

原 著

大腸癌腫瘍組織内 Thymidylate Synthase (TS) の
臨床的意義についての検討

東京女子医科大学 附属第二病院 外科 (指導: 梶原哲郎教授)

コバヤシ サトシ エンドウ シュンゴ カトウ ヒロユキ ハガ シュンスケ カジワラ テツロウ
小林 敏・遠藤 俊吾・加藤 博之・芳賀 駿介・梶原 哲郎

(受付 平成13年9月12日)

Clinical Significance of the Thymidylate Synthase (TS) Activity in Colorectal Carcinoma

Satoshi KOBAYASHI, Shungo ENDO, Hiroyuki KATO,
Shunsuke HAGA and Tetsuro KAJIWARADepartment of Surgery (Director: Prof. Tetsuro KAJIWARA)
Tokyo Women's Medical University Daini Hospital

Thymidylate synthase (TS) is one of the essential nuclear enzymes for nucleic acid synthesis, and it is considered to participate in tumor growth. Fluorouracils exert an anti-tumor effect when their products act in conjunction with TS. We herein identified the presence of TS in the cancer cells from 43 patients encountered between 1990 and 1999 with unresectable advanced recurrent colon cancer and who were treated with Leucovorin (LV)/5-fluorouracil (5-FU), using immunostaining techniques with an anti-human recombinant TS polyclonal antibody. The possibility that TS might be a useful indicator of the anti-tumor effect was then assessed based on our results and the patients' clinicopathological factors and prognoses. The staining results were viewed at a magnification of $\times 200$, and the cases were classified into a higher staining-positive-rate group and a lower staining-positive-rate and negative staining group according to the ratio of the number of both tumor cells and positively stained cells. Regarding pathological factors, specimens from patients with deeply invading tumors were frequently classified into the higher staining-positive-rate group. Chemotherapy was often effective in the lower staining-positive-rate group. More favorable outcomes were also obtained in the lower staining-positive-rate group. Fluorouracils therefore appear to effectively treat tumors with lower TS activities.

緒 言

Thymidylate synthase (TS) は核内酵素の一つで核酸合成に必要とされ、腫瘍増殖にも関係していると推測されている。生体内では、TSは5, 10- $\text{CH}_2\text{-FH}_4$ (メチレンテトラヒドロ葉酸), deoxyuridine monophosphate (dUMP) と ternary complex を形成し、チミジル酸の合成に関与してい

る。

一方、消化器癌に対する化学療法は、5-fluorouracil (5-FU) を基本とした biochemical modulation therapy が主流となっており、特に大腸癌に対しては Leucovorin (LV) /5-FU 療法が標準的化学療法とされる。5-FUはその生成物である fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) が

表1 対象症例の背景因子

	症例数 (n = 43)
年齢分布(歳)(平均)	29 ~ 77(60.4)
性別	
男性	23
女性	20
観察期間(月)(平均)	6.6 ~ 67.5(24.4)
治療対象病変部位	
右側結腸	12
左側結腸	13
直腸	18
再発部位	
肝臓	22
肺	5
腹膜	2
脳	1
局所	2
リンパ節	9
その他	2
化学療法	
施行回数(回)(平均)	2 ~ 17(6.6)
LV/5-FU療法の前治療	
フッ化ピリミジン	8
マイトマイシンC	4
無	31
投与方法	
静注	33
動注	7
静注+動注	3
化学療法の奏効度	
CR(著効)	3
PR(有効)	9
NC(不変)	9
PD(進行)	22

dUMP と拮抗し、これに代わってメチレンテトラヒドロ葉酸, TS と ternary complex を形成することにより, DNA の合成を阻害する. LV/5-FU 療法は, ここに葉酸として LV を投与することにより, ternary complex をさらに効率よく生成することで, 5-FU の効果を増強することがねらいである. つまり, TS は 5-FU さらには LV/5-FU 療法の key enzyme と考えられる.

本研究では治療切除不能進行・再発大腸癌に対して LV/5-FU を投与した 43 例について, 原発巣

の TS を免疫染色により評価し, 免疫染色の結果と予後因子との関連から, 抗癌剤の有効性の指標としての可能性について検討した.

対象および方法

1. 対象

1990 年から 1999 年までの治療切除不能の進行・再発大腸癌症例のうち, その治療として, LV/5-FU 療法を施行した評価可能病変を有する 43 例を対象とした. LV/5-FU 療法の投与方法は, LV 30mg/body と 5-FU 500mg/body を 5 日間連続で静脈内投与し, 4 週休薬を 1 クールとした. ただし, 有害事象などで 5 日間連続の投与ができない場合は, LV 30mg/body と 5-FU 500mg/body を週 1 回投与し, 5 回で 1 クールとした. 全例に本化学療法を 2 クール以上行い, 平均 6.7 クールを治療的に行った.

対象の平均年齢は 60.4 歳, 性別は男:女 = 23:20 で, 平均観察期間は 24.4 カ月である (表 1).

2. 大腸癌組織の TS の検出

今回, 大腸癌組織の TS の検出は, パラフィン包埋標本を用いた免疫染色法で行った¹⁾. なお, 大腸癌組織はすべて原発巣の組織を用いた. 免疫染色は DAKO Envision System (DAKO 社製) を用いた. その手順は以下の通りである.

①ホルマリン固定パラフィン包埋材料を 4 μ m の厚さに薄切し, 脱パラフィンする.

②マイクロウェーブ処理後に 3% H_2O_2 で内在性パーオキシダーゼを阻止する.

③ Phosphate buffer solution (PBS) で洗浄後, 抗ヒト recombinant TS (rTS) ポリクローナル抗体 (大鵬薬品工業株式会社から供与)²⁾ を 100 倍希釈し, 4 $^{\circ}C$ で一晚反応させる.

④ 2 次抗体とパーオキシダーゼを多数標識したポリマー試薬である DAKO Envision と室温で約 45 分反応させる.

⑤ 基質として 0.03% H_2O_2 を加えた発色剤, 3,3-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 溶液を用いて室温で 5 分間, 酵素組織化学反応を行い, 発色する.

⑥ ヘマトキシリンで核染色をした後, 脱水・透徹・封入する.

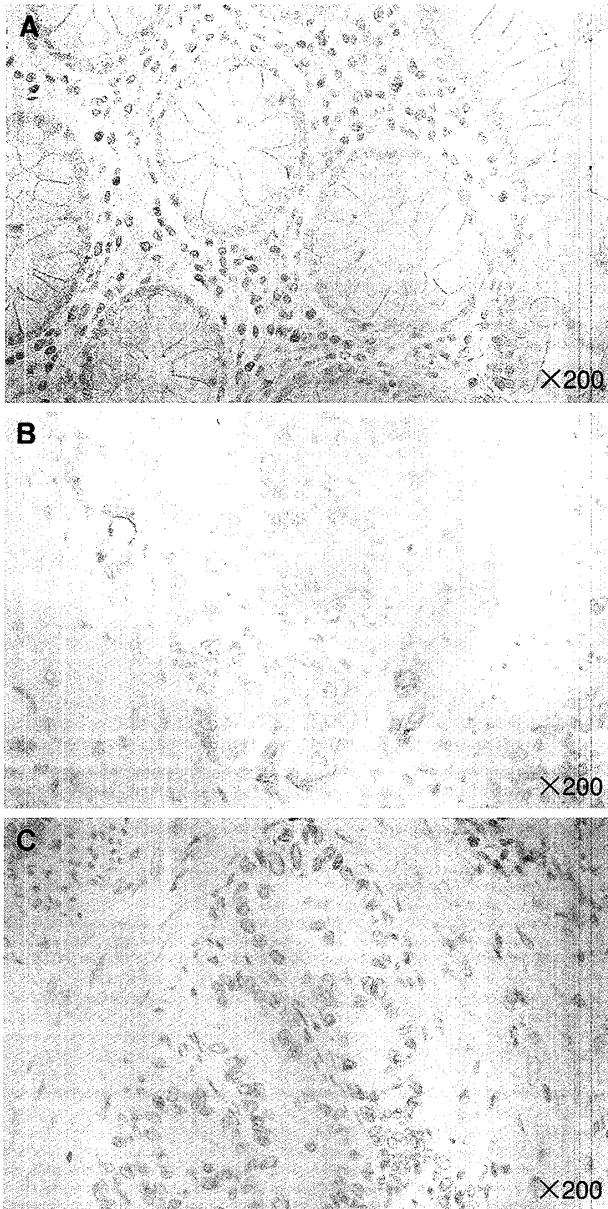


図1 免疫染色による TS の検出

(A) 正常腺管に染色性は認めなかった。(B) TS は、腫瘍腺管部のみ染色性を認め、間質における染色性はなかった。また、染色性を示した腺管に明確な偏りはなかった。

腫瘍細胞の染色性を陽性率 = (染色陽性腫瘍細胞数/全腫瘍細胞数) × 100 から高染色群 (B)、低染色群 (C) に分けた。

3. 免疫染色の評価

腫瘍細胞の染色程度の評価は、標本を 200 倍視野で観察し、染色性のよい 1 視野について、観察視野内の全腫瘍細胞数と染色陽性腫瘍細胞数を数え、陽性率 [(染色陽性腫瘍細胞数/全腫瘍細胞数)

× 100] で評価した。そして、陽性率の平均値を算出し、平均値以上の陽性率を示したものを高染色群、平均値未満を低染色群とした。

4. 臨床病理学的因子との関連

TS の陽性率から高染色群と低染色群に分けて、年齢、性別、壁深達度、腹膜播種性転移、肝転移、リンパ節転移等の臨床病理学的因子との関連について検討した。臨床病理学的因子に関する記載は大腸癌取扱い規約³⁾に従った。なお病期分類については Dukes 分類を用いた。また、化学療法の奏効度と化学療法開始時からの生存期間との関連についても検討した。

5. 統計学的処理

統計学的検定には χ^2 検定、Mann-Whitney U 検定を用い、生存率は Kaplan-Meier 法で算出し、検定には log-rank test を行った。なお、それぞれの検定で $p < 0.05$ をもって有意差ありと判定した。

結 果

1. 免疫染色による TS の検出

腫瘍内の TS の染色部位は腫瘍実質であり、腫瘍の間質には染色性は認めなかった。また、染色性を示した腺管の局在は、表層にあるもの、先進部にあるものと様々で、明確な偏りはなかった。なお、正常腺管は染色されなかった。TS の免疫染色では、腫瘍細胞の核、細胞質または、両者に染色性が得られた。そのうち、両者に染色性を示した細胞のみを陽性と判断した (図 1A, B)。

2. 免疫染色での TS 陽性率

観察視野内の全腫瘍細胞数は 698~1,102 個、平均 777 個で、染色陽性腫瘍細胞数は 0~859 個、平均 346 個であった。陽性率は 0~99.7% で、その平均値 (±標準偏差) は $45.3 \pm 39.6\%$ であった。今回の検討では、平均値より陽性率の高いものを高染色群、低いものを低染色群として、高染色群 23 例と低染色群 20 例に分けて、以下の検討を行った (図 1B, C)。

3. TS と臨床病理学的因子ならびに化学療法の奏効度との関連 (表 2)

臨床病理学的因子のうちで、TS との間に関連を認めたのは組織学的壁深達度のみであった。対

表2 TSと臨床病理学的因子ならびに化学療法の奏効度との関連

	高染色群 (n = 23)	低染色群 (n = 20)	p Value
年齢(歳)	60.5 ± 9.2	60.6 ± 12.6	NS
性別			
男性	11	6	
女性	12	14	NS
壁深達度*			
≤ ss, a1	9	14	
≥ se, a2	14	6	0.041
腹膜播種性転移			
陰性	23	18	
陽性	0	2	NS
肝転移			
陰性	10	11	
陽性	13	9	NS
リンパ節転移			
陰性	2	6	
陽性	21	14	NS
リンパ管侵襲*			
陰性	7	6	
陽性	16	14	NS
静脈侵襲*			
陰性	6	6	
陽性	17	14	NS
病理組織学的分類*			
高分化腺癌	8	6	
中分化腺癌	12	12	
低分化腺癌	2	1	
粘液癌	1	1	NS
Dukes 分類			
A	0	0	
B	2	1	
C	7	5	
D	14	14	NS
化学療法の奏効度			
CR・PR	2	10	
NC・PD	21	10	0.0026

* : 大腸癌取扱い規約より

象が治癒切除不能の進行・再発大腸癌であり、また対象症例には早期癌がないため、ss, a1以下の23例とse, a2以上の20例に分けた。この結果、ss, a1以下では高染色群9例、低染色群14例、se,

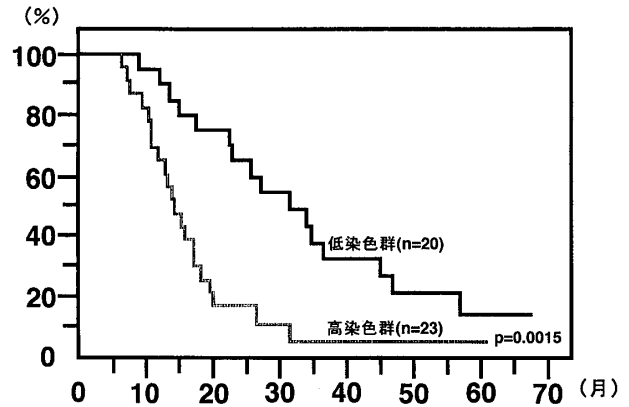


図2 生存曲線とTS分類

累積5年生存率は高染色群16.2%、低染色群33.2%、50%生存期間は高染色群14.3カ月、低染色群31.6カ月で、低染色群の予後が良好であった。

a2以上では高染色群14例、低染色群6例となり、壁深達度se, a2以上の症例に高染色群が多かった(p=0.041)。

しかし、再発前を含めた原発巣切除時の病期分類をみると、Dukes Bは高染色群2例、低染色群1例、Dukes Cは高染色群7例、低染色群5例、Dukes Dは高染色群14例、低染色群14例であり、進行度とTSの間には関連はなかった。

一方、化学療法の奏効度とTSの関連では、CR・PRの奏効例で高染色群2例、低染色群10例、NC・PDの非奏効例で高染色群21例、低染色群10例であり、奏効例に低染色群が、非奏効例に高染色例が多かった(p=0.0026)。

さらに予後とTS関連についてみると、累積5年生存率は高染色群16.2%、低染色群33.2%、その50%生存期間は高染色群14.3カ月、低染色群31.6カ月で、低染色群の予後が良好であった(p=0.0015)(図2)。

考 察

大腸癌に対する化学療法は、5-FUを用いる biochemical modulation therapy が主流となっている⁴⁾。5-FUの抗癌効果を考える上で、現在 key enzyme と考えられているものは、TS⁵⁾、dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)⁶⁾、thymidine phosphorylase (TP)⁶⁾、さらには orotate phosphoribosyl transferase (OPRT)⁷⁾の4つである。今回は、5-FUの biochemical modulation therapy のう

ちでも、大腸癌に対する世界的標準療法とされる LV/5-FU 療法の key enzyme と考えられる TS について検討した。

TS は、生体内ではメチレンテトラヒドロ葉酸と dUMP に作用し、ternary complex を形成し、DNA の合成に関与する。フッ化ピリミジン系抗癌剤の作用機序の一つには、5-FU からの生成物である FdUMP が dUMP と拮抗し、生体内のメチレンテトラヒドロ葉酸とともに TS と ternary complex を形成することによってチミジル酸の合成を抑制し、DNA の合成を阻害することにある⁸⁾。LV/5-FU 療法は、ここに葉酸として LV を投与することにより、より効率よく ternary complex を形成することを狙ったものである。つまり LV/5-FU 療法の抗腫瘍効果からは、腫瘍組織中の TS が key enzyme になっていると考えられる。逆に言うと、腫瘍に対する 5-FU、あるいは LV/5-FU 療法への抵抗性は、腫瘍内の TS の発現量に規定されるとも考えられる。

そこで今回の検討では、大腸癌組織内の TS の意義を明らかにするにあたり、TS が target enzyme となっていることから、5-FU 単独療法よりも LV/5-FU 療法施行例の方を、また化学療法の効果を評価する目的から、補助化学療法例ではなく、より評価が明確となる治癒切除不能の進行・再発大腸癌症例を対象とした。

TS の発現の評価方法には酵素活性⁹⁾、polymerase chain reaction (PCR) 法¹⁰⁾、免疫染色法¹¹⁾などの方法が用いられている。免疫染色法での評価については、binding assay 法による評価とほぼ同等と報告されており¹¹⁾、また取り扱いが簡便で、パラフィン包埋標本を用いるので retrospective にも検討可能であるため、測定方法としては最善の方法と考え、この方法を選択した。

大腸癌組織における TS の意義に関しての報告をみると、進行程度と相関せずに単独で予後因子になり得るとするもの¹⁰⁾や、肝転移例に比べ、肺転移例や腹膜播種性転移例に TS 活性が高いとするものがある¹²⁾¹³⁾。また、TS と細胞増殖能の指標である proliferating cell nuclear antigen (PCNA) による免疫染色の結果から、TS 活性が高いものほ

ど細胞増殖能が高いとする報告もある。

しかし、最近の多くの報告は TS と 5-FU の効果について論じている。治癒切除例を対象として、TS とフッ化ピリミジン系抗癌剤の効果をみると、TS 活性の低い症例には化学療法の効果はなく、TS 活性が高い症例には化学療法の効果があったとする報告¹⁴⁾や、逆に術後フッ化ピリミジン系抗癌剤を投与した症例では TS 活性が低いものほど予後がよいとする報告¹⁵⁾もある。さらには、化学療法を行うことにより腫瘍組織内に TS が誘導され、これが抗癌剤に対する耐性獲得のメカニズムの一つであるとする報告もある⁹⁾¹⁶⁾。Berger ら¹⁷⁾と Swain ら¹⁸⁾によれば、先天的な TS の過剰は 5-FU の阻害に関係し、5-FU の治療効果を減ずるとしている。また Chu ら¹⁹⁾は、5-FU にさらされている乳癌、大腸癌の細胞周期の研究において、5-FU の効果が阻害される原因として TS の生成量の増加にも関連があるとしている。

今回の検討で、臨床病理学的因子や進行程度と TS との関連をみると、壁深達度については、より深達度の深いもので TS 陽性率が高いとの結果が得られた。これは対象を治癒切除不能の進行・再発大腸癌に限った結果であるが、深達度の深いものほど細胞増殖能が高いことが原因になっていることが考えられる。

今回の免疫染色による評価からは、TS 値が低い症例の予後が良好という結果が得られ、Yama-chika ら²⁰⁾、Johnston ら¹⁴⁾、Lenz ら²¹⁾の報告と同じ結果を示している。進行・再発例という明らかに腫瘍増殖能が高いと考えられる症例においても、TS 陽性率で分類することにより、化学療法に対する反応に差があること、さらに予後についても明確に差がでたことは意義があると考えられる。しかし一方では Sanguedolce ら²²⁾の報告のように、進行大腸癌患者の腫瘍組織から binding assay を用いて TS を測定し、われわれと逆の見解を得ているものもある。

われわれが今回対象とした症例は、すべてフッ化ピリミジン系抗癌剤の投与を受けているため、この効果も予後に反映されていると思われる。DNA 合成において、TS 量が多い腫瘍はフッ化ピ

リミジン系抗癌剤を阻害するため、予後が不良になるのではないかと思われる。TS量とフッ化ピリミジン系抗癌剤の感受性については、今回、ある程度の関連が見出されたが、これにDPDなどについての検討も加えれば、より正確な治療効果予測が得られ、不必要な投与例を減らせると考えられる。TSが高い症例では5-FUの効果があまり期待できないので、5-FU以外の抗腫瘍剤の効果について検討する必要がある。また、現在ある抗腫瘍剤が全く効かないのか、あるいはほかの薬剤に変えればよいのかを検討する必要がある。

結 論

フッ化ピリミジン系抗癌剤の投与を術後に受けている症例において、大腸癌腫瘍組織内TSの染色度が低い症例は、高い症例に比べ予後は良好であり、フッ化ピリミジン系抗癌剤がTS量の少ない腫瘍の術後化学療法に効果的である可能性が示唆された。

稿を終えるに当たり、免疫染色に関して御指導ならびに御助言を頂いた病院病理科の相羽元彦教授に、病理標本作製に御協力を頂いた当院病院病理科の飯塚英治氏、橋本正徳氏、五十嵐昭喜氏、須賀道恵氏に、深謝致します。

文 献

- 1) Johnston PG, Drake JC, Trepel J et al: Immunological quantitation of thymidylate synthase using the monoclonal antibody TS-106 in 5-fluorouracil sensitive and human cancer cell lines. *Cancer Res* **52**: 4306-4312, 1992
- 2) Okabe H, Tsujimoto H, Fukushima M et al: Preparation of the antibodies against recombinant human thymidylate synthase for the detection of its intratumoral levels and the application to sensitivity-study of 5-fluorouracil. *Oncol Rep* **4**: 685-690, 1997
- 3) 大腸癌研究会編：大腸癌取扱い規約 改訂第6版。金原出版，東京（1998）
- 4) Leichman CG, Fleming TR, Muggia FM et al: Phase II study of fluorouracil and its modulation in advanced colorectal cancer: A Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* **13**: 1303-1311, 1995
- 5) Carreras CW, Santi DV: The catalytic mechanism and structure of thymidylate synthase. *Annu Rev Biochem* **4**: 721-762, 1995
- 6) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M et al: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* **6**: 1322-1327, 2000
- 7) 福島正和, 野村裕子, 村上裕子ほか：ヒト癌細胞における5-Fluorouracilリン酸化経路の解析。癌と治療 **23**: 721-731, 1996
- 8) Langenback RJ, Danenberg PV, Heidelberger C: Thymidylate synthase: mechanism of inhibition by 5-fluoro-2'-deoxy-uridylylate. *Biochem Biophys Res Commun* **48**: 1565-1571, 1972
- 9) Peters GJ, van der Wilt CL, van Groeningen CJ et al: Thymidylate synthase inhibition after administration of fluorouracil with or without leucovorin in colorectal cancer patients: Implication for treatment with fluorouracil. *J Clin Oncol* **12**: 2035-2042, 1994
- 10) Leichman L, Lenz HJ, Leichman CG et al: Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for resistance to protracted infusion of 5-fluorouracil and weekly leucovorin in disseminated colorectal cancers: Preliminary report from an ongoing trial. *Eur J Cancer* **31**: 1306-1310, 1995
- 11) Aschele C, Debernardis D, Casazza S et al: Immunohistochemical quantitation of thymidylate synthase expression in colorectal cancer metastases predicts for clinical outcome to fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* **17**: 1760-1770, 1999
- 12) Gorlick R, Metzger R, Danenberg KD et al: Higher levels of thymidylate synthase gene expression are observed in pulmonary as compared with hepatic metastasis of colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* **16**: 1465-1469, 1998
- 13) Cascinu S, Aschele C, Barni S et al: Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* **5**: 1996-1999, 1999
- 14) Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE et al: The role of thymidylate synthase expressions in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* **12**: 2640-2647, 1994
- 15) Benson AB III, Catalano PJ, Rao S et al: Thymidylate synthase expression as a predictor for response to 5-fluorouracil-based therapy and survival for patients with resected colon or ad-

- vanced colorectal cancer. An ECOG Study. Proc Am Soc Clin Oncol **16**: 258a, 1997
- 16) **Spears CP, Gustavsson BG, Berne M et al**: Mechanisms of innate resistance to thymidylate synthase inhibition after 5-fluorouracil. Cancer Res **48**: 5894-5900, 1988
 - 17) **Berger SH, Jenh CH, Johnston LF et al**: Thymidylate synthase overproduction and gene amplication in fluorodeoxyuridine-resistant human cells. Mol Pharmacol **28**: 461-467, 1985
 - 18) **Swain SM, Lippman ME, Egan EF et al**: Fluorouracil and high dose leucovorin in previously treated patients with metastatic breast cancer. J Clin Oncol **7**: 890-899, 1989
 - 19) **Chu E, Drake JC, Koeller DM et al**: Induction of thymidylate synthase associated with multidrug resistance in human breast and colon cancer. Mol Pharmacol **39**: 136-143, 1991
 - 20) **Yamachika T, Nakanishi H, Inada K et al**: A new prognostic factor for colorectal carcinoma, thymidylate synthase, and its therapeutic significance. Cancer **82**: 70-77, 1998
 - 21) **Lenz HJ, Leichman CG, Danenberg KD et al**: Thymidylate synthase mRNA level in adenocarcinoma of the stomach: A predictor for primary tumor response and overall survival. J Clin Oncol **14**: 176-182, 1995
 - 22) **Sanguedolce R, Vultaggio G, Sanguedolce F et al**: The role of thymidylate synthase levels in the prognosis and the treatment of patients with colorectal cancer. Anticancer Res **18**: 1515-1520, 1998
-