

学 位 論 文 の 要 旨

| | | | |
|--|-----|-----|-------|
| 学位の種類 | 博 士 | 氏 名 | 宮本 正之 |
| <p>学 位 論 文 題 目</p> <p>Prognostic significance of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma (胆管癌におけるc-Met過剰発現の予後への重要性)</p> <p>共 著 者 名</p> <p>尾島英知、岩崎基、清水祐子、国分明子、平岡伸介、小菅智男、 吉川大太郎、河野透、古川博之、柴田龍弘</p> <p>British Journal of Cancer 105巻131頁～138頁 平成23年</p> <p>1. 研究目的</p> <p>胆管癌は、胆管上皮細胞より生じる悪性度の高い浸潤癌である。発生早期は臨床症状に乏しく、多くの患者が切除不能の状態となる。切除が唯一の根治治療であるが、再発率は高く、現在、再発・切除不能胆管癌に対して、明らかに生存率を改善する化学療法は存在しない。</p> <p>近年、EGFR、VEGF、c-MetなどのReceptor tyrosine kinase (RTK)が胆管癌の治療に有望な標的分子であるとされており、我々もこれまで、EGFRとVEGFが胆管癌の標的治療に有望であることを報告してきた。c-Metは肝細胞成長因子(Hepatocyte growth factor; HGF)のレセプターで、複数の細胞内シグナルを活性化させ、胆管癌を含む様々な悪性腫瘍でその発現が認められており、胆管癌の治療の標的となる可能性があるが、胆管癌におけるc-Metの発現と予後との関係についてはこれまで示されていない。</p> <p>本論文の目的は、第一に胆管癌でのc-Met過剰発現の頻度を明らかにすることであり、第二に、c-Metと、胆管癌の切除例247例（肝内胆管癌(Intrahepatic cholangiocarcinoma; IHCC)111例、肝外胆管癌(Extrahepatic cholangiocarcinoma; EHCC) 136例)の臨床病理学</p> | | | |

的因子に既報の分子発現データ (EGFR, HER2, VEGF) を加えて、胆管癌患者の予後因子を明らかにすることである。さらに、胆管癌細胞株でのc-MetとEGFR発現についても検討した。

2. 患者・方法

2.1. 対象症例

対象症例は、1990年から2005年に国立がんセンター中央病院で手術を受け、胆管癌と診断された247症例である。内訳は男性168例、女性79例で、年齢は33才から82才（中央値65才）、観察期間は1.4から204.5月（中央値29.8月）である。症例をTNM分類第7版に則ってIHCC111例とEHCC136例の2グループに分けた。

2.2. 免疫組織染色

c-Metの免疫染色は、Envision™ + Dual link-system-HRPを用いた。抗体はanti-c-Met primary antibodyを用いた。c-Metの染色性の評価は、以下のように定義した。0は細胞膜の染色が癌細胞の30%以下、1+は弱く部分的な染色が癌細胞の30%以上、2+は強く完全な染色が癌細胞の30%以上のもの。これらを統計処理のため2つのグループに分類した (c-Met^{low} (0 or 1+) または c-Met^{high} (2+))。

2.3. 細胞株

国立がん研究センターにおいて樹立した人由来のIHCC株であるNCC-CC1、NCC-CC3-1、NCC-CC3-2、NCC-CC4、人由来のEHCC株であるNCC-BD1、NCC-BD2を用いた。さらに、IHCC株としてTKKK、HuCCT1、OZを、EHCC株としてTGBC24TKBを、陽性コントロールとしての胃癌株MKN45をRIKEN Bio Resource CenterおよびJapanese Collection of Research Bioresourcesより購入し使用した。

2.4. ウェスタンブロット

Complete protease inhibitor cocktailと、Phosphate inhibitor cocktailを用いて蛋白を抽出し、SDS-PAGEを用いて泳動し、Polyvinylidene difluoride membranesに転写した。ブロッキング後にanti-c-Met、anti-phospho-Met、anti-EGFR、anti-phospho EGFR と反応させた。可視化はECL Western Blotting Detection Reagents を用いた。Anti-β-actinをコントロールに用いた。

2.5. 統計

統計はStatview 5.0 statistical software packageを用いて行った。

3. 結果

3.1. 胆管癌標本におけるc-Metの免疫組織学的解析

c-Met染色は細胞膜と、細胞質に認められた。c-Metの陽性例は全体247例中の143例(57.9%)、IHCC111例中の50例(45.0%)、EHCC136例中の93例(68.4%)であった。c-Met高発現(2+; c-Met^{high})は胆管癌全体で35例(14.2%)、IHCCで13例(11.7%)、EHCCで22例(16.2%)であった。しばしばc-MetとEGFRの共発現が観察された。

3.2. 胆管癌細胞株でのc-MetとEGFRの発現

次に、細胞株でc-Met、リン酸化c-Met、EGFR、リン酸化EGFRの発現をウェスタンブロット法を用いて測定した。11のうち9つの胆管癌細胞株でc-Metの発現が観察された。c-MetとEGFRの共発現はNCC-CC-3-1を除く8つの細胞株で認められた。5つの細胞株(HuCCT1, OZ, NCC-BD2, TGBC24TKB, NCC-BD1)において、顕著なc-Metのリン酸化が認められ、これら5つを含む7つの細胞株においてc-MetとEGFRの活性化が認められた。

3.3. c-Metと臨床病理学的因子の関連性について

c-Metの過剰発現は、IHCCにおいてEGFRの過剰発現と有意に相関し(P=0.0063)、EHCCにおいて腫瘍の組織学的分化度(P=0.0239)とEGFRの過剰発現(P=0.0056)に有意に相関した。5年生存率は、c-Met^{high}群とc-Met^{low}群で、それぞれIHCCでは15.4%と41.1%(p=0.0013)と有意にc-Met^{high}群の予後が不良であり、EHCCでは40.9%と45.8%(P=0.1396)で有意差はなかった。

多変量解析の結果、IHCCでは、全生存期間で、予後不良因子はc-Met過剰発現(Hazard Ratio(HR):3.92)、肉眼型(HR:4.57)、肝内転移(HR:3.27)、リンパ節転移(HR:1.99)であった。無再発生存では、c-Met過剰発現(HR:3.50)、肉眼型(HR:4.78)、肝内転移(HR:2.78)、リンパ節転移(HR:2.94)、静脈浸潤(HR:4.62)、EGFR過剰発現(HR:1.98)であった。

EHCCで、c-Met過剰発現群は全生存期間で予後不良な傾向があったが、有意差はなく、多変量解析は施行しなかった。

4. 考案

本研究で、我々は胆管癌においてc-Met発現がEGFR過剰発現と相関すること、ならびにIHCCにおいてc-Met発現が予後因子となることを示した。

これまでの報告でc-Metの発現の頻度はIHCCで21~58%、EHCCで0~80%とされているが、c-Metと胆管癌の予後の関連性は示されておらず、画期的な知見と考えられる。

c-MetとEGFRの同時発現は、いくつかの臨床検体で観察されている。また、Met遺伝子の増幅

がEGFRファミリーを活性化させ、EGFR遺伝子の変異または増幅がc-Metを活性化させるというように、複数の細胞株で、EGFRとc-Metの間の双方向または一方向性の相互作用が認められており、c-MetとEGFRの間にはクロストークがあると考えられる。

c-Metの活性化は、EGFRを標的とした治療で耐性が生じる分子機構の一つと考えられており、c-Metのような代替のRTKの活性化が、EGFR経路をバイパスすることによる。c-Metの単独阻害またはEGFRとの同時阻害を行うことが、EGFR阻害剤への耐性が生じた際に、臨床で有用となる可能性がある。

5. 結論

c-Metの過剰発現は、胆管癌全体のEGFR過剰発現に相関し、肝内胆管癌の予後を悪化させることを明らかにした。今後、胆管癌治療として、c-Met阻害薬の開発が期待される。

引用文献

Clinicopathological and prognostic significance of EGFR, VEGF, and HER2 expression in cholangiocarcinoma. Yoshikawa D, Ojima H, Iwasaki M, Hiraoka N, Kosuge T, Kasai S, Hirohashi S, Shibata T. *Br J Cancer* 98:418-425 (2008)

Novel therapeutic inhibitors of the c-Met signaling pathway in cancer. Eder JP, Vande WGF, Boerner SA, LoRusso PM. *Clin Cancer Res* 15:2207-2214 (2009)




Signaling networks assembled by oncogenic EGFR and c-Met. Guo A, Villen J, Kornhauser J, Lee KA, Stokes MP, Rikova K, Possemato A, Nardone J, Innocenti G, Wetzel R, Wang Y, MacNeill J, Mitchell J, Gygi SP, Rush J, Polakiewicz RD, Comb MJ *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:692-697 (2008)

参考文献

腸閉塞を呈した小腸血管腫の1例. 宮本 正之, 山本 康弘, 鈴木 和香子, 岡村 幹郎, 河野 透, 古川 博之 日本臨床外科学会雑誌 第73巻7号1705~1709頁 平成24年

特発性血小板減少性紫斑病を伴った潰瘍性大腸炎の1例. 宮本 正之, 河野 透, 大沼 淳, 海老沢 良昭, 間宮 規章, 葛西 眞一日本臨床外科学会雑誌 第67巻8号1824~1827頁 平成18年

学位論文の審査結果の要旨

| | | | |
|--|--------|----|-------|
| 報告番号 | 第 号 | | |
| 学位の種類 | 博士(医学) | 氏名 | 宮本 正之 |
| <p>審査委員長 西川 祐司 </p> <p>審査委員 高後 裕 </p> <p>審査委員 谷口 隆信 </p> | | | |
| <p>学位論文題目</p> <p>Prognostic significanc of overexpression of c-Met oncoprotein in cholangiocarcinoma (胆道癌における c-Met 過剰発現の予後への重要性)</p> | | | |
| <p>胆管癌は肝内胆管癌と肝外胆管癌に大きく分類されているが、いずれも悪性度が高く、発見されても手術不能である症例が多い。また、手術不能例に対して化学療法が行われているが、生存率を改善する有効な薬剤は見出されていない。したがって、胆管癌の予後因子や治療ターゲットの探索は大きな臨床的課題であり、多数の研究者がこれらに取り組んでいる。</p> <p>本研究は、多くの腫瘍の増殖や浸潤に重要な役割を持っているとされる、hepatocyte growth factor (HGF)の受容体 c-Met の発現を多数の胆管癌症例において検討したものである。申請者は、国立がん研究センター中央病院において手術を受け、胆管癌とされた247症例(肝内胆管癌111例, 肝外胆管癌136例)を用い、腫瘍におけるc-Metの発現を免疫組織化学で調べ、発現の程度を0, 1+, 2+に分類し、0, 1+を軽度発現, 2+を高度発現として統計処理に使用している。c-Metの発現レベルを様々な臨床病理学的因子やEGFR, HER2, VEGFなどの既知の分子発現データと関連付けながら、胆管癌患</p> | | | |

者の予後因子を詳細に調べた。

その結果、c-Met 高度発現を示す腫瘍は胆管癌の 14.2%（肝内胆管癌 11.7%，肝外胆管癌 16.2%）であり、c-Met の過剰発現は、肝内胆管癌と肝外胆管癌のいずれにおいても EGFR の過剰発現と有意に相関した。また、肝外胆管癌では腫瘍の組織学的分化度と有意に相関した。さらに、肝内胆管癌症例では、c-Met が過剰に発現している場合、5 年生存率が有意に低いことが明らかになった。

申請者らは、ヒト胆管癌細胞株 11 例を用い、c-Met と EGFR の発現およびリン酸化の検討も行っており、多くの細胞株において両者の同時活性化が起こることを観察した。上記の臨床病理学検討と併せ、胆管癌の治療において c-Met と EGFR の両方を抑制することが重要であることが示唆された。

申請者に対して、各審査委員から論文内容、関連領域について試問がなされ、これらに対して適切な回答が寄せられた。

本審査委員会では慎重な意見交換を行い、本論文は申請者自身の努力の結果であり、これまで不明であった胆管癌の予後因子の一端を解明し、今後の治療に有益な示唆を与えた点で、学術的にも十分に貢献したことを認め、学位を授与する価値があると結論した。