

胃癌における臨床病理学および 分子生物学的予後予測因子の検討 —多変量解析による予後予測因子の同定—

西 本 直 樹

広島大学原爆放射能医学研究所病態治療部門, 臨床第二(腫瘍外科)研究分野(指導: 峠 哲哉教授)

受付 平成13年9月14日

受理 平成13年12月6日

胃癌において臨床病理学的因子及び分子生物学的因子を用い, 予後予測因子, 特に腹膜及び肝再発予測因子について多変量解析により検討した。当科で切除された原発胃癌切除症例165例について分子生物学的因子として, c-erb-B2, c-met, K-sam, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Platelet-derived endothelial cell growth factor (PDECGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), E-カドヘリン, β -カテニン, Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2), Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) の発現について免疫組織学的染色を施行した。これらの因子の中で単変量解析により c-met, K-sam, PCNA, PDECGF が予後予測因子となり得ることが認められた。さらにロジスティックモデルによる多変量解析により, 腹膜再発に関してはリンパ節転移, 間質型, K-sam および c-met の両者陽性群, 肝再発に関しては, 深達度, MMP-9 が有意な独立した再発予測因子であった。Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析による予後予測因子の検討ではリンパ節転移, 深達度, 間質, K-sam 及び c-met 両者陽性群が独立した因子であった。従って, 本研究により胃癌の予後予測因子に関して, 臨床病理学的因子に分子生物学的因子を加えて検討することがより有用であることが示された。

Key words : 胃癌, 分子生物学的因子, 腹膜再発, 肝再発, 予後予測因子

細胞の増殖は増殖因子や増殖抑制因子との相互作用によって調節されている。その相互作用のバランスが崩れ, 増殖刺激が続くことで細胞は自立増殖を開始する。また増殖因子のレセプターの異常により増殖刺激が持続的に伝達される事も知られており, 増殖因子及びそのレセプターは癌細胞の増殖にとって重要な働きをしている^{53,54}。癌遺伝子や癌抑制遺伝子の多くは, 細胞の増殖に働く増殖因子やその受容体, さらに細胞の増殖や分化におけるシグナル伝達系やそれによってもたらされる遺伝子の発現の調節に重要な蛋白をコードしていることがわかっている。一方, 局所で増殖した癌細胞のうち増殖優位性を獲得するものが転移を起こすと考えられている。すなわち転移の過程には, 1) 増殖および血管新生, 2) 高転移株の出現, 3) 原発巣からの離脱, 4) 脈管への侵入, 5) 細胞の集塊の形成, 6) 宿主細胞の攻撃からの回避, 7) 脈管への接着, 8) 脈管外への浸潤・脱出, さらに9) 転移

巣での増殖というモデルが提唱されている^{6,37}。この様な癌細胞の増殖や転移の過程には増殖因子^{2,5,34,42,47,48,53,56}, 細胞周期関連因子^{14,49}, 血管新生因子^{4,13,23}, 細胞接着因子^{14,32,38,43,49,51}, 間質融解酵素^{1,28,33,36}などの多くの因子が関与している。さらにこれらの分子生物学的因子の多くが癌の悪性度に関与することや予後予測因子として有用であることが報告されている^{16,21,26,46,50,57}。しかしながら, 多くの報告が認められているにもかかわらず, 真に有用な因子の同定は未だ行われていないのが現状である。その原因としてはそれぞれの因子が単独に異なる方法で多施設で検討されているため, 症例の背景や施設間格差等のバイアスが含まれるためである。そこで今回我々は, これらの問題を解決すべく, 予後予測因子として報告された10因子を同時に検討し, 多変量解析を行うことで真に有用である因子の同定を試みた。

材料と方法

1. 材料

対象は当科で手術を施行された原発胃癌切除症例165例で、これらの症例に対しホルマリン固定パラフィン包埋連続切片を作成し、病理組織学的並びに分子生物学的に解析を行った。病理組織学的項目は胃癌取り扱い規約(第13版)に従った¹⁰⁾。165例の臨床病理学的所見の内訳を表1に示す。年齢は24-89才までで、平均年齢65.1才、進行度はstage 1a 48例, 1b 30例, 2 22例, 3a 21例, 3b 18例, 4a 6例, 4b 20例で、深達度はsm 55例, mp 26例, ss 36例, se 30例, si 18例であった。また組織型はpap 15例, tub1 31例, tub2 51例, por 46例, sig 19例, muc 3例でpap, tub1, tub2の97例を分化型(Differentiated type)とし, por, sig, mucの68例を未分化型(Undifferentiated type)とした。リンパ節転移陰性例は81例で、転移陽性例は84例であった。またリンパ管侵襲は129例に陽性で、静脈侵襲は84例に陽性であり、スキルス型は25例、INF γ は61例であった。

検討した分子生物学的因子はいずれも胃癌において腹膜及び肝再発予測因子、もしくは予後予測因子として多くの報告がされている因子を選択した。すなわち、

がん遺伝子から c-erb-B2^{39,50)}, c-met^{21,22)}, K-sam^{7,57)}, 細胞周期関連因子から proliferating cell nuclear antigen (PCNA)^{11,12,25,52)}, 血管新生因子から Platelet-derived endothelial cell growth factor (PDEC GF)^{27,46)}, Vascular endothelial growth factor (VEGF)^{20,24)}, 細胞接着因子からE-カドヘリン^{32,40)}, β -カテニン³⁸⁾, 間質融解酵素から Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2)^{9,15,31)}, Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9)^{15,28)}の10因子とした。

2. 免疫組織化学染色

免疫組織化学染色は DAKO 社の LSAB キット (DAKO, Tokyo, Japan) を用い, strept-avidin-biotin-peroxidase complex 法にて行った²⁴⁾。まず10%のホルマリン固定された切除標本をパラフィン包埋し, 4 μ m 切片を作成した。キシレンで脱パラフィンをした後, 100%, 90%, 80%のアルコール系列にて水酸化した後, PBS にて浸透させた。その後マイクロウェーブ (600W, 15分) による抗原賦活をした後, 0.3%過酸化水素加エタノールにて内因性ペルオキシダーゼをブロッキング, BSA (Bovine serum albumin) にて非特異反応のブロッキングを行った後, 一次抗体を用い 4 $^{\circ}$ C, over night にて反応させた。ビオチン標識 2次抗体を

表1 臨床病理学的因子の背景

Age	(years)	Histology	
Range	24-89	pap	15
Mean	65.1	tub1	31
Sex	(No. of patients)	tub2	51
Male	105	por	46
Female	60	sig	19
stage		muc	3
Ia	48	Lymph node	
Ib	30	(-)	81
II	22	(+)	84
IIIa	21	Lymphatic invasion	
IIIb	18	(-)	36
IVa	6	(+)	129
IVb	20	Venous invasion	
Depth of invasion		(-)	81
sm	55	(+)	84
mp	26	Scirrous type	
ss	36	(-)	140
se	30	(+)	25
si	18	INF	
		α, β	104
		γ	61

室温で20分間反応させ、ペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンにて10分反応させた後、DAB-H₂O₂と反応させて発色し、核染色はマイヤーヘマトキシリンにて行い、封入、検鏡した。

免疫組織染色で使用した抗体はそれぞれ抗ヒト c-erb-B2 マウスモノクローナル抗体⁴⁸⁾ (Novocastra, Newcastle, UK) 100倍希釈, 抗ヒト c-met マウスモノクローナル抗体⁴⁵⁾ (Novocastra, Newcastle, UK) 100倍希釈, 抗ヒト K-sam マウスモノクローナル抗体 (国立がんセンターより供与)^{7,57)} 100倍希釈, 抗ヒト PCNA マウスモノクローナル抗体⁴¹⁾ (DAKO, Tokyo, Japan) 100倍希釈, 抗 Platelet-derived endothelial cell growth factor (PDECGF) ヒトモノクローナル抗体⁴⁶⁾ (Roche, Kanagawa, Japan) 400倍希釈, 抗ヒト Vascular endothelial growth factor (VEGF) ウサギポリクローナル抗体²⁴⁾ (Santa Cruz, Santa Cruz, CA) 200倍希釈, 抗ヒトE-カドヘリンマウスモノクローナル抗体⁵¹⁾ (Takara, Tokyo, Japan) 100倍希釈, 抗ヒトβ-カテニンウサギポリクローナル抗体 (Takara, Tokyo, Japan) 100倍希釈, 抗ヒト MMP-2 モノクローナル抗体¹⁸⁾ (富士薬品工業, 富山, 日本) 100倍希釈, 抗ヒト MMP-9 モノクローナル抗体 (富士薬品工業, 富山, 日本) 100倍希釈を用いた。

判定はいずれも腫瘍先進部, 特に最深部において検鏡200倍における3視野で観測し, 染色された癌細胞の比率で行った^{8,30)}。これまでの報告に従って^{7,24)} c-erb-B2, c-met, K-sam, MMP-2, MMP-9 は25%以上, PDECGF, VEGF はいずれも10%以上を陽性症例とした。PCNA は癌細胞を1000個検鏡し, 陽性細胞を100分率で表し PCNA 標識とし, 25以上の症例を陽性症例とした。E-カドヘリン, β-カテニンはいずれも癌細胞において正常粘膜と比較し, 染色が50%以上失われた症例を減弱症例とした。

3. 統計学的解析

統計学的処理は因子間の解析について student's t test, あるいはχ²検定を用い, 腹膜及び肝再発予測因子についてロジスティックモデルによる多変量解析を行った。累積生存率は Kaplan-meier 法にて算出し, logrank test を用いた。予後予測因子の多変量解析には Cox の比例ハザードモデルを用いた³⁾。統計ソフトは StatView (Ver.5.0) を使用し, 危険率は5%以下を統計学的な有意差とした。

成 績

1. 分子生物学的因子の発現

免疫染色の代表例を提示する (図1)。c-erb-B2 は胃癌組織では主に癌細胞の細胞膜及び一部細胞質に, c-met, K-sam の発現は主に癌細胞の細胞質に発現が認められた。PCNA はいずれも主に胃癌細胞の細胞核に染色性が認められた。PDECGF の発現は胃癌組織では癌細胞並びに線維芽細胞やマクロファージなど周囲の間質にも染色性が認められ, 癌細胞では主に細胞質に発現し, VEGF の発現も主に癌細胞の細胞質に発現していた。E-カドヘリンの発現は正常組織では上皮細胞膜や細胞質に果顆粒状に染色され, 胃癌組織では癌細胞の一部で同様に染色され, また一部では減弱, 消失していた。β-カテニンの発現は正常組織では主に上皮の細胞質と一部の核に染色され, 胃癌組織では癌細胞でも同様に染色され, 症例や部位により減弱, 消失していた。MMP-2, MMP-9 の発現は胃癌組織では癌細胞並びに線維芽細胞, 筋組織など周囲の間質にも染色性が認められ, 癌細胞では主に細胞質に染色性が認められた。

2. 臨床病理学的因子と分子生物学的因子の関連性

1) 臨床病理学的因子とがん遺伝子の発現との関連性

まず, がん遺伝子のうち c-erb-B2, c-met, K-sam の発現と臨床病理学的因子について検討した (表2)。c-erb-B2 の発現は165例中68例 (41%) に認められたが, 臨床病理学的因子と c-erb-B2 の発現との間に有意な相関は認めなかった。

一方 c-met の発現は165例中77例 (47%) に認められ, 臨床病理学的因子では深達度, 病期と有意な相関を認めた (それぞれ $p < 0.0001$, $p < 0.01$)。リンパ節転移については陽性例84例中48例 (57%), 陰性例81例中29例 (36%) であり, c-met の発現は有意に陽性症例で高く ($p < 0.001$), またリンパ管侵襲については陽性例129例中69例 (53%), 陰性36例中8例 (22%) であり, 血管侵襲については陽性例84例中47例 (56%), 陰性例81例中30例 (37%) とそれぞれ陽性例で頻度が有意に高かった (それぞれ $p < 0.001$, $p < 0.05$)。また組織型でも高分化型97例中37例 (40%) に対し低分化型68例中38例 (56%) と有意に低分化型で c-met 陽性例が多かった ($p < 0.05$)。

また K-sam の発現は165例中58例 (35%) に認められた。臨床病理学的因子では深達度, 病期と有意な相関を認め ($p < 0.0001$), リンパ節転移については陽性例84例中41例 (49%), 陰性例81例中17例 (21%) であり, 有意にリンパ節転移陽性症例で K-sam の発現が高く ($p < 0.001$), またリンパ管侵襲については陽性例129例中53例 (41%), 陰性36例中5例 (14%),

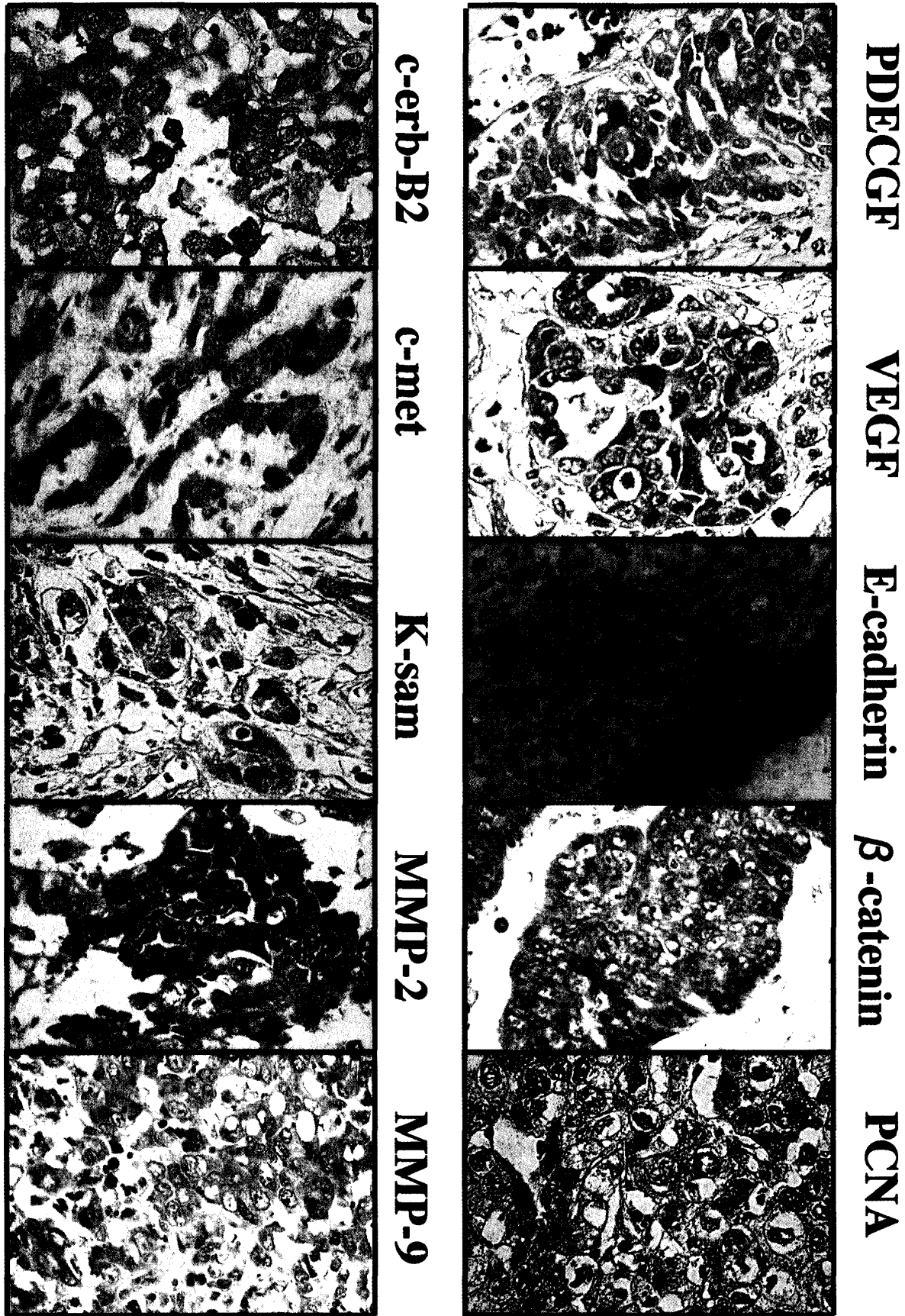


図1 分子生物学的因子の免疫組織学染色による発現 (c-erb-B2, c-met, K-sam, PCNA, PDECGF, VEGF, E-カドヘリン, β -カテニン, MMP-2, MMP-9)

表2 c-erb-B2, c-met, K-sam の発現と臨床病理学的因子との相関

Variable	Total	c-erb-b2		p	c-met		p	K-sam		p c-met & K-sam		p
Depth of invasion												
sm	55	22	40%		14	25%		4	7%	1	2%	
mp	26	8	31%		7	27%		9	35%	4	15%	
ss	36	13	36%	N.S	24	67%	<0.001	16	44%	12	33%	<0.001
se	30	14	47%		18	60%		16	53%	10	33%	
si	18	11	61%		14	78%		13	72%	11	61%	
Stage												
Ia	48	21	44%		12	25%		4	8%	1	2%	
Ib	30	8	27%		14	47%		11	37%	7	23%	
II	22	6	27%		11	50%		5	23%	4	18%	
IIIa	21	8	38%	N.S	14	67%	<0.01	12	57%	7	33%	<0.001
IIIb	18	9	50%		9	50%		8	44%	5	28%	
IVa	6	4	67%		3	50%		3	50%	2	33%	
IVb	20	12	60%		14	70%		15	75%	12	60%	
Histology												
Differentiated	97	44	45%	N.S	39	40%	<0.05	30	31%	18	19%	N.S
Undifferentiated	68	24	35%		38	56%		28	41%	20	29%	
Lymph node												
(-)	81	31	38%	N.S	29	36%	<0.01	17	21%	9	11%	<0.001
(+)	84	37	44%		48	57%		41	49%	29	35%	
Lymphatic invasion												
(-)	36	18	50%	N.S	8	22%	<0.001	5	14%	2	6%	<0.01
(+)	129	50	39%		69	53%		53	41%	36	28%	
Venous invasion												
(-)	81	29	36%	N.S	30	37%	<0.05	15	19%	8	10%	<0.0001
(+)	84	39	46%		47	56%		43	51%	30	36%	
Scirrous type												
(-)	140	61	44%	N.S	64	46%	N.S	51	36%	34	24%	N.S
(+)	25	7	28%		13	52%		7	28%	4	16%	
INF												
α, β	104	43	41%	N.S	42	40%	<0.05	31	30%	20	19%	N.S
γ	61	25	41%		35	57%		27	44%	18	30%	
Recurrence of liver												
(-)	153	49	39%	N.S	70	46%	N.S	52	34%	36	24%	N.S
(+)	12	10	56%		7	58%		6	50%	2	17%	
Recurrence of Peritoneam												
(-)	141	54	40%		60	43%		44	31%	27	19%	
(+)	24	5	56%	N.S	17	71%	N.S	14	58%	11	46%	<0.01
total	165	68	41%		77	47%		58	35%	38	23%	

血管侵襲については陽性例84例中43例（51%）、陰性例81例中15例（19%）とそれぞれ陽性例で K-sam の発現が有意に高かった（それぞれ $p < 0.01$, $p < 0.001$ ）。また組織型では低分化型68例中28例（41%）と高分化型97例中30例（31%）に比べ低分化型で多い傾向にあったものの有意差は認められなかった。

2) 臨床病理学的因子と細胞周期関連因子の発現との関連性

細胞周期関連因子のうち PCNA の発現と臨床病理学的因子について検討した（表3）。

PCNA の発現は165例中127例（77%）に認められた。臨床病理学的因子では深達度、病期と有意な相関

を認め (それぞれ $p < 0.05$), リンパ節転移については陽性例84例中72例 (86%), 陰性例81例中55例 (68%) であり, 陽性症例で PCNA 発現が有意に高く ($p < 0.01$), またリンパ管侵襲についても陽性129例中104例 (81%), 陰性36例中23例 (64%), 血管侵襲についても陽性84例中73例 (87%), 陰性81例中54例 (67%)

とそれぞれ陽性例でPCNA発現が有意に高かった (それぞれ $p < 0.05$, $p < 0.01$)。

3) 臨床病理学的因子と血管新生因子の発現との関連性

血管新生因子のうち PDEC GF と VEGF の発現と臨床病理学的因子について検討した (表3)。

表3 PCNA, PDEC GF, VEGF の発現と臨床病理学的因子との相関

Variable	Total	PCNA	p	PDEC GF	p	VEGF	p	
Depth of invasion								
sm	55	40	73%	13	24%	22	40%	
mp	26	17	65%	6	23%	7	27%	
ss	36	29	81%	17	47%	13	36%	N.S
se	30	4	13%	10	33%	11	37%	
si	18	17	94%	12	67%	10	56%	
Stage								
Ia	48	33	69%	10	21%	18	38%	
Ib	30	20	67%	11	37%	8	27%	
II	22	15	68%	5	23%	6	27%	
IIIa	21	8	86%	6	29%	7	33%	N.S
IIIb	18	16	89%	10	56%	10	56%	
IVa	6	5	83%	3	50%	3	50%	
IVb	20	20	100%	9	45%	11	55%	
Histology								
Differentiated	97	76	78%	33	34%	36	37%	N.S
Undifferentiated	68	51	75%	25	37%	27	40%	N.S
Lymph node								
(-)	81	55	68%	20	25%	34	37%	N.S
(+)	84	72	86%	38	45%	18	21%	N.S
Lymphatic invasion								
(-)	36	23	64%	7	19%	11	31%	N.S
(+)	129	104	81%	51	40%	52	40%	N.S
Venous invasion								
(-)	81	54	67%	21	25%	29	36%	N.S
(+)	84	73	87%	37	43%	34	40%	N.S
Scirrous type								
(-)	140	111	79%	21	19%	52	37%	N.S
(+)	25	16	64%	7	28%	11	44%	N.S
INF								
α, β	104	83	80%	35	34%	41	31%	N.S
γ	61	44	72%	23	38%	22	36%	N.S
Recurrence of liver								
(-)	153	115	75%	50	33%	56	37%	N.S
(+)	12	12	100%	8	67%	7	58%	N.S
Recurrence of Peritoneum								
(-)	141	107	76%	46	33%	51	36%	N.S
(+)	24	20	83%	12	50%	12	50%	N.S
total	165	127	77%	58	35%	63	38%	

PDECGF の発現は165例中58例 (35%) に認められた。臨床病理学的因子ではリンパ節転移については陽性84例中38例 (45%), 陰性81例中20例 (25%) であり, 陽性症例で有意に PDECGF の発現が高く ($p < 0.01$), またリンパ管侵襲については陽性129例中51例 (40%), 陰性36例中7例 (19%), 血管侵襲について

は陽性97例中37例 (38%), 陰性68例中21例 (31%) とそれぞれ陽性例で PDECGF の発現が有意に高かった ($p < 0.05$)。

一方 VEGF の発現は165例中63例 (38%) に認められたが, 臨床病理学的因子と VEGF の発現の間に有意な相関は認めなかった。

表4 E-カドヘリン, β -カテニンの発現と臨床病理学的因子との相関

Variable	Total	E-cadherin		p	beta-catenin		p
Depth of invasion							
sm	55	39	71%		13	24%	
mp	26	18	69%		5	19%	
ss	36	20	56%	N.S	11	31%	N.S
se	30	15	50%		7	23%	
si	18	10	56%		5	28%	
Stage							
Ia	48	34	71%		12	25%	
Ib	30	19	63%		10	33%	
II	22	17	77%		3	14%	
IIIa	21	10	48%	N.S	7	33%	N.S
IIIb	18	9	50%		5	28%	
IVa	6	2	33%		2	33%	
IVb	20	11	55%		2	10%	
Histology							
Differentiated	97	67	69%	<0.05	15	15%	N.S
Undifferentiated	68	35	51%		26	38%	
Lymph node							
(-)	81	56	69%	N.S	23	28%	N.S
(+)	84	46	55%		18	21%	
Lymphatic invasion							
(-)	36	23	64%	N.S	8	22%	N.S
(+)	129	79	61%		33	26%	
Venous invasion							
(-)	81	57	70%	<0.05	17	21%	N.S
(+)	84	45	54%		24	29%	
Scirrous type							
(-)	140	88	63%	N.S	31	22%	N.S
(+)	25	14	56%		10	40%	
INF							
α, β	104	68	65%	N.S	23	22%	N.S
γ	61	34	56%		18	30%	
Recurrence of liver							
(-)	153	96	63%	N.S	76	61%	N.S
(+)	12	6	50%		8	44%	
Recurrence of Peritoneum							
(-)	141	90	64%	N.S	80	60%	N.S
(+)	24	12	50%		4	44%	
total	165	102	62%		97	59%	

4) 臨床病理学的因子と細胞接着因子の発現との関連性

細胞接着因子のうちE-カドヘリンと β -カテニンの発現と臨床病理学的因子について検討した(表4)。

E-カドヘリンの減弱が認められた症例は165例中63例(38%)であった。臨床病理学的因子では組織型

で低分化型症例68例中33例(49%)と高分化型症例97例中30例(31%)と有意に低分化型で減弱症例が多かった($p < 0.05$)。

一方 β -カテニンの減弱が認められた症例は165例中41例(25%)であったが臨床病理学的因子と β -カテニンの発現の間に有意な相関は認めなかった。

表5 MMP-2, MMP-9 の発現と臨床病理学的因子との相関

Variable	Total	MMP-2	p	MMP-9	p
Depth of invasion					
sm	55	15 27%		10 18%	
mp	26	4 15%		5 19%	
ss	36	13 36%	N.S	14 39%	N.S
se	30	6 20%		10 33%	
si	18	9 50%		6 33%	
Stage					
Ia	48	14 29%		9 19%	
Ib	30	4 13%		6 20%	
II	22	8 36%		4 18%	
IIIa	21	6 29%	<0.01	9 43%	N.S
IIIb	18	2 11%		5 28%	
IVa	6	1 17%		2 33%	
IVb	20	12 60%		10 50%	
Histology					
Differentiated	97	33 34%	N.S	26 27%	<0.05
Undifferentiated	68	14 21%		19 28%	
Lymph node					
(-)	81	19 23%	N.S	16 20%	<0.05
(+)	84	28 33%		29 35%	
Lymphatic invasion					
(-)	36	6 17%	N.S	4 11%	<0.05
(+)	129	41 32%		41 32%	
Venous invasion					
(-)	81	21 26%	<0.05	15 19%	<0.05
(+)	84	26 31%		30 36%	
Scirrous type					
(-)	140	41 29%	N.S	43 31%	<0.05
(+)	25	6 24%		2 8%	
INF					
α, β	104	28 27%	N.S	30 29%	N.S
γ	61	19 31%		15 25%	
Recurrence of liver					
(-)	153	7 58%	N.S	6 25%	<0.05
(+)	12	40 26%		39 28%	
Recurrence of Peritoneam					
(-)	141	9 38%		7 58%	
(+)	24	38 27%	N.S	38 25%	N.S
total	165	47 28%		45 27%	

5) 臨床病理学的因子と間質融解酵素の発現との関連性

間質融解酵素のうち MMP-2 と MMP-9 の発現と臨床病理学的因子について検討した (表 5)。

MMP-2 の発現は165例中47例 (28%) に、MMP-9 の発現は165例中45例 (27%) に認められた。しかし臨床病理学的因子と MMP-2 あるいは MMP-9 の発現の間に有意な相関は認められなかった。

3. 腹膜再発予測因子

1) 単変量解析による腹膜再発予測因子の同定

まず臨床病理学的因子から病期、深達度、組織型、リンパ節転移、リンパ管侵襲、血管侵襲、間質型、INF の 8 項目と分子生物学的因子10因子の計18因子について単変量解析を行った。

腹膜再発に関与する臨床病理学的因子は病期、深達度、リンパ節転移、リンパ管侵襲、血管侵襲、間質型、INF の 7 因子がそれぞれ有意な予測因子であった ($p < 0.0001$) (表 6)。

一方、分子生物学的因子では血管新生因子、細胞接着因子は有意な予測因子とは認められなかった。また、がん遺伝子の中の検討では c-met 陽性症例77例中、腹膜再発症例が17例 (22%) に認められたのに対し、c-met 陰性症例は88例中7例 (8%) であり、c-met 陽性症例で有意に腹膜再発が多く認められた ($p = 0.0103$) (表 7)。また K-sam 陽性症例58例中腹膜再発症例は14例 (24%) に認められたのに対し、K-sam 陰性症例107例中では10例 (9%) に認められるのみで、K-sam 陽性症例で有意に腹膜再発が多発し

た ($p = 0.0041$)。さらに K-sam と c-met 両者の高発現症例38例で検討すると、これらの中で腹膜再発を来した症例は12例 (32%) に認められた。残る127症例では10例 (9%) のみに腹膜再発が認められ、K-sam と c-met 双方陽性症例で有意に腹膜再発が多い結果と

表 6 臨床病理学的因子と腹膜再発との相関

Variables	P (+) (24/165, 14.5%)			p value
	No. of patients	%		
Histology				
Differentiated	n=97	11	11%	n.s
Undifferentiated	n=68	13	19%	
Depth of invasion				
sm, mp	n=81	2	2%	<0.0001
ss, se, si	n=84	22	26%	
Lymph node				
(-)	n=81	1	1%	<0.0001
(+)	n=84	23	27%	
Lymphatic invasion				
(-)	n=36	0	0%	<0.0001
(+)	n=129	24	19%	
Venous invasion				
(-)	n=81	3	4%	<0.0001
(+)	n=84	21	25%	
Scirrous type				
(-)	n=140	14	10%	<0.0001
(+)	n=25	10	40%	
INF				
α, β	n=104	7	7%	<0.0001
γ	n=61	17	28%	

表 7 分子生物学的因子と腹膜再発との相関

Variables	No. of patients	%	p value	Variables	No. of patients	%	p value
PDECGF				PCNA			
(-)	12/107	11%	0.00993	(-)	4/38	11%	0.4231
(+)	12/58	21%		(+)	20/127	16%	
VEGF				c-met			
(-)	12/102	12%	0.1973	(-)	7/88	8%	0.0103
(+)	12/63	19%		(+)	17/77	22%	
E-cadherin				K-sam			
(-)	12/63	19%	0.1973	(-)	10/107	9%	0.0041
(+)	12/102	12%		(+)	14/58	24%	
β -catenin				c-met & K-sam			
(-)	9/41	22%	0.1208	(-)	12/117	10%	0.0147
(+)	15/124	12%		(+)	12/48	25%	
c-erb-B2							
(-)	10/97	10%	0.0653				
(+)	14/68	21%					

なった (p=0.0041)。

2) 多変量解析による腹膜再発予測因子の同定

腹膜再発に関しての単変量解析の結果, 臨床病理学的因子では病期, 深達度, リンパ節転移, リンパ管侵襲, 血管侵襲, 間質型, INF の7因子が, 分子生物学的因子では K-sam, c-met の2因子が有意な予測因子であった (p<0.05)。この9因子についてロジスティックモデルによる多変量解析を施行したところ, リンパ節転移, 間質型が有意な独立した再発予測因子であり (それぞれハザード比20.15, 6.07), 分子生物学的因子単独では有意な因子とはならなかった (表8)。そこで K-sam 及び c-met 両方が陽性であった38例を解析に加えて検討すると K-sam 及び c-met 陽性は有意な独立した腹膜再発予測因子であることがわかった (ハザード比2.99)。特に臨床病理学的因子の中で深達度 ss 以上やリンパ節転移陽性例, 間質がスキルス型等の腹膜再発高危険群の中で, その重要性を検討した結果をに示す (表9)。間質がスキルス型である症例で限定すると, K-sam 及び c-met 双方陽性症例では75%が腹膜再発を呈したのに対し, 双方陰性症例では33%と低値であった。

4. 肝再発予測因子

1) 単変量解析による肝再発予測因子の同定

肝再発に関与する臨床病理学的因子の検討を行うと, 深達度 ss 以上の症例84例中肝再発症例は11例

(13%) であったのに対し, mp 以下の症例81例中1例 (1%) であり, 深達度 ss 以上の症例で有意に肝再発が多く認められた (p<0.01) (表10)。また血管侵襲陽性の症例84例中, 肝再発症例は10例 (12%) であったのに対し, 血管侵襲陰性の症例81例中2例 (2%) と血管侵襲陽性の症例で有意に肝再発が多く認められた (p<0.05)。

一方, 肝再発に関与する分子生物学的因子の検討では, がん遺伝子, 細胞接着因子はいずれも肝再発予測因子としては不十分であったが, 血管新生因子では

表10 臨床病理学的因子と肝再発との相関

Variables	H (+) (12/165, 7.2%)			p value
	No. of patients	%		
Histology				
Differentiated	n=97	9	9%	n.s
Undifferentiated	n=68	3	4%	
Depth of invasion				
sm, mp	n=81	1	1%	<0.01
ss, se, si	n=84	11	13%	
Lymph node				
(-)	n=81	4	5%	n.s
(+)	n=84	8	10%	
Lymphatic invasion				
(-)	n=36	0	0%	n.s
(+)	n=129	12	9%	
Venous invasion				
(-)	n=81	2	2%	<0.05
(+)	n=84	10	12%	
Scirrous type				
(-)	n=140	11	8%	n.s
(+)	n=25	1	4%	
INF				
α, β	n=104	7	7%	n.s
γ	n=61	5	8%	

表8 多変量解析による腹膜再発予測因子

Variables	Hazard ratio	95% confidence interval	p value
Lymph nodemetastasis	20.15	2.56-158.56	0.0043
Scirrhous type	6.07	1.91-19.29	0.0022
c-met & K-sam	2.99	1.02-8.77	0.0469

表9 腹膜再発高危険群における c-met, K-sam の発現と腹膜再発との相関

	P(-) P(+) % p value					P(-) P(+) % p value					P(-) P(+) % p value						
Depth (ss, se, si)																	
K-sam & c-met	(-)	39	12	24%	0.49	K-sam	(-)	30	9	23%	0.54	c-met	(-)	22	6	21%	0.48
	(+)	23	10	30%			(+)	32	13	29%			(+)	40	16	29%	
N (+)																	
K-sam & c-met	(-)	42	13	24%	0.29	K-sam	(-)	33	10	23%	0.39	c-met	(-)	29	7	19%	0.15
	(+)	19	10	34%			(+)	28	13	32%			(+)	32	16	33%	
Scirrhous type (+)																	
K-sam & c-met	(-)	14	7	33%	0.11	K-sam	(-)	12	6	33%	0.28	c-met	(-)	8	4	33%	0.51
	(+)	1	3	75%			(+)	3	4	57%			(+)	7	6	46%	

PDECGF 陽性58例中肝再発陽性症例は8例(14%)に対し、PDECGF 陰性107例中肝再発陽性は4例(4%)であり、PDECGF の高発現例で有意に肝再発が多発した ($p=0.0176$) (表11)。また PCNA は肝再発症例12例すべてで陽性所見が認められた ($p=0.0491$)。さらに間質融解酵素の検討では、MMP-2 陽性症例47例中7例(16%)で肝再発が認められたのに対し、MMP-2陰性症例118例中では5例(4%)しか認められず、MMP-2高発現症例で肝再発が多く認められた ($p=0.0121$)。またMMP-9 45例中肝再発症例は7例(16%)であったのに対し、MMP-9 陰性症例120例中では5例(4%)しか認められず、MMP-9 高発現症例で肝再発が有意に多く認められた ($p=0.0121$)。なお、c-erb-B2 高発現症例は分化型や肝転移と相関するとの報告が多いが、今回の検討では分化型で c-erb-B2 高発現症例が多い傾向にあったものの有意差が認められるまでには至らなかった。

表11 分子生物学的因子と肝再発との相関

Variables	No. of patients	%	p value	Variables	No. of patients	%	p value
VEGF	(-) 5/102	5%	0.1357	PDECGF	(-) 4/107	4%	0.0176
	(+) 7/63	11%				(+) 8/58	
E-cadherin	(-) 6/63	10%	0.3815	PCNA	(-) 0/38	0%	0.0491
	(+) 6/102	6%				(+) 12/127	
β -catenin	(-) 1/41	2%	0.1692	MMP-2	(-) 5/118	4%	0.0121
	(+) 11/124	9%				(+) 7/47	
c-erb-B2	(-) 6/97	6%	0.5207	MMP-9	(-) 5/120	4%	0.0121
	(+) 6/68	9%				(+) 7/45	
c-met	(-) 5/88	6%	0.4002				
	(+) 7/77	9%					

2) 多変量解析による肝再発予測因子の同定

肝再発に関する単変量解析の結果、臨床病理学的因子では深達度、血管侵襲の2因子が、分子生物学的因子では PDECGF、PCNA、MMP-2、MMP-9 の4因子が有意な予測因子として同定された (それぞれ $p < 0.05$)。この6因子について多変量解析を施行したところ、深達度と MMP-9 が有意な独立した肝再発予測因子であることがわかった (それぞれハザード比

表12 多変量解析による肝再発予測因子

Variables	Hazard ratio	95% confidence interval	p value
Depth of invasion	15.678	1.33-184.84	0.0288
Histology	0.252	0.059-1.07	0.0617
Lymph node metastasis	0.426	0.093-1.955	0.2724
Venous invasion	2.04	0.349-11.93	0.4286
MMP-9	4.092	1.071-15.633	0.0393

表13 肝再発高危険群における PDECGF、MMP-9 の発現と肝再発との相関

	H(-)	H(+)	%	p value		H(-)	H(+)	%	p value
Depth (ss, se, si)									
PEFCGF	(-) 42	3	7%	0.1	MMP-9	(-) 50	4	7%	0.05
	(+) 31	8	21%				(+) 23	7	
N (+)									
PEFCGF	(-) 44	2	4%	0.13	MMP-9	(-) 52	3	5%	0.12
	(+) 32	6	16%				(+) 24	5	
v (+)									
PEFCGF	(-) 45	2	4%	0.02	MMP-9	(-) 51	3	6%	0.03
	(+) 29	8	22%				(+) 23	7	

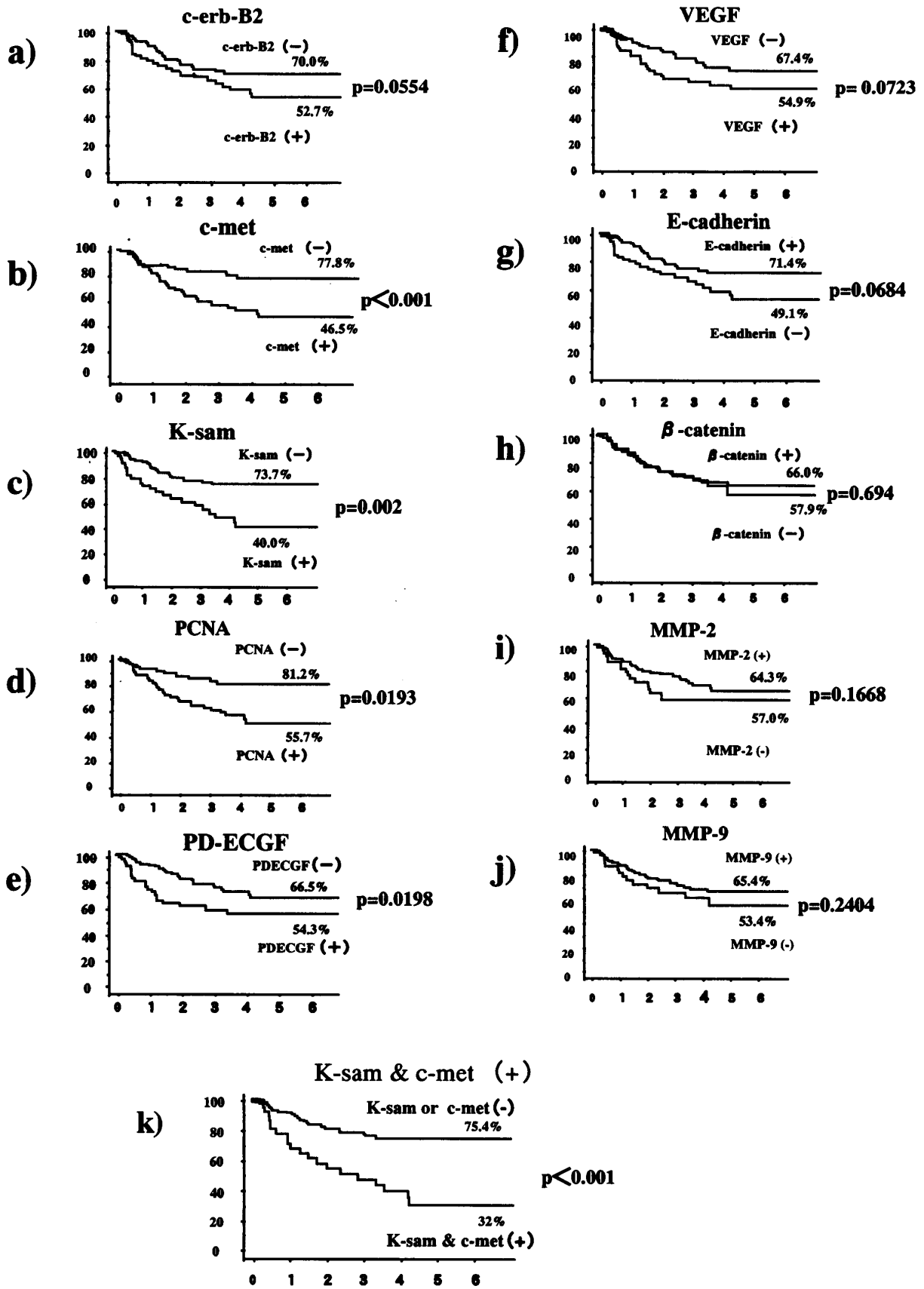


図2 分子生物学的因子の発現における生存曲線

a) c-erb-B2, b) c-met, c) K-sam, d) PCNA, e) PDECGF, f) VEGF, g) E-カドヘリン, h) β -カテニン, i) MMP-2, j) MMP-9, k) c-met 及び K-sam

15.68, 4.09) (表12)。特に臨床病理学的因子の中で深達度 ss 以上や静脈侵襲陽性例のような肝再発高危険群の中でも MMP-9 陽性群は有意に肝再発が多発した (表13)。

5. 予後予測因子

1) 単変量解析による分子生物学的因子における予後予測因子の同定

予後予測因子を検討するため、Kaplan-Meier による生存率の検討を行った (図2)。がん遺伝子においては、c-erb-B2 陰性症例の5年生存率は70.0%であるのに対し、陽性症例では52.7%と有意ではないもの予後不良の傾向にあった ($p=0.0554$) (図2, a)。一方、c-met 陰性症例の5年生存率は77.8%であるのに対し、陽性症例は46.5%と有意に予後不良であった ($p<0.001$) (図2, b)。また K-sam 陰性症例の5年生存率は73.7%であるのに対し、陽性症例は40%と有意に予後不良であった ($p=0.002$) (図2, c)。さらに c-met 及び K-sam 双方陽性症例の予後は5年生存率が32%と最も不良であった (図2, k)。

また PCNA 陽性症例の5年生存率は55.7%であり、陰性症例では81.2%と陽性症例で有意に予後不良であった ($p=0.0193$) (図2, d)。

PDECGF 陰性症例の5年生存率は76.7%であったが、陽性症例は54.3%で有意に予後不良であった ($p=0.0198$) (図2, e)。一方 VEGF 陰性症例の5年生存率は67.4%であるのに対し、陽性症例は54.9%と有意差は認めないものの陽性症例で予後不良の傾向にあった ($p=0.0723$) (図2, f)。

E-カドヘリンでの検討では、発現減弱症例の5年生存率は有意差は認めないものの減弱症例で予後不良の傾向にあった ($p=0.0684$) (図2, g)。しかしながら β -カテニンの発現による予後の影響は認められなかった (図2, h)。

間質融解酵素では MMP-2, MMP-9 いずれも発現による予後の差は認められなかった (図2, i, j)。

2) 多変量解析による予後予測因子の同定

単変量解析の結果、分子生物学的因子では K-sam, c-met, PDECGF, PCNA の4因子が有意な予後予測因子であることから、これら4因子と臨床病理学的因子を併せた12因子について Cox の比例ハザードモデルを用いて多変量解析を行った。結果はリンパ節転移、深達度、間質が独立した予後予測因子で、それぞれハザード比3.745, 3.322, 2.203であったが、分子生物学的因子単独では独立したものはなかった。しかしながら分子生物学的因子の中で2因子の組み合わせで解

表14 Cox の比例ハザードモデルによる多変量解析

Variables	Hazard ratio	95% confidence interval	p value
Lymph node metastasis	3.745	1.536-9.174	0.0037
Depth of invasion	3.322	1.340-8.197	0.0095
Scirrhus type	2.203	1.151-4.219	0.0172
c-met & K-sam	2.063	1.140-3.731	0.0167

析を行うと、腹膜再発予測因子となった K-sam 及び c-met 両者陽性群でハザード比は2.063となり、独立した予後予測因子であると同定された (表14)。

考 察

本研究では、これまで予後因子として報告された多くの分子生物学的因子を用い、真に有用性のある因子の同定を行うことを目的とした。そこで今回、がん遺伝子、細胞周期関連遺伝子、血管新生因子、細胞接着因子や間質融解酵素などから代表的な10因子を選択し、検討を行った。結果に示す如く、臨床病理学的因子との相関や、予後予測因子としての重要性はそれぞれにおいて、これまでに報告された結果と遜色のないものであった。従って、臨床病理学的因子及び今回検索した分子生物学的因子全てを多変量解析を行うことで再発予測因子あるいは予後予測因子における最も重要な因子の同定が可能と考え、検討を行った。

まず腹膜再発予測因子について検討した。今回の検討では単変量解析の結果から臨床病理学的因子の中では深達度やリンパ節転移の有無のみでなく、リンパ管侵襲、血管侵襲、間質型、INF のそれぞれ因子についても有意な腹膜再発予測因子となった。一方、分子生物学的因子の中では K-sam, c-met の2因子が有意な腹膜再発予測因子であった。

c-met 遺伝子は hepatocyte growth factor (HGF) のレセプターをコードする癌遺伝子である²⁾。HGF は間質細胞から産生され、これが癌細胞のレセプターに結合するとチロシンキナーゼが活性化され自己リン酸化が起こり³⁴⁾、自律増殖や scattering を引き起こすことが報告されている。これはがん細胞が集塊から離脱し、播種性増殖を促すことと関連すると考えられる⁵⁾。さらに c-met 遺伝子の増幅例は予後不良であるとの報告や²¹⁾、mRNA の splicing の異常がスキルス胃癌に多く、深達度、リンパ節転移との相関が認められていることと矛盾しないものと考えられる²²⁾。一方、K-sam 遺伝子は KATO III 胃癌細胞株より増幅している遺伝子としてクローニングされ、fibroblast growth factor

(FGF) receptor family に属する癌遺伝子で、胃癌、特に低分化腺癌やスキルス癌で増幅していることが知られている^{17,29,44,57}。今回の検討では諸家の報告と同様、c-met 遺伝子の発現は低分化腺癌で有意に高頻度に認められ、深達度、リンパ節転移とも有意に相関し、また K-sam 遺伝子の発現も低分化腺癌に多いことから腹膜再発と相関したものと考えられた。これらの8因子の中で最も重要な腹膜再発予測因子の同定のためにロジスティックモデルによる多変量解析を施行したところ、リンパ節転移、間質型が有意な独立した因子であった。分子生物学的因子の中では単独での独立した腹膜再発予測因子はなく、c-met 遺伝子、K-sam 遺伝子はいずれも単独では臨床病理学的因子を越える因子ではなかった。しかしながら K-sam 遺伝子と c-met 遺伝子の組み合わせで検討すると K-sam 及び c-met 両者陽性群は有意な独立した腹膜再発予測因子であることが示された。このことは深達度の高い症例やリンパ節転移陽性例、スキルス型など腹膜再発高危険群の中で、K-sam と c-met が重要な役割を演じてくると予想され、実際にスキルス型に限定すると、K-sam 及び c-met 両者陽性例はいずれか一方が陰性例に比べて腹膜再発が多く、その重要性が示唆された。これは c-met は間質の線維芽細胞から産生される HGF の受容体をコードする遺伝子で、HGF が癌細胞の受容体に結合することで scattering factor としての働きにより癌組織から癌細胞がばらばらに分散し、スキルス癌で見られるように間質を分散しつつ浸潤していく役割を果たす一方で、K-sam は FGF の受容体をコードする遺伝子であり、間質における線維芽細胞の増生を促進することに関与し、さらに線維芽細胞から HGF の産生が促されるという相互関係を形成しているものと考えられた。

次に肝再発予測因子について検討した。単変量解析の結果から、臨床病理学的因子では深達度、血管侵襲の2因子が、分子生物学的因子では PDECGF, PCNA, MMP-2, MMP-9 の4因子が有意な肝再発予測因子であった。PDECGF, PCNA, MMP-2, MMP-9 はいずれも単独で肝再発と相関することが報告されており、諸家の報告と矛盾しない結果であった^{15,46}。さらにこれら6因子の中で最も重要な肝再発予測因子の同定のためにロジスティックモデルによる多変量解析を施行したところ深達度、MMP-9が有意な独立した因子であった。実際に深達度 ss 以上の症例や静脈侵襲陽性症例の高危険群に限定すると MMP-9陽性例は陰性例に比べ、有意に肝再発が多く認められた。MMP-9 はマトリックス分解酵素に属する蛋白であり、細胞外マ

トリックスを構成する各種コラーゲンやプロテオグリカン、糖蛋白質などを特異的に分解する。特に血管壁の基底膜成分(ゼラチン)の破壊に大きな役割を果たすのがゼラチナーゼ活性を持つ MMP-2 及び MMP-9 であり、周囲組織への浸潤や血管内への侵入における重要な因子で、癌の血行性転移に大きく関与していると考えられる^{1,28,36}。実際に深達度の高い症例や静脈侵襲陽性症例に限定した検討でも、MMP-9 陽性例は有意に肝再発が多く、肝再発予測因子として MMP-9 の発現の重要性が示唆された。

最後に予後予測因子について検討した。単変量解析の結果、分子生物学的因子の中では K-sam, c-met, PDECGF, PCNA の4因子が有意な予後予測因子となり、これらの結果はいずれも諸家の報告通りである^{7,21,46,52}。VEGF や c-erb-B2 などは有意な予後予測因子との報告もあるが^{24,50}、今回の検討では統計学的有意差は認めなかった。単変量解析で有意であった4因子と臨床病理学的因子8因子、計12因子について Cox の比例ハザードモデルを用いた多変量解析を行ったところ、リンパ節転移、深達度、間質が独立した有意な予後予測因子となった。今回検討した分子生物学的因子は単独では独立した有意な因子は認められず、臨床病理学的因子を凌駕するものではないことが示された。しかし腹膜再発予測因子と考えられた K-sam 及び c-met 両者陽性群について検討すると、独立した予後予測因子としての重要性が確認された。これは胃癌における再発死亡形式として腹膜再発が最も多く、K-sam や c-met は腹膜再発を強く反映することから、これらの因子が予後予測因子として重要であると考えられた。

以上より、臨床病理学的因子に加え、分子生物学的因子を加えることで、胃癌のより詳細な再発形式や予後の予測ができることが示唆された。

結 語

胃癌における臨床病理学的因子と多数の分子生物学的因子を用いた多変量解析を行い、以下の結論を得た。

1. 腹膜再発予測因子の検索ではリンパ節転移、間質型、K-sam 及び c-met 両方陽性群で有意な独立した因子であった。
2. 肝再発予測因子の検索では深達度、MMP-9 が有意な独立した因子であった。深達度 ss 以上の症例や静脈侵襲陽性症例のような高危険群で、MMP-9 陽性例は陰性例に比べ、有意に肝再発が多かった。

3. 予後予測因子の検索では、リンパ節転移、深達度、間質、K-sam 及び c-met 両方陽性群が独立した因子であった。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始懇篤なる御指導、御校閲を賜りました恩師、峠哲哉教授に親甚なる謝意を捧げます。また本研究に終始御協力、御助言を頂きました吉田和弘博士、教室員および技術員各位に深く感謝いたします。

本論文の主旨は第55回日本消化器外科学会（宮崎、2000）において発表した。

参 考 文 献

1. 安藤 聡, 宮崎 勝, 伊藤 博, 海保 隆, 安藤 克彦, 大和田 哲, 尾形 章, 林 伸一, 安田典夫, 更科広美, 島 伸之. 1993. 大腸癌組織 type、collagenase 活性の浸潤、転移形成における臨床的意義. 日本消化器外科学会雑誌 90 : 1555-1561.
2. Bottaro, D. P., Rubin, J. S., Faletto, D. L., Chan, A. M., Kmieciak, T. E., Vande-Woude, G. F. and Aaronson, S. A. 1991. Identification of the hepatocyte growth factor receptor as the c-met proto-oncogene product. *Science* 25 : 1802-1804.
3. Cox, D. R. 1972. Regression model and life tables. *J. R. Stat. Soc.* 34 : 187-220.
4. Folkman, J. 1985. Tumor angiogenesis. *Adv. Cancer Res.* 43 : 175-203.
5. Furlong, R. A., Takehara, T., Taylor, W. G., Nakamura, T. and Rubin, J. S. 1991. Comparison of biological and immunochemical properties indicates that scatter factor and hepatocyte growth factor are indistinguishable. *J. Cell. Sci.* 100 : 173-177.
6. Hart, I. R., Goode, N. T. and Wilson, R. E. 1989. Molecular aspects of the metastatic cascade. *Biochem. Biophys. Acta* 98 : 965-984.
7. Hattori, Y., Itoh, H., Uchino, S., Hosokawa, K., Ochiai, A., Ino, Y., Ishii, H., Sakamoto, H., Yamaguchi, N., Yanagihara, K., Hirohashi, S., Sugimura, T. and Terada, M. 1996. Immunohistochemical detection of K-sam protein in stomach cancer. *Clinical Cancer Res.* 2 : 1373-1381.
8. Hiraga, Y., Tanaka, S., Haruma, K., Yoshihara, M., Sumii, K., Kajiyama, G., Shimamoto, F. and Kohno, N. 1998. Immunoreactive MUC1 expression at the deepest invasive portion correlates with prognosis of colorectal cancer. *Oncology* 55 : 307-319.
9. Hoyhtya, M., Fridman, R., Komarek, D., Porter, Jordan, K., Stetler, Stevenson, W. G., Liotta, L. A. and Liang, C. M. 1994. Immunohistochemical localization of matrix metalloproteinase 2 and its specific inhibitor TIMP-2 in neoplastic tissues with monoclonal antibodies. *Int. J. Cancer* 56 : 500-505.
10. 胃癌研究会. 1999. 胃癌取り扱い規約. 改訂13版. 金原出版, 東京.
11. Inada, T., Imura, J., Ichikawa, A., Ogata, Y. and Shimamura, K. 1993. Proliferative activity of gastric cancer assessed by immunostaining for proliferating cell nuclear antigen. *J. Surg. Oncol.* 54 : 146-152.
12. 稲田 高夫, 井村 譲二, 尾形 佳郎. 1992. PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) より見た進行胃癌増殖能の検討. 胃癌の発生と進展 4 : 459-466.
13. Ishikawa, F., Miyazono, K., Hellman, U., Drexler, H., Wernstedt, C., Hagiwara, K., Usuki, K., Takaku, F., Risau, W. and Heldin, C. R. 1989. Identification of angiogenic activity and the cloning and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor. *Nature* 338 : 557-562.
14. 香川 佳寛, 吉田 和弘, 西本 直樹, 矢野 康生, 平井 敏弘, 峠 哲哉. 2000. 胃癌における細胞周期調節因子の発現と悪性度 - 特に粘膜下層浸潤癌について -. 日本消化器外科学会雑誌 33 : 433-439.
15. 梶原 哲郎, 小川 健治. 1995. マトリックスメタロプロテイナーゼ (MMP) と血行転移. 消化器外科 18 : 1933-1939.
16. Kameda, T., Yasui, W., Yoshida, K., Tsujino, T., Nakayama, H., Ito, M., Ito, H. and Tahara, E. 1990. Expression of ERBB2 in human gastric carcinomas; relationship between p185ERBB2 expression and gene amplification. *Cancer Res.* 50 : 8002-8009.
17. Katoh, M., Hattori, Y., Sasaki, H., Tanaka, M., Sugano, K., Yazaki, Y., Sugimura, T. and Terada, M. 1992. K-sam gene encodes secreted as well as transmembrane receptor tyrosine kinase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89 : 2960-2964.
18. Kawahara, E., Okada, Y., Nakanishi, I., Iwata, K., Kojima, S., Kumagai, S. and Yamamoto, E. 1993. The expression of invasive behavior of differentiated squamous carcinoma cell line evaluated by an in vitro invasion model. *Jpn. J. Cancer Res.* 84 : 409-418.
19. Kawanishi, J., Kato, J., Sasaki, K., Fujii, S., Watanabe, N. and Niitsu, Y. 1995. Dysfunction of E-cadherin due to mutation of beta-catenin in a scirrhous gastric cancer cell line. *Nippon-Rinsho.* 53 : 1590-1594.

20. **Keck, P. J., Hauser, S. D., Krivi, G., Sanzo, K., Warren, T., Feder, J. and Connolly, D. T.** 1989. vascular permeability factor, an endothelial cell mitogen related to PDGF. *Science* **246** : 1309-1312.
21. **Kuniyasu, H., Yasui, W., Yokozaki, H., Kitadai, Y. and Tahara, E.** 1993. Aberrant expression of c-met mRNA in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* **55** : 72-75.
22. **Kuniyasu, H., Yasui, W., Kitadai, Y., Yokozaki, H., Ito, H. and Tahara, E.** 1992. Frequent amplification of the c-met gene in scirrhous type stomach cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **189** : 227-232.
23. **Leung, D. W., Cachianes, G., Kuang, W. J., Goeddel, D. V. and Ferrara, N.** 1989. vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science* **246** : 1306-1309.
24. **Maeda, K., Chung, Y. S., Ogawa, Y., Takatsuka, S., Kang, S. M., Ogawa, M., Sawada, T. and Sowa, M.** 1996. Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer* **77** : 858-863.
25. **Maeda, K., Chung, Y. S., Onoda, N., Ogawa, M., Kato, Y., Nitta, A., Arimoto, Y., Kondo, Y., Arakawa, T. and Sowa, M.** 1996. Association of tumor cell proliferation with lymph node metastasis in early gastric cancer. *Oncology* **53** : 1-5.
26. **Maeda, K., Chung, Y. S., Onoda, N., Kato, Y., Nitta, A., Arimoto, Y., Yamada, N., Kondo, Y. and Sowa, M.** 1994. Proliferating cell nuclear antigen labeling index of preoperative biopsy specimens in gastric carcinoma with special reference to prognosis. *Cancer* **73** : 528-533.
27. **Maeda, K., Chung, Y. S., Takatsuka, S., Ogawa, Y., Onoda, N., Sawada, T., Kato, Y., Nitta, A., Arimoto, Y. and Kondo, Y.** 1995. Tumor angiogenesis as a predictor of recurrence in gastric carcinoma. *J. Clin. Oncol.* **13** : 477-481.
28. 磨伊正義, 土屋百合, 渡辺美智夫, 野村英弘 1994. メタロプロテアーゼとそのインヒビター. *外科治療* **71** : 176.
29. **Nakatani, H., Sakamoto, H., Yoshida, T., Yokota, J., Tahara, E., Sugimura, T. and Terada, M.** 1990. Isolation of an amplified DNA sequence in stomach cancer. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** : 707-710.
30. **Nishida, T., Tanaka, S., Haruma, K., Yoshihara, M., Sumii, K. and Kajiyama, G.** 1995. Histologic grade and cellular proliferation at the deepest invasive portion correlate with the high malignancy of submucosal invasive gastric carcinoma. *Oncology* **52** : 340-346.
31. **Nomura, H., Fujimoto, N., Seiki, M., Mai, M. and Okada, Y.** 1996. Enhanced production of matrix metalloproteinases and activation of matrix metalloproteinase 2 (gelatinase A) in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* **69** : 9-16.
32. **Ochiai, A., Akimoto, S., Shimoyama, Y., Nagafuchi, A., Tsukita, S. and Hirohashi, S.** 1994. Frequent loss of alpha catenin expression in scirrhous carcinomas with scattered cell growth. *Jpn. J. Cancer Res.* **85** : 266-273.
33. **Otani, Y., Okazaki, I., Arai, M., Kameyama, K., Wada, N., Maruyama, K., Yoshino, K., Kitajima, M., Hosoda, Y. and Tsuchiya, M.** 1994. Gene expression of interstitial collagenase (matrix metalloproteinase 1) in gastrointestinal tract cancers. *J. Gastroenterol.* **29** : 391-397.
34. **Ponzetto, C., Giordano, S., Peverali, F., Della Valle, G., Abate, M. L., Vaula, G. and Comoglio, P. M.** 1991. c-met is amplified but not mutated in a cell line with an activated met tyrosine kinase. *Oncogene* **6** : 553-559.
35. **Poulsom, R., Pignatelli, M., Stetler-Stevenson, W. G., Liotta, L. A., Wright, P. A., Jeffery, R. E., Longcroft, J. M., Rogers, L. and Stamp, G. W.** 1992. Stromal expression of 72kD type I collagenase (MMP-2) and TIMP-2 mRNAs in colorectal carcinoma. *Am. J. Pathol.* **141** : 389-396.
36. **Sato, H., Kida, Y., Mai, M., Endo, Y., Sasaki, T., Tanaka, T. and Seiki, M.** 1992. Expression of genes encoding type IV collagen-degrading metalloproteinases and their inhibitors TIMPs in various human tumor cells. *Oncogene* **7** : 77-83.
37. **Schwartz, G. K.** 1996. Invasion and metastases in gastric cancer: in vitro and in vivo models with clinical correlations. *Semin. Oncol.* **23** : 316-324.
38. **Shibata, T., Ochiai, A., Kanai, Y., Akimoto, S., Gotoh, M., Yasui, N., Machinami, R. and Hirohashi, S.** 1996. Dominant negative inhibition of the association between beta-catenin and c-erbB-2 by N-terminally deleted beta-catenin suppresses the invasion and metastasis of cancer cells. *Oncogene* **13** : 883-889.
39. 島田悦司, 加藤道男, 斉藤洋一 1993. 胃癌における c-erbB-2 蛋白発現についての免疫組織科学的研究. *日外会誌* **94** : 33-40.
40. **Shino, Y., Watanabe, A., Yamada, Y., Tanase, M., Yamada, T., Matsuda, M., Yamashita, J., Tatsumi, M., Miwa, T. and Nakano, H.** 1995. Clinicopathologic evaluation of immunohistochemical E-cadherin expression in human gastric carcinomas. *Cancer* **76** : 2193-2201.
41. 白野純子, 中村 毅, 中江史朗, 斉藤洋一 1995. 大腸癌における PCNA 標識率とその臨床評価. *日外会誌* **96** : 787-791.
42. **Slamon, D. J., Godolphin, W., Jones, L. A.,**

- Holt, J. A., Wong, S. G., Keith, D. E., Levin, W. J., Stuart, S. G., Udove, J. and Ullrich, A. 1989. Studies of the HER2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* **244** : 707-712.
43. **Streit, M., Schmidt, R., Hilgenfeld, R. U., Thiel, E. and Kreuser, E. D.** 1996. Adhesion receptors in malignant transformation and dissemination of gastrointestinal tumors. *J. Mol. Med.* **74** : 253-268.
44. **Tahara, E.** 1995. Molecular biology of gastric cancer. *World. J. Surg.* **19** : 484-490.
45. **Tamada, T., Tsubouchi, H., Daikuhara, Y., Prat, M., Comoglio, P. M., McGeer, P. L. and McGeer, E. G.** 1994. Immunohistochemistry with antibodies to hepatocyte growth factor and its receptorprotein (c-met) in human brain tissues. *Brain Research.* **637** : 308-312.
46. **Takebayashi, Y., Miyadera, K., Akiyama, S., Hokita, S., Yamada, K., Akiba, S., Yamada, Y., Sumizawa, T. and Aikou, T.** 1996. The expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jan. J. cancer Res.* **87** : 288-295.
47. **Tal, M., Wetzler, M., Josefberg, Z., Deutch, A., Gutman, M., Assaf, D., Kris, R., Shiloh, Y., Givol, D. and Schlessinger, J.** 1988. Sporadic amplification of the HER2/neu protooncogene in adenocarcinomas of various tissue. *Cancer Res.* **48** : 1517-1520.
48. **Venter, D. J., Tuzi, N. L. and Kumar, S.** 1987. Overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein in human breast carcinomas Immunohistological assessment correlates with gene amplification. *Lancet* **2** : 69-72.
49. **Yasui, W., Kudo, Y., Semba, S., Yokozaki, H. and Tahara, E.** 1997. Reduced expression of cyclin-dependent kinase p27^{kip1} is associated with advanced stage and invasiveness of gastric carcinomas. *Jps. J. Cancer Res.* **88** : 625-629.
50. **Yonemura, Y., Ninomiya, I., Yamaguchi, A., Fushida, S., Kimura, H., Ohoyama, S., Miyazaki, I., Endou, Y., Tanaka, M. and Sasaki, T.** 1991. Evaluation of immunoreactivity for erbB-2 protein as a marker of poor short term prognosis in gastric cancer. *Cancer Res.* **51** : 1034-1038.
51. **Yonemura, Y., Nojima, N., Kaji, M., Fujimura, T., Itoh, H., Ninomiya, I., Miyazaki, I., Endo, Y. and Sasaki, T.** 1995. E-cadherin and urokinase-type plasminogen activator tissue status in gastric carcinoma. *Cancer* **76** : 941-953.
52. 米村 豊, 山口明夫, 加治正英, 伏田幸夫, 津川浩一郎, ルイス フォンセカ, 宮崎逸夫 1992. 胃癌における Proliferating Cell Nuclear Antigen (PCNA 標識) と悪性度. *日外会誌* **93** : 661.
53. **Yoshida, K., Takanashi, A., Kyo, E., Ito, M., Ito, H., Niimoto, M. and Tahara, E.** 1989. Epidermal growth factor induces the expression of its receptor gene in human gastric carcinoma cell line TMK-1. *Jpn. J. Cancer Res.* **80** : 743-746.
54. **Yoshida, K., Tsujino, T., Yasui, W., Kameda, T., Sano, T., Nakayama, H., Toge, T. and Tahara, E.** 1990. Induction of growth factor receptor and metalloproteinase genes by epidermal growth factor and/or transforming growth factor alpha in human gastric carcinoma cell line MKN-28. *Jpn. J. Cancer Res.* **81** : 793-798.
55. **Yoshida, K., Yokozaki, H., Niimoto, M., Ito, H., Ito, M. and Tahara, E.** 1989. Expression of TGF-beta and procollagen type I and type III in human gastric carcinomas. *Int. J. Cancer* **44** : 394-398.
56. 吉田和弘, 峠 哲哉 1999. 消化器癌の増殖因子. *消化器外科* **22** : 1012-1018.
57. 吉田和弘, 安井 弥, 横崎 宏, 田原栄一, 香川佳寛, 西本直樹, 峠 哲哉, 吉田輝彦, 寺田雅昭 1998. 胃癌における新しい予後因子. *癌と化学療法* **25** : 2021-2027.

Identification of Clinicopathological and Molecular Prognostic Factors in Patients of Gastric Cancer by Multivariate Analyses

Naoki NISHIMOTO

Department of Surgical Oncology, Research Institute for Radiation Biology and Medicine, Hiroshima University
(Director: Prof. Tetsuya TOGE)

In the present study, in order to elucidate the important predictive factors for the prognosis, liver metastasis and peritoneal metastasis in gastric carcinomas, immunohistochemical analyses were performed on 165 surgically resected cancer specimens of the stomach. We investigated the correlation between clinicopathological factors and the expression of 10 molecular markers including c-erb-B2, c-met, K-sam, proliferating cell nuclear antigen (PCNA), Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF), Vascular endothelial growth factor (VEGF), E-cadherin, β -catenin, Matrix metalloproteinase 2 (MMP-2) and Matrix metalloproteinase 9 (MMP-9). Lymph node metastasis, scirrhou type and coexpression of K-sam and c-met were prominent independent predictive factors for peritoneal metastasis, and the depth of invasion and expression of MMP-9, for liver metastasis, respectively. Moreover, Cox's multivariate proportional hazards analyses revealed that the depth of tumor invasion, lymph node metastasis, scirrhou type and coexpression of K-sam and c-met were independent prognostic indicators for patients with gastric carcinoma. From these results, it is concluded that analyses with both clinicopathological factors and molecular markers will be more useful for the prediction of the prognosis of gastric cancer patients.