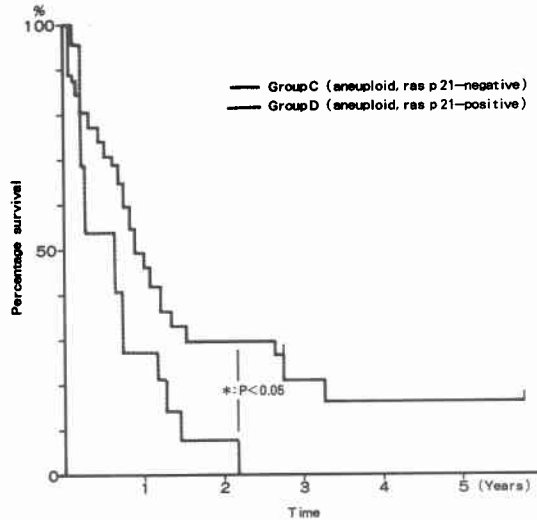


図6 DNA ploidy pattern, ras p21活性からみた Borrmann 4型胃癌の予後 (Group C: Group D)



例, III 11例, IV 61例であり, DNA ploidy・ras p21発現と stage の間に差はなかった. また浸潤様式・肝転移・漿膜面浸潤・腹膜播種の有無と各群間に差を認めなかった. 一方静脈侵襲では, A 群47%(8/17), B 群11%(1/9)が陽性であったのに対し, D 群では87%(13/15)が陽性であり D 群では有意な高値を示した. つぎに DNA ploidy と予後をみると図3のごとく diploid の5生率28%, aneuploid 8%と diploid で有意に生存

組織型・リンパ節転移・リンパ管侵襲では A・B・C・D 各群間で差を認めなかった. stage では stage II 4

率が良好であった。また ras p21の発現と予後をみると、図4のように ras p21陰性例の5生率27%、p21陽性例6%と p21陰性例では有意に生存率が良かった。さらに A・B・C・D群の生存率は図5、6のごとくであり、各群の5生率はそれぞれ38%、18%、16%、0%であった。A-B群およびC-D群・A-D群の各群間生の生存率に有意差をみとめた。D群は最も生存率が悪く、3年以内に全例死亡した。

III. 考 察

Borrmann 4型胃癌の予後規定因子にはリンパ節転移・腹膜播種の有無・肉眼型亜型などの因子が報告されている⁷⁾⁸⁾。しかし、大部分の Borrmann 4型胃癌は手術時予後の漿膜面浸潤陽性であり、たとえ治癒切除されても潜在性腹膜播種の再燃により死亡する。このような悪性度の高い Borrmann 4型胃癌の生物学的特性について近年、さまざまな方法で研究されるようになった。DNA ploidy が胃癌の予後因子となることは広く認められており、aneuploid では diploid にくらべ、予後は不良であると考えられている⁹⁾¹⁰⁾。その理由として aneuploid では diploid にくらべ、リンパ節転移や血行性転移が高頻度にみられ、増殖活性が高いためと考えられている⁹⁾¹⁰⁾。今回の Borrmann 4型胃癌の成績でも aneuploid は diploid にくらべ静脈侵襲が高率で、予後も不良であった。一方、ras 遺伝子の産生する p21は細胞膜に存在し³⁾、増殖因子受容体からのシグナル伝導系に関与し¹¹⁾、その結果、細胞増殖を促進するとされている¹²⁾。特に ras p21の第12、61番目のアミノ酸の点突然変異により活性化された ras 遺伝子は刺激伝導系の破綻を起こし、細胞増殖を常に促進すると考えられている。また Greig ら¹³⁾は増殖能・転移能の低い NIH 3T3細胞に活性化 h-Ha-ras gene をトランスフェクションすることにより、増殖能のみならず転移も増大することを報告している。ras 遺伝子はその活性化ばかりでなく、p21の増量によっても細胞の悪性変換を促すことが知られている¹⁴⁾。胃癌における ras 遺伝子の活性化は稀であるが¹⁵⁾¹⁶⁾、Noguchi¹⁷⁾、Ohuchi¹⁸⁾らはわれわれと同じ抗体を用い、40~70%に ras p21発現の増量を認めたとしている。胃癌における ras p21の発現と悪性度について Noguchi ら¹⁷⁾は差を認めなかったと報告している。この成績は大腸癌¹⁹⁾・乳癌²⁰⁾でも報告されている。Ohuchi ら¹⁷⁾は早期胃癌より進行癌で ras p21の発現頻度が高く、Tahara ら²¹⁾は p21発現量の多い胃癌は発現量の低い胃癌にくらべ、予後が不良であったと述べている。われわれの成績で

は ras p21の発現と組織型、リンパ節転移などは相関がみられなかったが、静脈侵襲では ras p21陽性例は陰性例にくらべ有意に高率であった。しかも DNA ploidy との関係でみると diploid, aneuploid とともに ras p21陽性胃癌は陰性胃癌にくらべ予後不良であった。

以上の成績から ras p21の増量のみられる Borrmann 4型胃癌は静脈侵襲が高率で、転移を来たしやすいと推定された。Viola ら²²⁾は膀胱癌で ras p21陽性率と核異型度が相関し、腺腔形成とは逆相関し、CEA や prostate-specific antigen と比較しても組織学的悪性度との間により、強い相関がみられたとしている。われわれは胃癌において、癌胎児蛋白の発現と予後が相関することを報告したが²³⁾、stageの進行した例ではその関係は明らかではなかった。今後胃癌の進展や転移に関係のある癌遺伝子の同定と、その外科臨床への応用が研究されねばならない。

IV. ま と め

Borrmann 4型胃癌76例を対象とし、DNA ploidy, ras p21発現状態を検索した。

1. DNA ploidy pattern は diploid 26例、aneuploid 50例であり、diploid の5生率28%、aneuploid 8%であった。

2. ras p21活性は24例・32%に認められ、ras p21陰性胃癌の5生率27%、陽性胃癌では6%で両群間に有意差を認めた。

3. DNA ploidy, ras p21発現状態と予後をみると、diploid, aneuploid とともに ras p21陽性例は陰性例にくらべ有意に予後不良であった。

以上により Borrmann 4型胃癌の予後規定因子として DNA ploidy と ras p21発現の検索は有用であると考えられた。

文 献

- 1) Tahara E, Sumiyoshi H, Hata J et al: Human epidermal growth factor as a biologic marker of high malignancy. *Jpn J Cancer Res* 77: 142-152, 1986
- 2) Tahara E: Scihhrous argyrophil cell carcinoma of the stomach with multiple production of polypeptide hormones, amine, CEA, lysozyme and hCG. *Cancer* 49: 1904-1915, 1982
- 3) Willingame MC, Pastan I, Shir TY et al: Localization of the src gene product of the Harvey strain of MSV to plasma membrane of transformed cells by electron microscopic immunohistochemistry. *Cell* 19: 1005-1009, 1980
- 4) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: Stathmo-

- kinetic method を用いた胃癌細胞核 DNA 量の検討. 医のあゆみ 142 : 407-408, 1987
- 5) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: 抗 Bromodeoxyuridine モノクローナル抗体および DNA 量定量による胃癌の細胞動態解析. 日本外科学誌 88 : 1044, 1987
 - 6) 胃癌研究会編: 外科. 病理. 胃癌取扱い規約. 金原出版, 東京, 1979
 - 7) 岩永 剛, 熊野健彦: スキルス胃癌の術後経過と予後. 臨外 26 : 1101-1106, 1971
 - 8) 三輪 潔, 中村 茂: スキルス胃癌の生物学的特徴. クリニカ 10 : 261-266, 1983
 - 9) 米村 豊, 杉山和夫, 鎌田 徹ほか: 胃癌における細胞核の DNA ploidy pattern と胃癌の悪性度. Oncologia 20 : 24-31, 1987
 - 10) Inokuchi K, Kodama Y, Sasaki O et al: Differentiation of growth patterns of early gastric carcinoma determined by cytofluorometric DNA analysis. Cancer 51 : 1138-1141, 1983
 - 11) Shir TY, Papareorge AG, Stocker PG et al: Guanine nucleotide binding and autophosphorylating activities associated with the p20 src protein of Harvey murine sarcoma virus. Nature 287 : 686-691, 1980
 - 12) Tabin CJ, Bradley SM, Bargmann CL: Mechanism of activation of a human oncogene. Nature 300 : 143-149, 1982
 - 13) Greig RG, Koestler TP, Trainer DL et al: Tumorigenic and metastatic properties of "normal" and ras-transfected NIH/3T3 cells. Proc Acad Sci USA 82 : 3698-3701, 1985
 - 14) 広橋説雄, 金井歳雄, 野口雅之: 病理よりみた癌遺伝子産物発現の意義. 代謝 24 : 183-187, 1987
 - 15) O'Hara M, Oskersson M, Trainsky MA et al: Mechanism of activation of human ras genes cloned from a gastric adenocarcinoma, and pancreatic carcinoma cell line. Cancer Res 46 : 4695-4700, 1986
 - 16) Nishida J, Kobayashi Y, Hirai H et al: A point mutation at codon 12 of the N-ras in a human stomach cancer. Biochem Biophys Res Commun 146 : 247-252, 1987
 - 17) Noguchi M, Hirohashi S, Shimosato Y et al: Histologic demonstration of antigens reactive with anti-p21 ras monoclonal antibody (RAP-5) in human stomach cancer. JCN 2 : 379-385, 1986
 - 18) Ohuchi N, Hand PH, Erlo G et al: Enhanced expression of c-Ha-ras p21 in human stomach adenocarcinomas defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. Cancer Res 47 : 1413-1420, 1987
 - 19) Gallick GE, Kurzrock R, Kloetzer WS et al: Expression of p21 in fresh primary and metastatic human colorectal tumors. Proc Natl Acad Sci USA 82 : 1795-1799, 1985
 - 20) Ghosh AK, Moore M, Harris M: Immunohistochemical detection of ras oncogene p21 product in benign and malignant mammary tissue in mam. J Clin Pathol 39 : 28-434, 1986
 - 21) Tahara E, Yasui W, Taniyama K et al: Ha-ras oncogene product in human gastric carcinoma: Correlation with invasiveness metastasis or prognosis. Jpn J Cancer Res 77 : 517-522, 1986
 - 22) Viola MV, Fromowitz F, Oravez S et al: Expression of ras p21 in prostatic cancer. N Engl J Med 314 : 133-137, 1986
 - 23) 米村 豊, 沢 敏次, 橋本哲夫ほか: 胃癌における癌関連抗原発現様式と予後. 日消外会誌 20 : 2299-2304, 1987