

原 著

進行結腸癌における c-MET (hepatocyte growth factor receptor) 発現の術後予後因子としての意義

獨協医科大学越谷病院外科

小林 和弘 奥山 隆 中村 哲郎 山口 真彦

はじめに：Hepatocyte growth factor (HGF) は c-MET 受容体と特異的に結合し、癌細胞の増殖、遊走、形態形成などに関与する。今回、治癒切除された進行結腸癌における c-MET 発現の予後因子としての有用性を検討した。方法：対象は 1988-1998 年までに治癒切除された深達度 ss 結腸癌 88 例で、HE 染色と c-MET 免疫組織化学染色を施行した。結果：c-MET 発現は 88 病変中 37 病変 (42.0%) に認められた。c-MET 発現が認められた病変では c-MET 発現を認めなかった病変に比べ有意にリンパ管侵襲、リンパ節転移を多く認めた ($p=0.0006$, $p<0.0001$)。術後再発は 27 症例 (30.6%) でみられ、再発を認めた症例では再発を認めなかった症例に比べ、c-MET 発現が有意に多く認められた。再発形式別では、肺転移再発で c-MET 発現の有無による有意差がみられた ($p=0.0098$)。また、累積生存曲線および 5 年生存率と c-MET 発現との関係では c-MET 発現の有無による有意差を認めた (c-MET 陽性：49.2%，c-MET 陰性：77.8%)。術後生存に関する多変量解析を行うと c-MET 発現のみが独立した有意な予後因子であった ($p=0.0123$)。考察：治癒切除された進行結腸癌症例における c-MET 発現は、術後再発や予後不良の高危険群抽出に有用であることが示唆された。

緒 言

治癒切除された大腸癌の術後再発や予後の予測は、従来から組織型や深達度、リンパ節転移、脈管侵襲などの病理組織学的因子にて行われている^{1)~4)}。近年、発癌における遺伝子異常や癌転移における分子機構が解明されるにしたがい、癌関連遺伝子や癌抑制遺伝子、糖鎖抗原、増殖因子、細胞間接着因子など分子生物学的因子の転移や予後への関与が検討され、それらの予後因子としての有用性が報告されている^{5)~9)}。このうち、癌抑制遺伝子である p53 や糖鎖抗原 Sialyl Lewis^x の異常発現は、大腸癌における独立した予後因子であることが免疫組織化学染色による検討においても指摘されている^{5)~7)}。

Hepatocyte growth factor (以下、HGF) の特異的受容体である c-MET は分子量 50kD の α 鎖と

145kD の β 鎖からなるヘテロ 2 量体で、 α 鎖は細胞外ドメインのみを β 鎖は細胞外、膜貫通、細胞内の各ドメインを有する。HGF が c-MET と結合すると、c-MET の 2 量体形成、自己リン酸化、細胞内エフェクターの結合を経て、Ras-MAP キナーゼ系や PI3 キナーゼ系などの下流伝達経路へそのシグナルを伝達し、細胞の増殖、遊走、形態形成などの作用を促す¹⁰⁾¹¹⁾。また、癌細胞において、細胞接着分子であるカドヘリンと β カテニンの結合機能を低下させ、細胞接着機構を破綻し、癌細胞の癌巣からの遊離を促す¹²⁾。

現在までに c-MET は膀胱癌や乳癌、肺癌、腎癌などの癌浸潤や転移に関与することが報告されているが、大腸癌についての報告は少ない^{13)~20)}。今回、我々は治癒切除された進行結腸癌を対象に、c-MET 発現と臨床病理学的所見や再発、予後との関連を検討し、c-MET 発現の予後因子としての有用性を検討した。

Table 1 Clinicopathological findings

		Number of patients
Age (year) *		62.9 (40-90)
Gender	male	55
	female	33
Location	right side	37
	left side	51
Tumor size (mm) *		52.5 (20-150)
Differentiation	well	70
	moderate	18
Lymphatic invasion	present	64
	absent	24
Venous invasion	present	18
	absent	70
Lymphnode metastasis	present	48
	absent	40
c-MET	positive	37
	negative	51
Cumulative five year survival rate		65.80%

* : median (interquartile range)

対 象

1988年4月～1998年12月までの間に当科にて外科的治癒切除(根治度A)された深達度ss結腸癌201症例であり、このうち以下の条件を満たす高・中分化型腺癌88症例88病変を対象とした。すなわち、病理学的に2群リンパ節まで検討されている、術前・術後に化学療法がなされていない、術後観察が少なくとも3年以上であることを条件とし、これら全ての条件を満たすものとした。また、多発大腸癌症例や炎症性腸疾患、大腸腺腫症を伴う症例、他の悪性疾患を併発あるいは他病死している症例は対象より除外した。対象症例の内訳は平均年齢(範囲)は62.9(40～90)歳、性別では男性55例、女性33例であった。占居部位別では右側結腸37病変、左側結腸51病変で、腫瘍径の平均(範囲)は52.5(20～150)mmであった(Table 1)。

方 法

臨床病理学的所見：切除した結腸癌組織は4%ホルマリンで24時間固定後、パラフィン包埋、4μmの連続切片を作製しHE染色とc-MET免疫組織化学染色を行った。病変の占居部位について

は主支配血管の違いにより上腸間膜動脈系(盲腸、上行結腸、横行結腸)を右側結腸、下腸間膜動脈系(下行結腸、S状結腸)を左側結腸とした。その他の臨床病理学的所見の記載については、大腸癌取扱規程に準じた⁴⁾。

c-Met免疫組織化学染色と発現程度の評価：脱パラフィン後、マイクロウェーブ照射(300Wで20分)を行い、0.3% H_2O_2 加メタノールにて30分間内因性ペルオキシダーゼ活性を阻害した。さらに、プロテインブロック血清(DAKO, Carpinteria, CA, USA)を30分反応させた後、1次抗体としてrabbit抗ヒトc-MET抗体[Met(SP260), Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA]を100倍希釈し室温で1時間反応させ、さらに4℃にて1晩反応させた。2次抗体のrabbit IgG抗体(PK-6101, Vectastain ABC kit Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA)と反応させ、Avidin-biotin peroxidase complex methodにより、1.6%DAB- H_2O_2 溶液内で10分間呈色させ、水洗後hematoxylinで核染色を行い、脱水、透徹、封入した。

c-MET発現は一部の正常細胞の細胞質にも認められたが、主に病巣先進部における癌細胞の細胞質に認められた(Fig. 1a～d)。c-MET発現の判定は、病巣の浸潤最深部を含む最大剖面全体においてc-MET発現を認める腫瘍細胞の割合にて以下の2群に分類した。すなわち、腫瘍細胞の割合が0～30%未満のもの(little)あるいは30%～60%未満のもの(weakly positive)を陰性、60%～80%未満のもの(positive)あるいは80%以上のもの(strong positive)を陽性とした¹⁸⁾。

統計学的検討：統計学的な有意差検定は、2群間の比較には χ^2 検定とMann-Whitney U検定を用いた。再発については2002年3月の予後調査に基づいて検討し、平均観察期間は70.2か月であった。術後の累積生存曲線および生存率の算出にはKaplan-Meier法(logrank test)を用い、術後生存に関する危険因子候補の多変量解析は比例ハザードモデルにて算出した。いずれも $p < 0.05$ の場合に有意差ありと判定した。

成 績

対象病変の臨床病理学的所見：今回の対象病変

Fig. 1 a : Immunohistochemical detection of c-MET on section of normal tissue. b : Colon carcinoma tissue positive of immunohistochemical staining for c-MET. c : Colon carcinoma tissue negative of immunohistochemical staining for c-MET. a-c : Original magnification $\times 200$ d : An example of a lesion staining for c-MET along the invasive front. d : Original magnification $\times 40$

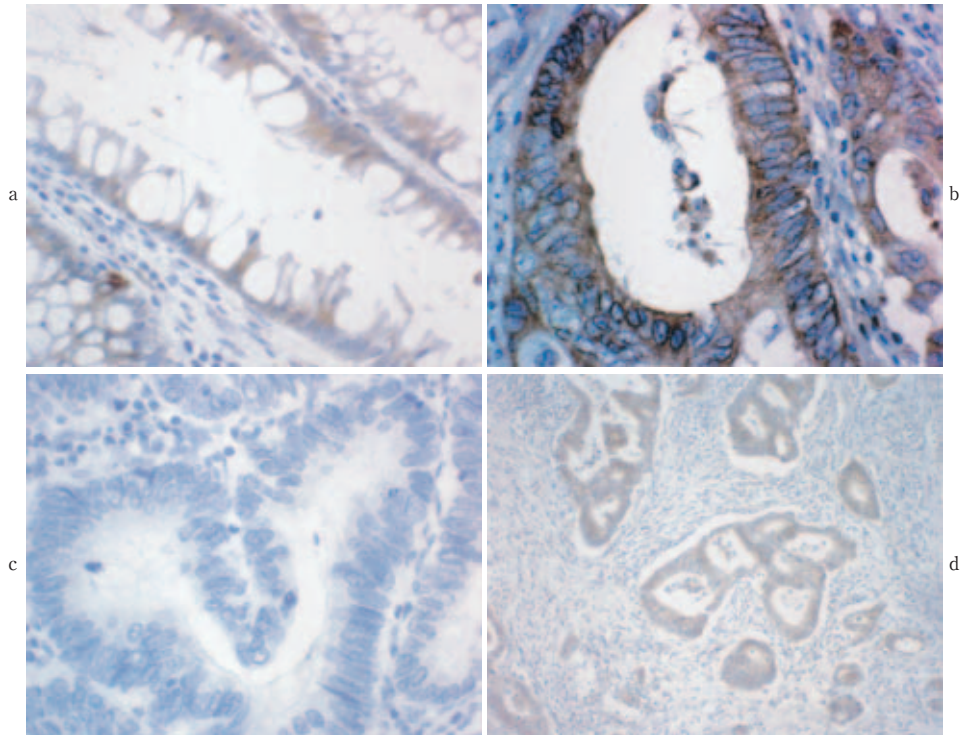


Table 2 Relationship of the expression of c-met and clinicopathological findings

		Number of patients		p value
		c-met positive	c-met negative	
Age		36	22	0.2552*
Gender	male	20	35	0.1633
	female	17	16	
Location	right colon	18	19	0.2851
	left colon	19	32	
Tumor size	< 50.0mm	18	24	0.8828
	50.0mm \leq	19	27	
Differentiation	well	28	42	0.4433
	moderately	9	9	
Lymphatic invasion	present	34	30	0.0006
	absent	3	21	
Venous invasion	present	11	7	0.0662
	absent	26	44	
Lymph node metastasis	present	32	16	< 0.0001
	absent	5	35	

* : Mann-Whitney U test

Table 3 Relationship with the expression of c-MET and recurrence

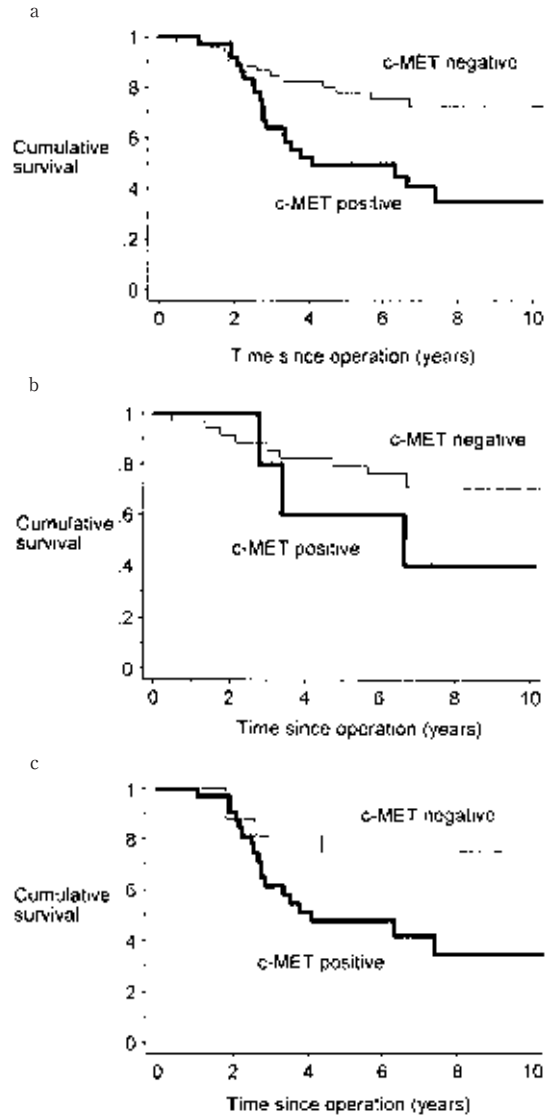
		Number of patients		p value
		c-MET positive	c-MET negative	
Overall	present	19	8	0.0003
	absent	20	43	
Local	present	2	0	0.093
	absent	35	51	
Liver	present	7	6	0.3505
	absent	30	45	
Lung	present	8	2	0.0098
	absent	29	49	
Peritoneum	present	2	0	0.093
	absent	35	51	

中リンパ管侵襲は 64 病変に、静脈侵襲は 18 病変に認められ、リンパ節転移は 48 病変に認められた。術後再発は 27 症例 (30.6%) に認められ、累積 5 年生存率は 65.8% であった (Table 1)。

c-MET 発現と臨床病理学的所見との関連：c-MET 発現は 88 例中 37 例 (42.0%) に認められた。c-MET 発現を認めた病変ではリンパ管侵襲、リンパ節転移を有意に多く認めたが^s ($p=0.0006$, $p<0.0001$)、静脈侵襲の有無との有意な関連は認められなかった ($p=0.0662$)。年齢、性差、占居部位、腫瘍径、組織型と c-MET 発現との関連は認められなかった (Table 2)。

c-MET 発現と再発、予後との関連：再発を認めた症例では再発を認めなかった症例に比べ、c-MET 発現が有意に多く認められた ($p=0.0003$) (Table 3)。これを再発形式別にみると肺転移再発を認めた症例ではこれを認めなかった症例に比べ c-MET 発現が有意に多く認められたが^s ($p=0.0098$)、局所再発、肝転移再発、腹膜再発と c-MET 発現との有意な関連は認められなかった。

また、予後との関係では c-MET 発現の有無により累積生存曲線、5 年生存率 (c-MET 発現あり 49.2%, c-MET 発現なし 77.8%) で有意差を認めた ($p=0.0028$, logrank test) (Fig. 2a)。しかしながら、これを stage 別にみると stage III 症例では有意差を認めたが、stage II 症例においては有意差を認めなかった (stage III : $p=0.0445$, stage

Fig. 2 Comparison of postoperative survival according to positive or negative of immunohistochemical staining for c-MET. a : All patients ($p = 0.0028$). b : Stage III patients ($p = 0.2091$). c : Stage II patients ($p = 0.0445$).

II : $p=0.2091$) (Fig. 2b, c)。

c-MET 発現を含めた臨床病理学的所見を予後に関する危険因子の候補として多変量解析を行うと、c-MET 発現のみが独立した有意な予後因子であった [hazard ratio (95% confidence interval) :

Table 4 Relationship of the expression of c-MET and routine pathological findings with survival analysed using the proportional hazard model

		Hazard ratio	95% confidence interval	p value
Differentiation	well : moderately	1.945	0.737-5.132	0.1788
Tumor location	right side : left side	1.161	0.562-2.401	0.6865
Tumor size	< 50.0mm : 50.0mm ≤	0.92	0.453-1.870	0.8188
Lymphatic invasion	present : absent	0.653	0.264-1.619	0.3578
Venous invasion	present : absent	1.437	0.607-3.400	0.679
Lymphnode metastasis	present : absent	1.108	0.456-2.688	0.8214
c-MET	positive : negative	3.031	1.272-7.225	0.0123

3.031 (1.272-7.225), $p=0.0123$] (**Table 4**).

考 察

本検討において c-MET 発現は、治癒切除された進行結腸癌のリンパ節転移や術後再発、予後と有意な関連を認めた。さらに、予後に関する危険因子についての多変量解析では、他の危険因子候補のなかで c-MET 発現のみが独立した有意な予後因子であった。これらの結果は、報告数は少ないものの以前より指摘されている大腸癌における c-MET 発現と悪性度との関連を肯定するものであった^{17)~20)}。

c-MET の発現部位としては、癌の生物学的特性が現れているとされる癌先進部の近傍に存在する癌腺管に認められた^{21)~23)}。このことは HGF/c-MET signal が宿主と直に接している癌先進部において癌の増殖、浸潤、転移に重要な働きをしていることを示唆する。ただし、癌の増殖、浸潤には他に多くの分子生物学的因子が関与することから、今後は HGF/c-MET signal の上・下流 signal や癌先進部におけるマトリクスメタプロテアーゼなどの癌-宿主反応との関連性についても検討することで、大腸癌における c-MET 発現の生物学的意義がさらに解明されていくものと考えられる²⁴⁾。

一方、Umeki ら²⁵⁾は大腸癌における c-MET 過剰発現は腫瘍径のみに有意な関連を示し、他の臨床病理学的所見や survival との関連は認めなかったことを報告している。この我々の結果との相違が生じた原因については、本検討では対象症例の深達度を ss に限定したことが起因している

ものとも推測できる。大腸癌における HGF/c-MET signal の重要性を明らかにするため、早期結腸癌も含めたさらなる症例の集積が今後も必要不可欠である。

現在、治癒切除後結腸癌の追加補助化学療法は stage III 以上の症例に対して標準治療とされており、stage II 症例については controversial であり標準化されていない^{26)~28)}。しかしながら、stage II 症例のなかにも術後再発を認め予後不良の症例が少なからず存在する。そのため、stage II 症例における再発高危険群を抽出するための因子について多くの検討がなされている^{29)~32)}。本研究では stage 別での術後生存に c-MET 発現による有意差は認められなかったが、c-MET が stage II 症例における再発高危険群の抽出に有用な因子となる可能性もある。そのため現在我々は、症例数を増やし stage II 症例での c-MET 発現の検討を進めている。

大腸癌に対する化学療法では現在 5-fluorouracil (5-Fu) を中心とした薬剤投与が行われているが、その効果は十分なものとはいえず、そのためいくつかの薬剤について大規模な多施設共同研究が行われている^{33)~35)}。HGF/c-MET signal についても徐々に解明が進んでおり、最近では c-MET 受容体に HGF と競合的に結合し、c-MET のチロシンリン酸化を阻害する HGF アンタゴニスト (NH4/malignostain) が癌抑制に有用であることが報告され、癌治療への貢献が期待される³⁶⁾³⁷⁾。

稿を終えるにあたり、本研究にご協力、ご尽力ください

ました医学総合研究所・越谷共同利用部門技術員・黄海文昌氏、検鏡に際し御指導を頂いた病理部・上田善彦教授に感謝の意を表します。

なお、本文の要旨は第102回日本外科学会総会(札幌)において発表した。

文 献

- 1) Ducks CE : The classification of cancer of the rectum. *J Pathol Bacteriol* **35** : 322—332, 1932
- 2) Astler VB, Collier FA : The prognostic significance of direct extension of colon and rectum. *Ann Surg* **139** : 846—851, 1954
- 3) American Joint Committee on Cancer : AJCC Cancer staging manual. Edited by Fleming ID, Cooper JS, Henson DE. Fifth edition. Lippincott-Raven, Philadelphia, 1997
- 4) 大腸癌研究会編 : 大腸癌取扱い規約. 改訂第6版. 金原出版, 東京, 1998
- 5) Allegra CJ, Parik S, Colangelo LH et al : Prognostic value of thymidylate synthase, Ki-67, and p53 in patients with Duke's B and C colon cancer : a national cancer institute-national surgical adjuvant breast and bowel project collaborate study. *J Clin Oncol* **21** : 241—250, 2003
- 6) Zeng ZS, Sarkis AS, Zhang ZF et al : p53 unclear overexpression : an independent predictor of survival in lymph node-positive colorectal cancer patients. *J Clin Oncol* **12** : 2043—2050, 1994
- 7) Nakayama T, Watanabe M, Katsumata T et al : Expression of sialyl lewis^a as a new prognostic factor for patients with advanced colorectal carcinoma. *Cancer* **75** : 2051—2056, 1995
- 8) Giacomelli L, Gianni W, Belfiore C et al : Persistence of epidermal growth factor receptor and interleukin 10 in blood of colorectal cancer patients after surgery identifies patients with high risk to relapse. *Clin Cancer Res* **9** : 2678—2682, 2003
- 9) Chen PY, Choo PH, Yao J et al : A survival-stratification model of human colorectal carcinomas with β -catenin and p27^{kip1}. *Cancer* **95** : 2479—2486, 2002
- 10) Greradi E, Stoker M : Hepatocyte growth factor-scatter factor : mitogen, motogen and met. *Cancer Cells* **3** : 227—232, 1991
- 11) Matsumoto K, Nakamura T : Roles of HGF as a pleiotropic factor in organ regeneration. *EXS* **65** : 225—249, 1993
- 12) 落合淳志 : カドヘリンと疾患. *病理と臨* **18** : 320—327, 2000
- 13) Ebert M, Yokoyama M, Friess H et al : Coexpression of the c-met proto-oncogene and hepatocyte growth factor in human pancreatic cancer. *Cancer Res* **54** : 5775—5778, 1994
- 14) Taback B, Chan AD, Kuo CT et al : Detection of occult metastatic breast cancer cells in blood by a multimolecular marker assay : correlation with clinical stage of disease. *Cancer Res* **61** : 8845—8850, 2001
- 15) Tokunou M, Niki T, Eguchi K et al : c-MET expression in myofibroblasts : role in autocrine activation and prognostic significance in lung adenocarcinoma. *Am J Pathol* **158** : 1451—1463, 2001
- 16) Sweeney P, El-Naggar AK, Lin SH et al : Biological significance of c-MET over expression in papillary renal cell carcinoma. *J Urol* **168** : 51—55, 2002
- 17) 鯉坂秀之, 西村元一, 経田 淳ほか : 大腸癌における c-MET/hepatocyte growth factor receptor の発現. *日消病会誌* **95** : 750—754, 1998
- 18) Tabuchi Y, Nakamura T, Ohno M et al : Immunohistochemical expression of c-MET (HGF receptor) in colorectal cancer lesions. *Bull Health Sci Kobe* **14** : 43—48, 1998
- 19) Herynk MH, Radinsky R : The coordinated functional expression of epidermal growth factor receptor and c-MET in colorectal carcinoma metastasis. *In Vivo* **14** : 587—596, 2000
- 20) Otte JM, Schmitz F, Kiehn K et al : Functional expression of HGF and its receptor in human colorectal cancer. *Digestion* **61** : 237—246, 2000
- 21) Jass JR, Love SB, Northover JM : A new prognostic classification of rectal cancer. *Lancet* **2** : 1303—1306, 1987
- 22) Coverlizza S, Risio M, Ferrari A : Colorectal adenomas containing invasive carcinoma : pathologic assessment of lymph node metastatic potential. *Cancer* **64** : 1937—1947, 1989
- 23) Ono M, Sakamoto M, Ino Y et al : Cancer cell morphology at the invasive front and expression of cell adhesion-related carbohydrate in the primary lesion of patients with colorectal carcinoma with liver metastasis. *Cancer* **78** : 1179—1186, 2000
- 24) 奥山 隆 : 大腸 sm・mp 癌における Matrix Metalloproteinase-9 (MMP-9) 発現と臨床病理学的所見の検討. *日本大腸肛門病会誌* **55** : 9—15, 2002
- 25) Umeki K, Shiota G, Kawasaki H : Clinical significance of c-MET oncogene alterations in human colorectal cancer. *Oncology* **56** : 314—321, 1999
- 26) Moertel CG, Fleming TR, Macdonald JS et al : Fluorouracil plus levamisole as effective adjuvant therapy after resection of stage III colon carcinoma. *Ann Intern Med* **122** : 321—326, 1995
- 27) Wolmark N, Rockette H, Mamounas E et al : Clinical trial to assess the relative efficacy of fluorouracil and leucovorin, and fluorouracil, leucovorin, and levamisole in patients with Duke's B and C carcinoma of the colon : results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project C-04. *J Clin Oncol* **17** : 3553—3559, 1999
- 28) Mamounas E, Wieand S, Wolmark N et al : Com-

- parative efficacy of adjuvant chemotherapy in patients with Dukes' B versus Dukes' C colon cancer : results from four National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project adjuvant studies (C-01, C-02, C-03, and C-04). *J Clin Oncol* **17** : 1349—1355, 1999
- 29) Thebo JS, Senagore AJ, Reinhold DS et al : Molecular staging of colorectal cancer. K-ras mutation analysis of lymph nodes upstages Dukes B patients. *Dis Colon Rectum* **43** : 155—162, 2000
- 30) Purdie CA, Piris J : Histopathological grade, mucinous differentiation and DNA ploidy in relation to prognosis in colorectal carcinoma. *Histopathology* **37** : 474—475, 2000
- 31) Gervaz P, Bouzourene H, Cerottini J-P et al : Dukes B colorectal cancer : distinct genetic categories and clinical outcome based on proximal or distal tumor location. *Dis Colon Rectum* **44** : 364—373, 2001
- 32) Okuyama T, Nakamura T, Yamaguchi M : Budding is useful to select high-risk patients in stage II well-differentiated or moderately differentiated colon adenocarcinoma. *Dis Colon Rectum* **46** : 1400—1406, 2003
- 33) Colorectal Cancer Collaborative Group : Palliative chemotherapy for advanced colorectal cancer : systematic review and meta-analysis. *BMJ* **321** : 531—535, 2000
- 34) Douillard JY, Cunningham D, Roth AD et al : Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : a multicentre randomized trial. *Lancet* **355** : 1041—1047, 2000
- 35) De Gramont A, Figuer A, Seymour M et al : Leucovorin and fluorouracil with or without oxaliplatin as first-line treatment in advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol* **18** : 2938—2947, 2000
- 36) Date K, Matsumoto K, Shimura H et al : HGF/NK4 is a specific antagonist for pleiotrophic actions of hepatocyte growth factor. *FEBS Lett* **420** : 1—6, 1997
- 37) Matsumoto K, Nakamura T : NK4 (HGF-antagonist/angiogenesis inhibitor) in cancer biology and therapeutics. *Cancer Sci* **94** : 321—327, 2003

The Expression of c-MET (HGF Receptor) Represents Poor Prognosis of Patients with pT3 Colon Carcinoma

Kazuhiro Kobayashi, Takashi Okuyama, Tetsuro Nakamura and Masahiko Yamaguchi
Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine, Koshigaya Hospital

Introduction : Hepatocyte growth factor receptor (c-MET) has been suggested to play a role in the progression and metastasis of colorectal carcinoma. In this study we investigated the relationship between expression of c-MET and the malignant potential of pT3 colon carcinoma. **Methods** : Curatively resected specimens of 88 well or moderately differentiated colon adenocarcinomas were studied. The median postoperative follow-up time was 70.2 months. Serial sections were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded blocks, and they were stained with HE and immunohistochemically stained for c-MET. Expression of c-MET at the invasive front of the tumor was evaluated as positive (+) or negative (-). **Results** : Expression of c-MET was positive in 37 lesions (42.0%), and it was significantly correlated with lymphatic invasion ($p = 0.0006$) and lymph node metastasis ($p < 0.0001$). Recurrence was detected in 27 patients (30.6%). Patients with c-MET-positive lesions had a significantly higher incidence of pulmonary metastatic recurrence than patients with c-MET-negative lesions ($p = 0.0098$). Postoperative survival was significantly shorter in patients with c-MET-positive lesions than in patients with c-MET-negative lesions ($p = 0.0028$, logrank test). The multivariate proportional hazard model revealed that expression of c-MET was the only significant co-factor of postoperative survival in pT3 colon carcinoma [hazard ratio (95% confidence interval) : 3.031 (1.272-7.225), $p = 0.0123$]. **Conclusion** : Thus, testing pT3 colon carcinoma for expression of c-MET is useful for predicting recurrence and outcome.

Key words : c-MET (hepatocyte growth factor receptor), colon carcinoma, recurrence, prognosis

[*Jpn J Gastroenterol Surg* 39 : 23-30, 2006]

Reprint requests : Takashi Okuyama Department of Surgery, Dokkyo University School of Medicine, Koshigaya Hospital
2-1-50 Minamikoshigaya, Koshigaya, 343-8555 JAPAN

Accepted : June 22, 2005