

## 消化器癌でのリンパ節転移と癌遺伝子発現, どちらがより有力な予後因子か

長崎大学医学部第2外科

元島 幸一 兼松 隆之

胃癌, 胆管癌, 膵癌を対象として, リンパ節転移と癌関連遺伝子発現のどちらがより有力な予後因子であるかを検討した. 切除標本のパラフィン切片と c-myc, p53, K-ras, erbB-2, epidermal growth factor receptor (EGFR), EGF, TGF $\alpha$  抗体を用い, 免疫組織学的に検討した. 単変量解析は generalized Wilcoxon method, 多変量解析には Cox model を用いた. 単変量解析で有意な予後因子は, 胃癌120例では全因子, 進行胃癌80例ではリンパ節転移, K-ras, EGF, TGF $\alpha$  であった. 進行胃癌の35例の再発死亡について多変量解析を行うと, リンパ節転移 ( $p=0.012$ ) のみが有意で独立した予後因子であった. 胆管癌60例の単変量解析では, リンパ節転移, erbB-2, EGFR, TGF $\alpha$ , 膵管癌57例ではリンパ節転移と EGFR が有意な予後因子であった. 胆管癌, 膵管癌での2年以内の早期再発死亡についての多変量解析で, 胆管癌, 膵管癌のいずれでも EGFR が有意で独立した予後因子であった.

**Key words:** prognostic factor, nodal involvement, oncoprotein expression

### はじめに

リンパ節転移は消化器癌の重要な予後因子として長い間活用されている. 最近, 急速な進歩を遂げている癌遺伝子研究により, 癌遺伝子が新たな予後因子として注目され, 原発臓器に特異な癌遺伝子発現が, 有力な予後因子として認められつつある.

今回, 胃癌, 胆管癌, 膵癌を対象として, リンパ節転移と癌遺伝子発現のどちらがより有力な予後因子であるかを検討した.

### 対象と方法

対象症例数は胃癌120例, 胆管癌60例, 膵管癌57例である. 胃癌症例は治癒切除後5年以上経過症例である. 胆管癌では治癒, 非治癒切除を問わないで切除症例を対象とした. 膵管癌では膵島腫瘍や膵嚢胞腺癌を除く膵管癌切除症例57例を対象症例とした. リンパ節転移の有無は組織学的診断に基づいた.

切除標本のパラフィン切片と癌遺伝子産物に対する抗体を用い, 免疫組織学的に検討した. 用いた抗体は抗 c-myc monoclonal 抗体<sup>2)</sup>(長崎大学腫瘍医学), 抗

p53 monoclonal 抗体<sup>3)</sup>(PAb1801, Oncogene Science 社), 抗 K-ras monoclonal 抗体<sup>3)</sup>(長崎大学腫瘍医学), 抗 erbB2 monoclonal 抗体<sup>4)</sup>(NTH), 抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) polyclonal 抗体<sup>5)</sup>(Oncogene Science 社), 抗 epidermal growth factor (EGF) monoclonal 抗体<sup>6)</sup>(湧永製薬), 抗 transforming growth factor (TGF)  $\alpha$  monoclonal 抗体<sup>7)</sup>(Oncogene Science 社) である. 染色方法は ABC 法で, 癌細胞の20%以上が染色された標本を陽性, 20%未満を陰性と判定した.

リンパ節転移や癌遺伝子蛋白の発現と予後との関連を統計学的に検定し, より有力な予後因子の特定を試みた. 単変量, 多変量解析の2段階の検定を行い, 単変量解析は generalized Wilcoxon method, 多変量解析は Cox proportional hazard regression method<sup>8)</sup>を用いた.

### 結 果

1. 胃癌での各予後因子の陽性率: 胃癌 stage ごとの陽性率を **Table 1** に示す. リンパ節転移の強い有意差は規約上の条件からである. c-myc, p53では stage 間の陽性率に有意差を認めなかった. K-ras, erbB-2, EGFR, EGF, TGF $\alpha$  の stage I と II または III 間での陽性率に有意差を認めた. しかし, stage II と III 間での陽性率にはどの予後因子についても差を認めなかった.

\*第41回日消外会総会シンポジウム・消化器癌の新しい予後因子—細胞生物学的並びに分子生物学的アプローチ  
<1993年6月14日受理>別刷請求先: 元島 幸一  
〒852 長崎市坂本町1-7-1 長崎大学医学部第2外科

**Table 1** Positive rate of prognostic variables in gastric, bile duct, and pancreatic carcinomas in each stage

Gastric carcinomas (n=120)					
Variables	I (n=54)	II (n=18)	III (n=45)	IV (n=3)	Chi-square
Nodal invol	0(0%)	12(67%)	39(87%)	3(100%)	p<0.0001
c-myc	30(56%)	13(72%)	33(73%)	1(33%)	NS
p53	9(17%)	7(39%)	15(33%)	2(67%)	NS
K-ras	15(28%)	11(61%)	29(64%)	1(33%)	p<0.01
erbB-2	4(7%)	7(39%)	21(47%)	1(33%)	p<0.01
EGFR	11(20%)	11(61%)	21(47%)	2(67%)	p<0.01
EGF	11(20%)	9(50%)	25(56%)	2(67%)	p<0.01
TGF $\alpha$	7(13%)	9(50%)	24(53%)	2(67%)	p<0.01
Bile duct carcinomas (n=60)					
Variables	I (n=9)	II (n=11)	III (n=20)	IV (n=20)	Chi-square
Nodal invol	0(0%)	3(27%)	9(45%)	16(80%)	p<0.0001
c-myc	4(44%)	8(73%)	13(65%)	17(85%)	NS
p53	4(44%)	8(73%)	14(70%)	17(85%)	NS
K-ras	4(44%)	9(82%)	17(85%)	17(85%)	NS
erbB-2	3(33%)	3(27%)	13(65%)	15(75%)	p<0.05
EGFR	2(22%)	8(73%)	12(60%)	15(75%)	p<0.01
EGF	4(44%)	3(27%)	10(50%)	8(40%)	NS
TGF $\alpha$	3(33%)	7(64%)	15(75%)	13(65%)	NS
Pancreatic carcinomas (n=57)					
Variables	II (n=11)	III (n=23)	IV (n=23)	Chi-square	
Nodal invol	8(73%)	17(74%)	17(74%)	NS	
c-myc	9(82%)	17(74%)	18(78%)	NS	
p53	7(64%)	12(52%)	14(61%)	NS	
K-ras	9(82%)	20(87%)	23(100%)	NS	
erbB-2	5(45%)	8(35%)	7(30%)	NS	
EGFR	7(64%)	14(61%)	16(70%)	NS	
EGF	5(45%)	10(43%)	12(52%)	NS	
TGF $\alpha$	9(82%)	16(70%)	19(83%)	NS	

Nodal invol; Nodal involvement, NS; not significant

胃癌での各予後因子ごとの単変量解析：各予後因子ごとに陽性率と陰性群間で単変量解析を **generalized Wilcoxon** 法で行うと、胃癌120例では、すべての予後因子に有意差を認めた。このため、より激しい条件付けを行い、進行胃癌80例について、各予後因子ごとに陽性群と陰性群間で **univariate analysis** を行った。この進行胃癌80例では35例が再発死亡していた。その結果、リンパ節転移、K-ras、EGFで  $p<0.01$ 、TGF $\alpha$ で  $p<0.05$ をもって陽性群の予後が陰性群に比べ不良であった (**Table 2**)。

胃癌での各予後因子ごとの多変量解析：進行胃癌80例中35例の再発死亡について独立して有意に関連する予後因子を検定する目的で、多変量解析を行った。その結果、リンパ節転移 ( $p=0.012$ ) のみが有意で独立

した予後因子であった。胃癌の組織型、再発時期などについても検定したが、独立した有意な予後因子はリンパ節転移因子以外には存在しなかった (**Table 3**)。

2. 胆管癌での各予後因子の陽性率：胆管癌 **stage** ごとの陽性率を **Table 1** に示す。リンパ節転移に強い有意差は規約上の条件による。c-myc、p53、K-ras、EGF、TGF $\alpha$  では **stage** 間での陽性率に有意差を認めなかった。erbB-2の **stage II** と **IV** ( $p<0.05$ )、EGFRの **stage I** と **IV**間 ( $p<0.01$ ) での陽性率に有意差を認めた。

胆管癌での各予後因子ごとの単変量解析：胆管癌60例中45例が再発死亡した。この胆管癌60例について各予後因子ごとに陽性群と陰性群間で **generalized Wilcoxon** 検定を行うと、リンパ節転移 ( $p<0.01$ )、erbB-2

**Table 2** Results of univariate analysis in each prognostic variable in gastric, bile duct, and pancreatic carcinomas

Advanced gastric carcinoma (n=80)		
Variables	Positive rates (%)	Generalized wilcoxon
Nodal invol	53(66%)	p<0.01
c-myc	54(68%)	NS
p53	24(30%)	NS
K-ras	47(58%)	p<0.01
erbB-2	32(40%)	NS
EGFR	38(48%)	NS
EGF	40(50%)	p<0.01
TGF $\alpha$	41(51%)	p<0.05
Bile duct carcinoma (n=60)		
Variables	Positive rates (%)	Generalized wilcoxon
Nodal invol	28(47%)	p<0.05
c-myc	42(70%)	NS
p53	45(75%)	NS
K-ras	48(80%)	NS
erbB-2	35(58%)	p<0.01
EGFR	37(62%)	p<0.01
EGF	25(42%)	NS
TGF $\alpha$	40(67%)	p<0.01
Pancreatic carcinoma (n=57)		
Variables	Positive rates (%)	Generalized wilcoxon
Nodal invol	40(70%)	p<0.05
c-myc	44(77%)	NS
p53	34(60%)	NS
K-ras	51(89%)	NS
erbB-2	17(30%)	NS
EGFR	36(63%)	p<0.01
EGF	28(49%)	NS
TGF $\alpha$	43(75%)	NS

Nodal invol ; Nodal involvement, NS ; not significant

(p<0.01), EGFR (p<0.01), TGF $\alpha$  (p<0.01)の4因子について、陽性群の予後が陰性群に比べ有意に不良であった (Table 2).

胆管癌での各予後因子ごとの多変量解析：再発死亡の時期を問わないで再発死亡について多変量解析を行うと、erbB-2 (p=0.005)のみが独立した有意の予後因子であった。同様に、早期再発死亡として、2年以内再発死亡について multivariate analysisを行うと、EGFR (p=0.015)とリンパ節転移 (p=0.019)が有意で、独立した予後因子であった。erbB-2(p=0.116)は2年以内の早期再発死亡には関連がなかった

**Table 3** Results of multiivariate analysis in prognostic variables in patients with gastric, bile duct, and pancreatic carcinomas

Recurrent death of patients with advanced gastric carcinoma (n=80)		
Variables	Hazard ratio	p value
Nodal invol	2.57	0.012
K-ras	1.25	0.216
EGFR	1.18	0.244
Rapid recurrent death of patients with bile duct carcinoma (n=60)		
Variables	Hazard ratio	p value
EGFR	2.53	0.015
Nodal invol	2.42	0.019
erbB-2	1.60	0.116
Rapid recurrent death of patients with pancreatic carcinoma (n=57)		
Variables	Hazard ratio	p value
EGFR	3.50	0.001
Nodal invol	2.23	0.030

Nodal invol ; Nodal involvement

(Table 3).

3. 膵管癌での各予後因子の陽性率：膵管癌 stageごとの陽性率を Table 1 に示す。膵管癌57例には stage I 症例は1例もなかった。リンパ節転移を含め全ての因子について stage 間での陽性率に有意差を認めなかった。

膵管癌での各予後因子ごとの単変量解析：膵管癌57例中53例が再発死亡した。膵管癌症例について各予後因子ごとに陽性群と陰性群間で generalized Wilcoxon 検定を行うと、リンパ節転移 (p<0.05)とEGFR (p<0.01)の2項目について陽性群の予後が陰性群に比べ有意に不良であった (Table 2).

膵管癌での各予後因子ごとの多変量解析：再発死亡について多変量解析を行うと、リンパ節転移 (p=0.007)のみが有意で、独立した予後因子であった。同様に、早期再発死亡として、2年以内再発死亡について多変量解析を行うと、EGFR (p=0.001)とリンパ節転移 (p=0.030)が有意で独立した予後因子であった (Table 3).

### 考 察

最近の癌遺伝子に関する研究は、飛躍的な進歩を遂げている。発癌や進展には point mutation, amplification などによる癌遺伝子の活性化と dele-

tion, splicing などによる癌抑制遺伝子の失活が複雑に関連することが多くの癌腫で認められている。最近ではこれらの癌遺伝子、癌抑制遺伝子の過剰発現をモノクローナル抗体で検出可能な遺伝子も少なくない。今回検討した7つの癌遺伝子関連産物を区分すると、癌遺伝子として分類される c-myc, K-ras, erbB-2, 癌抑制遺伝子であり、癌細胞内の核に蓄積異常として発現する p53, そして EGFR, EGF, TGF $\alpha$  は発癌との関連は不明であるが、代表的な増殖因子とそのレセプターである。

従来より、リンパ節転移は有力な予後因子とされてきた。有力な予後因子は進行度分類に活用され、TNM 分類や Dukes 分類はリンパ節転移を主要な因子とした進行度分類である。リンパ節転移以外の胃癌での予後因子として、漿膜浸潤、腫瘍径、リンパ管や静脈浸潤などの臨床病理学的因子、最近では DNA ploidy pattern, bromodeoxyuridine (BrdU)<sup>9)</sup>, proliferating cell nuclear antigen (PCNA)<sup>10)</sup>などの増殖能を観察できる marker が報告されている。また、胆管癌では、リンパ節転移、肝内直接浸潤、膵臓浸潤、十二指腸浸潤などが予後因子として挙げられている。リンパ節転移は、占居部位を問わない胆管癌に共通した stage 決定因子、予後因子である。膵癌でも、リンパ節転移、門脈浸潤、後腹膜浸潤は予後に関連する因子として報告されている。しかし、これらのリンパ節転移以外の予後因子が、リンパ節転移よりも有力であるとする報告はほとんどない。こうしたことより、リンパ節転移の予後因子としての重要性をよく理解できる。今回、胃癌、胆管癌、膵癌を対象として、臨床的に有用性の高い予後因子であるリンパ節転移と、これらの癌腫に発現する癌遺伝子蛋白のどちらがより有力な予後因子であるか検討した。

まず、胃癌症例120例での有リンパ節転移群の5生率は44%で、無リンパ節転移群の5生率は93%であり、強い有意差 ( $p < 0.001$ ) を認めた。同様に、進行胃癌のみの80例でも有リンパ節転移の群と無リンパ節転移群間の生存期間に有意差 ( $p < 0.01$ ) を認めた。また、胆管癌 ( $p < 0.05$ )、膵癌 ( $p < 0.05$ ) でもリンパ節転移陽性は有意な予後不良因子であった。今回対象した胃癌、胆管癌、膵癌のいずれでもリンパ節転移は、univariate analysis で有意な予後因子であった。

癌関連遺伝子産物のなかで、進行胃癌組織に発現して進行胃癌患者の予後に有意に関連した遺伝子産物は、K-ras, EGF, TGF $\alpha$  であった。Ras family on-

cogene の機能はいまだに十分解明されていないが、増殖に関係するレセプター刺激の伝導路に位置するので増殖能を反映すると考えられる。EGF, TGF $\alpha$  は増殖因子であり、そのレセプターは EGFR である。これらの増殖因子陽性が不良な予後に関連することは、以前にも報告されている<sup>11)</sup>。さらには、胃癌培養株を用いて、これらの増殖因子と EGFR の両方の mRNA の過剰発現を証明して autocrine system の存在を強く示唆する報告がなされている<sup>12)</sup>。

同様に、胆管癌切除例60例では erbB-2, EGFR, TGF $\alpha$  が有意な予後因子であった。erbB-2の発現は分化度の高い腺癌に高頻度に認められる。胆管癌の組織型のほとんどが分化型腺癌であるので、胆管癌での erbB-2陽性率は高率になると考えられた。erbB-2蛋白は細胞膜に局在して、EGFR と同様に増殖因子のレセプターと考えられている。しかし、リガンドはいまだに明確でなく、gp30が有力候補にとどまっている<sup>13)</sup>。ErbB-2レセプターも autocrine system を営む可能性が推定されている。EGFR, TGF $\alpha$  の同時発現例が多数を占め、胆管癌での主な増殖機転が EGFR, TGF $\alpha$  の autocrine であり、この autocrine system の作動が予後不良に関連することが示唆された。

Univariate analysis で、膵癌の予後と有意に関連した癌関連遺伝子は EGFR のみであった。EGFR 陽性率は63%で、そのリガンドである TGF $\alpha$  または EGF との同時陽性率は約60%を占めた。さらに、膵癌培養株を用いて、これらの増殖因子と EGFR の両方の mRNA の過剰発現を証明して autocrine system の存在を強く示唆する報告が、以前から報告されている<sup>14)</sup>。

再発死亡と予後との関連を Cox のモデルを用いて重回帰分析すると、進行胃癌80例での再発死亡を独立して有意に指摘できたのはリンパ節転移のみで、癌遺伝子発現は有意でなかった。この結果は癌関連遺伝子の発現と胃癌の組織型に関連性があると考えられる。つまり、分化型胃癌での癌関連遺伝子発現は高頻度である。一方、スキルスなどの低分化型での発現は乏しい。そして、低分化型の予後は不良であるため、癌遺伝子の発現は再発死亡に関連しないという結果になったと考えられた。進行胃癌でのリンパ節転移は組織型などに左右されないため、最も強力な独立した予後因子になったと考えられた。今回の重回帰分析で、膵癌、胆管癌の2年以内の早期再発予知に EGFR 発現が有用であると判明した。これらの癌部には EGFR の増殖因子が同時発現していたので autocrine system の存

在が示唆された。Autocrine system が作動した癌では、浸潤、転移しても、新たな環境の支配を受けないで増殖でき、肺癌での広範な転移巢の成立に autocrine system が、関係すると考えられた。

従来の病理組織学的予後因子は予後予知に有用であっても、癌の予防や治療には全くつながらなかった。しかし、原発臓器に特異な予後因子を癌遺伝子に求めることで、その癌腫での発癌や進展の機構を解明できるようになった。発癌機構の解明は癌の予防に、進展機構の解明は治療につながる可能性がある。癌関連遺伝子を用いた予後因子の解明は、こうした観点から重要であると考えられる。

#### 文 献

- 1) Naoe T, Nozaki N, Yamada K et al: Diversity of cellular molecules in human cells detected by monoclonal antibodies reactive with c-myc proteins produced in Escherichia coli. *Jpn J Cancer Res* 80 : 747—753, 1989
- 2) Banks L, Matlashewski G, Crawford L: Isolation of human-p53 specific monoclonal antibodies and their use in the studies of human p53 expression. *Eur J Biochem* 159 : 529—534, 1986
- 3) Yoshida K, Hamatani K, Koide H et al: Preparation of anti-ras Mr 21,000 protein monoclonal antibodies and immunohistochemical analyses on expression of ras genes in human stomach and thyroid cancers. *Cancer Res* 48 : 5503—5509, 1988
- 4) Fendly BM, Winget M, Hudziak RM et al: Characterization of murine monoclonal antibodies reactive to either the human epidermal growth factor receptor or HER2/neu gene product. *Cancer Res* 50 : 1550—1558, 1990
- 5) Gullick WJ, Downward J, Parker PJ et al: The structure and function of the EGFR studied by using antisynthetic peptide antibodies. *Proc R Soc London* 226 : 127—134, 1985
- 6) Tsukitani K, Tatemoto Y, Noda Y et al: Immunohistochemical detection of human epidermal growth factor in submandibular glands and their tumors using a polyclonal antiserum and monoclonal antibody. *Histochemistry* 87 : 293—300, 1987
- 7) Srivillo JM, McCormack ES, Yanez L et al: Preparation and characterization of monoclonal antibodies specific for human transforming growth factor alpha. *Oncogene* 5 : 377—386, 1990
- 8) Cox DR: Regression models and life-tables. *J R Stat Soc [B]* 34 : 187—220, 1972
- 9) Gratzner HG: Monoclonal antibody to 5-bromo- and -5-iododeoxyuridine: A new reagent for detection of DNA replication. *Science* 218 : 474—476, 1982
- 10) Miyachi K, Fritzler M, Tan E: Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunology* 121 : 2228—2334, 1978
- 11) Yasui W, Hata J, Yokozaki H et al: Interaction between epidermal growth factor and its receptor in progression of human gastric carcinoma. *Int J Cancer* 41 : 211—217, 1988
- 12) Yosida K, Kyo E, Tsujino T et al: Expression of epidermal growth factor, transforming growth factor- $\alpha$  and their receptor genes in human gastric carcinoma; Implication for autocrine growth. *Jpn J Cancer Res* 81 : 43—51, 1990
- 13) Lupu R, Colomer R, Zugmaier G et al: Direct interaction of a ligand for the erbB-2 oncogene product with the EGF receptor and p185erbB-2. *Nature* 249 : 1552, 1990
- 14) Smith JJ, Derynck R, Korc M: Production of transforming growth factor alpha in human pancreatic cancer cells: Evidence for a superagonist autocrine cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* 84 : 7567—7570, 1987

### Evaluation of Nodal Involvement and Expression of Oncoprotein as Prognostic Factors in Gastric, Bile duct, and Pancreatic carcinomas

Koichi Motojima and Takashi Kanematsu

Second Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine

Recent studies have shown that oncoprotein expression is correlated with poor prognosis of cancer patient. To evaluate the importance of nodal involvement and oncoprotein expressions as prognostic factors, we analyzed 80 patients with advanced gastric, 60 patients with pancreatic carcinomas by immunohistologic assay. Nodal involvement was the most important prognostic indicator in gastric cancer. High incidences of EGFR expression were shown in bile duct and pancreatic carcinoma. Survival of patients with EGFR-positive cancer was shorter than those with EGFR-negative cancer. These results suggested that EGFR expression is of prognostic value in the recurrence of bile duct and pancreatic carcinomas.

**Reprint requests:** Koichi Motojima Second Department of Surgery, Nagasaki University School of Medicine 1-7-1 Sakamoto, Nagasaki, 852 JAPAN