Dokkyo Journal of Medical Sciences
32(3)：135～141，2005

原　著

進行結腸癌におけるc-MET発現とbuddingの関係について

獨協医科大学越谷病院外科
小林　和弘　　奥山　　隆

要　旨　進行結腸癌におけるc-MET発現と癌浸潤先進部buddingとの関連について検討した．また，c-MET発現とbuddingの治癒切除後の予後因子としての有用性について比較検討した．

【対象・方法】治癒切除された進行結腸癌88症例を対象に，HE染色とc-MET免疫組織化学染色を施行した．

【成績】c-MET発現はbudding，リンパ節転移，術後再発を認めた症例で有意に多く認められた（$p < 0.0001$，$p = 0.0013$，$p = 0.0019$）．予後に関しては累積生存曲線，5年生存率においてc-MET発現とbuddingのそれぞれで，その有無による有意差を認めた（$p = 0.0028$，$p = 0.0136$）．さらに，c-MET発現およびbuddingを含めた臨床病理学的所見を予後因子の候補として術後生存期間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．

【結論】本検討より進行結腸癌におけるbudding形成にHGF/c-MET signalの関与が示唆された．また，治癒切除後の進行結腸癌症例においてc-MET発現は有用な予後因子であった．

Key Words：c-MET，budding，予後因子

はじめに

個々の癌が有する生物学的特性は，癌細胞と宿主正常細胞とのinteractionが最も激しい癌浸潤先進部に現れると考えられている[1,2]．癌浸潤先進部における病理学的所見は，その癌が元来有している浸潤能や転移能を介して癌の予後と関連があると推測される．この癌浸潤先進部に着目したこれまでの報告では，同部における病理学的所見が癌の悪性度診断に有用であるとしている[3,4]．癌浸潤先進部にみられる病理学的所見のなかで，buddingは癌細胞が少数集簇，あるいは孤立した癌細胞が散在性に認められる所見としてみられ，大腸癌の転移や再発，予後との関連性が指摘されている[5,6]．我々も以前からbuddingを大腸癌の予後因子として注目しており，buddingが治癒切除された進行結腸癌の独立した予後因子であることを報告している[7]．

現在，癌の深達度やリンパ節転移あるいは脈管侵襲などの病理学的因子が，治癒切除された大腸癌の予後因子として有用とされ，術後の予後予測や補助化学療法の適応決定に際しその判断材料として用いられている[8～11]．しかしながら，実際の臨床において，リンパ節転移や脈管侵襲が存在しないにも拘わらず予後不良の症例が少なからず経験される．このようなことから，最近では癌の抑制遺伝子や増殖因子，細胞間接着因子などの分子生物学的因子が注目され，分子生物学的手法を用いた新しい予後因子として期待がもたれている[12～14]．

c-METはc-*met*遺伝子にコードされる蛋白質で，HGF（hepatocyte growth factor）をリガンドとするチロシンキナーゼ型レセプターである．c-*met*遺伝子はヒト骨肉腫細胞より同定され，染色体7q21-q31上に位置する[15,16]．構造的には細胞膜表面で受容体構造を示す分子量50 kDのα鎖と，細胞質内にあってチロシンキナーゼ活性を有する145 kDのβ鎖から成るヘテロダイマーである[17]．c-METは細胞表面にてHGFと特異的に結合をすることで，HGFの作用である上皮性細胞の増殖，遊走，形態形成に関与する[18,19]．特に，癌細胞においてはその浸潤・転移に関与するscatter factorとして注目されており，癌細胞の分離や分散に関与している[20]．c-METの過剰発現は多くの悪性腫瘍において予後不良因子として考えられ，大腸癌においても悪性度に関与することが報告されている[21～24]．

今回，我々は進行結腸癌においてHGF/c-MET signalによるscatter factorとしての作用が癌浸潤先進部でのbudding出現に関与しているか否かについて検討した．

平成17年5月10日受付，平成17年8月23日受理
別刷請求先：奥山　隆
〒343-8555 埼玉県越谷市南越谷2-1-50
獨協医科大学越谷病院外科

表1 臨床病理学的所見

		症例数
年齢		62.9（40－90）*
性別	男性	55
	女性	33
占拠部位	右側	37
	左側	51
腫瘍径（mm）		52.5（20－150）*
組織型	高分化	70
	中分化	18
リンパ管侵襲	あり	64
	なし	24
血管侵襲	あり	18
	なし	70
リンパ節転移	あり	48
	なし	40
budding	あり	49
	なし	39
c-MET	陽性	37
	陰性	51
5年生存率		65.8％

＊範囲（最小－最大）

さらに，進行結腸癌における予後因子としてc-MET発現の有用性についても検討を行った．

対象と方法

1. 対 象

1990年4月－1997年12月までに当科にて外科的治癒切除（根治度A）された深達度ss結腸癌のうち臨床病理学的に十分に観察可能であった高・中分化型腺癌88症例88病変を対象とした．男性55例，女性33例で平均年齢（範囲）は62.9（40－90）歳であった．腫瘍径の平均（範囲）は52.5（20－150）であった（表1）．なお，今回の検討では術前あるいは術後に化学療法がなされた症例や同時性多発大腸癌症例，炎症性腸疾患や大腸腺腫症を合併した症例は対象より除外した．再発については2001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ヶ月であった．

2. 方 法

臨床病理学的所見

切除した結腸癌組織は10％ホルマリンで24時間固定後，パラフィン包埋した後，4 μmの連続切片を作成しHE染色とc-MET免疫組織化学染色を行った．臨床病理学的所見の記載はHE染色標本を用いて，現行の大腸癌取扱い規約に準じた[25]．

病変の占拠部位については主支配血管の相違により上腸間膜動脈系（盲腸，上行結腸，横行結腸）を右側結腸とし，下腸間膜動脈系（下行結腸，S状結腸）を左側結腸とした．また，buddingの判定はMorodomiの定義に従い，癌浸潤先進部において癌細胞が少数集簇し，構造的に管状構造を示す所見，または癌細胞が孤立して存在し明確な構造を示さず間質に散在性に認められる所見が認められる場合をbuddingありとした（図1）[5]．

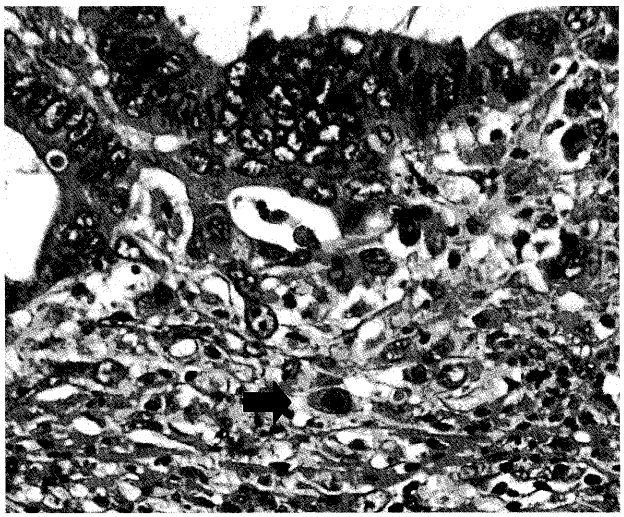

図1 癌浸潤先進部におけるbudding

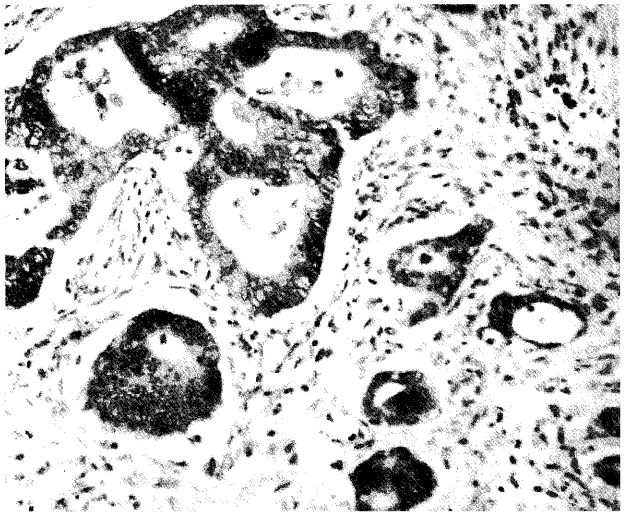

図2 c-MET免疫組織化学染色にて染色がみられた結腸腺癌

免疫組織化学的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（300 W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 Protein Block, 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℃にて一晩反応させた．2次抗体の

表2 c-MET発現と臨床病理学的所見

		症例数		
		c-MET陽性	c-MET陰性	p値
年齢		66	22	0.2552*
性別	男性	20	35	0.1633
	女性	17	16	
占拠部位	右側	18	19	0.2851
	左側	19	32	
腫瘍径	＜50.0 mm	18	24	0.8828
	50.0 mm≦	19	27	
組織型	高分化	28	42	0.4433
	中分化	9	9	
リンパ管侵襲	あり	34	30	0.0006
	なし	3	21	
静脈侵襲	あり	11	7	0.0662
	なし	26	44	
budding	あり	28	21	0.0013
	なし	9	30	
リンパ節転移	あり	32	16	＜0.0001
	なし	5	35	

＊ Mann-Whitney U test

rabbit IgG 抗体（PK-6101, Vectastain ABC kit Vector Laboratories, Burlingme, 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発現は一部の正常粘膜の細胞質に認められたが，主に病巣先進部近傍の癌細胞質に認められた（図2）．c-MET発現の判定は病巣の浸潤最深部を含む最大割面全体において，c-MET発現を認める腫瘍細胞の割合に基づき以下の2群に分類した．すなわち，c-MET発現を認める腫瘍細胞の割合が0－30%未満（－）のものあるいは30%－60%未満（＋）のものを陰性，60%-80%未満（＋＋）のものあるいは80%以上（＋＋＋）のものを陽性とした[26]．

統計学的検討

統計学的検討は，2群間の比較にはχ^2検定あるいはMann-Whitney U検定を用い，累積生存曲線および生存率の算出にはKaplan-Meier法を，その検定にはlogrank testを用いた．予後因子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の場合に統計学的有意差ありと判定した．

結　果

1. 対象病変の臨床病理学的所見，再発，予後

組織型は高分化型腺癌70例，中分化型腺癌18例であった．占拠部位別では右側結腸37病変，左側結腸51病変であった．リンパ管侵襲は64病変に認められ，静脈侵襲は18病変に認められた.リンパ節転移は48病変に認められ，buddingは49病変に認められた．術後再発は25例（28.4%）に認められ，累積5年生存率は65.8%であった（表1）．

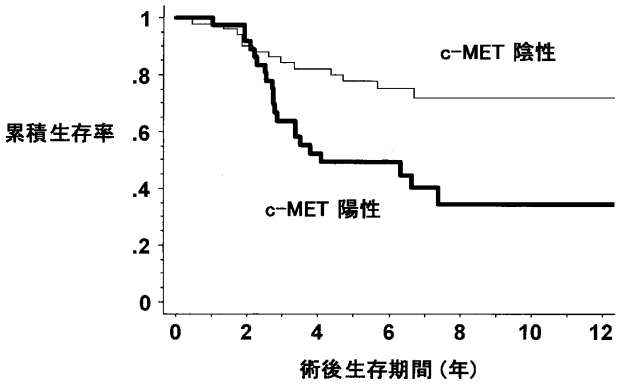

図3a

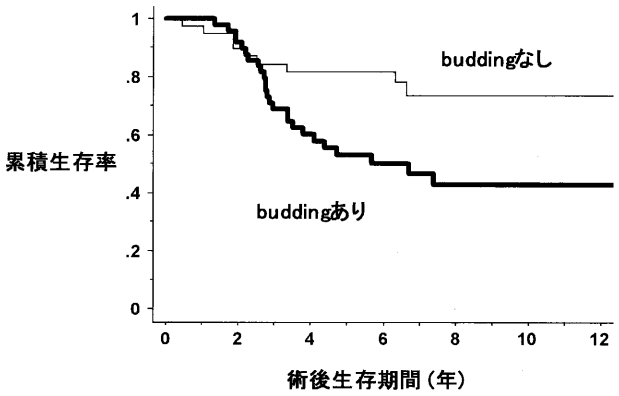

図3b

2. c-MET発現とbuddingおよび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．性差，年齢，腫瘍最大径，組織型，占拠部位とc-MET発現との関連性は認められなかった．静脈侵襲を有する病変ではc-MET陽性例が多かったが，有意差は認められなかった（p = 0.0662）．リンパ管侵襲，リンパ節転移，buddingを有する病変は，これらを有しない病変に比べc-MET陽性病変が有意に多く認められた（p = 0.0006，p＜0.0001，p = 0.0013，表2）．

3. 予後因子としての検討

予後に関する検討では，c-MET発現の有無により累積生存曲線，5年生存率（c-MET陽性49.2%，c-MET陰性77.7%）で有意差を認めた（p = 0.0028，logrank test，図3a）．また，buddingの有無による累積生存曲線，5年生存率についての検討でも同様に有意差を認めた（5年

表3 術後生存に関する多変量解析

		ハザード比	95％信頼区間	p値
組織型	高分化：中分化	2.024	0.769－5.358	0.1558
占拠部位	右側：左側	1.064	0.519－2.179	0.866
腫瘍径	＜50.0 mm：50.0 mm≦	0.835	0.408－1.708	0.6215
リンパ管侵襲	あり：なし	0.657	0.269－1.604	0.3559
静脈侵襲	あり：なし	1.322	0.553－3.158	0.5297
リンパ節転移	あり：なし	0.857	0.332－2.213	0.7503
budding	あり：なし	2.226	0.914－5.421	0.0781
c-MET	あり：なし	2.702	1.101－6.635	0.03

生存率：buddingあり53.1％，buddingなし81.7％，p = 0.0136，logrank test，図3b)．c-MET発現とbudding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（比例ハザードモデル）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［ハザード比（95％信頼区間）：2.702（1.101-6.695），p = 0.03，表3］．

考　察

本検討においてc-MET過剰発現は癌表層部の癌腺管やbudding自体には認められず，癌先進部近傍の癌腺管に認められた．このことは，HGF/c-MET signalが，従来から癌の浸潤や転移に重要であるとされる癌浸潤先進部において重要な働きをしているものと推測できる．また，c-MET発現とbuddingとの関連性が認められたことより，budding形成にHGF/c-MET signalが関与していることも示唆された．

今回の結果は，癌の生物学的特性が癌浸潤先進部に反映され，同部における病理学的検討が癌の悪性度診断に有用であるとする従来の報告を裏打ちするものであった[3,4]．また，c-METの発現はbudding自体でなく，buddingを認める癌先進部近傍の癌腺管に認められたことは興味深く，このことは，癌先進部近傍の癌腺管からその出現が推測されるbuddingが癌先進部近傍の癌腺管におけるHGF/c-MET signalのscatter factorとしての作用によるものと推測された．すなわち，scatter factorにより癌先進部近傍の癌腺管において細胞間接着やマトリックスの破壊がおこり癌細胞が分離，分散することで癌細胞の小管状構造や孤立性の癌細胞を生じるものと考えられた．

現在，大腸癌における治癒切除後の予後因子として，深達度やリンパ節転移，脈管侵襲などが挙げられている[8～11]．このうち脈管侵襲については，その評価基準が各病理医間で異なることや，判定精度を上げるために免疫組織化学染色が有用とされるものの，すべての施設で行われているものではないため，施設間での判定精度の違いが生じてくるなどの問題点がある[29,30]．そのため比較的観察が容易で通常のHE染色で判定可能であるbuddingが以前より注目されてきた．Buddingは今井により癌の悪性度を現す病理学的因子（sprouting）として1954年に報告され，現在までに大腸癌のリンパ節転移や再発，予後との関連が諸家より報告されており，我々も治癒切除されたstage Ⅱ結腸癌症例においてbuddingが独立した予後因子であることを報告してきた[5～7]．

現在までにbudding形成のメカニズムについて分子生物学的に検討した報告は少ないが，近年，Jassらはbudding形成と*APC* mutationとの関連を指摘し，buddingの形成がgenetic mechanismによるものであることを報告している[31]．本検討においてbuddingとc-MET発現との関連性が認められたことは，budding形成が単に癌-宿主間の免疫反応によるものではないことが推測され，budding形成を分子生物学的側面より検討する上で重要な結果であった．しかしながら，budding形成のメカニズムについては多くの遺伝子やsignalの関与が推測され，今後も議論の余地がある．

本検討ではc-MET発現とbuddingは共に進行大腸癌の有意な予後因子であった．この結果は，以前より報告されているように大腸癌におけるc-MET発現と悪性度との関連を肯定するものであった[23,24,26,32]．今後は，進行結腸癌のみならず早期結腸癌症例も含めた検討やHGF/c-MET signalの上流や下流のsignalについても検討を加えることで，大腸癌の浸潤や転移におけるHGF/c-MET signalの重要性がより明確になっていくものと思われた．また，多変量解析の結果から，c-MET発現はbuddingよりも的確に予後を反映しており，予後因子として有用であることが示唆された．

現在，癌におけるHGF/c-MET signalの重要性に注目し，HGFの受容体であるc-METをtargetとした癌治療も考案されている．Matsumotoらは*in vitro*にて，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)が癌抑制に有効であることを報告しており，今後，臨床応用が期待される[33,34]．

謝　辞　稿を終えるにあたり，ご指導を賜った山口真彦教授に深甚なる謝意を表します．また，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にて発表した．

文　献

1) 今井環：人体癌腫発育状況の形態学的考察．福岡医誌 **45**：13-43, 1954.
2) Gabbert H, Wagner R, Moll R, et al：Tumor dedifferentiation：an important step in tumor invasion. Clin Exp Metastasis, **3**：257-279, 1985.
3) Jass JR, Love SB, Northover JM.：A new prognostic classification of rectal cancer. Lancet, **2**：1303-1306, 1987.
4) 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.
5) Morodomi T, Isomoto H, Shirouzu K, et al：An index for estimating the probability of lymph node metastasis in rectal cancers. Cancer, **63**：539-431, 1989.
6) Hase K, Shatney C, Johnson D, et al：Prognostic value of tumor "budding" in patients with colorectal cancer. Dis Colon Rectum, **36**：627-635, 1993.
7) 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.
8) Ducks CE.：The classification of cancer of the rectum. J Path Bact, **35**：322-332, 1932.
9) Fleming ID, Cooper JS, Henson DE, et al：American Joint Committee on Cancer staging manual (5th edition). Philadelphia：Lippincott-Raven, 1997.
10) Minsky BD, Mies C, Rich TA, et al：Lymphatic vessel invasion is an independent prognostic factor for survival in colorectal cancer. Int J Radiat Oncol Biol Phys, **17**：311-318, 1989.
11) Krasuna MJ, Flancbaum L, Cody RP, et al：Vascular and neural invasion in colorectal carcinoma. Incidence and prognostic significance. Cancer, **61**：1018-1023, 1988.
12) 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.
13) Nakamura T, Nawa K, Ichihara A.：Partial purification and characterization of hepatocyte growth factor from serum of hepatectomized rats. Biochem Biophys Res Commum, **122**：1450-1459, 1984.
14) Furuta K, Zahurak M, Goodman SN, et al：CD44 expression in the stromal matrix of colorectal cancer：association with prognosis. Clin Cancer Res, **4**：21-29, 1998.
15) Cooper CS, Park M, Blair DG, et al：Molecular cloning of a new transforming gene from a chemically transformed human cell line. Nature, **311**：29-33, 1984.
16) Giordano S, Ponzetto C, Di Renzo MF, et al：Tyrosine kinase receptor indistinguishable from the c-met protein. Nature (Lond.) **399**：155-156, 1989.
17) Duh FM, Scherer SW, Tsui LC, et al：Gene structure of the human MET proto-oncogene. Oncogene, **15**：1583-1586, 1997.
18) Blume-Jensen P, Hunter T.：Oncogenic kinase signaling. Nature, **411**：355-365, 2001.
19) Maulik G, Shrikhande A, Kijima T, et al：Role of the hepatocyte growth factor receptor, c-Met, in oncogenesis and potential for therapeutic inhibition. Cytokine Growth Factor Rev, **13**：41-59, 2002.
20) Stella MC, Comoglio PM.：HGF：A multifunctional growth factor controlling cell scattering. Int J Biochem Cell Biol, **31**：1357-1362, 1999.
21) 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.
22) 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.
23) 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.
24) Wielenga VJ, van der Voort R, Taher TE, et al：Expression of c-met and heparan-sulfate proteoglycan forms of CD44 in colorectal cancer. Am J Pathol, **157**：1563-1573, 2000.
25) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約．第6版．金原出

版，東京，1998.

26) Tabuchi Y, Nakamura T, Ohno M, et al：Immunohistochemical expression of c-met（HGF receptor）in colorectal cancer lesions. Bulletin of Health Sciences Kobe, **14**：43-48, 1998.

27) Schena M, Shalon D, Davis RW, et al：Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. Science, **270**：467-470, 1995.

28) Golub TR, Slonim DK, Tamayo P et al：Molecular classification of cancer：Class discovery and class prediction by gene expression monitoring. Sience, **286**：531-537, 1999.

29) 味岡洋一：病理診断の不一致はなぜ生じるのか．武藤徹一郎（編）：大腸sm癌—内視鏡診断と治療，166-172，日本メディカルセンター，東京，1999.

30) 大倉康男，池上雅博，鶴田修：大腸sm癌における脈管侵襲の判定—病理医間で差はないのか？ 早期大腸癌，**5**：486-500，2001.

31) Jass JR, Backer M, Fraser L, et al：APC mutation and tumor budding in colorectal cancer. J Clin Pathol, **56**：69-73, 2003.

32) 鰺坂秀之，西村元一，経田淳，他：大腸癌におけるc-MET/hepatocyto growth factor receptorの発現．日消誌 **95**：750-754，1998.

33) Matsumoto K, Kataoka H, Date K, et al：Cooperative interaction between α-chain and β-chain of HGF on c-met receptor confers ligand-induce receptor tyrosine phosphorylation and multiple biological responses. J Bio Chem, **273**：22913-22920, 1998.

34) Date K, Matsumoto K, Kuba K, et al：Inhibition of tumor growth and invasion by a four-kringle antagonist（HGF/NK4）for hepatocyte growth factor. Oncogene, **17**：3045-3054, 1998.

The relationship between the expression of hepatocyte growth factor receptor (c-Met) and budding in pT3 colon adenocarcinoma

Kazuhiro Kobayashi and Takashi Okuyama

Department of Surgery, Koshigaya Hospital, Dokkyo University School of Medicine

Introduction Hepatocyte growth factor receptor (c-met) is suggested to play an important role in the progression and metastasis of colorectal cancer. In this study, we investigated the relationship between the expression of c-met and budding in pT3 colon adenocarcinoma. **Patients and Methods** Curatively resected specimens of 88 pT3 well or moderately differentiated colon adenocarcinoma were studied. The median postoperative follow-up was 70.2 months. We made serial sections from formalin-fixed and paraffin embedded blocks, and performed H-E staining and immunohistochemical staining for c-met. We classified the expression of c-met were evaluated as positive (+) or negative (−). The finding of budding at the invasive front of tumor was recorded according to Morodomi's criteria. **Results** The expression of c-met was 37 lesions and was significantly correlated with lymphatic invasion, lymphnode metastasis, budding, and overall recurrence ($p = 0.0006$, $p < 0.0001$, $p = 0.0013$, and $p = 0.0019$, respectively). 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). Similarly, budding was a significantly prognostic factor ($p = 0.0136$, logrank test). Multivariate proportional hazard model revealed that the expression of c-met was the only significant co-factor of postoperative survival in pT3 colon adenocarcinoma. **Conclusion** HGF/c-MET signal may affect the formation of budding at the invasive front of tumor. Moreover, c-MET is an useful marker suggesting poor survival in patients with pT3 colon carcinoma.

Key Words : colon carcinoma, c-MET, budding, prognostic factor