

主論文の要旨

The prognostic value of hepatocyte growth factor receptor expression in patients with perihilar cholangiocarcinoma.

〔肝門部領域胆管癌患者における肝細胞成長因子受容体発現の予後的価値〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病態外科学講座 腫瘍外科学分野

(指導：椰野 正人 教授)

渡邊 博行

【緒言】

肝門部領域胆管癌 (PHC) は、その解剖学的存在部位と隣接臓器への浸潤のために治療困難な癌と考えられている。積極的な外科切除により、生存率の向上は認めるものの、進行 PHC における根治切除後の生存率は未だに不良である。これまでに病理学的因子として組織型、脈管浸潤、神経浸潤、リンパ節転移、癌遺残の有無が予後と相関することが明らかとなっている。しかしながら、これらが同等の状況でも症例により予後が大きく異なることがある。

Mesenchymal-epithelial transition factor (MET) and Recepteur d'Origine Nantais (RON) はそれぞれ、hepatocyte growth factor (HGF) と hepatocyte growth factor-like protein (HLP) をリガンドとする細胞表面の膜貫通型受容体チロシンキナーゼである。MET と RON は上皮細胞において、有糸分裂と形態形成を誘発し、組織の再生と発達に関係する。悪性腫瘍においては、両レセプターが活性化することにより惹起される細胞内シグナル伝達が、腫瘍の進行と転移に関係し、MET と RON の過剰発現が、悪性腫瘍の予後不良因子となることが特定の癌種で報告されている。しかしながら、PHC における MET と RON の共発現について検討されたことは無く、悪性度との関連も不明である。今回我々は、PHC の切除検体を用いて MET、RON 受容体の発現を免疫染色で検討し、これらの発現の強さと予後の関連について検討した。

【対象及び方法】

[対象]

2001 年から 2007 年の間に、当科で切除を行い、病理学的に PHC と診断された患者は 248 名であった。このうち遠隔転移症例、癌遺残症例の 79 例を除き、治癒切除が施行された 169 例を対象とした (Figure 1)。

[抗体]

CONFIRM anti-Total c-MET (SP44) Rabbit Monoclonal Primary Antibody (rabbit monoclonal, Ventana Medical Systems Inc., Tucson, AZ)²³ と Anti-RON antibody [EP1132Y] (rabbit monoclonal, Abcam Inc., Cambridge, UK)²⁴ を使用した。

[免疫化学染色]

染色は DISCOVERY XT automated slide preparation system (Ventana Medical Systems Inc.) で、manufacturer's instructions (Ventana Medical Systems Inc.) に従って行った。MET に対する染色は、スライドを MET 抗体と amplification kit (Ventana Medical Systems Inc.) で、60 分間室温でインキュベートし、RON に対する染色は、スライドを 100 倍希釈した RON 抗体で、12 時間室温でインキュベートした。さらに MET、RON 共に Universal Secondary Antibody (Ventana Medical Systems Inc.) で、48 時間インキュベートした。抗体は DAB Map Detection Kit (Ventana Medical Systems Inc.) で検出した。染色されたスライドは、染色濃度により以下の 3 グループに分類した (Figure 2)。

発現無し [-]; 細胞膜が全く染色されていない

弱発現 [+]; 30%以上の癌細胞が弱く、部分的に染色されている

強発現 [++]; 30%以上の癌細胞が濃く、完全に染色されている

2人の診療情報を知らない観察者がそれぞれスライドを評価し、評価が分かれたときは討議を行い、最終的なグループ分類を行った。今回の検討では、強発現 [++] 症例を発現陽性とした。

[統計解析]

t 検定、 χ^2 検定、Fisher 正確確率検定を行った。生存期間は、手術日から死亡または最終生存確認日までとした。観察期間の中央値は 1405 日 (期間: 15 - 4845 日) であった。169 例の PHC 患者のうち 19 例 (11.2%) は他病死している。手術関連死亡は 169 例中 4 例 (2.4) であった。経過観察期間中に他病死した症例は censored case として扱った。術後の生存率は Kaplan-Meier 法で計算し、log rank 検定で比較を行った。多変量解析は COX 比例ハザードモデルで行った。すべての統計解析は SPSS[®] statistical package, version 11 (IBM, Armonk, NY) で行った。 $P < 0.050$ であった場合を統計学的有意差有りとした。

【結果】

[PHC 標本に対する免疫化学染色]

MET、RON は PHC 細胞の細胞膜と細胞室で染色された (Figure 2)。MET 陽性例は 169 例中 56 例 (33.1%) で、RON 陽性例は 169 例中 66 例 (39.1%) であった (Table 1)。

[MET、RON の共同発現と臨床病理学的因子]

今回の検討で、MET、RON が共に発現陽性であった 27 症例を MET・RON 陽性群とし、その他の症例を OTHERS 群とした。MET・RON 陽性群は、門脈浸潤 ($P=0.002$)、他臓器浸潤 ($P=0.018$) の頻度が OTHERS 群に比べ有意に低かった (Table 2)。しかしながら、統計学的な有意差は認めないものの、全生存率は MET・RON 陽性群が OTHER 群に比べ低い傾向であった ($P=0.234$) (Figure 3A)。5 年生存率は MET・RON 陽性群が 37.0%、OTHER 群が 47.9%であった。

引き続き UICC 第 7 版に基づき Stage IIIa、IIIb、IVa 群を抽出し解析を行った。単変量解析では、病理学的静脈浸潤陽性、リンパ節転移陽性、MET・RON 陽性が統計学的有意差をもって予後不良因子として抽出された (Table 3)。これらの 3 因子で多変量解析を行うと、リンパ節転移陽性、MET・RON 陽性が独立した予後不良因子として確認された。全生存率は MET・RON 陽性群が統計学的有意差をもって OTHERS 群より不良であった (Figure 3B)。5 年生存率は MET・RON 陽性群が 16.7%、OTHERS 群が 39.8%であった ($P=0.021$)。MET、RON の発現頻度は Stage I、II 群、Stage IIIa、IIIb、IVa 群で差を認めなかった (data not shown)。

【考察】

MET と RON は同じ癌原遺伝子のファミリーであり、細胞表面で非共有結合性複合体を形成し、協調して細胞内シグナル伝達を行っていることが報告されている。また MET、

RON 二つの受容体が同時に活性化することで、相乗効果を生み、浸潤、転移をきたしている可能性があることが報告されている。MET、RON レセプターが活性化することにより、癌細胞の進行、浸潤、転移を引き起こすことが *in vivo* でも *in vitro* でも報告されている。MET、RON レセプターが共に過剰発現している事が予後不良因子となることは、尿路癌、膀胱癌、肝細胞癌、乳癌、大腸癌、卵巣癌で報告されているが、胆管癌においては未だ検討されていなかった。本検討で、他の固形癌と同様に進行 PHC において、MET・RON 陽性群の予後が有意に悪いという結果が得られた。

以前に我々は、574 例の PHC 切除例の病理学的所見を検討し、リンパ節転移陽性であることが最も強い予後不良因子であることを報告している。本検討のサブクラス解析で行った UICC stage IIIa, IIIb, IVa での検討で、MET・RON 陽性群と OTHERS 群のリンパ節転移陽性率はそれぞれ 50%と 59.4%で統計学的有意差を認めなかった。にもかかわらず、その全生存率は MET・RON 陽性群で有意に悪かった。この結果は MET・RON の発現が、既存の病理学的分類から推測することのできない生物学的悪性度を反映している可能性を示している。

MET、RON に対する dual inhibitor は既に開発されており、*in vitro*、*in vivo* での研究が行われている。しかしながら臨床試験としては、MET、RON を含むレセプターをターゲットにしている multi-kinase inhibitor の経口投与が乳頭型腎細胞癌と切除不能な固形癌に対して行われているのみである。今回の研究結果を鑑みれば、MET、RON に対する dual inhibitor は、治癒切除後にもかかわらず予後が不良である症例において、有効な治療となり得ると考えられる。

本研究の問題点としては、母集団が 169 症例と少ないことが挙げられる。また UICC stage I、II 症例においては MET・RON 陽性群の臨床的特徴を明らかにすることが出来なかった。これは stage I、II 症例の母集団が 55 症例と少数であった事と、治癒切除後の予後が 5 年生存率 > 80%と良好な事に起因すると考えている。それ故、MET・RON 陽性群が stage I、II 症例でも予後が悪いと判断するには、さらに大きな母集団での検討が必要である。また MET・RON 陽性群が何故予後不良となるのかという機序は不明である。MET・RON 陽性患者の再発形式は、局所再発、肝転移再発、腹膜播種再発、リンパ節再発と多岐にわたり (data not shown)、生物学的特徴は明らかとならなかった。また、MET、RON に関連したシグナル伝達が、胆管癌においてそれぞれ HGF、HLP により強く惹起されているのか否かは明らかにされていない。この点を解明するためには、さらなる臨床データの集積と PHC における MET、RON 受容体の作用についての解明が必要である。

【結語】

本研究から、進行 PHC において、MET・RON 陽性群は予後不良であるということが明らかとなった。また、MET・RON 陽性群か否かが、既存の病理学的分類から独立した悪性度分類の指標となり得る事が示唆された。また予後不良な進行 PHC に対しては MET・RON に対する dual inhibitor が、高い治療効果を示す事が期待される。