日消外会誌　27（8）：1879～1884，1994年

原　著

int-2，hst-1，およびRB遺伝子からみた食道癌の生物学的悪性度の評価

名古屋市立大学第2外科

呉山　泰進　片岡　誠　桑原　義之　岩田　宏
加島　健利　篠田　憲幸　佐藤　篤司　服部　浩次
中野浩一郎　西脇　巨記　正岡　昭

1989年から1991年までに切除された17例の食道癌を組織材料としてint-2，hst-1遺伝子の増幅，RB遺伝子のLoss of heterozygosity（以下，LOHと略記）の有無を検索し，臨床病理学的因子との相関，予後因子としての有用性を検討した．1）int-2，hst-1遺伝子の増幅はそれぞれ59%，53%の症例に認められた．増幅例は組織型や進行度とは相関なく，男性，遠隔転移陽性例，v因子，ly因子陽性例に有意に高率にみられた．また増幅例は生存率も低い傾向が認められ，4倍以上の高度増幅例は特に遠隔転移を来しやすく予後不良であった．2）RB遺伝子のLOHは56%に認められ，リンパ節転移，v因子，進行度と相関が認められたが生存率の解析では一定の傾向は認められなかった．以上よりint-2，hst-1遺伝子増幅は従来の組織学的悪性度とは独立した生物学的指標として有用であると考えられた．

Key words: int-2, hst-1 oncogene, RB tumor suppressor gene, esophageal carcinoma, prognostic factor

はじめに

従来食道癌の悪性度は組織学的な検索によりなされ，予後を規定する因子としてはこの組織学的悪性度，あるいは癌の進行度を中心に検討が行われてきた[1)2)]．しかし個々の症例の生物学的な態度をこれらの指標のみで論ずることは困難であり新たな生物学的指標が望まれるところである．近年分子生物学の進歩により癌の発生，進展過程において複数の遺伝子変化が生じている[3)~16)]ことが明らかにされており癌患者の予後と遺伝子異常の有無は密接な関連が存在すると予想される．

そこで著者らは食道癌における癌遺伝子（int-2，hst-1）の増幅，癌抑制遺伝子（RB）のヘテロ接合性の消失（loss of heterozygosity；以下，LOHと略記）の有無を解析し生存率や組織学的因子などの臨床特性と比較することにより，これら癌関連遺伝子からみた食道癌の悪性度の評価と予後因子としての有用性を検討した．

＜1994年3月2日受理＞別刷請求先：呉山　泰進
〒467　名古屋市瑞穂区瑞穂町川澄1　名古屋市立大学第2外科

対象と方法

1989年から1991年までに当院で切除された術前未治療の原発性食道癌の組織で－80°Cで保存されていた17例を材料として使用した．hst-1，int-2遺伝子の増幅は，slot-blot hybridization法により，RB遺伝子のLOHはSouthern hybridization法により測定した．

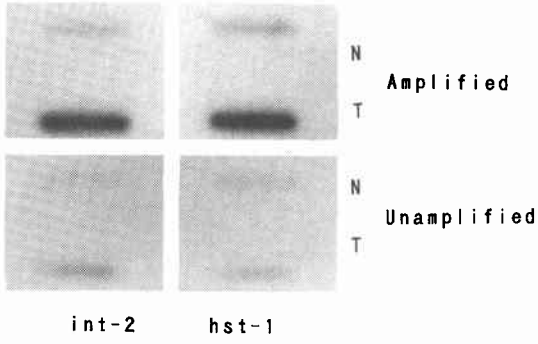
1）Slot-blot hybridization

腫瘍組織をproteinase　K処理後phenol法によりDNAを抽出し，アルカリ変性中和後ナイロンフィルターにトランスファーし，^{32}Pで標識したプローブ（human int-2，SS6，0.9kb，Sacl fragment，human hst-1，probe C，0.7kb EcoRI fragment）とハイブリダイズさせオートラジオグラフィーにより増幅倍率の強度を正常組織との対比で測定した．2倍以上の強度が得られたものを増幅ありと判定した（**Fig. 1**）．

2）Southern hybridization

腫瘍組織から抽出したDNAを制限酵素RsaIで消化し，0.8%アガロース電気泳動し，ナイロンフィルターにトランスファーした．クローニングされた^{32}P標識cDNAプローブ（p7F12；13q　14.2に位置するRB遺伝子の3′側のrestriction fragment length polymorphismマーカー）とハイブリダイゼイション

Fig. 1 Slot blot hybridization analysis of int-2 and hst-1 genes. N, normal adjacent esophageal tissue. T, primary tumor tissue. In primary tumor tissue of amplified case, the degree of amplification of int-2 and hst-1 are 3.4-fold and 2.7-fold, respectively.



を行った後オートラジオグラフィーを行い，LOHの有無を検索した（**Fig. 2**）．

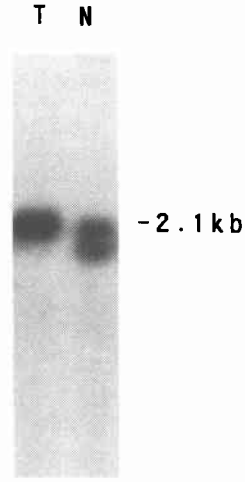
なお使用したプローブは遺伝子バンク（JCRB）より入手した．

対象症例17例の内訳は男性13例，女性4例で平均年齢は61.4±11.9歳であった．占居部位はCe：2例，Iu：3例，Im：8例，Ei：2例，Ea：2例であった．深達度はpm：2例，a1：1例，a2：11例，a3：3例で，リンパ節転移度はn0：4例，n2：8例，n3：4例，n4：1例であり，食道癌取扱い規約に基づく組織学的進行度はstage II：1例，stage III：8例，stage IV：8例であった（**Table 1**）．

以上17例についてint-2，hst-1遺伝子の増幅の有無，RB遺伝子のLOHの有無と臨床病理学的因子，すなわち年齢，性，腫瘍径，遠隔転移の有無，組織型，深達度，リンパ節転移の有無，ly因子，v因子，ie因子，組織学的進行度との相関関係および予後との関連を検討した．

なお，統計学的解析については，癌関連遺伝子と他の因子の相関はKendall testで評価した．生存率の算出はKaplan-Meier法（有意差検定はgeneralized Wilcoxon testによる）を用いた．

Fig. 2 Loss of heterozigosity by Southern hybridization. N, normal adjacent esophageal tissue. T, primary tumor tissue. In a normal tissue upper and lower bands were defined as alleles 1 and 2, respectively. Allele 2 was lost in primary tissue.



結　果

1．int-2遺伝子の増幅と臨床病理学的因子との相関

int-2遺伝子の増幅は17例中10例（59%）に認められた．各因子との相関ではint-2遺伝子の増幅は年齢，腫瘍径，組織型，深達度，リンパ節転移の有無，ie因子，進行度とは相関を認めなかった．性別では男性は13例中10例（77%）に増幅が認められたのに対し女性は4例すべて増幅が認められなかった（$p<0.01$）．遠隔転移陰性例では13例中6例（46%）の増幅率にとどまったのに対し遠隔転移陽性例では4例全例に増幅を認めた（$p<0.01$）．またly因子陰性例では6例中1例（17%）に，ly因子陽性例では10例中9例（90%）に増

Table 1 Clinicopathological features of 17 patients

Age	Sex	Location	Depth of Invasion	Node Metastasis	stage
61.4±11.9	M：13	Ce：2	pm：2	n0：4	I：0
(Mean±SD)	F：4	Iu：3	a1：1	n1：0	II：1
		Im：8	a2：11	n2：8	III：8
		Ei：2	a3：3	n3：4	IV：8
		Ea：2		n4：1	

幅を認め（p<0.01），v因子陰性例では9例中3例(33%)に，v因子陽性例では7例全例に増幅を認めた(p<0.01)（**Table 2**）.

2. hst-1遺伝子の増幅と臨床病理学的因子との相関

hst-1遺伝子の増幅は17例中9例（53%）に認められint-2遺伝子の増幅とほぼ同様の結果を示した．各因子との相関でもhst-1遺伝子の増幅は，int-2遺伝子と同様の結果となった．すなわち性別（p<0.01），遠隔転移の有無(p<0.01)，ly因子(p<0.01)，v因子(p<0.01)に相関を認めた（**Table 2**）.

3. RB遺伝子のLOHの有無と臨床病理学的因子との相関

RB遺伝子は，正常組織でheterozygosityを示した9例のinformative caseのうち5例（56%）にLOH

Table 2 Correlation between clinicopathological factors and int-2, hst-1, and RB genes, respectively

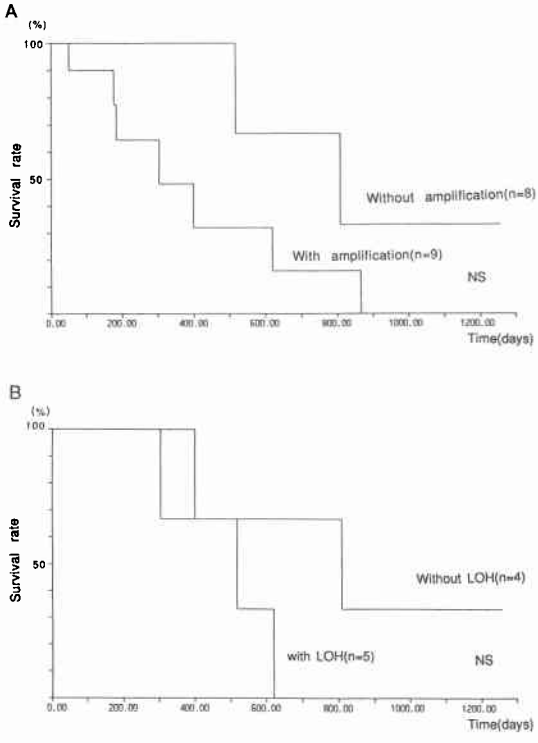
Factors	int-2	hst-1	RB
	Amplified/total(%)	Amplified/total(%)	LOH/Informative (%)
Total	10/17(59)	9/17(53)	5/9(56)
Age			
<65	4/ 8(50)	4/ 8(50)	3/5(60)
≧65	6/ 9(67)	5/ 9(56)	2/4(50)
Sex			
M	10/13(77)	9/13(69)	4/6(67)
F	0/ 4(0)**	0/ 4(0)**	1/3(33)
Tumor size			
<5.0cm	5/ 7(71)	4/ 7(57)	3/5(60)
≧5.0cm	5/10(50)	5/10(50)	2/4(50)
Dist. metastasis			
M(−)	6/13(46)	5/13(38)	4/8(50)
M(+)	4/ 4(100)**	4/ 4(100)**	1/1(100)
Differentiation			
well	4/ 7(57)	4/ 7(57)	2/4(50)
moderate	6/10(60)	5/10(50)	3/5(60)
Depth of Invasion			
pm	1/ 2(50)	0/ 2(0)	2/2(100)
a1	0/ 1(0)	0/ 1(0)	0/1(50)
a2	7/11(64)	7/11(64)	2/4(50)
a3	2/ 3(67)	2/ 3(67)	1/2(50)
Lymph node			
n(−)	1/ 4(52)	1/ 4(25)	0/2(0)
n(+)	8/13(62)	8/13(62)	5/7(71)*
ly			
(−)	1/ 6(17)	1/ 6(17)	1/2(50)
(+)	9/10(90)**	8/10(80)**	4/6(67)
v			
(−)	3/ 9(33)	3/ 9(33)	1/4(25)
(+)	7/ 7(100)**	6/ 7(86)**	4/4(100)**
ie			
(−)	5/10(50)	5/10(50)	2/4(50)
(+)	2/ 3(67)	1/ 3(33)	2/3(67)
stage			
II	0/ 1(0)	0/ 1(0)	0/1(0)
III	4/ 8(50)	4/ 8(50)	1/3(33)*
IV	6/ 8(75)	5/ 8(63)	4/5(80)

*p<0.05 **p<0.01

Table 3　Cases showing more than 4-fold amplification of int-2, hst-1 gene

Age	Sex	Tumor Size	Stage	Survival Period	Site of Distant Metastasis	int-,2 hst-1 Amplification
66	M	5	a2, n3；IV	6Mo.	Lung, Bone	7.0, 11.3
48	M	10	a2, n2 M(+)；IV	1Mo.	Liver, Lung	4.5, 5.9

Fig. 3　The cumulative survival curves by Kaplan-Meier method. Panel A. curves for patients groups with and without int-2/hst-1 coamplification. Panel B. curves for patients groups with and without LOH.



を認めた．各因子との相関では，年齢，性別，腫瘍径，遠隔転移の有無，組織型，深達度，ly 因子，ie 因子，など相関は認められなかったがリンパ節転移陽性例では 7 例中 5 例(71%)に，v 因子陽性例では 4 例すべてに LOH を認めた($p<0.05$, $p<0.01$)．また進行度に従って LOH の頻度が増加した($p<0.05$)（**Table 2**）．

4．int-2，hst-1遺伝子の高度増幅例

int-2遺伝子，hst-1遺伝子の増幅が 4 倍以上認められた症例を示した．2 例はいずれも stage IV と高度進行例であった．1 例は術前から肝，肺に転移を認め，他の 1 例は治癒切除が行われたが術後肺，骨に転移を認め 6 か月で再発死亡した（**Table 3**）．

5．生存率の解析

Kaplan-Meier 法による生存率では int-2，hst-1遺伝子の増幅群は非増幅群に比べて悪い傾向を示したが有意の差は認められなかった．一方，RB 遺伝子は一定の傾向は認められなかった（**Fig. 3**）．

考　察

int-2遺伝子はマウス乳癌ウイルス（MMTV）がマウスに感染して乳癌を起こす際に活性化させる遺伝子の 1 つとして同定され[3]，また hst-1遺伝子はマウス繊維芽細胞である N1H3T3細胞をトランスフォームする活性のある遺伝子としてヒト胃癌材料よりクローニングされた[4]．その後 int-2，hst-1遺伝子は染色体11q13領域に隣接して存在し[5]，乳癌[6]，胃癌[5]などさまざまなヒト癌で増幅していることがわかった．一方，RB 遺伝子は網膜芽細胞腫（Retinoblastoma）の原因となる遺伝子として発見された癌抑制遺伝子である．相同染色体上の両方の RB 遺伝子が失活すると癌になりやすくなり，骨肉腫や肺癌，乳癌などさまざまなヒト癌で13q14，17p 領域の RB 遺伝子の失活が確認されている[7)~9)]．

その後の研究により食道癌においても高頻度に int-2/hst-1領域の増幅あるいは RB 遺伝子の LOH が認められる[10)~14)]ことがわかったが，腫瘍の進展，あるいは予後とのかかわりについて言及した報告はいまだ数少なく，また従来悪性度の指標とされてきた組織学的因子を含めた臨床的因子との関係は詳細には検討されていない．著者らはこの点を明らかにするために凍結食道癌組織を用いて int-2，hst-1遺伝子の増幅の有無，RB 遺伝子の LOH の有無を検討した．

int-2遺伝子の増幅は17例中10例（59%）に，hst-1遺伝子の増幅は17例中 9 例（53%）に認められ，Tsuda ら[10]，Wagata ら[14]の報告とほぼ同様の値であった．ホルマリン固定パラフィン標本を用いた Kitagawa らの検討[11]では28%，Mori ら[12]の検討では24%と若干増幅率が低い傾向を示した．

背景因子との相関を見ると，int-2，hst-1遺伝子は65歳以上と65歳未満ではその増幅率に有意差は認められなかった．性別による比較では，男性ではそれぞれ77%，69%と高率に増幅が認められたのに対し，女性では全く認められなかった．これはTsudaら[10]が指摘するように食道癌が高率に男性に発生することと符号し，int-2，hst-1遺伝子の増幅が食道癌の発生段階に関与しているとも考えられ，興味深い結果であると考えられる．

その他の因子では腫瘍径，組織型，深達度，リンパ節転移，組織学的進行度などとは相関性は認められなかったが，遠隔転移，ly因子の有無，v因子の有無とそれぞれ有意の相関を示した．換言するとint-2，hst-1遺伝子増幅例は腫瘍の進行度によらずリンパ管，静脈に浸潤しやすいが，リンパ節転移とは相関性がないことから，主に静脈を介した遠隔転移を来しやすいと言える．int-2/hst-1遺伝子のタンパク質はそのアミノ酸配列が線維芽細胞増殖因子（FGF）と高い相同性を示すことが推測されている[15]が，今回の検討結果もint-2，hst-1遺伝子タンパク質が増殖因子としての生化学特徴を有することを裏付けている．

リンパ節転移とly因子との関係は解離しているがこの理由はリンパ管に浸潤した腫瘍細胞がリンパ節に転移を来すには腫瘍免疫など宿主側の要因も関与するためであろう．転移リンパ節においてはほぼ100%の増幅率を示す[10]という事実はint-2，hst-1遺伝子増幅がリンパ節転移に何らかの形で関与していることを示唆するものであり，腫瘍側因子としてはint-2，hst-1遺伝子増幅例は潜在的にリンパ節転移を来しやすい状態にあると推察される．

RB遺伝子のLOHは正常組織でheterozygosityが認められた9例のinformative caseのうち5例（56%）に認められた．LOHの有無は年齢，性，腫瘍径，遠隔転移の有無，組織型，深達度，ly因子，ie因子とは相関が認められなかったがリンパ節転移の有無，v因子，組織学的進行度と有意の相関が認められた．Wagataら[14]は31例に対しLOHとリンパ節転移，深達度，進行度，組織型について検討し，有意な差は認められなかったものの進行した症例や組織型では低分化型にLOHの頻度が高かったとしている．

予後との関連ではint-2，hst-1増幅例は非増幅例に比べ生存率が低い傾向が認められた．これはint-2，hst-1増幅例が非増幅例に比べ有意に遠隔転移の頻度が高いことに起因すると考えられる．特にint-2，hst-1遺伝子が4倍以上の高度増幅を認めた症例は，1例は術前に肝，肺転移が確認され，1例は治癒切除後早期に肺，骨転移が確認され，術後6カ月で死亡し予後不良であった．このことから増幅の有無のみならず増幅の強度も腫瘍の悪性度を反映した重要な予後因子ではないかと考えられる．

RB遺伝子のLOHの有無による生存率は一定の傾向は認められなかった．Vogelsteinら[16]は大腸癌においてすべての染色体上のLOHを検索し，染色体の欠失の頻度が増加している症例では予後不良であったと報告しており，今後食道癌においてもさらなる綿密な遺伝子の解析と症例の蓄積により次第に明らかにされるであろう．

本論文の要旨は第93回日本外科学会総会において発表した．

文　献

1) 遠藤　健：胸部食道癌切除成績決定に関する多変量解析による研究—Coxのハザード法を用いて—．日消外会誌　**25**：1191—1200，1992
2) 木村景柱：重回帰分析による食道癌予後解析の研究．日気管食道会報　**36**：371—381，1985
3) Peters G, Brookes S, Smith R et al: Tumorigenesis by mouse mammarytumor virus: evidence for a common region for provirus integration in mammary tumor. Cell **33**: 369—377, 1983
4) Sakamoto H, Mori, Taira M et al: Trasforming gene from human stomach cancers and a noncancerous portion of stomach mucosa. Proc Natl Acad Sci USA **83**: 3997—4001, 1986
5) Yoshida M, Wada M, Stoh H et al: Human HST1 (HSTF1) gene maps to chromosome band 11q13 and coamplifies with the INT2 gene in human cancer. Proc Natl Acad Sci USA **85**: 4861—4864, 1988
6) Ali IU, Merlo G, Callahan R et al: The ampification unit on chromosome 11q13 in aggressive primary human brest tumors entails the bcl-1, int-2 and hst loci. Oncogene **4**: 89—92, 1989
7) Friend SH, Bernards R, Rogeli S et al: A human DNA segment with properties of the gene that predisposes to retinoblastoma and osteosarcoma. Nature **323**: 643—646, 1986
8) Harbour JW, Lai SL, Whang-Peng J et al: Abnormalities in structure and expression of the human retinobloastoma gene in SCLC. Science **241**: 353—357, 1988
9) Lee EY-HP, To H, Shew J-Y et al: Inactiva-

tion of the retinoblastoma susceptibility gene in human breast cancers. Science **241**：218—221, 1988

10) Tsuda T, Tahara E, Kajiyama G et al High incidence of coamplification of hst-1 and int-2 genes in human esophageal carcinomas. Cancer Res **49**：5505—5508, 1989

11) Kitagawa Y, Ueda M, Ando N et al: Significance of int-2/hst-1 coamplificaton as a prognostic factor in patients with esophageal squamous carcinoma. Cancer Res **51**：1504—1508, 1991

12) Mori M, Tokino T, Yanagisawa A et al: Association between chromosome 11q13 amplification and prognosis of patients with oesophageal carcinomas. Eur J Cancer **28**：755—757, 1992

13) Boynton RF, Huang Y, Blount PL et al: Frequent loss of heterozygosity at the retinoblastoma locus in human esophageal cancers. Cancer Res **51**：5766—4769, 1991

14) Wagata T, Ishizaki K, Imamura M et al: Deletion of 17p and amplification of the int-2 gene in esophageal carcinomas. Cancer Res **51**：2113—2117, 1991

15) Yoshida T, Miyagawa K, Odagiri H et al: Genomic sequence of hst, a transforming gene encoding a protein homologous to fibroblast growth factor and the int-2-encoded protein. Proc Natl Acad Sci USA **84**：7305—7309, 1987

16) Vogelstein B, Fearon ER, Kern SE et al: Allelotype of colorectal carcinomas. Science **244**：207—211, 1989

A Cytogenetic Analysis of Human Esophageal Carcinomas in term with Their Prognosis Using int-2, hst-1 and RB Gene Probes

Yasuyuki Kureyama, Makoto Kataoka, Yoshiyuki Kuwabara, Hiroshi Iwata, Taketoshi Kashima, Noriyuki Shinoda, Atsushi Sato, Koji Hattori, Koichiro Nakano, Naoki Nishiwaki and Akira Masaoka

Second Department of Surgery, Nagoya City University Medical School

We analyzed the correlation between clinicopathological factors and int-2 and hst-1 gene amplification and RB-LOH in 17 patients with esophageal carcinoma who underwent surgery from 1989 to 1991. The rates of int-2 and hst-1 gene amplification were 59% and 53%, respectively. Int-2 and hst-1 amplification were not correlated with histological type or clinical stage, but were significantly correlated with sex, distant metastasis, venous invasion and lymphatic invasion. Patients with amplification of these genes especially with more than 4-fold amplification had poorer prognosis due to distant metastasis than those without amplification. The incidence of RB-LOH was 56%. RB-LOH was correlated with lymphnode metastasis, venous invasion and clinical stage, although RB-LOH showed no tendency in the analysis of survival. These results revealed that int-2 and hst-1 gene amplification is a useful biological indicator that is not related to histological malignancy.

Reprint requests: Yasuyuki Kureyama The Second Department of Surgery, Nagoya City University Medical School
1 Kawasumi, Mizuhocho, Mizuho-ku, Nagoya City, 467 JAPAN