

胃癌における予後規定因子としての癌関連遺伝子異常 —c-erbB-2と p53遺伝子について—

九州大学第2外科

前原 喜彦 大岩 久夫 劉 啓 大城 辰雄
奥山 稔朗 掛地 吉弘 折田 博之 大野 真司
馬場 秀夫 安達 洋祐 杉町 圭蔵

胃癌組織における c-erbB-2 蛋白の発現および p53 異常蛋白の発現を調べ、転移形式・予後との関係について検討した。

c-erbB-2 蛋白陽性症例は対象 160 例のうち 17 例 (11%) であった。c-erbB-2 蛋白陽性例の 5 年生存率は 29% であり、陰性例の 47% に比べ予後が有意に不良であった。p53 異常蛋白の発現は原発巣 96 例のうち 52 例 (54%) に認めた。p53 異常蛋白陽性群のリンパ節転移率は 85% であり、陰性群の 64% に比べて有意に高かった。DNA ploidy pattern との関係では、p53 陽性群の Aneuploid の割合は 69% であり陰性群の 45% よりも有意に高かった。また Ki-67 陽性細胞率は p53 陽性群の 30.6% に比べ陰性群 25.1% と陽性群の方が有意に高かった。p53 陽性群の 3 年生存率は 33.6% であり、陰性群の 57.6% に比べて低い傾向が見られた。

胃癌における c-erbB-2 蛋白の発現および p53 異常蛋白の発現は予後規定因子として有用であると考えられた。

Key words: c-erbB-2, p53, gastric cancer

I. 結 言

細胞の癌化およびその増殖・進展に際して多くの癌関連遺伝子の異常が報告されている。これらの遺伝子異常を臨床検体において診断し予後因子としての可能性を検討することによって、より詳細な悪性度診断が可能となることが期待される。そこでわれわれは癌関連遺伝子である c-erbB-2 と p53 遺伝子の発現を胃癌の切除標本を用いて解析し、その予後因子としての意義を検討した。

II. 対象と方法

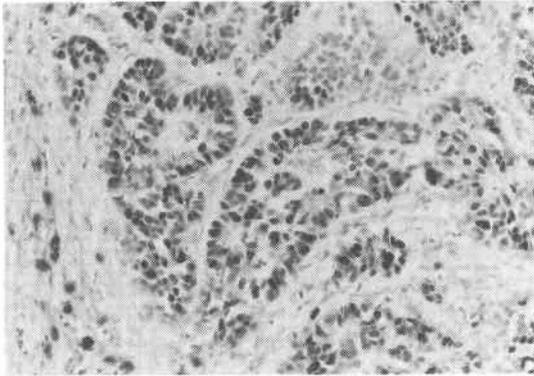
c-erbB-2 については 1976 年から 1987 年に九州大学第 2 外科において切除された胃癌 160 例を対象に、そのホルマリン固定標本を抗 c-erbB-2 蛋白モノクローナル抗体 (Triton 社製 mAb1) を用いた ABC 法¹⁾により染

色し c-erbB-2 蛋白発現を解析し、癌細胞の 10% 以上が染色されるものを陽性と判定した。そして、c-erbB-2 蛋白発現の有無と転移形式および予後に対する影響を検討した。

p53 については 1989 年から 1990 年に切除された胃癌 96 例、122 病巣 (原発巣 96 例、リンパ節転移巣 26 例) を対象とした。切除胃癌の先進部より組織を採取し PLP 固定後、凍結切片を作成しモノクローナル抗体 PAb240 (Oncogene Science) を用いた ABC 染色²⁾を施した。PAb240 はヒト・マウスに共通で N 末端から 156 から 214 の位置のアミノ酸をエピトープとし高次構造の変化も認識可能な p53 異常蛋白に特異的な抗体である。明瞭に核が褐色に染まるものを p53 異常蛋白陽性とした (Fig. 1)。DNA ploidy pattern は PI 染色後 FACSscan flowcytometer (Beckton Dickinson) で DNA ヒストグラムを作成し求めた。Ki-67 陽性細胞はモノクローナル抗体 Ki-67 (DAKO) を用いて ABC 染色を施し、癌細胞 1,000 個あたりの陽性細胞を百分率で表し増殖活性の指標とした。

* 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: 前原 喜彦
〒812 福岡市東区馬出 3-1-1 九州大学医学部第 2 外科

Fig. 1 Photomicrograph of primary gastric cancer as seen in a frozen section stained using monoclonal antibody PAb240 ($\times 120$).



III. 結 果

c-erbB-2蛋白陽性と判定された症例は対象160例中、17例(11%)であった。このうち進行癌における陽性率は12%(15/130)であり、早期癌の陽性率7%(2/30)に比較して有意に高率であった。c-erbB-2蛋白陽性例に進行した症例が多く認められたが、肉眼型、組織型、漿膜浸潤、脈管侵襲との間に有意な関連は認められなかった。

次にc-erbB-2産物発現と術後成績について検討した。c-erbB-2産物発現陽性例の5年生生存率は29%、陰性例の5年生生存率は47%であり陽性例の予後が有意に不良であった($p < 0.01$)。次にc-erbB-2産物発現と転移形式との関係についてみると、c-erbB-2産物発現陽性例では、腹膜播種、リンパ節転移、肝転移の頻度はおのおの41%、94%、18%であり、陰性例の11%、68%、5%に比べ有意に高率であった($p < 0.05$)。

p53異常蛋白の発現例は原発巣96例のなかで52例(54%)であった。組織型では、分化型と未分化型とで陽性率に有意な差はなかったが、腺管構造や髄様構造を示す部分で陽性所見を呈する部分が多かった。リンパ節転移陽性率はp53異常蛋白陽性群は85%(44/52)であり、陰性群の64%(28/44)に比べて有意に高かった($p < 0.05$)。原発巣とリンパ節巣におけるp53異常蛋白の発現については、原発巣陽性の大半のリンパ節転移巣でp53異常蛋白の発現が認められ、原発巣で陰性であった8例についても7例でリンパ節転移巣に陽性所見が認められた。また静脈侵襲についてもp53陽性群では、陰性群に比べ有意に多かった。予後との相関をみると、3年生生存率は陽性群33.6%であり、陰性群

の57.6%に比べて低い傾向が見られた。

p53異常蛋白陽性群と陰性群のDNA ploidy patternとKi-67陽性率の平均値の比較を行った。Aneuploidの割合は陽性群が69%であり陰性群の45%よりも有意に高かった($p < 0.05$)。またKi-67陽性細胞率はp53陽性群30.6%、陰性群25.1%であり陽性群の方が有意に高かった($p < 0.05$)³⁾。

IV. 考 察

c-erbB-2遺伝子産物はepidermal growth factor receptor (EGFR)と良く似た構造を示し、レセプター型チロシンキナーゼ機能を有しているとされている。c-erbB-2産物はいわゆる“Orphan Receptor”であり、リガンドは現在のところ明らかでないが数種の増殖因子の存在が推測されている。さらに通常、胎生期の上皮組織にのみ分布しているものの、種々の悪性腫瘍でc-erbB-2遺伝子増幅やc-erbB-2蛋白の発現がみられることから、c-erbB-2の活性化機構の破綻により細胞外シグナルの細胞内伝達に異常が生じ、癌の発生と進展に関与するようになると考えられている。臨床的には、乳癌において予後規定因子として重要な意味を持つことが報告されている⁴⁾。

今回の胃癌における報告ではc-erbB-2蛋白発現は約10%に認められ、発現陽性例の予後が不良であった。c-erbB-2蛋白発現陽性例にリンパ節転移、腹膜播種、肝転移が多かったことが原因であると考えられた。

癌抑制遺伝子p53遺伝子の産物であるp53蛋白は核内に局在し細胞周期の負の制御、DNAの複製・転写の調節などに関与していると考えられている。さまざまなヒト腫瘍で高頻度にp53遺伝子の異常が報告されており癌化において重要な役割を持つと考えられている。胃癌においては免疫組織学的な検討では30%~50%にp53の異常蛋白の発現があったとの報告がある。遺伝子レベルの解析では、p53遺伝子の存在する17pのLOHの解析、PCR-SSCP法、あるいはPCR-Direct sequence法により40%~60%にp53遺伝子の突然変異を認めている。他のヒト腫瘍同様胃癌でも高い頻度でp53遺伝子異常が存在することが明らかになってきた。

p53遺伝子の存在する17pの欠失が高分化腺癌に多く、早期癌の段階からおこるとの報告があり、われわれの検討でもp53蛋白の異常発現は早期胃癌においてすでに45%と高率に認められた。Shirasawaら⁵⁾の家族性大腸腺腫症の解析では、癌のみならず腺腫部分にもp53遺伝子の変異が確認されたとの報告があり、消

化器癌の発生・進展において比較的早期の段階からのp53遺伝子変異の関与が示唆される。

今回の検討では、対象の半数にp53の変異が認められリンパ節転移や静脈侵襲との相関が得られた。さらにKi-67細胞陽性率を指標に胃癌の増殖活性を検討すると、p53異常蛋白陽性群の方が陰性群に比べて増殖活性が高かった。胃癌において増殖活性の高いものはリンパ節転移を起こしやすいことをわれわれはすでに報告しており⁹⁾、遺伝子異常で異常蛋白が発現すると細胞の増殖活性が高まり、リンパ節転移をおこしやすくなるものと考えられる。予後との相関についてもp53陽性例で不良の傾向があるが、現時点では追跡期間が短いので今後の調査が必要である。

c-erbB-2およびp53異常はリンパ節転移、腹膜播種、肝転移と強く相関しており、これが予後不良の原因であると考えられた。胃癌におけるc-erbB-2やp53の癌関連遺伝子異常は予後や再発形式の予知に有用な因子であることが示唆された。

近年の分子生物学の進歩により癌関連遺伝子の研究は飛躍的に発展したものの疑問点はなお多い。現在、新しい癌抑制遺伝子の同定や機能の解明、構造と機能との関連などの研究が進められている。しかし、その臨床的意義を明らかにするためには遺伝子異常を容易に検出する方法を開発し多数の症例で詳細な臨床データをもとに多重遺伝子変異、変異の相互関係、悪性度との関係を解析する必要がある。消化器癌をあつかう臨床において遺伝的素因の診断・日常の診断・予後評価・遺伝子治療に癌抑制遺伝子の研究の成果を応用する試みはあるが、現実の診断や治療との隔たりは大きい。今後、診断・予防・治療への応用の面から

1. 遺伝的素因(体細胞での遺伝子異常)の発見による高リスク群の設定

2. 良性悪性境界病変における悪性度の判定としての指標の有用性の確立

3. 遺伝子変異を来たす環境的要因の解明による癌化の予防

4. 悪性度判定にもとづいた治療法の確立が期待される。

文 献

- 1) Hsu S, Raine L, Fanger H: Use of Avidine-Biotin-Peroxidase Complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: A comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. *J Histochem Cytochem* 29: 577-580, 1981
- 2) Gannon JV, Greaves R, Iggo R et al: Activating mutation in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J* 9: 1595-1602, 1988
- 3) Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S et al: Gastric cancer with p53 overexpression has high potential for metastasising to lymph nodes. *Br J Cancer* 67: 589-593, 1993
- 4) Gullick WJ, Love SB, Wright C et al: c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. *Br J Cancer* 63: 434, 1991
- 5) Shirasawa S, Urabe K, Yanagawa Y et al: p53 gene mutations in colorectal tumors from patients with familial polyposis coli. *Cancer Res* 51: 2874-2878, 1991
- 6) Kakeji Y, Korenaga D, Tsujitani S et al: Predictive value of Ki-67 and argyrophilic nuclear organizer region staining for lymph node metastasis in gastric cancer. *Cancer Res* 51: 3503-3506, 1991

The Abnormal Expressions of c-erbB-2 or p53 Proteins are Significant Prognostic Factors in Gastric Cancer

Yoshihiko Maehara, Hisao Oiwa, Liu Qi, Tatsuo Oshiro, Toshiro Okuyama, Yoshiro Kakeji, Hiroyuki Orita, Shinji Ohno, Hideo Baba, Yosuke Adachi and Keizo Sugimachi
Department of Surgery II, Faculty of Medicine, Kyushu University

We evaluated the expression of the c-erbB-2 protein and the abnormal p53 protein gastric cancer, using monoclonal antibodies mAb 1 and PAb 240, respectively. c-erbB-2 protein expression was found in 17 (11%) of 160 gastric cancers. The 5-year survival rates in patients with positive and negative c-erbB-2 protein were 29% and 47%, respectively, a statistically significant difference. Moreover, patients with positive staining had higher recurrence rates, such as lymph node metastasis, hepatic metastasis and peritoneal dissemination. Abnormalities in p53

expression were found in 52 (54%) of 96 gastric cancers. Tumors stained positively for p53 metastasized to lymph nodes (Metastatic rate: 85%) more frequently than those with negative staining (64%). The incidence of DNA aneuploid pattern, as determined by flow cytometry, and proliferative activity, as measured by the Ki-67 labeling index, were higher in the p53-positive group than in the p53-negative group. Data on the immunohistochemistry of c-erbB-2 and p53 proteins in gastric cancer will be clinically useful in providing information on prognosis.

Reprint requests: Yoshihiko Maehara Department of Surgery II, Faculty of Medicine, Kyushu University
3-1-1 Maidashi, Higashiku, Fukuoka, 812 JAPAN
