

Thesis

# 大腸癌原発巣におけるThymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase発現の臨床的意義 —フッ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果予測との関連—

埼玉医科大学外科学（消化器・一般外科部門 消化器・一般外科（II））

（指導：平山 廉三 教授）

西 直人

---

## Gene Expression of Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Primary Colorectal Cancer

Naoto Nishi (Department of Digestive and General Surgery, Saitama Medical School, Moroyama, Iruma-gun, Saitama 350-0495, Japan)

**BACKGROUND:** Thymidylate synthase (TS) is a target enzyme for 5-fluorouracil (5-FU), and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) is a rate-limiting enzyme for degradation of 5-FU. Recently, determination of intratumoral TS and DPD is of clinical interest because elevated TS and DPD levels can influence the tumor response to 5-FU based chemotherapy through increased inactivation of the agent in tumor cells. In the present study, TS and DPD mRNA levels were evaluated in 12 cases of primary colorectal cancer with liver metastasis that were surgically resected. Moreover, TS and DPD mRNA levels of primary colorectal cancer with metastatic tumor were analysed in terms of the response of UFT/LV based chemotherapy. **PATIENTS and METHODS:** (1) TS and DPD mRNA levels were evaluated in 12 surgical cases of primary colorectal cancer with liver metastasis. No one had received 5-FU based chemotherapy prior to the study. (2) TS and DPD mRNA levels of the metastatic colorectal cancer patient who received the UFT/LV based chemotherapy were investigated in 37 cases. **RESULT:** (1) Measurement of the TS and DPD mRNA level in both primary and metastatic lesions were possible in all 12 cases. The TS mRNA level in hepatic metastatic foci was significantly lower than that in primary lesions (median TS/GAPDH ratio 0.89 and 1.09 respectively,  $p=0.0047$ , Wilcoxon signed-ranks test). The DPD mRNA level in hepatic metastatic foci was significantly higher than that in primary lesions (median DPD/GAPDH ratio 0.87 and 0.48 respectively,  $p=0.0047$ ). Both TS and DPD mRNA had linear relationship between primary colorectal cancer and metastatic liver tumor. (2) The response rate of UFT/LV based chemotherapy with low-TS mRNA ( $TS \leq 1.0$ ) was significantly higher than that with high-TS mRNA ( $TS > 1.0$ ) ( $P=0.038$ ). Similarly, the response rate with low-DPD mRNA ( $DPD \leq 0.5$ ) was statistically higher than that with high-DPD mRNA ( $DPD > 0.5$ ) ( $P < 0.0001$ ). The patients with low expression of TS mRNA had significantly longer survival than patients with high value of TS mRNA ( $P=0.0069$ ). The patients with low expression of DPD mRNA had also significantly longer survival than patients with a high value of DPD mRNA ( $P < 0.0001$ ). **CONCLUSION:** The results of this study showed that TS and DPD gene expression in primary colorectal cancer is associated with metastatic tumor. It will become possible to predict the efficacy of the UFT/LV based chemotherapy for liver metastasis by analyzing TS and DPD levels of colorectal cancer.

**Keywords:** Thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) 5-fluorouracil (5-FU), colorectal cancer

## 緒言

5-FU系抗癌剤は消化器癌、とりわけ、大腸癌化学療法に広く使用されている重要な抗癌剤である<sup>1)</sup>。腫瘍内に取り込まれた5-FUは速やかに律速段階の分解酵素であるdihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)により2-fluoro- $\beta$ -alanineまで分解される<sup>2)</sup>。分解を受けなかった5-FUは細胞内でリン酸化をうけ活性代謝体に変化し、殺細胞効果を発揮する。活性代謝体の5-fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP)は、還元型葉酸補酵素の5,10-methylene tetrahydrofolateの存在下に、DNA de novo系酵素のthymidylate synthase (TS)と三元共有結合複合体(ternary complex)を形成し、TSの酵素活性を阻害する<sup>3,4)</sup>。これにより、DNAのde novo合成系は抑制され、DNA障害が時間依存的に惹起される<sup>4)</sup>。

以上のような5-FUの作用機序から考えると、標的酵素のTSおよび分解酵素のDPDの多寡により、抗腫瘍効果が決定される可能性が推測される。すなわち、分解酵素のDPD活性が低いほど腫瘍内の5-FU濃度は高まり、また、標的酵素のTS活性が低いほど、FdUMPにより効率よくTS活性が阻害され、抗腫瘍効果が増強されることが予想される。TS、DPD発現を検討する方法としては、本来であれば活性そのものを測定することが望ましいが、活性の測定には100 mg単位の凍結標本を必要とし、また、放射性同位元素を用いた測定は煩雑である<sup>5)</sup>。

TSの蛋白レベルでの発現がRNAレベルでの発現と相関することはすでに報告されている<sup>6)</sup>。われわれは、大腸癌におけるDPD活性がDPD遺伝子のRNAレベルでの発現と相関することを報告した<sup>7)</sup>。これらの事実から、南カリフォルニア大学のDanenbergらは、Mayo regimenの5-FU/leucovorin (LV)による化学療法を施行された33症例を対象として、転移巣におけるTS、DPD発現と抗腫瘍効果の関連を検討した<sup>8)</sup>。その結果、DPD遺伝子が高発現の11症例では奏効例がなく、TS遺伝子、DPD遺伝子が低発現の13例では12例(92%)が奏効したことを報告した。

消化器癌の転移は、原発巣から遊離した癌細胞が他臓器に着床し血管新生を伴って新たな転移巣を形成することは論をまたない<sup>9)</sup>。ここで、転移巣におけるTS、DPD発現は原発巣におけるそれらを反映しているか否か、原発巣におけるTS、DPD遺伝子発現から転移再発巣における治療効果予測が可能か否か、という疑問が生じる。

本研究においては、同時性肝転移を伴った進行大腸癌12例を対象に大腸癌原発巣と肝転移巣におけるTS、DPD遺伝子発現を比較検討し、さらに、UFT/LV療法を行った転移性大腸癌37症例を対象に、原発巣におけるTS、DPD遺伝子発現と抗腫瘍効果の関連

を検討した。

## 検討1：大腸癌原発巣と転移巣におけるTS、DPD遺伝子発現

### I. 対象

2000年1月~2003年12月の間に慈生会等潤病院にて術前化学療法を施行せずに手術が行われた同時性肝転移を伴う進行大腸癌12例を対象とした。男性8例、女性4例、平均年齢は65歳(39~77歳)で、結腸癌9例、直腸癌3例であった。肝切除の術式は、葉切除2例、区域切除2例、亜区域切除1例、部分切除7例であった。

### II. 方法

#### 1. 検体採取とTS、DPD mRNA発現量の測定法

治療目的に切除された標本の腫瘍部から5 mm角の組織検体を採取し、直ちに冷凍保存後、組織中のTS、DPD mRNA発現量を測定した。なお、本研究は慈生会等潤病院倫理委員会に承認されたものであり、患者から書面による同意を得た上で行った。測定方法の詳細を以下に示す。

#### 2. 半定量的RT-PCR法

切除された組織検体の一部(約20 mg)を直ちに冷凍保存後、RNA抽出キット(RNeasy MiniKit: (QIAGEN Inc. Chatsworth, CA, USA)でRNAを抽出し、逆転写酵素でRNAからcDNAを合成し<sup>10)</sup>、これを用いてRT-PCRを施行した。Table 1に用いたprimer/probeの塩基配列を示す<sup>7,11)</sup>。PCR産物をアガロースゲル上に電気泳動しethidium bromideにて染色後UVイルミネーターで可視化し、TS、DPD mRNAとGAPDH mRNAの発現量の比(TS/GAPDHまたはDPD/GAPDH)により半定量した(Fig. 1)。

#### 3. 統計学的推計

原発巣と肝転移巣における遺伝子発現の比較はWilcoxon検定を、原発巣と肝転移巣の遺伝子発現の関連についてはPearsonの相関係数を用い検討した。 $p < 0.05$ を有意差ありとした

### III. 結果

#### 1. 原発巣と肝転移巣におけるTS、DPD mRNA発現の差異

原発巣と肝転移巣におけるTS、DPD mRNA発現の差異をFig. 2に示す。TS mRNA遺伝子発現の中央値は、原発巣1.09(0.41~1.59)、肝転移巣0.89(0.17~1.27)であり、原発巣と比較して肝転移巣は有意に低値であった( $P=0.0047$ )。また、DPD mRNA遺伝子発現の中央値は、原発巣0.48(0.29~1.32)、肝転移巣0.87(0.32~2.57)であり、原発巣と比較して肝転移巣は有意に高値であった( $P=0.0076$ )。

#### 2. 原発巣と肝転移巣におけるTS、DPD mRNA発現の関連

原発巣と肝転移巣における TS, DPD mRNA 発現の相関を Fig. 3 に示す。TS, DPD mRNA 発現ともに、原発巣と肝転移巣における発現に正の相関を認めた (TS mRNA: 相関係数 0.735,  $p=0.0065$ , DPD mRNA: 相関係数 0.859,  $p=0.0003$ )。

## 検討2: 大腸癌組織の TS・DPD mRNA 発現量と転移性大腸癌に対するフツ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果<sup>12)</sup>

### I. 対象

1998年7月から2000年12月までの期間に東京医科歯科大学消化器外科において切除不能転移性大腸癌に対してテガフルウラシル (UFT)・ロイコボリン (LV) の

経口治療が行われた37症例を対象とした。全例が原発巣を切除後に、転移性病巣に対して first-line 化学療法として治療が行われた症例であり、(1) PS score が2以上であること<sup>13)</sup>, (2) 計測可能な病変が少なくとも1つあること, (3) 血液学的検査によって十分な肝・腎機能が確認されていること, (4) 3ヶ月以上の余命が期待できることを適格基準として満たしていた。平均年齢は62歳(38~80歳)で、同時性転移9症例、異時性転移28症例であった。

### II. 方法

#### 1. 治療法と治療効果判定

化学療法は、UFT400 mg/m<sup>2</sup>/day および LV15 mg/body を5日間経口投与のあと2日間休薬した。これを4回(28日間)繰り返し1サイクルとした<sup>14)</sup>。治療前および2サイクル(8週)の治療毎に CT による計測可能病変の評価を行い、UICC ガイドライン<sup>15)</sup>に基づいて治療効果判定を行った。2症例は CR, 10症例は PR, 16症例は NC, 9例は PD であり、奏効率は32.4% (12/37)であった。

#### 2. 検体採取と TS・DPD mRNA 発現量の測定法

原発巣切除術時に大腸癌より約20 mg の検体を採取し、速やかに液体窒素で迅速凍結し-80°C で保存した。術前化学療法を行った症例はなかった。TS・DPD mRNA 発現量の測定法は、先に述べた半定量的 RT-PCR 法により、標的遺伝子の TS・DPD mRNA と内部標識の GAPDH mRNA の発現量の比を算出した<sup>7,11)</sup>。

#### 3. 統計学的推計

奏効率の比較には two sided Fisher's exact test を用いた。生存曲線は Kaplan-Meier 法により描出し、log-rank test により差を検定した。 $p < 0.05$  を有意差ありとした。

Table 1. Primer sequence of TS, DPD and GAPDH

mRNA	Bases	Sequences	Product size (bp)
TS	989-1010	CAATCAGATCGAGCCACTGAAA	579
	1567-1547	GTGTTACTCAGCTCCCTCAGA	
DPD	2516-2536	TCCTCCAGGTATGCAGTGCCA	514
	3029-3009	GTTATGGTGGCAGGTGGGTT	
GAPDH	483-494	CAACAGCCTCAAGATCATAAGC	328
	810-790	TTCTAGACGGCAGGTCAGGTC	

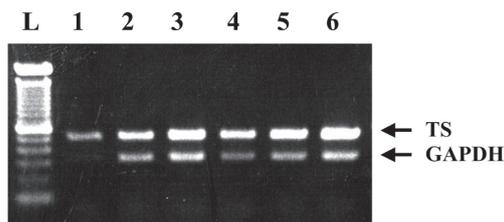


Fig. 1. Bands of TS (upper) and GAPDH (lower) are detected on 2% agarose gel. To identify the linear amplification phase, polymerase chain reaction was performed using three different concentrations of cDNA for each sample (lanes 1, 2 and 3 for one case and 4, 5 and 6 for another case).

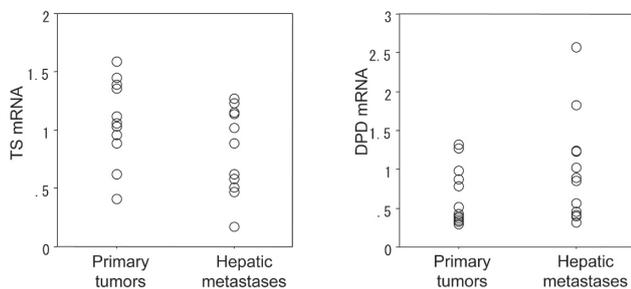


Fig. 2. A comparison of TS and DPD mRNA levels between primary tumors and hepatic metastases in 12 cases. The TS mRNA level in hepatic metastatic foci was significantly lower than that in primary tumors (median TS mRNA 0.89 and 1.09 respectively,  $p=0.0047$ , Wilcoxon signed-ranks test). The DPD mRNA level in hepatic metastatic foci was significantly higher than that in primary tumors (median DPD mRNA 0.87 and 0.48 respectively,  $p=0.0047$ ).

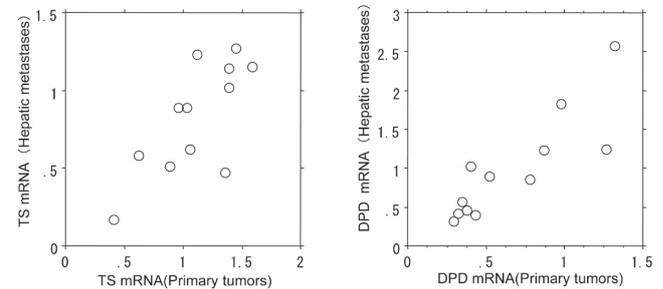


Fig. 3. Relationship of TS and DPD mRNA levels between primary tumors and corresponding hepatic metastases. Both TS and DPD mRNA levels had linear relationship between primary tumors and hepatic metastases (TS:  $\rho=0.735$ ,  $p=0.0065$ ; DPD:  $\rho=0.859$ ,  $p=0.0003$ ; Pearson's correlation coefficient).

### III. 結果

#### 1. TS, DPD mRNA発現からみた腫瘍縮小効果

37例全例でTS, DPD mRNA発現量の測定が可能であり, 各々中央値は0.49 (0.15~1.44), 1.02 (0.21~1.59)であった. カットオフ値をTS mRNA 0.5, DPD mRNA 1.0として, mRNA発現を低発現, 高発現に分類した.

TS mRNA発現別に奏効率をみると, TS高発現 (TS mRNA  $\geq 1.0$ ) では15.8% (3/19)に対して, TS低発現 (TS mRNA  $< 1.0$ ) では50.0% (9/18)と, TS高発現に比較してTS低発現で有意に高い奏効率がえられた ( $P=0.038$ ) (Table 2). 一方, DPD高発現 (DPD mRNA  $\geq 0.5$ ) の18例には奏効例を認めず, DPD低発現 (DPD mRNA  $< 0.5$ ) では63.2% (12/19)と高い奏効率が認められた ( $P < 0.0001$ ) (Table 2).

つぎにTS, DPD mRNA発現の組み合わせで奏効率をみると, TS低発現かつDPD低発現の12例では奏効例を9例 (奏効率75.0%) に認めたが, TS高発現またはDPD高発現の25例では奏効例は3例 (奏効率12.0%) に過ぎなかった ( $P=0.0003$ ) (Table 2).

#### 2. TS, DPD mRNA発現からみた生存期間

TS低発現の生存期間中央値 (MST) は12.3ヶ月 (3.1~28.3ヶ月) に対して, TS高発現のMSTは8.4ヶ月 (3.3~17.3ヶ月) と, TS低発現例で生存期間の延長が認められた ( $P=0.0069$ ). また, DPD低発現のMSTは14.4ヶ月 (8.7~28.3ヶ月) に対して, DPD高発現のMSTは7.4ヶ月 (3.0~11.2ヶ月) と, DPD低発現例で生存期間の延長が認められた ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 4).

TS, DPD mRNA発現の組み合わせで生存期間を検討すると, TS低発現かつDPD低発現の症例ではMSTは16.3ヶ月 (8.7~28.3ヶ月) であったが, TS高発現またはDPD高発現の症例では8.4ヶ月 (3.1~17.3ヶ月) であった ( $P < 0.0001$ ) (Fig. 5).

### 考案

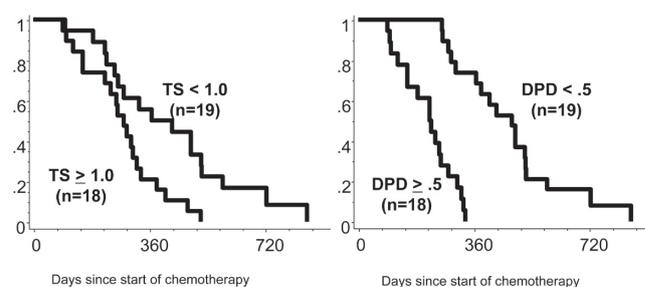
今回の検討において, TS, DPD遺伝子発現は大腸癌原発巣と肝転移巣において正の相関を認め, 肝転移巣のTS, DPD発現は原発巣のそれを反映していた. また, 原発巣のTS, DPD遺伝子発現から, 転移巣におけるUFT/LV療法の治療効果を予想できる可能性が示唆された.

興味深いことに, 原発巣に比較して肝転移巣ではTS遺伝子は有意に発現が低く, DPD遺伝子は高発現であった. 大腸癌原発巣, 転移巣の125病巣におけるTS遺伝子発現をmRNAレベルで検討したYamadaらの報告<sup>16)</sup>では, 原発巣0.98, 肝転移0.70, リンパ節転移1.92, 肺転移3.42 (中央値) と原発巣・転移巣間で発現に差を認め, 肝転移巣では原発巣に比較して低値であったことはわれわれの結果に一致している. また, Gorlickらも, 同様にRNAレベルで肺転移のTS発現は

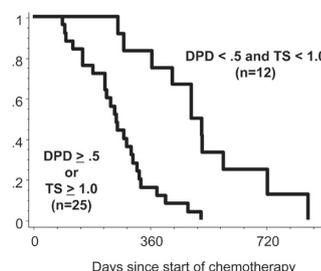
肝転移に比較して高値であることを報告し<sup>17)</sup>, さらに, Cascinuらは, 免疫染色による蛋白レベルで腹腔内腫瘍 (原発巣を含む) は肝転移に比較してTS高発現であったとしている<sup>18)</sup>. DPD遺伝子発現に関しては, 同時性肝転移12症例における大腸癌原発巣と肝転移巣の

**Table 2.** Summary of response data for tumors with different expression of TS and DPD mRNA

Gene expression status	responder	non-responder	P
low TS (TS < 1.0)	9	9	
high TS (TS > 1.0)	3	16	0.0382
low DPD (DPD < 0.5)	12	7	
high DPD (DPD > 0.5)	0	18	<0.0001
low TS and low DPD	9	3	
high TS or high DPD	3	22	0.0003



**Fig. 4.** Cumulative survival curves (Kaplan-Meier) for patients with TS and DPD mRNA levels above or below the nonresponse cutoff and for patients with TS and DPD mRNA levels above and below the response cutoff. The median survival was 8.4 months in patients with high TS mRNA levels, but only 12.3 months in patients with low expression ( $p=0.0069$ ; log-rank test). Patients with low DPD mRNA levels survived longer than those with high DPD mRNA levels (median:14.4 months versus 7.4 months,  $p < 0.0001$ ; log-rank test).



**Fig. 5.** Cumulative survival curves (Kaplan-Meier) for patients with both low DPD and low TS mRNA levels and those with high DPD or high TS mRNA levels. The median survival time was 16.3 months in patients with both low DPD and low TS mRNA levels, which was significantly longer than the 8.4 months in patients with other combinations of DPD and TS mRNA levels ( $p < 0.0001$ ; log-rank test).

DPD 遺伝子発現を検討したShirotaらの報告でも、原発巣に比較して肝転移巣ではDPD 遺伝子発現は高発現であった<sup>19</sup>。McLeodらは、酵素活性およびWestern blot法による蛋白レベルの検討を原発巣と肝転移巣で行い、原発巣に比較して肝転移巣でDPD 発現は高値であったと報告した<sup>20</sup>。また、Etienneらも、53例の原発巣と103例の肝転移巣におけるDPD 活性を比較し、有意に肝転移巣でDPD 活性が高いことを示した ( $P < 0.001$ )。すなわち、われわれの原発巣に比較して肝転移巣ではTS 発現が減弱しDPD 発現は増強していた事実は、既報の諸家の報告と矛盾していない。

Yamadaらは、先述の大腸癌原発巣、転移巣125病巣の比較において、原発巣と転移巣のTS 遺伝子発現に相関はなかったと報告している<sup>16</sup>。しかし、この報告においてはTS 発現の異なる肝転移巣、リンパ節転移巣、肺転移巣をまとめて転移巣として解析している。われわれは、肝転移巣に限って同一症例の原発巣におけるTS 遺伝子発現の相関を検討したところ、原発巣のTS 遺伝子発現は肝転移巣における発現と正の相関関係を認めた。今回の検討から、少なくとも肝転移巣のTS 遺伝子発現は原発巣における発現を反映していることはいえよう。また、Etienneらは、原発巣と肝転移巣(同時性90例、異時性13例)のTS 活性に弱い相関関係があったことを示している<sup>21</sup>。リンパ節転移、肺転移の病巣におけるTS 遺伝子発現を同一症例における原発巣のTS 発現と比較検討することは、今後の課題である。DPD 発現に関しては、Etienneらが原発巣と肝転移巣のDPD 活性を比較し、極めて弱ながらも相関を報告している<sup>21</sup>。

原発巣と転移巣間でTS、DPD 遺伝子発現のレベルが異なっている理由に関しては、現時点では不明である。可能性としては、「Seed and Soil」理論があげられよう<sup>16</sup>。癌細胞という「種」が同一であっても、転移先の「土壌」を反映して、転移癌細胞の形質が変化していく可能性がある。肝臓は生体内で最もDPD 酵素活性が高い臓器であるため<sup>22</sup>、これを反映して肝転移巣におけるDPD 遺伝子発現が高まった可能性も否定できない。さらに、TS 遺伝子発現は、上流のE2F1などの細胞周期調節因子により調節されていることが報告さ

れている<sup>23, 24</sup>。転移先において何らかの遺伝子発現の調節機構が働いている可能性も考えるべきであろう。

フッ化ピリミジン系抗癌剤の標的となる転移巣におけるTS、DPDの発現の多寡がその転移巣の治療効果を決定することは、諸家の報告に一致をみている<sup>6, 8, 18, 25-27</sup>。今回の検討では、大腸癌原発巣におけるTS、DPD 遺伝子発現が、転移再発病巣に対して行ったフッ化ピリミジン系抗癌剤の効果予測に有用な可能性が示唆された。

原発巣のTS 発現から転移再発巣における5-FU系抗癌剤の治療効果を検討した報告をTable 3にまとめた。核内のTS 発現を免疫染色で評価したWongらの報告では、原発巣のTS 発現が低い症例で転移巣における治療効果が得られていた<sup>28</sup>。しかし、他の4つの報告<sup>29-32</sup>では、原発巣のTS 発現と転移再発巣の治療効果の関連を認めていない。これら4つの報告では、いずれも細胞質内のTS 発現を免疫染色で評価している。むしろ、Johnstonらの報告では、原発巣の高TS 発現症例で転移巣における治療効果が得られていた<sup>32</sup>。このように、原発巣のTS 発現が転移巣のフッ化ピリミジン系抗癌剤への反応性を反映するか否かは、controversialな状況であった。われわれの原発巣のTS 発現をmRNAにより評価した報告<sup>12</sup>は、原発巣のTS 発現の多寡が転移巣のフッ化ピリミジンに対する治療効果予測の指標になるか否か、そして、適切なTS 発現の評価方法は何か、すなわち、遺伝子発現レベルか免疫染色レベルか、に大きな疑問を投げかけた。最近、Popat<sup>33</sup>らは、進行再発大腸癌におけるTS 発現と予後に関して、われわれの報告を含む13論文、887症例のmeta-analysisを行った<sup>33</sup>。この結果では、TS 発現を転移巣で評価した場合のハザード比は2.39 (95%信頼域, 1.43-4.01)、原発巣で評価した場合のハザード比は1.33 (95%信頼域, 1.07-1.66)と、TS 発現の評価部位によらず、TS 高発現例は予後が不良であった。すなわち、転移再発巣に対する化学療法の前後は、原発巣におけるTS 発現からも予測可能と考えられる。また、評価方法に関しては、免疫染色ではハザード比は1.35 (95%信頼域, 0.95-1.91)であったが、遺伝子発現ではハザード比は2.11 (95%信頼域, 1.51-2.95)とTS 高発現

**Table 3.** Prediction of efficacy of 5-FU based chemotherapy in terms of TS expression in primary colorectal cancer

Author	Year	Method	Response rate			Survival time		
			High TS	Low TS	P	High TS	Low TS	P
Findlay	1997	IHC*	-	-	ns	-	-	0.35
Paradiso	2000	IHC*	15%	30%	<0.04	13 months	12 months	ns
Aschle	2000	IHC*	53%	37%	0.47	-	-	-
Wong	2001	IHC*	17%	32%	0.04	-	-	-
Ichikawa	2003	RT-PCR	16%	50%	0.038	8 months	12 months	<0.01
Johnston	2003	IHC*	11%	2%	0.084	14 months	17 months	ns

IHC\*: Immunohistochemistry

例は予後が不良であった。免疫染色ではハザード比の95%信頼域が1.00をはさんでいる事実は、免疫染色の客観的評価の困難さを示唆している可能性もある。

大腸癌におけるフッ化ピリミジンの治療効果とDPD発現に関する検討は少ない。転移巣におけるDPD mRNAの発現がMayo regimenでの治療効果と関連するとSalongaらは報告したが<sup>8)</sup>、転移巣におけるDPD活性と5-FU持続点滴療法での治療効果を検討した報告では、奏効例と非奏効例におけるDPD活性は162~182 pmol/min/mg proteinと差を認めなかった<sup>21)</sup>。今後、DPD発現とフッ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果の関連に関しては、前向き研究で検証する必要がある。

われわれの今回の研究は、TS、DPD遺伝子発現を組み合わせることにより、TSまたはDPD遺伝子発現単独の場合よりも、奏効例の予測効率が高まる可能性を示した。TS、DPD遺伝子発現に加え、Salongaらは、thymidine phosphorylase (TP) 遺伝子発現を、Ichikawaらは、OPRT遺伝子発現を加味する重要性を報告している<sup>8,34)</sup>。今後の展開としては、さらに多数の遺伝子発現を包括的に検討するDNAアレイなどの新規測定法の導入が、正確なフッ化ピリミジン系抗癌剤の効果予測には必要と考えられる。

## 謝 辞

稿を終えるにあたり、埼玉医科大学外科学(消化器・一般外科部門)平山廉三教授の御高閲ならびに市川度助教授の御指導に心から感謝いたします。慈生会等潤病院 宮永忠彦理事長、仁瓶善郎院長、代田喜典先生の御教導に深謝致します。

## 引用文献

- 1) Moertel CG. Chemotherapy for colorectal cancer. *N Engl J Med* 1994;330:1136-42.
- 2) Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS, Huster WJ, Diasio RB. Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* 1987;47:2203-6.
- 3) Langenbach RJ, Danenberg PV, Heidelberger C. Thymidylate synthase: mechanism of inhibition by 5-fluoro-2[prime]-deoxyuridylylate. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;48:1565-71.
- 4) Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johnstone PG, van Groeningen CJ, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299-305.
- 5) Aschele C, Lonardi S, Monfardini S. Thymidylate Synthase expression as a predictor of clinical response to fluoropyrimidine-based chemotherapy in advanced colorectal cancer. *Cancer Treat Rev* 2002;28:27-47.
- 6) Johnston PG, Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD, Allegra CJ, Danenberg PV, et al. Thymidylate synthase gene and protein expression correlate and are associated with response to 5-fluorouracil in human colorectal and gastric tumors. *Cancer Res* 1995;55:1407-12.
- 7) Uetake H, Ichikawa W, Takechi T, Fukushima M, Nihei Z, Sugihara K. Relationship between intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity and gene expression in human colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 1999;5:2836-9.
- 8) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 2000;6:1322-7.
- 9) Fidler IJ. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003;3:453-8.
- 10) Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987; 162:156-9.
- 11) Ishikawa Y, Kubota T, Otani Y, Watanabe M, Teramoto T, Kumai K, et al. Dihydropyrimidine dehydrogenase activity and messenger RNA level may be related to the antitumor effect of 5-fluorouracil on human tumor xenografts in nude mice. *Clin Cancer Res* 1999;5:883-9.
- 12) Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei Z, et al. Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:786-91.
- 13) Zubrod C, Schneiderman M, Frei J. Appraisal of methods for study of Chemotherapy of cancer in man: comparative therapeutic trial of nitrogen Mustard thiethylene thiophosphoramide. *J Chron Dis* 1960;11:7-13.
- 14) Ichikawa W, Nihei Z, Uetake H, Yamada H, Shirota Y, Sugihara K. UFT plus leucovorin for metastatic colorectal cancer: Japanese experience. *Oncology(Huntingt)* 2000;14:41-3.
- 15) Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1977; 35:292-8.

- 16) Yamada H, Ichikawa W, Uetake H, Shiota Y, Nihei Z, Sugihara K, et al. Thymidylate synthase gene expression in primary colorectal cancer and metastatic sites. *Clin Colorectal Cancer* 2001;1: 169-73.
- 17) Gorlick R, Metzger R, Danenberg KD, Salonga D, Miles JS, Longo GS, et al. Higher levels of thymidylate synthase gene expression are observed in pulmonary as compared with hepatic metastases of colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 1998;16:1465-9.
- 18) Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G, et al. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 1999;5:1996-9.
- 19) Shiota Y, Ichikawa W, Uetake H, Yamada H, Nihei Z, Sugihara K. Intratumoral dihydropyrimidine dehydrogenase messenger RNA level reflects tumor progression in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol* 2002;9:599-603.
- 20) McLeod HL, Sludden J, Murray GI, Keenan RA, Davidson AI, Park K, et al. Characterization of dihydropyrimidine dehydrogenase in human colorectal tumours. *Br J Cancer* 1998;77:461-5.
- 21) Etienne MC, Chazal M, Laurent-Puig P, Magne N, Rosty C, Formento JL, et al. Prognostic value of tumoral thymidylate synthase and p53 in metastatic colorectal cancer patients receiving fluorouracil-based chemotherapy: phenotypic and genotypic analyses. *J Clin Oncol* 2002;20:2832-43.
- 22) Harris BE, Song RL, Soong SJ, Diasio RB. Circadian variation of 5-fluorouracil catabolism in isolated perfused rat liver. *Cancer Res* 1989;49:6610-4.
- 23) Banerjee D, Gorlick R, Liefshitz A, Danenberg K, Danenberg PC, Danenberg PV, et al. Levels of E2F-1 expression are higher in lung metastasis of colon cancer as compared with hepatic metastasis and correlate with levels of thymidylate synthase. *Cancer Res* 2000;60:2365-7.
- 24) DeGregori J, Kowalik T, Nevins JR. Cellular targets for activation by the E2F1 transcription factor include DNA synthesis- and G1/S-regulatory genes. *Mol Cell Biol* 1995;15:4215-24.
- 25) Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 1997;15:3223-9.
- 26) Kornmann M, Link KH, Lenz HJ, Pillasch J, Metzger R, Butzer U, et al. Thymidylate synthase is a predictor for response and resistance in hepatic artery infusion chemotherapy. *Cancer Lett* 1997;118: 29-35.
- 27) Aschele C, Debernardis D, Casazza S, Antonelli G, Tunesi G, Baldo C, et al. Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 1999;17:1760-70.
- 28) Wong NA, Brett L, Stewart M, Leitch A, Longley DB, Dunlop MG, et al. Nuclear thymidylate synthase expression, p53 expression and 5FU response in colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 2001;85:1937-43.
- 29) Findlay MP, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 1997;75:903-9.
- 30) Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2000;6:4797-802.
- 31) Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J, et al. Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 2000;82:560-7.
- 32) Johnston PG, Benson AB 3rd, Catalano P, Rao MS, O'Dwyer PJ, Allegra CJ. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer: lack of correlation with outcome and response to fluorouracil in metastatic disease sites. *J Clin Oncol* 2003;21:815-9.
- 33) Popat S, Matakidou A, Houlston RS. Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 2004;22:529-36.
- 34) Ichikawa W, Uetake H, Shiota Y, Yamada H, Takahashi T, Nihei Z, et al. Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 2003;89:1486-92.