

肝内胆管癌における Ribonucleotide Reductase M1 発現の 臨床学的意義：Gemcitabine 治療抵抗性

堅 田 朋 大

新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野

(主任：若井俊文教授)

Clinical Significance of Ribonucleotide Reductase M1 Expression in Patients with Intrahepatic Cholangiocarcinoma: Association with Gemcitabine Resistance

Tomohiro KATADA

Division of Digestive and General Surgery, Niigata University

Graduate School of Medical and Dental Sciences

(Director: Prof. Toshifumi WAKAI)

要 旨

【目的】 Gemcitabine (以下 GEM) の代謝経路において、リボヌクレオチド還元酵素の調節サブユニットである Ribonucleotide Reductase M1 (以下 RRM1) は GEM の作用機序に重要な働きを示す key molecular とされている。本研究の目的は、肝内胆管癌における RRM1 発現を免疫組織化学にて検討し、GEM 基盤の術前化学療法の効果と RRM1 発現との関連を明らかにすることにある。

【対象と方法】 1992 年 1 月から 2012 年 12 月までに当科で根治切除が施行された肝内胆管癌 43 例を対象とした。術前に高度局所進展のため根治切除が困難・不能と診断された 4 例に対して、GEM 基盤の術前化学療法 (GEM 単剤 2 例, GEM + TS-1 併用 2 例) を施行した。術前化学療法の治療効果は RECIST ガイドラインに準じて判定した。RRM1 発現は免疫組織化学により評価され、陽性または陰性に分類した。

【結果】 RRM1 発現陽性は 43 例中 27 例 (63 %) であった。GEM 基盤の術前化学療法が施行された 4 例全例で重篤な有害事象の発生なく、化学療法前に立案していた術式の遂行が可能であった。術前化学療法を施行した 4 例中 3 例は RRM1 発現陽性であり、腫瘍縮小率は 11 %, 14 %, 25 % であり、治療効果は安定 (SD) と判定された。残り 1 例は RRM1 発現陰性で、腫瘍縮小率は 68 % であり、部分奏功 (PR) と判定された。

【結論】 GEM 基盤の術前化学療法の効果は RRM1 発現と関連していることが示唆される。高度局所進展を伴う肝内胆管癌に対する GEM 基盤の術前化学療法は安全に施行でき、かつ立案術式を遂行可能であるため、十分に認容されるものである。

キーワード：肝内胆管癌, Gemcitabine, RRM1, 術前化学療法, 外科切除

Reprint requests to: Tomohiro KATADA
Division of Digestive and General Surgery,
Niigata University Graduate School of
Medical and Dental Sciences,
1-757 Asahimachi - dori, Chuo - ku,
Niigata 951-8510, Japan.

別刷請求先：〒951-8510 新潟市中央区旭町通 1-757
新潟大学大学院医歯学総合研究科
生体機能調節医学専攻機能再建医学大講座消化器・
一般外科学分野

堅 田 朋 大

緒 言

肝内胆管癌の治療法として、組織学的に腫瘍遺残のない外科切除が最も優れた治療法とされている¹⁾。しかしながら外科切除のみでは術後成績は不良であり、治療成績の向上には術前または術後化学療法の併用療法の確立が望まれている。進行胆道癌において Gemcitabine (以下 GEM) が有効とされているが²⁾、その治療効果は未だ十分なものとは言えない。近年、リボヌクレオチド還元酵素の調節サブユニットである Ribonucleotide Reductase M1 (以下 RRM1) の高度発現が GEM 耐性と関連があると考えられている³⁾。

本研究の目的は、肝内胆管癌における RRM1 発現を免疫組織化学にて検討し、GEM 基盤の術前化学療法の効果と RRM1 発現との関連を明らかにすることである。

材料と方法

1. 対象

1992 年 1 月から 2012 年 12 月までに当科で根治切除が施行された肝内胆管癌 43 例を対象とした。男性 30 例、女性 13 例であり、平均年齢は 67 歳 (範囲: 31-82 歳) であった。術前に血清 CEA 値および血清 CA19-9 値を測定し、術前平均値 (範囲) は、血清 CEA 値 5.0 ng/mL (1.3-173.6 ng/mL) で、血清 CA19-9 値は 135 U/mL (5.4-18609 U/mL) であった。術前化学療法を施行した症例では、化学療法開始前および終了後 (手術前) に血清 CEA 値および血清 CA19-9 値を測定した。

2. 術前化学療法

当科では 2009 年から高度局所進展を伴う肝内胆管癌に対する治療戦略として術前化学療法が導入された。術前化学療法の適応は、肝外への浸潤および顕在化リンパ節転移であった。術前化学療法のプロトコールは GEM 800mg/m² を 2 週毎の経静脈的投与とした。43 例中 4 例に GEM 基盤の術前化学療法が施行された。化学療法に対する

治療効果は Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) ガイドラインに準じて判定した⁴⁾。治療の有害事象は Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) を用いて評価した⁵⁾。

3. 外科手術

肝内胆管癌 43 例の術式の内訳は、左 3 区域切除 4 例、拡大肝左葉切除 16 例、肝左葉切除 7 例、右 3 区域切除 1 例、拡大肝右葉切除 6 例、肝右葉切除 2 例、中央 2 区域切除 1 例、後区域切除 3 例、肝部分切除 3 例であった。肝外胆管切除を 31 例、血管合併切除を 7 例 (門脈 5 例、門脈+肝動脈 1 例、下大静脈 1 例) に併施した。

4. 病理組織学的検査

所属リンパ節転移は 43 例中 15 例 (35%) に認められた。43 例中 6 例 (14%) で病理学的に遠隔転移を認め、pM1 と診断された。3 例は傍大動脈リンパ節転移陽性例、3 例は限局性の腹膜播種転移陽性例であった。病期は UICC 第 7 版 TNM 分類に準じて判定し⁶⁾、Stage I が 13 例、Stage II が 11 例、Stage III が 2 例、Stage IVA が 11 例、Stage IVB が 6 例であった。

5. 免疫組織化学検査

肝内胆管癌の切除標本を 10%ホルマリンで固定後に、パラフィン包埋ブロックから 3 μ m の連続切片を作製し、各々 Hematoxylin Eosin 染色および RRM1 に対するポリクローナル抗体 (rabbit polyclonal antibody against RRM1, Richmond, BC, Canada) を用いた免疫組織化学を行った。RRM1 発現は細胞質内の免疫活性の存在と定義した⁷⁾。本研究では肝内胆管癌における RRM1 発現を強い細胞質内の免疫活性を特徴とした RRM1 発現陽性群と、細胞質内の免疫活性がない、または弱いことを特徴とした RRM1 発現陰性群の 2 群に分類した。

6. 統計解析

すべての統計解析は Windows 版 PASW

表 1 GEM 基盤の術前化学療法施工例

症例	年齢 (歳)	性別	resimen	治療前/後 血清 CEA (ng/mL)	治療前/後 血清 CA19-9 (U/mL)	腫瘍縮小率	RECIST 分類	術式	UICC TNM 分類	RRM1 発現
1	61	男性	GEM+TS-1	4.1/2.2	14600/441	68%	PR	左葉切除 肝外胆管切除	T3N0M1 Stage IVB	陰性
2	62	男性	GEM	4.5/5.0	46/33	11%	SD	左葉切除 肝外胆管切除	T1N1M0 Stage IVA	陽性
3	31	男性	GEM+TS-1	896.5/173.6	84/83	14%	SD	拡大左葉切除	T2N1M0 Stage IVA	陽性
4	62	男性	GEM	2170/271	11.4/5.5	25%	SD	拡大左葉切除 肝外胆管切除	T4N1M0 Stage IVA	陽性

Statistics 17 software (SPSS Japan (株), 東京) を用いて行った. 群間における頻度検定には Fisher's 直接確率法, Person の χ^2 検定を用いた. 術後の経過観察期間中央値は 45 か月であった. 11 種類の臨床病理学的因子に RRM1 発現を加えた計 12 種類の因子に関して単変量 (log-rank test) を用いて生存解析を行った. また, 両側検定で行い P 値 < 0.05 を統計学的に有意とした.

結 果

1. 肝内胆管癌における RRM1 発現

RRM1 発現陽性例は 43 例中 27 例 (63%) であった. RRM1 発現陽性群と RRM1 発現陰性群との間で, 年齢・性別・pT 分類・pN 分類・UICC TNM Stage・腫瘍径・組織分化度・癌遺残度・術前化学療法の有無・術後補助化学療法の有無に関して有意な差を認めなかった. pM 分類は RRM1 発現と強く関連しており, pM1 (遠隔転移) を呈する腫瘍は, 6 例全例が RRM1 発現陰性であり, 一方 pM0 であった腫瘍は 37 例中 27 例 (73%) が RRM1 発現陽性であった ($P = 0.001$). 術後成績は RRM1 発現陽性群 (生存期間中央値 35 か月, 5 年生存率 45%) と RRM1 発現陰性群 (生存期間中央値 19 か月, 5 年生存率 40%, $P = 0.556$) との間で統計学的に差を認めず同等の成績であった.

2. GEM 基盤の術前化学療法症例の検討

標的病変の抗癌剤効果判定は, 部分奏功 (PR) が 1 例, 安定 (SD) が 3 例であり, 奏功率は 25% であった (表 1). 症例 1 では計 8 回の GEM 治療が行われ, 腫瘍縮小率は 68% であり, PR と判定された (図 1A, B). 症例 2 では計 4 回の GEM 治療が行われ, 腫瘍縮小率は 11% であり, SD と判定された (図 1C, D). 症例 3 では計 5 回の GEM 治療が行われ, 腫瘍縮小率は 14% であり, SD と判定された (図 1E, F). 症例 4 では計 2 回の GEM 治療が行われ, 腫瘍縮小率は 25% であり, SD と判定された (図 1G, H).

術前化学療法が施行された 4 例全例で GEM による重篤な有害事象の発生を認めなかった. PR となった症例 1 では RRM1 発現陰性 (図 2A, B) で, SD となった症例 2~4 では RRM1 発現陽性 (図 2C, D) であった. 全例で術前化学療法前に立案していた術式の遂行が可能であった.

術式の内訳は, 左葉切除 2 例, 拡大左葉切除 2 例であり, 肝外胆管切除を 3 例に併施した. 病理学的病期診断は PR となった症例は Stage IVB (pT3N0M1) であり, SD となった症例は各々 Stage IVA (pT1N1M0), Stage IVA (pT2N1M0), Stage IVA (pT4N1M0) であった. 全例で術後に GEM 基盤の補助化学療法が施行された.

PR となった症例は術後 9.4 か月目に原病死した. SD となった 2 例は各々術後 11.5 か月, 14.8 か月目に原病死した. 残り 1 例の SD 症例は術後

術前化学療法前

術前化学療法後

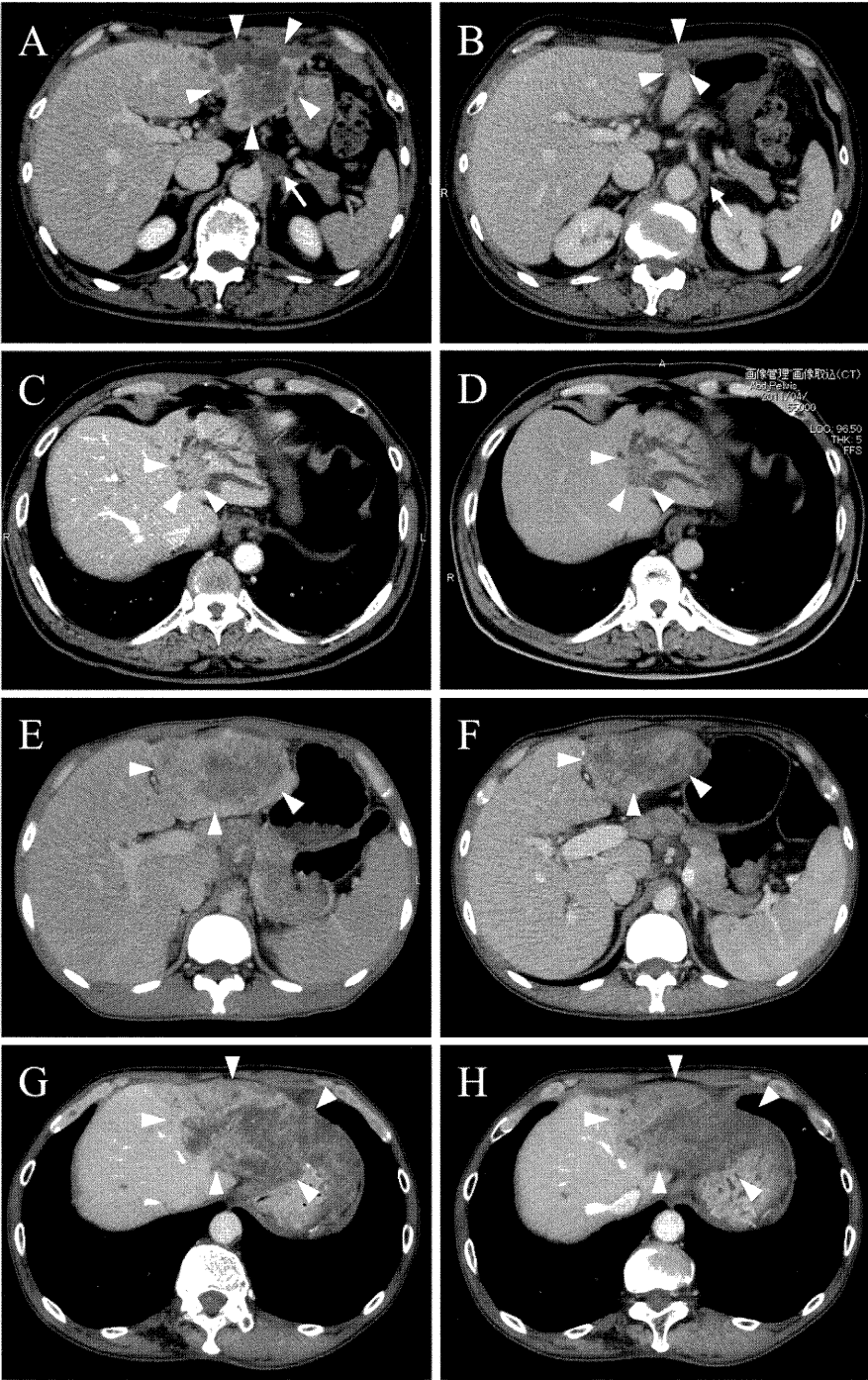


図 1 術前化学療法前後の CT 検査所見
矢頭は肝内胆管癌, 矢印は転移リンパ節を示す.

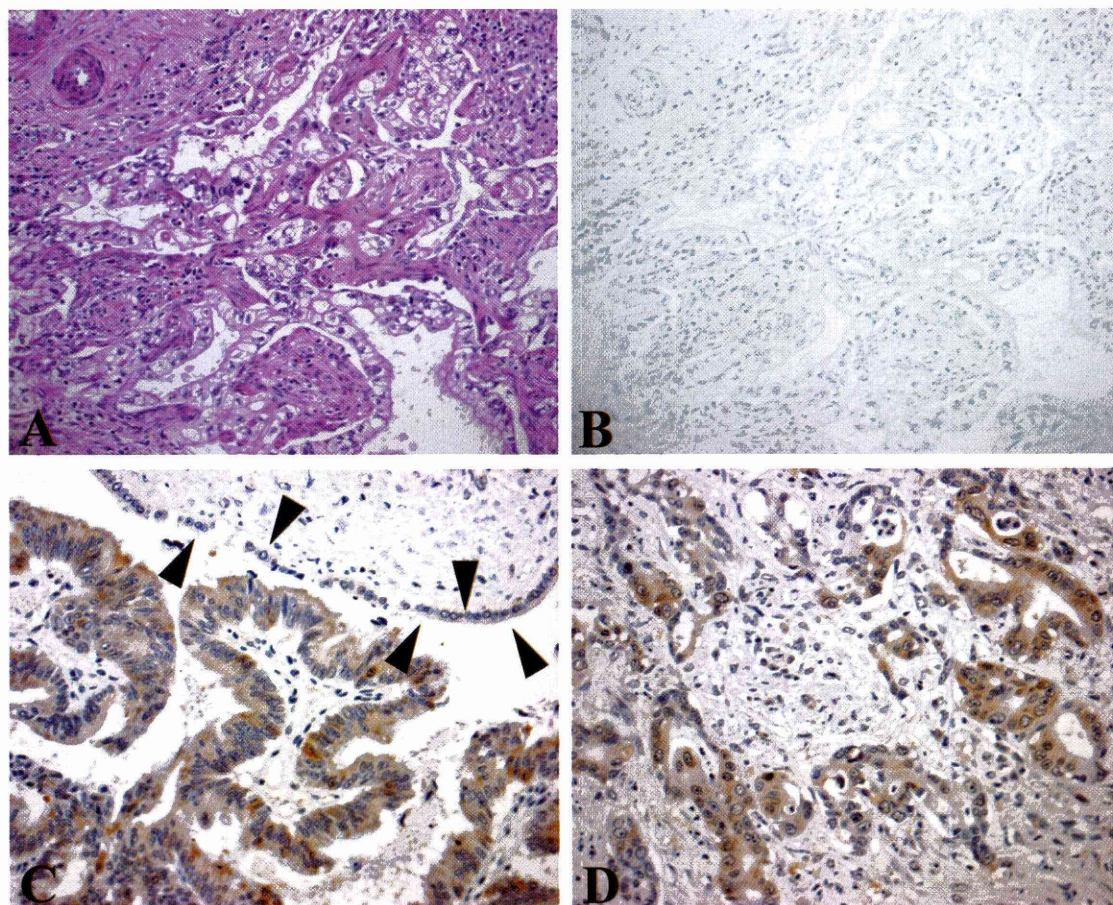


図2 肝内胆管癌における RRM1 発現

- (A) 残存腫瘍（症例1）の組織像（HE 染色）。
- (B) 残存腫瘍（症例1）における RRM1 免疫組織化学検査で RRM1 発現は認めない。
- (C) RRM1 免疫組織化学検査で非腫瘍性肝内胆管（矢頭）に RRM1 発現は認めないが、残存腫瘍部では RRM1 発現陽性である。
- (D) 腫瘍細胞の細胞質内に RRM1 発現陽性である。

25.9 か月無再発生存中であった。

考 察

肝内胆管癌は診断時には既に高度な局所浸潤と遠隔転移が生じていることが多く、極めて予後不良な悪性腫瘍とされている⁸⁾。肝内胆管癌の治療法として、組織学的に腫瘍遺残のない外科切除が最も優れた治療法とされている¹⁾。しかしながら、

外科切除のみでは術後成績は不良であり、治療成績の向上には術前または術後化学療法の併用療法の確立が望まれている。GEM は多種の固形腫瘍に対して、広いスペクトラムを有する重要なヌクレオチドアナログである⁹⁾。進行胆道癌においても GEM が有効とされているが、その治療効果は未だ十分とは言えない¹⁰⁾。その理由として腫瘍によって GEM に対する反応性が異なることが挙げられる。GEM 治療前にどのような腫瘍に GEM

った。Ohtaka らは 47 例の外科切除標本において 62 % の RRM1 高発現を認め⁷⁾、本研究の結果 (RRM1 発現陽性率 63 %) と同様の結果を報告している。したがって、肝内胆管癌患者の約 40 % は RRM1 低発現であり、GEM 基盤の化学療法が有効である可能性が示唆される。

また、本研究では術前化学療法が施行された 4 例全例で重篤な有害事象の発生なく、化学療法前に立案していた術式の遂行が可能であった。以上のことから、高度局所進展を伴う肝内胆管癌に対して GEM 基盤の術前化学療法は十分に許容されるものと考えられる。

GEM 基盤の術前化学療法が施行された症例 1 は遠隔転移陽性例かつ RRM1 低発現であったために、GEM 治療が奏功し PR が得られたものと考えられた。今後さらなる症例の蓄積が必要ではあるが、根治切除が困難・不能である遠隔転移陽性例では RRM1 低発現が予測されるため、積極的な GEM 基盤の化学療法を行うことで抗癌剤の上乗せ効果により切除率および治療成績の向上が期待される。

現在、RRM1 以外にも hENT1 や dCK といった複合的な因子が GEM 耐性機序に関与していると考えられており¹⁷⁾¹⁸⁾、肝内胆管癌に対するバイオマーカーの治療効果の予測的価値を解明するためにも、さらなる研究が必要である。

結 論

GEM 基盤の術前化学療法の効果は RRM1 発現と関連していることが示唆される。高度局所進展を伴う肝内胆管癌に対する GEM 基盤の術前化学療法は安全に施行でき、かつ立案術式を遂行可能であるため、十分に認容されるものである。

謝 辞

稿を終えるにあたり、御指導を賜りました新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野 若井俊文教授に深謝いたします。

文 献

- 1) Luo X, Yuan L, Wang Y, Ge R, Sun Y and Wei G: Survival Outcomes and Prognostic Factors of Surgical Therapy for All Potentially Resectable Intrahepatic Cholangiocarcinoma: a Large Single - Center Cohort Study. *J Gastrointest Surg* 18: 562 - 572, 2014.
- 2) Okusaka T, Ishii H, Funakoshi A, Yamao K, Ohkawa S, Saito S, Saito H and Tsuyuguchi T: Phase II study of single - agent gemcitabine in patients with advanced biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 57: 647 - 653, 2006.
- 3) Jordheim LP, Sève P, Trédan O and Dumontet C: The ribonucleotide reductase large subunit (RRM1) as a predictive factor in patients with cancer. *Lancet Oncol* 12: 693 - 702, 2011.
- 4) Therasse P, Arbuck SG, Eisenhauer EA, Wanders J, Kaplan RS, Rubinstein L, Verweij J, Van Glabbeke M, van Oosterom AT, Christian MC and Gwyther SG: New guidelines to evaluate the response to treatment in solid tumors. European Organization for Research and Treatment of Cancer, National Cancer Institute of the United States, National Cancer Institute of Canada. *J Natl Cancer Inst* 92: 205 - 216, 2000.
- 5) Cancer Therapy Evaluation Program. Common Terminology Criteria for Adverse Events. Version 4.0. National Cancer Institute. Available from URL: http://ctep.cancer.gov/protocolDevelopment/electronic_applications/ctc.htm
- 6) Sobin L, Gospodarowicz M and Wittekind C: TNM Classification of Malignant Tumours. 7th ed, John Wiley & Sons, Ltd., Hoboken, NJ, pp114 - 117, 2009.
- 7) Ohtaka K, Kohya N, Sato K, Kitajima Y, Ide T, Mitsuno M and Miyazaki K: Ribonucleotide reductase subunit M1 is a possible chemoresistance marker to gemcitabine in biliary tract carcinoma. *Oncol Rep* 20: 279 - 286, 2008.
- 8) Shirabe K, Shimada M, Harimoto N, Sugimachi K, Yamashita Y, Tsujita E and Aishima S: Intrahepatic cholangiocarcinoma: its mode of

- spreading and therapeutic modalities. *Surgery* 131: 159 - 164, 2002.
- 9) Mini E, Nobili S, Caciagli B, Landini I and Mazzei T: Cellular pharmacology of gemcitabine. *Ann Oncol* 17: 7 - 12, 2006.
- 10) Dingle BH, Rumble RB and Brouwers MC; Cancer Care Ontario's Program in Evidence - Based Care's Gastrointestinal Cancer Disease Site Group: The role of gemcitabine in the treatment of cholangiocarcinoma and gallbladder cancer: a systematic review. *Can J Gastroenterol* 19: 711 - 718, 2005.
- 11) Chapman TR and Kinsella TJ: Ribonucleotide reductase inhibitors: a new look at an old target for radiosensitization. *Front Oncol* 1: 56, 2012.
- 12) G. Bepler, X. Li, M. Schell, Z. Zheng, D. Boulware, C. K. Obasaju and C. Reynolds: Predictive value of RRM1 and ERCC1 protein levels in a prospective community - based trial of gemcitabine/carboplatin (GC) vs gemcitabine (G) alone. *Journal of Clinical Oncology* 26: Suppl 15, 2008.
- 13) Spratlin J, Sangha R, Glubrecht D, Dabbagh L, Young JD, Dumontet C, Cass C, Lai R and Mackey JR: The absence of human equilibrative nucleoside transporter 1 is associated with reduced survival in patients with gemcitabine - treated pancreas adenocarcinoma. *Clin Cancer Res* 10: 6956 - 6961, 2004.
- 14) Strimpakos AS, Syrigos KN and Saif MW: Pharmacogenomics in pancreatic adenocarcinoma: new data and their clinical implications. *JOP* 14: 359 - 362, 2013.
- 15) Nakamura J, Kohya N, Kai K, Ohtaka K, Hashiguchi K, Hiraki M, Kitajima Y, Tokunaga O, Noshiro H and Miyazaki K: Ribonucleotide reductase subunit M1 assessed by quantitative double - fluorescence immunohistochemistry predicts the efficacy of gemcitabine in biliary tract carcinoma. *Int J Oncol* 37: 845 - 852, 2010.
- 16) Wakai T, Shirai Y, Sakata J, Takamura M, Matsuda Y, Korita PV, Muneoka K, Sasaki M, Ajioka Y and Hatakeyama K: Ribonucleotide reductase M1 expression in intrahepatic cholangiocarcinoma. *Hepatogastroenterology* 58: 1659 - 1663, 2011.
- 17) Maréchal R, Bachet JB, Mackey JR, Dalban C, Demetter P, Graham K, Couvelard A, Svrcek M, Bardier - Dupas A, Hammel P, Sauvanet A, Louvet C, Paye F, Rougier P, Penna C, André T, Dumontet C, Cass CE, Jordheim LP, Matera EL, Closset J, Salmon I, Devière J, Emile JF and Van Laethem JL: Levels of gemcitabine transport and metabolism proteins predict survival times of patients treated with gemcitabine for pancreatic adenocarcinoma. *Gastroenterology* 143: 667 - 674, 2012.
- 18) Nakagawa N, Murakami Y, Uemura K, Sudo T, Hashimoto Y, Kondo N and Sueda T: Combined analysis of intratumoral human equilibrative nucleoside transporter 1 (hENT1) and ribonucleotide reductase regulatory subunit M1 (RRM1) expression is a powerful predictor of survival in patients with pancreatic carcinoma treated with adjuvant gemcitabine - based chemotherapy after operative resection. *Surgery* 153: 565 - 575, 2013.

(平成26年1月22日受付)