

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010 ~ 2012

課題番号：22591517

研究課題名（和文） 遺伝子発現から見た膵癌術後補助化学療法の適応

研究課題名（英文） The indication of adjuvant chemotherapy after the resection of pancreatic cancer due to biomarkers

研究代表者

竹田 伸 (TAKEDA SHIN)

名古屋大学・医学系研究科・准教授

研究者番号：20314015

研究成果の概要（和文）：

膵癌の補助化学療法薬は、ジェムザール(gem)またはS-1であり優劣について2013年1月にJASPAC臨床試験の結果が発表されS-1の優勢が報告された。本研究では、S-1は5FU系の抗がん剤であるためにbiomarkerとしてTS、DPD、OPRT遺伝子に注目し発現度に応じてsubgroup解析し、first lineとしての補助化学療法薬の選択の確立を目的に検討した。S-1は悪性度の高いTS+症例の方が有効であり、DPD+症例に対する制御は軽微であった。TS+症例またはDPD-症例に2次治療としてS-1を使うと予後の改善傾向を示したことより発現による抗がん剤の選択の重要性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Gemcitabine or S-1 is now considered to be the standard adjuvant therapy for advanced pancreatic cancer. Randomized controlled studies by JASPAC have demonstrated that S-1 is more effective in prolonging survival in patients with advanced pancreatic cancer in 2013. However, the indications due to biomarkers are not reported. Therefore, our aim is to clarify which biomarkers is important in gemcitabine or S-1 as adjuvant therapy for the resectable pancreatic cancer. These results suggest that the cases with TS positive or DPD negative might be predictor for the response to S-1.

交付決定額

(金額単位：円)

|        | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2010年度 | 1,800,000 | 540,000   | 2,340,000 |
| 2011年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 2012年度 | 400,000   | 120,000   | 520,000   |
| 総計     | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

研究分野：消化器外科学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：pancreatic cancer, オーダーメイド医療, 抗癌剤感受性遺伝子, TS, DPD, adjuvant chemotherapy, S-1, gemcitabine

1. 研究開始当初の背景

(1) 学術的背景

膵癌全国登録調査報告では、膵癌の5年生存率は、切除例13.2%、姑息手術例0.7%、

非切除例0%で、現状では、外科的切除をすることが長期生存を可能にする唯一の治療法であるが、切除しても肝再発、局所再発、癌性腹膜炎など、術後早期に再発をきたし

予後は満足のものではない。難治性膵癌の治療成績を向上するためには、集学的治療が必要である。化学療法薬として、2001年よりジェムザール(塩酸ゲムシタビン)が保険認可され、2005年よりS-1(経口5-FU系抗癌剤)が保険適応認可されたが、現時点ではジェムザールによる治療が主流となっている。一般的に、5-FU(フルオロウラシル)は古くから膵癌に対して使用されているが、単剤での効果には限界があり、分子標的薬や他の併用薬で改善することが期待されていたが、今のところジェムザール単独を凌駕するプロトコールはないと報告されている。S-1は5-FUのプロドラッグであるtegafurにモジュレーターを併用した配合剤で、わが国を中心に開発が進められており、ここ最近注目されている。膵癌に対する標準治療の確立は非常に重要な課題であるがGEST(gem vs S-1 vs GS)の臨床試験の結果はgem+S-1がやや良い結果であったが有意差は認めなかった。一方、補助化学療法ではJASPAC: Japan Adjuvant Study Group of Pancreatic Cancer: gem vs S-1, の臨床試験の結果が2013年1月に報告されS-1の有意性が証明された。厚生労働省班会議gem+S-1併用の臨床試験が進行中である。しかし、臨床の場では実際に治療をしてみると効果のある患者と全く効果がないと感ずる患者を経験する。すなわち、癌化学療法において求められていることは、始める前にどの抗癌剤がどれ程有効であるかを予測できるかどうかということである。すなわち、予測可能な因子を見つけ、科学的理論的根拠によって、有望な治療を提供することにある。

5-FUに関して我々は、1994年から当科において肝再発の患者に対し、術後に5-FUを用いた門脈注入補助化学療法を3週間行った。その結果、切除のみよりは門脈注入補助化学療法の延命効果が示唆された。また、5-FUの作用機序から、TS(thymidylate synthase), DPD(dihydropyrimidine dehydrogenase)の腫瘍内発現と5-FU治療の効果に相関があることが判明した。すなわち、TS高発現群(66%)あるいはDPD低発現群(56%)に5-FU門脈注入補助化学療法を行った症例は、生存率が一番よいことが明らかとなった(Takeda S. Hepatogastroenterology 2001, Nakayama S. Ann Surg 2004)。このことから、DPDを発現している癌細胞にもS-1は有効であることが推察されるため、計算上は約7割に有効であることになる。

## (2) 世界での報告状況について

① ジェムザールの感受性遺伝子(代謝性)は、RRM1, RRM2, DCK, CDA, 細胞内濃度に関連する遺伝子hENT(human equilibrative

nucleoside transporter)などが報告されている(Giovannetti E. Cancer Res 2006)。Giovannettiらは、62例の切除膵癌の検討でhENTが感受性遺伝子であると報告している。

② ジェムザールの代謝に関係しない感受性遺伝子として、EMTに関するE-cadherin, Zeb-1が逆相関し、Zeb-1が低発現している癌細胞はジェムザール, 5-FU, CDDPに感受性がると報告している(Arumugam T. Cancer Res 2009)。

## 2. 研究の目的

膵癌に対する化学療法がめざましく進歩する中、標準治療の確立を含めて臨床試験が盛んに行われているが、現在使用でき有望な抗癌剤は、ジェムザール(塩酸ゲムシタビン)またはS-1(経口5-FU系抗癌剤)のみである。新薬の開発は重要な課題であるが、現状ではこれらの薬剤の有効性をいかに予測し無駄なく治療できるかが成績の向上につながる。そのために、手術で得た膵癌組織標本を用いて両者に関係する遺伝子発現を検索し、臨床経過と対応して相関関係を検討し、関係ある遺伝子を見つけることで、患者個々の癌の特性に合わせた治療方針を提供出来ると考える。

## 3. 研究の方法

- (1) 免疫組織染色にて、ホルマリン固定した切除膵癌組織より5-FU感受性遺伝子であるTS, DPD, OPRTの発現を調べる。30%以上染色されれば陽性と判断した。それらの発現と、無再発、生存率との関係について検討した。術後補助化学療法は、術後に最低3ヶ月以上で半年間を行った場合とした。
- (2) 当科では、年間に約35例の通常型膵癌切除例を経験しており、切除膵癌組織を入手できる環境にあるが、今回わずかに42例の新鮮凍結組織よりmicrodissection法でqualityの高いRNAを抽出し、その後ジェムザール感受性遺伝子の発現を定量RT-PCR法で検出した。それらの発現と、無再発、生存率との関係について検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 5FU系感受性遺伝子について

切除膵癌ホルマリン固定パラフィン切片で評価しえた254例の免疫組織染色の結果である。対象はTable 1のごとくstage III 70例, stage IVa 101例, stage IVb 83例の計254例である。補助化学療法をしなかった手術のみは91例, 5FU門脈注入療法(術後3-4週間) 38例, gem(3-6ヶ月) 87例, TS-1(3-6ヶ月) 29例, GS(gem+TS-1を3-6ヶ月) 9例であった。

Table 1

## 対象

切除腫瘍ホルマリン固定パラフィン切片で評価しえた254例

|           | surgery | 5-FU | gem | GS | S-1 | total |
|-----------|---------|------|-----|----|-----|-------|
| stage III | 20      | 14   | 25  | 4  | 7   | 70    |
| stage IVa | 40      | 11   | 35  | 2  | 13  | 101   |
| stage IVb | 31      | 13   | 27  | 3  | 9   | 83    |
| total     | 91      | 38   | 87  | 9  | 29  | 254   |

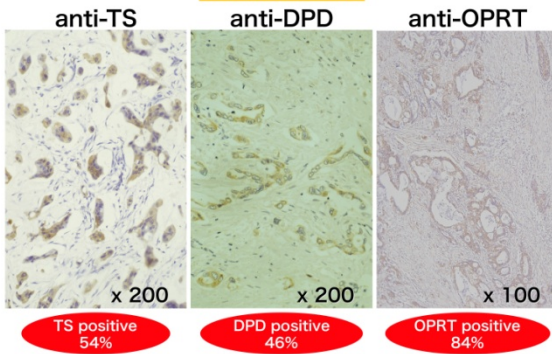
5-FU: 250mg/day continuously for 3-4weeks just after surgery  
 gem: 1g/m<sup>2</sup> for at least 3 months to 6 months  
 S-1: 80mg/m<sup>2</sup> for at least 3 months to 6 months

TS, DPD, OPRT 陽性率は、それぞれ 54%, 46%, 84%であった (Fig. 1)。

この結果、OPRT はほとんどの症例で陽性

Fig. 1

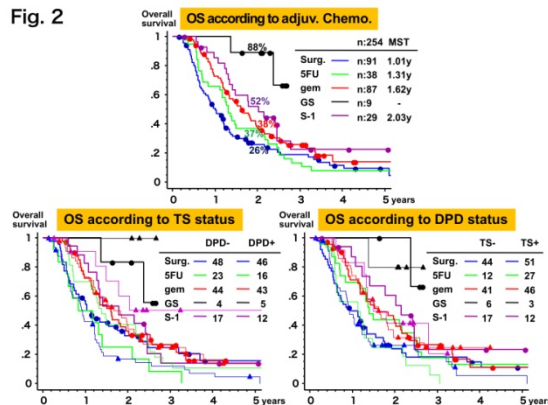
## 免疫組織染色法



のため除外した。生存率は Kaplan-Meier 法で検討した。

Fig. 2 の如く 2 年生存率では、手術のみ、5FU 門注療法, gem, TS-1 は、それぞれ 26%, 37%, 38%, 52%であった。TS 発現程度で検討すると、手術単独群は TS+群は予後が悪かった。TS は悪性度を反映していると考えられた。5FU と TS-1 どちらも TS+の方が生存率は改善した。DPD 発現程度で検討すると、手術単独群は変化なし、5FU, TS-1 どちらも DPD-の方が生存率は改善した。

Fig. 2



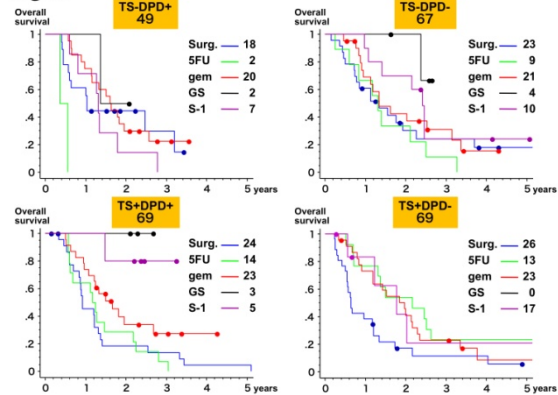
TS・DPDの subgroup 解析の結果は、TS+DPD-において 5FU と TS-1 は全く同等の結果であった。DPD+でも TS+ならば、TS-1 は非常に有効であった。TS-でも DPD-ならば、TS-1 は若干有効であった。TS-DPD+は、全く反応していなかった (Fig. 3)。

また、再発後の 2nd line として TS+ならば gem から TS-1 への変更は、有意差はないが有効な傾向を示した。

## (2) gem 感受性遺伝子

ジェムザールの感受性遺伝子 (代謝性) は、

Fig. 3



RRM1, RRM2, DCK, CDA, p53, 細胞内濃度に関連する遺伝子 hENT (human equilibrative nucleoside transporter) を RT-PCR 法で凍結標本組織約 42 例より検出したが、癌部と非癌部の両方とも抽出できた 32 例を用いて検討した。

RRM2 のみ癌部で高発現していたが、他の遺伝子は非癌部の方が癌部より発現が多かった。しかし、RRM2 に関して高発現している症例に進行している症例が多いわけではなかった (P=0.22)。他の遺伝子も同様に低発現と進行度は相関しなかった (Table 2)。

Table 2

## stage別の各遺伝子発現

| gene | exp | II | III | IVa | IVb |
|------|-----|----|-----|-----|-----|
| RRM2 | +   | 0  | 1   | 2   | 5   |
|      | -   | 1  | 5   | 12  | 6   |
| RRM1 | +   | 0  | 5   | 5   | 5   |
|      | -   | 1  | 1   | 9   | 6   |
| hENT | +   | 0  | 5   | 3   | 6   |
|      | -   | 1  | 1   | 1   | 5   |
| dck  | +   | 0  | 4   | 4   | 7   |
|      | -   | 1  | 2   | 5   | 4   |
| CDA  | +   | 0  | 2   | 3   | 4   |
|      | -   | 1  | 1   | 6   | 4   |
| p53  | +   | 0  | 0   | 3   | 5   |
|      | -   | 1  | 6   | 11  | 6   |

RRM2 高発現群に手術のみで補助化学療法 gem を行わないと予後は悪く悪性度を反映していると思われた。同様に hENT も低発現群に予後悪いが補助化学療法 gem を行うと改善した。どのような機序かは定かでないが興味深い結果であった (Fig. 4)。

gem は hENT を介して細胞内に gem が入って CDA 遺伝子で分解される一方、DCK でリン酸化が起こり dFdCTP へと変換される。5FU 系と同様に DPD が CDA に相当し、OPRT が DCK に相当するはずであるが、gem に関しては代謝酵素遺伝子は余り治療効果と

関連していなかった (Fig. 5)。

Fig. 4

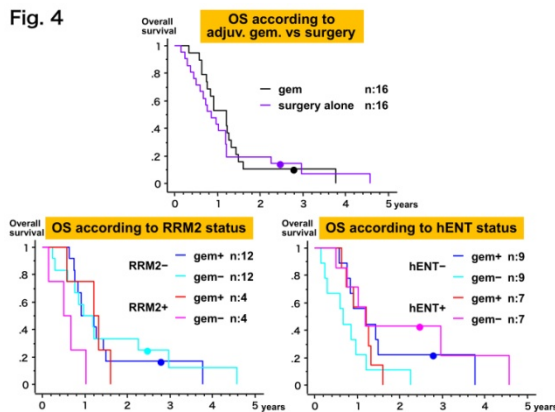
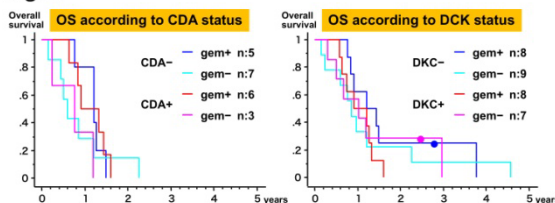


Fig. 5



### (3) 結語

TS/DPD status から見た 200 例以上の検討はなく、TS+DPD-群は gem または S-1、TS+DPD+群と TS-DPD-群は S-1 を基本とする補助化学療法を、TS-DPD-群は新規抗がん剤で試みる方がよいと思われる。TS 遺伝子と RRM2 遺伝子は悪性度を反映している可能性が高いが、抗がん剤にも感受性があると思われた。

### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 2 件)

- ① Akimasa Nakao, Hideki Kasuya, Tefvik T. Sahin, Naohiro Nomura, Akiyuki Kanzaki, Makoto Misawa, Takashi Shirota, Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Toshio Shikano, Shuji Nomoto, Shin Takeda, Yasuhiro Koderu, Yukihiro Nishiyama. A phase I dose-escalation clinical trial of intraoperative direct intratumoral injection of HF10 oncolytic virus in non-resectable patients with advanced pancreatic cancer. *Cancer Gene Therapy* (査読有) Vol. 18 No. 3 P167-175. 2011
- ② 竹田 伸, 中尾昭公. 特集: 膵癌の治療戦略 I. 外科治療 膵癌に対する術後補助化学療法. *消化器外科* (査読有) Vol. 33 No. 12 P1831-1837. 2010

[学会発表] (計 7 件)

- ① Hideki Kasuya, Gewen Tan, Tefvik T Sahin, Toshio Shikano, Suguru Yamada, Kazuo Yamamura, Tsutomu Fujii, Hiroyuki Sugimoto, Shuji Nomoto, Shin Takeda, Akimasa Nakao, Yasuhiro Koderu. New biological therapeutic drug, oncolytic herpes virus hrR3, with anti-angiogenesis drug, Bevacizumab, against human gastric cancer xenograft model. IASGO 2012 (22nd World Congress of the International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists), 2012. 12. 6 Bangkok, Thailand

- ② Tsutomu Fujii, Suguru Yamada, Masaya Suenaga, Norio Okumura, Daisuke Kobayashi, Chie Tanaka, Goro Nakayama, Hiroyuki Sugimoto, Masahiko Koike, Shuji Nomoto, Michitaka Fujiwara, Shin Takeda, Yasuhiro Koderu. Epithelial to Mesenchymal Transition (EMT) in Pancreatic Cancer. The Joint 43rd Meeting of the American Pancreatic Association and the 17th Meeting of the International Association of Pancreatology, 2012. 11. 2 Miami, Florida

- ③ 山田 豪, 藤井 努, 奥村徳夫, 末永雅也, 田中千恵, 大橋紀文, 中山吾郎, 杉本博行, 小池聖彦, 野本周嗣, 藤原道隆, 竹田 伸, 小寺泰弘. 膵癌における上皮間葉系転換 (EMT) と Zeb-1 の臨床的意義の検討. 第 43 回日本膵臓学会大会, 2012. 6. 29 山形 (ホテルメトロポリタン山形)

- ④ Suguru Yamada, Tsutomu Fujii, Bryan C. Fuchs, Hiroyuki Sugimoto, Shuji Nomoto, Shin Takeda, Yasuhiro Koderu, Akimasa Nakao. Implication of epithelial to mesenchymal transition (EMT) in pancreatic cancer prognosis. AACR Annual Meeting 2012, 2012. 4. 1 Chicago, IL

- ⑤ 竹田 伸, 野本周嗣, 杉本博行, 藤井 努, 神田光郎, 菅江 崇, 岡村行泰, 神崎章之, 林 真路, 中尾昭公. 膵癌術後補助化学療法としての TS1 の有用性. 第 65 回日本消化器外科学会総会, 2010. 7. 16 下関 (海峡メッセ下関)

⑥ Shin Takeda, Shuji Nomoto, Hideki Kasuya, Hiroyuki Sugimoto, Tsutomu Fujii, Akimasa Nakao. The Strategy of the Adjuvant Chemotherapy after Radical Resection for Pancreatic Cancer, Which is Better Gemcitabine or S-1? Joint Meeting of the International Association of Pancreatology and the Japan Pancreas Society 2010 (第14回国際膵臓学会・第41回日本膵臓学会大会合同会議), 2010.7.12 福岡 (福岡国際会議場)

⑦ 竹田 伸, 藤井 努, 中尾昭公. 膵癌に対する治療成績向上の工夫. 第96回日本消化器病学会総会, 2010.4.24 新潟 (新潟県民会館)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

竹田 伸 (TAKEDA SHIN)  
名古屋大学・医学(系)研究科(研究院)・  
准教授  
研究者番号: 20314015

### (2) 研究分担者

杉本 博行 (SUGIMOTO HIROYUKI)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・講師  
研究者番号: 20437007

藤井 努 (FUJII TSUTOMU)  
名古屋大学・医学部附属病院・助教  
研究者番号: 60566967

中尾 昭公 (NAKAO AKIMASA)  
名古屋大学・大学院医学系研究科・教授  
研究者番号: 70167542  
(H22年度)

### (3) 連携研究者

連携研究者なし