

## 消化器癌における分子生物学的パラメーターの 予後因子としての有用性

慶應義塾大学医学部外科学教室, 東京電力病院外科\*

上田 政和 菊池 潔\* 安藤 暢敏  
都築 俊治 北島 政樹

消化器癌における分子生物学的パラメーターの予後因子としての有用性を明らかにすることを目的として, 癌遺伝子増幅の有無と予後や再発など癌患者の臨床像との関連を解析した. その結果食道癌では, int-2およびc-erb B 癌遺伝子増幅が, 胃癌ではint-2およびc-erb B-2癌遺伝子増幅が高率に認められたが, 大腸癌や肝細胞癌では, いずれの癌遺伝子も増幅頻度は10%以下であった. 食道癌, 胃癌ではint-2増幅群で術後累積生存率が低下し, さらに食道癌では遠隔臓器転移が, 胃癌では腹膜転移と遠隔臓器転移が非増幅群に比較して有意に高率であった. c-erb B 癌遺伝子増幅は食道癌で高率にみられたが, これらの症例ではいずれも手術時にリンパ節転移がみられ, しかも術後5年生存率は低下していた. 以上, 分子生物学的的手法により癌遺伝子増幅を検索することにより, 癌患者の治療上重要な情報を得ることが可能であり, 有用な腫瘍マーカーであることが明らかにされた.

**Key words:** oncogene amplification, prognostic factor, cancer in digestive organ

### はじめに

癌は遺伝子の異常により生じる疾患であり, 遺伝子異常の蓄積より発生・進展することが, 近年の分子生物学の進歩により明らかにされてきた. したがって, 遺伝子異常の有無と予後や再発など癌患者の臨床像とは密接な関連が存在すると予想される. 一方, 消化器癌に対する治療法は現在まで, 主としてTNM分類に基づいた病巣の広がりや病理組織学的所見から決定されてきたが, これらの情報のみでは必ずしも十分ではない. 例えば, 従来予後判定因子では良好と考えられる症例でも, 早期に再発・転移をきたす症例に我々臨床医はしばしば遭遇する. そこで, 分子生物学的パラメーターにより癌の生物学的悪性度を予測し, 癌治療の有力な武器とするために, 手術時もしくは術前内視鏡下生検時に得られた癌組織について癌遺伝子異常を測定し, 手術時所見や術後累積生存率または再発部位など臨床腫瘍学的特性と比較検討した.

### 対象と方法

対象は食道癌107例, 胃癌97例の手術時に得られたホルマリン固定パラフィン包埋標本と, 食道癌43例, 胃癌34例, 大腸癌20例, 肝細胞癌40例の手術もしくは内視鏡下に生検により得られた新鮮凍結標本である. 胃癌ホルマリン固定パラフィン標本はいずれも進行癌症例のみであった. ホルマリン固定パラフィン標本よりのDNA抽出は, 既に報告した方法により行った<sup>1)</sup>. 以下略記すると, パラフィン標本より5枚以上の連続切片を作製し, 一枚についてはHE染色を行い鏡検下に癌部を同定しマッピングしたのち, 他の未染スライドより癌部に一致する部位を集めて脱パラフィン後にDubeauら<sup>2)</sup>の方法にしたがってDNAを抽出した. 新鮮凍結標本よりのDNA抽出は, chloroform-phenol-isoamylalcohol法により行った. DNA濃度はspectrophotometryにより測定し, 10 $\mu$ gのDNAをpolyvinylidene difluoride filterにアブライした. 増幅を検討したのは, int-2, c-erb B, c-erb B-2, c-myc癌遺伝子で, それぞれのプローブはSS6, pE7, pKX044, pMyc6514を使用し, オリゴラベリングシステムを用いたマルチプライムラベリングでラベルした<sup>3)</sup>.

Denhardt's solutionで2時間42度でプレハイブリ

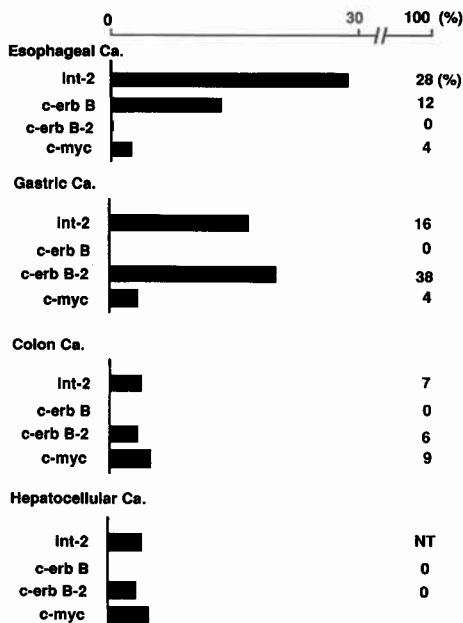
\*第41回日消外会総会シンポジウム・消化器癌の新しい予後因子—細胞生物学的並びに分子生物学的アプローチ—  
<1993年6月14日受理>別刷請求先: 上田 政和  
〒160 新宿区信濃町35 慶應義塾大学医学部外科

を行った後、ラベルしたプローブと12時間42度でハイブリダイゼーションを行った。3倍以上の遺伝子コピー数の増加がみられる症例を増幅例と判定した。ホルマリン固定パラフィン標本については retrospective に、内視鏡下に生検により得られた新鮮凍結標本については prospective に根治術後の累積生存率あるいは再発や再発部位との検討を行った。

**結 果**

新鮮凍結標本について、各種癌遺伝子を検討した (Fig. 1)。食道癌においては int-2, c-erb B, c-erb B-2, c-myc 癌遺伝子の増幅は、それぞれ28%, 12%, 0%, 4%と int-2癌遺伝子の増幅が最も高頻度であり、c-erb B 癌遺伝子がそれに次ぎ約1割程度の増幅が認められたが、c-erb B-2や c-myc 癌遺伝子の増幅はほとんどみられなかった。一方、胃癌においては int-2, c-erb B, c-erb B-2, c-myc 癌遺伝子の増幅は、それぞれ16%, 0%, 22%, 3%と食道癌症例とは異なり、c-erb B-2が最も高頻度であり、それに次いで int-2癌遺伝子の増幅が高頻度であった。大腸癌や肝細胞癌について検討すると、大腸癌では int-2, c-erb B, c-erb B-2, c-myc 癌遺伝子の増幅はそれぞれ7%, 0%, 6%, 9%で、肝細胞癌では c-erb B, c-erb B-2, c-myc 癌遺伝子の増幅は0%, 0%, 7%であった。

**Fig. 1** Incidence of oncogene amplification in various cancer

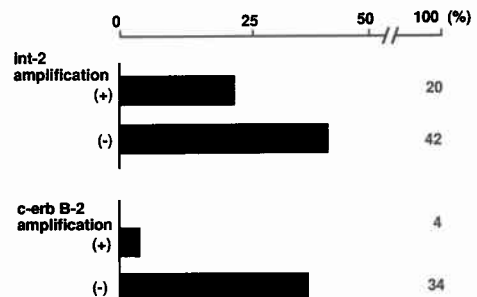


いずれも c-myc 癌遺伝子が最も高頻度ではあったが、その頻度はあまり高いものではなかった。食道癌における int-2および c-erb B 癌遺伝子増幅の相互関係を検討すると、おのおの増幅は独立した因子であり、相関関係は認められなかった。胃癌における int-2および c-erb B-2癌遺伝子についても同様に、相互に関連は認められなかった。

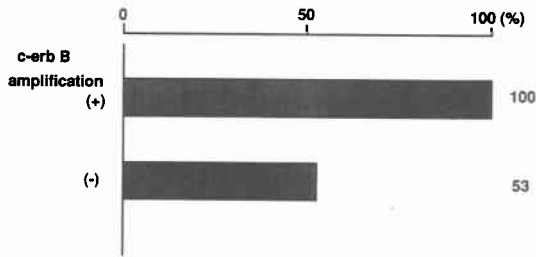
ところで、新鮮凍結標本では、標本の保存状況がある程度一定であること、患者の転帰が判明する前に癌遺伝子増幅が判定されることなど多くの利点を有しているが、反面多数の症例を集積したり、結果が判明するのに時間を要するという欠点も有している。両者の欠点を相補うためには両者の結果が一致するかということが重要である。そこで、ホルマリン固定パラフィン標本より DNA を抽出し、癌遺伝子増幅を検討すると、食道癌および胃癌では int-2, c-erb B, c-erb B-2癌遺伝子増幅はそれぞれ35%, 10%, 0%および18%, 0%, 22%と、新鮮凍結標本から得られたデータと同様の傾向が得られた。

ホルマリン固定パラフィン標本より癌遺伝子増幅を測定し、retrospective に生存率や再発部位など臨床特性と比較し得た食道癌症例の術後5年生存率を、int-2および c-erb B 癌遺伝子について増幅および非増幅の2群に分けて検討した (Fig. 2)。食道癌症例での int-2および c-erb B 癌遺伝子増幅群では術後5年生存率はそれぞれ20%, 4%と非増幅群の41%, 34%に比較すると有意に低下していた。しかも、int-2癌遺伝子に関しては、これら増幅・非増幅群の術前および術中・術後の背景因子には両者間で差異はみられなかった。一方、c-erb B 癌遺伝子増幅症例ではすべての症例で手術時にリンパ節転移が認められたが、非増幅群ではほぼ半数ぐらいにしか過ぎず、両者間には有意の差が認

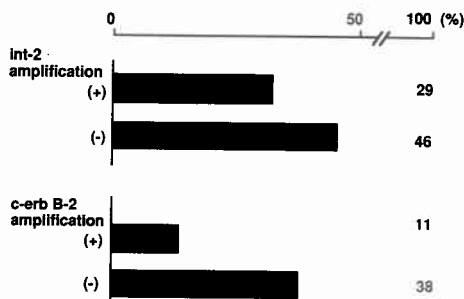
**Fig. 2** 5Year-survival rate of the patients with esophageal cancer



**Fig. 3** Incidence of lymphnode metastasis at operation in the patients with esophageal cancer



**Fig. 4** 5Year survival rate of the patients with gastric cancer



められた (Fig. 3). 術前内視鏡により得られた新鮮凍結標本より癌遺伝子の増幅を検討した結果でも食道癌では int-2, c-erb B 癌遺伝子増幅群とともに非増幅群に比較して有意に5年生存率が低下していた。また、内視鏡下に術前に c-erb B 癌遺伝子増幅が判定された症例でも、全例で手術時にリンパ節転移が認められた。胃癌症例での int-2および c-erb B-2癌遺伝子増幅群の5年生存率を非増幅群と比較した (Fig. 4)。胃癌症例でもやはりこれら癌遺伝子増幅群の生存率は非増幅群よりも低下していたが、大腸癌や肝細胞癌症例では int-2増幅例が少ないことも関連してか、非増幅群との間に明らかな差異は認められなかった。

次に、癌遺伝子増幅と再発様式との関連を検討した。食道癌では int-2癌遺伝子が増幅していた症例は肝、肺、骨を中心とした遠隔臓器転移が、非増幅群ではリンパ節転移が高率に認められた。c-erb B 癌遺伝子増幅例では int-2癌遺伝子のような再発部位との関連はみられなかった。胃癌では int-2癌遺伝子増幅群は非増幅群に比較し、腹膜転移と遠隔臓器転移が有意に高率であった。

#### 考 察

現在まで70種以上の癌遺伝子が報告されており、癌

組織におけるそれらの異常には、癌遺伝子コピー数の増加を意味する増幅、点突然変異、欠失、産物の発現異常など多くの変化が存在している。これらの変化のうちで、我々は癌遺伝子の増幅に焦点を絞って臨床特性との関連を検討した。種々の消化器癌について、int-2, c-erb B, c-erb B-2, c-myc 癌遺伝子と増幅を検討した結果から、癌遺伝子の増幅と臓器との間にきわめて興味ある事実が明らかとなってきた。すなわち、扁平上皮癌である食道癌においては c-erb B 癌遺伝子の増幅が高率にみられるものの、c-erb B-2癌遺伝子の増幅は全くみられず、逆に腺癌である胃癌では c-erb B-2癌遺伝子の増幅が高率であるにもかかわらず、c-erb B 癌遺伝子の増幅は全く認められないことである。消化器癌だけではなく、肺の扁平上皮癌でも高率に c-erb B 癌遺伝子が増幅していることや腺癌である乳癌でも c-erb B-2癌遺伝子が高率に増幅している<sup>4)</sup>ことも考え合わせると、c-erb B や c-erb B-2癌遺伝子増幅はそれぞれ扁平上皮癌や腺癌に特徴的な事であると考えられる。ところで、癌組織で増幅している癌遺伝子は、以上のように組織特異性のあるものばかりではなく、int-2癌遺伝子の様に扁平上皮癌である食道癌でも、腺癌である胃癌や乳癌でも高率に増幅しているものもあり、おのおの癌遺伝子にも特有の特性が認められる。ところで、肝細胞癌や腺癌であっても大腸癌では、int-2, c-erb B, c-erb B-2癌遺伝子の増幅頻度が低率であり、しかも食道癌や胃癌と異なりこれら癌遺伝子の増幅と臨床的特性とに明らかな関連が認められなかったことは、肝細胞癌や大腸癌の臨床特性を規定する他の癌遺伝子が存在するがそれらがまだ分離・同定されていないことを示唆しているものと考えている。

癌遺伝子増幅が如何なる検体について測定可能かという問題は、臨床特性を明らかにするためにはきわめて重要な問題である。ホルマリン固定パラフィン標本による測定が可能であれば retrospective study を行って、どの様な因子が関与しているかを予測可能となり、その後の prospective study への移行を能率よく行うことが可能である。食道癌と胃癌について手術時に得られたホルマリン固定パラフィン標本と新鮮凍結標本の結果を比較して、種々の癌遺伝子についてほぼ同じ結果が得られたことは retrospective study の結果がその方法論的制約を伴ってはいらぬものの prospective study を今後押し進めて行くのに、十分な根拠を与えることになったものと考えている。

癌遺伝子増幅と臨床特性を比較検討した結果、食道

癌では int-2 または c-erb B 癌遺伝子増幅症例では術後累積生存率が非増幅例に比較して有意に低下しており、両者間には密接な関連があることが明らかにされた。胃癌についても、int-2 癌遺伝子増幅例では、その術後累積生存率が低下しており同様の結果が得られている。これらの癌遺伝子増幅症例の術後累積生存率が低下している原因を考えると基本的には2つのことが考えられる。すなわち、1つは癌遺伝子の増幅がその産物の異常を引き起こしており、その産物の異常により癌細胞がより悪性度を獲得するという考え方であり、もう1つは増幅している癌遺伝子が直接癌細胞の悪性度に関連するのではなく、同時に増幅している他の遺伝子が癌細胞の悪性度に関連しているという考え方である。実際の癌患者では両者の事象が同時に引き起こされているものと我々は考えている。癌遺伝子産物が癌細胞の悪性度に関連していると考えられる例は、食道癌における c-erb B 癌遺伝子増幅が挙げられる。すなわち、食道癌においては c-erb B 癌遺伝子増幅例のみでなく、c-erb B 癌遺伝子産物である上皮増殖因子受容体の過剰発現食道癌症例でもその術後累積生存率が有意に低下していた<sup>5)</sup>し、上皮増殖因子受容体の細胞当たりの個数が異なるヒト扁平上皮癌細胞株をヌードマウスに移植し、外因性に EGF を投与すると上皮増殖因子受容体が多い癌細胞株の方が増殖速度が早く、癌細胞の悪性度が高いことが予測された。

以上にみられるような癌遺伝子増幅の単位を考えてみると、例えば食道癌を例にとると、int-2 癌遺伝子増幅症例は必ず同じ染色体の近傍に存在している hst-1 癌遺伝子増幅を伴っていたり<sup>1)</sup>、乳癌症例では、c-erb B-2 癌遺伝子症例は食道癌同様同じ染色体近傍に位置している c-erb A 癌遺伝子増幅を伴っているなど、その増幅単位は決して単独の遺伝子ではなくもっと広い単位であると考えられる。一方、int-2 や hst-1 癌遺伝子については現在まで多くの努力がなされているにも関

わらず、これら癌遺伝子増幅例においても、mRNA やその産物の過剰発現が報告されていないことを考え合わせるとこのような症例では、これらの癌遺伝子が直接癌細胞の悪性度に関連しているのではなく、同時に増幅している他の遺伝子が関連している可能性も十分考えられる。最近、食道癌などで int-2 癌遺伝子の増幅にみられる症例では細胞増殖に関連している蛋白をコードし、しかもその産物の発現している cyclin D 遺伝子も増幅している事が報告されており大変興味深い。

これらのデータは、各種消化器癌に対して分子生物学的手法により癌遺伝子異常を検索することにより、その予後や再発形式など消化器癌患者の治療上重要な情報を知ることが可能であり、有用なマーカーとなりうることを示している。

#### 文 献

- 1) Kitagawa Y, Ueda M, Ando N et al: Significance of int-2/hst-1 coamplification as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. *Cancer Res* 51: 1504-1508, 1991
- 2) Dubeau L, Chandeler LA, Ghalow JR et al: Southern blot analysis of DNA extracted from formalin-fixed pathology specimens. *Cancer Res* 46: 2964-2969, 1986
- 3) Feingerg AP, Vogelstein BA: A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific acitivity. *Anal Biochem* 13: 6-13, 1983
- 4) 上田政和, 清水信義, 阿部令彦: 悪性腫瘍におけるがん遺伝子の増幅・発現—臓器特異性と予後との関連を中心として—。日外会誌 9: 1579-1582, 1989
- 5) Ozawa S, Ueda M, Ando N et al: Prognostic significance of epidermal growth factor receptor in esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer* 63: 2169-2173, 1989

**Clinical Implication of Molecular Biological Parameter for Prognostic  
Factor in Digestive Organ Cancer**

Masakazu Ueda, Kiyoshi Kikuchi\*, Nobutoshi Ando, Toshiharu Tsuzuki and Masaki Kitajima

Department of Surgery, School of Medicine, Keio University

\*Department of Surgery, Tokyo Denryoku Hospital

To clarify a prognostic significance of molecular biological parameters, the correlation between oncogene amplifications and clinical characteristics were investigated in this study. Oncogene amplification was estimated by the slot-blot hybridization method. In esophageal cancer, int-2 and c-erb B amplifications were detected in 28% and 12% of cases, respectively. In gastric cancer, int-2 and c-erb B-2 amplifications were detected in 16% and 22%, respectively. The 5-year survival rate of cancer patients with amplifications was significantly lower than that of those without amplification. The int-2 amplification in esophageal cancer was closely correlated with distant organ metastasis after radical surgery. The c-erb B amplification was correlated with lymph node metastasis at operation. The same results were obtained in gastric cancer patients with int-2 amplification. These data indicate that molecular biological parameters are useful markers in the treatment of cancer patients.

**Reprint requests:** Masakazu Ueda Department of Surgery, School of Medicine, Keio University  
35 Shinanomachi, Shinjuku-ku, Tokyo, 160 JAPAN

---