日消外会誌　31（10）：2167～2170，1998年

特集11

胃癌生検組織中の転移関連遺伝子群のmRNA発現からみた脈管侵襲の術前予測

金沢大学がん研究所腫瘍外科
高橋　豊　Zhang Bin　磨伊　正義

胃癌の脈管浸潤の意義の再評価並びにその術前予測の可能性を検討した．胃癌手術症例1,374例による検討では，ly因子とリンパ節転移と腹膜播種，v因子と肝転移との間に関係が認められた．次にly因子，v因子の術前予測を目的に，術前生検組織93例を対象に転移の分子機構から予測される理論的に脈管浸潤に必要な因子である増殖因子としてepidermal growth factor receptor（EGFR），血管新生因子としてbasic fibroblast growth factor（bFGF）とvascular endothelial growth factor（VEGF），浸潤因子としてtype IV collagenase，接着因子としてE-cadherinの転移関連遺伝子群のmRNAをIn situ hybridization（ISH）法による発現程度から検討した．その結果，ly因子ではcollagenaseとE-cadherin（減弱），v因子はcollagenaseとVEGFが単変量解析により陽性群と陰性群で有意の差を認めた．以上から，本法は胃癌の脈管浸潤の予測，ひいては転移，再発の予測に有用であると考えられた．

Key words: lymphatic invasion, vascular invasion, metastasis-related genes

はじめに

胃癌の脈管侵襲は，転移再発形式の予測に重要な情報の1つであるが，これに基づいた治療方針決定のためには術前にある程度予測することが必要である．一方，脈管侵襲とは癌細胞が原発巣の微小な脈管に浸潤した状態を示すものであり，転移の分子生物学からみると，その形成には血管新生，増殖，浸潤，接着などのプロセスをクリアーする必要がある[1]．そこで，今回教室における胃癌症例のly，v factorの意義を再検討するとともに，分子生物学的手法を用いた生検組織における各プロセスの転移関連遺伝子群のmRNA発現から，これらの脈管侵襲を予測が可能であるかどうかを検討した．

対象と方法

1．胃癌症例の転移形式の予測におけるly，v factorの意義

教室において1997年までに切除手術がなされた胃癌1,374例を対象に，ly因子，v因子とリンパ節転移，肝転移，腹膜播種[2]との関連について検討した．

2．胃癌生検組織中の転移関連遺伝子群のmRNA発現とly，v factorとの相関

胃癌の術前生検組織の内，mRNAが存在することが確認された93例（**Table 1**）を対象に，既報のin situ hybridization（ISH）法により，転移関連遺伝子群の発現を検討した．用いたprobeは，血管新生因子としてbasic fibroblast growth factor（bFGF）とvascular endothelial growth factor（VEGF），増殖因子としてepidermal growth factor receptor（EGFR），浸潤に関わる因子として血管内皮基底膜の破壊に不可欠なtype IV collagenase，接着に関連する因子としてE-cadherinの5種類とmRNA全量を反映する$d(T)_{20}$ oligonucleotide（poly dT）の計6つを使用し，連続切片を用い同部位を染色した．ISHはFisher社のMicroprobeキットを用いた．この仕組みを**Fig. 1**に示

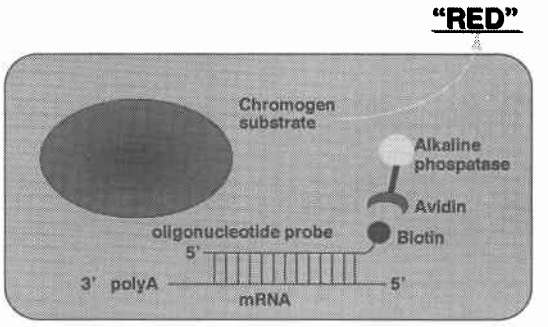
Table 1　The distribution of ly factor and v factor of gastric cancer patients

ly0	26	v0	63
1	28	1	18
2	22	2	8
3	17	3	4

＊第51回日消外会総会シンポ3・胃癌における脈管侵襲の意味

<1998年7月22日受理>別刷請求先：高橋　豊
〒921-8044　金沢市米泉町4―86　金沢大学がん研究所外科

Fig. 1　Mechanism of ISH method.



すが，各プローブをビオチン化し，AB 反応を利用して alkalinephosphatase で赤く染色させるものである．具体的には，脱パラフィンから始まり，各 probe との接触を温度を上げることにより短い時間で行い，染色性を高める薬剤を使用しつつ，最後に赤く染色させるものである．いずれも 1 回の操作で，20枚のスライドを染めることが可能であり，全行程で約 3 時間で終了する[3]．

それぞれの probe の発現値は，既報[4]のごとくまずそれぞれの症例の 6 つの probe による染色程度を image analyzer にて OD 値で表現し，転移関連遺伝子群の OD 値をそれぞれ poly dT の OD 値で除した値を，それぞれ遺伝子の発現指数とした．すなわち，それぞれの遺伝子群が mRNA 全体からみて何%の mRNA に発現しているかを示すものである．次に各遺伝子の発現指数の平均値と ly 因子，v 因子との関連について統計学的に検討した．

成　績

1．ly 因子，v 因子と各転移形式との関係

ly 因子では，まずリンパ節転移との相関をみると，ly0では6.2%に過ぎないのに対し，ly1，2，3と上昇するに従い，72.3%，85.0%，99.8%と高率を示し，強い相関が認められた(**Fig. 2**)．特に治療上問題となる 3 群と 4 群との関係を見ると，より鮮明であり，ly0の症例は認められないのに対し，ly1，2，3ではそれぞれ10.4%，19.4%，50.0%と漸増していた．次に肝転移と腹膜播種との関係を見たが，肝転移では ly1，2，3でいずれも10%内外と差が認められなかったが，腹膜播種では ly0では1.4%と低率であるが，ly1，2，3ではそれぞれ11.8%，15.9%，34.1%と相関が認められた．

次に v 因子を検討したところ，まず肝転移との関係をみると，v0では1.4%であるのに対し，v1，2，3ではそれぞれ10.1%，20.5%，50.0%と著増しており，強い相関が認められた(**Fig. 3**)．しかしリンパ節転移や腹膜播種とは相関は認められなかった．

Fig. 2　Correlation between ly factor (lymphatic invasion) and lymph node metastasis of gastric cancer.

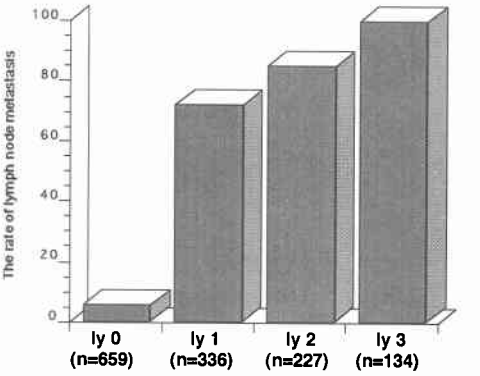
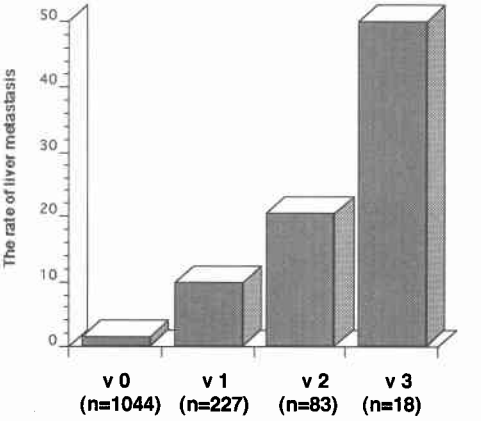


Fig. 3　Correlation between v factor (vascular invasion) and liver metastasis of gastric cancer.



以上から，ly 因子ではリンパ節転移と腹膜播種，v 因子では肝転移との関係が認められた．

2．転移関連遺伝子群の mRNA 発現指数と ly 因子，v 因子との関係

各遺伝子群の発現指数の平均値と ly 因子，v 因子との関係を単変量解析にて検討した．ly 因子との関係をみると，EGFR, bFGF, VEGF ではいずれも ly＋群は ly－群に比し，発現指数が高い傾向がみられるものの有意差は認められなかった．これに対し，collagenase は ly＋群で74であったのに対し，ly－群では39と有意差を持って ly＋群が高い発現指数を示した (p=

Table 2 mRNA expression index of metastasis-related genes in patients with lymphatic invasion positive and negative gastric cancer.

	ly+(n=67)	ly−(n=26)	
EGFR	58(20-100)	55(18-100)	
bFGF	61(18-96)	53(15-80)	
VEGF	65(28-100)	53(17-100)	
Collagenase	74(32-90)	39(0-64)	p=0.005
E-cadherin	20(5-40)	42(11-76)	p=0.01

Table 3 mRNA expression index of metastasis-related genes in patients with vascular invasion positive and negative gastric cancer.

	v+(n=30)	v−(n=63)	
EGFR	60(24-100)	54(18-100)	
bFGF	58(18-92)	55(15-56)	
VEGF	76(38-100)	42(17-86)	
Collagenase	72(30-90)	41(10-72)	p=0.0006
E-cadherin	35(5-72)	32(12-76)	p=0.01

0.05)．また E-cadherin は逆に ly+群で20，ly−群で42と有意差を持って発現が減弱していた（p=0.01）(**Table 2**)．

これに対し v 因子では，VEGF が v+群で76，v−群42と明らかに陽性群で高値を示した（p=0.0006）．また，collagenase も v+群で72，v−群41と陽性群で有意に高い発現が認められた．これに対し，EGFR，bFGF における発現指数の亢進や E-cadherin の発現減弱は認められなかった（**Table 3**）．

考　察

胃癌における ly 因子，v 因子は数多くの病理情報の中でその意義が埋没していたが，元来リンパ節転移を生ずるためにはリンパ管に癌細胞が入ることが不可欠であり，また血行性転移には癌細胞が静脈に浸潤する必要性が高いものと考えられる．つまりこれらの因子は，臨床的な転移の少し前のステップを直接みることができるものであり，当然，転移，再発の予測に有用なものであることは容易に予測がつく．実際，今回の検討でも，ly 因子とリンパ節転移，v 因子と肝転移との間には強い相関が認められ，これらの因子の程度が高まるにつれて，転移の率も上昇していた．しかしこのような転移，再発の良い指標も，術後病理成績を待って初めて知ることができるため，術前，術中からの治療応用に使うことは不可能であった．そこで求められるのが，この ly 因子，v 因子を必然的に予測できる因子を検索することである．

一方，無秩序にみえた癌の転移も分子機構の飛躍的な発展により，かなり詳細に解明されてきた．すなわち，ある種の癌遺伝子により転移能を獲得した癌細胞が，血管発生を高めつつ増殖能を増し，血管内皮細胞の基底膜を分解して血管内に進入し，大循環を経て標的臓器に到達する．標的臓器ではその血管内皮に接着し，基底膜を分解して臓器に進入し，血管新生を高めて増殖することにより転移が完成する．この中で，ly 因子，v 因子は原発臓器で脈管に浸潤した像を顕微鏡的にみるものである．つまり理論的には，この脈管浸潤までに必要なステップをクリアーしなければならない．そこで，増殖因子，血管新生因子，基底膜を分解する因子などの亢進，さらに細胞が遊離するための接着因子の減弱などの有無から予測することが妥当と考えられる．

ここでまず問題となるのがどのような因子を検討すべきかということであるが，これまでの数多くの胃癌を中心とした報告から増殖因子として EGFR[5]，血管新生因子として bFGF と VEGF[6]，基底膜分解酵素として基底膜の主成分である type IV collagen を分解する type IV collagenase[7]，接着因子として E-cadherin[8]を選択した．次の問題として，これらの因子の発現をどのような方法で検討すべきかということが挙げられるが，小さな生検組織を用いること，簡便であること，より客観的な評価が可能であることなどから，Fidler らが開発した ISH 法を選択した．この方法では20枚の切片の各プローブの mRNA の発現を約3時間で染色することが可能である．また各プローブの特異性に関してはすでに詳細な検討がなされており，大腸癌を中心にいくつかの報告がなされている．

以上から ISH 法により，胃癌生検組織を用いた，各種の転移関連遺伝子群の検索を行い，その発現程度から ly 因子，v 因子の予測が可能であるかを検討した．その結果，ly 因子では type IV collagenase と E-cadherin，v 因子は type IV collagenase と VEGF が単変量解析により陽性群と陰性群で有意の差を認めた．さらに ly 因子，v 因子の程度により，さらなる発現の差を認めた．2つの遺伝子群を組み合わせることにより，それぞれ70%の予測が可能と考えられたが，今回の検討は少数でもあり，今後これらの遺伝子群を中心に症例を重ねて ly 因子，v 因子の予測の設定条件を確立させる必要があると考えられた．

教室では，以前から再発形式を予測した「術中先回

り免疫化学療法」を提唱し，肝転移には術中肝動注，腹膜播種には腹腔内高濃度化学療法などを施行し，それぞれ再発率の低下や生存期間の延長を得ている[9]．この治療の重要なポイントは，それらの再発ハイリスク症例をどのように設定すべきかということであるが，今回の ISH 法により ly 因子，v 因子の予測は，このハイリスクをより効率的に選択するために多いに有用なものになるものと期待される．

文　献

1) Fidler IJ: Critical factors in the biology of human cancer metastasis: 28th GHA Clowes Memorial Award Lecture. Cancer Res **50**: 6130—6138, 1990
2) 胃癌研究会編：胃癌取扱い規約．改訂斑12版．金原出版，東京，1993
3) Radinsky R, Bucana CD, Ellis LM et al: A rapid colorimetric in situ messenger RNA hybridization technique for analysis of epidermal growth factor receptor in paraffin-embeded surgical specimens of human colon carcinomas. Cancer Res **53**: 937—943, 1993
4) Kitadai Y, Ellis LM, Tucker SL et al: Multiparametiric in situ mRAN hybridization analysis to predict disease recurrence in patients with colon carcinoma. Am J Pathol **149**: 1541—1551, 1996
5) Radinsky R, Risin S, Fan D et al: Level and function of epidermal growth factor receptor predict the metastatic potential of human colon carcinoma cells. Clin Cancer Res **1**: 19—31, 1995
6) Takahashi Y, Cleary KR, Mai M et al: Significance of vessel count, vascular endothelial growth factor, and its receptor (KDR) in intestinal-type gastric cancer. Clin Cancer Res **2**: 1679—1684, 1996
7) Sato H, Kida Y, Mai M et al: Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in various human tumor cells. Oncogene **7**: 77—83, 1992
8) Shiozaki, Tahara H, Oka H et al: Expresseion of immunoreactive E-cadherin adhesion molecules in human cancers. Am J Pathol **139**: 17—23, 1991
9) Takahaashi Y, Ohta T, Nomura H et al: Intraoperative hepatic arterial infusion for prevention of liver metastasis from gastric cancer. Editored by Siewert JR and Roder JD. International Proceedings of 2nd International Gastric Cancer Congress. Monduzzi Editore, Bologna, 1997, p1423—1427

Multiparametric in Situ mRNA Hybridization Analysis for Gastric Biopsies to Predict Lymphatic Invasion and Vascular Invasion in Patients with Gastric Carcinoma

Yutaka Takahashi
Department of Surgical Oncology, Cancer Research Institute, Kanzawa University

We determined the level of expression several genes that regulate different steps in the process of gastric cancer metastasis (growth [epidermal growth factor receptor: EGF-R], angiogenesis [basic fibroblast growth factor: bFGF] and vascular endothelial growth factor: VEGF]), invasion (type IV collagenase), and cell adhesion/cohesion (E-cadherin) in biopsy specimens of primary human gastric carcinomas by using the in situ hybridization (ISH) method to predict lymphatic invasion and vascular invasion. Our results showed that higher expression of type IV collagenase and lower expression of E-cadherin significantly related to lymphatic invasion, and higher expression of type IV collagenase and VEGF were significantly correlated with vascular invasion, These results suggest that our ISH method for gastric biopsy specimens will be useful to predict lymphatic invasion and vascular invasion followed by metastasis and recurrence of gastric cancer.

Reprint requests: Yutaka Takahashi Department of Surgical Oncology, Cancer Research Institute, Kanzawa University
4-86 Yoneizumi, Kanazawa, 921-8044 JAPAN