

学位申請論文

## 進行胃癌における胃型・腸型形質は予後に影響するか

獨協医科大学 第一外科学

大塚 吉郎

**要 旨** 早期胃癌における形質発現（胃型・腸型）は近年癌発生機序からみた新たな分化の形態として検討されている。進行胃癌における形質発現の意義についての研究報告は少なく、我々は進行胃癌患者を対象として胃型・腸型胃癌に分類し、retrospectiveに臨床病理学的検討を行った。対象は胃癌に対し根治切除術を施行した stage II ~ III B の胃癌患者 66 例である。摘出癌組織のパラフィン包埋切片を用いて MUC2・MUC5AC・MUC6・CD10 に対する免疫染色を行いその染色性により胃型・腸型・混合型・分類不能の 4 群に分類し、胃癌の臨床病理所見や生存率との関連について検討した。対象中 38 例に関しては抗癌剤感受性試験を行い、形質発現との関連を調べた。形質発現と病理組織分化度や進行度との間に有意な関連を認めず、発現様式による生存率の差も認めなかった。抗癌剤感受性試験においても形質発現との関連を認めなかった。我々の検討から、進行癌では形質発現による分類は、従来用いられている病理組織分化度と比較し予後などの推測において意義が低いと結論された。また、抗癌剤感受性を判定するための一定の傾向を認めなかった。

**Key Words** : 胃癌, 形質発現, 胃型, 抗癌剤感受性

### 緒 言

胃癌の胃型・腸型とは、従来の腺構造を軸にした分化の指標に加わった新たな分化の形態であり、胃癌細胞が表現する形質が胃粘膜の細胞に類似しているか、腸の粘膜の細胞（腸上皮化生）に似ているかで胃癌を亜分類したものである。胃粘膜の粘液には腺窩上皮に含まれるものと幽門腺の粘液があり、腸の杯細胞には粘液があり、吸収上皮には特徴的な刷子縁を認める。これらを種々の抗体を使用し免疫組織学的に検討することで、細胞形質を基とした分類が可能となった。

従来、胃癌の組織型は分化型腺癌と未分化型腺癌に大別され、臨床的にもその分類に応じた胃癌の特性があることが示されてきた。また胃癌の発生に関しても、胃分化型癌は腸上皮化生を、未分化癌は固有胃粘膜を母地として発生するとされていた<sup>1~3)</sup>。しかし粘液組織化学および免疫組織化学的手法の発達により、胃癌の細胞形質判定が客観的かつ容易に行えるようになってきた。その結果、胃分化型腺癌だけでも多彩な細胞形質を有するこ

とが次第に明らかとなった。胃型分化型癌で腺窩上皮や幽門腺の細胞形質を有意に有することも決してまれでなく、特に小病変であるほどその頻度が高いことが判明してきた<sup>4~6)</sup>。

免疫組織化学的に胃腺窩上皮粘液は MUC5AC 陽性粘液、幽門腺ならびに腺頸部副細胞には MUC6 陽性粘液が証明される。一方腸上皮化生腺管の杯細胞では MUC2 陽性粘液を認め、刷子縁には CD10 が陽性染色される。これらを基に胃癌組織を胃型・腸型・胃腸型（混合型）等に分類した検討がなされてきた<sup>8~10)</sup>。

またそうした流れの中で胃癌発生に関し下田らは、胃型形質を有する 10 mm 以下の早期がんでは 86 % が純粋な分化型腺癌で、10 mm 以上では分化型、未分化型、分化・未分化混合型の頻度がほぼ同じとなる。一方腸型形質胃癌では腫瘍の大きさに関わらず分化型腺癌が約 70 ~ 80 % と頻度がほとんど変わらない。このことは胃型形質を有した小さい分化型腺癌は粘膜内で発育と共に未分化型腺癌に発育しうること、また腸型腺癌は組織型の変化を伴うことなく粘膜内で発育することを示唆している、と報告している<sup>7)</sup>。

以上述べたように胃癌における胃粘膜の形質発現は、主に組織発生の観点から早期癌を対象として多施設において検討されている。一方進行胃癌において予後因子としてその分類が有用であるか否かを検討した報告は少な

平成 19 年 10 月 31 日受付, 平成 19 年 12 月 7 日受理  
別刷請求先: 大塚吉郎

〒321-0293 栃木県下都賀郡壬生町北小林 880  
獨協医科大学 第一外科学

い<sup>7,13,14)</sup>。本研究は進行胃癌での形質発現を検討し、それによる予後や抗癌剤の感受性に対する影響を探ることを目的とした。

## 方 法

### 1. 対象

1996年から2004年に、インフォームドコンセントが得られ獨協医科大学第一外科で根治的胃切除術を施行したStage II・ⅢA・ⅢBであった胃癌症例中、術後36ヶ月以内に原病死以外の理由で観察不能となった症例を除く66例(術後3年以上生存31例:3年未満死亡35例)を対象として以下の免疫染色を用いた形質発現評価を行った。また、抗癌剤感受性試験に関しては同症例中の38例にHDRA法(Histoculture Drug Response Assay)による検討を行った。

対象の年齢は38～87歳(平均66.9歳)、男性40人対女性26人の全て術後3年以上経過した症例であった。その内訳はStage II:26例(39.4%)・Stage III A:31例(47.0%)・Stage III B:9例(13.6%)。組織型は胃癌取扱い規約上の分類(tub1, tub2, pap, por, sig, muc)を参照の上、再度、腺管成分の有無などから分化型と未分化型に再分類した<sup>15)</sup>。その結果分化型25例(37.9%)・未分化型41例(62.1%)であった。いずれの症例も術後補助化学療法を行ったが、薬剤の投与法はいずれも5-FU(5-fluorouracil)を含む治療法であった。

### 2. 免疫組織学染色法

方法は摘出癌組織のパラフィン包埋切片を用いた。これを脱パラフィン、microwaveによる賦活化後2次抗体を含むZymed<sup>®</sup>社のHistostain<sup>®</sup> Plus Kits(希釈無し)にて免疫染色を行った。使用した1次抗体はMuc-2 Glycoprotein mouse monoclonal antibody(Novocastra, 希釈率1:80), Muc-5AC Glycoprotein mouse monoclonal antibody(Novocastra, 希釈率1:50), Muc-6 Glycoprotein mouse monoclonal antibody(Novocastra, 希釈率1:50), CD10 mouse monoclonal antibody(Novocastra, 希釈率1:80)を用いた。発色はdimethylaminoazobenzene(DAB)を使用し、核染はメチルグリーンを用いた。MUC5AC, MUC6, MUC2に関しては細胞内での発色、CD10に関しては細胞膜での発色を測定した。それぞれの抗体による染色で、Tajimaらの報告<sup>8)</sup>を参考に腫瘍先進部(腫瘍辺縁で壊死組織を含まない部位)で腫瘍細胞の染色性が10%未満の場合を陰性、10%以上を陽性と判定した。癌の形質発現による分類は、MUC5ACまたはMUC6の少なくとも一方が陽性でMUC2, CD10いずれも陰性の場合を胃型胃癌と判定した。また、MUC2もし

くはCD10の少なくとも一方が陽性でMUC5AC, MUC6いずれも陰性を腸型胃癌とし、MUC5ACまたはMUC6の少なくとも一方が陽性かつMUC2, CD10の少なくとも一方が陽性を混合型胃癌、MUC5AC, MUC6, MUC2, CD10全て陰性の場合は分類不能と4つのカテゴリーに分類した。

### 3. 生存率に関与する因子の検討

対象全症例において形質発現分類(胃型・腸型・混合型・分類不能)や胃癌組織分化度、リンパ管浸襲(ly)、静脈浸襲(v)、リンパ節転移(n)、などの各臨床病理学的因子に対してそれぞれ生存曲線を作成し、生存率に違いがあるかどうかを検討した。なお、生存率に関しては本検討が進行胃癌症例を対象としているため、3年生存率で比較検討を行った。

### 4. 抗癌剤感受性試験

検討した66例のうち38例に対し手術時に摘出した癌組織の一部を採取しHDRA法にて5-FU(5-fluorouracil), MMC(mitomycin C), CDDP(cisplatin), TXT(docetaxel)4種類の抗癌剤の感受性を検討した<sup>11,12)</sup>。腫瘍増殖抑制率50%以上を陽性、50%未満を陰性と評価した。

### 5. 統計

形質発現に基づく群間比較の有意差検定は $\chi^2$ 乗検定及びクラスカル・ワーリス検定で行った。また同分類や臨床病理学的因子、抗癌剤感受性の陽・陰性についてKaplan-Meier法を用いて生存曲線を作成した。それらにより $p$ 値を算定し、 $p < 0.05$ で有意差ありと判定した。統計処理にはスタットビュー 5.0を使用した。

## 結 果

### 1. 形質分類

形質発現の免疫染色を施行し、前述のように胃型・腸型・混合型・分類不能に分類した。図1に胃型胃癌を示す。MUC5AC及びMUC6染色陽性かつMUC2及びCD10染色陰性と判定した。同様に図2に腸型胃癌を示す。MUC5AC及びMUC6染色陰性かつMUC2及びCD10陽性と判定した。

### 2. 形質分類と臨床病理学的所見の検討

胃癌66例の形質分類の結果、胃型13.6%(9例)腸型30.3%(20例)混合型33.3%(22例)分類不能22.7%(15例)の割合で出現していた。各個体条件(年齢・性別・病理組織分化度・Stage)による形質分類の頻度に

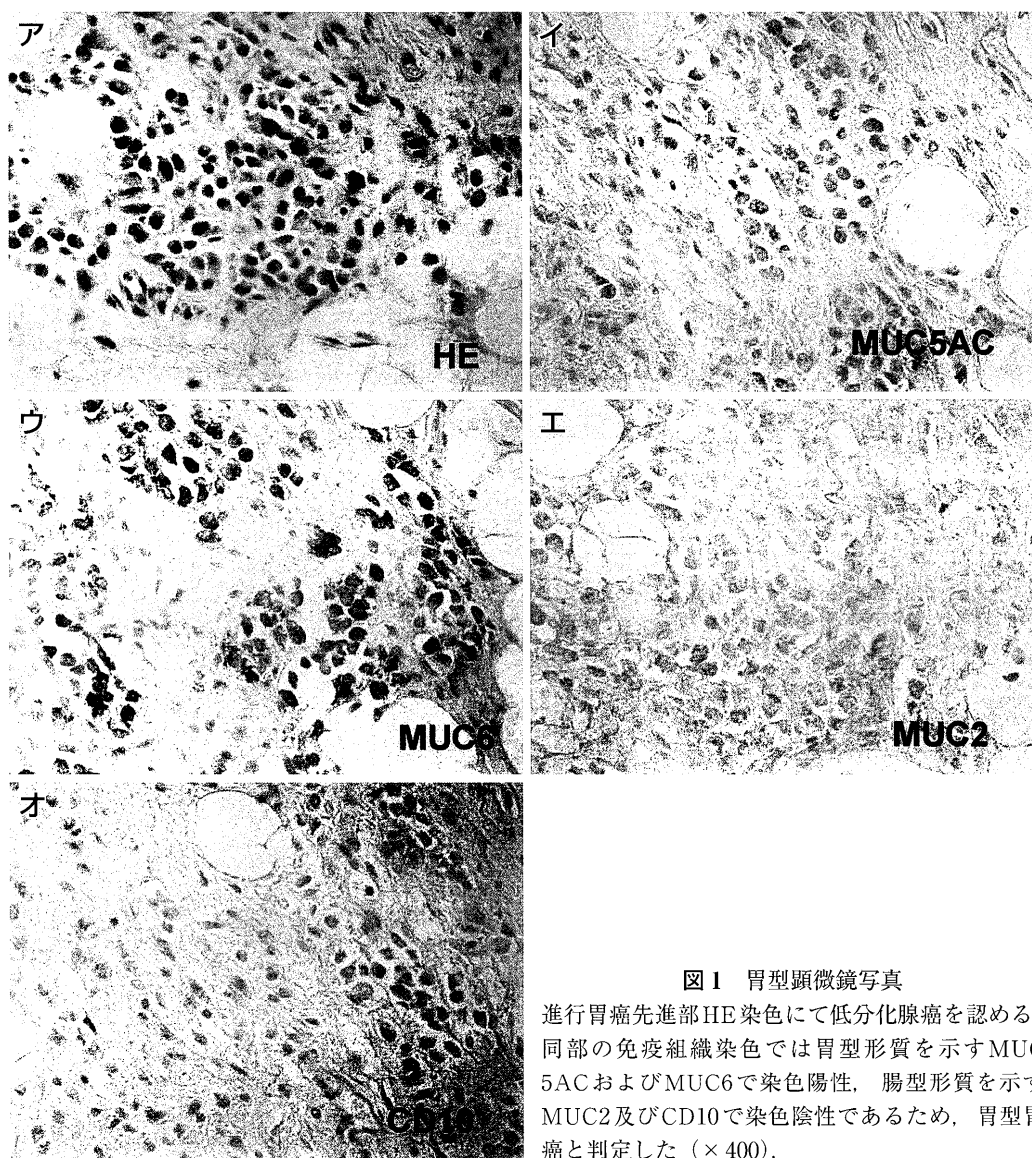


図1 胃型顕微鏡写真

進行胃癌先進部HE染色にて低分化腺癌を認める。同部の免疫組織染色では胃型形質を示すMUC5ACおよびMUC6で染色陽性、腸型形質を示すMUC2及びCD10で染色陰性であるため、胃型胃癌と判定した(×400)。

有意差を認めなかった(表1)。また、3年以上の生存例と3年未満での死亡例との間に形質分類の頻度に有意差を認めなかった( $p = 0.8429$ )(表2)。

### 3. 形質発現および臨床病理学的所見と予後の検討

対象66例の形質分類の結果、その3年生存率はそれぞれ胃型33.3%・腸型50.0%・混合型50.0%・分類不能46.7%で各群の間に生存率の有意差を認めなかった( $p = 0.8504$ )(図3)が、病理組織分化度による3年生存率の比較では分化型胃癌(68.0%)の生存率が未分化型胃癌(34.1%)に比べ有意に高い結果( $p = 0.0063$ )であった(図4)。また、3年以上生存例と3年未満での死亡例との比較において3年未満での死亡例で未分化型胃癌の頻度が有意に高かった( $p = 0.0070$ )(表3)。リンパ管侵襲(ly0/ly1/ly2/ly3)別での生存の検討では有意差はなかったものの、ly0>ly1>ly2>ly3の順に生存率が低下

することが示唆された( $p = 0.1870$ )。リンパ節転移(no/n1/n2)との関連ではn1>n2>n0の順で有意に生存率の低下を認めた( $p = 0.0340$ )。

### 4. 抗癌剤感受性試験の検討

胃型・腸型・混合型・分類不能での各種抗癌剤(5-FU/MTX/CDDP/TXT)に対する感受性陽性率と形質発現による分類との関連を示唆すると思われるものは認めなかった(表4)。また分化型胃癌・未分化型胃癌による分類と各種抗癌剤感受性試験の検討においても関連を認めなかった(表5)。

## 考 察

胃癌における形質発現を基にした臨床病理学的検討は多施設で行われ、特に早期胃癌に関し組織発生観点から多くの研究がされている。しかしその評価や形質発現

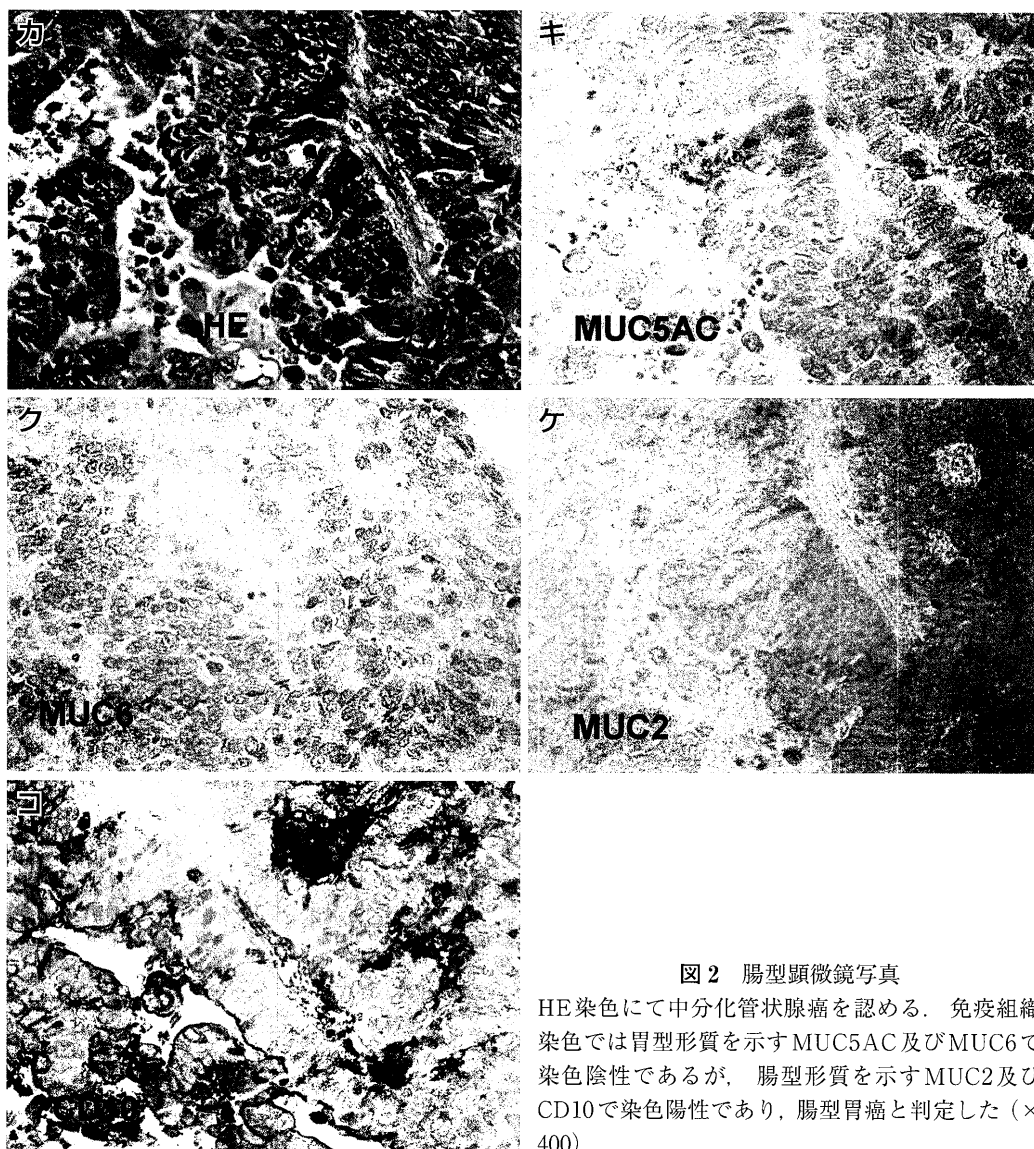


図2 腸型顕微鏡写真

HE染色にて中分化管状腺癌を認める。免疫組織染色では胃型形質を示すMUC5AC及びMUC6で染色陰性であるが、腸型形質を示すMUC2及びCD10で染色陽性であり、腸型胃癌と判定した(×400)。

において共通の診断基準は作られておらず、各施設間で発生頻度には隔たりを認める。下田らは早期胃癌351例の検討より胃型15～20%・腸型約20%・残りの約60%が胃腸混合型であったとしている<sup>7)</sup>のに対し、渡部らの52例の分類では胃型25%・小腸型40%・胃腸混合型35%であったと報告している<sup>10)</sup>。このような形質発現による分類の相違が類似した検討のなかで出てくる理由として、染色方法は使用している抗体がほぼ同一であるにもかかわらず、形質発現染色の際に陽性と判定する染色率が5%・10%に分かれることや分類自体にも各研究により相違があることが最大要因と思われる<sup>7～10)</sup>。

我々は進行胃癌の検討をするにあたり、特に胃型形質・腸型形質と臨床病理学的所見との対比を中心に行う目的であったため、胃腸混合型形質の判定が低くなることを想定しTajimaらの報告<sup>8)</sup>を参考に染色率≥10%を陽性とした。また早期胃癌における形質発現の評価で

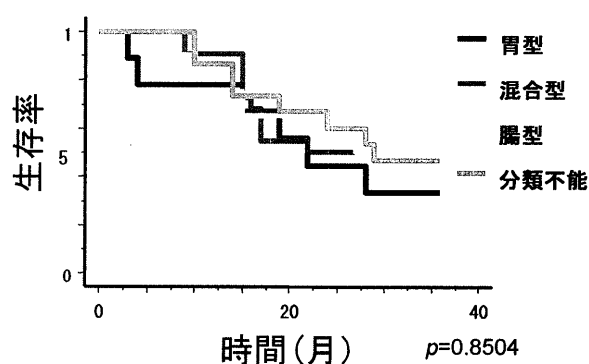


図3 生存曲線(形質分類)

形質発現(胃型・腸型・混合型・分類不能)それぞれにおける3年生存率の比較を行った。各群の生存率に有意差を認めなかった( $p = 0.8504$ )。

は一般に腫瘍の最大断面を用いた評価を行っているが、本研究では腫瘍径の大きい進行癌を対象としたことから

表1 形質発現の結果

	胃型	腸型	混合型	分類不能	p value
症例% (n)	13.6 (9)	30.3 (20)	33.3 (22)	22.7 (15)	
平均年齢	72.4	67.1	66.6	66.8	0.4160
性別 男性	7	10	10	13	0.1140
女性	2	10	12	2	
病理組織型					0.2619
分化型	5	9	4	7	
未分化型	4	11	18	8	
Stage					0.8993
II	4	9	8	5	
III A + III B	5	11	14	10	

年齢・性別・病理組織分化度・病期における形質発現の結果に有意差を認めない。

表2 3年以上生存・3年未満死亡症例による形質分類の結果

	胃型	腸型	混合型	分類不能	p value
3年未満	6	10	11	8	0.8429
3年以上	3	10	11	7	

3年以上生存症例と3年未満での死亡症例との間に形質分類の結果に有意差を認めない。

腫瘍の最大断面での評価は困難であったため、細胞活性が最も高いと思われる腫瘍先進部での拡大(400倍)3視野の中で、(染色性を認める腫瘍細胞数/視野中の全腫瘍細胞数)の割合の平均から評価を行った。その結果各形質発現の発現頻度は胃型13.6%・腸型30.3%・混合型33.3%・分類不能22.7%と、分類不能群でやや出現率が高値を示したが、早期胃癌での報告例と大きく偏らない結果を認めた。

過去進行胃癌において形質発現と生存率の関連を報告したものは稀であり、Emmanuelleらはmucinous gastric carcinoma 31例での形質発現を検討し、その中でMUC2発現が高値なものほど生存率が低かったと報告している<sup>13)</sup>。またMeng-Mengらは印環細胞癌66例の中で腸型形質を有するものは細胞増殖能力が高く、予後不良であると報告している<sup>14)</sup>。しかしこれら報告ではTNM等の、従来検討されている予後に影響を与えると考えられる臨床病理学的所見との比較検討がされておらず、形質発現に基づく胃癌分類が予後因子として有用であると評価するのは困難と判断せざるを得ない。我々は今回Stage II～III Bまでの治療切除進行胃癌症例を対象とした検討を行ったが、結果胃型・腸型・混合型・分類不能各群の生存曲

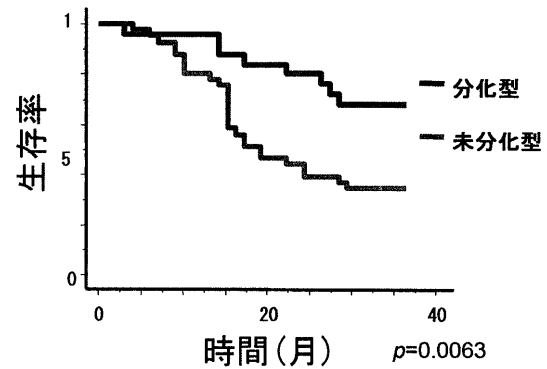


図4 生存曲線(病理組織分化度)

病理組織分化度(分化型・未分化型)による3年生存率を比較した結果、分化型胃癌の生存率が有意に良好であった( $p = 0.0063$ )。

表3 3年以上生存・3年未満死亡症例による病理組織分化度の結果

	未分化型	分化型	p value
3年未満	27	8	0.0070
3年以上	14	17	

3年以上生存例と3年未満での死亡例では3年未満での死亡症例で未分化型胃癌を優位に多く認めた。

表4 抗癌剤感受性試験 胃型・腸型・混合型・分類不能

	胃型 (%)	腸型 (%)	混合型 (%)	分類不能 (%)	p value
5-FU	50	50	25	28.6	0.5264
MTX	66.7	25	50	57.1	0.3539
CDDP	22.2	25	16.7	16.7	0.9642
TXT	0	16.7	10	0	0.57

形質発現分類による各種抗癌剤感受性に有意差を認めない。

表5 抗癌剤感受性試験 分化型・未分化型

	分化型 (%)	未分化 (%)	p value
5-FU	44.5	34.6	0.5344
MTX	54.5	48	0.7174
CDDP	27.3	16.7	0.4665
TXT	0	9.5	0.2905

病理組織分化度による各種抗癌剤感受性に有意差を認めない。

線に有意差は認めず、予後因子として形質発現を評価する意義は低いと判断された。他方Stage (II・III A・III B)間の生存率の比較および分化型・未分化型胃癌での生存率の比較では各群間に有意差を認め、既存の病理組織学的診断価値の有用性裏付けるものとなった。

抗癌剤感受性試験に関し久保田ら・古川らは胃・大腸癌の検討において予後判定の有用性を示す結果を報告しているが<sup>16~22)</sup>、今回我々の検討では感受性陽性・陰性間に予後の差を認めず、また形質発現による感受性の差も認めなかった。

## 結 論

進行胃癌における形質発現の評価を行ったが、形質発現の相違が予後を規定する因子とはなり得ないと考えられた。一方で分化型・未分化型の比較においては未分化型胃癌で有意に生命予後の増悪を認め、既存の胃癌の組織学的評価の有用性をさらに裏付ける結果となった。また、抗癌剤感受性試験による予後評価の検討では、形質発現との関連において、有効性は認められなかった。形質発現による胃型・腸型胃癌の分類方法には研究者間で若干の相違があるが、前述のように組織分化度に匹敵する因子となる可能性は低いのではないかと考えられた。

進行胃癌に対する治療に関しては、形質発現の表現型・抗癌剤感受性の有無により治療方法を変更することなく経過観察・補助化学療法を行うことが重要であると考えられた。

## 参考文献

- 1) Nakamura K, Sugano H, Takagi K. : Carcinoma of the stomach in incipient phase : Its histogenesis and histologic appearances. *Gann*, **59** : 251-258, 1968.
- 2) 中村恭一 : 胃癌の構造. 医学書院, 第3版 : 185-247, 2005.
- 3) Lauren P. : The two histologic main types of gastric carcinoma : diffuse and so-called intestinal type carcinoma. *Acta Pathol Microbiol Scand*, **64** : 31-49, 1965.
- 4) Egashira Y, Shimoda T, Ikegami M. : Mucin histochemical analysis of minute gastric differentiated adenocarcinoma. *Pathol Int*, **49** : 55-61, 1999.
- 5) Kabashima A, Yao T, Sugimachi K, et al. : Relationship between biologic behavior and phenotypic expression in intramucosal gastric carcinomas. *Hum Pathol*, **33** : 80-86, 2002.
- 6) Saito A, Shimoda T, Nakanishi Y, et al. : Histologic heterogeneity and mucin phenotypic expression in early gastric cancer. *Pathol Int*, **51** : 165-171, 2001.
- 7) 下田忠和 : 胃癌の発生と生物学的態度—新しい視点から. 外科, **64** : 292-300, 2002.
- 8) Tajima Y, Shimoda T, Nakanishi Y, et al. : Gastric and intestinal phenotypic marker expression in gastric carcinomas and its prognostic significance : immunohistochemical analysis of 136 lesions. *Oncology*, **61** : 212-220, 2001.
- 9) Tsukashita S, Kushima R, Bamba M, et al. : MUC gene expression and histogenesis of adenocarcinoma of the stomach. *Int J Cancer*, **94** : 166-170, 2001.
- 10) 渡辺玄, 渡辺英伸, 味岡洋一, 他 : 胃型の高分化型早期胃癌の病理学的特徴. 胃と腸, **38** : 693-700, 2003.
- 11) Freeman AE, Hoffman RM. : *Proc Natl Acad Sci USA*, **83** : 2694-2698, 1986.
- 12) Vescio RA, Redfern CH, Nelson TJ, et al. : *Proc Natl Acad Sci USA*, **84** : 5029-5033, 1987.
- 13) Emmanuelle L, Farid Z, Guillaume P. : Relationships between mucinous gastric carcinoma, MUC2 expression and survival. *Wor J Gastroenterol*, **21** : 3324-3331, 2006.
- 14) Meng-Meng Tian, Ai-Lian Zhao, Zhong-Wu Li, et al. : Phenotypic classification of gastric signet ring cell carcinoma and its relationship with clinicopathologic parameters and prognosis. *Wor J Gastroenterol*, **23** : 3189-3198, 2007.
- 15) 胃癌取り扱い規約. 日本胃癌学会, 金原出版. 第13版, 1999.
- 16) Furukawa T, Kubota T, Hoffman RM : Clinical application of the histoculture drug response assay. *Clin Cancer Res*, **1** : 305-311, 1995.
- 17) 古川智子, 鈴木一枝, 湯浅智子, 他 : 組織培養法を用いた抗癌剤感受性試験 (Histoculture Drug Response Assay) の臨床的検討—胃, 大腸の累積有効率曲線による解析—. 日癌治, **31** : 116-126, 1996.
- 18) 古川智子, 久保田哲朗, 谷野裕一, 他 : 組織培養法を用いた抗癌剤感受性試験 (Histoculture Drug Response Assay) の臨床的検討—癌種間における抗癌剤感受性分布および臨床効果予測性. 日癌治, **32** : 400-409, 1997.
- 19) Tanino H, Oura S, Hoffman RM, et al. : Acquisition of multidrug resistance in recurrent breast cancer demonstrated by the histoculture drug response assay. *Anticancer Res*, **21** : 4083-4086, 2001.
- 20) Comis RL, Carter SK. : Intergration of chemotherapy into combined modality treatment of solid tumors III. *Gastric Cancer Treat Rev*, **1** : 221-238, 1974.
- 21) Ramming KP, Haskell CM. : Colorectal malignancies. *Cancer Treatment*. 2nd edition, 275-307, 1985.
- 22) 磯部陽, 久保田哲朗, 窪地淳, 他 : 特集 胃癌術後補助化学療法をめぐる高度進行胃癌における術後化学療法と抗癌剤感受性試験—prospective studyでの検討—臨床外科, **53** : 1285-1289, 1998.