

EGFR 変異と Uracil-Tegafur による肺腺癌術後補助療法に関する関連性についての検討

末久 弘^{a*}, 豊岡伸一^a, 堀田勝幸^b, 内田亜希子^b, 宗 淳一^a, 藤原義朗^b,
松尾恵太郎^c, 大内田 守^d, 高田 穰^e, 木浦勝行^b, 伊達洋至^f

岡山大学大学院医歯薬学総合研究科 ^a腫瘍・胸部外科学, ^b血液・腫瘍・呼吸器内科学, ^d分子遺伝学,
^c愛知がんセンター 疫学・予防部, 京都大学 ^e放射線生物研究センター, ^f呼吸器外科

キーワード: non-small cell lung cancer, adjuvant chemotherapy, uracil-tegafur, EGFR

Epidermal growth factor receptor mutation status and adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung

Hiroshi Suehisa^{a*}, Shinichi Toyooka^a, Katsuyuki Hotta^b, Akiko Uchida^b, Junichi Soh^a, Yoshiro Fujiwara^b,
Keitaro Matsuo^c, Mamoru Ouchida^d, Minoru Takata^e, Katsuyuki Kiura^b, Hiroshi Date^f

Departments of ^aCancer and Thoracic Surgery, ^bHematology, Oncology and Respiratory Medicine, ^dMolecular Genetics, Okayama University Graduate School of Medicine,
Dentistry and Pharmaceutical Sciences, ^cDivision of Epidemiology and Prevention, Aichi Cancer Center Research Institute, ^eRadiation Biology Center, ^fDepartment of Chest Surgery,
Kyoto University

緒 言

近年、肺癌術後補助化学療法が予後を改善することが報告されている。Uracil-tegafur は非小細胞肺癌の補助療法としての有効性が証明され、日本において手術群の症例に対して明らかに予後を延長することが示された。特に stage IB において有効で、さらに腫瘍径 2 cm 以上の症例でも有効である可能性が大規模ランダム化試験で示された¹⁾。

一方、分子腫瘍学の進歩により抗癌剤の治療効果予測因子の同定が試みられている。Olaussen らは前向き

試験において、DNA 修復に関与する除去修復交差相補群 1 の蛋白発現が陰性の症例が、陽性の症例よりも予後良好であることを示した²⁾。さらに上皮成長因子受容体 (epidermal growth factor receptor: EGFR) 遺伝子変異症例において、gefitinib などのチロシンキナーゼ阻害剤の有効性との関連が示された^{3,4)}。これらの事実は肺癌患者の個別化治療の可能性を示している。

EGFR 変異は肺腺癌、非喫煙者、アジア人種に多い⁵⁾。日本人の 40%、欧米人の 15% に認められる。EGFR 経路と 5-fluorouracil (5-FU) の感受性との関連性について、Ueda らは EGF 刺激によって dihydropyrimidine dehydrogenase 活性が低下、つまり 5-FU 感受性が高まることが子宮頸癌においてみられたと報告している⁶⁾。一方、Magne らは gefitinib が thymidylate synthase 活性を低下、つまり 5-FU 感受性を高めたと報告した⁷⁾。EGFR 変異は主に肺腺癌に

平成20年10月受理

*〒791-0280 愛媛県松山市南梅本町甲160
国立病院機構四国がんセンター 外科
電話: 089-999-1111 FAX: 089-999-1100
E-mail: hsue@mva.biglobe.ne.jp

プロフィール



末久 弘
昭和41年7月27日生
平成10年3月 宮崎医科大学医学部卒業
平成10年5月 岡山大学医学部附属病院第二外科入局
平成10年9月 屋島総合病院外科 医師
平成12年9月 住友別子病院外科 医師
平成14年9月 玉野市民病院外科 医師
平成15年9月 岡山大学医学部・歯学部附属病院 腫瘍・胸部外科 医員
平成17年6月 岡山大学医学部腫瘍・胸部外科学 研究生
平成19年4月 四国がんセンター外科 医師
現在に至る

認められるため、uracil-tegafur を投与された肺腺癌患者の予後と *EGFR* 変異との関連を調べることは大変興味深い。

本研究では、完全切除された肺腺癌患者に補助療法として uracil-tegafur を投与した場合における、*EGFR* 変異の予後判定因子としての可能性を検討した。また、in vitro 系の *EGFR* 遺伝子導入細胞株における 5-FU の効果も検討した⁸⁾。

材料と方法

1. 患者と治療

対象は岡山大学にて1994年1月から2003年12月までに完全切除された、p-stage I～III A の551例。そのうち術前治療あるいは uracil-tegafur 以外の術後補助療法がなされた症例は除外した。さらに p-stage I A のうち腫瘍径 2 cm 未満は除外した。結果として187例が該当した。内訳は、68例 (36%) が uracil-tegafur 投与群、119例が手術のみの経過観察群であった。Uracil-tegafur は少なくとも1年間投与した。67%が完全に1年間、79%が6ヶ月以上投与された。手術は標準的な肺葉切除と縦隔リンパ節郭清を行った。

2. DNA 抽出と *EGFR* 変異検索

DNA は凍結標本かパラフィン包埋切片から抽出し、*EGFR* エクソン19欠失変異とエクソン21点突然変異 (L858R) を、PCR 法とダイレクトシーケンス法で検出した。

3. 細胞株における 5-FU の効果

肺腺癌細胞株は7種 (wild-type : A549, H1299, H1437, mutation type : PC-3, PC-9, H3255, H1975) を用いた。*EGFR* 遺伝子導入ベクターは、ヒト *EGFR* 遺伝子をプラスミド cDNA 3.1-neo vector に挿入し作成した。エクソン19欠失変異 (L746-S750del) と L858R 変異は「QuikChange Kit」を使用して誘導した。ABC1 細胞株は *EGFR*・*KRAS* 遺伝子変異はなく、*EGFR*-wild-type, *EGFR*-L746-S750 deletion mutant, *EGFR*-L858R mutant, vector control の4種のベクターを Lipofectamine 2000 を用いて導入した。蛋白発現はウエスタンブロット法にて評価した。

細胞増殖能は MTS アッセイにより行った。細胞株を96穴プレートに 5×10^3 個ずつ播き、5-FU を加えて72時間培養した。そして 5-FU 濃度ごとの吸光度を測定し IC_{50} を求めた。

4. 統計学的解析

各項目間の相違について χ^2 検定を行った。全生存期間は手術日から生死判明日までとした。無再発生存期間は手術日から再発、死亡、二次癌発生までの期間とした。解析は log-rank test を併用した Kaplan-Meier 法と Cox ハザードモデルを用いた。P 値 0.05 未満を有意差ありとした。

結 果

1. 患者背景と *EGFR* 変異

平均年齢66歳、男性98例、女性89例。喫煙者103例、非喫煙者84例。p-stage I が149例、p-stage II が23例、p-stage III A が15例であった。

EGFR 変異は187例中79例、42.2%に認めた。そのうち49例がエクソン19欠失変異、30例がエクソン21点突然変異であった。女性、非喫煙者に有意に変異が多かった (表1, $P < .001$)。

2. 生存率、*EGFR* 変異と術後補助療法

187例中68例が術後補助療法をうけ、119例が経過観察された。中間観察期間は術後補助療法群が65.7ヶ月、経過観察群が56.2ヶ月であった。

単変量解析では、術後補助療法群が経過観察群よりも ($P=0.073$, 図1A), *EGFR* 変異群が野生群よりも予後がよい傾向であった ($P=0.092$, 図1B)。エクソン19と21の変異別での相違は見られなかった。多変量解析では、術後補助療法が独立して有意に予後を延長していた (表2)。

EGFR 変異別に検討した。*EGFR* 野生群では、単変量解析で術後補助療法が有意に予後を延長していた ($P=0.039$, 図2A)。多変量解析でも同様であった (表2)。しかし *EGFR* 変異群では術後補助療法による予後延長の効果は認められなかった (図2B, 表2)。

3. 肺腺癌細胞株に対する 5-FU の効果

5-FU は、*EGFR* 遺伝子導入した全ての ABC1 細胞株の増殖を、濃度依存的に阻害した。 IC_{50} は表3に示すとおりであった。この結果から、*EGFR* 変異型細胞株は 5-FU 低感受性を有することが示唆された。その他の肺腺癌細胞株でも、*EGFR* 変異型細胞がより 5-FU 低感受性であった。

考 察

この研究において、uracil-tegafur による術後補助療法は *EGFR* 野生型患者において有意に予後を延長す

表1 患者背景 (文献8より引用)

Characteristics	Patients with <i>EGFR</i> mutation number (%)	Patients without <i>EGFR</i> mutation number (%)	<i>P</i> value
Age			.62
≤66 (n=97)	38 (48)	48 (44)	
>66 (n=90)	41 (52)	60 (56)	
Sex			<.001
Male (n=98)	30 (38)	68 (63)	
Female (n=89)	49 (62)	40 (37)	
Pathological stage			.29
I (n=149)	67 (85)	82 (76)	
II (n=23)	8 (10)	15 (14)	
III A (n=15)	4 (5)	11 (10)	
Smoking history			<.001
Ever-smoker (n=103)	31 (39)	72 (67)	
Never-smoker (n=84)	48 (61)	36 (33)	
Adjuvant therapy			.25
Uracil-tegafur (n=68)	25 (32)	43 (40)	
None (n=119)	54 (68)	65 (60)	

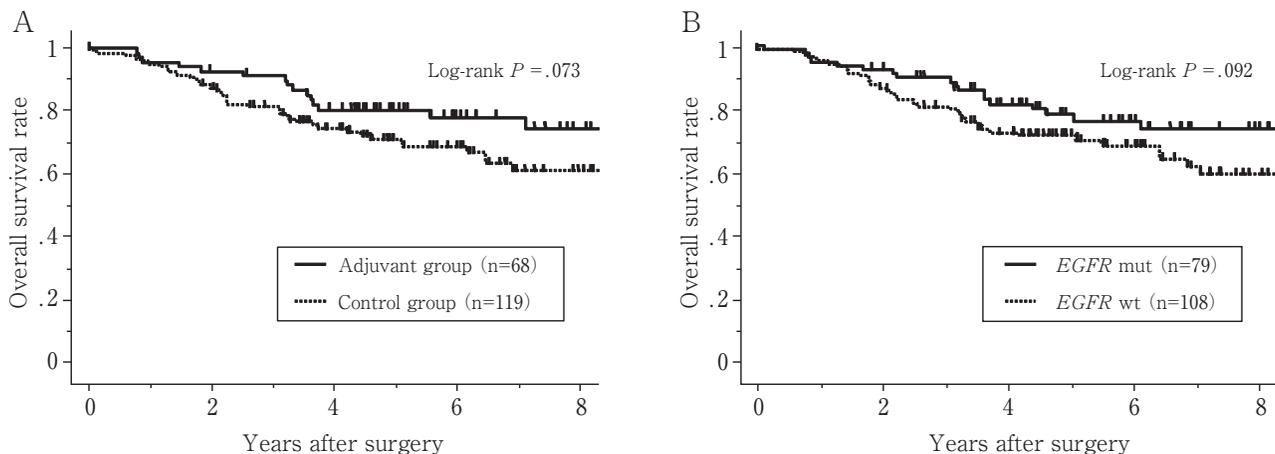


図1 全患者の生存期間の Kaplan-Meier 曲線 (文献8より引用)
 A) 術後補助療法群と経過観察群, B) *EGFR* 変異群と野生群

ることを示した。さらに細胞レベルにおいても, *EGFR* 野生細胞株が 5-FU 高感受性であることを示した。この現象を支持する報告として以下の報告がある。*EGFR* 変異によりシグナル伝達経路の下流にある Akt, STAT が活性化され, 抗アポトーシスに傾くとされる⁹⁾。非小細胞肺癌で *EGFR* 変異を有すると, シスプラチンやドキソルビシンなどの化学療法により相対的に抗アポトーシスになる⁹⁾。一方, uracil-tegafur

はアポトーシスを誘導し抗腫瘍効果を発揮する¹⁰⁾。Tanaka らは, 非小細胞肺癌に対する術後補助療法は, アポトーシス係数の高い腫瘍を有する患者の予後を延長すると報告している¹¹⁾。腫瘍のアポトーシスと uracil-tegafur の同じような関係が消化器癌の研究で報告されている¹⁰⁾。以上より, *EGFR* 変異型腫瘍は抗アポトーシスの状態であるため, 5-FU 低感受性つまり uracil-tegafur 抵抗性であると考えられる。

表2 術後生存期間に対する Cox 比例ハザードモデル (文献8より引用)

A. Total patients.

Variables	HR (95% CI)	P value
Adjuvant uracil-tegafur (yes vs. no)	0.38 (0.19-0.75)	.005
<i>EGFR</i> mutation (yes vs. no)	0.81 (0.44-1.47)	.48
Pathological stage (II vs. I)	1.62 (0.73-3.62)	.24
(III A vs. I)	7.03 (3.23-15.3)	<.001
Age (≤66 vs. >66)	0.71 (0.40-1.26)	.24
Sex (female vs. male)	0.35 (0.13-0.95)	.039
Smoking history (yes vs. no)	0.77 (0.30-2.00)	.60

B. Patients with *EGFR* wild-type tumors.

Variables	HR (95% CI)	P value
Adjuvant uracil-tegafur (yes vs. no)	0.34 (0.14-0.80)	.013
Pathological stage (II vs. I)	1.38 (0.51-3.73)	.52
(III A vs. I)	6.45 (2.49-16.7)	<.001
Age (≤66 vs. >66)	0.57 (0.27-1.19)	.13
Sex (female vs. male)	0.28 (0.066-1.16)	.079
Smoking history (yes vs. no)	0.56 (0.14-2.23)	.41

C. Patients with *EGFR* mutant tumors.

Variables	HR (95% CI)	P value
Adjuvant uracil-tegafur (yes vs. no)	0.52 (0.16-1.69)	.28
Pathological stage (II vs. I)	2.32 (0.51-10.6)	.28
(III A vs. I)	10.6 (2.65-42.1)	<.001
Age (≤66 vs. >66)	0.90 (0.33-2.46)	.84
Sex (female vs. male)	0.45 (0.10-2.05)	.30
Smoking history (yes vs. no)	1.06 (0.27-4.27)	.93

略語：HR, ハザード比；CI, 信頼区間

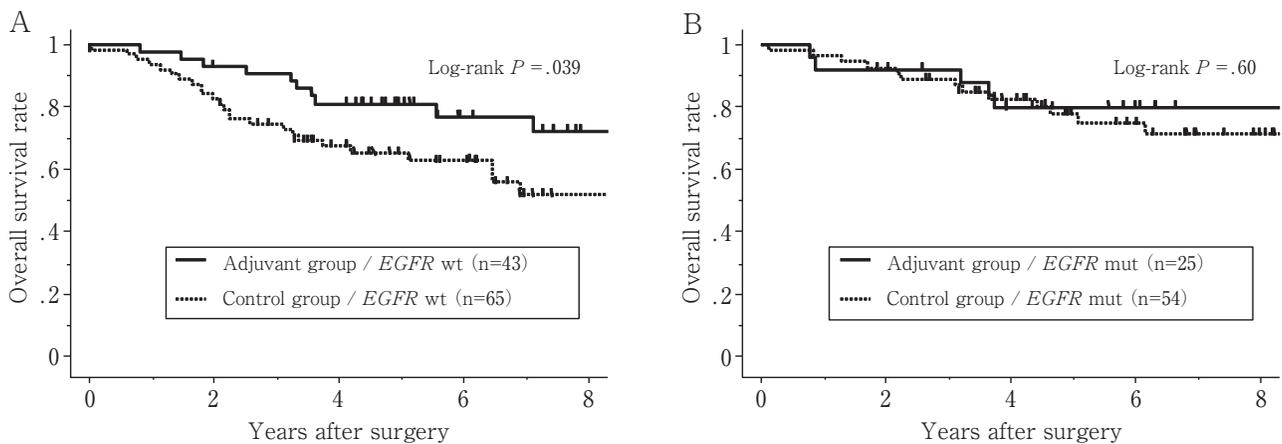


図2 *EGFR* 変異の有無別にみた生存期間の Kaplan-Meier 曲線 (文献8より引用)

A) *EGFR* 野生群 (108名), B) *EGFR* 変異群 (79名)

表3 5-FU に対する感受性試験 (文献8より引用)

Cells	EGFR status	IC ₅₀ (μM)
Transfectant (ABC1)		
Vector control	Wild-type	9.3±1.8
EGFR wild-type	Wild-type	5.2±0.6
EGFR exon19 del	Exon19 del	17.8±4.6
EGFR L858R	L858R	21.8±8.6
Non-transfectant		
A549	Wild-type	13.6±2.2
H1299	Wild-type	11.3±2.4
H1437	Wild-type	24.5±3.3
PC-3	Exon19 del	44.2±4.0
PC-9	Exon19 del	24.5±4.0
H3255*	L858R	>1500
H1975	L858R+T790M	35.0±5.6

*H3255の IC₅₀は計測範囲外

非小細胞肺癌の術後補助化学療法としては、uracil-tegafur 以外にシスプラチンを基本とした化学療法の有用性が報告されているが、今後はよりベネフィットが得られる症例を選別すること、すなわち患者の個別化治療が必要であると考えられる。そのためには、薬剤ごとの効果予測因子の探索、同定が必要である。今回の我々の研究は、特に EGFR 野生型患者において uracil-tegafur が術後補助療法の一つの選択肢に成りうる可能性を示している。

結 論

Uracil-tegafur による肺腺癌術後補助療法は、EGFR 野生型腫瘍の患者の予後を延長した。EGFR 遺伝子の状態は、5-FU 関連薬剤を用いた補助療法の効果予測因子になる可能性がある。

謝 辞

本研究の遂行にあたり、磯本幸成先生 (岡山大学医学部共同実験室) にご協力頂きました。心より深謝いたします。

文 献

- 1) Kato H, Ichinose Y, Ohta M, Hata E, Tsubota N, Tada H, Wadanabe Y, Wada H, Tsuboi M, Hamajima N, Ohta M : A randomized trial of adjuvant chemotherapy with uracil-tegafur for adenocarcinoma of the lung. N Engl J Med (2004) 350, 1713-1721.
- 2) Olaussen KA, Dunant A, Fouret P, Brambilla E, André F, Haddad V, Taranchon E, Filipits M, Pirker R, Popper H,

Stahel R, Sabatier L, et al. : DNA repair by ERCC1 in non-small-cell lung cancer and cisplatin-based adjuvant chemotherapy. N Engl J Med (2006) 355, 983-991.

- 3) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, et al. : Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med (2004) 350, 2129-2139.
- 4) Mitsudomi T, Kosaka T, Endoh H, Horio Y, Hida T, Mori S, Hataoka S, Shinoda M, Takahashi T, Yatabe Y : Mutations of the epidermal growth factor receptor gene predict prolonged survival after gefitinib treatment in patients with non-small-cell lung cancer with postoperative recurrence. J Clin Oncol (2005) 23, 2513-2520.
- 5) Shigematsu H, Lin L, Takahashi T, Nomura M, Suzuki M, Wistuba II, Fong KM, Lee H, Toyooka S, Shimizu N, Fujisawa T, Feng Z, et al. : Clinical and biological features associated with epidermal growth factor receptor gene mutations in lung cancers. J Natl Cancer Inst (2005) 97, 339-346.
- 6) Ueda M, Kitaura K, Kusada O, Mochizuki Y, Yamada N, Terai Y, Kumagai K, Ueki K, Ueki M : Regulation of dihydropyrimidine dehydrogenase and pyrimidine nucleoside phosphorylase activities by growth factors and subsequent effects on 5-fluorouracil sensitivity in tumor cells. Jpn J Cancer Res (2000) 91, 1185-1191.
- 7) Magné N, Fischel JL, Dubreuil A, Formento P, Ciccolini J, Formento JL, Tiffon C, Renée N, Marchetti S, Etienne MC, Milano G : ZD1839 (Iressa) modifies the activity of key enzymes linked to fluoropyrimidine activity : rational basis for a new combination therapy with capecitabine. Clin Cancer Res (2003) 9, 4735-4742.
- 8) Suehisa H, Toyooka S, Hotta K, Uchida A, Soh J, Fujiwara Y, Matsuo K, Ouchida M, Takata M, Kiura K, Date H : EGFR Mutation Status and Adjuvant Chemotherapy with Uracil-Tegafur for Adenocarcinoma of the Lung. J Clin Oncol (2007) 25, 3952-3957.
- 9) Sordella R, Bell DW, Haber DA, Settleman J : Gefitinib-sensitizing EGFR mutations in lung cancer activate anti-apoptotic pathways. Science (2004) 305, 1163-1167.
- 10) Oki E, Sakaguchi Y, Toh Y, Oda S, Maehara Y, Yamamoto N, Sugimachi K : Induction of apoptosis in human tumour xenografts after oral administration of uracil and tegafur to nude mice bearing tumours. Br J Cancer (1998) 78, 625-630.
- 11) Tanaka F, Otake Y, Yanagihara K, Yamada T, Miyahara R, Kawano Y, Li M, Inui K, Wada H : Apoptosis and p53 status predict the efficacy of postoperative administration of UFT in non-small cell lung cancer. Br J Cancer (2001) 84, 263-269.