

## 大腸癌原発巣における 5-FU (5-fluorouracil) 関連酵素発現量の意義

東京女子医科大学医学部外科学 (第2) 講座

カネコ ユキ セシモ アキヨシ カメオカ シンゴ  
金子 由紀・瀬下 明良・亀岡 信悟

(受理 平成26年9月25日)

Significance of Expression Levels of 5-Fluorouracil (5-FU)-associated Enzymes in the Primary Lesion  
for the Prognosis of Colorectal Cancer

Yuki KANEKO, Akiyoshi SESHIMO and Shingo KAMEOKA

Department of Surgery II, Tokyo Women's Medical University

We have investigated the association between intra-tumor expressions of thymidylate synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), and orotate phosphoribosyl transferase (OPRT)—enzymes involved in 5-FU metabolism—and clinicopathological factors in colorectal cancer. **Subjects:** The subjects comprised 52 cases with colorectal cancer that underwent surgery in our department between 1999 and 2001. **Methods:** Laser microdissection was employed for measurement of mRNA of TS, DPD, and OPRT, and their association with clinicopathological factors (lymphatic invasion, and venous invasion, invasion depth, lymph node metastasis, histological types, clinical stage) and prognosis was analyzed. **Results:** TS mRNA was at low levels in advanced cases—indicated by pathological factors such as lymphatic invasion, venous invasion, depth invasion, and clinical stage as well as in well-differentiated cases. When enzyme expression levels were compared between the cases with and without recurrence, TS mRNA expression levels was significantly lower in the group with recurrence. A multivariate analysis extracted invasion depth and lymph node metastasis as risk factors for recurrence, but not TS mRNA. In the group with recurrence, there was no significant difference in survival rates between the groups with high and low TS mRNA levels, respectively. Neither DPD nor OPRT mRNA levels had a significant correlation with clinicopathological factors. **Conclusions:** Although it has been suggested that the prognosis for colorectal cancer is poorer in cases with higher TS mRNA levels, the results of this study suggest that the TS mRNA levels were higher in cases with higher grades of malignancy but then decreased in more advanced cases. The clinical significance of TS mRNA should be considered based on these points of view.

**Key Words:** colorectal cancer, thymidylate synthase, clinicopathological factors

## 緒 言

近年、大腸癌の化学療法において、分子標的薬の導入やレジメンの開発により、生存期間が延長している。しかし、未だ5-FU系の抗癌剤が標準治療となっている。

TS (Thymidylate Synthase), DPD (Dihydropyrimidine Dehydrogenase), OPRT (Orotate Phosphoribosyl Transferase) は5-FU系抗癌剤の代謝酵素である。各酵素の代謝経路から、腫瘍内の各酵素の発現がTS, DPDは低く、OPRTは高いほど5-FU

の抗腫瘍効果が発揮され则认为られている。

さらに、TSはDNAのde novo合成経路の律速酵素であると同時に細胞周期G0期からS期への細胞増殖に関わる酵素であり、細胞増殖が盛んであるほど、増加する。このためTSの腫瘍内発現が高いほど、悪性度が高いとされている<sup>1)~5)</sup>。

各酵素の活性値やmRNA発現量と病理学的因子や予後との関連の報告には、一定の見解は得られていない<sup>6)~17)</sup>。

これまで各酵素の測定は、酵素活性値の測定や免

**Table 1** Distribution of expression levels of the enzymes

	mean $\pm$ SD	median (range)
TS mRNA	2.59 $\pm$ 2.68	1.74 (0.71-17.82)
DPD mRNA	0.34 $\pm$ 0.15	0.30 (0.10-0.65)
OPRT mRNA	1.54 $\pm$ 0.58	1.46 (0.46-3.16)

Distribution of TS mRNA expression levels did not follow a normal distribution. Distribution of DPD and OPRT expression levels follow a normal distribution.

疫組織染色法で測定されてきた。しかし、これらの方法は多くの組織片が必要であること、正常組織が混入することなどが問題点となっていた。近年、マイクロダイセクション (LCM) とリアルタイム PCR (RT-PCR) を組み合わせた Danenberg Tumor Profile (DTP) 法により微量の組織からでも、標的部分 (腫瘍組織) のみを抽出し、高感度、高精度に各酵素の mRNA 発現量を測定することが可能となった。

そこで、当施設における大腸癌手術症例について DTP 法を用いて各酵素の mRNA 発現量を測定し、各酵素と病理学的因子との関係、予後について検討した。

## 対象と方法

### 1. 対象

1999 年から 2001 年までの 2 年間に東京女子医科大学第二外科において手術を施行した大腸癌手術症例のうち、各酵素の発現量を測定できた 52 例を対象とした。対象症例の内訳は男性 27 例、女性 25 例、手術時年齢は 40~84 歳 (平均 62.7 歳) であった。

### 2. 方法

1) 大腸癌原発巣の TS, DPD, OPRT の mRNA 発現量の測定

対象症例の大腸癌原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋標本 (FFPE) より 10  $\mu$ m 厚の薄切片を作製し、LCM 法を用いて癌細胞を抽出した。その後 RT-PCR 法にて  $\beta$ -actin mRNA 発現を対照とし、TS, DPD, OPRT の mRNA 発現量を定量的に測定した。測定は米国の Response Genetic Inc. (RGI 研究所) に依頼して行った。

2) 臨床病理学的因子と各酵素の mRNA 発現量の関係

各酵素の発現量と臨床病理学因子 (リンパ管侵襲, 静脈侵襲, 壁深達度, リンパ節転移, 分化度, 進行度) の関係について検討した。臨床病理学的因子は大腸癌取り扱い規約第 6 版に準じた<sup>18)</sup>。

### 3) 統計学的処理

今回の検討では統計ソフト Dr. SPSS II を使用した。各酵素の mRNA 発現量の分散を確認し、ノンパラメトリック検定は Mann-Whitney 検定 (MW), Kruskal Wallis 検定 (KW), パラメトリック検定, Student-t test (t-test) と ANOVA (analysis of variance) を使用した。さらに Jonckheere-Terpstra 検定 (JT) にて傾向検定を追加した。生存分析は Kaplan-Meier 法および log-rank test, 多変量解析はロジスティック回帰分析, 変数減少法を使用した。すべての検定で p-value < 0.05 を有意差ありとした。

なお、この研究は東京女子医科大学の倫理委員会の承認を得て行った。

## 結 果

### 1) 各酵素の mRNA 発現量

各酵素の発現量の分布を示す (Table 1)。

分布から、以後の検定方法は、TS mRNA 発現量は、分散に歪みやはずれ値があったため、ノンパラメトリック検定とし、DPD および OPRT mRNA 発現量は正規分布に従っており、パラメトリック検定とした。

2) 各酵素の mRNA 発現量と臨床病理学因子の関係 (Table 2)

臨床病理学的因子と各酵素の mRNA 発現量の関係について検討した。その結果を Table 2 に示す。

#### (1) TS mRNA 発現量

組織型は低分化で有意に高値であった。逆にリンパ管侵襲高度 (ly2-3), 静脈侵襲陽性 (v1-3), 漿膜浸潤陽性 (SE-), 臨床病期進行例 (Stage III-IV) で有意に低値であった。リンパ節転移陽性 (N1-) でも有意差はないものの、低値となる傾向がみられた。

#### (2) DPD および OPRT mRNA 発現量

DPD, OPRT mRNA 発現量と臨床病理学的因子とは統計学的に関連は認めなかった。

### 3) 再発の有無による各酵素発現量

再発の有無は治療開始時の進行度が強く影響する。全症例が術後 5 年を経過した 2006 年 12 月の時点において再発例と無再発例に分け、各酵素の mRNA 発現量の分布を比較した (Table 3)。再発例では、TS mRNA 発現量が有意に低値 (p = 0.0126) であった。DPD および OPRT mRNA 発現量では有意差は認めなかった。

### 4) 再発の危険因子に関する検討

再発を目的変数、再発に関わる因子としてリンパ管侵襲, 静脈侵襲, リンパ節転移, 壁深達度, 組織

**Table 2** Relationship between clinicopathological factors and the expression levels of enzymes

Variables	Category	N	TS mRNA		DPD mRNA		OPRT mRNA	
			Median (range)	p-value	Mean ± SD	p-value	Mean ± SD	p-value
Lymphatic invasion	ly0-1	37	2.04 (0.93-17.82)	MW 0.017*	0.35 ± 0.14	##N.S.	1.58 ± 0.57	##N.S.
	ly2-3	15	1.34 (0.71-2.53)		0.32 ± 0.17		1.51 ± 0.62	
Venous invasion	v0	39	1.71 (0.71-17.82)	MW 0.032*	0.34 ± 0.14	##N.S.	1.58 ± 0.59	##N.S.
	v1-3	13	1.74 (0.91-8.88)		0.34 ± 0.18		1.69 ± 0.53	
Depth	-SS	40	2.10 (0.93-17.82)	MW 0.003*	0.35 ± 0.13	##N.S.	1.59 ± 0.63	##N.S.
	SE-	12	1.340 (0.71-3.15)		0.30 ± 0.18		1.38 ± 0.36	
Lymph node metastasis	N0	27	2.04 (0.93-17.82)	MW 0.085	0.36 ± 0.15	##N.S.	1.64 ± 0.62	##N.S.
	N1-	25	1.62 (0.71-6.05)		0.32 ± 0.15		1.44 ± 0.54	
Differentiation	well	21	1.66 (0.71-7.44)	KW 0.012* JT 0.042*	0.29 ± 0.14	#N.S.	1.30 ± 0.49	#N.S.
	mod	26	1.74 (0.91-8.88)		0.35 ± 0.14		1.74 ± 0.60	
	por	5	4.47 (2.53-17.82)		0.43 ± 0.17		1.50 ± 0.56	
Stage	Stage I II	23	2.54 (0.93-17.82)	KW 0.047* JT 0.014*	0.36 ± 0.15	#N.S.	1.65 ± 0.64	#N.S.
	Stage III	19	1.51 (0.71-6.05)		0.34 ± 0.15		1.43 ± 0.61	
	Stage IV	10	1.60 (0.91-2.14)		0.26 ± 0.12		1.52 ± 0.32	

TS mRNA was at low levels in advanced cases—indicated by pathological factors such as lymphatic invasion, venous invasion, depth invasion, and clinical stage. Conversely, TS mRNA level was significantly higher in cases with poor differentiation.

DPD and OPRT mRNA expression levels showed no difference in each of the clinicopathological factors.

KW: Kruskal-Wallis, JT: Jonckheere-Terpstra, MW: Mann-Whitney U, #ANOVA: analysis of variance, ##t: Student' t-test, \*p<0.05, N.S.: not significant.

**Table 3** Comparison of enzyme expression levels in the recurrence group and the non-recurrence group

	Recurrence (+) (N = 20)	Recurrence (-) (N = 32)	p-value
TS mRNA	1.62 ± 0.57	3.20 ± 3.26	#0.0126*
DPD mRNA	0.30 ± 0.13	0.36 ± 0.15	##N.S.
OPRT mRNA	1.35 ± 0.53	1.67 ± 0.59	##N.S.

TS mRNA expression levels was at significantly low levels in the recurrence group compared to the group with no recurrence. mean ± SD, #Mann-Whitney, ##Student-t test, \*p<0.05, N.S.: not significant.

型, TS mRNA 発現量 ( $\leq 2.5$ ,  $> 2.5$ ) を選択し, ロジスティック回帰分析を行った (Table 4). 単変量解析にてリンパ管浸潤高度 (ly2-3), 漿膜浸潤陽性 (SE-), リンパ節転移陽性 (N1-), TS mRNA 発現量低値が再発に関わる因子として抽出された. 変数減少法による多変量解析を行った. 壁深達度 ( $p = 0.014$ ), リン

パ節転移 ( $p = 0.039$ ) が再発に寄与する因子として抽出されたが, TS mRNA 発現量は抽出されなかった.

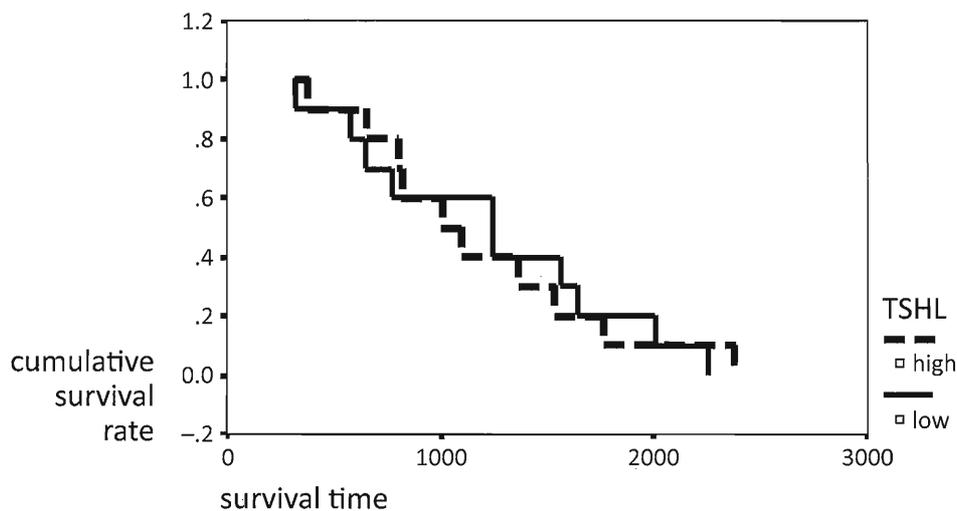
#### 5) 再発群における TS mRNA 発現量と累積生存曲線 (Fig. 1)

再発群で TS mRNA 発現量を再発群の中央値で高値群と低値群にわけた生存期間の差を Kaplan-

**Table 4** Multivariate analysis of recurrence factors by logistic regression

Variables	Category	N (recurrence)	Univariate analysis			Multivariate analysis (backward elimination method)		
			Odds ratio	95%CI	p-value	Odds ratio	95%CI	p-value
Lymphatic invasion	ly0-1	37 (11)			0.047*			
	ly2-3	15 (9)	3.545	1.015-12.832				
Venous invasion	v0	39 (12)			0.055			
	v1-3	13 (8)	3.600	0.973-13.316				
Depth	-SS	40 (11)			0.006*			0.014*
	SE-	12 (9)	7.909	1.801-34.728		6.943	1.477-32.647	
Lymph node metastasis	N0	27 (6)			0.015*			0.039*
	N1-	25 (14)	4.455	1.338-14.831		3.898	1.069-14.215	
Differentiation	well	21 (6)			0.231			
	mod, por	31 (14)	2.058	0.631-6.711				
TS mRNA expression	High ( $\geq 2.5$ )	16 (2)			0.019*			
	Low ( $< 2.5$ )	36 (18)	0.143	0.028-6.850				

A multivariate analysis extracted invasion of depth and lymph node metastasis as risk factors for recurrence, but not TS mRNA expression levels.



TS mRNA expression	N	Survival time Median(days)	Log-rank test
high(>1.62)	10	1003.00	0.979
low( $\leq 1.62$ )	10	1246.00	

**Fig. 1** Survival curves related to expression levels of TS mRNA in the recurrence group. In the group with recurrence, there was no significant difference in survival rates between the groups with high or low TS mRNA levels.

Meyer 法および log-rank test で検討した。生存期間に有意差はなかった。

#### 考 察

5-FU の代謝に関わる酵素として、TS、DPD、OPRT の存在が知られている。OPRT は 5-FU を活

性化ヌクレオチドに変換し、DNA および RNA の合成阻害に関わる。DPD は腫瘍内で 5-FU の 85% を代謝、無毒化する。DPD による分解を免れた 5-FU 代謝産物である fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) と還元型葉酸が covalent ternary complex

を形成することで、TSの酵素活性が阻害されDNA合成阻害をきたすと考えられている。したがって、腫瘍内のTSとDPDが低く、OPRT活性は高いほど5-FUの抗腫瘍効果は高くなると考えられる。

また、TSは細胞増殖に関わる酵素でもあり、細胞増殖の盛んな組織で増加する。従って、TSの腫瘍内発現が高いほど悪性度が高くなり、悪性度の指標となることが示唆されている<sup>1)~5)</sup>。

当施設の大腸癌手術症例に対してTS、DPD、OPRT各酵素のmRNA発現量と臨床病理学的因子との関係について検討した。今回の検討では、TS mRNA発現量ではリンパ管侵襲高度陽性、静脈侵襲陽性、漿膜浸潤陽性、臨床病期進行例で有意に低値であった。逆に、組織型では低分化の群でTS mRNA発現量が有意に高値であった。

以上の結果から、組織型を悪性度の指標、リンパ管侵襲、静脈侵襲、壁深達度、臨床病期を進行度の指標として考えると、悪性度が高いと高発現となり、進行に伴い低発現となる可能性が示唆された。

Fujiiら<sup>19)</sup>は大腸癌原発巣におけるTS活性値とKi67 Labeling index (LI)との関係について検討し、LIが75以上で有意にTS活性が高値(p=0.0016)であり、悪性度の高いものでTS活性値が高値であったと報告した。またYamaneら<sup>20)</sup>は大腸癌肝転移巣のTS mRNA発現量につき比較検討をし、高分化 $1.8 \pm 2.3$ 、低分化 $4.0 \pm 4.9$ 、同時性肝転移 $1.3 \pm 0.8$ 、異時性肝転移 $2.3 \pm 3.0$ で、有意差はなかったが、悪性度の高いものにおいて高値であり、進行した転移巣では低値となる傾向があったと報告した。両者の結果は悪性度の高いものほど、TS活性が高値であることが示唆されるものとし、今回の結果と合致する。

病理学的背景因子とTS mRNA発現量との関係について山田ら<sup>21)</sup>は4文献<sup>19)21)~23)</sup>の報告を集積し、深達度、静脈侵襲、リンパ管侵襲、リンパ節転移、進行度につき比較したが、いずれも統計学的に差がなかったと報告している。

長野ら<sup>24)</sup>はTS mRNA発現量を原発巣、間質部および転移巣と比較している。TS mRNA発現量は間質より腫瘍部で強く発現した。また転移巣との比較では、肝転移<原発巣<リンパ節転移の順に低発現であったと報告している。発現が異なる要因として転移巣での細胞増殖の形態の違いや、mRNAレベルでの発現調節機構が異なることを挙げている。

しかし進行度による各酵素のmRNA発現量の変化に関する論文は現在のところ見つけることはでき

なかった。

手術後5年を経過し、再発のあった症例で有意にTS mRNA発現量が低値であったことから、多変量解析により、再発に影響を与える因子について解析を行った。単変量解析ではTS mRNA発現量も有意であった。しかし、多変量解析では漿膜浸潤とリンパ節転移が再発に寄与する因子として抽出されたが、TS mRNA発現量は抽出されなかった。また、再発群においてTS mRNA発現量の高値群と低値群で生存日数を比較したところ、両者には生存期間に差はみられなかった。

以上の結果から、TS mRNA発現量は進行に伴い低値となるが直接的な再発の因子ではなく、予後には影響しないと考えられた。

Sanjayら<sup>25)</sup>は進行大腸直腸癌症例で術後にTS inhibitorを用いた症例の8文献に対し、TS mRNA発現量とoverall survival (OS)について検討している。その結果、総合的にはTS mRNA発現量が高値であるほど生存期間が短く、予後が不良である傾向であった。しかし文献によって結果にばらつきがあったと報告している。文献毎に測定方法が異なること、基準点の設定が各文献により異なることを問題点として指摘している。

今回の検討では再発群では低値であり、癌の進行に伴ってTS mRNA発現量が低発現となる可能性が示唆された。測定時期の観点からも検討することが必要と考えられた。

本論文に関し開示すべき利益相反はない。

#### 文 献

- 1) Herzfeld A, Greengard O: Enzyme activities in human fetal and neoplastic tissues. *Cancer* 46: 2047-2054, 1980
- 2) Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D et al: p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 4: 1243-1250, 1998
- 3) Peters G, van Groeningen CJ, Laurensse EJ: Thymidylate synthase from untreated human colorectal cancer and colorectal mucosa: Enzyme activity and inhibition by 5-fluoro-2'-deoxy-uridine-5'-monophosphate. *Eur J Cancer* 27: 263-267, 1991
- 4) Pradiso A, Simone G, Petroni S et al: Thymidylate Synthase and p53 primary tumor expression as predictive factors for advanced colorectal cancer patients. *Br J Cancer* 82: 560-567, 2000
- 5) 斎藤卓也, 柿原直樹, 石井 亘ほか: 大腸癌腫瘍組織中のThymidylate Synthase (TS), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) 値は予後の指標

- となりうるか. 京二赤医誌 25 : 80-88, 2004
- 6) **Inoue T, Hibi K, Nakayama G et al**: Expression level of thymidylate synthase is a good predictor of chemosensitivity to 5-fluorouracil in colorectal cancer. *J Gastrointrol* 40: 143-147, 2005
  - 7) **Johnslon PG, Fisher ER, Rockette HE et al**: The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12: 2640-2647, 1994
  - 8) **Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K et al**: Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 7: 193-198, 2000
  - 9) **伊佐 勉, 照屋 剛, 友利寛文ほか**: 大腸癌における組織内 Thymidylate Synthase および Dihydropyrimidine Dehydrogenase 活性と臨床病理学的因子との関連性について. *日本大腸肛門病会誌* 55 : 343-347, 2002
  - 10) **吉田 徹, 下沖 収, 馬場祐康ほか**: 胃癌・大腸癌における DPD, TS 蛋白発現の検討. *癌と化療* 32 : 183-187, 2005
  - 11) **山田岳史, 田中宣威, 横井公良ほか**: 5-FU 関連酵素 OPRT, DPD, TS 活性を用いた 5-FU の効果予測. *癌と化療* 33 (11) : 1603-1609, 2006
  - 12) **山本哲朗, 滝田尚仁, 仙石博信ほか**: Danenberg Tumor Profile 法を用いた大腸癌におけるピリミジン代謝酵素の mRNA 発現量の検討. *順天堂医* 52 : 62-68, 2006
  - 13) **大見琢磨**: 大腸癌における Orotate Phosphoribosyl Transferase(OPRT), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD), Thymidylate Synthase (TS) 活性および mRNA 発現と臨床病理学的背景因子に関する検討. *帝京医誌* 30 (4) : 229-239, 2007
  - 14) **徳永行彦, 大西崇規, 佐々木宏和ほか**: 5FU 代謝酵素の発現, 並びに AUC 曲線からみた大腸癌術後化学療法の個別化. *通信医* 59 (3) : 181-182, 2007
  - 15) **石橋敬一郎, 傍島 潤, 大澤智徳ほか**: びまん浸潤型大腸癌における Thymidylate Synthase, Thymidine Phosphorylase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Orotate Phosphoribosyltransferase mRNA 発現. *癌と化療* 34 (7) : 1073-1077, 2007
  - 16) **石田秀行, 白川一男, 大澤智徳ほか**: 大腸癌原発巣における Thymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Orotate Phosphoribosyltransferase mRNA 発現の相互関係と 5-FU 系抗癌剤の効果予測. *癌と化療* 32 (12) : 1929-1934, 2005
  - 17) **竹村雅至, 大杉治司, 李 榮注ほか**: 大腸癌組織中 DPD・OPRT 活性よりみた大腸癌に対する化学療法. *癌と化療* 31 : 1053-1056, 2004
  - 18) **大腸癌研究会**: 「大腸癌取り扱い規約第 6 版」, 金原出版, 東京 (1998)
  - 19) **Fujii R, Kameoka S, Seshimo A**: Relationships between the expression of thymidylate synthase, Dihydropyrimidine dehydrogenase, and orotate phosphoribosyltransferase and cell proliferative activity and 5-fluorouracil sensitivity in colorectal carcinoma. *Int J Clin Oncol* 8: 72-78, 2003
  - 20) **Yamane T, Seshimo A, Kameoka S**: Analysis of the mRNA expression levels of thymidylate synthase (TS) dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) in liver metastases from colorectal cancer. *Hepatogastroenterology* 60: 291-295, 2013
  - 21) **山田岳史, 田中宣威, 横井公良ほか**: 大腸癌における Orotate Phosphoribosyl Transferase (OPRT), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD), Thymidylate Synthase (TS) 活性と臨床病理学検討. *癌と化療* 33 (6) : 789-793, 2006
  - 22) **上村佳央, 小林研二, 青木太郎ほか**: 大腸癌における Orotate Phosphoribosyl Transferase (OPRT), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) 活性の関連性と臨床病理学的因子に関する検討. *癌の臨* 49 : 1425-1429, 2003
  - 23) **落合 匠, 杉谷通治, 西村和彦ほか**: 大腸癌における Orotate Phosphoribosyl Transferase (OPRT), Thymidylate Synthase (TS), Dihydropyrimidine Dehydrogenase (DPD) の発現と臨床病理学的背景因子に関する検討. *癌と化療法* 29 (3) : 413-420, 2002
  - 24) **長野裕人, 市川 度, 清水道生ほか**: 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* 31(6) : 889-892, 2004
  - 25) **Popat S, Matakidou A, Houlston RS**: Thymidylate synthase expression and prognosis in colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *J Clin Oncol* 22 (3): 529-536, 2004