

大腸癌における c-erbB-2蛋白発現と臨床評価

神戸労災病院外科

中江 史朗 裏川 公章 植松 清

大腸癌での c-erbB-2蛋白発現と臨床病理学的諸因子, DNA ploidy pattern との関係を検討した。大腸癌切除44例の凍結標本でモノクローナル抗体を用いて c-erbB-2蛋白を染色し, flow cytometer で核 DNA 量を解析した。蛋白陽性率は25/44 (56.8%) で, 組織型では高分化型19/21, 中分化型4/7, 低分化型1/2, 粘液癌1/1, 深達度別では m 0/1, sm 1/2, pm 1/2, ss(a₁) 6/10, s(a₂) 15/23, si(ai) 2/6であった。リンパ節転移では n(-)16/26, n(+)9/18と差はなく, 脈管侵襲では ly(-) 2/8, ly(+)23/36と侵襲例の染色率が高い傾向がみられ, stage では I 1/4, II 11/16, III 3/6, IV 1/8, V/9/10 で, stage V では I~IV に比べ陽性率が有意に高かった。DNA ploidy pattern 別では, diploidy 11/14, aneuploidy 14/28で差はなかった。stage V で発現頻度が有意に高かったことから大腸癌における c-erbB-2蛋白の発現は遠隔転移と関連し, DNA ploidy とは独立した悪性度の指標となる可能性が推察された。

Key words: colorectal carcinoma, c-erbB-2 oncoprotein, DNA ploidy pattern

はじめに

近年, c-erbB-2遺伝子産物の発癌への関与, 悪性度との関連などが注目されているが¹⁾, 大腸癌に関する報告は少ない。今回われわれは, 大腸癌における c-erbB-2蛋白の発現と臨床病理学的諸因子および DNA ploidy pattern との関係について検討したので報告する。

対象と方法

1991年4月より1992年2月までの11か月の間に当科で経験した大腸癌切除症例44例(結腸癌31例, 直腸癌13例)を対象とした。新鮮組織を癌巣部より採取後直ちに-80℃に凍結し, 以下の解析の試料とした。

1) c-erbB-2蛋白発現の検索

4μの凍結組織切片を風乾し, 冷アセトンにて5分間固定後10%正常豚血清を20分間反応させた。1次抗体として抗 c-erbB-2蛋白モノクローナル抗体 (Triton Biosciences 社×10) を用い37℃で1時間反応させた。その後2次抗体としてペルオキシターゼ標識抗マウス抗体 (TAGO 社) で37℃1時間処理後, DAB にて発色し, メチルグリーンで核染色した。この標本を鏡し, 細胞膜に明瞭な DAB の反応を示す例を陽性とした。

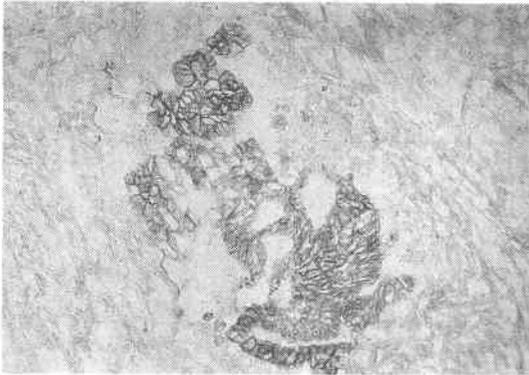
2) 腫瘍核 DNA 量の測定

凍結標本組織を解凍後1mm³に細切し, 0.05% collagenase で37℃で30分間 incubate し, さらにステンレスメッシュで濾過し, 単離細胞を得た。細胞浮遊液に A 液 (trypsin spermine) を加え²⁾室温で15分間静置した。次に B 液 (trypsin-inhibitor, RNase) を加え²⁾室温にて15分後に propidium iodide で核染色後, flow cytometer (FCAScan, BECTON DICKINSON 社製) で DNA ploidy を解析した。DNA ploidy は CV 値が 8%未滿の G₀/G₁ピークが1つのものを diploidy とし, 明らかな G₀/G₁ピークが2つ以上認められるものを aneuploidy とした。なお, 用語および臨床病理学的所見は大腸癌取扱規約³⁾に従い, 統計学的検討は χ^2 検定および t 検定を用い, 度数5未滿の場合 Fisher の直接確率計算法を使用し, 危険率5%未滿を有意とした。

成績

c-erbB-2蛋白は Fig. 1 (Well differentiated adenocarcinoma, ss, n(-), P₀, H₃の症例) のように大腸癌細胞膜に, あるいは症例によっては細胞質にも認められた。病巣全体に陽性所見のみられるものと一部にみられるものがあり, heterogeneity がみられたが, 部分的にみられた症例でも病巣の50%以上に陽性所見がみられた。このような陽性所見を示す症例は全44例中25例 (56.8%) であった。6例 (うち5例が蛋白陽性) につき erbB-2遺伝子の増幅の有無を South-

Fig. 1 Immunostaining of c-erbB-2 protein was observed in the membrane of colonic cancer cells.



ern blotting 法にて検索したが、全例遺伝子の増幅はみられなかった。臨床病理学的諸因子および DNA ploidy pattern と c-erbB-2 蛋白発現との関連は以下のごとくであった。

1) 腫瘍径

c-erbB-2 蛋白陰性例の腫瘍径は 5.8 ± 2.1 cm, c-erbB-2 蛋白陽性例の腫瘍径は 5.9 ± 2.4 cm で両群間に有意な差はみられなかった (Table 1).

2) 組織型

c-erbB-2 蛋白陽性率は高分化腺癌では 19/34 (55.9%), 中分化腺癌では 4/7 (57.1%), 低分化腺癌 1/2, 粘液癌では 1/1 であり, 高分化腺癌と中分化腺癌の間で差はみられなかった (Table 2).

3) 深達度

深達度別染色陽性率は m 0/1, sm 1/2, pm 1/2, ss (a₁) 6/10 (60%), s(a₂) 15/23 (65.2%), si(ai) 2/6 (33.3%) と統計学的に有意ではなかったが, 深達度 ss(a₁) 以上の症例では 23/39 (59.0%) と pm 以下の症例の 2/5 (40%) に比べやや陽性率が高かった (Table 3).

4) 組織学的リンパ節転移

リンパ節転移陰性例の染色陽性率は 16/26 (61.5%) で, リンパ節転移陽性例の染色陽性率 9/18 (50%) との間で有意な差はみられず, リンパ節転移との関連はみられなかった (Table 4).

5) リンパ管侵襲

染色陽性率は ly₀ 2/8 (25%), ly₁ 10/16 (62.5%), ly₂ 7/10 (70.0%), ly₃ 6/10 (60%) であり, リンパ管侵襲陽性例 (ly₁₋₃) の染色陽性率 23/36 (63.9%) はリンパ管侵襲陰性例 (ly₀) より染色率の高い傾向 (p <

Table 1 Relationship between tumor size and expression of c-erbB-2 oncoprotein

c-erbB-2 staining	n	Tumor size
Negative	19	5.8 ± 2.1
Positive	25	5.9 ± 2.4

Mean ± S.D. (cm)

] N.S.

Table 2 Relationship between histological type and expression of c-erbB-2 oncoprotein

Histological type	n	c-erbB-2 staining	
		Negative	Positive
Well differentiated	34	15	19
Moderately differentiated	7	3	4
Poorly differentiated	2	1	1
Mucinous	1	0	1

] N.S.

Table 3 Relationship between depth and expression of c-erbB-2 oncoprotein

Depth	n	c-erbB-2 staining	
		Negative	Positive
m	1	1	0
sm	2	1	1
pm	2	1	1
ss a ₁	10	4	6
s, a ₂	23	8	15
si, ai	6	4	2

] N.S.

Table 4 Relationship between nodal status and expression of c-erbB-2 oncoprotein

Nodal status	n	c-erbB-2 staining	
		Negative	Positive
Negative	26	10	16
Positive	18	9	9

] N.S.

0.1) がみられた (Table 5).

6) 静脈侵襲

染色陽性率は v₀ 9/17 (52.9%), v₁ 7/10 (70%), v₂ 6/10 (60.0%), v₃ 3/7 (42.9%) と静脈侵襲の程度による明らかな差はみられず, 静脈侵襲との関連はみられなかった (Table 6).

7) 組織学的進行程度

stage 別に染色陽性率をみると I 1/4 (25%), II 11/16 (68.8%), III 3/6 (50%), IV 1/8 (12.5%), V 9/

Table 5 Relationship between lymphatic vessel invasion and expression of c-erbB-2 oncoprotein

Lymphatic vessel invasion	n	c-erbB-2 staining		
		Negative	Positive	
ly ₀	8	6	2	} p<0.1
ly ₁	16	6	10	
ly ₂	10	3	7	
ly ₃	10	4	6	
		13	23	

Table 6 Relationship between venous invasion and expression of c-erbB-2 oncoprotein

Venous invasion	n	c-erbB-2 staining		
		Negative	Positive	
V ₀	17	8	9	} N.S.
V ₁	10	3	7	
V ₂	10	4	6	
V ₃	7	4	3	

Table 7 Relationship between stage and expression of c-erbB-2 oncoprotein

stage	n	c-erbB-2 staining		
		Negative	Positive	
I	4	3	1	} p<0.05
II	16	5	11	
III	6	3	3	
IV	8	7	1	
V	10	1	9	

10 (90%) と stage V では stage I~IV の陽性率16/34 (47.1%) より有意に (p<0.05) 高かった。stage V の陽性9例の内訳は H₂ 2例, H₃ 1例, P₁ 1例, P₃ 3例, H₂P₂ 1例および M (+) (肺転移) 1例であった (Table 7)。

8) DNA ploidy pattern

Aneuploidy の出現は不明2例を除くと42例中28例 (66.7%) にみられた。これを stage 別にみると I 3/4 (75.0%), II 6/16 (37.5%), III 5/5 (100%), IV 7/7 (100%), V 7/10 (70%) と stage III~V の19/22 (86.4%) は stage I, II の9/20 (45%) に比べ aneuploidy の割合が有意に (p<0.02) 高かった (Table 8)。c-erbB-2蛋白陽性率は diploidy 11/14 (78.6%), aneuploidy 14/28 (50.0%) で c-erbB-2蛋白染色性の有無と aneuploidy 出現との間に関連は認められなかった

Table 8 Relationship between stage and DNA ploidy pattern

stage	n	DNA ploidy		
		Diploidy	Aneuploidy	
I	4	1	3	} p<0.02
II	16	10	6	
III	5	0	5	
IV	7	0	7	
V	10	3	7	

Table 9 Relationship between DNA ploidy pattern and expression of c-erbB-2 oncoprotein

DNA ploidy	n	c-erbB-2 staining		
		Negative	Positive	
Diploidy	14	3	11	} N.S.
Aneuploidy	28	14	14	
Unknown	2	2	0	

(Table 9)。

考 察

近年、さまざまな悪性腫瘍において癌遺伝子の発現と予後との相関が報告され^{4)~7)}、中には神経芽細胞腫における N-myc 遺伝子のように予後判定の重要な指標となっている遺伝子も存在する⁸⁾⁹⁾。c-erbB-2遺伝子は乳癌や胃癌などの腺癌において増幅が報告され¹⁰⁾、胃癌における c-erbB-2遺伝子の増幅は Park ら¹¹⁾は7.8%に、田原ら¹²⁾は11.1%にみられたとしており、c-erbB-2蛋白は Falck ら¹³⁾によれば胃癌の19%に、米村ら¹⁴⁾によれば11.9%に発現がみられたとしている。最近、c-erbB-2蛋白の発現と乳癌の悪性度が相関することが知られるようになり¹⁵⁾¹⁶⁾、米村ら¹⁴⁾は胃癌でも予後と有意に相関すると報告している。大腸癌に関する検討は少ないが、大森ら¹⁷⁾はパラフィン包埋ブロックを用いた検討で蛋白発現頻度は肝転移陰性群で4.4%、肝転移群では、異時性43.8%、同時性20.7%であり、異時性・同時性肝転移群とも肝転移陰性群に比べ蛋白発現の頻度が有意に高く、c-erbB-2蛋白は大腸癌の肝転移に関与している可能性があるとして報告している。

われわれの成績では染色陽性率は56.8%と大森ら¹⁷⁾の報告より高かったが、これは抗原性の失活の少ない凍結標本を使用したため¹⁸⁾と思われる。また Southern blotting 法による c-erbB-2癌遺伝子の増幅の有無の検

計では検討対象の6例中5例が蛋白陽性であったにもかかわらず、全例遺伝子の増幅は認められなかった。乳癌では c-erbB-2 DNA が single copy でも免疫組織学的に検索すると細胞膜に c-erbB-2 蛋白が認められる例がある¹⁹⁾としており、このような癌における c-erbB-2 蛋白は DNA の増幅していない例でも発現していると考えられる。

臨床病理学的諸因子との検討では stage I~IV においては stage の進行とともに c-erbB-2 蛋白の発現の頻度が高くなる傾向はなく、stage を規定する因子としての深達度、組織学的リンパ節転移とも有意な関連はみられなかった。しかし遠隔転移を有する stage V では stage I~V に比べ染色陽性率が有意に高かった。これは前述した大森ら¹⁷⁾の肝転移に関する報告と同様の傾向であり、c-erbB-2 蛋白の発現が遠隔転移に關与している可能性が推察された。組織型に関して胃癌では分化型腺癌に有意に発現が認められ²⁰⁾、c-erbB-2 蛋白の発現は胃癌細胞の分化度を反映している²⁰⁾と述べている報告もみられる。今回の大腸癌の検討では高分化腺癌と中分化腺癌の間で差はみられなかった。

DNA ploidy は多くの腫瘍において患者の予後因子として重要であると報告され²¹⁾²²⁾、大腸癌でもリンパ節転移の高度な症例や病期の進んだ症例で aneuploidy の出現率が高いとする報告²³⁾や aneuploidy は diploidy より予後不良とする報告が多くみられる^{23)~25)}。著者らの検討でも stage III~V では大部分の症例が aneuploidy であった。DNA ploidy と c-erbB-2 蛋白発現に關し大森ら¹⁷⁾は染色体の量的異常と質的異常という異なる現象を検出するもので相関関係は無いと述べているが、われわれの症例でも同様の結果であった。

以上より大腸癌において c-erbB-2 蛋白発現が遠隔転移に關与している可能性が推察され、DNA ploidy とは独立した悪性度の指標となることが示唆された。今後症例を重ね、予後との関連の有無も明らかにしていきたいと考えている。

文 献

- 1) 豊島久真男: C-erbB-2 とがん。癌と化療 17: 309-314, 1990
- 2) Vindelov LL, Christensen IJ, Nissen NI: A detergent-trypsin method for the preparation of nuclei for flow cytometric DNA analysis. Cytometry 3: 323-327, 1983
- 3) 日本大腸癌研究会編: 大腸癌取扱い規約, 改訂第4版。金原出版, 東京, 1985
- 4) Ohouchi N, Hand PH, Merlo G et al: Enhanced expression of c-Ha-ras p21 in human stomach adenocarcinomas(aderocarcinomas とする) defined by immunoassays using monoclonal antibodies and in situ hybridization. Cancer Res 47: 1413-1420, 1987
- 5) Garcia I, Dietrich PY, Aapro M et al: Genetic alterations of c-myc, c-erbB-2, and c-Ha-ras protooncogenes and clinical associations in human breast carcinomas. Cancer Res 49: 6675-6679, 1989
- 6) Yonemura Y, Sugiyama K, Fujimura T et al: Epidermal growth factor receptor status and S-phase fractions in gastric carcinoma. Oncology 46: 158-161, 1989
- 7) Ozawa S, Ueda M, Ando O et al: High incidence of EGF receptor hyperproduction in esophageal squamous-cell carcinomas. Int J Cancer 39: 333-337, 1987
- 8) Brodeur GM, Seeger RC, Schwab H et al: Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advance disease stage. Science 224: 1121-1124, 1984
- 9) 嶋武博之, 塚原哲夫, 中川千鶴: 臨床に有用な遺伝子 N-myc 遺伝子。臨検査 33: 1308-1309, 1989
- 10) 横田 淳, 山本 雅: ヒト腺がんにおける c-erbB-2/neu 遺伝子の活性化。渋谷正史, 山本 雅編。がん遺伝子の研究—最近の進歩。中外医学社, 東京, 1988, p70-77
- 11) Park JB, Rhim JS, Park SC et al: Amplification, overexpression and rearrangement of the erbB-2 protooncogene in primary human stomach carcinomas. Cancer Res 49: 6605-6609, 1989
- 12) 田原栄一: オンコジン。癌と化療 16: 2149-2155, 1989
- 13) Falk VG, Gullick W: c-erbB-2 oncogene product staining in gastric adenocarcinoma. An immunohistochemical study. J Pathol 159: 107-111, 1989
- 14) 米村 豊, 二宮 致, 大山繁和ほか: 胃癌における erbB-2 タンパクの発現とリンパ節転移. Oncologia 24: 75-81, 1991
- 15) Wright C, Anngus B, Nicholson S et al: Expression of c-erbB-2 oncoprotein: A prognostic indicator in human breast cancer. Cancer Res 49: 2087-2090, 1989
- 16) Walker RA, Gullick WJ, Valey JM: An evaluation of immunoreactivity for cerbB-2 protein as a marker of poor short-term prognosis in breast cancer. Br J Cancer 60: 426-429, 1989
- 17) 大森一吉, 内野純一, 近藤征文ほか: 大腸癌にお

- る肝転移再発の予知—原発巣の病理組織学的所見, c-erbB-2 蛋白および腫瘍核 DNA 量からの検討. 日消外会誌 24 : 2963—2969, 1991
- 18) 梶 寛: 市販抗体および抗原に関する一般的問題点. 渡辺慶一, 中根一穂 編. 酵素抗体法, 学際企画, 東京, 1985, p168—185
- 19) Venter DJ, Tuzi NL, Kumar S et al: Over expression of the c-erbB-2 oncoprotein human breast carcinomas: Immunohistological assessment correlates with gene amplification. Lancet 11 : 69—71, 1987
- 20) 岩田啓吾: スキルス胃癌における免疫組織化学的検討—TGF- β , PDGF, I 型プロコラーゲンおよび c-erbB-2 遺伝子産物の発現・局在について—. 聖マリアンナ医大誌 18 : 734—742, 1990
- 21) Friedlander ML, Hedley DW, Taylor IW et al: Influence of cellular DNA content on survival in advanced ovarian cancer. Cancer Res 44 : 397—400, 1984
- 22) Hedley DW, Rugg CA, Gelber RD: Association of DNA index and S-phase fraction with prognosis of nodes positive early breast cancer. Cancer Res 47 : 4729—4735, 1987
- 23) 辻田和紀, 船橋公彦, 渡邊正志ほか: Flow cytometry による大腸癌核 DNA 量測定の意義. 日消外会誌 24 : 2176—2182, 1991
- 24) Kokal WA, Gardine RI, Morris P et al: Tumor DNA content in resectable primary colorectal carcinoma. Ann Surg 209 : 188—193, 1989
- 25) 小坂健夫, 伊井 徹, 松本 尚ほか: FCM をもちいた DNA PLOidy および DNA Index と大腸癌の予後に関する検討. 日本大腸肛門病会誌 40 : 734—740, 1987

Correlationship Between c-erbB-2 Protein Expression and Clinical Outcome in Colorectal Cancer

Shiro Nakae, Tomoaki Urakawa and Kiyoshi Uematsu
Department of Surgery, Kobe Rosai Hospital

Forty-four frozen samples of surgically removed colorectal cancer were subjected to: (1) c-erbB-2 protein staining with a monoclonal antibody to c-erbB-2 protein and (2) analysis of nuclear DNA content by flow cytometry. The overall c-erbB-2 protein-positive rate was 25/44 (56.8%). There was no significant difference in the rate between well-differentiated adenocarcinoma (19/34), moderately differentiated adenocarcinoma (4/7). In relation to the depth of cancer, the incidence of c-erbB-2 protein was 0/1 in m cases, 1/2 in sm cases, 1/2 in pm cases, 6/10 in ss (a₁) cases, 15/23 in s (a₂) cases, and 2/6 in si (ai) cases. There was also no significant difference in the rate between patients without (16/26) and those with lymph node metastasis (9/18). The incidence tended to be higher in cases with lymphatic vessel invasion: 2/8 in ly₀ cases, 23/36 in ly₁₋₃ cases. The incidence was 1/4 at stage I, 11/16 at stage II, 3/6 at stage III, 1/8 at stage IV and 9/10 at stage V. Aneuploidy was observed in 28/42 cases. The incidence of c-erbB-2 protein did not differ significantly in diploidy cases (11/14) from that in aneuploidy cases (14/28). These results suggest that the expression of c-erbB-2 protein in colorectal cancer is associated with distant metastasis, and that it serves as an index of the malignancy level of colorectal cancer independent of DNA ploidy patterns.

Reprint requests: Shiro Nakae
2-4-28 Minami-Mukonosu, Amagasaki-shi, 661 JAPAN