

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2018

課題番号：26460951

研究課題名(和文)血清バイオマーカーTYMPによる胃癌XP療法の効果予測とモニタリング

研究課題名(英文)Effect prediction and monitoring of serum biomarker TYMP in gastric cancer XP therapy

研究代表者

菊池 由宣(KIKUCHI, Yoshinori)

東邦大学・医学部・講師

研究者番号：20408769

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌患者77人を症例集積した。治療前の血清TPを酵素結合免疫吸着検定法により測定し、血小板数、性別、年齢、腫瘍病期および組織学的等級、ならびに外科的に切除された組織標本の免疫反応性を含む患者の特徴を記録した。結果として血清TPレベルは低分化型および印環細胞腺癌の方が分化型胃癌より有意に高かった。一方、TP発現は、高分化型および中分化型腺癌細胞内で観察されたが、低分化型腺癌および印環細胞癌では著しく弱かった。統計的に有意差はなかったが、癌組織において高いTP発現および血小板数の高値は予後不良因子であった。TP発現は血清TPレベルと相関していなかったが、血小板数とわずかに相関していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胃癌組織でのTP発現は血清TP値よりも血小板数と関連性があることが示された。したがって、胃癌患者における血小板数とカペシタビン治療効果との関係の評価するためには今後、より多くの患者を評価する必要がある。

研究成果の概要(英文)：A series of 77 patients with gastric adenocarcinoma were enrolled in the study. Pretreatment serum TP was determined by enzyme-linked immunosorbent assay and the patient characteristics, including platelet count, gender, age, tumor stage and histological grade, and immunoreactivity of surgically resected tissue specimens, were recorded. The serum TP level was significantly higher in poorly differentiated and signet ring cell adenocarcinomas than in more differentiated types. TP expression was observed within well- and moderately differentiated adenocarcinoma cancer cells, but was significantly weaker in poorly differentiated adenocarcinomas and signet ring cell carcinomas. Although the differences were not statistically significant, high TP expression and high platelet counts were poor prognostic factors. TP expression was not correlated with serum TP levels, but was slightly correlated with the platelet count.

研究分野：消化器

キーワード：胃癌 thymidine phosphorylase Capecitabine 血小板数 ELISA 免疫組織学的染色

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

- (1) 本邦における胃癌の標準化学療法は SPIRITS 試験(Lancet Oncol 2008)の結果、TS-1+シスプラチン(CDDP)(SP)療法とされている。海外での比較試験の ML17032 試験においては、5-FU+CDDP 療法に対する XP 療法の非劣勢が証明された(Ann Oncol. 2009)ことから海外では XP 療法は進行・再発胃癌に対する標準治療とされている。XP 療法は SP 療法と比較して、遜色ない治療成績であると報告した(Int J Clin Oncol. 2012)。しかしながら XP 療法の有用性については後ろ向き解析を中心とした報告が多く、前向き臨床第 Ⅲ 相試験の報告は少ない。
- (2) 我々は以前より胃癌および食道癌患者の新規の血清バイオマーカーの解析を行い血清検査が癌の悪性度診断として有用であるか否かを検討している。有意な予後因子は、p53 抗体、VEGF、PDECGF(TP)、1-CTP、SCC-Ag、CYFRA21-1、Midkine であった(Surgery 2002, Cancer 2002, Cancer 2003)。また 5-FU 代謝酵素である Thymidylate synthase (TS)、Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)の活性は 5-FU に対する感受性あるいは予後推測因子として注目されていることから胃癌細胞を用いて酵素活性が 5-FU 投与により変化してその効果に影響を与えるか否かを検討した研究では胃癌細胞の TS、DPD の mRNA 値あるいは酵素活性が 5-FU 投与により変化することを明らかにしてきた(Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2003)。
- (3) 近年、TP の発現レベルが高い腫瘍では血管密度が高く、予後不良因子となっている可能性が示唆されている(Oncol. Rep. 2010)。5-FU や S-1 の臨床効果と TP の発現レベルを評価した検討では、TP は薬剤抵抗性の因子として報告されている(Clin Cancer Res 2005)。逆に、TP はカペシタビンの代謝標的酵素であることから、TP タンパク質や TP mRNA BM5) 発現量の高い胃癌において、高い奏効率が確認されている(Oncology 1999, Oncol Rep 2003)。カペシタビンは腫瘍内 TP によって特異的に 5-FU へ変換されるようにデザインされたプロドラッグであるため、TP の発現量が高い腫瘍において効率よく活性本体の 5-FU へ変換されていると考えられる。従って、腫瘍内 TP 発現レベルの違いに注目して、5-FU 系薬剤を使い分けることができると考えられる。TP の測定には、ELISA 法や免疫染色による発現量の測定や mRNA の定量などが一般的である。従来の報告は外科的手術で切除された凍結標本やホルマリン固定された標本を用いた免疫染色が行われてきた。しかし、すべての患者で標本を入手することは困難であり、特に進行癌から新たに生検標本を採取することは患者負担を考慮すると必ずしも容易ではなく、血液解析等の比較的侵襲が少ない検査での評価が望まれる。Stage III および IV の再発胃癌症例を対象として、血清中 TP 量は同一患者の腫瘍 TP 量に比べて約 2500 倍低いものの、血中 TP 量と腫瘍内 TP 量との間に有意に強い相関が認められることを報告している(Oncol Rep. 2003)。このことは、血中 TP 量の測定が腫瘍内 TP 量のサロゲートになりうることを示唆しており、血中 TP 量を指標に 5-FU 系薬剤の使い分けに繋がる情報が得られると考えられる。

### 2. 研究の目的

切除不能進行・再発胃癌に対する標準治療は、国内では TS-1 + CDDP (SP) 療法であり、海外では Capecitabine + CDDP (XP) 療法である。Capecitabine の標的酵素である TP の腫瘍内の発現レベルが高いと化学療法抵抗性であることが多いが、TP 活性の高い腫瘍に対しては XP 療法が SP 療法よりも有効である可能性がある。本研究では、胃癌症例を対象にして血清 TP 値と XP 療法との有効性との関連性を解析し、血清 TP 値による XP 治療の効果予測・治療モニタリングを行うことを目的とする。

### 3. 研究の方法

- (1) 2011年4月～2013年7月までに当施設で切除(内視鏡的・外科的)した胃癌患者で治療前に遠心分離機で採取し、凍結保存していた77症例の血清を対象に thymidine phosphorylase (TP) を enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kit (USCN Life Science, cat. no. MBS889092) を用いて測定した。
- (2) 77症例の胃癌患者のホルマリン固定した組織切片を rabbit polyclonal primary antibody (HPA001072, SIGMA Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いて TP を染色した。

### 4. 研究成果

- (1) 癌組織の免疫染色を行い 2 人の医師によって検鏡し、TP の発現するがん細胞の分布が 10% 未満なら Grade 0、10-30% なら Grade 1、31-60% なら Grade 2、61% 以上であれば Grade 3 とした。また染色の強度として全く染色されないものは Grade 0、弱く染色されるものは Grade 1、中等度染色されるものは Grade 2、強度に染色されるものは Grade 3 とした(図 1)。

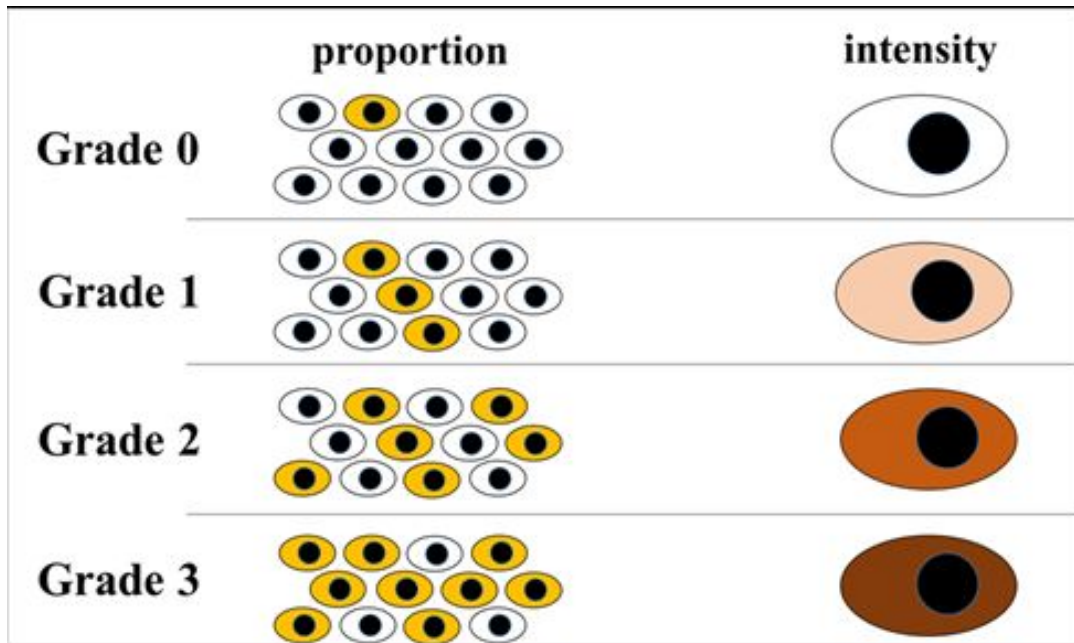


図 1 免疫染色による TP 発現の分布と染色強度の Grade

- (2) ELISA 法により血清 TP 値を測定し、性別・年齢（65 歳上下）・病理学的病期・組織型でそれぞれ血清 TP 値の中央値で比較をした結果、低分化型腺癌および印環細胞癌は高・中分化型腺癌より優位に血清 TP 値が高値を示したが他の因子では有意差がつかなかった。また病理組織学的染色の Grade 間で血清 TP 値に有意な差を認めなかった（図 2）

		Number	serum TP level (mg/dl) Median (IQR)	P value
Gender	Female	29	5.66 (3.88–9.10)	0.966 <sup>a)</sup>
	Male	48	5.36 (3.84–7.75)	
Age	<65 years old.	27	5.20 (3.81–6.43)	0.308 <sup>a)</sup>
	≥65 years old	50	5.66 (3.88–9.25)	
Pathological stage	I	43	5.20 (3.74–6.44)	0.541 <sup>b)</sup>
	II	19	6.99 (4.12–8.92)	
	III	5	4.68 (4.27–4.69)	
	IV	10	5.28 (4.66–17.80)	
Histology	Tub1 or tub2	37	4.69 (3.67–5.93)	0.008 <sup>a)</sup>
	Por or sig	40	6.40 (4.49–10.53)	
Proportion of TP staining	Proportion 0	31	5.20 (3.66–7.27)	0.702 <sup>b)</sup>
	Proportion 1	25	5.79 (4.62–8.50)	
	Proportion 2	13	4.52 (3.67–7.65)	
	Proportion 3	8	5.51 (4.77–7.37)	
Intensity of TP staining	Intensity 0	31	5.20 (3.66–7.27)	0.405 <sup>b)</sup>
	Intensity 1	29	5.52 (3.83–8.54)	
	Intensity 2	14	5.41 (4.72–6.88)	
	Intensity 3	3	6.22 (4.72–7.76)	

TP: thymidine phosphorylase      IQR: inter quartile range      a) Mann-Whitney *U* test  
Tub1: well differentiated adenocarcinoma      Tub2: moderately differentiated adenocarcinoma      b) Kruskal-Wallis test  
Por: poorly differentiated adenocarcinoma      Sig: signet-ring cell carcinoma

図 2 胃癌患者 77 人の特徴と血清 TP 濃度の中央値

- (3) 組織型の違い（高・中分化型腺癌と低分化型腺癌・印環細胞癌）による免疫組織学的 TP の発現の分布と染色強度を検討した結果、高・中分化型腺癌の方が有意に TP の発現が強いことが分かり、血清 TP 値の結果と相反することが示された（図 3）。血清 TP 値が最も高値な症例は Stage I の早期胃癌であり、癌細胞には全く TP の発現が認められない Grade 0 で、癌細胞周囲のリンパ球等の炎症細胞には染色が認められた（図 4）。Liakakos らは腫瘍関連性の間質細胞の TP 発現は低分化型腺癌でのみ認められると報告している<sup>1)</sup>ことから血清 TP 値は癌細胞ではなく間質細胞の TP 発現に左右される可能性が示唆された。

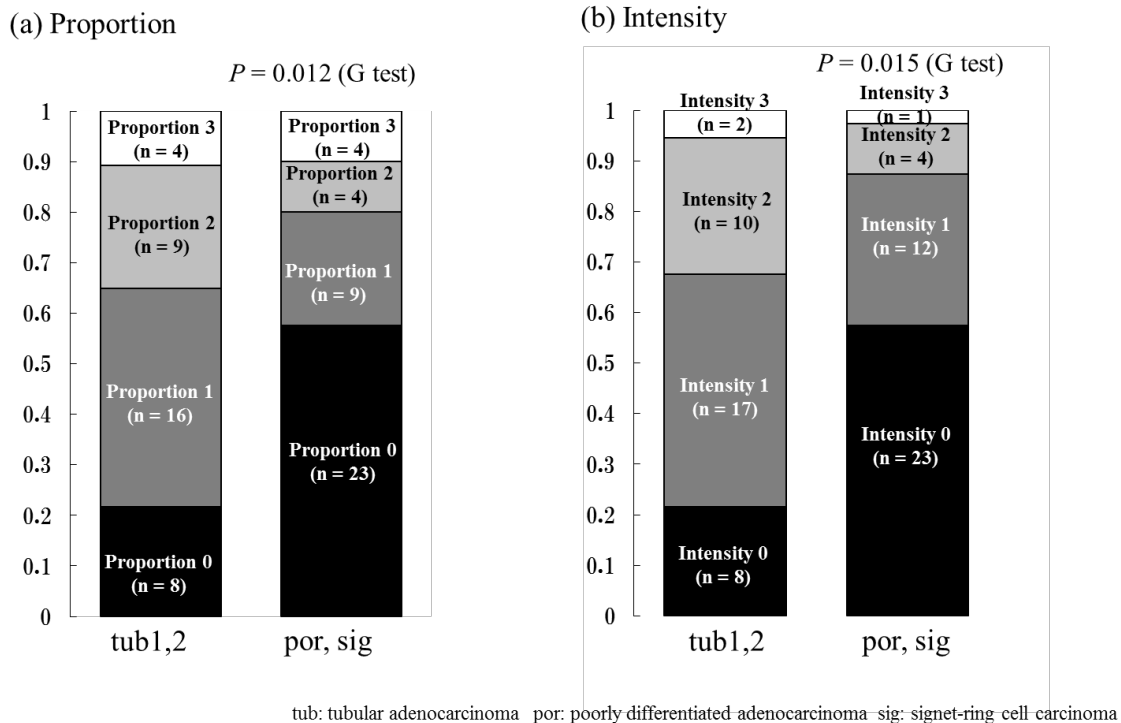


図3 組織別の免疫組織学的染色によるTP発現の分布(a)と強度(b)

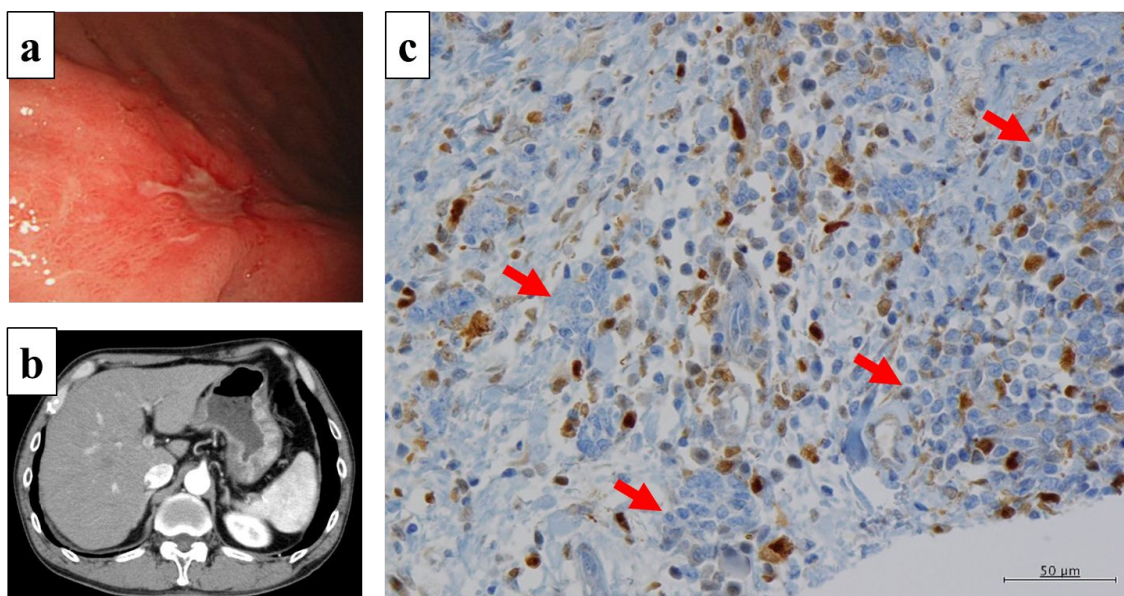


図4 もっとも血清TP値が高い症例の内視鏡画像(a)、CT画像(b)、免疫組織学的TP染色(c)

- (4) TPは血小板由来内皮細胞増殖因子(PDEGF)と同じ構造のたんぱく質として同定されている<sup>2)</sup>。それゆえ組織型、血清TP値(中央値)、組織のTPの発現の有無、血小板数(中央値)により全生存期間を比較した結果、いずれも全生存期間に有意差を認めなかったが組織のTP発現がある群と血小板数が多い群では生存率が悪い傾向を認めた(図5)。

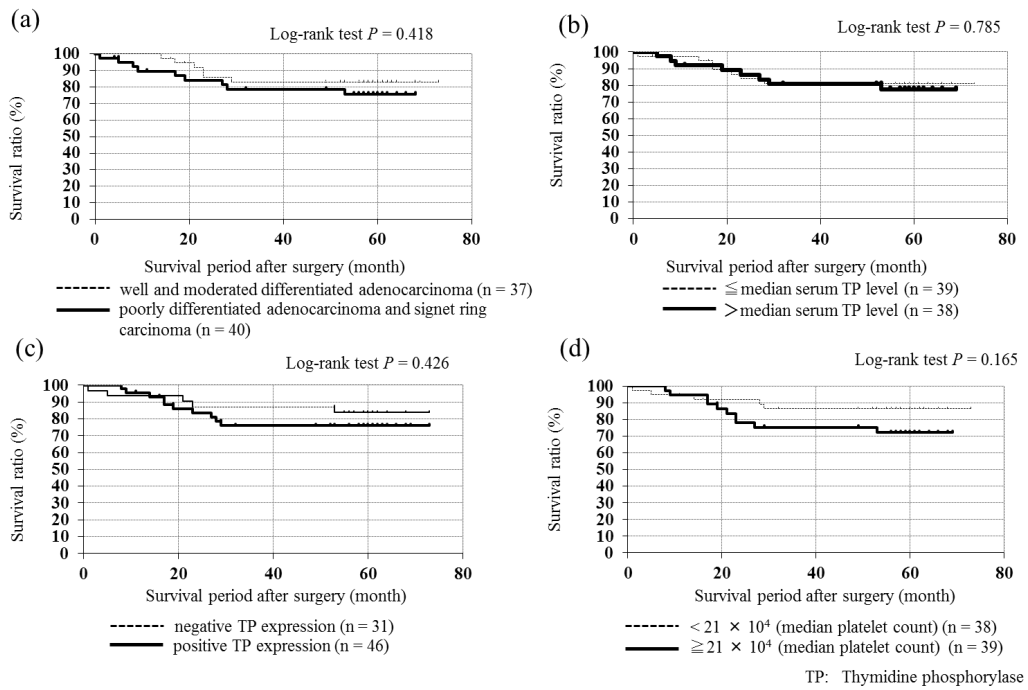


図5 組織別 (a)、血清TP値別 (b)、組織学的TP発現別 (c)、血小板数別 (d)での全生存期間

(5) 血清TP値と血小板数には相関関係を認めなかった (図6a)。一方、癌組織のTP発現分布および強度が強い症例は血小板数が高い傾向を認めた (図6c, d)。

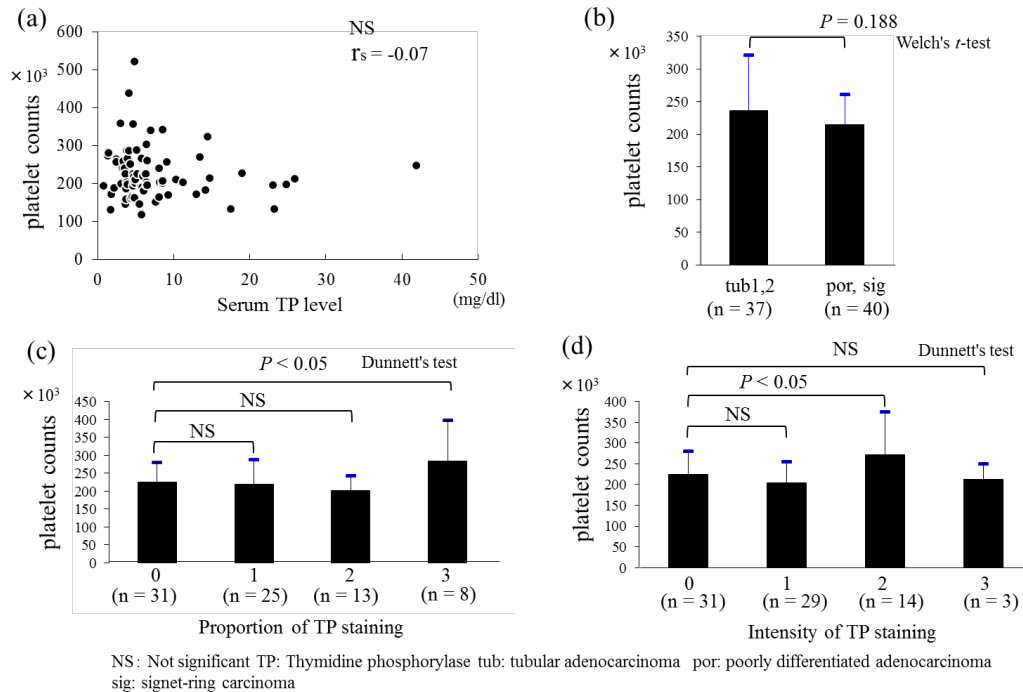


図6 血小板数と血清TP値 (a)、組織別 (b)、免疫組織学的TP発現の分布 (c)と強度 (d)の関連性

<引用文献>

Liakakos T, Troupis T, Ghiconi I, Triantafyllidis S, Macheras A, Karatzas G, et al. Immunohistochemical localization of thymidine phosphorylase in gastric cancer: Is there a role of differential expression in tumor cells and associated stromal cells? *Anticancer Res.* 2006; 26: 3899-904.

Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T, Haraguchi M, Akiyama S. Angiogenic factor. *Nature.* 1992; 356: 668.

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Yoshinori Kikuchi, Masaaki Ito, Tetsuo Nemoto, et al. Thymidine Phosphorylase Expression in Gastric Cancer Tissues is Associated with Thrombocytosis but not with Serum Thymidine Phosphorylase Concentration Toho J Med 査読有 Vol. 4、No.2 2018、66 73

〔学会発表〕(計 1 件)

菊池由宣, 伊藤正朗, 根本哲生, 他: 血清 thymidine phosphorylase は胃癌の thymidine phosphorylase 発現の代用マーカーか? 2017 年 第 55 回日本癌治療学会学術集会 横浜市

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名: 島田 英昭

ローマ字氏名: (SHIMADA, Hideaki)

所属研究機関名: 東邦大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 20292691

研究分担者氏名: 五十嵐 良典

ローマ字氏名: (IGARASHI, Yoshinori)

所属研究機関名: 東邦大学

部局名: 医学部

職名: 教授

研究者番号 (8 桁): 50212741

研究分担者氏名: 名波 竜規

ローマ字氏名: (NANAMI, Tatsuki)

所属研究機関名: 東邦大学

部局名: 医学部

職名: 助教

研究者番号 (8 桁): 90385831

### (2)研究協力者

研究協力者氏名:

ローマ字氏名:

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。