

A study of *KRAS* mutations in the primary tumors and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer

(FOLFOX療法の前後の原発病変と再発病変における
大腸癌*KRAS*遺伝子変異一致率の検討)

学位論文内容の要旨

【背景と目的】切除不能進行・再発大腸癌に対する化学療法は、薬剤の開発や投与法の考案などにより様々な変遷と発展を続け、抗 vascular endothelial growth factor (VEGF) 抗体薬や、抗 epidermal growth factor receptor (EGFR) 抗体薬といった分子標的治療薬の導入により生存期間中央値 24 ヶ月を超える成績が報告されるようになった。特定のタンパク質の機能の阻害を目的とした分子標的薬は、がん細胞など目的の組織、細胞にその標的となる分子が発現していなければ効果を発揮しない。また標的分子およびその下流の細胞内シグナル伝達経路のタンパク質に変異などが生じることで、効果が増強ないし減弱することも知られている。*KRAS* 遺伝子は第 12 染色体短腕上に位置し、RASp21 と呼ばれる GTPase 活性をもつ GTP・GDP 結合タンパク質をコードしている。RASp21 は細胞膜の内側に存在し EGFR からのシグナルを下流の RAF-MAPK 経路に伝達する役割をもっている。*KRAS* 遺伝子変異は exon 2 のコドン 12, 13 にその 90%以上が集中している。*KRAS* 遺伝子の DNA に点突然変異が起これば、RASp21 に結合した GTP を GDP に加水分解する GTPase 活性が低下し、恒常的に下流分子の活性化を誘導する GTP 結合型の状態にとどまる。そのため抗 EGFR 抗体薬により EGFR の阻害を行っても RAS より下流へのシグナル伝達がブロックされず治療効果が得られないとされている。現在、*KRAS* 遺伝子変異は切除不能進行・再発大腸癌における抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子と考えられており、すでに多数の臨床試験において *KRAS* 変異型の大腸癌患者群では、抗 EGFR 抗体薬による治療効果が不良であることが報告されている。さらに、EGFR からのシグナル伝達経路の下流に位置する *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* などにも活性型変異がみられることがある。これらの遺伝子変異も抗 EGFR 抗体薬の効果を修飾する可能性があることが報告されているが、多数の変異陽性症例の治療効果を検討した十分な報告はまだなされていない。Oxaliplatin は第三世代プラチナ製剤であり、大腸癌患者において 5-fluorouracil (5-FU) との併用で FOLFOX 療法として頻用されている。Oxaliplatin は DNA 二本鎖内及び二本鎖間に架橋するが、特に連続したグアニン塩基間に付加体 (Pt-GG adduct) を形成して DNA 損傷を引き起こす薬剤である。また、培養細胞実験系による研究では oxaliplatin に長期曝露することによって遺伝子変異が促進する可能性についても報告されている。大腸癌の原発部位と転移部位においての *KRAS* 遺伝子変異の比較では、その状態は高率に一致すると報告されているが、DNA 損傷を誘導する oxaliplatin のような化学療法薬が長期間投与された後の異時性の再発癌で *KRAS* 遺伝子の獲得変異の有無や、変異の変化の有無は、詳

細な検討の報告はなく現時点では不明である。以上のような背景の中で、*KRAS* 遺伝子のような治療効果を予測するバイオマーカーとなり得る遺伝子の変異が FOLFOX 療法によって修飾されるとすれば、抗 EGFR 抗体薬による治療前にバイオマーカーを検索する DNA ソースとして、原発病変と異時性再発病変のどちらを用いるべきかについては再考する必要がある。このことを明らかにするために、本研究では大腸癌 Stage III, IV 根治切除後の術後補助 FOLFOX 療法施行後に再発した症例のうち、組織検索が可能であった症例について、化学療法施行前後のそれぞれの病変の *KRAS* およびその他のバイオマーカー候補である *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* の遺伝子変異を検討した。

【対象と方法】 Stage III, IV 期大腸癌の根治切除後に術後補助化学療法として FOLFOX 療法を施行した後に再発し、転移巣切除を施行した 21 症例の 63 病変を対象とした。内訳は原発巣/化学療法前転移巣/化学療法後転移巣が 21/18/24 検体であった。パラフィンブロック標本から macro-dissection 法により癌部を削り出し、得られた DNA を ARMS-Scorpion 法と multiplex PCR-Luminex 法にて *KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* の遺伝子変異の状態を解析した。

【結果】 21 症例における原発病変は結腸/直腸：8/13 例であった。初回原発病変切除の時点では Stage III/IV：12/9 例であった。同時性転移病変を有する Stage IV の 9 症例の転移病変の総数は 12 病変であった。さらに、Stage III 症例のうちの 5 症例 6 病変は初回手術後 FOLFOX 療法施行前の異時性再発の病変であり切除が行われていた。これらの計 18 病変を pre-FOLFOX 病変と定義した。一方、21 症例の 24 病変が FOLFOX 療法施行中または施行後に再発し、その後外科的切除が行われた病変であった。これらの病変を post-FOLFOX 病変と定義した。全ての転移病変は大腸腺癌からの転移であるとして矛盾しない病理組織学的形態像を示していた。原発巣の *KRAS* codon 12 および 13 遺伝子変異は、野生型/変異型がそれぞれ 8/13 症例であった。まず、原発病変と pre-FOLFOX 病変の一致性について検討した。原発病変において *KRAS* G12A の変異を認め、肺転移病変において *KRAS* 野生型の症例を 1 例認めた。病理組織は結腸 adenocarcinoma からの肺転移として矛盾なく、FFPE 標本よりゲノム DNA を再抽出し ARMS 法による再検を 2 回行ったが変異は認められなかった。その他の 14 症例における pre-FOLFOX 17 病変では、検索した遺伝子変異の有無と変異パターンは全て原発病変と一致していた。一方、post-FOLFOX 病変の 24 病変においては、すべての症例において原発病変と再発転移病変において遺伝子変異のパターンに変化はなかった。

【考察】抗 EGFR 抗体薬投与前の治療果予測因子である *KRAS* 遺伝子変異検査に用いる DNA 検体は、FOLFOX 療法施行中または施行後の症例であっても、原発病変や転移病変のどの病変を用いても問題なく、新たな検体の採取は必須ではない可能性が示唆された。しかし、本研究は少数例の検討であり、*KRAS* 等の遺伝子変異が FOLFOX 療法により変化しないかどうか、さらに多くの症例で確認する必要があるが、手術検体のみを対象とすると症例集積は困難であると予想される。FOLFOX 療法施行前後の末梢血から circulating tumor cells を回収し、高感度の検出法を用いた遺伝子変異の解析法の開発も今後考慮すべきである。

【結論】 FOLFOX 療法施行症例においても、効果予測因子となり得るバイオマーカー遺伝子の変異はみられず、原発病変、FOLFOX 療法施行後の転移病変のいずれの検体を用いても DNA によるバイオマーカー検索は実施できる可能性が示唆された。

学位論文審査の要旨

主査	教授	佐藤典宏
副査	准教授	神山俊哉
副査	教授	平野聡
副査	教授	野口昌幸

学位論文題名

A study of *KRAS* mutations in the primary tumors and post-FOLFOX metastatic lesions in cases of colorectal cancer

(FOLFOX療法の前後の原発病変と再発病変における大腸癌*KRAS*遺伝子変異一致率の検討)

本学位論文は、FOLFOX療法の前後の原発病変と再発病変における大腸癌 *KRAS* 遺伝子変異一致率について、臨床検体を用いて評価したものである。結果として、治療後の *KRAS* 遺伝子変異は認められなかった。質疑応答の概要は以下の通りである。

副査：神山俊哉准教授から、腫瘍の *heterogeneity* に関する検討が行われたかという質問が挙げられた。転移巣が数か所ある場合は、それぞれの腫瘍の遺伝子状態をみており、一症例内という観点では複数個所をみているとの回答であった。追加として、一つの腫瘍内での *heterogeneity* に関しての検討はどうかという質問に対して、一つの腫瘍に対して *macro-dissection* 法により一括して腫瘍を削出しており *heterogeneity* は検討できていないとの回答であった。神山先生より、最近ではひとつの腫瘍内での *heterogeneity*、癌幹細胞に関しても報告がみられており、ひとつの腫瘍内の部位別における *heterogeneity* もみられる可能性があり、今後の検討課題となるのではないかとのコメントが述べられた。神山先生の総評として、臨床現場における疑問を解決しようという試みの研究ではないかとのコメントが述べられた。

副査：平野聡教授から、本研究における *KRAS* 遺伝子変異の発生頻度が通常の報告よりも高いことが指摘された。これは、本研究における対象集団が、特殊な症例集団をみている可能性もあり、21例という症例で一般化するには注意が必要であるとのコメントが述べられた。また、*oxaliplatin* 抵抗性の症例に関しては、抗腫瘍効果のない症例であることから、そのような症例ではもともと遺伝子変異が起こりにくい可能性があるのではないかという議論が交わされた。しかし、*oxaliplatin* に対する感受性に関わらず全症例において変異の変化が起らなかった点に関しては興味深い結果であるとの総評が述べられた。その他、本研究において、化学療法として *oxaliplatin* 併用の FOLFOX 療法が選択されて理由に関して質問が挙げられた。FOLFOX 療法は、現在の切除不能・再発大腸癌において最も一般的にひろく施行されている化学療法であり一般的な症例に結果を還元しやすいことと、FOLFOX 療法は大腸癌の術後補助化学療法としての *evidence* が得られており、補助化学療法としても一般臨床で施行されていることからこの点でも結果を一般化しやすいとの回答であった。

副査：野口昌幸教授から、*KRAS* 遺伝子変異の記載方法について意見が述べられた。論文表中の記載方法はコードされるアミノ酸の表記であり、研究の本来の目的である遺伝子配列が表記されていないのではないかとの指摘があった。臨床における *KRAS* 遺伝子状態の記載の慣例ではあるが、指摘の通り遺伝子配列を表記しているものではなく、記載方法を再

検討するとの回答であった。

主査：佐藤典宏教授から、本研究では遺伝子状態の変化が起こる可能性は0%であったが、予測期待値がどの程度で、前向きに行うとすればどれくらいの症例設計が必要かの検討はあったか、との質問が挙げられた。本研究ではそのような検討は行っておらず、集められる検体数のみで後ろ向きの検討を行ったとの回答であった。統計的な処理を多少加えて論文に記載してはどうかとのコメントが述べられた。また、論文中の総括および結論に関しても、本研究に基づく結果を中心に記載するべきであるとのコメントが述べられた。

全体として、臨床検体を用いた、臨床現場における疑問に答えようとする研究であるとの評価であった。症例数が limitation とはなるため、この結果がどの程度一般化できるについては検討が必要であり、統計学的な検討も加えることが推奨された。

以上より、審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽と取得単位なども併せて、申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。