

## 内 容 要 旨 目 次

### 主 論 文

***BRAF*V600E mutation is a predictive indicator of upfront chemotherapy for stage IV colorectal cancer**

(*BRAF* V600E 変異は StageIV結腸直腸癌に対する術前化学療法の適応予測因子である)

森川達也、稲田 涼、永坂岳司、母里淑子、岸本浩行、河合 毅、榎田祐三、三嶋秀行、  
Ajay Goel、藤原俊義

Oncology Letters (掲載予定)

## 主 論 文

### *BRAF*V600E mutation is a predictive indicator of upfront chemotherapy for stage IV colorectal cancer

(*BRAF* V600E 変異は StageIV 結腸直腸癌に対する術前化学療法に適応予測因子である)

#### 【緒言】

結腸直腸癌は癌関連死因の第一位、且つ最も頻度の多い癌種であり、全世界で年間 100 万人以上が新たに診断されている(1, 2)。同時性に遠隔転移を有し、TNM 分類第 7 版で StageIV とされる患者の内、25%は予後不良であり、5 年生存率は 12%までである(3, 4)。StageIV 結腸直腸癌と診断された患者の内、肝転移が最も多く、20~30%の患者に診られる。一方で腹膜播種や肺転移を各々 10~15%、10~25%の患者に認め、また直腸あるいは結腸への転移はほとんど認めない(5)。同時性に遠隔転移を有する患者の内、80%程度の患者は根治的切除が不能であり、原発巣切除を施行された患者の 10~30%は穿孔や出血などの合併症を併発している(6)。

以前に、初回の腫瘍切除が StageIV 結腸直腸癌患者の全生存率を改善する重要なステップであることが、いくつかの前向き研究で明らかにされた(7, 8)。しかし、原発巣切除の最適な時期については議論の余地がある。Poultsides 等は(9)、全身化学療法先行は StageIV 結腸直腸癌患者に安全に投与が可能で、多くの症例で姑息的な原発巣切除を回避し得る可能性について述べている。更に、無作為 phaseIII 試験[EORTC40983]では、最初に切除可能肝転移巣を有する StageIV の患者や腫瘍再発の患者において、周術期(術前-そして術後-)に FOLFOX4 を施行した群は、手術単独群と比較して、全生存率に差異は無いものの、無再発生存率を有意に改善することが示された(10, 11)。前述の研究では FOLFOX4 を用いた周術期化学療法が最初に切除可能肝転移巣を有する患者群において病状増悪のリスクを減少させることが示された。しかしこれらの患者の分子生物学的特性については調べられておらず、StageIV 結腸直腸癌患者における早期腫瘍切除の必要性和周術期化学療法の必要性に関しては、議論の余地が残っている。

結腸直腸癌は、様々ながん遺伝子あるいはがん抑制遺伝子における genetic あるいは epigenetic な変異を含む特有の変異に関連した一連の段階を経て進行する(12-1)。*KRAS* 癌遺伝子の点突然変異は、典型例ではコドン 12 と 13 に認め、頻度のより少ないものとしてはコドン 59, 61, 117 そして 144 に認める。更に、癌賦活化を担う点突然変異は *BRAF* 癌遺伝子のコドン 600 に認められた(15)。*KRAS* 及び *BRAF* 腫瘍性タンパク質におけるこれらの変異は、例えば細胞増殖やアポトーシス、接着、浸潤そして血管新生などの細胞反応を伝えるシグナルカスケードを賦活化する(16, 17)。以前から、マイナー変異を含む *KRAS* 遺伝子の変異は、抗 EGFR 抗体に対する耐性と関わるということが知られている(15, 18, 19)。*BRAF* 遺伝子が *KRAS* の下流に位置するにも関わらず、賦活化された *BRAF* V600E の変異が抗 EGFR 抗体に対する耐性の予測バイオマーカーと考えられてはいない。しかし、この遺伝子における変異は、根治術後の

Stage II 及び III 結腸直腸癌患者の不良予後の強い予測因子であることが言われてきた (15, 20-24)。

本研究では *BRAF* 及び *KRAS* 遺伝子の変異がまた、Stage IV 結腸直腸癌患者の最適な治療ストラテジーをも示しているのではないかと仮定している。従って、これらの遺伝子における変異の有無を、診断時に切除可能あるいは不可能な転移巣を有した Stage IV 結腸直腸癌患者の治療継続群において測定し、患者の予後と生存に関連する臨床病理学的特性との関連性を用いて臨床的意義を判定した。

## 【材料と方法】

### 研究対象

治療継続中である全 113 症例の Stage IV 結腸直腸癌患者が、2000 年～2013 年にかけて岡山大学病院で結腸切除術あるいは直腸切除術を施行された。すべての症例は病理学的に腺癌と診断され、Lynch 症候群や家族性腺腫性ポリポーシスなどの家族性結腸直腸癌患者は除外した。

本研究は岡山大学病院の治験審査委員会により承認を得た。全患者から、研究目的に組織及び臨床データを使用する旨のインフォームドコンセントを得ている。腫瘍の組織学的診断は WHO 国際腫瘍分類に準じており、腫瘍は分化型(高分化型腺癌や中分化型腺癌)あるいは未分化型(未分化型腺癌や粘液癌)に細分類された(25)。病理学的 Stage は TMN 分類第 7 版に準じた(4)。

### *KRAS* 及び *BRAF* 変異解析

各症例のホルマリン固定組織並びにパラフィン包埋組織、あるいは新鮮凍結組織から抽出された DNA を用いて、ダイレクトシーケンス法によりコドン 12 及び 13 を含む *KRAS* exon2 と、コドン 600 を含む *BRAF* exon15 の変異を同定した。*KRAS* 及び *BRAF* に対するプライマーシーケンスと、PCR の設定条件については以前に報告した通りである(26)。PCR 生成物は QIA quick PCR purification kit を用いて精製し、ABI PRISM 310-Avant 及び 310R Genetic Analyzer を使用し直接シーケンスした。

### Analysis of microsatellite status

モノヌクレオチドのマイクロサテライトマーカーである BAT26、NR27、そして NR21 を使用した Multiplex PCR を用いて結腸直腸癌組織の MSI を判定した。モノヌクレオチドマーカーが 1 以上を示す遺伝子不安定性のある腫瘍を MSI と分類し、これらのマーカーに変異を認めないタイプの癌をマイクロサテライト安定性 (MSS) とした。結腸直腸癌において high MSI あるいはミスマッチ欠損を検出するために National Cancer Institute が推奨する 5 つのマーカーと比較して、モノヌクレオチドマーカーである BAT26、NR27 や NR21 は同等あるいはより優れているというデータ解析結果を我々は以前に立証している(27)。

## Statistical analysis

統計解析には SPSS ver. 20.0 を使用した。カテゴリー変数はフィッシャー検定を用いて比較し、連続変数は Kruskal-Wallis 検定を用いて比較した。生存曲線は Kaplan-Meier 法を使用して計算し、サブグループにおける生存時間の差異は log-rank テストを用いて比較した。単変量及び多変量解析はコックス比例ハザードモデルを用いた。単変量解析で抽出された有意な因子を多変量解析にかけ、独立予後因子を同定した。P 値<0.05 を統計学的に有意差有とした。

## 【結果】

### Patient characteristics

StageIV 結腸直腸癌患者 113 症例の内、57.5%が男性であり、42.5%が女性であり (Table I)、年齢中央値は 64 歳 (35-88 歳) であった。血清 CEA 値の中央値は 34.0ng/ml (1.0-9092.0ng/ml) であった。腫瘍局在は盲腸から横行結腸脾彎曲部までとする近位側結腸と、下降結腸脾彎曲部から直腸までとする遠位側結腸に分類した。24.8% (28 例) を近位側結腸に、75.2% (85 例) を遠位側結腸に認めた。腫瘍の大部分、85.8% (97/113 例) は組織学的に分化型腺癌と診断され、14.2% (16/113 例) は未分化型腺癌とされた。肝臓あるいは肺など、単一臓器への遠隔転移を有した症例は 64.6% (73/113 例) であり、35.4% (40/113 例) は多臓器転移を有していた (Table I)。68.1% (77/113 例) の患者が、フッ化ピリミジンにオキサリウラチンあるいはイリノテカンを加えたレジメンによる化学療法を施行された。化学療法を施行されたこれら 77 例の内、23 例は原発巣切除前から継続して施行され (術前化学療法)、54 例は原発巣切除後に施行 (術後化学療法) された。StageIV 結腸直腸癌全症例の内 63.7% (72 例) が、原発巣と転移巣に対して癌遺残が無いとされる根治的切除術を施行され、残り 36.3% (41 例) が原発巣のみで癌遺残を伴う局所切除を施行された。

### Frequencies of MSI and mutations in BRAF and KRAS genes in stage IV CRC

本研究の StageIV 結腸直腸癌患者の集団において、MSI を示す腫瘍は無く、113 例全てが MSS であった。KRAS 及び BRAF 変異解析は 113 例全ての検体から成功し、2 つの遺伝子における変異は相互に排他的な形式で起こっており、2 つの遺伝子ともに変異を示す腫瘍は認めなかった。BRAF 変異は腫瘍の 6.2% (7 例) に認め、V600E 変異をコードしていた。KRAS 遺伝子のコドン 12, 13 における変異は 27.4% (31 例) の腫瘍に認めた。KRAS exon2 変異を有する 31 例において、全例が単一変異であり、変異で最も多く見られたのは GGT⇒GAT (G12D) で 13.3% (15/113 例) であり、それに続き順に GGT⇒GTT (G12V) の 6.2% (7/113 例)、GGC⇒GAC (G13D) の 4.4% (5/113 例)、GGT⇒AGT (G12S) の 2.7% (3/113 例)、GGT⇒TGT (G12C) の 0.9% (1/113 例) であった。これら 2 つの遺伝子における変異の有無に基づき、StageIV 結腸直腸癌患者全 113 例を BRAF-mutant、KRAS-mutant そして野生型に分類した (Table I)。

### Associations between genetic profiles and clinicopathological characteristics

*BRAF* 変異腫瘍は近位側結腸において有意に多く認め、近位側結腸が 6 例に対して遠位側結腸では 1 例であり、加えて *BRAF* 変異は組織学的に未分化型腫瘍に随伴して認めた ( $p=0.016$ )。多臓器遠隔転移は、*KRAS* 変異型 (29.0% ; 9/31 例) や野生型 (34.7% ; 26/75 例) と比較し、*BRAF* 変異を伴う結腸直腸癌により多く認めた (71.4% ; 5/7 例 ;  $p=0.095$ )。

*KRAS* 変異腫瘍を伴う患者の 74.2% (23/31 例) 及び *BRAF* 変異腫瘍を伴う患者の 57.1% (4/7 例) がフッ化ピリミジン系を使用した化学療法を初回に施行された。術前化学療法は *BRAF* 変異腫瘍群の 28.6% (2/7 例) に、*KRAS* 変異腫瘍群の 29.0% (9/31 例) そして野生型群の 16.0% (12/75 例) に施行された。術後化学療法は *BRAF* V600E 変異群の 28.6% (2/7 例) に、*KRAS* 変異群の 45.2% (14/31 例) そして野生型群の 50.7% (38/75 例) に施行された。対照的に、*BRAF* 変異腫瘍群の 42.8% (3/7 例) に、*KRAS* 変異腫瘍群の 25.8% (8/31 例)、そして野生型群の 33.3% (25/75 例) には原発巣切除前からの化学療法投与は行われなかった。分子標的薬である bevacizumab は、*KRAS* 変異腫瘍群の 54.8% (17/31 例) に投与され、*BRAF* 変異腫瘍群の 28.6% (2/7 例) には bevacizumab あるいは cetuximab が投与された。StageIV 結腸直腸癌患者の内、63.7% (72 例) が転移巣切除を伴う癌遺残の無い根治的手術を施行され、一方で 36.3% (41 例) が癌遺残を認める原発巣切除のみの姑息的手術を施行された。*BRAF* 変異腫瘍群では根治的切除を施行された患者はおらず、対して *KRAS* 変異腫瘍群では 48.4% (15/31 例) そして野生型群では 34.7% (26/75 例) が根治的手術を施行された ( $p=0.047$ )。

### Survival analysis in stageIV CRC patients with BRAF mutations

*KRAS* 及び *BRAF* 遺伝子変異を伴う StageIV 結腸直腸癌患者の生存率を Fig. 1 に示した。観察期間中央値は 17.3 か月であり、*BRAF* 変異患者の予後は *KRAS* 変異患者や野生型の患者と比較して有意に悪く、生存期間中央値は各々 2.5 か月、41.2 か月そして 40.3 か月であった ( $p<0.001$ )。単変量解析では幾つかの予後不良関連因子が明らかとなり、それには未分化型であることや、多発転移、癌遺残、化学療法未施行、分子標的薬使用そして *BRAF* 遺伝子変異の存在などが含まれた (Table II)。同様に、多変量解析では、未分化型、癌遺残そして *BRAF* 遺伝子変異の存在が、統計学的有意差を持って StageIV 結腸直腸癌における独立した予後不良の予測因子であることが明らかとなった (HR ; 8.42,  $p<0.0001$  ; Table III)。

続き、術前化学療法施行について補足すると、StageIV 結腸直腸癌患者において術前化学療法の有無は臨床経過に差異をもたらさなかった (Fig. 2)。しかし、原発巣に *BRAF* V600E 変異を伴う 7 例においては、内 2 例が術前化学療法を施行され、施行されなかった残り 5 例と比較して生存期間の改善を認め (Fig. 3)、StageIV 結腸直腸癌患者における *BRAF* 変異による予後評価を強調するものであった。

## 【考察】

本研究では原発腫瘍組織における *BRAF* V600E 変異の有無を明らかにし、StageIV結腸直腸癌患者のための個別化治療ストラテジーの可能性に関する仮説を裏付けるためのデータを作成した。

StageIV結腸直腸癌に関する幾つかのスタディでは、初期の腫瘍切除が生存期間を改善するとされてきた(5, 7, 8, 28)。しかし、いくつかの症例では、原発巣の外科的切除により遠隔転移巣の急速な増大を予想外に来すことがあり(29, 30)、限られた症例においては原発腫瘍が転移巣の成長を阻害していることを示唆している(31-33)。本研究のデータにおいて、原発巣切除後に急速な遠隔転移巣の増大を伴う StageIV結腸直腸癌患者群が、*BRAF* V600E 変異を有する患者を含んでいる可能性を示唆している。

術前化学療法の重要性が、以前の無作為 phase III 試験[EORTC 40983]で述べられており(10, 11)、FOLFOX4 を用いた組み合わせの化学療法を周術期に施行されると手術単独群と比較して全生存期間の延長には寄与しないにも関わらず、無増悪生存期間(PFS)の改善をもたらすとされた(10, 11)。従って、周術期の化学療法は、初回に切除可能な肝転移巣を有する Stage IV 結腸直腸癌患者の中で症例によっては PFS におけるイベントリスクを減少させる可能性がある。このことに一致して、本研究のデータは、V600E *BRAF* 変異を伴う進行結腸直腸癌が、周術期の化学療法の恩恵を最も受ける傾向があることを示した。

この StageIV患者群において、典型的な DNA 修復遺伝子欠損である MSI を示す腫瘍は認めなかった(34)。臨床的には、MSI を示す結腸直腸癌には Lynch 症候群や散発性 MSI 癌が含まれる(34, 35)。Lynch 症候群は遺伝性であり、DNA ミスマッチ修復遺伝子である MLH1、PMS2、MSH2 あるいは MSH6 における生殖細胞変異を反映している。対症的に散発性 MSI は通常 MLH1 のプロモーター領域のメチル化を反映しており、これにより修復遺伝子の転写サイレンシングを引き起こしている(14, 26)。本研究では、Lynch 症候群の患者は除外されており、この StageIV患者群は散発性結腸直腸癌を示している。散発性 MSI 結腸直腸癌の臨床病理学的特徴は、高齢の女性で、近位側結腸に多く、組織学的に未分化で、臨床病期が浅く、進行が緩徐で予後がより良好なことが挙げられる(36-38)。故に、本研究の腫瘍が MSI を示すことはないであろう。なぜならそういった腫瘍は通常進行癌や転移癌とはなり難いからである。

*BRAF* 癌遺伝子における変異は 2002 年に初めて発見され、当初は MSI 結腸直腸癌特に散発性結腸直腸癌に関連しているとされた(14, 39, 40)。その後、*BRAF* 変異結腸直腸癌は散発性 MSI あるいは MSS 腫瘍であるとされ、*BRAF* V600E 変異は散発性 MSI 腫瘍の 50%以上そして幾らかの MSS 腫瘍において認めるとされた(26)。幾つかの臨床試験の遡及研究では、*BRAF* V600E 変異の存在は Stage II/III 結腸直腸癌患者、特に MSI-Low (MSI-L) やマイクロサテライト安定性 (MSS) あるいは MSI でない患者 (non-MSI) において、全生存に対する強い予後不良因子である(24)。幾つかの研究では、*BRAF* 変異を有する MSI 結腸直腸癌患者は、*BRAF* 変異を有する MSS 腫瘍の患者と比較して有意に予後が良好とされている(41, 42)。同様に、分子標的薬を使用した組み合わせ化学療法を施行された転移性結腸直腸癌患者において、*BRAF* 変異は不良な予後と有意に相関していた(15, 20-22)。

前向き FFC9601 試験では、同時性転移を有し、化学療法を施行された StageIV 結腸直腸癌患者の生存に関して、原発巣切除の有益性について調べ、結果として遠位側に腫瘍を有する患者の生存がより良好であったとされた(8)。これらの知見についての機序は不詳であるにもかかわらず、その著者らは原発腫瘍の局在と切除が、結腸直腸癌患者の治療マネージメントにおいて臨床的に重要であることを強調している。本研究では、*BRAF* 変異を有する結腸直腸癌は、近位側という原発巣の局在や不良な予後に有意に相関し、その生存期間中央値は 2.5 か月であった。従って、*BRAF* V600E 変異を伴わない場合、遠位側にある StageIV 結腸直腸癌患者における予後の改善を説明し得る可能性がある。その上、これらのデータは *BRAF* 変異を伴う StageIV の患者は多臓器への遠隔転移を有する傾向にあり、根治的切除が困難となることを示唆している。従って、*BRAF* 変異結腸直腸癌が有意に予後不良であるとされるように、*BRAF* 変異を伴う患者は根治的切除を誰も施行出来ていないのである。

結腸直腸癌の StageIV 患者 113 例の 6.2%にあたるたった 7 例の *BRAF* 変異患者であるが、彼らは術前の系統的な化学療法に良好な反応を示し、それによる予後の改善を認めた。対症的に、化学療法の代わりに原発巣切除を先行した *BRAF* 変異患者は、その生存期間中央値が僅か 0.9 ケ月であった。これらのデータは、集約的な術前化学療法が *BRAF* 変異を伴う結腸直腸癌患者の予後を改善することを示唆している。

#### 【結論】

本研究は限られた 113 例ではあるが、結腸直腸癌患者の原発巣における *BRAF* 変異は有意な予後不良因子であると言える。この研究は、集約的な術前化学療法が *BRAF* 変異を有する進行結腸直腸癌患者の生存率を高めることを示唆するものである。