

論文の内容の要旨

論文題目 分子標的薬による大腸癌治療効果に関する臨床病理学的
および分子生物学的検討

東京大学大学院医学系研究科

平成 17 年 4 月入学

医学博士課程

内科学専攻

消化器内科

指導教員 小池 和彦 教授

吉田 俊太郎

背景・目的

生活習慣を含めた様々な要因によると思われる、世界的な大腸癌患者の増加が報告されている。本邦でも、男性の癌死因の第 3 位、女性では第 1 位と最も重要な癌となってきた。医療技術の進歩にもかかわらず、進行大腸癌で発見される症例も多く、その予後は依然として 5 年生存率で 10%を切る厳しい状況である。1990 年に入り、進行大腸癌症例に対する、5-FU を用いた化学療法による生存延長および患者 QOL の向上への寄与が明らかとなり、以降積極的な化学療法を中心とした治療が検討されるようになった。その後 2000 年に入り新たな抗癌剤が臨床の現場に登場したことで、median survival time (以降 MST) の延長が次々に報告されるようになった。そのような流れに拍車をかけたのが、分子標的薬剤の出現である。抗 VEGF ヒト化マウスモノクローナル抗体である bevacizumab と、抗 EGFR ヒト化マウスモノクローナル抗体である cetuximab の出現により、2005 年ころより進行大腸癌治療に新たな展開が開けてきた。

今回の研究では、進行大腸癌化学療法に着目し、当科で加療を受けた大腸癌症例をレトロスペクティブに解析し、分子標的薬を含めた治療の効果をあきらかにすると共に、特に cetuximab 治療における治療抵抗性因子についても検討した。

方法

1. 進行・再発大腸癌治療の検討

5-FU による大腸癌化学療法を開始した 2002 年から 2009 年 11 月までの間に、東京大学消化器内科において進行・再発大腸癌に対する化学療法を施行した 71 例を対象に、年齢、性別など患者背景を調査すると共に、その治療成績および予後を治療法による MST の検討を、Kaplan-Meier 法を用いて検討した。

2. Cetuximab 治療症例の分子生物学および臨床病理学的検討

EGFR より下流のシグナルがその治療抵抗性に関わるとの報告があり、当院および関連施設である JR 東京総合病院において cetuximab 治療を受けた 12 例を対象に、臨床病理学および分子生物学的検討を行った。具体的には cetuximab 治療抵抗性の biomarker とされている、KRAS、BRAF および PIK3CA 変異と PTEN の発現について検討し、治療効果との関連につき検討した。

3. 新たな biomarker としての RASAL1 の検討

大腸癌 cell line を用いて、RAS protein Activator Like-1 (以降 RASAL1) を強制発現させた細胞と、野生株に対する cetuximab 治療の影響を、MTT assay 系、ウエスタンブロッティングを用いて評価し、cetuximab を投与した症例において、免疫組織化学染色にて RASAL1 の発現と治療効果との関連につき検討した。

結果

1. 進行・再発大腸癌治療の検討

2002 年 8 月から 2009 年 10 月までの期間に、大腸癌化学療法を目的に当院入院した症例は 92 例あり、そのうち、年齢、performance status が不良、本人家族の希望無いといった理由のため Best supportive care (以降 BSC) の方針となった 12 例、他院加療を希望された 9 例は、今回の検討から除外した。その結果、71 例が検討の対象となった。年齢中央値は 62.0 歳、性別は男性 39 例、女性 32 例であった。病変の局在を右側結腸、左側結腸、直腸の 3 領域に分類すると、それぞれ 22 例、32 例、17 例であった。診断時の TMN 分類による病期では、stage I が 4 例、stage II が 6 例、stage III が 19 例、stage IV が 42 例で、stage IV 症例中 92.9%にあたる 39 例が肝転移巣を有し、肺転移は 16.7%にあたる 7 例は肺転移巣を有していた。

分子標的薬を用いた症例は 34 例あり、bevacizumab のみが 22 例、cetuximab のみが 6 例、両薬剤を使用した症例が 6 例あった。71 症例における MST は、37.6 ヶ月と良好であった。Bevacizumab 治療は 28 人 (39.4%) に対して行なわれ、そのうち Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (以降 RECIST) による治療効果判定が可能であった 22 症例につき、成績を評価した。CR は 0 人、PR は 7 人 (31.8%)、SD は 9 人 (40.9%)、PD は 6 人 (27.3%) で、奏功率は 31.8%、病勢コントロール率は 72.7% と良好であった (表 4)。TTP は、11.3 ヶ月で、併用治療別で見ると FOLFIRI 群がやや長い傾向があったが、有意差はなかった ($p=0.62$)。

Cetuximab 治療は 12 人 (16.9%) に対して行なわれ、全例が RECIST による治療効果判定が可能であった。CR は 0 人、PR は 3 人 (25.0%)、SD は 3 人 (25.0%)、PD は 6 人 (50.0%) で、奏功率は 25.0%、病勢コントロール率は 50% であった。Time To disease Progression (以降 TTP) は、3.3 ヶ月で、併用治療別で見ると CPT-11 併用群の TTP と MST が有意に延長されていた

($p=0.042$, $p=0.001$)。全症例において、分子標的薬使用の予後への寄与を評価したところその使用は有意に予後の延長に寄与していた ($p=0.030$)。

Cetuximab 治療症例分子生物学および臨床病理学的検討

当科およびJR東京総合病院において2008年10月から2009年11月までにEGFR免疫染色陽性が確認され、cetuximab治療を行った合計12例を検討の対象とした。年齢中央値は61.5歳、男性8人、女性4人であった。病変部位は左側結腸が8人と多かった。術後adjuvant治療を除く、cetuximab投与前の平均化学療法数は3.0回であった。組織学的には高分化腺癌が多く認められた。KRASのアミノ酸変異は、G12V 2例、G13D 1例で、KRAS変異は全体の25%に認められた。BRAFおよびPIK3CAの変異を持つ症例は認められなかった。PTENの免疫染色による発現低下の頻度は4/12 (33.3%) であった。治療効果との関連では、KRAS変異のある症例のTTPが1.3ヶ月、変異のない症例のMSTが4.3ヶ月と、有意差はないものの ($p=0.22$) 変異症例でTTPが短くなる傾向がみられた。PTEN発現低下のある症例のTTPが4.1ヶ月、発現低下のない症例のTTPが5.1ヶ月と効果との関連は見られなかった。

2. 新たな biomarker としての RASAL1 の検討

トランスフェクションにより、恒常活性型 RASAL1 発現細胞を、ヒト大腸癌細胞株であるCaCO2細胞にて作製し、RASAL1の発現をウエスタンブロッティングにて確認したところ、野生株ではRASAL1の発現を認めず、トランスフェクションした細胞において、発現が増強していることを確認した。また、その下流であるリン酸化 ERK の活性が抑制されており、RASAL1の恒常発現により、下流のシグナルが抑制されていることも確認できた。つづいて、細胞増殖を検討したところ、恒常活性型 RASAL1 発現細胞では、その細胞増殖が抑えられていた。Cetuximab濃度を $1\mu\text{g/ml}$ として、24時間後の野生株 CaCO2細胞および恒常活性型 RASAL1 発現細胞と野生株細胞の cetuximab 治療感受性をみたところ、野生株では細胞増殖抑制効果を認めないものの、恒常活性型 RASAL1 発現細胞では細胞増殖は有意に抑えられていた ($p<0.05$)。ウエスタンブロッティングにて cetuximab 治療による細胞内シグナルの経時的変化をみると、RASAL1 強制発現細胞において、下流のシグナルである p-ERK が抑制されていることが確認できた。以上の結果から、RASAL1 の発現低下が腫瘍増殖を促進することが予想されたため、当院にて化学療法を行なった71例中、組織入手が可能で、解析の同意のとれた48例において、RASAL1の発現を確認した。発現低下症例は12例 (25.0%) で、その発現低下と大腸癌の予後との関与は認められなかった。

RASAL1の発現の有無と cetuximab 治療抵抗性に関して検討では、発現低下が認められたのは3例 (25%) で、RASAL1 発現低下の症例の TTP が 3.1ヶ月、発現低下のない症例の TTP が 4.1ヶ月で、有意差は認められなかった ($p=0.58$)。KRAS 変異症例を除いて検討すると、その発現低下が治療抵抗性と関連していることが示唆された ($p=0.069$)。

結論

進行・転移大腸癌の予後は、分子標的治療薬も含めた化学療法の進歩により改善していることが示された。分子標的治療薬による治療に関しては、本邦においても、海外の報告同様の成績となっており、大腸癌化学療法における有効な薬剤と考えられる。特に cetuximab 治療においては、その治療抵抗性の指標となる biomarker が存在する可能性があ

り、当院症例でも KRAS 変異は治療抵抗性への関与が疑われた。あらたな、治療抵抗性因子と考えられた RASAL1 の検討では、大腸癌細胞株における RASAL1 の発現低下は、細胞増殖を促進し、cetuximab 治療に抵抗性を示した。当院症例において検討すると、KRAS 変異のない症例においては、RASAL1 の発現低下が cetuximab 治療に対する治療抵抗性の biomarker となっている可能性が示唆された。