

胃癌の HER2 診断

**Oliver Stoss, PhD, Martina Schmitt, PhD,
Dirk Zielinski, PhD, Thomas Henkel, PhD**

Targos Molecular Pathology
Germaniastrasse 7
D-34119 Kassel, Germany

**Iris Nagelmeier, MD
Josef Rüschoff, MD**

Pathologie Nordhessen
Germaniastrasse 7
D-34119 Kassel, Germany

HER2 受容体に対するヒト化モノクローナル抗体であるトラスツズマブ (Herceptin® ; Genentech/Roche) が進行胃癌に対する初の分子標的薬として 2010 年 2 月に承認されて以来、胃癌の HER2 発現状態を調べるのが重要な課題となっている。ToGA 試験のデータから、このような抗 HER2 治療の恩恵を受けるのは HER2 タンパク過剰発現の患者であることが示された (1)。胃癌のラパチニブ治療について現在進行中の第 III 相臨床試験 (LOGiC 試験) でも、HER2 検査に基づいて患者の層別化が行われている。

胃癌における HER2 受容体の役割

ヒト上皮増殖因子受容体 (EGFR) ファミリーには ErbB 1~4* の 4 種類の受容体があり、いずれもリガンドが結合するとホモ二量体またはヘテロ二量体を形成して活性化する。今のところ ErbB2 (HER2) に結合するリガンドは同定されていないが、HER2 は特殊な立体構造変化によって恒常的な活性化を起こすことが乳癌の生物学的研究から示されており、非常に重要視されている。過剰発現した HER2 は他の EGFR ファミリーの結合パートナーとなることが多く (2, 3)、シグナル伝達を介して乳癌の細胞増殖、アポトーシス、転移、血管新生に影響を及ぼす。胃癌における HER2 介在性の分子経路については乳癌と比べてまだ知見が少ないが、最近の報告から、胃癌でも HER2 が同様の役割を担うことが示唆されている (図 1)。HER2 が胃癌の予後因子となる可能性を示すエビデンスがあり、乳癌と同様、HER2 過剰発現は全生存期間短縮と相関することが報告されている (4~7)。

EGFR ファミリー各メンバーとそのリガンドの胃腸管における発現の傾向を系統的に検索する研究はまだ行われていない。ToGA 試験では、HER2 の遺伝子増幅や細胞膜上の過剰発現は乳癌と同程度の 22.1% であった。しかしこれまでの文献においては、HER2 陽性率は IHC 法で 6.8%~34.0%、FISH 法で 7.1%~42.6% と、報告による差が大きい (8)。これには研究ごとの判定基準の違いだけでなく、胃癌特有の要因がいくつか関与していると考えられる。

第一に、発現パターンを見ると、HER2 陽性の胃癌と乳癌では発生の生物学的背景が異なるようである。胃癌では HER2 発現細胞の分布が乳癌より不均一で、このことから発癌過程における HER2 の役割に違いがあることが示唆される (9)。

* ErbB-1 = 上皮増殖因子受容体 (EGFR) ; ErbB-2 = ヒトでは HER2、げっ歯類では neu ; ErbB-3 = HER3 ; ErbB-4 = HER4 (Wikipedia より)
HER2 は遺伝子である (HER2/neu と呼ばれる)

「胃癌の組織学的な多様性を考えると、CISH など明視野で評価可能な *in situ* ハイブリダイゼーション法は FISH に代わりうる有力な検査法といえる」

第二に、HER2 の過剰発現や増幅は圧倒的に intestinal type の胃癌に多く見られ、diffuse type の胃癌検体では少ない (1, 4)。そして第三に、HER2 の過剰発現率や増幅率は腫瘍の部位によっても異なる。HER2 発現率は胃よりも胃食道接合部の癌に多く、食道癌ではさらに高い可能性がある (1)。

HER2 過剰発現が発癌に及ぼす影響は二量体を形成する結合パートナーにも依存する。そこで次に、胃癌における他の EGFR ファミリーの役割について現在わかっていることを簡略して述べる。

EGFR 発現は胃癌症例の最大 63% で認められ、そのうち 15% が HER2 との共発現であり、EGFR の過剰発現は胃癌の予後不良と関連している (10)。形質転換増殖因子 TGF- α は胃腸管における主要な EGFR リガンドと考えられている (11)。TGF- α は胃の酸性度を抑え、胃上皮細胞の増殖と胃粘膜の産生を促進する。EGFR の発現増加は食道の扁平上皮細胞癌で見られることが多く、予後不良と関連している (12, 13)。また、食道腺癌の 11.7%、パレット食道の 14.2% で EGFR の変異が見出されている (14)。

ErbB2/ErbB3 ヘテロ二量体は乳癌の進展において中心的な役割を果たすことが報告されている。近年の Zhang らの報告によれば、胃癌に HER2 と HER3 の共発現は観察されず、diffuse type の胃癌の 26.2% で発現の大部分を HER3 が占めていた (15)。したがって、胃癌では乳癌と比較して HER2/HER3 二量体の担う役割が小さい可能性がある。胃癌の HER3 については報告にデータの食い違いがあるため、さらなる研究が必要である (16)。脱分化が進んだ胃癌では、HER3 が進展に関与している

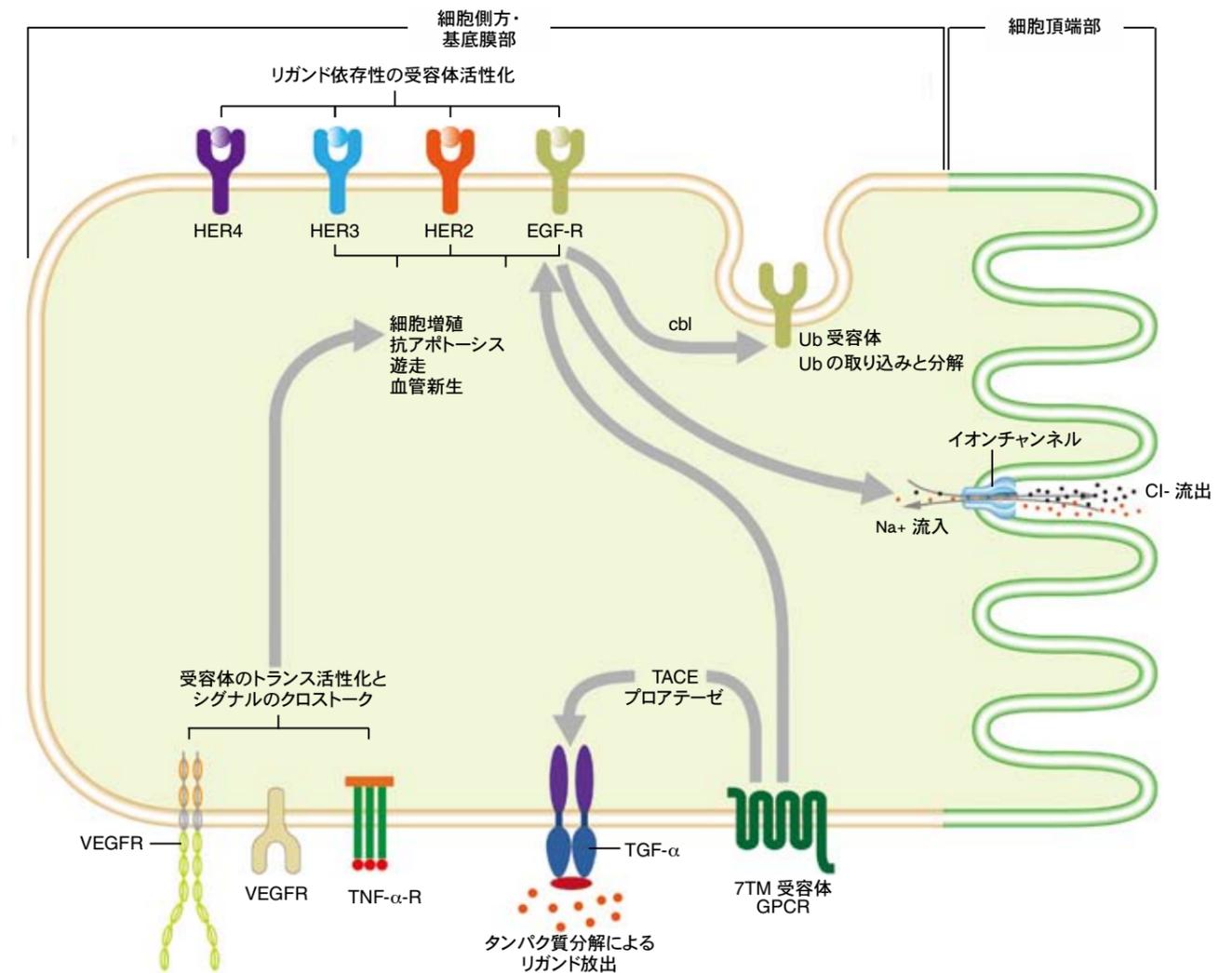


図 1. EGFR ファミリーに関連するシグナルイベント。EGFR については多数の相互作用が報告されているが、HER2 はヘテロ二量体形成のパートナーとなることが多く、下流のシグナル伝達の活性化に重要な役割を果たす。恒常的な活性化をきたした HER2 は、それ自身がリガンド依存性のホモ二量体形成を介してこれらのシグナル経路を活性化する。EGFR が HER2 を介してリガンド依存性またはリガンド非依存性に活性化されると、細胞増殖、抗アポトーシス経路の活性化、細胞遊走や血管新生の促進につながる。これらのプロセスには、VEGFR、IGFR、TNF- α -R などさまざまな受容体型チロシンキナーゼのシグナルクロストークも関与する。G タンパク質共役受容体は EGFR をトランス活性化するとともに、EGFR リガンドの放出も誘導する。EGFR の細胞内シグナル伝達を制御しているのはユビキチン介在性の受容体細胞内取り込みと分解である。EGFR の活性化はイオンの流出入にも影響を与え、これによって胃内環境を維持している。各種の増殖因子受容体は胃癌細胞の側方・基底膜部にのみ存在する。

<略語>

EGFR : 上皮増殖因子受容体 ; HER : ヒト上皮増殖因子受容体 ; cbl : E3 ユビキチンリガーゼ ; Ub : ユビキチン ; VEGFR : 血管内皮増殖因子受容体 ; IGFR : インスリン様増殖因子受容体 ; TNF- α -R : 腫瘍壊死因子 α 受容体 ; TGF- α : 形質転換増殖因子 α ; TACE : 腫瘍壊死因子 α 変換酵素 ; 7TM 受容体 : 7 回膜貫通型受容体 ; GPCR : G タンパク質共役受容体

可能性がある(17)。

ErbB4/HER4に関する知見は現在のところ非常に少ない。HER2と異なり、ErbB4の免疫組織染色において印環細胞癌で特に強染色になったとの報告がある(18)。

ここではErbB受容体を中心に述べたが、GPCR、VEGF、TNF- α 、IGFRとの間に強いクロストークがあることも忘れてはならない(19)。また、胃癌細胞には細胞表面の重要なシグナル伝達イベントである、タンパク分解酵素の切断によるErbB受容体リガンドの放出制御も存在する(20)。

HER2 検査： 免疫組織化学染色と *in situ* ハイブリダイゼーション

現在、胃癌のHER2発現状態を調べることは、病理医が年間約30,000～50,000ユーロにもなる高額医療実施の可否を判断することを意味する(21)。また、トラスツズマブなどの分子標的薬にも副作用があることから、投与においてはHER2陽性患者の選択のみならず、HER2陰性患者を適切に除外することも倫理上重要である。組織切片からHER2発現状態を評価する方法としては、蛍光*in situ*ハイブリダイゼーション(FISH)、銀*in situ*ハイブリダイゼーション(SISH)、発色*in situ*ハイブリダイゼーション(CISH)、免疫組織化学染色(IHC)、RT-PCR法などがある。血清サンプルでELISAを行ってHER2の細胞外領域(ECD)を測定する方法もある。このうちルーチン検査で最も多く用いられているのがFISH法とIHC法である。IHC法の利点は試薬や装置のコストが低いことだが、乳癌の検査結果で一貫性がないとの指摘があり、検査精度について疑問の声もある。IHC法によるHER2検査はさまざまな外部要因の影響を受けるため(表1)、乳癌での検査法を標準化する取り組みが続けられている(22)。2000年代初期では約27%であった検査施設間の不一致率が現在では約14%に改善している(23)。一般的に、IHC法の検査結果は使用試薬の品質管理やコントロールスライドを使用することで管理可能であり、染色手順が適切に実施されたかどうかを確認できる。しかし、検体の状態に起因する問題を特定可能な内部コントロールを検体組織中で得ることは困難な場合が多い。IHC法の検査結果に影響する主な要因14項目のうち、8項目までは、有効性が確認されている市販のHER2検査キットを使うことで標準化できる(表1の項目5～12)。しかしながら市販のキットの使用によっても検査結果に違いがあり、境界域でのスコア判定では特に注意を要する。乳癌ではIHC法によるHER2検査の標準化のために多数の品質管理プログラム

が実施されている。胃癌では判定方法がより複雑で、染色パターンも乳癌より不均一であるため、判定を行う病理医のトレーニングがさらに重要になると思われる。

HER2検査法としては、HER2 IHC法の標準化において指摘されている問題点により、FISH法をHER2標準検査法として導入を希望する施設もある。我々の経験においても、異なるHER2 FISHキット製品の使用が検査実施施設間の不一致の主な原因ではなかった。しかし高コストであることや特殊な装置を必要とすることなど一般的に指摘されているFISH法の問題点以外に、検体中の評価対象領域の選択が主観的であり、判定者間の不一致の原因となる恐れがあることを留意する必要がある。その他にも、FISH法は固定液や固定時間の影響を受けやすいため、検体の状態に起因する検出不能率が高いといったことも報告されている。さらに、スライド上の蛍光シグナルは時間の経過とともに減衰するため、FISH法の結果報告にも障害がある。スライド全体をスキャンしデジタル画像として保存することも技術的には可能ではあるが、時間とコストの観点から見て、まだ現実的ではない。FISH法に影響する主な外部要因を表2にまとめた。

IHC法によるHER2検査結果に影響する主な外部要因	
1.	固定液
2.	固定時間
3.	組織切片の厚さ
4.	切片作製から染色までの時間
5.	抗原賦活方法
6.	抗体の種類
7.	抗体の希釈倍率
8.	反応温度
9.	反応時間
10.	抗体検出システム
11.	自動染色装置の使用
12.	結果判定方法
13.	病理医のトレーニング
14.	HER2 IHC解析ソフトウェアの使用

表1. IHC法によるHER2検査結果に影響する主な外部要因

胃癌のHER2検査におけるIHC法とFISH法の意義についてはまだ十分に確立されていない。ToGA試験では両者の判定結果に有意な相関が認められたが、乳癌と比較すると相関が低い傾向があった。IHC法でスコア0または1+と判定されたケースのうち7.5%がFISH陽性となり、HER2遺伝子増幅はHER2受容体が過剰発現する主要な機序ではあるものの、胃癌ではHER2発現の制御に他の機序も関与していることが示唆された。IHC陽性でFISH陰性となるケースは非常に少数であるため、トラスツズマブ治療の効果予測としてどちらの検査法が優れているかを判断するのは、現時点では難しい。

HER2検査はまだ始まったばかりであり、胃癌の判定に関して最適と判断できる検査方法は今のところないが、胃癌では、数個のHER2遺伝子増幅細胞が分散しているケースが非常に多く、またHER2遺伝子増幅が不均一な大きな組織切片では、遺伝子増幅のある小病巣を見逃す恐れがあるため、FISH法によるHER2状態の判定が乳癌より困難になると予想される。さらに、現在市販されているFISHプローブではマクロファージで非特異的なシグナルが検出されるようである。もう一つ指摘されている点として、組織領域の選択が主観的に行われるため、不均一な遺伝子増幅パターンのケースでは判定者間のばらつきが乳癌より高くなる可能性がある。一方、IHC法には、胃粘膜の腸上皮化生の非特異染色や、陽性腫瘍細胞の染色強度と分布の不均一性という課題がある。IHC法とFISH法との結果の不一致の原因のひとつとして判定基準の問題もある。FISH法ではシグナルを計測する腫瘍細胞を20個と規定しているのに対し、IHC法では10%(数千個に相当)以上の腫瘍細胞が判定に必要である。胃

FISH法によるHER2検査結果に影響する主な外部要因	
1.	固定液
2.	固定時間
3.	組織切片の厚さ
4.	プローブのハイブリダイゼーションから解析までの時間(シグナル消失のため)
5.	結果判定方法(計測する細胞数を含む)
6.	病理医のトレーニング/計測専任担当者の採用
7.	HER2 FISH解析ソフトウェアの使用

表2. FISH法によるHER2検査結果に影響する主な外部要因

癌では局所的なHER2発現が乳癌より多いため、この判定基準の定義の違いが判定結果の差異に影響することが予想される。

胃癌の組織学的な多様性を考えると、CISH法など明視野で評価可能な*in situ*ハイブリダイゼーション法はFISH法に代わりうる有力な検査法といえる。乳癌ではCISHなどの方法でFISH法と同等の検査結果が得られることが示されており、胃癌でも同様の比較試験が必要である。

胃癌のHER2検査ガイドライン

IHC法とFISH法による胃癌のHER2検査のガイドラインは、乳癌で立証されたDako HercepTest™とFISH法の判定基準をベースに作成された。乳癌のHER2検査にはカットオフ値が存在し、IHC法で細胞膜が染色された腫瘍細胞がこのカットオフ値より少なければスコア0と判定される。ToGA試験では、IHC法による乳癌HER2検査の標準カットオフ値が試験開始当時10%だったことから、胃癌の手術材料にも同じ値が適用された。ところが2005年に始まった別の胃癌のバリデーション試験において、胃癌でのHER2の染色が不均一になることから判定基準の変更が必要であることが示された。病理医による国際的な検討会が持たれ、生検材料については10%のカットオフ値を適用しないというコンセンサスに達した(8, 24)。胃癌では同一検体内にIHC法で陰性となる領域と陽性となる領域とが隣接し存在することがあるため、乳癌よりも、生検での検体採取部位により判定結果に差異が生じやすいと考えられる。

胃癌のHER2 IHC判定方法の変更が必要となった別の理由として、胃腺癌細胞に特有の組織形態学的特徴もある。胃癌のHER2受容体は主に細胞の側方・基底膜側に発現するため、必ずしも細胞膜全体が染色されるわけではない。仮に細胞頂端膜側にHER2受容体が存在するとしても、その病態生理学的な意義ははっきりしていない。以上より、細胞膜の側方・基底膜側だけが染色されている場合もHER2の細胞膜染色と定義される。

HER2遺伝子増幅の定義としてのFISHのカットオフ値(HER2/CEP17のシグナル総数比)は、2005年の乳癌での基準と同じ ≥ 2.0 に設定された(細胞20個で評価する)。HER2:CEP17比が1.8～2.2の場合は細胞40個による再判定が推奨されている。

ToGA試験のデータを受けて、欧州医薬品庁(EMA)ではHER2評価手順としてまずIHC法を行うアルゴリズムを採用した。

「IHC 法と FISH 法による胃癌の HER2 検査のガイドラインは、Dako HercepTest™……をベースに作成された」

IHC 法でスコアが 0 または 1+ になった場合は、トラスツズマブ治療を行わない。スコア 3+ の場合はトラスツズマブ治療の適応候補となる。スコア 2+ の場合は判定境界域として ISH 法による評価が推奨される。

品質保証

IHC 法による胃癌 HER2 検査の品質保証プログラムが開始された。現在、HER2 の染色パフォーマンスと評価は Quality Initiative in Pathology (QuIP) 試験の検討対象となっている。各種のトレーニングプログラムも今後実施される予定である。各国の病理学関連団体が胃癌 HER2 評価のトレーニングコースを設けており、民間業者が主催する国際的なトレーニングコースもある (25)。

品質保証に関する研究としては、胃癌 HER2 検査の問題点を特定する目的で最近行われたフランスとドイツの Ring Study がある (26)。また、乳癌における HER2 検査の標準化および品質管理の取り組みは胃癌にも適用可能である (22)。さらに検査結果の妥当性を確認することにより誤判定を低減することが可能である。例えば、diffuse type の胃癌が HER2 陽性になる可能性は低く、陽性となった場合、再チェックを行うことが推奨される。

Q&A

以下、胃癌の HER2 検査に関する Q&A をまとめた。

HER2 陽性の小病巣が散見される症例でも、腫瘍中の HER2 陽性細胞率が高い症例と同じように HER2 標的治療による効果が期待できるでしょうか。

現在のところ、この質問に答えられるだけのデータはありません。

腫瘍の染色が均一でない症例も、染色が均一な症例と同じように HER2 標的治療による効果が期待できるでしょうか。

HER2 陽性細胞がまばらに存在する腫瘍と均一な染色を示す腫瘍とで、生物学的背景に違いがある可能性は十分考えられます。

が、治療レベルではどうなのかという結論は出ていません。

IHC 陽性で FISH 陰性の症例では、HER2 標的治療による効果が期待できるでしょうか。

この判定結果の組合せは症例数が少ないため、恐らくあと 2 ～ 3 年は答えが出ないだろうと考えます。

FISH 陽性で IHC 陰性の症例では、HER2 標的治療による効果が期待できるでしょうか。

ToGA 試験のデータでは、これらの患者群は FISH 陽性で IHC 陽性の患者群と比較してトラスツズマブに対する反応性が低いことが示唆されています。ただし症例数はまだわずかです。

FISH 法で陽性と陰性を判別するカットオフ値は適切なのですか。 現在のところ、HER2:CEP17 比のカットオフ値は乳癌が 2.2 であるのに対して胃癌では 2.0 とされています。胃癌のカットオフ値を上げることが検査の効果予測力を向上させるかどうかは、今後の検証を待つ必要があります。

胃癌に対する IHC 法のカットオフ値は現行で染色細胞 10% とされていますが、これで正しいのですか。

乳癌については、カットオフ値が 10% から 30% に引き上げられました (22)。胃癌と乳癌では染色パターンが異なるため、同じカットオフ値を適用できるかどうかという結論は出ていません。

原発巣と転移巣の検体で HER2 発現はどのように異なりますか。 各臨床試験の特質によって異なる可能性はあるものの (転移性乳癌、術後補助療法または術前補助療法の乳癌など)、乳癌の経験から、原発巣と転移巣で HER2 発現状態が非常によく一致することが知られています。ただ、我々の知る限り、胃癌に関するデータは現在のところありません。

生検材料と手術材料で HER2 検査結果はどの程度相関しますか。 胃癌では HER2 発現が不均一なため、生検材料と手術材料の検査結果不一致率が乳癌より高い可能性は考えられます。生検材料と手術材料とでは必要な固定時間も異なるので、これも検査結果に影響する可能性があります。この点を検討する研究も現在進行中です。

胃癌のポリソミーについてはどうですか。

細胞 1 個当たりの 17 番染色体セントロメアシグナルが 2 つより多い場合をポリソミーといい、FISH 法が偽陰性となる主因のひとつです。胃癌でポリソミーが大きな役割を担うとすれば、ポリ

ソミーの症例が HER2 標的療法に反応するかを確認することが重要になるかもしれません。

結論

胃癌の HER2 検査は、IHC 法と FISH 法の標準化が今後の課題となる。乳癌の HER2 検査に精通した病理医は世界各国に多数存在するが、胃癌ではまだ少数であるため、乳癌用の判定基準を誤って胃癌にも適用し、陽性例を見落としてしまう危険性がある (27)。

技術的には、乳癌で蓄積された経験が胃癌 HER2 検査の方法やガイドラインの確立に役立つと思われる。胃癌では FISH 法の評価がより複雑になるため、今後、明視野による ISH 法が FISH 法に取って代わる可能性は十分考えられる。HER2 の状態を組織学的観察と遺伝子増幅という 2 つの観点から同時に評価できることの価値は大きい。加えて、明視野 ISH 法では、検体スライドを常温で長期保存することや、鏡検像をより簡便な機器で速やかにデジタル化することも可能になるとと思われる。

参考文献

1. Van Cutsem, et al. Efficacy results from the ToGA trial: A phase III study of trastuzumab added to standard chemotherapy (CT) in first-line human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive advanced gastric cancer (GC). 2010; ASCO Abstract LBA4509.
2. Graus-Porta, et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. *EMBO J* 1997; 16:1647-1655.
3. Waterman, et al. A hierarchical network of interreceptor interactions determines signal transduction by Neu differentiation factor/neuregulin and epidermal growth factor. *Mol Cell Biol* 1996; 16:5276-5287.
4. Tanner, et al. Amplification of HER2 in gastric carcinoma: association with topoisomerase II alpha gene amplification, intestinal type, poor prognosis and sensitivity to trastuzumab. *Ann Oncol* 2005; 16:273-278.
5. Nakajima, et al. The prognostic significance of amplification and over-expression of c-met and c-erb B-2 in human gastric carcinomas. *Cancer* 1999; 85:1894-1902.
6. Park, et al. HER2(neu amplification is an independent prognostic factor in gastric cancer. *Dig Dis Sci* 2006; 51:1371-1379.
7. Yonemura, et al. Expression of c-erbB-2 protein is an independent indicator of poor short-term prognosis in patients with gastric carcinoma. *Cancer* 1991; 67:2914-2918.
8. Hofmann, et al. Assessment of a HER2 scoring system for gastric cancer: results from a validation study. *Histopathology* 2008; 52:797-805.
9. HER2 amplification is highly homogenous in gastric cancer. *Hum Pathol* 2010; 41:304-305; author reply 305-306.
10. Tokunaga, et al. Clinical significance of epidermal growth factor (EGF), EGF receptor, and c-erbB-2 in human gastric cancer. *Cancer* 1995; 75:1418-1425.
11. Cartlidge, et al. Transforming growth factor alpha and epidermal growth factor levels in normal human gastrointestinal mucosa. *Br J Cancer* 1989; 60:657-660.
12. Gibault, et al. Diffuse EGFR staining is associated with reduced overall survival in locally advanced oesophageal squamous cell cancer. *Br J Cancer* 2005; 93:107-115.
13. Yano, et al. Immunohistologic detection of the epidermal growth factor receptor in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* 1991; 67:91-98.
14. Kwak, et al. Epidermal growth factor receptor kinase domain mutations in esophageal and pancreatic adenocarcinomas. *Clin Cancer Res* 2006; 12:4283-4287.
15. Zhang, et al. Comparative Study on Over-expression of HER2/neu and HER3 in Gastric Cancer. *World J Surg* 2009; 33:2112-2118.
16. Sanidas, et al. Expression of the c-erbB-3 gene product in gastric cancer. *Int J Cancer* 1993; 54:935-940.
17. Kobayashi, et al. Activation of ErbB3-P13-kinase pathway is correlated with malignant phenotypes of adenocarcinomas. *Oncogene* 2003; 22:1294-1301.
18. Kataoka, et al. Expression of mRNA for heregulin and its receptor, ErbB-3 and ErbB4, in human upper gastrointestinal mucosa. *Life Sci* 1998; 63:553-564.
19. Rodland, et al. Multiple mechanisms are responsible for transactivation of the epidermal growth factor receptor in mammary epithelial cells. *J Biol Chem* 2008; 283:31477-31487.
20. Shida, et al. Lysophospholipids transactivate HER2/neu (erbB-2) in human gastric cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2005; 327:907-914.
21. Neyt, et al. An economic evaluation of Herceptin® in adjuvant setting: The Breast Cancer International Research Group 006 trial. *Ann Oncol* 2006; 17:381-390.
22. Wolff, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007; 25:118-145.
23. Roche, et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. *J Natl Cancer Inst* 2002; 94:855-857.
24. Rüschoff, et al. HER2 testing in castric cancer: What is different in comparison to breast cancer? *Pathologe* 2010; 31:208-217.
25. International HER2 training courses: www.targos-gmbh.com.
26. Rüschoff, et al. HER2 Testing in Gastric Cancer: Guideline Validation and Development. *Virchows Archiv*; submitted.
27. Barros-Silva, et al. Association of ERBB2 gene status with histopathological parameters and disease-specific survival in gastric carcinoma patients. *Br J Cancer* 2009; 100:487-493.