

Thesis

組織型別にみた胃癌におけるThymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase発現の検討

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)

須藤 謙一

Gene Expression of Thymidylate Synthase and Dihydropyrimidine Dehydrogenase in Gastric Cancer in Terms of Histological Type

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

S-1 is a new oral fluorinated pyrimidine, in which tegafur (FT) has been combined with two substances as modulator; gimeracil (CDHP), and oteracil potassium (Oxo), in a molar ratio of 1:0.4:1 (FT:CDHP:Oxo). 5-FU is catabolized to dihydrofluorouracil by the first and rate-limiting enzyme, dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD). The main mode of action of 5-FU is thought to be through its active metabolite suppresses thymidylate synthase (TS), that subsequently inhibit DNA syntheses. The predictive values of TS and DPD gene expressions in primary gastric cancer in terms of differentiated and undifferentiated type cases were also evaluated and the 2 gene expressions were retrospectively evaluated in patients with gastric cancer treated by a regimen containing S-1. The study population consisted of 78 patients with advanced gastric cancer who underwent surgical treatment and without S-1 chemotherapy 27 patients treated by S-1-alone for metastatic gastric cancer. Laser-captured micro dissection of malignant tissue was performed in formalin-fixed, paraffin-embedded specimens. After extraction RNA, TS and DPD gene expressions were measured by the real-time reverse transcriptional PCR method. TS gene expression was higher in differentiated type cases than undifferentiated type cases ($p < 0.001$). However, DPD gene expression of undifferentiated type cases was statistically higher than that of differentiated type cases ($p < 0.05$). There was no statistical difference in DPD gene expression in term of response in 27 cases treated with S-1. TS mRNA of responding tumors was statistically lower than that of nonresponding ones when treated with S-1 ($p < 0.005$), and patients with low TS gene expression survived longer than those with high TS gene expression, with statistical significance ($p < 0.0001$). TS and DPD gene expressions in primary gastric cancer differ according to degree of histological differentiation. In addition S-1 treatment effect for metastatic gastric cancer might be determined by depending on the amount of TS expressions, regardless of DPD gene expressions.

はじめに

検診により早期発見の機会が増加したものの、日常臨床の場では、治癒切除術後の再発症例や来院時切除不能の転移を伴う進行胃癌に遭遇する。これらの切

医学博士 甲第966号 平成17年2月18日(埼玉医科大学)

除不能の転移・再発症例に対しては化学療法が選択される。日本胃癌学会による「胃癌治療ガイドライン(改第2版・2004年3月版)」においては、「胃癌に対する標準的化学療法として、フッ化ピリミジン(5-FU等)」とcisplatin(CDDP)を含む化学療法が有望ではあるが、国内外の臨床試験成績からも現段階で特定のレジメン

III. 結果

腫瘍細胞におけるTS遺伝子発現は、分化型癌では2.96(中央値)(1.15~13.37)に対して、未分化型癌では2.26(中央値)(0.85~4.35)と有意に高値を呈した(P=

Table 1. Patient characteristics

No of patients	78
Age(years)	
Median	63
Range	32~87
Gender	
Male	53
Femal	25
Tumor Size)cm)	
≤ 6	48
> 6	30
Histological type	
Differentiated	42
Undifferentiated	36
Depth of tumor invasion	
T2	35
T3	30
T4	13
Lymph node metastasis	
N0	19
≥ N1	59
Hepatic metastasis	
Yes	8
No	70
Peritoneal dissemination	
Yes	12
No	66
Stage	
I	16
II	15
III	24
IV	23

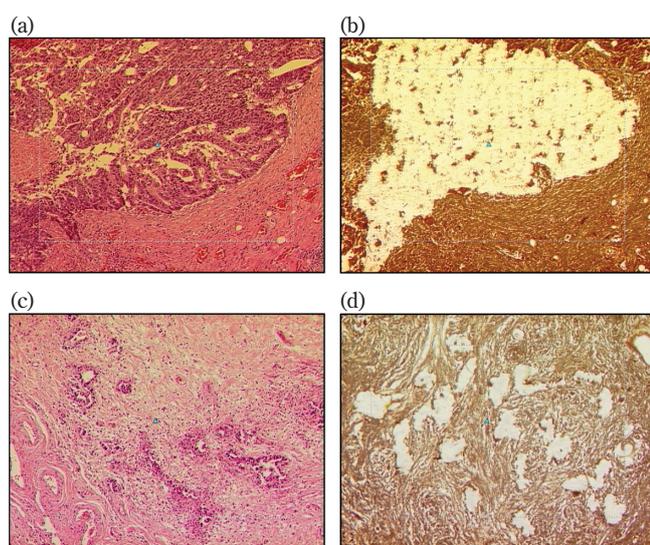


Fig. 2. Laser-captured microdissection of cancer tissues in differentiated gastric adenocarcinoma. (a) Nuclear fast red stain. (b) After laser captured microdissection of malignant tissue. Original magnification, 200X. Laser-captured microdissection of cancer tissues in undifferentiated gastric adenocarcinoma. (c) Nuclear fast red stain. (d) After laser captured microdissection of malignant tissue. Original magnification, 200X.

0.0014) (Fig. 3). 一方、腫瘍細胞におけるDPD遺伝子発現は、分化型癌では0.99(中央値)(0.43~1.97)に対して、未分化型癌では1.23(中央値)(0.42~6.93)と有意に高値を呈した(P=0.014) (Fig. 3).

X軸にDPD発現を、Y軸にTS発現をとり、組織型別に遺伝子発現をプロットすると、TS遺伝子に関しては分化型癌で、DPD遺伝子に関しては未分化型癌で幅広く分布していた (Fig. 4). しかし、分化型癌のDPD遺伝子と未分化型癌のTS遺伝子の分布は狭く、いずれの組織型においてもTS、DPD遺伝子共に高発現の症例は存在しなかった。

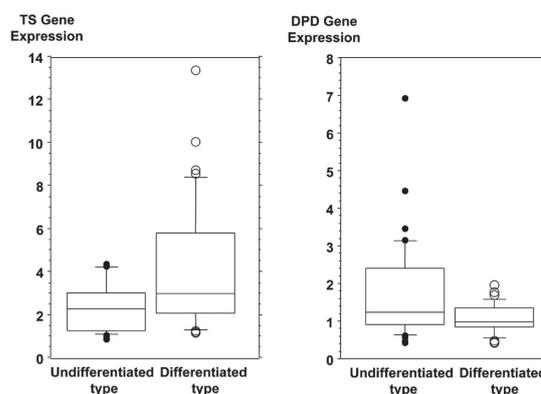


Fig. 3. Distribution of TS and DPD gene expression according to malignant tissues. Boxes indicate the first and third quartiles(median inside); bars represent the range of values falling within 1.5-fold the interquartile. Closed and open circles reoresent outliers(> 1.5-fold the interquartile range)for undifferentiated and differentiated tyoe cases, respectively.

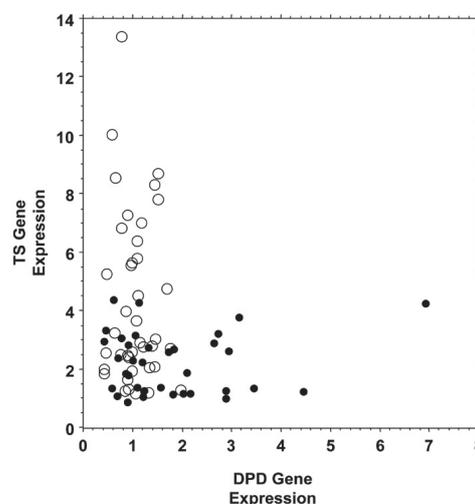


Fig. 4. DPD gene expression plotted against TS expression in malignant tissues obtained from 78 primary gastric cancer in relation to differentiation. Closed and open circles indicate undifferentiated and differentiated types, respectively.

【検討2】切除不能再発胃癌症例におけるTS, DPD 遺伝子発現とS-1単剤による治療効果

I. 対象

1999年1月~2000年3月の間に埼玉医科大学消化器一般外科(II)において、切除不能進行再発胃癌に対してS-1(80 mg/m²/日, 4週投与2週休薬)の経口治療が行われた27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) Performance status (PS) scoreが2以上であること²¹⁾, (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。患者背景因子を示す(Table 2)。平均年齢は58歳(29~78歳)で、分化型腺癌10症例、未分化型腺癌17症例であった。

II. 治療法と治療効果判定

化学療法は、S-1 80 mg/m²/日を4週間投与した後2週間休薬し、これを1サイクルとした。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²²⁾に基づいて治療効果判定を行った。1症例はcomplete response (CR), 7症例はpartial response (PR), 13症例はno change (NC), 6例はprogressive disease (PD)であり、奏効率は29.6% (8/27)であった。

III. TS, DPD mRNA発現量の測定法

切除標本を緩衝化10%中性ホルマリンで72時間固定し、パラフィン包埋を作製。5μm薄切切片を病理組織学的検索に、10μm薄切切片をDTP法に供し¹⁸⁻²¹⁾。腫瘍細胞における、TS mRNAおよびDPD mRNAの発現を、β-actin mRNA発現を内部標識として半定量した。

遺伝子発現の比較にはMann-Whitney test, 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(JMP software version 5.01 (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA)). p<0.05を有意差ありとした。

IV. 結果

1. 奏効度と遺伝子発現 (Fig. 5)

TS遺伝子発現は、奏効例では1.58(中央値)(0.85~2.66)に対して、非奏効例では2.88(中央値)(1.06~13.37)と有意に高値を呈した(P<0.005)。一方、DPD遺伝子発現は、奏効例1.22(中央値)(0.84~2.16)、非奏効例0.99(中央値)(0.42~6.93)と奏効度により差を認めなかった(P=0.41)。

2. 生存期間と遺伝子発現 (Fig. 6)

全27例におけるTS, DPD遺伝子発現の中央値各々2.61, 1.00をカットオフ値として、遺伝子発現を高発現と低発現に分類した。TS高発現(>2.61)の14症例の生存期間中央値は4.0ヶ月(2.1~8.6ヶ月)に対して、TS低発現(≤2.61)の13症例の生存期間中央値は9.3ヶ月(3.2~23.0ヶ月)と生存期間の延長を認めた(P<0.0001)。しかし、DPD遺伝子発現の程度により、生存期間に差を認めなかった。

Table 2. Patient characteristics

No of patients	27
Age(years)	
Median	58
Range	29~78
Gender	
Male	20
Femal	7
PS	
0	19
1	5
2	3
Histological type	
Differentiated	10
Undifferentiated	17
Metastasis	
Synchronous	10
Metachronous	17
Advant chemotherapy	
Yes	14
No	13
Metastatic site	
Liver	8
Lymph node	15
Lung	5
Other	5

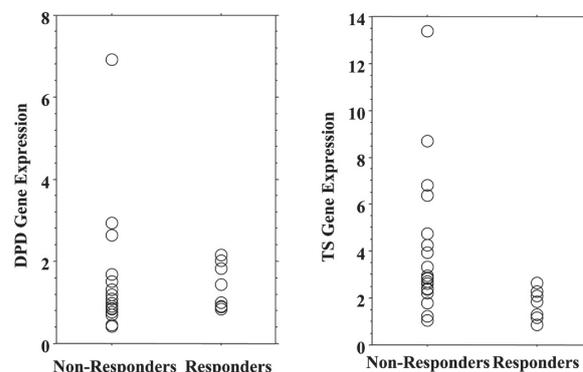


Fig. 5. DPD and TS mRNA in 27 primary gastric cancer treated with S-1 alone in relation to nonresponse or response. There was no statistical difference in DPD gene expression among responding and nonresponding tumours. Median values of TS mRNA were 1.58 and 2.88 for responding tumours and nonresponding tumours, respectively (Mann-Whitney U test; P<0.005).

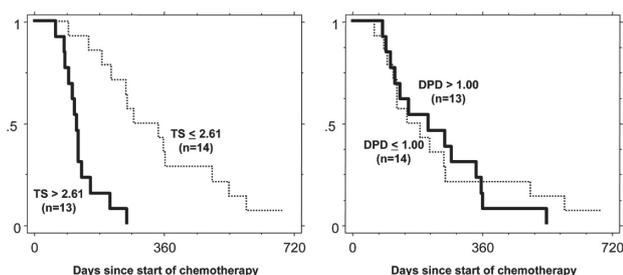


Fig. 6. Cumulative survival curves (Kaplan-Meier) when treated with S-1 alone.

考案

従来のフッ化ピリミジン系抗癌剤では治療効果の得られなかった未分化型腺癌においてS-1が有効な機序のひとつとして、未分化型腺癌ではDPDは低発現から高発現の症例が存在するが、TS発現に関しては低発現の症例が多いことが考えられた。

また、切除不能転移再発胃癌に対するS-1の治療効果は、腫瘍内のDPD遺伝子発現とは無関係に腫瘍内TS発現により決定される可能性が示された。

Ichikawaらは、転移性大腸癌のフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する治療効果予測に、原発巣におけるTS発現が有用なことを報告した¹¹⁾。5-FU+CDDP療法を行った進行再発胃癌の治療効果においても、原発巣におけるTS発現と関連することが報告されている²³⁾。今回のDPD阻害剤であるCDHPを含有するS-1においても、5-FU+CDDP療法と同様に、原発巣におけるTSが低発現症例で転移巣における奏効が得られやすく、生存期間が延長していた。MiyamotoらはS-1単剤治療の行われた進行再発胃癌症例を対象として、TSポリクローナル抗体を用いて生検材料の免疫組織学的染色を行い、治療効果との関連を検討している²⁴⁾。この報告では、TS発現により奏効率と治療効果に差を認めておらず、われわれの結果と異なる。この原因としては、Miyamotoらは免疫組織学的染色によりTS蛋白の発現を測定しているが、われわれは客観的評価が可能で精度の高いリアルタイムRT-PCR法によりTS遺伝子発現を測定していることが挙げられよう¹⁹⁾。

Ishikawaらは、5-FU感受性試験において胃癌組織内のDPD遺伝子発現が低いほど高感受性であることを示した^{25, 26)}。これは、Ichikawaらの転移性大腸癌のフッ化ピリミジン系抗癌剤に対する治療効果予測に原発巣におけるDPD遺伝子発現が有用な報告と一致している¹¹⁾。しかし、今回のS-1による治療効果との関連においては、DPD遺伝子発現によらず奏効度、生存期間に差を認めなかった。これは、DPD阻害剤を含有しないフッ化ピリミジン系抗癌剤の治療効果は腫瘍内のDPD発現の多寡により決定されるが、S-1のように強力なDPD阻害剤を含有するフッ化ピリミジン系抗

癌剤では腫瘍内のDPD活性が阻害されるため、DPDが高発現の腫瘍でも抗腫瘍効果が得られる可能性を示すものである。MiyamotoらはS-1単剤治療の行われた進行再発胃癌症例を対象として、DPDポリクローナル抗体を用いて生検材料の免疫組織学的染色を行い、DPD高発現症例でも治療効果の認められることを報告しており、われわれの結果と一致している²⁴⁾。今回の検討では腫瘍細胞内におけるDPD遺伝子発現からのみ治療効果の関連を検討したが、北郷らの胃癌に対する免疫組織化学的染色の報告では、腫瘍細胞のみならず間質細胞にもDPD蛋白発現を認めており、今後、間質細胞におけるDPD発現と治療効果の関連性についても検討を行う必要がある^{17, 27)}。

さて、ここでS-1単剤では抗腫瘍効果の得られにくい高TS発現症例をどう治療するかという問題が生じる。Banerjeeらは、細胞周期調節因子であるE2F-1遺伝子をtransfectした株化肉腫細胞の5-FU感受性に関して興味深い報告を行っている。E2F-1遺伝子のtransfectによりTSは高発現になると同時に、5-FUに対しては耐性化しirinotecanに対しては高感受性となった^{28, 29)}。IrinotecanはDNA鎖のトポロジーに関連するtopoisomerase-1 (Topo-1) を標的とする抗癌剤であり、Topo-1高発現の腫瘍細胞でirinotecanに対して感受性となる³⁰⁾。Ichikawaらは大腸癌において腫瘍内のTS遺伝子発現とTopo-1遺伝子発現は正の相関にあることを報告した^{31, 32)}。これらの事実は、高TS発現腫瘍でirinotecanに感受性である可能性を示唆している。転移再発胃癌に対するS-1+irinotecan併用療法の治療効果をTS遺伝子発現からみると、TS遺伝子発現の多寡によらず腫瘍縮小や生存期間に差を認めなかった³³⁾。すなわち、高TS発現の腫瘍に対しては、irinotecanが有用と考えられる。

胃癌の組織型別に腫瘍細胞におけるTS、DPD遺伝子発現をみると、TS遺伝子発現は分化型癌で高く、逆にDPD遺伝子発現は未分化型癌で高発現であった。現時点で、胃癌の組織型によりTS、DPD遺伝子発現が異なる理由は不明である。TS、DPDは本来われわれの生体内では核酸代謝に必須の酵素であり、TSはピリミジン代謝の合成系の酵素に^{9, 10)}、DPDは分解系の酵素に分類される⁷⁾。したがって、これらの合成系酵素と分解系酵素の発現のバランスが、組織型によりことなることは決して従来の生化学的観察事項と矛盾するものではない。³H-thymineを用いた胃癌細胞のlabeling indexは分化型癌の13~38%に対して未分化型癌では5~16%と低く、細胞内へのthymineの取り込みは分化型癌で高いことが報告されている³⁴⁾。すなわち、細胞増殖能の高い分化型癌では、TSなどの合成系酵素活性が亢進し、逆にDPDなどの分解系酵素活性は抑制される可能性はある。今後、細胞増殖能とピリミジン代謝関連酵素の発現に関して、詳細な検討が必

要であろう。

臨床的には、この胃癌の組織型別にみたTS、DPD遺伝子発現の差異は大きな意義を有する。未分化型癌はDPD高発現であることは、従来のDPD阻害剤を含まないフッ化ピリミジン系抗癌剤では抗腫瘍効果が得られにくかったことを裏付けている。さらには、DPD高発現の腫瘍でもDPD阻害剤を含有するS-1は抗腫瘍効果が得られることから、未分化型癌におけるS-1の高い抗腫瘍効果をも説明が可能となる。

従来のTS、DPD遺伝子発現の検討には、凍結標本を必要としていた。しかし、今回のこれらの遺伝子発現の検討は、ルーチンに保存が行われ、かつ、取り扱いの容易なパラフィン包埋切片を用いて、新たに開発されたDTP法により行った¹⁷⁻²⁰。最近、同様のパラフィン包埋切片からのLCM法を用いた遺伝子解析の方法論と遺伝子解析の薬剤感受性予測に関する妥当性が、乳癌のホルモン療法施行症例において示された³⁵。今後、いずれの施設でも日常的に入手・保管が可能で取り扱いの容易なパラフィン包埋切片から、腫瘍細胞のみをLCM法に切り出すことにより正常間質細胞の混入が防止できる本法は、腫瘍の抗癌剤感受性に応じて薬剤を選択する「癌治療の個別化」に向けての大きな追い風になることが期待される。

参考文献

- 1) 日本胃癌学会ガイドライン検討委員会編. 胃癌治療ガイドライン2004年4月改訂【第2版】. 東京: 金原出版;2004.p.12-3.
- 2) Sirasaka T, Shimamoto Y, Ohshimo H, Yamaguchi M, Kato T, Yonekura K, et al. Development of a novel form of an oral 5-fluorouracil derivative(S-1) directed to the potentiation of the tumor selective cytotoxicity of 5-fluorouracil by two biochemical modulators. *Anticancer Drugs* 1996;7:548-57.
- 3) Yamada Y, Hamaguchi T, Goto M, Muro K, Matsumura Y, Shimada Y, et al. Plasma concentration of 5-fluorouracil and F-beta-alanine following oral administration of S-1, a dihydropyrimidine dehydrogenase inhibitory fluoropyrimidine, as compared with pretracted venous infusion of 5-fluorouracil. *Br J Cancer* 2003; 89:816-20.
- 4) Tatsumi K, Hukushima M, Shirasaka T, Fujii S. Inhibitory effects of pyrimidine, barbituric acid and pyridine derivatives on 5-fluorouracil degradation in rat liver extracts. *Jpn J Cancer Res* 1987;78:738-55.
- 5) Sakata Y, Ohtsu A, Horikoshi N, Sugimachi K, Mitachi Y, Taguchi T. Late Phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1(1 mtegafur-0.4 Mgimestat-1m otastat potassium) in advanced gastric cancer patients. *Eur J Cancer* 1998; 34:1715-20.
- 6) Koizumi W, Kurihara M, Nakano S, Hasegawa K. Phase II study of S-1, a novel oral derivative of 5-fluorouracil, in advanced gastric cancer. For the S-1 Cooperative Gastric Cancer Study Group. *Oncology* 2000;58:191-7.
- 7) 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* 1978;47:2203-6.
- 8) Yamada H, Ichikawa W, Uetake H, Shirota 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.
- 9) Langenbach RJ, Danenberg PV, Heidelberger C. Thymidylate synthase: mechanism of inhibition by 5-fluoro-2'-deoxyuridylate. *Biochem Biophys Res Commun* 1972;48:1565-71.
- 10) Peters GJ, van der Wilt CL, van Triest B, Codacci-Pisanelli G, Johanson PG, Van Groeningen CJ, et al. Thymidylate synthase and drug resistance. *Eur J Cancer* 1995;31A:1299-305.
- 11) Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y, Yamada H, Nishi N, Nihei A, et al. Combination of dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase gene expressions in primary tumors as predictive parameters for the efficacy of fluoropyrimidinebased chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res* 2003;9:786-91.
- 12) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei SS, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphotylase. *Clin Cancer Res* 2000;6:1322-7.
- 13) 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.
- 14) Takechi T, Fujioka A, Matsushima E, Fukushima M. Enhancement of the antitumor activity of 5-fluorouracil (5-FU) by inhibiting dihydropyrimidine dehydrogenase activity (DPD) using 5-chloro-2, 4-dihydroxyphridine (CDHP) in human tumor cells. *Eur J Cancer* 2002;38:1271-7.
- 15) Fujiwara H, Teraishi M, Irinoda T, Takagane A, Abe K, Nakaya T, et al. Superior antitumor activity of S-1 in tumours with a high dihydropyrimidine

- dehydrogenase activity. *Eur J Cancer* 2003;39:2387-94.
- 16) 日本胃癌学会編. 胃癌取扱い規約1999年6月改訂 [第13版]. 東京:金原出版;1999.
- 17) 長野裕人, 市川 度, 清水道生, 代田喜典, 仁瓶善郎. Danenberg Tumor Profile法による大腸癌におけるTSおよびDPD mRNA発現量の検討. *癌と化療* 2004; 31(6):889-92.
- 18) Lorad RV, Salonga D, Danenberg KD, Peter JH, DeMeester TR, Park JM, et al. Telomerase reverse transcriptase expression is increase early in the Barrett's metaplasia, dysplasia, adenocarcinoma sequence. *J Gastrointest Surg* 2000;4:135-42.
- 19) Kornmann M, Schwada W, Sander S, Kron M, Strater J, Polat S, et al. Thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase mRNA expression levels: predictors for survival in colorectal cancer patients receiving adjuvant 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 2003;9:4116-24.
- 20) Emmert-Buck MR, Bonner RF, Smith PD, Chuaqui RF, Zhuang Z, Goldstein SR, et al. Laser capture microdissection. *Science* 1996;274:998-1001.
- 21) 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.
- 22) Hayward JL, Carbone PP, Heusen JC, Kumaoka S, Segaloff A, Rubens RD. Assessment of response to therapy in advanced breast cancer. *Br J Cancer* 1997;35:292-8.
- 23) Van Cutsem E, Haller D, Ohtsu A. The role of chemotherapy in the current treatment of gastric cancer. *Gastric Cancer* 2002;5(suppl):17-22.
- 24) Miyamoto S, Boku N, Ohtsu A, Ochiai A, Okabe H, Fukushima M. Clinical implications of immunoreactivity of thymidylate synthase and dihydropyrimidine dehydrogenase in gastric cancer treated with oral fluoropyrimidine(s-1). Study Group of S-1 for Gastric Cancer. *Int J Oncol* 2000;17:653-8.
- 25) 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.
- 26) Nozawa H, Tsukui H, Nishida K, Yakumaru K, Nagawa H, Sekikawa T. Dihydropyrimidine dehydrogenase expression in preoperative biopsy and surgically resected specimens of gastric carcinoma. *Cancer Chemotherapy Pharmacol* 2002;49:267-73.
- 27) 北郷邦昭, 市川度, 植竹宏之, 仁瓶善郎. 胃癌組織におけるDihydropyrimidine Dehydrogenaseの発現—モノクローナル抗体を用いた免疫組織学的染色とDPD mRNA—. *癌と化療* 2002;29(2):245-52.
- 28) Banerjee D, Mayer-Kuckuk P, Capioux G, Budak-Alpdogan T, Gorlick R, Bertino JR. Novel aspects of resistance to drugs targeted to dihydrofolate reductase and thymidylate synthase. *Biochim Biophys Acta* 2002;1578:164-73.
- 29) Banerjee D, Schnieders B, Fu JZ, Adhikari D, Zhao SC, Bertino JR. Role of E2F-1 in chemosensitivity. *Cancer Res* 1998;56:4292-6.
- 30) Hsiang YH, Liu LF, Wall ME, Wani MC, Nicholas AW, Manikumar G, et al. DNA topoisomerase I-mediated DNA cleavage and cytotoxicity of camptothecin analogues. *Cancer Res* 1989;49:4385-9.
- 31) Ichikawa W, Uetake H, Nihei Z, Matsuo K, Fujita H, Yamada Y. Topoisomerase-I(TOPO-I) expression correlates to thymidylate synthase(TS) expression in colorectal cancer(CRC). *Proc Am Soc Clin Oncol* 1999;18:246a.
- 32) Vanhoefler U, Harstrick A, Achterrath W, Cao S, Seeber S, Restum YM. Irinotecan in the treatment of colorectal cancer: clinical overview. *J Clin Oncol* 2001;19:1501-18.
- 33) Ichikawa W, Takahashi T, Suto K, Yamashita T, Nihei Z, Shirota Y. Thymidylate synthase predictive power is overcome by irinotecan combination therapy with S-1 for gastric cancer. *Br J cancer* 2004;91:1245-50.
- 34) Fenoglio-Preiser CM, Noffsinger AE, Belli J, Stemmermann GN. Pathologic and phenotypic features of gastric cancer. *Semin Oncol* 1996;23:292-306.
- 35) Paik S, Shak S, Tang G, K Chungyeul K, Baker J, Cronin M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med* 2004;351:2817-26.