日消外会誌　30（4）：886～890，1997年

特集1

# 術前生検材料の分子生物学的検索による胃癌の転移・再発予測の可能性について
## ―胃癌におけるCD44変異体発現の検討―

関西医科大学第2外科，附属肝臓研究所分子遺伝学部門*
山道　啓吾　　上原　芳彦*　　大沢　常秀　　大草　世雄
田中　完児　　中根　恭司　　日置紘士郎
東京工業大学生命理工学部生命理学科
喜多村　直実

接着分子CD44はalternative splicing機構により変異体を形成することが知られている．最近，このCD44変異体の発現が癌の浸潤，転移と深く関連するといわれている．われわれは癌の遺伝子診断の臨床応用として，variant exon 6を含むCD44変異体（CD44v6）mRNAの発現を胃癌において検討し，術前内視鏡生検材料の検索で術後の転移や再発を予測することが可能であるかを検討した．胃癌73症例の手術標本のCD44v6 mRNA発現量はリンパ節転移および肝転移と有意に相関した．また，再発例のCD44v6 mRNA発現量が増加し，高発現群の予後は不良であった．25症例の生検材料の検討ではCD44v6 mRNA発現は同症例の手術標本の発現とほぼ一致した．CD44v6 mRNAの発現は術前の生検材料でも十分，定量可能であり，胃癌の転移，再発の危険性を予知する因子として術前の評価に利用することが可能であることが示唆された．

**Key words：** CD44，gastric cancer，RT-PCR

### はじめに

癌転移機構の解明は癌を制圧する上で残された最終課題とされている．最近の分子生物学の飛躍的な進歩によりこの癌転移の機序も徐々に解明されてきた．しかし，これらの基礎的研究の成果を如何に臨床に応用するかは今後の課題とされている．

われわれは癌の浸潤・転移に深く関係するといわれている接着分子CD44変異体に着目し，胃癌組織におけるvariant exon 6を含むCD44変異体（CD44v6）の発現を分子生物学的手法でmRNAの発現量として客観的にとらえることを試み，その意義．臨床病理学的に検討した．さらに，術前の内視鏡による生検材料検索を行い，臨床応用の可能性について検討した．

### 対象と方法

(1) 胃癌手術標本におけるCD44v6 mRNA発現

1988年から1989年の2年間に当科で切除した胃癌症例のうち予後が確認できた73例を対象にCD44v6 mRNA発現をRT-PCR/Southern blot法で定量し，臨床病理学的に検討した．再発や予後についての検討は73例のうち治癒切除（根治度A，B）の行われた48例を対象に検討した．

(2) 胃癌術前内視鏡生検材料におけるCD44v6 mRNA発現

1996年1月から6月に当科で経験した胃癌25症例において術前の内視鏡施行時および手術時に標本を採取し，それぞれのCD44v6 mRNA発現量を検索し，比較検討した．

(3) RT-PCR/Southern blot法を用いたmRNA発現の定量化

胃癌組織および隣接非癌部組織からtotal RNAを抽出，CD44v6に特異的なPrimerおよびProbeを用い，RT-PCR/Southern blot法を行った．得られたバンドをImage analyzer（BAS2000）で解析し，数値化した．癌組織でのmRNA発現を非癌組織の発現と比

＊第48回日消外会総会シンポ1・消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開

＜1996年12月11日受理＞別刷請求先：山道　啓吾
〒570　守口市文園町10―15　関西医科大学第2外科

**Fig. 1** Map of CD44 gene with position of Primers and Probe.

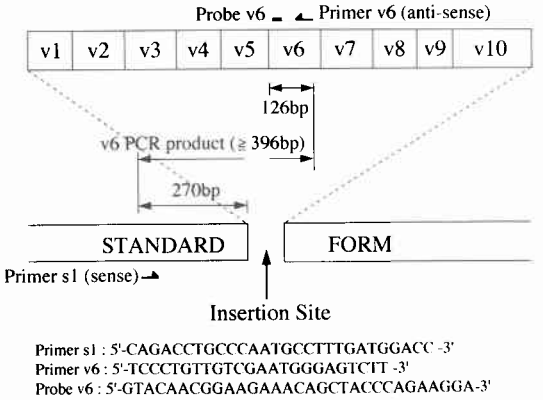
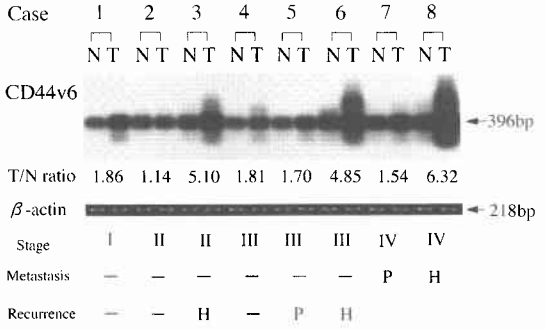



**Fig. 2** RT-PCR/Southern blot analysis of surgical specimens from 8 cases of gastric cancer patients and the expression level of CD44v6 mRNA (T/N ratio).




較することにより定量化を試みた．すなわち，癌組織/非癌組織比（T/N比）を算出し，CD44v6 mRNA発現量の指標とした．なお，すべての標本においてinternal controlとして$\beta$-actinの発現をPCRで確認し，cDNA量の調整を行った．**Fig. 1**にCD44の遺伝子構造とPrimerとProbeの位置を示すが，増幅されるCD44v6のPCR産物は理論上，すべてvariant exon 6を含むものであり，バンドの長さは，最小396bpであるが，v1からv5のexonの挿入の有無により数種類のバンドが検出されることとなり，Image analyzerによるバンドの解析は，得られたすべての長さのバンドに対して行った．

## 結　果

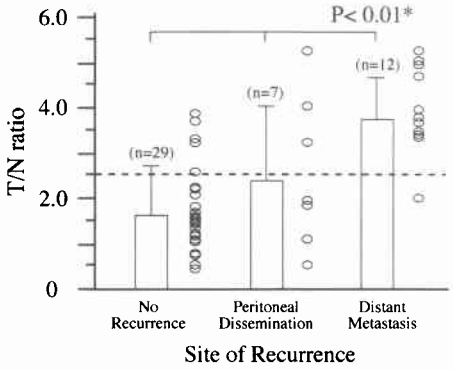
(1) 胃癌手術標本におけるCD44v6 mRNA発現

CD44v6 mRNA発現は，すべての癌組織および隣接非癌部組織で確認され，T/N比の平均は2.38±1.4 (Mean±SD)であった．癌部でのCD44v6 mRNA発現の増強は73例中，54例で認められ，特に肝転移症例や肝再発症例で著明であった(**Fig. 2**)．臨床病理学的諸因子との検討では，CD44v6 mRNA発現量はリンパ節転移と有無と肝転移の有無，stageとの間に有意な相関が認められ，特に肝転移症例のT/N比は3.84±1.5と異常に増加していた(**Table 1**)．胃癌治癒切除例48例中，19例で再発が認められ，遠隔臓器転移

**Table 1** Correlation between the expression level of CD44v6 mRNA and clinicopathologic factors

| Variable | No. | CD44v6 T/N ratio (MEAN±SD) | CD44v6 P |
|---|---|---|---|
| Tumor location | | | |
| Cardia | 14 | 2.42±1.4 | NS |
| Other | 59 | 2.38±1.4 | |
| Maximum tumor diameter | | | |
| <50mm | 26 | 2.25±1.2 | NS |
| ≧50mm | 47 | 2.46±1.5 | |
| Gross appearance | | | |
| Bormann 1/2 | 42 | 2.31±1.3 | NS |
| Bormann 3/4 | 31 | 2.49±1.5 | |
| Histology | | | |
| Differentiated | 37 | 2.43±1.3 | NS |
| Undifferentiated | 36 | 2.34±1.5 | |
| Histological growth pattern | | | |
| Expansive | 11 | 2.15±1.1 | NS |
| Intermediate | 41 | 2.37±1.4 | |
| Infiltrative | 21 | 2.49±1.6 | |
| Lymphatic involvement | | | |
| No | 13 | 1.79±1.1 | NS |
| Yes | 60 | 2.51±1.4 | |
| Vascular involvement | | | |
| No | 14 | 2.18±1.4 | NS |
| Yes | 59 | 2.43±1.4 | |
| Depth of invasion | | | |
| t1/2 | 43 | 2.33±1.4 | NS |
| t3/4 | 30 | 2.47±1.5 | |
| Lymphnode metastasis | | | |
| No | 11 | 1.54±1.2 | <0.05 |
| Yes | 62 | 2.53±1.4 | |
| Peritoneal dissemination | | | |
| No | 66 | 2.46±1.4 | NS |
| Yes | 7 | 1.64±1.0 | |
| Liver metastasis | | | |
| No | 67 | 2.26±1.3 | <0.01 |
| Yes | 6 | 3.84±1.5 | |
| Stage | | | |
| stage I/II | 22 | 1.82±1.3 | <0.01 |
| stage III/IV | 51 | 2.63±1.4 | |

**Fig. 3** Correlation between CD44v6 mRNA expression and site of reccurence in 48 curatively resected gastric cancer patients.




* significant dfference by Kruskal-Wallis test.

**Table 2** Correlation between CD44v6 mRNA expression and site of recurrence

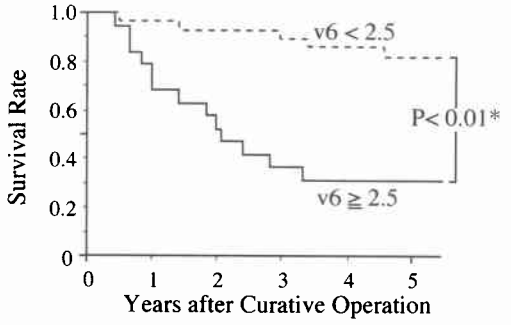
| Site of Recurrence | n(%) | CD44v6 mRNA Expression | | P* |
|---|---|---|---|---|
| | | T/N ratio<2.5 | ≧2.5 | |
| No recurrence | 29(100) | 24(82.8) | 5(17.2) | |
| peritoneal dissemination | 7(100) | 3(57.1) | 3(42.9) | <0.001 |
| distant metastasis | 12(100) | 1( 8.9) | 11(91.7) | |

*chi-squere test

による再発が12例で，腹膜播種性転移によるものが7例であった．胃癌再発とCD44v6 mRNA発現量の関係は，再発部位別にみると遠隔臓器転移例のT/N比が3.79±0.9で，腹膜播種性転移例の2.34±1.7，無再発例の1.60±1.0に比べ有意に高値であった(**Fig. 3**)．また，T/N比が2.5以上をCD44v6 mRNA高発現群，2.5未満を低発現群とすると遠隔転移例12例中11例が高発現群であり，無再発例や腹膜播種例に比べ有意に高発現群が多かった(**Table 2**)．予後との検討では，CD44v6 mRNA低発現群の5年生存率は83%であったのに対し，高発現群の5年生存率は32%と低値であり，有意に予後不良であった(**Fig. 4**)．COX比例ハザードモデルを用いた多変量解析で検討すると，CD44v6 mRNA発現のP値は0.002と腹膜播種，肝転移の因子に次いで低値であり，独立した予後因子としての有用性が判明した(**Table 3**)．

(2) 胃癌術前内視鏡生検材料におけるCD44v6 mRNA発現

**Fig. 4** Kaplan-Meier survival cureves for curatively resected gastric cancer.

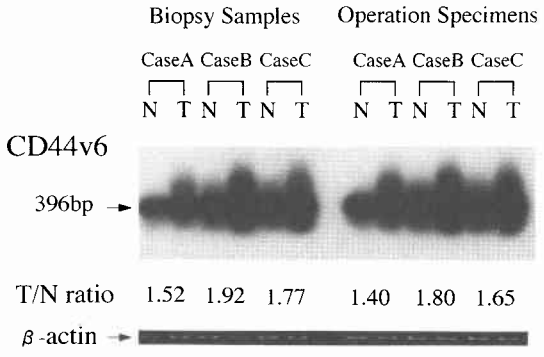



*significant difference by Logrank test

**Table 3** Multivariate analysis of prognostic factors for overall survival in 73 gastric cancer patients using Cox proportional hazard model

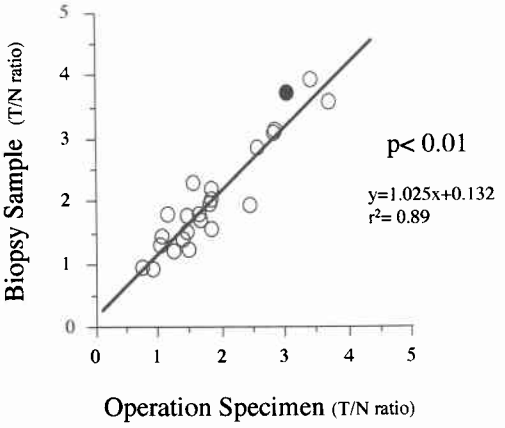
| Variable | Chi-square | Hazard ratio | P |
|---|---|---|---|
| Histology | 0.491 | 1.319 | 0.483 |
| Lymphatic in volvement | 0.152 | 1.193 | 0.697 |
| Vascular involvement | 0.309 | 1.266 | 0.578 |
| Tumor size | 0.318 | 1.249 | 0.573 |
| Gross appearence | 0.001 | 0.986 | 0.972 |
| Depth of invasion | 3.557 | 2.275 | 0.059 |
| Lymphnode netastasis | 6.018 | 2.770 | 0.014 |
| Peritoneal dissemination | 12.176 | 9.583 | 0.001 |
| Liver metastasis | 11.959 | 8.116 | 0.001 |
| CD44v6 mRNA expression | 9.414 | 3.712 | 0.002 |

**Fig. 5** CD44v6 mRNA expression in gastric cancer: comparison between biopsy and operated specimen.




内視鏡生検材料から得られたtotal RNA量は9.8±4.6μg/sampleであり，RT-PCRの検索に十分なRNA量が得られた．同一症例の生検材料と手術標本

**Fig. 6** Correlation of CD44v6 mRNA expression between biopsy and operated specimen (closed circle: case with liver metastasis)




のCD44v6 mRNA発現はほぼ同一の結果が得られた(**Fig. 5**).それぞれの標本のCD44v6 mRNA発現量の相関について検討すると，有意な相関関係が認められた．さらに，肝転移症例においては手術標本同様，生検材料でもCD44v6 mRNA発現量の増加をみた(**Fig. 6**).

## 考　察

癌の血行性転移は，癌細胞の原発巣の離脱から始まり，血管内への侵入，移動，着床から遠隔臓器での増殖に至るまで多くのステップを経て形成される．これら一連の過程にはさまざまな因子が関わっており，特に接着分子の関与は重要な役割を果たしているといわれている[1].

接着分子CD44はもともとリンパ球のホーミングレセプターとして認識された分子である．その構造は，細胞外ドメイン，膜貫通部，細胞質部分から成り，リガンドとの結合は，N末端側に軟骨プロテグリカンのコア蛋白質，あるいはリンク蛋白質様のドメインが存在し，ヒアルロン酸などへの結合を担うとされている．また，CD44には細胞外ドメインの膜近傍域にalternative splicing機構により最高10個のvariant exonがさまざまな組み合わせで挿入されて形成される変異体の存在が知られている[2]．1991年にラット膵癌由来転移性細胞株においてCD44v6の過剰発現が報告されて以来，ヒトにおいても種々の癌種でCD44変異体の発現が癌の浸潤・転移に深く関与することが報告されている[3]．癌の転移過程におけるCD44の関与は，ヒアルロン酸の発現が認められる血管内皮細胞と癌細胞の接着に関する部分が有力視されている．

今回の胃癌手術標本における臨床病理学的検討では，CD44v6の発現はリンパ節転移や肝転移と有意に相関する結果が得られた．特に肝転移症例での発現は異常に増強しており，胃癌においてもCD44v6は，転移形成に深く関わっていることが判明した．さらに，再発とも有意に相関し，癌組織においてCD44v6発現の増強が認められる症例は，遠隔転移による再発をきたしやすく，予後も不良であった．再発例でのCD44v6発現の増強はstage IIのような比較的早期の症例でも確認されており(**Fig. 2**, Case 3)，また，今回は示していないが，リンパ節転移巣や肝転移巣のCD44v6 mRNAの発現を検討すると原発巣と同じレベルの発現の増強が認められている．これらのことから癌細胞におけるCD44変異体の発現は，癌の増殖過程の比較的早期の段階から原発巣の癌細胞が遺伝子変化をきたすことにより増強され，その結果，癌細胞は転移能を獲得する一因となることが考えられる．それ故に原発巣の検索により転移に関する情報が得られる可能性が示唆され，臨床応用として，術前内視鏡生検材料での検討を行った．生検材料のような微小なsampleでも検索に十分なRNA量が得られ，また，生検材料におけるCD44v6 mRNA発現量は手術標本の発現量とほぼ一致する結果が得られ，術前の検索で胃癌の転移・再発の危険性を把握することができる可能性があることが示された．CD44変異体の予後との関係は，Mulderら[4]が大腸癌で，Kaufmannら[5]が乳癌で報告している．いずれもCD44v6に対する抗体を用いた免疫組織学的研究でCD44v6の発現が陽性例や強陽性例の予後が不良であるとしている．しかし，同じ抗体で陽性率が異なる報告もあり[6]，免疫組織学的方法では発現の強弱の客観的な判定や生検材料のような微小なsampleの検索は困難と思われる．今回の研究ではRT-PCR/Southern blot法を用いることにより，微小なsampleにおいてもmRNAレベルでの発現を客観的にとらえることを可能にした．癌の転移は複数の分子が複雑に関与し，成立するものであり，CD44変異体の発現のみで説明がつくものではないが，この分子を正確にとらえ，臨床に応用することが癌の転移や再発の予防につながり，さらには治療成績の向上をもたらすものと思われる．

なお，本論文の要旨は第48回日本消化器外科学会総会シンポジウム1—消化器癌の遺伝子診断とその治療への展開—において発表した．

## 文 献


1) Zetter BR: Adhesion molecules in tumor metastasis. Semin Cancer Biol **4**: 219—229, 1993
2) Tölg C, Hoffmann M, Herrlich P et al: Splicing choice from ten variant exons establishes CD44 variability. Nucleic Acids Res **21**: 1225—1229, 1993
3) Wielenga VJM, Heider KH, Offerhaus GJA et al: Expression of CD44 variant proteins in human clorectal is related to tumor progression. Cancer Res **53**: 4754—4756, 1993
4) Mulder JWR, Kruyt PM, Sewnath M et al: Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. Lancet **344**: 1470—1472, 1994
5) Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP et al: CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. Lancet **345**: 615—619, 1995
6) Koretz K, Müler P, Lehnert T et al: Effect of CD44v6 on survival in colorectal carcinoma. Lancet **327**: 327—328, 1995


## Possibility of the Prediction of Metastasis Using Molecular Biological Examination of Biopsy Specimens in Patients with Gastric Cancer —Clinical Study of CD44 Variant mRNA Expression in Gastric Cancer—


Keigo Yamamichi, Yoshihiko Uehara*, Tsunehide Osawa, Tokio Okusa, Kanji Tanaka, Yasushi Nakane and Koshiro Hioki
Second Department of Surgery and *Department of Molecular Genetics, Institute for Liver Research, Kansai Medical University
Naomi Kitamura
Department of Life Science, Faculty of Bioscience and Biotechnology, Tokyo Institute of Technology



CD44 is a cell surface adhesion molecule involved in cell-cell and cell-matrix interactions. CD44 exists in a standard form and in multiple isoforms, each generated by alternative splicing of up to 10 variant exons (termed v1-v10) encoding parts of the extracellular domain. Expressions of CD44 and its variants are associated with cancer progression and metastasis. We examined the expression of CD44 containing a segment encoded by variant exon 6 (CD44v6) mRNA in 73 cases of gastric cancer using molecular biological examination of surgical specimens. The level of CD44v6 mRNA expression was significantly higher in patients with lymph node metastasis and liver metastasis. In 48 curatively resected patients, the level of CD44v6 mRNA expression significantly correlated with recurrence. Furthermore, there was a significant survival advantage in patients iwth a low level of CD44v6 mRNA expression as compared to those with high expression. We also examined the level of CD44v6 mRNA expression in endoscopic biopsy specimens from 25 cases of gastric cancer. The expression of CD44v6 mRNA in biopsy specimens was similar to that in surgical specimens from the same patient. These results suggest that the level of CD446 v mRNA expression is a potential prognostic indicator and may be useful as a preoperative predictor of distant metastasis and recurrence in patients with gastric cancer.



**Reprint requests:** Keigo Yamamichi Second Department of Surgery, Kansai Medical University
10-15 Fumizonocho, Moriguchi, 570 JAPAN