

4型胃癌におけるTS, DPD, TP, OPRTのmRNAの発現と予後

東京女子医科大学医学部外科学(第2)講座

ハシモト タダミチ セシモ アキヨシ カメオカ シンゴ
橋本 忠通・瀬下 明良・亀岡 信悟

(受理 平成26年10月16日)

Manifestation and Prognosis of TS, DPD, TP, and OPRT mRNAs in Type 4 Gastric Cancer

Tadamichi HASHIMOTO, Akiyoshi SESHIMO and Shingo KAMEOKA

Department of Surgery II, Tokyo Women's Medical University

Introduction: The anticancer drug fluoropyrimidine is a principal agent among anticancer drugs for the treatment of gastric cancer. The manifestation of metabolic enzymes thymidine synthase (TS), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP), and orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) influences the effect of treatment. Also, we reported with the independent prognostic factor. **Materials and Methods:** We studied 62 cases of type 4 gastric cancer surgery. We measured TS, DPD, TP, and OPRT mRNAs intratumorally using the Danenberg tumor profile (DTP) method and examined the association in terms of clinicopathology and prognosis. **Results:** We performed the measurement with up to 92.5% accuracy using the DTP method; however, because there were few tumor ingredients for type 4 gastric cancer, it had been difficult to measure this accurately until now. Each enzyme level, histological type, and connection with the clinical stage were unrelated. We did not observe a difference in TS, DPD, and OPRT mRNAs when we examined each enzyme level and prognosis; however, the 3-year survival rate in the high TP mRNA level group was 19% and that in the low TP mRNA level group was 40%, with the prognosis being significantly poor in the high TP mRNA level group. We conducted multivariable analysis on each enzyme level and pathological factor (histological type, lymph node metastasis, lymph duct infestation, vein infestation, and serosal invasion) in terms of the prognosis. TP mRNA was the significant factor, with lymph duct infestation, vein infestation, and serosal invasion. **Conclusion:** TP mRNA was an independent prognostic factor, and it was suggested that we could become the index of the prognostication.

Key Words: type 4 gastric cancer, thymidine phosphorylase (TP), Danenberg tumor profile (DTP) method

緒 言

4型胃癌はスキルス胃癌の性状を示すことが多く早期発見が困難なため、診断時には進行癌であることが多い。また治癒切除率が低く、治癒切除後も高率に再発するため、抗癌剤治療の対象となることが多い。そして進展様式として高頻度のリンパ節転移、腹膜播種の進展様式を示すため他の肉眼系の胃癌と比較しても極めて予後不良の疾患である^{1)~4)}。

一方で、胃癌に対する診断と治療技術が進歩し、その他の肉眼型進行胃癌に対して、奏効率の高い薬が開発されてきた^{4)~9)}。その中でフッ化ピリミジン系

抗癌剤は依然として中心となる薬剤の一つである。Thymidine synthase (TS) dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP), orotate phosphoribosyltransferase (OPRT) はフッ化ピリミジン系抗癌剤の代謝酵素であり、原発巣での各酵素の発現とその治療効果について多くの報告がなされている^{10)~13)}。また抗癌剤との関連だけではなく、独立した予後因子としても報告されている。しかし、4型胃癌では癌細胞が少なく、間質が多いため、測定が難しくこれまでは報告が少ない。近年になり、パラフィン包埋標本より癌細胞だけを分離し、

各酵素の遺伝子が測定できるようになってきた。そこで今回、我々はその方法を用いて、4型胃癌手術症例の胃癌原発巣における各酵素の mRNA を測定し、その有用性について検討した。

対象と方法

2006年に新規抗癌剤である TS-1 の術後予防投与を開始したため、それ以前の症例では化学療法の効果は少ないと考え、1990年から2005年の16年間に当科において施行した4型胃癌切除67症例で上記酵素の遺伝子を測定し、患者側病巣因子について予後を検討した。5例は分離細胞数が少なく測定が不十分であったため、検討から除外した。62症例の内訳を示す (Table 1)。男女比は男性34例、女性28例、年齢は 61.2 ± 11.7 歳であった。

胃癌原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋標本から laser capture microdissection (LCM) により腫瘍組織と正常組織を分離した。そして癌細胞から TS, DPD, TP, OPRT の mRNA 発現を Danenberg tumor profile (DTP)¹⁴を用いて測定した。mRNA

発現量は β -actin との比で表した。実際の測定は Response Genetics Inc に依頼し行った。

今までの mRNA の解析には凍結標本が使用されたため、対象となる検体が限られていた。今回の DTP 法では LCM により、4型胃癌のように間質が多い腫瘍でも癌細胞を正確に切り出すことができた。その切り出した細胞より RNA を抽出、real time-PCR によって TS, DPD, TP, OPRT の mRNA 発現を定量した。この測定は、包括的同意のもとに行った。なお、用語は日本胃癌取り扱い規約第13版¹⁵に準じた。

すべての結果は平均値 \pm 標準誤差 (mean \pm SE) で示した。生存曲線は Kaplan-Meier 法で作成し、log-rank test で有意差検定を行った。また Cox 比例ハザードモデルによる解析を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありと判定した。解析ソフトは SAS Institute Inc の JMP を用いた。本研究は東京女子医科大学倫理委員会の承認を受けている。

結 果

対象症例の生存期間中央値 median survival time (MST) は 500 日で、平均経過観察期間は 852 ± 129 日、そして各ステージの生存率は有意差を認めた (Fig. 1)。

5-Fu 代謝関連酵素の測定結果

1. 各酵素の測定結果

TS mRNA は 0.74~18.87, 平均 4.00 ± 2.85 であった。DPD mRNA は 0.53~3.63, 平均 1.61 ± 0.70 であった。TP mRNA は 2.03~21.6, 平均 8.69 ± 4.55 であった。OPRT mRNA は 0.37~2.97, 平均 1.17 ± 0.53

Table 1 Background of patients

Sex (M/F)	34 (54.8%)/28 (45.2%)
Age (years)	61.2 ± 11.7
Stage (0/I/II/III/IV)	0/5/2/20/10/25
A histologic type	
signet ring cell adenocarcinoma	1 (1.6%)
mucinous carcinoma	2 (3.2%)
tubular adenocarcinoma	10 (16.1%)
poorly differentiated adenocarcinoma	49 (79.0%)

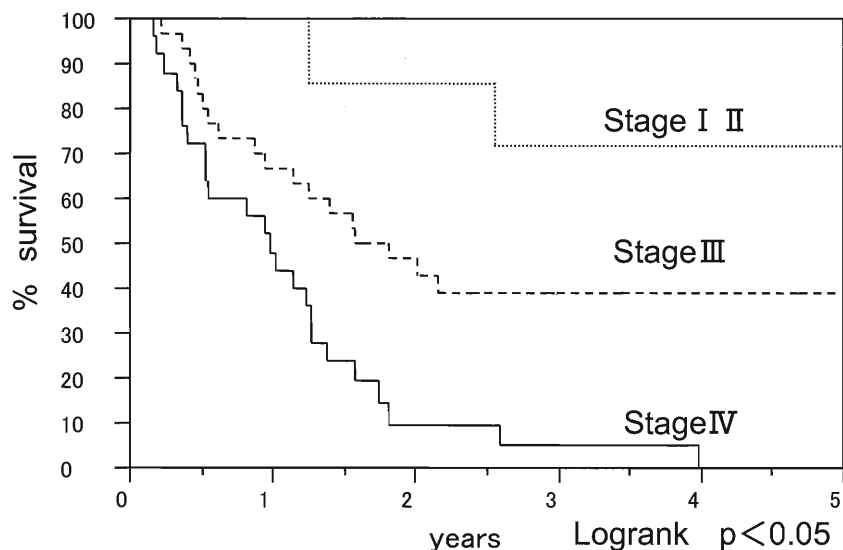


Fig. 1 The survival rate at each stage

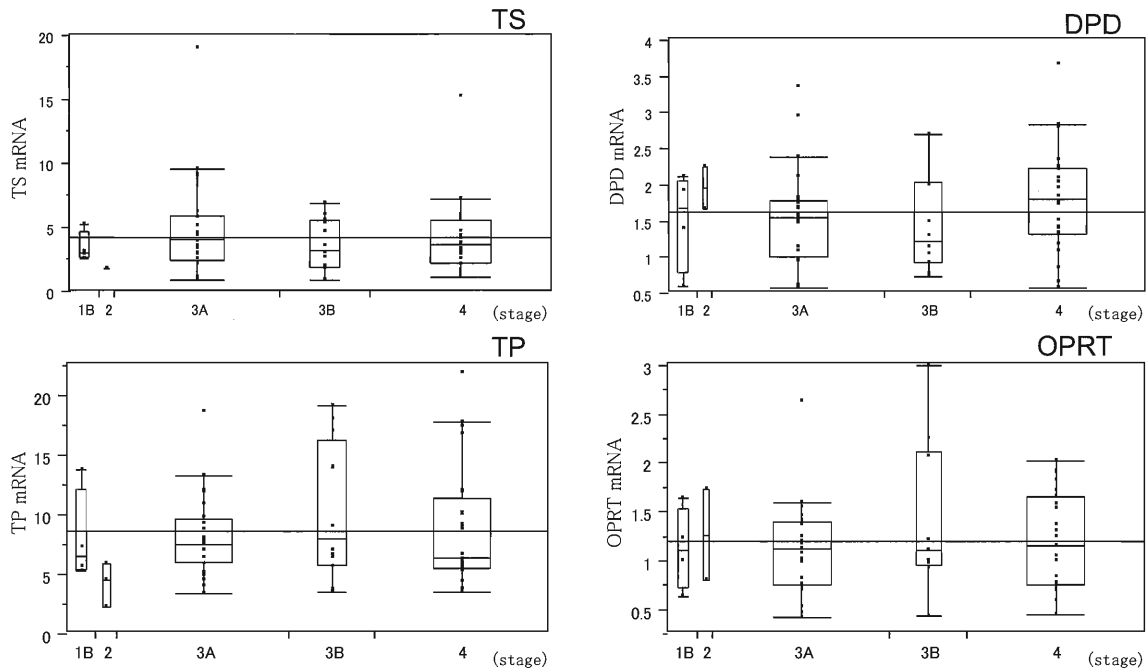


Fig. 2 Each enzyme in relation to its clinical stage

With regard to the stage, we can see the perioperative progress, a reflection in the cancer cell itself, and there seems to be no correlation.

The width of a graph is proportional to the number of cases.

であった。

2. 病期との関連

各酵素と臨床病期に関しては明らかな関連は認めなかった (Fig. 2)。

3. 組織型との関連

各酵素と組織型に関しても明らかな関連は認めなかった。

4. 各酵素の値による生存率の検討

各酵素を中央値にて高値群, 低値群と2群に分類して生存率を検討した。

TS mRNA, DPD mRNA, OPRT mRNA では生存率に差は認めなかった。しかし TP mRNA において3年生存率が高値群19%, 低値群40%であり TP mRNA 高値群にて有意に予後不良であった (Fig. 3)。

5. 予後因子と各酵素値

4型胃癌の予後因子として, 組織型(分化型, 未分化型)リンパ節転移(N0.1, N2.3)リンパ管侵襲(ly0.1, ly2.3)静脈浸潤(v0.1, v2.3)漿膜浸潤の有無(T1.2, T3.4)の5因子を単変量解析すると, リンパ節転移, リンパ管侵襲にて予後に有意差を認めた。そして, これら5因子と TP mRNA で生存期間について多変量解析を行った。TS mRNA, DPD mRNA, OPRT mRNA は有意な因子として残らなかった。しかし

TP mRNA はリンパ管侵襲, 静脈浸潤, 漿膜浸潤の有無とともに有意な因子として残った (Table 2)。

6. TP mRNA とリンパ節転移, リンパ管侵襲, 静脈侵襲の関連

リンパ節転移 (N0-3), リンパ管侵襲 (ly0-3), 静脈侵襲 (v0-3) の関係を解析した。TP mRNA を連続変数のまま Wilcoxon 検定を行った。TP mRNA が高値な症例では, リンパ節転移 (N0-3), リンパ管侵襲 (ly0-3) は有意に高度であった。しかし静脈侵襲 (v0-3) と TP mRNA では明らかな相関関係は認めなかった (Fig. 4)。

考 察

5-Fu は1956年に Dushinsky, Heidelberger らによって合成された。その後, 抗腫瘍効果を有することが報告され, 多数の基礎的研究の結果が報告されている^{16)~18)}。5-Fu 代謝酵素の研究は1985年の Naguib ら¹⁹⁾が最初である。5-Fu 代謝経路の約85%が肝臓に存在しており DPD によって分解されるが, 腫瘍組織にも, 強い5-Fu 代謝酵素の存在を述べている。1994年には Beck ら²⁰⁾, 1995年には Etienne ら²¹⁾が腫瘍組織内の代謝酵素が, 5-Fu の抗腫瘍効果に及ぼす影響を報告している。その後, 5-Fu の作用機序の研究が進み, 現在, 5-Fu の抗腫瘍効果として, RNA 機能障害および DNA 合成障害に関わる酵素

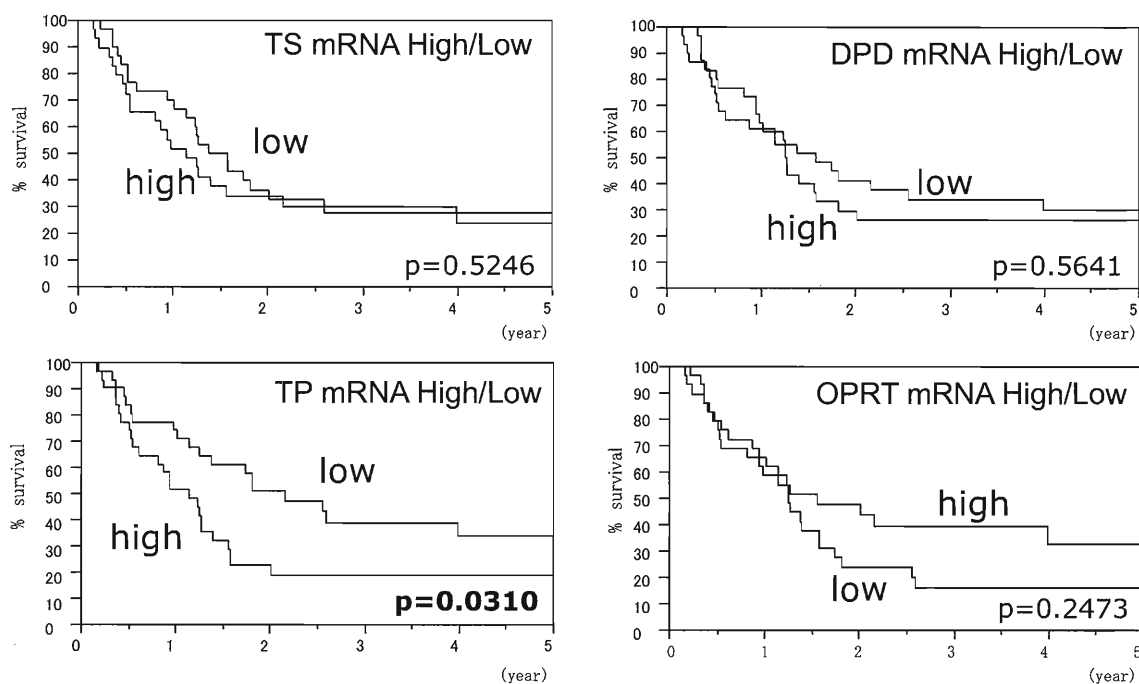


Fig. 3 Each enzyme level, high/low

We did not observe a difference in survival rates in TS, DPD, and OPRT mRNAs.

We had a significantly poor prognosis in the high TP mRNA level group.

Table 2 Analysis of prognostic variables using the Cox's proportional hazards model

	n	p-value		Hazard rate	95%CI
		Univariate	Multivariate		
TP mRNA High/Low	31/31	0.0334*	0.0224*	1.4891	1.0587-2.1325
Undif./Dif	52/10	0.7878	0.1435	0.7249	0.4459-1.1097
n0,1/n2,3	26/36	0.0009*	0.0634	0.6984	0.4627-1.0209
ly0,1/ly2,3	21/41	0.0001*	0.0062*	0.5508	0.3417-0.8492
v0,1/v2,3	60/2	0.1683	0.0231*	0.3096	0.1472-0.8211
T1,2/T3,4	19/43	0.0517	0.0096*	0.6361	0.4339-0.8991

*: significantly different.

は TS, DPD, TP, OPRT の 4 つが考えられている。腫瘍内に取り込まれた 5-Fu は腫瘍細胞内の DPD により 2-fluoro- β -alanine に分解される²²⁾。分解を受けなかった 5-Fu が fluorodeoxyuridine monophosphate (FdUMP) に代謝される。FdUMP は還元型葉酸と TS とともに ternary complex を形成することにより、TS の活性酵素が阻害され、DNA 合成阻害をもたらす²³⁾。OPRT は 5-Fu を fluorouridine monophosphate (FUMP) に転換することにより DNA 合成阻害および RNA 機能障害の両方に関わる。TP は 5'-DFUR を 5-Fu に転換することで抗腫瘍効果を発揮させる²⁴⁾。

これまで代謝酵素の測定には酵素活性測定、免疫組織染色が行われてきた。近年、分子生物学的研究

の進歩により RT-PCR 法による mRNA の測定が行われている。従来、mRNA の解析には凍結標本が使用されるため対象となる検体が限られていた。そして正常間質細胞の混入が避けられず、scirrhous type のように癌組織中に間質が多い症例では結果がどこまで癌細胞の遺伝子を反映しているのかという懸念が存在した。そのため 4 型胃癌手術症例に関する報告は少ない。しかし Danenberg らにより開発された DTP 法は取り扱いの簡便なパラフィン包埋切片を用いて LCM 法により癌細胞のみを採取し、mRNA レベルの遺伝子発現を調べる方法である。この方法は症例が凍結標本に限定されず、正常細胞の混入も防止できるため、多数の検体を用いた癌細胞のみの信頼性の高い mRNA レベルの結果が期待できる。

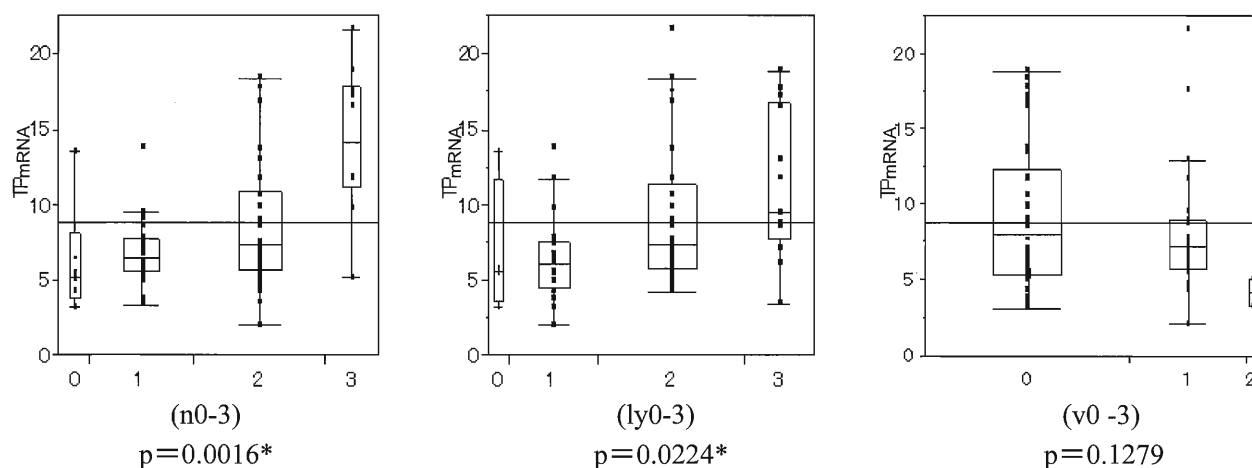


Fig. 4 Relationship between TP mRNA and pathological factor

We considered TP mRNA as a continuous variable in analysis of lymph node metastasis (n0-3), lymph duct infestation (ly0-3), and relationship with vein infestation (v0-3).

The width of a graph is proportional to the number of cases.

*: significantly different.

その他の特徴として検体量が微量で良いため治療前の生検材料や早期癌も測定可能となっている。またホルマリン固定パラフィン包埋標本を使用するため保存が簡便であり、レトロスペクティブな検討が容易となった。当科においも過去16年間に行った4型胃癌について検討したが、67例中62例(92.5%)の症例で測定可能であった。

今回、測定できたTS mRNA, DPD mRNA, TP mRNA, OPRT mRNAと臨床病期を検討すると、明らかな関連は認めなかった。おそらく病期は手術時の進行度を反映したものであり、癌細胞自体の性質を反映したのではないため関連しないと思われた。

また各酵素を高値群、低値群にて予後を比較検討した。TP mRNAにおいて高値群の予後が不良で、生存率に有意差を認めた。TPが癌組織内で高値を示すことはこれまで多く報告されている。TPと胃癌の予後に関する報告では、免疫染色によるTP発現を比較した研究が多く、ELISA法での測定も含めてTP活性が高い症例では予後不良を示唆する報告が多い^{25)~27)}。また4型胃癌の予後因子として組織型(分化型、未分化型)リンパ節転移(N0.1, N2.3)リンパ管侵襲(ly0.1, ly2.3)静脈浸潤(v0.1, v2.3)漿膜浸潤の有無(T1.2, T3.4)の5因子と各酵素値で多変量解析すると、TP mRNAはリンパ管侵襲、静脈浸潤、漿膜浸潤の有無とともに有意な因子として残った。TPは血管新生因子のひとつであり、血小板由来内皮細胞成長因子(PD-ECGF)と同一の蛋白質である

ことが解明され²⁸⁾²⁹⁾、さらにアポトーシスの抑制に関与するなど、癌の転移進展の成立過程において注目されている³⁰⁾。今回TP mRNA高値症例では血管新生因子としての作用から静脈浸潤が増加すると予想されたが、TP mRNA値と静脈浸潤には明らかな相関関係を認めなかった。しかしTP mRNA高値症例では、リンパ節転移、リンパ管侵襲はともに有意に高度であった。TP mRNA高値症例ではリンパ節転移が有意に多いことはTakebayashiら³¹⁾も指摘しており、今回4型胃癌に絞った検討においても同様の結果となった。またUejimaら³²⁾も胃癌においてTPはVEGF(vascular endothelial growth factor)と共発現し、両者が相加、相乗的に作用して新生血管のみならずリンパ節転移にも関与することを述べている。4型胃癌におけるTPの転移に関する役割は大きいと思われた。

今回、有意差は認めなかったがOPRTにおいては低値群で予後不良の傾向があった。これまでもOPRTは様々な固形癌において検討されており、胃癌においても予後因子と関連があると報告されている³³⁾。今回は症例数が少ないため有意差は認めなかったが、症例を積み重ねれば有意差が出る可能性は高いと思われた。

またTS-1につづいて胃癌化学療法にてよく用いられる5-DFURやそのprodrugであるcapecitabineは腫瘍内に存在するTPによって代謝され5-Fuに変換される。TPが高い腫瘍では5-DFURやcapecitabineに対して高い感受性を示すことが基礎

的に報告されており³⁴⁾, 4型胃癌でもDTP法を用いることにより内視鏡生検の微小検体からTP mRNAを測定でき, 予後因子としてだけでなく化学療法の感受性予測となり, 今後もTP mRNA測定は大きな意味をもつことと思われた.

結 論

DTP法により4型胃癌の腫瘍内のTS mRNA, DPD mRNA, TP mRNA, OPRT mRNAを92.5%の症例で測定することができた. 各酵素値は臨床病期と関連性はなかった. 各酵素値と予後とを検討するとTP mRNA高値群にて予後不良であり, その一因としてTPのリンパ節転移への関与が考えられた. 各酵素と5因子(組織型, リンパ節転移, リンパ管侵襲, 静脈侵襲, 漿膜浸潤の有無)との多変量解析でもTP mRNAは, リンパ管侵襲, 静脈侵襲とともに有意な因子として残った. TP mRNAは独立した予後因子であり, 予後判定の指標となりうることが示唆された.

開示すべき利益相反状態はない

文 献

- 1) **Maehara Y, Moriguchi S, Orita H et al:** Lower survival rate for patients with gastric carcinoma of Borrmann type IV following gastric resection. *Surg Gynecol Obstet* **175**: 13-16, 1992
- 2) **Parkin DM:** Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol* **2**: 533-543, 2001
- 3) **Nakazawa K, Yashiro M, Hirakawa K et al:** Keratinocyte growth factor produced by gastric fibroblasts specifically stimulates proliferation of cancer cells from scirrhous gastric carcinoma. *Cancer Res* **63**: 8848-8852, 2003
- 4) **Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A et al:** Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. *Lancet* **376**: 687-697, 2010
- 5) **Ajani JA, Rodriguez W, Bodoky G et al:** Multicenter phase III comparison of cisplatin/S-1 with cisplatin/infusional fluorouracil in advanced gastric or gastroesophageal adenocarcinoma study: the FLAGS trial. *J Clin Oncol* **28**: 1547-1553, 2010
- 6) **Kang YK, Kang WK, Shin DB et al:** Capecitabine/cisplatin versus 5-fluorouracil/cisplatin as first-line therapy in patients with advanced gastric cancer: a randomised phase III noninferiority trial. *Ann Oncol* **20** (4): 666-673, 2009
- 7) **Ohtsu A, Shimada Y, Shirao K et al:** Randomized phase III trial of fluorouracil alone versus fluorouracil plus cisplatin versus uracil and tegafur plus mitomycin in patients with unresectable, advanced gastric cancer: The Japan Clinical Oncology Group Study (JCOG9205). *J Clin Oncol* **21**: 54-59,

- 2003
- 8) **Koizumi W, Narahara H, Hara T et al:** S-1 plus cisplatin versus S-1 alone for first-line treatment of advanced gastric cancer (SPIRITS trial): a phase III trial. *Lancet Oncol* **9**: 215-221, 2008
- 9) **Boku N, Yamamoto S, Fukuda H et al:** Fluorouracil versus combination of irinotecan plus cisplatin versus S-1 in metastatic gastric cancer: a randomised phase 3 study. *Lancet Oncol* **10**: 1063-1069, 2009
- 10) **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
- 11) **Ichikawa W, Uetake H, Shirota Y 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* **89**: 1486-1492, 2003
- 12) **Yasuno M, Mori T, Koike M et al:** Importance of thymidine phosphorylase expression in tumor stroma as a prognostic factor in patients with advanced colorectal carcinoma. *Oncol Rep* **13**: 405-412, 2005
- 13) **Hisamitsu K, Tsujitani S, Yamaguchi K et al:** Expression of dihydropyrimidine dehydrogenase in cancer cells but not in stromal cells predicts the efficacy of fluorouracil treatment in patients with gastric carcinoma. *Anticancer Res* **24**: 2495-2501, 2004
- 14) **Fink L, Seeger W, Ermert L et al:** Real-time quantitative RT-PCR after laser-assisted cell picking. *Nat Med* **4**: 1329-1333, 1998
- 15) **日本胃癌学会:** 「胃癌取扱い規約. 第13版」, 金原出版, 東京 (1999)
- 16) **Duschinsky R, Plevin E, Heidelberger C:** The synthesis of 5-fluoropyrimidines. *J Am Chem Soc* **79**: 4559, 1957
- 17) **Heidelberger C, Chaudhuri NK, Dannenberg P et al:** Fluorinated pyrimidines, a new class of tumor-inhibitor compounds. *Nature* **179**: 663-666, 1957
- 18) **Curreri AR, Ansfield FJ, McIver FA et al:** Clinical studies with 5-fluorouracil. *Cancer Res* **18**: 478-484, 1958
- 19) **Naguib FN, el Kouni MH, Cha S:** Enzyme of uracil catabolism in normal and neoplastic human tissue. *Cancer Res* **45**: 5405-5412, 1985
- 20) **Beck A, Etienne MC, Chéradame S et al:** A role for dihydropyrimidine dehydrogenase and thymidylate synthase in tumor sensitivity to fluorouracil. *Eur J Cancer* **30**: 1517-1522, 1994
- 21) **Etienne MC, Chéradame S, Fischel JL et al:** Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* **13**: 1663-1670, 1995
- 22) **Heggie GD, Sommadossi JP, Cross DS et al:** Clinical pharmacokinetics of 5-fluorouracil and its metabolites in plasma, urine, and bile. *Cancer Res* **47**: 2203-2206, 1987
- 23) **van Laar JA, Rustum YM, Ackland SP et al:**

- Comparison of 5-fluoro-2'-deoxyuridine with 5-fluorouracil and their role in the treatment of colorectal cancer. *Eur J Cancer* **34**: 296-306, 1998
- 24) **Kono A, Hara Y, Sugata S et al**: Activation of 5'-deoxy-5-fluorouridine by thymidine phosphorylase in human tumors. *Chem Pharm Bull* **31**: 175-178, 1983
- 25) **Noguchi T, Fujiwara S, Takeno S et al**: Clinical impact of thymidine phosphorylase expression in gastric cancer. *Oncol Rep* **19**: 561-566, 2003
- 26) **Ogawa K, Konno S, Takebayashi Y et al**: Clinicopathological and prognostic significance of thymidine phosphorylase expression in gastric cancer. *Anticancer Res* **19**: 4363-4367, 1999
- 27) **Kikuyama S, Inada T, Shimizu K et al**: Thymidine phosphorylase expression in gastric cancer association with proliferative activity and angiogenesis. *Anticancer Res* **20**: 2081-2086, 2000
- 28) **Miwa M, Ura M, Nishida M et al**: Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectivity in tumors by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue. *Eur J Cancer* **34**: 1274-1281, 1998
- 29) **Takebayashi Y, Yamada K, Miyadera K et al**: The activity and expression of thymidine phosphorylase in human solid tumor. *Eur J Cancer* **32**: 1227-1232, 1996
- 30) **Furukawa T, Yoshimura A, Sumizawa T et al**: Angiogenic factor. *Nature* **356**: 668, 1992
- 31) **Takebayashi Y, Miyadera K, Akiyama S et al**: Expression of thymidine phosphorylase in human gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **87**: 288-295, 1996
- 32) **Uejima T, Osaki M, Kase S et al**: Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) and thymidine phosphorylase (dThdPase) in human intestinal type gastric carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **53**: 235-243, 2002
- 33) **Sakurai Y, Yoshida I, Tonomura S**: Clinicopathological Significance of orotate phosphoribosyltransferase in gastric Carcinoma. *Jpn J Cancer Chemother* **33**: 487-492, 2006
- 34) **Ishikawa T, Sekiguchi F, Fukase Y et al**: Positive correlation between the efficacy of capecitabine and doxifluridine and the ratio of thymidine phosphorylase to dihydropyrimidine dehydrogenase activities in tumors in human cancer xenografts. *Cancer Res* **58**: 685-690, 1998