筑　波　大　学

博 士 （ 医 学 ） 学 位 論 文

KRAS 野生型切除不能大腸癌に対する
抗 EGFR 抗体治療における
血清バイオマーカー解析

２０１７

筑波大学

高　橋　　直　樹

目次

第１章　　はじめに・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・5

1-1.　大腸癌の疫学

1-2.　切除不能大腸癌薬物療法における抗体薬治療

1-3.　抗 EGFR 抗体無効のバイオマーカー：*RAS* 遺伝子変異

1-4.　抗 EGFR 抗体のバイオマーカー: *RAS* 遺伝子変異以外

1-5.　血中 EGFR リガンド濃度測定の意義

第２章　　血清リガンド蛋白の発現解析と予後解析・・・・・・・・・・・・14

2-1.　目的

2-2.　材料と方法

2-2-1.　対象症例

2-2-2.　Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

2-2-3.　*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* 遺伝子変異解析

2-2-4.　治療効果の評価ならびに統計学的評価

2-3.　結果

2-3-1.　患者背景

2-3-2.　血清リガンド解析

2-3-3.　*KRAS*, *NRAS*, *BRAF*, *PIK3CA* 遺伝子変異

2-3-4.　*KRAS* exon 2 野生型における血清リガンド濃度と予後解析

2-3-5.　*KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA* 野生型における血清リガンド濃度と予後解析

2-3-6.　血清リガンド濃度と抗 EGFR 抗体の抗腫瘍効果

2-3-7.　病勢増悪時の血清リガンド濃度変化と予後解析

2-4.　考察

第３章　総括・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37

第４章　引用文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・38

第５章　化学療法レジメン・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46

第６章　謝辞・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・46

第７章　本研究の倫理委員会承認、研究費・・・・・・・・・・・・・・・・・47

第８章　筆者の本研究における貢献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

第９章　参考文献・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・47

第１章　はじめに

1-1.　大腸癌の疫学

大腸癌（結腸癌、直腸癌）は、世界でも多い癌腫であり、罹患率では男性で 3 位、女性で 2 位を占めており、死亡率に関しては第 4 位である[1]。日本においては、国立がん研究センターがん対策情報センターのデータによれば、2014 年に癌で死亡した人は 368,103 人（男性 218,397 人、女性 149,706 人）であり、2012 年に新たに診断された癌（罹患全国推計値）は 865,238 人（男性 503,970 人、女性 361,268 人）であった。大腸癌の罹患率の年次推移は、男女とも 1990 年代前半までは増加し、その後は横ばい傾向にある。また、死亡率の年次推移は、男女とも戦後から 1990 年代半ばまで増加し、その後漸減傾向である。大腸癌の罹患数に関しては、男女ともに第 2 位であり、全体では第 1 位であった（結腸癌：87797 人、直腸癌：46778 人）。死亡数に関しては、男性で 3 位、女性で 1 位であり、全体では 2 位となっている（結腸癌：33297 人、直腸癌：15188 人）[2]。　日本における切除不能大腸癌の割合は、大腸癌研究会（全国登録：2000～2004 年）によれば、大腸癌全体の登録数 25298 症例のうち、4300 症例(17.0 %)であった。また予後に関しては、Stage IV（大腸癌取り扱い規約 第 6 版)における 5 年生存率は 18.7%であった。

1-2.　切除不能大腸癌の薬物療法における抗体薬治療

切除不能・進行大腸癌の薬物療法における変遷は、1950 年代に開発された 5-フルオロウラシル(5-FU)に代表されるフッ化ピリミジン系抗癌剤に始まり、biochemical modulation の概念に基づき、5-FU+ロイコボリン療法(5-FU/LV)による生存期間の延長が示された[3,4]。1990 年代に入ると新規抗がん剤のイリノテカン(CPT-11),オキサリプラチン(L-OHP)が登場し、従来の抗癌剤と併用することの有用性を検証する臨床試験で行われるようになった。2000 年に IFL 療法（bolus 5-FU/LV+CPT-11）と bolus 5-FU/LV 療法の第 3 相試験が行われ、IFL 群が生存期間において有意に優れており標準治療となった(無増悪生存期間[PFS] 7.0 カ月 vs 4.3 カ月、p=0.004； 全生存期間[OS] 14.8 カ月 vs 12.6 カ月、p=0.04) [5]。2007 年に報告された IFL 療法と FOLFIRI 療法(infusional 5-FU/LV+CPT-11)、CapeIRI 療法(Capecitabine/CPT-11)を比較した第 3 相試験(BICC-C 試験)では、FOLFIRI 療法が IFL 群と比較して生存期間の延長が確認された(PFS 7.6 カ月 vs 5.9 カ月、p=0.004； OS 23.1 カ月 vs 17.6 カ月、p=0.09)[6]。CapeIRI 療法は、IFL 群と比較して PFS ならびに OS で有意差を認めなかった(PFS 5.8 カ月 vs 5.9 カ月、

p=0.46； OS 18.9 カ月 vs 17.6 カ月、p=0.93)。一方、IFL 療法を対照群として FOLFOX4 療法(infusional 5-FU/LV+L-OHP)と比較した第 3 相試験(N9741 試験)では FOLFOX4 療法は IFL 療法と比較して、OS で有意な延長が認められた(19.5 カ月 vs 15.0 カ月、p=0.0001)[7]。これらの試験の結果から初回化学療法における標準的化学療法として、それぞれ FOLFIRI 療法、FOLFOX 療法が確立した。

近年の分子標的治療薬の開発により、切除不能・進行再発大腸癌においても、血管内皮成長因子（vascular endothelial growth factor：VEGF）を標的とした bevacizumab、VEGF 受容体(VEGFR)-2 を標的とした ramucirumab、上皮成長因子受容体（epidermal growth factor receptor: EGFR）を標的とした cetuximab、panitumumab が日常診療で使用されている。

Bevacizumab は VEGF に特異的に結合するヒト化 IgG1 モノクローナル抗体であり、VEGF がその受容体に結合することを阻止することによって、その生物活性を阻害する。IFL 療法に bevacizumab を併用した群と IFL 単独群の比較試験が行われ、IFL＋bevacizumab 療法が有意に OS を延長させることが報告された(20.3 か月 vs 15.6 か月、p<0.001)[8]。NO16966 試験は XELOX(capecitabine+L-OHP)または FOLFOX と XELOX＋bevacizumab または FOLFOX＋bevacizumab の 2x2 試験であり、L-OHP 併用化学療法に bevacizumab を上乗せする PFS の優越性と、フッ化ピリミジン系の 5-FU-LV と capecitabine の PFS の非劣性を検証した。Bevacizumab 併用群が非併用群と比較して有意な延長を認め（9.4 カ月 vs 8.0 カ月、p=0.0023）、5-FU/LV に対する capecitabine の非劣性も示され(8.5 カ月 vs 8.0 カ月、HR 1.01、97.5%信頼区間の上限が 1.23 以下)、FOLFOX もしくは XELOX に bevacizumab を併用する療法が新たな初回化学療法における標準治療の一つとなった[9]。また、bevacizumab を含む初回治療の増悪後、2 次治療において bevacizumab を継続して併用する（bevacizumab beyond progression：BBP）する方が併用しない群と比較して、OS を改善させることが TML 試験にて証明されている(11.1 カ月 vs 9.6 カ月、p=0.0062）[10]。

Ramucirumab は血管内皮細胞膜上の VEGFR-2 の細胞外ドメインに特異的に結合する完全ヒト型 IgG1 モノクローナル抗体である。Bevacizumab、L-OHP、フッ化ピリミジン系製剤を用いた初回治療後に病勢進行を認めた切除不能・進行大腸癌患者に対する 2 次治療として、FOLFIRI 療法に対する ramucirumab の上乗せを評価した第 3 相試験である RAISE 試験が行われ、ramucirumab 群において OS が有意に延長した(13.3 カ月 vs 11.7 カ月、ｐ＝0.0219）[11]。

Cetuximab は EGFR に対するマウス／ヒト キメラ IgG1 モノクローナル抗体であり、EGFR の細胞外ドメインに特異的に結合し、EGFR へのリガンド結合を阻害する。EGFR 発

現のある切除不能・進行大腸癌を対象としてFOLFIRI+cetuximab群とFOLFIRI+プラセボ群を比較した第３相試験(CRYSTAL試験)と、FOLFOX4＋cetuximab群とFOLFOX4単独群を比較した第２相試験(OPUS試験)は、初回化学療法におけるcetuximabの上乗せ効果を検証した臨床試験である。これら試験の実施される頃から、大腸癌の約 40％を占める *KRAS* exon 2 遺伝子変異を有する症例では、抗EGFR抗体薬が無効であることが明らかになってきた[12]。CRYSTAL試験ではEGFR発現のある切除不能・進行大腸癌を対象に、FOLFIRI療法にcetuximabの上乗せ効果を検証した第3相比較試験であり、全体の主要評価項目あるPFSではcetuximab併用群で有意な延長を認めた(8.9カ月 vs 8.0カ月、p=0.048)。本試験の後解析において*KRAS*遺伝子解析が行われ、*KRAS* exon 2野生型ではcetuximab併用群でPFSの有意な改善が認められたが(9.9カ月 vs 8.7カ月、p=0.02)、逆に*KRAS* exon 2変異型においてはcetuximab併用群でPFSの改善は認められなかった(7.6 カ月 vs 8.1 カ月、p=0.75)[13]。OPUS 試験では主要評価項目である奏効率はcetuximab併用群にて良好な傾向が認められた（46% vs 36%）。後解析として*KRAS*遺伝子変異が行われ、*KRAS* exon 2野生型においてはcetuximab併用群で有意に奏効率の改善を認め（57％ vs 34%、p=0.0023）、逆に*KRAS* exon 2変異型ではcetuximab併用群で奏効率は有意に不良であった（34％ vs 53%、p=0.0026）[14]。フッ化ピリミジン系薬剤、CPT-11、L-OHP の全てに不応の切除不能な大腸癌を対象とした、cetuximab 単独療法群とbest supportive care (BSC)群を比較した第3相試験(NCIC-CTG CO.17)では、cetuximab 単独療法群の方が BSC 群と比較して、OS において有意に優れた結果であり(6.1カ月 vs 4.6カ月、p=0.0046)、3次治療でのcetuximab単剤療法の有用性が示された[15]。また、CPT-11 不応の転移性大腸癌を対象とした CPT-11+cetuximab 併用療法とcetuximab 単独療法との第 2 相比較試験(BOND 試験)では、cetuximab 併用群において奏効率(22.9% vs 10.8%、p=0.0076)とPFS(4.1カ月 vs 1.5カ月、p<0.001)が有意に優れていた。これにより CPT-11 不応の症例に対して、cetuximab 併用下での CPT-11 再投与による耐性克服の可能性が示された[16]。また、5-FU/LV+L-OHP による初回治療に不応性の切除不能な大腸癌を対象として CPT-11+cetuximab 併用療法と CPT-11 単独療法との第3相比較試験(EPIC)が行われ、併用群においてPFS(4.0カ月 vs 2.6カ月、p<0.0001)と奏効率(16.4% vs 4.2%、p<0.0001)が有意に優れていた [17]。

PanitumumabはEGFRに対するIgG2完全ヒトモノクローナル抗体であり、cetuximabと比較してinfusion reactionやアレルギー反応はまれである（全グレード：1.5%）[18]。皮疹、下痢などの副作用については cetuximab とほぼ同じ頻度で出現する（皮疹 86.7 vs 87.5%、下痢 18.3% vs 17.7%）[19]。初回治療におけるFOLFOXへの上乗せ効果を検証したPRIME試験では、*KRAS* exon 2野生型においてpanitumumab併用群は主要評価項

目であるPFSが有意に優れていた(9.6カ月 vs 8.0カ月、p＝0.02)が、*KRAS*変異型においてはpanitumumab併用群においては、むしろ短縮していた(7.3カ月 vs 8.8カ月、p＝0.02)。OSに関しては*KRAS*野生型においてpanitumumab併用群で良好な成績であったが、有意差は認めなかった(23.9カ月 vs 19.7カ月、p=0.07)[20]。二次治療におけるFOLFIRIへの上乗せ効果を検証した20050181試験においても、*KRAS*野生型においてpanitumumab併用群で有意にPFSが優れていた(5.9カ月 vs 3.9カ月、p=0.004)が、OSにおいては両群で有意差は認めなかった(14.5カ月 vs 12.5カ月、p=0.12)。*KRAS*変異型においては、奏効率(13% vs 14&, p=1.0)、PFS(5.0カ月 vs 4.9カ月、p=0.14)、OS(11.8カ月 vs 11.1カ月、p=0.55)ともに改善は認めなかった[21]。フッ化ピリミジン、CPT-11、L-OHPに不応の転移性大腸癌を対象としたpanitumumab投与群とBSC群を比較する第3相試験が行われ、panitumumab投与群で奏効率(10% vs 0%、p<0.0001)とPFS(8.0カ月 vs 7.3カ月、p<0.0001)が有意に優れていた[22]。

以上から、抗EGFR抗体であるcetuximabとpanitumumabは、*KRAS*野生型（大腸癌症例の約60%）において有効性が証明され、*KRAS*変異型の場合には抗EGFR抗体は無効であることが示唆された。Cetuximabとpanitumumabの有効性の比較に関しては、既治療の*KRAS*野生型患者を対象として、cetuximab単剤とpanitumumab単剤を比較した第3相試験（ASPECCT試験）が行われ、両薬剤は奏効率(19.8% vs 22.0%、オッズ比 1.15、95%信頼区間 0.83-1.58)で有意な差は認められず、Panitumumabのcetuximabに対するOSの非劣性(10.4カ月 vs 10.0カ月、inferior p-value=0.0007)が証明されている[19]。

1-3. 抗EGFR抗体無効のバイオマーカー：*RAS*遺伝子変異解析

*KRAS*遺伝子変異(exon 2)が抗EGFR抗体の効果予測因子として確立されたが、*KRAS*（exon 3,4)、*NRAS*（exon 2,3,4)などの頻度の少ない（全部を合わせて大腸癌の約10%）minorな遺伝子変異も抗EGFR抗体の無効因子として報告されるようになった[23]。*KRAS*（exon 2,3,4)、*NRAS*（exon 2,3,4)の変異を総じて*RAS*変異と定義し、過去に行われた抗EGFR抗体の第3相試験の検体を用いて、*RAS*遺伝子解析が行われた。*RAS*野生型の成績を表1に、*RAS*変異型の成績を表2にまとめた[24-27]。

表 1. 抗 EGFR 抗体の第 3 相試験における *RAS* 遺伝子野生型集団での治療効果

Trial	Treatment regimen	N	PFS (M)	HR	OS (M)	HR	RR (%)
PRIME	FOLFOX	253	7.9	0.72	20.2	0.78	—
(1st line)	FOLFOX＋Pmab	259	10.1	P=0.004	26.0	P=0.04	—
20050181	FOLFIRI	211	4.4	0.695	13.9	0.803	10
(2nd line)	FOLFIRI＋Pmab	204	6.4	P=0.006	16.2	p=0.08	41
20020408	BSC	63	7 wks	0.36	—	—	0
(3rd line)	Pmab＋BSC	73	14.1 wks	P<0.0001	—	—	16
OPUS	FOLFOX4	46	5.8	0.43	17.8	0.83	30.4
(1st line)	FOLFOX4＋Cmab	36	12.0	P=0.018	20.7	P=0.497	61.1
FIRE-3	FOLFIRI＋BV	171	10.2	0.93	25.6	0.70	59.6
(1st line)	FOLFIRI＋Cmab	171	10.4	P=0.54	33.1	P=0.011	65.5
PEAK	mFOLFOX6＋BV	82	9.5	0.65	28.9	0.63	60.5
(1st line)	mFOLFOX6＋Pmab	88	13.0	P=0.029	41.3	P=0.058	63.6

PFS : Progression-free survival, OS: Overall survival, HR: Hazard ratio, RR: Response rate, Cmab: Cetuximab, Pmab: Panitumumab, BV: Bevacizumab, BSC: Best supportive care, wks: weeks, N: patient's number, M: months

表 2. 抗 EGFR 抗体の第 3 相試験における *RAS* 遺伝子変異型集団での治療効果

Trial	Treatment regimen	N	PFS (M)	HR	OS (M)	HR	RR (%)
PRIME	FOLFOX	276	8.7	1.31	19.2	1.25	—
(1st line)	FOLFOX＋Pmab	275	7.3	P=0.008	15.6	P=0.043	—
20050181	FOLFIRI	294	4.0	0.861	11.1	0.914	15
(2nd line)	FOLFIRI＋Pmab	299	4.8	P=0.14	11.8	P=0.34	13
20020408	BSC	114	7.3 wks	0.97	—	—	—
(3rd line)	Pmab＋BSC	99	7.4 wks	P=0.729	—	—	—
OPUS	FOLFOX4	78	7.8	1.59	17.8	1.35	48.7
(1st line)	FOLFOX4＋Cmab	94	5.6	P=0.018	13.4	P=0.089	36.2
FIRE-3	FOLFIRI＋BV	86	12.2	2.22	20.6	1.20	58.1
(1st line)	FOLFIRI＋Cmab	92	6.1	P=0.004	16.4	P=0.57	38.2
PEAK	mFOLFOX6＋BV	27	8.8	1.13	16.6	0.41	—
(1st line)	mFOLFOX6＋Pmab	24	8.4	P=0.68	27.0	P=0.02	—

PFS: Progression-free survival, OS: Overall survival, HR: Hazard ratio, RR: Response rate, Cmab:Cetuximab, Pmab: Panitumumab, BV: Bevacizumab, BSC: Best supportive care, wks: weeks, N: patient's number, M: months

表 1，2 にまとめた前向きランダム化比較試験の組織検体を用いた prospective-retrospective analysis の結果では、*RAS* 野生型で抗 EGFR 抗体の効果が高くなる一方で、*RAS* 変異型においては抗 EGFR 抗体薬の効果は得られにくい対象であり、欧米のガイドラインや添付文書では *RAS* 遺伝子変異例には抗 EGFR 抗体薬の投与は推奨されていない。これらの結果を持って、日本においても *RAS* 解析が 2015 年に保険承認された。一度

に 96 検体、48 の変異のパターンを短時間で測定でき、測定感度も 1～5 %と良好な *RAS* 検査キット（MEBGENTM RASKET KIT：RASKET）が日本で開発された[28]。

1-4. 抗 EGFR 抗体のバイオマーカー解析：*RAS* 遺伝子変異以外

抗 EGFR 抗体の効果予測因子として、*RAS* 遺伝子変異が日常診療で使用されるようになったが、その他にこれまで様々なバイオマーカー解析が行われてきた。

抗 EGFR 抗体と腫瘍組織の EGFR 発現に関しては、前臨床試験において EGFR 発現の腫瘍細胞に抗腫瘍効果が高かったため[29]、大腸癌に cetuximab が承認された当初は、免疫染色にて EGFR 発現のある症例に適応が限定されていた。大腸癌組織の免疫染色において EGFR は 80～90%の症例に発現増強が認められ、実際には大部分の症例は治療対象となる。しかし、その後、EGFR 発現のない大腸癌においても cetuximab で奏効する症例が報告されるようになった[30]。Panitumumab においても、PRIME 試験ならびに 20050181 試験における後解析で、EGFR 発現の強度により抗 EGFR 抗体の効果に差がないことが報告された[31]。この理由としては、大腸癌組織においては heterogeneous な分子生物学的特徴が見られ、原発巣と転移巣で発現が異なることが指摘されている[32]。現在では腫瘍組織における EGFR 発現が抗 EGFR 抗体の適応条件にはなっていない。また、EGFR の gene copy number(GCN)や fluorescence in situ hybridization (FISH)に関しては、過去の報告において奏効ならびに予後に関与しているという報告があるものの[33, 34]、依然として前向きの大規模な臨床研究における検証はされておらず、GCN ならびに FISH の陽性基準なども研究によりバラツキがある点が課題となっている。

EGFR の下流シグナル伝達分子の遺伝子に関しては、*RAS* 遺伝子変異以外に、*BRAF*、*PIK3CA*、*PTEN* 等が解析されてきた。*BRAF* は *KRAS* の下流シグナルであり、変異を生じると増殖シグナルが活性化される。遺伝子変異の大部分は V600E 変異である。*BRAF* V600E 変異は大腸癌の約 5-10%で認められる。過去の探索研究では、*BRAF* 変異は抗 EGFR 抗体(cetuximab)における予後不良因子であることが報告されている [35]。CRYSTAL 試験と OPUS 試験を統合した後ろ向き解析では、*BRAF* 変異型大腸癌は、*BRAF* 野生型大腸癌と比較して極めて予後不良であった。PFS、OS の中央値は cetuximab 併用群でそれぞれ 7.1 ヵ月、14.1 ヵ月、非併用群で 3.7 ヵ月、9.9 ヵ月、ハザード比は 0.62、0.67 と、*BRAF* 変異における cetuximab による上乗せ効果が示唆される結果であったが[36]、少数例(5 症例)のサブグループ解析のため、効果予測因子として定まった見解とはされていない。*PIK3CA* 変異は、PI3K が PIP2→PIP3 へのリン酸化を誘導し、AKT などの下流シグナルを活性化させる。ヘリカルドメインである exon 9 と、キナーゼドメインである exon 20 が存在し、大腸癌における *PIK3CA* 変異は過去の報告からは約 15%に認められる[23]。抗 EGFR

抗体における *PIK3CA* exon20 変異の意義に関して、過去の報告では *PIK3CA* exon 20 変異が抗 EGFR 抗体治療の無効因子ならびに予後不良因子であるとの報告もある一方で、関連がないという報告もある[37]。前向きランダム化比較試験の後解析では、NCIC CTG CO.17 試験の *KRAS* 野生型かつ *PIK3CA* 変異型の少数例（26 症例）における検討によって、cetuximab + BSC 群は BSC 群と比較して奏効率(20% vs 12%)、OS(9.6 か月 vs 3.6 か月、p=0.059)とも良好な傾向が認められたと報告があり、panitumumab 単剤と BSC を比較した 20020408 試験の後解析でも同様に *PIK3CA* 変異型であっても Panitumumab 群で良好な成績（奏効率：20%）が認められている[38]。しかし、*BRAF* 変異と同様に頻度が少なく、大規模なデータによる検証はないことから一定の見解を得ていないのが現状である。*PTEN* はがん抑制遺伝子であり、PTEN 機能低下は PI3K からの下流シグナル活性化を誘導する。大腸癌では、免疫染色による PTEN 発現の低下は約 20-40%に認められ、*PTEN* 遺伝子変異は約 5%に認められる。過去の探索研究では、PTEN の発現低下している症例は、発現低下のない症例と比較して奏効率が低く(36% vs 5%)、PFS が短縮していること(4.7 カ月 vs 3.3 カ月、p=0.005)が報告されており[39]、また、*KRAS* exon2 野生型の切除不能・進行大腸癌に対する cetuximab 治療において、PTEN 発現がない症例は、それ以外の症例と比較して予後が不良であった(OS: 11.8 カ月 vs 16.2 カ月、p=0.013)[40]。その一方で、PTEN の発現が抗 EGFR 抗体治療の予後に関連がないという報告もあり、cetuximab 単剤群と BSC 群のランダム化比較試験である NCIC CTG CO.17 試験における後解析では、PTEN 発現に関わらず cetuximab 単剤群で OS の改善傾向が認められた(発現なし：HR 0.63、発現あり：HR 0.66)[38]。20020408 試験の後解析では、*PTEN* 変異は約 9%に認められ、*PTEN* の遺伝子変異によらず panitumumab の有効性が認められた(変異なし：HR 0.36、変異あり：HR 0.11）[41]。現時点では、PTEN 発現や *PTEN* 遺伝子変異と抗 EGFR 抗体の治療効果や予後に関与しているかどうかについては一定の見解は得られていない。

EGFR リガンドとして上皮成長因子 (EGF)、トランスフォーミング増殖因子(transforming growth factor; TGF-α）、amphiregulin (AREG)、ヘパリン結合 EGF 様増殖因子(heparin-binding EGF-like Growth Factor; HB-EGF)、betacellulin、epiregulin (EREG)、neuregulin (NRG) 、epigen が挙げられる(図 1)。

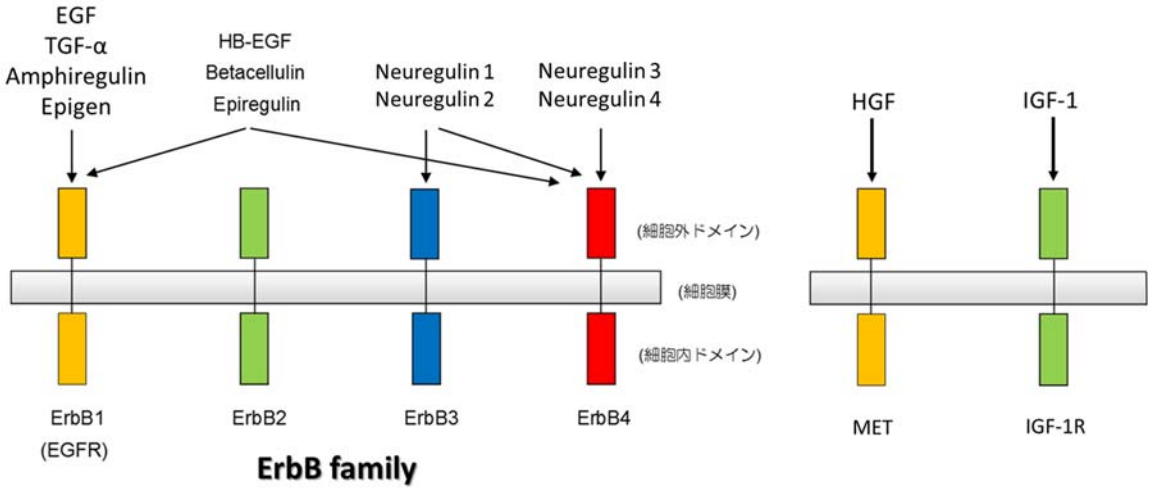

図 1. ErbB ファミリーの受容体ならびに対応するリガンド

これらのリガンドは ErbB (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog)ファミリーの受容体に結合し、細胞内の増殖シグナルを活性化する。また、NRG は EGFR とは結合しないが、ErbB3、ErbB4 と結合し、受容体以下の細胞内シグナル活性化などに関与しているとされている。また ErbB ファミリー以外にも、hepatocyte growth factor (HGF)/MET、insulin-like growth factor-1(IGF-1)/IGF-1R 経路の活性化は、ErbB ファミリーの下流シグナル(PIK3/AKT 経路や MARK 経路など)を活性化させ、抗 EGFR 抗体治療における抵抗性に関与していることが考えられている[42, 43]。切除不能・進行大腸癌で cetuximab 治療を受けた 220 症例の後ろ向き探索研究の報告では、*KRAS*野生型では AREG、EREG の発現が高い群で PFS(EREG: HR 0.61, p<0.0001; AREG: HR:0.60, p<0.0001)ならびに OS(EREG: HR 0.61, p<0.0001; AREG: HR:0.60, p<0.0001)の延長が認められたが、*KRAS* 変異群ではその傾向は認められなかった(p>0.05)[44]。Cetuximab 単剤の治療をうけた 3 つの前向き臨床試験（144 症例）の後解析でも、AREG、EREG を含む遺伝子高発現群で奏効例が高かった(33% vs 5%)[45]。L-OHP ベースの化学療法に cetuximab の上乗せ効果を検証した MRC COIN 試験に登録された 1,630 例中 952 例における後解析では、*KRAS* status と EREG 発現で OS を評価され、*KRAS* 野生型かつ EREG 高発現の群で最も予後が良好であった(p=0.004)[46]。また、CPT-11＋panitumumab 併用療法と CPT-11 単剤を比較した PICCOLO 試験において、*RAS* 野生型患者で AREG、EREG の高発現群では、CPT-11+panitumumab 群が CPT-11 単剤群と比較して有意に PFS の延長を認めた (8.3 カ月 vs 4.4 カ月、p<0.001)。[47]。

1-5.　血中 EGFR リガンド濃度測定の意義

本研究では、切除不能進行大腸癌における抗 EGFR 抗体の有効性に関するバイオマーカー研究として、血清におけるリガンド濃度を測定し、その臨床的意義を評価した。過去の報告では、*RAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 下流シグナル遺伝子変異が抗 EGFR 抗体治療における無効因子であるとの報告があり[23]、腫瘍組織の検討ではリガンド蛋白のうち、*KRAS* 野生型の症例においては AREG、EREG の発現が有効性に関与している可能性が示唆されている[44-47]。下流シグナル遺伝子変異が存在する症例においては、リガンド蛋白の発現に関わらず抗 EGFR 抗体の効果が期待できない可能性が高いが、遺伝子変異のない野生型においては、リガンド蛋白の発現の程度によって、抗 EGFR 抗体の有効性に違いが認められる可能性がある。これにより、特定のリガンド蛋白の発現が、抗 EGFR 抗体治療を受ける患者の positive もしくは negative selection ができるバイオマーカーとして確立すれば、今後の更なる抗体治療における個別化が可能となると考えた。また、血清検体では、採血という低侵襲な検査で検体が得られることや、治療直前の血清検体を用いることで過去に保存された腫瘍組織で評価するより、現在の腫瘍の状態をリアルタイムに評価できる利点がある。

第２章　血清リガンド蛋白の発現解析と予後解析

2-1.　目的

KRAS 野生型の切除不能・進行大腸癌の患者の血清検体を用いて、代表的なリガンド蛋白の血清濃度を測定し、抗 EGFR 抗体治療の奏効ならびに予後との関連性について検討を行う。

2-2.　材料と方法

2-2-1. 対象症例

2008 年 8 月から 2011 年 8 月に国立がん研究センター中央病院において抗 EGFR 抗体の治療を受けた切除不能・進行大腸癌患者のうち、病理にてホルマリン固定パラフィン包埋(FFPE)組織検体が保存されており、バイオバンクに保存されている凍結血清（治療前：2 週以内、病状増悪時：後 2 週以内）を使用した。この期間中は我が国を含めて世界的に抗 EGFR 抗体薬の適応は *KRAS exon* 2 野生型にのみ限定されていた。したがって、すべての症例で *KRAS* exon 2 の遺伝子解析ならびに臨床情報が得られている。適格規準としては、(1)病理組織学的に腺癌と診断されている、(2)抗 EGFR 抗体(cetuximab, panitumumab)治療前に抗 EGFR 抗体を含まない 1 レジメン以上の化学療法を受けている、(3)ECOG PS で 0～2、(4)肝機能ならびに腎機能が保たれている、(5)抗 EGFR 抗体治療は抗 EGFR 抗体の単剤ならびに CPT-11 ベースの化学療法との併用療法とする、 (6) 2～3 か月ごとに CT 検査にて増悪まで病状評価をされている、(7) 事前にバイオバンク検体における研究に関して、説明・同意を得ていること、以上の 7 項目である。主たる除外規準としては、(1)抗 EGFR 抗体以外の EGF 経路を標的とした分子標的治療薬を受けている、(2)他の重複する進行癌を認める、(3)中枢神経系に腫瘍浸潤もしくは転移を有する。

本研究は国立がん研究センター倫理審査委員会の承認を得て行った。

2-2-2. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

測定項目として、過去の文献から ErbB ファミリーを標的とした分子標的治療薬の有効性に関与していると考えられるリガンドである EGF、TGF-α、AREG、EREG、NRG、HGF、IGF-1 を選択した[42-51]。治療前、病状増悪時の血清検体を用い、過去の文献で使用されている市販の ELISA キットを用いて血清濃度を測定した。EGF は DEG00(R&D)、AREG は SEA006Hu(Uscn Life Science Inc)、EREG は CSB-EL007779HU(CUSABIO)、 TGF-α は DTGA00(R&D)、NRG は CSB-E17153h(CUSABIO)、HGF は DHG00(R&D)、IGF-1 は DG00(R&D)のキ

ットを用いた(表 3)。

表 3. ELISA

		EGF	TGF-α	EREG	AREG	NRG	HGF	IGF-1
ELISA Kit		DEG00 (R&D)	DTGA00 (R&D)	CSB-EL007779HU (CUSABIO)	SEA006Hu (Uscn Life Science Inc)	CSB-E17153h (CUSABIO)	DHG00 (R&D)	DG00 (R&D)
Method		Sandwich	Sandwich	Sandwich	Sandwich	Sandwich	Sandwich	Sandwich
	Sample incubation	37 ℃, 2 h	37 ℃, 2 h	37 ℃, 2 h	37 ℃, 2 h	37 ℃, 2 h	RT, 2 h	4 ℃, 2 h
	Conjugate	HRP	HRP	Biotin-Antibody + HPR-Avidin	Biotin-Antibody + HPR-Avidin	Biotin-Antibody + HPR-Avidin	HRP	HRP
	Antibody incubation	RT, 2 h	RT, 2 h	37 ℃, 1 h + 37 ℃, 1 h	37 ℃, 1 h + 37 ℃, 30 min	37 ℃, 1 h + 37 ℃, 1 h	37 ℃, 2 h	4 ℃, 1 h
	Substrate	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB	TMB
	Substrate incubation	37 ℃, 20 min	37 ℃, 30 min	37 ℃, 30 min	37 ℃, 30 min	37 ℃, 30 min	RT, 30 min	37 ℃, 30 min

EGF: epidermal growth factor, EREG: epiregulin, AREG: amphiregulin, NRG: neuregulin, HGF: hepatocyte growth factor, IGF-1: insulin-like growth factor-1, RT: room temperature, HRP: horseradish peroxidase, TMB: tetramethylbenzidine, h: hour, min: minute

各々のリガンド測定のプロトコールは、以下のとおりである。

・EGF ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、50 µL Assay Diluent を血清サンプルに添加する、(2)スタンダードサンプルならびに血清サンプルを 200µl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し 37℃で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃棄し、wash buffer 250µl/回で 3 回洗浄する、(4)接合体(conjugate)溶液を各 well に 200µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、室温で 2 時間静置する、(5) 各 well 内の液体を廃棄し wash buffer 250µl/回で 3 回洗浄する、(6)基質溶液を各 well に 200µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 20 分間、遮光で静置する、(7)停止溶液 (Stop solution) を各 well に 50µl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定し、560nm の波長で補正する。

・TGF-α ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、(2)スタンダードサンプルならびに血清サンプルを 50µl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し 37℃で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃棄し、wash buffer 250µl/回で 4 回洗浄する、(4)接合体(conjugate)溶液を各 well に 200µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、室温で 2 時間静置する、(5) 各 well 内の液体を廃棄し wash buffer 250µl/回で 4 回洗浄する、(6)基質溶液を各 well に 200µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 30 分間、遮光で静置する、(7)停止溶液 (Stop solution) を各 well に 50µl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定し、

560nm の波長で補正する。

・EREG ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、(2)スタンダードサンプルならびに血清サンプルを 100µl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し 37℃で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃棄し、ビオチン抗体溶液を各 well に 200µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 1 時間静置する、(4)各 well 内の液体を廃棄し、wash buffer 250µl/回で 3 回洗浄する、(5)HRP-アビジン溶液を各 well に 100µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 1 時間静置する、(6) 各 well 内の液体を廃液し wash buffer 250µl/回で 5 回洗浄し、TMB 溶液を 90µl ずつ各 well 内に添加してから、37℃で 30 分間遮光して静置する、(7)停止溶液 (Stop solution) を各 well に 50µl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定し、560nm の波長で補正する。

・AREG ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、(2)スタンダードサンプルならびに血清サンプルを 200µl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し 37℃で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃棄し、Detection Regent A 液を各 well に 100µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 1 時間静置する、(4)各 well 内の液体を廃液し、wash buffer 250µl/回で 3 回洗浄する、(5) Detection Regent B 液を各 well に 100µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 30 分間静置する、(6) 各 well 内の液体を廃棄し wash buffer 200µl/回で 3 回洗浄し、TMB 溶液を 90µl ずつ各 well 内に添加してから、37℃で 30 分間遮光して静置する、(7)停止溶液 (Stop solution) を各 well に 50µl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定する。

・NRG ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、(2)スタンダードサンプルならびに血清サンプルを 100µl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し 37℃で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃液し、ビオチン抗体液を各 well に 100µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 1 時間静置する、(4)各 well 内の液体を廃棄し、wash buffer 250µl/回で 3 回洗浄する、(5) HRP-アビジン液を各 well に 100µl ずつ添加してプレートシールで密閉し、37℃で 1 時

間静置する、(6) 各 well 内の液体を廃棄し wash buffer 250μl/回で 5 回洗浄し、TMB 溶液を 90μl ずつ各 well 内に添加してから、37℃で 30 分間遮光して静置する、(7)停止溶液（Stop solution）を各 well に 50μl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定し、560nm の波長で補正する。

・HGF ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、(2)アッセイ溶液 50ml ならびにスタンダードサンプルならびに血清サンプルを 150μl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し室温で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃棄し、wash buffer 250μl/回で 4 回洗浄を行う、(4) HRP-Conjugate 液を各 well に 200μl ずつ滴下してプレートシールで密閉し、37℃で 2 時間静置する、(5) 各 well 内の液体を廃棄し wash buffer 250μl/回で 4 回洗浄し、TMB 溶液を 200μl ずつ各 well 内に添加してから、室温で 30 分間遮光して静置する、(6)停止溶液（Stop solution）を各 well に 50μl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定し、560nm の波長で補正する。

・IGF-1 ELISA protocol

(1)すべての試薬、スタンダードサンプル、血清検体を準備する、(2)アッセイ溶液 150ml ならびにスタンダードサンプルならびに血清サンプルを 50μl ずつ、プレートの各 well に添加する(1 検体あたり 2 well で測定)し、プレートシールにて密閉し 4℃で 2 時間静置する、(3)各 well 内の液体を廃棄し、wash buffer 250μl/回で 4 回洗浄を行う、(4) 冷たい Conjugate 液を各 well に 200μl ずつ滴下してプレートシールで密閉し、4℃で 1 時間静置する、(5) 各 well 内の液体を廃棄し wash buffer 250μl/回で 4 回洗浄し、TMB 溶液を 200μl ずつ各 well 内に添加してから、37℃で 30 分間遮光して静置する、(6)停止溶液（Stop solution）を各 well に 50μl ずつ添加して、30 分以内に 450nm の波長で吸光度を測定し、560nm の波長で補正する。

2-2-3. *KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA* 遺伝子変異解析

本研究の対象患者の FFPE 腫瘍組織切片を用いて、*Minor KRAS*（変異の hot spot である *KRAS* exon 2［codon 12, 13］以外の頻度の低い exon の変異）, *NRAS, BRAF, PIK3CA* の遺伝子変異解析をダイレクトシークエンスにて行った。HE 染色スライド上で腫瘍成分の多い領域を顕微鏡にて確認しマーキングを行った。未染色スライドでマーキングと一致する領

域を削りとり、QIAamp DNA FFPE Tissue Kit(QIAGEN KK, Tokyo, Japan)を用いて、DNA 抽出を行った。*KRAS* exon 2 (codons 12, 13)/exon 3、(codon 61)/exon 4 (codon 146)、*BRAF* exon 15 (codon 600)、*PIK3CA* exon 9 (codons 542, 545)/exon 20 (codon 1047)、*NRAS* exon 2 (codons 12, 13)/exon 3 (codon 61)を PCR (GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler)で増幅した。PCR 産物は、アガロースゲル電気泳動後に、臭化エチジウムにて染色を行い、サイズ確認を行った。その後、ABI 3130x/Genetic Analyzer を用いて、塩基配列解析を行い、遺伝子変異の有無を評価した。

2-2-4. 治療効果の評価ならびに統計学的評価

抗 EGFR 治療における治療効果の評価は、治療奏効、PFS、OS を用いた。治療奏効に関しては、RECIST(Response Evaluation Criteria in Solid Tumors) version 1.0 をもとに評価した。完全奏効 (CR) 、部分奏効 (PR) 、病勢安定 (SD) 、病勢進行 (PD) 、評価不能 (NE) のいずれかで効果判定を行った。奏効率 (Objective response rate:ORR) は全体評価のうちの CR＋PR の割合と定義して、病勢コントロール率 (DCR) は全体評価のうちの CR＋PR＋SD の割合と定義した。PFS の定義は抗 EGFR 抗体の治療開始日から病状増悪もしくは死亡日のいずれか早い日までの期間とした。OS の定義は抗 EGFR 抗体の治療開始日から、死亡日もしくは最終追跡日 (打ち切り) までとした。

患者背景項目における 2 群間の割合の違いを評価するため、2×2 の分割表における独立性の検定として、カイ 2 乗検定もしくは Fisher の正確確率検定を用いた。PFS ならびに OS の生存期間の推定ならびに生存曲線は Kaplan-Meier 法を用い、群間比較は log-rank 検定を用いた。すべての検定は両側検定で、有意差は $p<0.05$ と定義した。単変量解析ならびに多変量解析は、Cox 比例ハザードモデルを用いて行った。共変数として、年齢 (中央値) 、性別 (男/女) 、PS (0-1/2) 腫瘍の組織型 (分化型/未分化) 、原発部位 (結腸/直腸) 、Stage(切除不能/再発)、転移臓器数 (0-1/2 以上) を選んだ。群間比較のためのカットオフ値として、中央値と ROC (receiver operator characteristic)曲線解析で DCR が最も良好となる血清リガンド濃度の 2 つを設け、解析した。統計解析は SPSS ver.19 (IBM、Tokyo, Japan) を用いた。

2-3. 結果

2-3-1. 患者背景

2008 年 8 月から 2011 年 8 月までの 3 年 1 か月の期間で、症例選択基準を満たした *KRAS* exon2 野生型大腸癌は全体で 113 例であった。そのうち 10 例においては ELISA に用いる血清量が十分に保管されておらず、本解析の対象は 103 例となった。患者背景を表 4 に示した。

表 4. 患者背景

	Total
Number of patients	103
Median age (range)	62.0 (26-81)
Gender (%)	
Male	65 (68.0)
Female	38 (32.0)
ECOG PS (%)	
0-1	97 (94.2)
2	6 (5.8)
Primary site (%)	
Colon	52 (50.5)
Rectum	51 (49.5)
Histological type (%)	
well, mod	88 (85.4)
por, sig,	14 (13.6)
muc	1 (1.0)
Number of metastatic site (%)	
1	29 (28.2)
2≦	38 (71.6)
Treatment lines of anti-EGFR antibodies (%)	
2nd	9 (8.7)
3rd	67 (65.1)
4th≦	27 (26.2)
Regimen of treatment (%)	
CPT-11 based chemotherapy with anti-EGFR antibodies	82 (79.6)
Monotherapy of anti-EGFR antibodies	21 (20.4)
Anti-EGFR antibodies (%)	
Cetuximab	83 (80.6)
Patinimumab	20 (19.4)
Subsequent treatment (%)	
Yes	32 (31.1)
No	81 (68.9)

Abbreviations: HGF; Hepatocyte growth factor, EREG; Epiregulin, ECOG PS; Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, well; well differentiated adenocarcinoma, mod; moderately differentiated adenocarcinoma, por; poorly differentiated adenocarcinoma, sig; signet ring cell carcinoma, muc; mucinous adenocarcinoma, EGFR; Epidermal growth factor receptor

年齢の中央値は 62.0 歳であり、PS 0-1 が 94.2%と大部分を占めた。原発巣の割合は結腸と直腸でほぼ同等であった。腫瘍の組織型は、高分化・中分化型が 85.4%と大半を占めており、約 7 割の患者で遠隔転移臓器が 2 つ以上認められていた。抗 EGFR 抗体の治療内容に関しては、CPT-11 ベースの化学療法と抗 EGFR 抗体の併用療法：抗 EGFR 抗体単剤が 8：2、抗 EGFR 抗体の種類としては cetuximab：panitumumab は 8：2 の割合であった。3 次治療以降で抗 EGFR 抗体を用いた症例が約 9 割を占めていた。過去の前治療歴に関しては、全症例でフッ化ピリミジン系薬剤を使用しており、L-OHP が 99.0%、CPT-11 ベースが 91.3%の症例で用いられていた。後治療は約 3 割の患者が受けていた。

2-3-2. 血清リガンド濃度

103 症例の治療前ならびに病勢増悪時の血清リガンド濃度を測定した。治療開始前、病勢増悪時の血清濃度を表 5 にまとめた。

表 5. 治療開始前、腫瘍増悪時の血清リガンド濃度

	EGF	TGF-α	EREG	AREG	NRG	HGF	IGF-1
A total number of Serum samples	103	82	103	98	102	103	102
Pre-treatment concentration	(pg/ml)	(ng/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(pg/ml)	(ng/ml)
Median	128.8	5.4	1485.2	27.8	67.3	1337.1	78.8
Range	14.5 - 818.3	0.4 - 73.6	562.3-3731.5	3.0 - 636.1	12.4 - 332.8	703.7-3319.3	16.9 - 185.2
Serum concentration at PD							
Median	177.5	15.7	1790.6	209.7	78.7	1496.9	63
Range	19.4 – 1171.1	0.2 – 46.2	582.9-3947.9	9.2 – 3052	5.1 – 1218.7	786.2-3391.1	13.8 – 260.9
Change of serum levels after treatment							
Elevation (%)	69 (67.0)	68 (82.9)	60 (58.3)	93 (94.9)	56 (54.9)	59 (57.3)	36 (35.3)
No elevation (%)	33 (32.0)	12 (14.6)	43 (44.7)	5 (5.1)	46 (45.1)	43 (41.7)	66 (64.7)
Impossible to analyze (%)	1 (1.0)	2 (2.4)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (1.0)	0 (0.0)

Abbreviations: EGF= epidermal growth factor, EREG= epiregulin, AREG= amphiregulin, NRG=Neuregulin, HGF= Hepatocyte growth factor, IGF-1= Insulin-like growth factor 1, PD= Progression disease. Serum data of TGF-α (n=21), AREG (n=5) , NRG (n=1) and IGF-1 (n=1) were excluded because serum concentration of these ligands were exceeded from measurable range.

TGF-α (n=21)、AREG (n=5)、NRG (n=1) 、IGF-1(n=1)においては測定感度以下で実数値として検出できなかった症例があった。測定したリガンドのうち、治療前と比較して病勢増悪時に血清濃度が上昇していた割合（本研究においては、治療前の血清濃度と比較して 10%以上の上昇と定義）が多かったのは、EGFR にのみ結合するリガンドである AREG(94.9%)、TGF-α (82.9%) 、EGF(67.0%)であった。治療開始前と病勢増悪時における各リガンドの血清濃度を、各々の症例の値としてグラフ化し図 2 にまとめた。

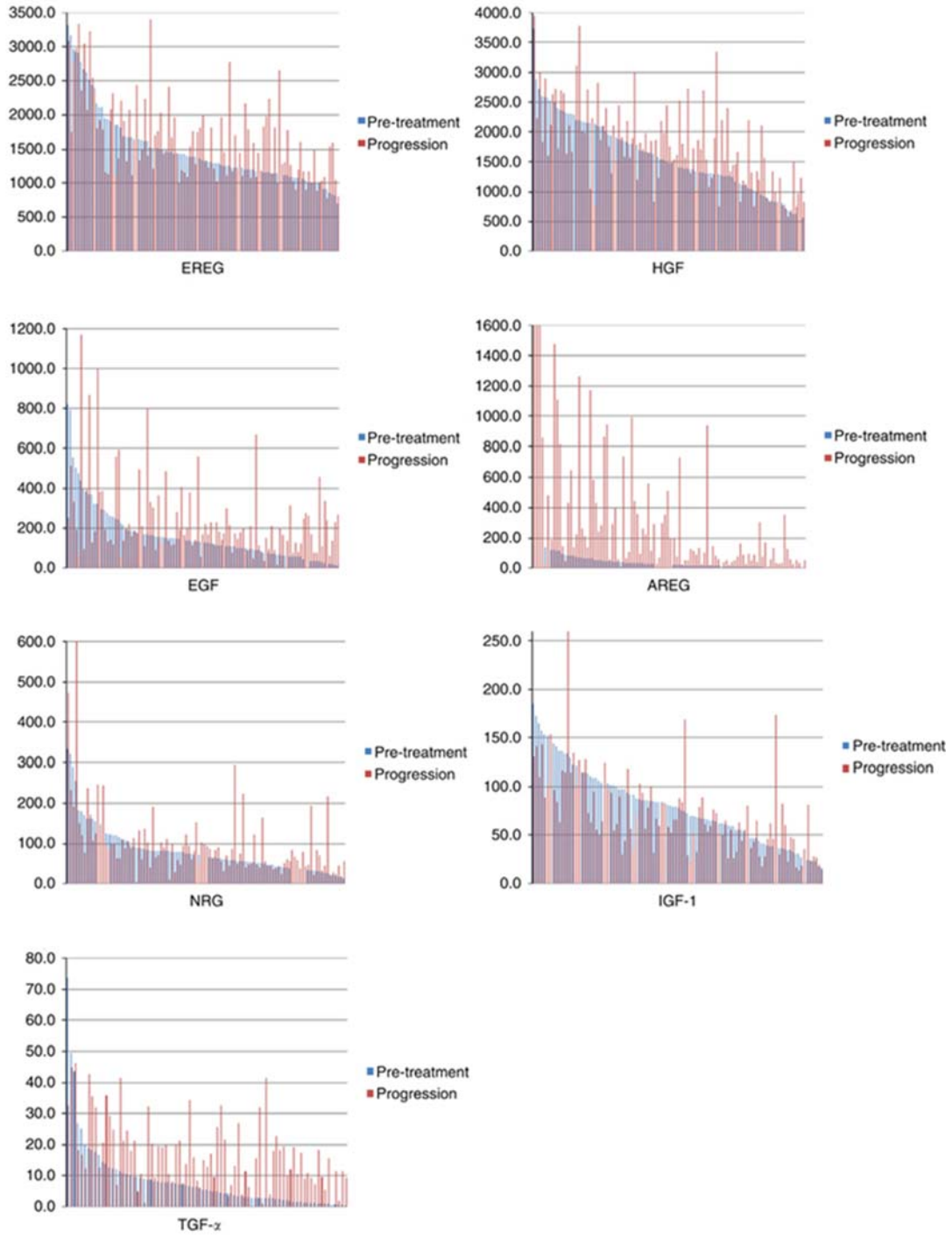

図 2. 治療開始前、病勢増悪時の血清リガンド濃度の個別データ

2-3-3. *KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* の遺伝子変異

リガンド解析をおこなった 103 症例のうち、18 症例で *KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* のいずれかの遺伝子変異が認められた。これらの遺伝子変異を有する症例では、全ての症例において抗 EGFR 抗体の奏効例は認められなかった(SD: N=6、PD: N=12)。遺伝子変異としては、*KRAS* codon 61 (N=2, 1.9%)、*KRAS* codon 146 (N=5, 4.9%)、*BRAF* V600E (N=2,

1.9%)、*PIK3CA* exon9（N=4, 3.9%)、*NRAS* codon 12/13（N=2, 1.9%)、*NRAS* codon 61（N=5, 4.9%)が認められた。2 症例においては２つの遺伝子変異の重複が認められた（*KRAS* codon 146/*PIK3CA* exon 9、*NRAS* codon 61/*PIK3CA* exon 9）。

2-3-4. *KRAS*野生型における予後解析（治療開始前の血清リガンド濃度）

測定した治療前の血清リガンドの中央値（表 5 参照）をカットオフ値として、血清濃度が高値と低値の２群にわけて、PFS ならびに OS を評価した。測定したリガンドのうち、両群（低値/高値）間で PFS および OS に有意差が認められたのは、HGF と EREG であった（図 3）。他のリガンドに関しては、PFS において有意差を認めるものはなかった（図 4）。

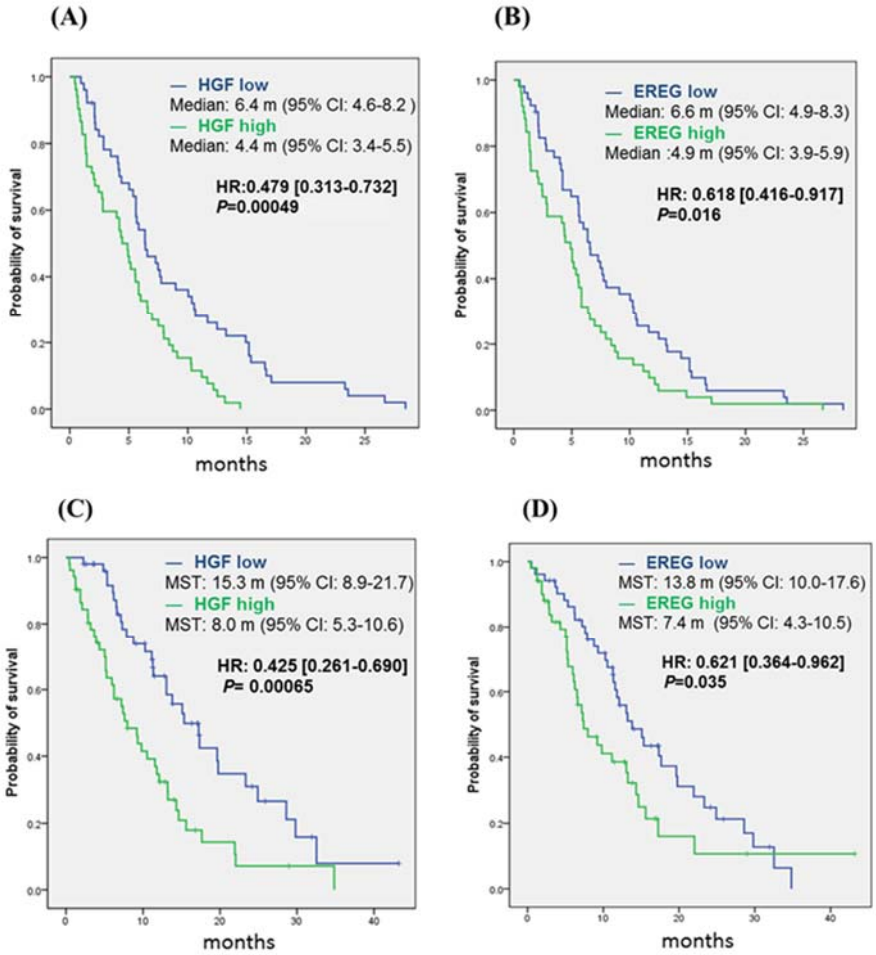

図 3. *KRAS*野生型患者の HGF, EREG による生存曲線(カットオフ値：中央値)
(A) HGF 値による PFS の生存曲線、 (B) EREG 値による PFS の生存曲線、(C) HGF による OS の生存曲線、(D) EREG 値による OS の生存曲線

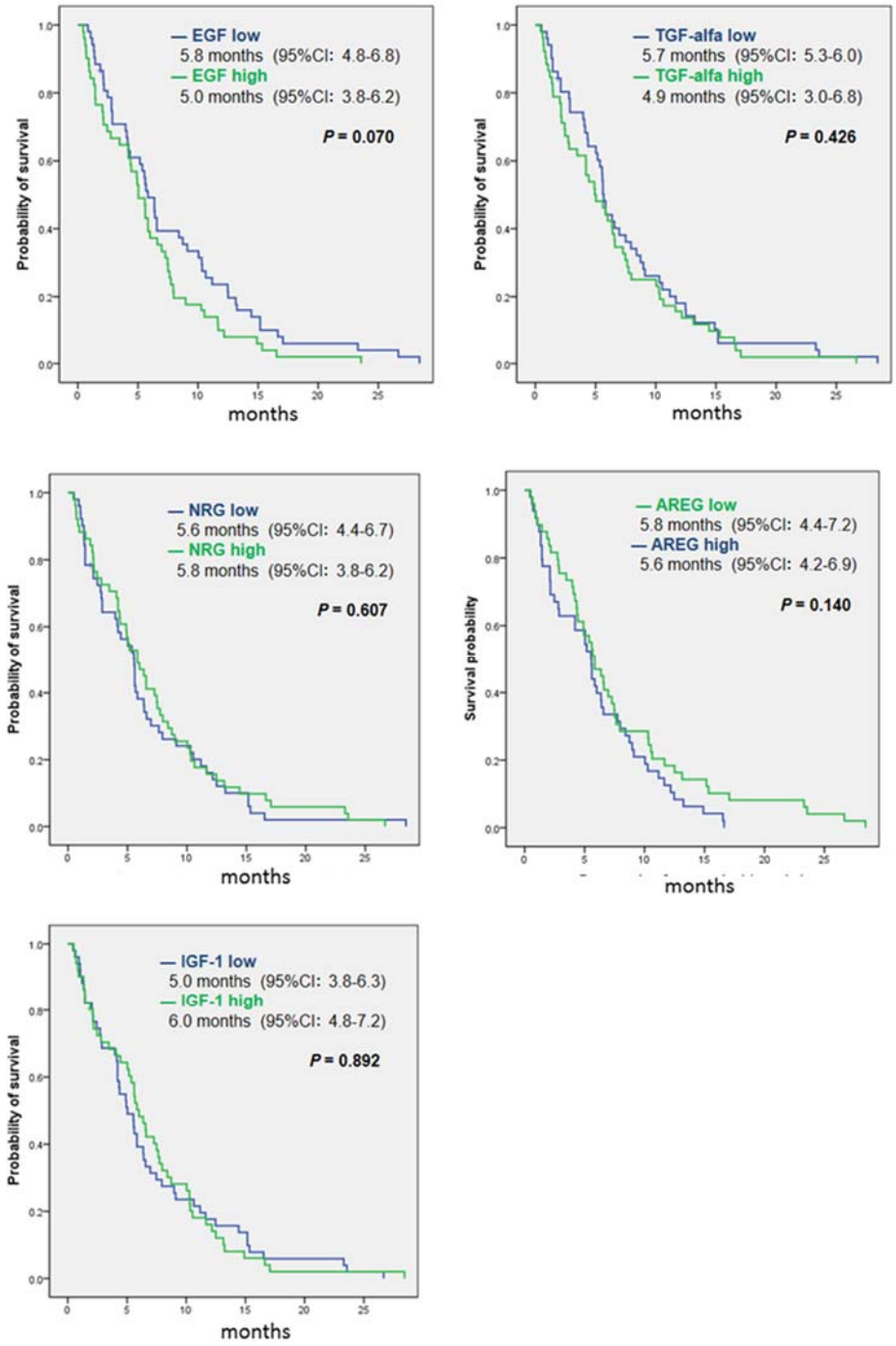

図 4. *KRAS* 野生型患者の EGF、TGF-α、AREG、NRG、IGF-1 による無増悪生存期間（PFS）の生存曲線

HGF 低値群は HGF 高値群と比較して、PFS の有意な延長が認められた(中央値: 6.4 カ月 vs 4.4 カ月, ハザード比:0.479, 95%信頼区間: 0.313-0.732, log-rank test p= 0.00049)。また、EREG 低値群は EREG 高値群と比較して、有意に PFS の延長を認めた(中央値: 6.6 カ月 vs 4.9 カ月, ハザード比:0.618, 95%信頼区間:0.416-0.917, log-rank

test p=0.016)。HGF 低値群は HGF 高値群と比較して、有意に生存期間が長かった(中央値: 15.3 カ月 vs 8.0 カ月, ハザード比: 0.425, 95%信頼区間:0.261-0.690, log-rank test p=0.00065)。EREG 低値群は EREG 高値群と比較して、有意に生存期間が長かった(中央値: 13.8 カ月 vs 7.4 カ月, ハザード比: 0.621、95%信頼区間: 0.364-0.962, log-rank test p=0.035) (図 3)。

血清リガンド濃度の中央値をカットオフ値とした場合に、HGF ならびに EREG の高値群・低値群における血清リガンド濃度ならびに *KRAS, NRAS, BRAF, PIK3CA* 遺伝子変異の頻度を以下にまとめた (表 6) 。HGF ならびに EREG においては前述の生存曲線の解析において、どちらも低値群の方が予後良好であったが、両群の遺伝子変異の頻度は、有意な差は認めないが低値群で多い傾向が認められた。予後不良な高値群に遺伝子変異が多く認められたわけではなかった。

表 6. 血清 HGF, EREG 値による *KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 遺伝子変異の頻度

	Pre-treatment HGF level		Pre-treatment EREG level	
	High	Low	High	Low
Number of patients	52	51	51	52
Pre-treatment serum concentration (pg/ml)				
Median	1672.5	1154.8	1662.5	1175
Range	1361.8 - 3319.3	703.7 - 1337.1	1497.2 – 3731.5	562.3-1485.2
Serum concentration at PD (%)				
Median	1990.2	1166	2188.4	1274.9
Range	1540.4 – 3391.1	786.2 – 1532.4	1725.8 – 3947.9	582.9 – 1710.5
Change of serum levels after treatment				
Elevation (%)	25 (48.1)	35 (68.6)	28 (54.9)	31 (59.6)
No elevation (%)	27 (51.2)	16 (31.4)	22 (43.1)	21 (40.4)
Impossible to analyze (%)	0	0	1 (2.0)	0
Genomic mutations: total (%)	7 (13.4)	13 (25.5)	9 (17.6)	11 (21.1)
KRAS codon 61 (Q61H; N=2)	0	2 (4.0)	1 (2.0)	1 (1.9)
KRAS codon 146 (A146T; N=4, A146V; N=1)	1 (1.9)	4 (8.0)	1 (2.0)	4 (7.7)
BRAF codon 600 (V600E; N=2)	1 (1.9)	1 (2.0)	1 (2.0)	1 (1.9)
PIK3CA exon 9 (E545K; N=3, E545A; N=1)	1 (1.9)	3 (6.0)	2 (4.0)	2 (3.8)
PIK3CA exon 20	0	0	0	0
NRAS codon 12/13 (G13D: N=2)	1 (1.9)	1 (2.0)	1 (2.0)	1 (2.0)
NRAS codon 61 (Q61L; N=3, Q61E; N=1, Q61K; N=1)	3 (5.7)	2 (4.0)	3 (6.0)	2 (3.8)

Abbreviations: HGF; Hepatocyte growth factor, EREG; Epiregulin, PD; progression disease

ROC 曲線解析における至適カットオフ値は、EREG:1412.65 pg/ml(感度:0.719、 特異度:0.549)、HGF : 1393.55 pg/ml(感度:0.620、特異度:0.656)であった。HGF、EREG を至適カットオフ値として 2 群に分けてそれぞれ生存期間の比較を行ったところ、同様に HGF と EREG の両方で有意差が認められた。中央値のカットオフ値の場合と比較して、低値群と高値群の生存期間の差は大きくなった (図 5) 。他のリガンドも同様に至適カッ

トオフ値にて PFS の生存解析を行ったが有意差は認められなかった（図 6）。

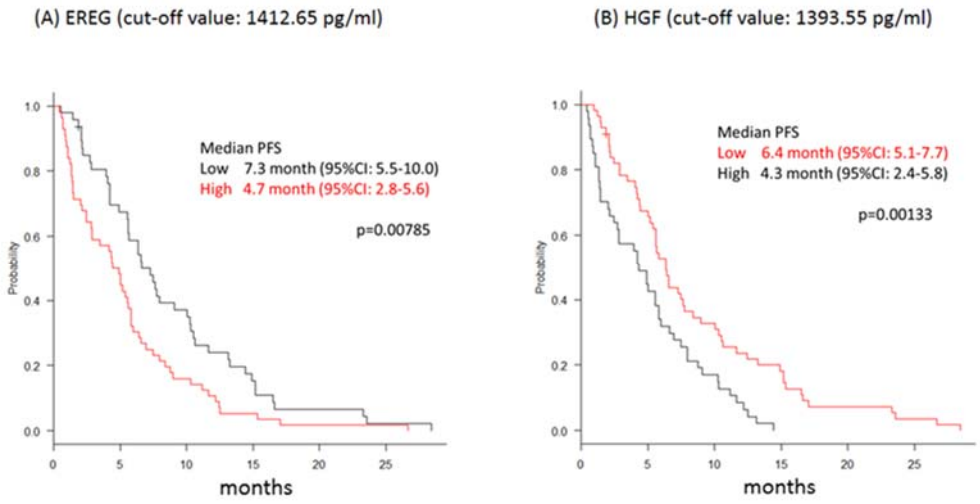

図 5. ROC 曲線解析の至適カットオフ値による生存曲線
(A) EREG 値における PFS の生存曲線、(B) HGF 値における PFS の生存曲線

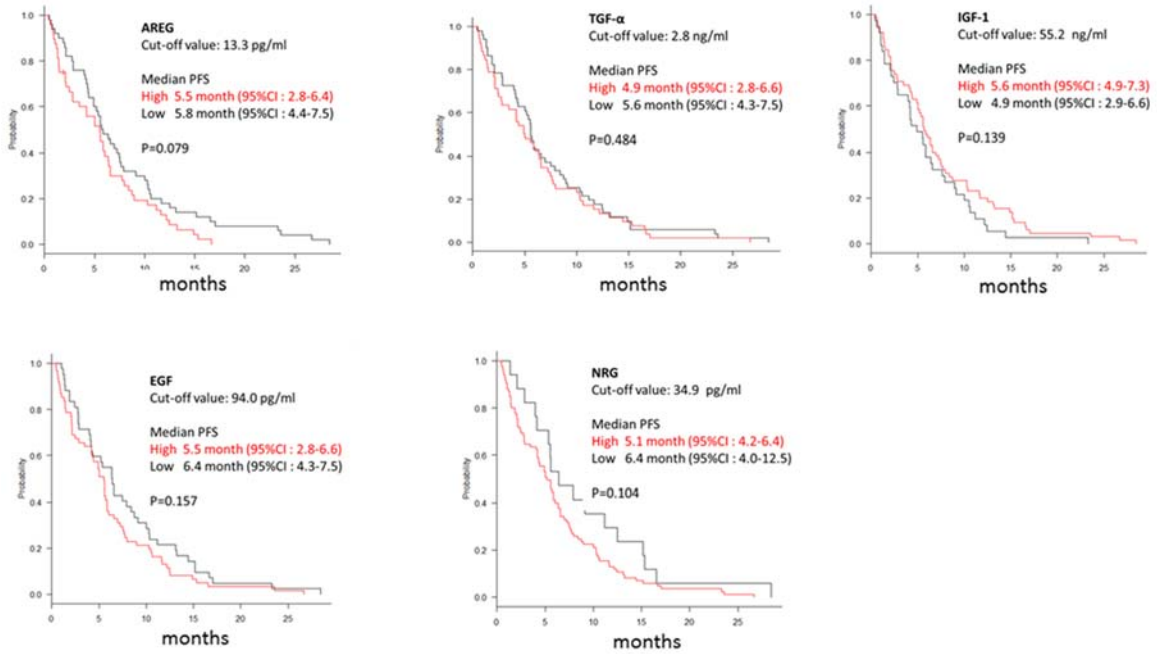

図 6. EGF、TGF-α、AREG、NRG、IGF-1 の至適カットオフ値による無増悪生存期間（PFS）の生存曲線

多変量解析（リガンド血清濃度のカットオフ値：中央値）では、PFS において血清 HGF 濃度（ハザード比:0.562, 95%信頼区間:0.591-0.878, p= 0.001）と血清 EREG 濃度（ハザード比:0.646, 95%信頼区間:0.426-0.976,p= 0.039)は独立した予後因子であった（表 7A）。OS においては、HGF が独立した予後因子であった(ハザード比:0.447, 95%信頼区間: 0.267-0.747, p=0.002)。EREG は、ハザード比：0.605、95%信頼区間：0.365-1.001、p=0.050 であった（表 7B）。

表 7. *KRAS* 野生型患者における予後解析

(A) PFS における単変量・多変量解析

		PFS					
		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variables		HR	95% CI	*P*-value	HR	95% CI	*P*-value
ECOG PS	0-1	1			1		
	2	2.849	1.147 — 7.079	0.024	2.069	0.802 — 5.333	0.109
Gender	male	1					
	female	0.861	0.575 — 1.289	0.468			
Age	≦70	1					
	＞70	0.906	0.515 — 1.595	0.733			
Primary lesion	colon	1					
	Rectum	1.080	0.729 — 1.598	0.702			
Stage	stage IV	1					
	recurrence	0.933	0.629 — 1.383	0.728			
Histological type	well/mod	1					
	por/sig/muc	1.473	0.845 — 2.566	0.172			
Metastatic site	1	1					
	2 or more	1.041	0.676 — 1.603	0.856			
Serum HGF	high	1			1		
	Low	0.479	0.313 — 0.732	< 0.001	0.562	0.359 — 0.878	0.011
Serum EREG	high	1			1		
	Low	0.618	0.416 — 0.917	0.017	0.646	0.426 — 0.979	0.039

Abbreviations: HR; Hazard ratio, CI: confidential interval, ECOG PS; Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, PFS; Progression-free survival, well; well differentiated adenocarcinoma, mod; moderately differentiated adenocarcinoma, por; poorly differentiated adenocarcinoma, sig; signet ring cell carcinoma, muc; mucinous adenocarcinoma. HGF; Hepatocyte growth factor, EREG; Epiregulin

(B) OS における単変量・多変量解析

		OS					
		Univariate analysis			Multivariate analysis		
Variables		HR	95% CI	*P*-value	HR	95% CI	*P*-value
ECOG PS	0-1	1			1		
	2	6.637	2.611 — 16.870	< 0.001	5.476	2.029 — 14.776	< 0.001
Gender	male	1					
	Female	1.377	0.833 — 2.275	0.212			
Age	≦70	1					
	＞70	1.107	0.563 — 2.175	0.769			
Primary lesion	colon	1					
	Rectum	1.138	0.706 — 1.834	0.596			
Histological type	well/mod	1					
	por/sig/muc	1.804	0.929 — 3.503	0.081			
Stage	stage IV	1	0.522 — 1.360	0.484			
	recurrence	0.843					
Metastatic site	1	1					
	2 or more	1.148	0.674 — 1.955	0.612			
Serum HGF	high	1			1		
	Low	0.425	0.261 — 0.690	< 0.001	0.447	0.267 — 0.747	0.002
Serum EREG	high	1			1		
	Low	0.621	0.416 — 0.917	0.035	0.605	0.365 — 1.001	0.050

Abbreviations: HR; Hazard ratio, CI: confidential interval, ECOG PS; Eastern Cooperative Oncology Group Performance Status, OS; Overall survival, CI; confidence interval, well; well differentiated adenocarcinoma, mod; moderately differentiated adenocarcinoma, por; poorly differentiated adenocarcinoma, sig; signet ring cell carcinoma, muc; mucinous adenocarcinoma. HGF; Hepatocyte growth factor, EREG; Epiregulin

2-3-5. All wild-type (*KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA* 野生型)の予後解析

治療開始前のリガンドの濃度における予後解析において、HGF、EREG が *KRAS* exon 2 野生型患者の抗 EGFR 抗体の予後に関与していることが分かった。Minor *KRAS*、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* の遺伝子変異が 18 症例で認められており、これらの症例では抗 EGFR 抗体の奏効は認めなかったことから、これらの遺伝子変異が解析の結果に影響を及ぼした可能性が示唆された。これらの遺伝子変異を持たない症例（All wild-type）で HGF、EREG の予後解析をおこなった（図 7）。

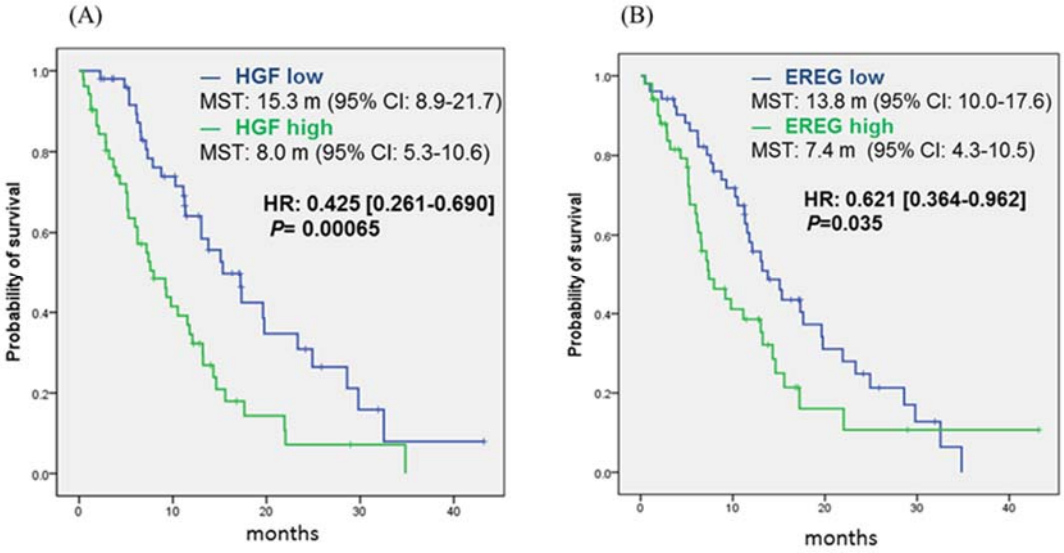

図 7. All wild-type の HGF,EREG 値における生存曲線(カットオフ値：中央値)
(A) HGF 値における OS の生存曲線、 (B) EREG 値における OS の生存曲線

そこで、これらの遺伝子変異を有する症例と、これらの遺伝子変異のうち一つでも解析不能であった症例は除外として、All wild-type 合計 57 症例で PFS における生存解析を追加した。*KRAS* exon2 野生型の解析と比較して症例数が減ったものの、PFS では HGF 低値群は高値群と比較して生存期間が有意に延長していた(10.0 カ月 vs 5.5 カ月, ハザード比:0.362, 95%信頼区間:0.199-0.659,log-rank p=0.00053)。また、EREG 低値群は高値群と比較して生存期間が有意に延長していた(8.0 カ月 vs 5.0 カ月, ハザード比:0.584, 95%信頼区間:0.337-0.991,log-rank p=0.047)。以上から、All wild-type においても、*KRAS* exon2 野生型と同様な傾向があることが示唆された。

2-5-6. 血清リガンド濃度と抗 EGFR 抗体の奏効との関連

KRAS exon2 野生型ならびに All wild-type における抗 EGFR 抗体治療における ORR は、それぞれ 33.0%、42.1%であり、DCR は 68.9%、80.7%であった（表 8）。

表 8. 血清 EREG ならびに HGF 値における奏効ならびに病勢コントロール割合

(A) *KRAS* exon 2 wild-type

		Pre-treatment HGF level			Pre-treatment EREG level		
Best response	Total (%)	High	Low	P-value	High	Low	P-value
PR	34 (33.0)	16 (30.8)	18 (35.3)		12 (23.5)	21 (40.4)	
SD	37 (35.9)	15 (28.8)	22 (43.1)		18 (35.3)	19 (36.5)	
PR	32 (31.1)	21 (40.4)	11 (21.6)		21 (41.2)	12 (23.1)	
Total	103 (100)	52 (100)	51 (100)		51 (100)	52 (100)	
ORR [95% CI]	33.0 % [24.1- 43.0]	30.8 % [18.7- 45.1]	35.3 % [22.4- 49.9]	0.678	23.5 % [12.8- 37.5]	40.4 % [27.0- 54.9]	0.091
DCR [95%CI]	68.9 % [59.1- 77.7]	59.6 % [45.1- 73.1]	78.4 % [64.7- 88.7]	0.055	58.8 % [44.2- 72.4]	76.9 % [63.2- 87.5]	0.059

Abbreviations: HGF; hepatocyte growth factor, EREG; epireglin, PR; partial response, SD; stable disease, PD; progressive disease, CI; confidence interval

(B) All wild-type

		Pre-treatment HGF level			Pre-treatment EREG level		
Best response	Total (%)	High	Low	P-value	High	Low	P-value
PR	24 (42.1)	9 (31.0)	15 (53.6)		7 (25.9)	17 (56.6)	
SD	22 (38.6)	12 (41.4)	10 (35.7)		11 (40.7)	11 (36.7)	
PR	11 (19.3)	8 (27.6)	3 (10.7)		9 (33.3)	2 (6.7)	
Total	57 (100)	29 (100)	28 (100)		27 (100)	30 (100)	
ORR [95% CI]	42.1 % [29.1- 55.9]	31.0 % [15.3- 50.8]	53.6 % [33.9- 72.5]	0.110	25.9 % [11.1- 46.3]	56.6 % [37.4- 74.5]	0.031
DCR [95%CI]	80.7 % [68.1- 90.9]	72.4 % [52.8- 87.3]	78.4 % [71.8- 97.7]	0.179	66.6 % [46.0- 83.5]	93.3 % [77.9- 99.2]	0.017

Abbreviations: HGF; hepatocyte growth factor, EREG; epireglin, PR; partial response, SD; stable disease, PD; progressive disease, CI; confidence interval

血清濃度の中央値をカットオフ値とした場合に、HGF ならびに EREG における治療前血清濃度の高値群、低値群での ORR、DCR を比較した。*KRAS* exon 2 野生型の場合、EREG 高値群と低値群で ORR はそれぞれ 23.5% vs 40.4%であり、低値群で良好な傾向が認められた(p=0.091)。DCR においては、HGF 高値群は 59.6%、HGF 低値群は 78.4%であり、HGF 低値群で良好な傾向が認められた(p=0.055)。また、EREG 高値群は 58.8%、EREG 低値群では 76.9%であり、EREG 低値群でも良好な傾向が認められた(p=0.059) (表 6A)。

All wild-type においては、HGF の血中濃度において ORR ならびに DCR で有意な差は認められなかった。EREG においては、高値群と低値群における ORR は 25.9% vs 56.6%で、有意に低値群で奏効率が高かった(p=0.031)。また、DCR においては高値群が 66.6%、低値群が 93.3%であり、有意に低値群の DCR が高かった(p=0.017) (表 8B)。

2-3-7. 治療前から病勢増悪時の血清濃度変化における予後解析

治療前の血清濃度の高値群（High）、低値群（Low）の比較（カットオフ値：血中濃度の中央値）に加えて、治療開始前から病勢増悪までにリガンドの血清濃度が上昇した群(elevation)と上昇しなかった群(no elevation)に分けて、全てで 4 グループに分けた（治療前：High/Low、治療増悪時：elevation/no elevation）。この 4 グループの生存解析を PFS ならびに OS で行った。HGF と EREG のどちらも、High/elevation 群が他のグループよりも予後が悪く、Low/no elevation 群が最も予後が良好であった（図 8）。

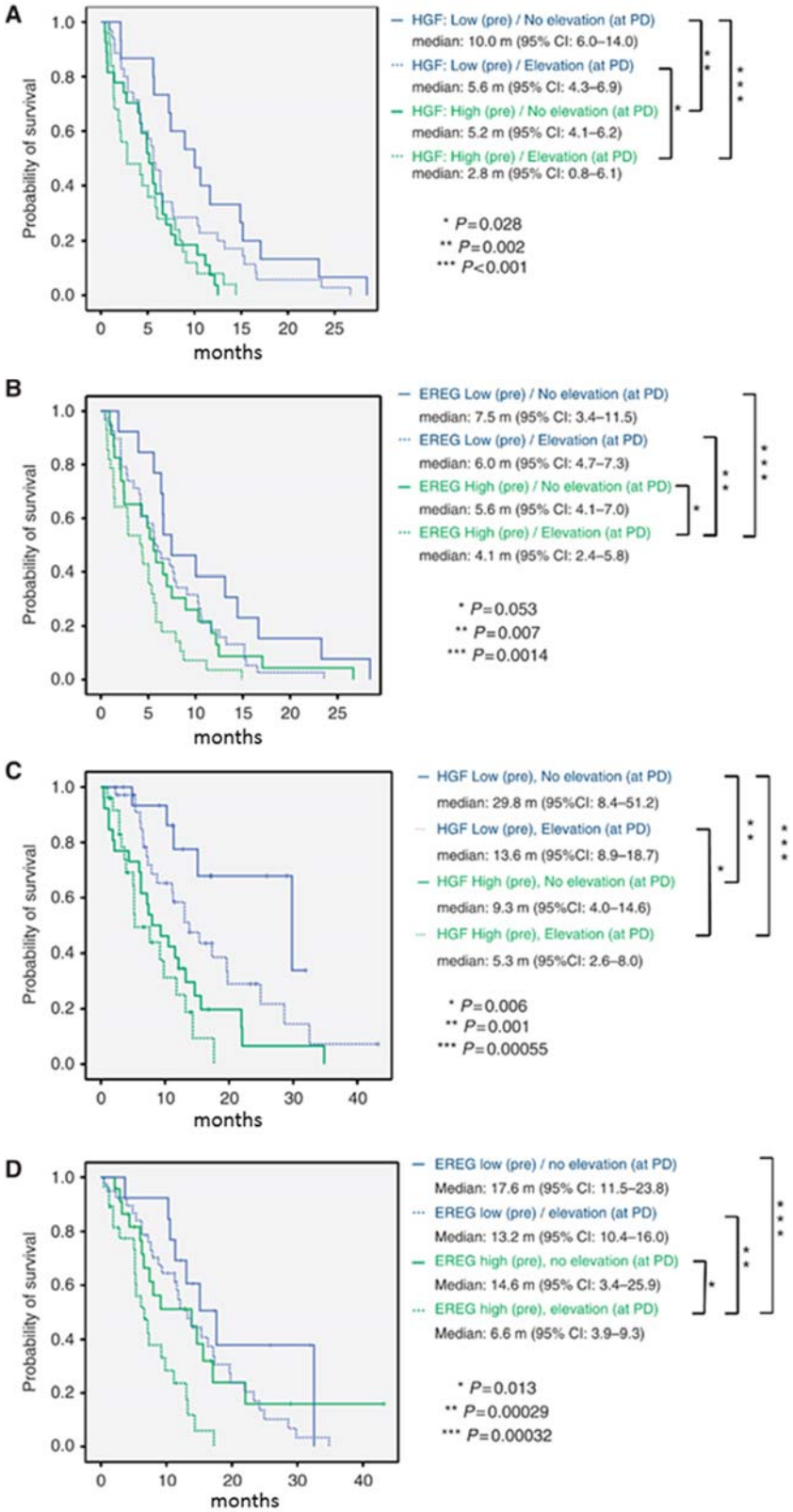

図 8. 治療前ならびに治療増悪時までのリガンド値変化における生存曲線
(A)HGF 値における PFS の生存曲線、(B)EREG 値における PFS の生存曲線、(C)HGF 値における PFS の生存曲線、(D)EREG 値における OS の生存曲線

2-4. 考察

本研究において、*KRAS* exon 2 野生型ならびに All wild-type の切除不能・進行再発大腸癌に対する抗 EGFR 抗体治療におけるバイオマーカー探索を目的とした血清リガンド解析を行った。治療開始前と病状進行時の血清を用いたものは過去に報告がなく、血清リガンド濃度が抗 EGFR 抗体の効果予測ならびに治療抵抗性に関与しているかを探索した初めての報告となる。血清リガンド濃度を ELISA にて測定し、症例によって血清濃度にバラツキがあることが分かった。また、本研究で解析したリガンドのうち、治療開始前の HGF ならびに EREG の血清濃度が治療奏効(ORR、DCR)ならびに予後(PFS、OS)に影響を与える可能性が示唆された。どちらの血清リガンドにおいても、治療開始前の血中濃度が低値である方が、抗 EGFR 抗体治療にて良好な予後が得られ、逆に高値である場合は予後不良であった。ORR においては EREG 低値で良好な傾向が認められ、DCR においては HGF ならびに EREG が低値で良好な傾向が認められた。治療開始前から病勢増悪時において血清濃度が上昇した症例は、上昇しない症例と比較して、治療前の血清濃度に関わらず予後不良である傾向が認められた。

本研究では、*KRAS* 以外にも、*NRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 遺伝子変異を解析した。DeRoock らは、欧州にて大腸癌の組織検体を用いた多施設共同の大規模な遺伝子解析を行い、上記の遺伝子変異の頻度は少ないものの(*NRAS*:2.6%、*BRAF*:4.7%、*PIK3CA*:14.5%)、抗 EGFR 抗体の無効因子であることを報告している [23]。本研究においても、*KRAS* exon 2 野生型であった 103 症例のうち 18 症例において、これらの遺伝子変異が認められたが、全ての症例で奏効は認められなかった。これらの EGFR 下流シグナル分子の遺伝子変異は、リガンド蛋白や EGFR の発現と関係なく、恒常的にがん増殖シグナルを活性化させることが示唆される。本研究においても、生存期間ならびに奏効の群間比較を行う場合に、これらの遺伝子変異の頻度の群間での分布の違いは結果に大きな影響を与えると考えられた。そこで、我々は血清濃度の低値群と高値群の間で、これらの抗 EGFR 抗体の無効因子である遺伝子変異の頻度に差がないか検討した。実際には HGF ならびに EREG では、血清リガンド濃度の低値群と比較して、血清リガンド濃度の高値群で頻度は少なく、逆に予後が良好な血清リガンド濃度の低値群で遺伝子変異が多く認められた。血清 HGF、EREG のバイオマーカーの意義を確認するため、これら遺伝子変異を有する症例を除外して、症例数は限定されるが All wild-type における生存解析を行った。結果としては、HGF ならびに EREG ともに、血清濃度の高値群、低値群で生存期間の差は、*KRAS* exon 2 野生型を対象とした解析結果よりも大きくなった。以上から、下流シグナル遺伝子変異のない症例の方が、血清リガンド HGF ならびに EREG 濃度は抗 EGFR 抗体のバイオマーカ

ーとしての意義がより強くなる可能性が示唆された。

本研究では、治療前の血清濃度における予後解析に加え、病勢増悪時の血清を評価することにより、抗 EGFR 抗体の抵抗性に関しても検討をおこなった。増悪時においては、AREG、EGF、TGF-α などのリガンドは、治療前よりも増悪時に血中濃度が上昇している症例が多いことが分かったが、これらのリガンドの治療前の血中濃度が高値ならびに病勢増悪時に血中濃度が上昇している症例では、予後の悪い傾向は認めなかった。このことから、これらリガンドの抗 EGFR 抗体の抵抗性獲得への関与は少ないものと考えられた。一方で、HGF や EREG の場合には、治療前の血清濃度高値ならびに病勢増悪時に血清濃度が上昇する症例は、予後が悪い傾向にあった。以上からこれらのリガンドは予後因子のみでなく、抗 EGFR 抗体の治療抵抗性にも関与している可能性が示唆された。

過去の文献によると、EGF 経路を標的とした分子標的治療薬による治療において、HGF/MET 経路が治療抵抗性と重要な関連があることが示唆されている。Wheeler らは、セツキシマブ耐性細胞では、ErbB2、ErbB3、c-MET の強い活性化が認められ、EGFR の upregulation が更に ErbB2 と ErbB3 の 2 量体形成を促進していることを報告した[52]。Yano らは、EGFR 変異の肺癌において、HGF が EGFR-TKI(tyrosine kinase inhibitor)の抵抗性に関与していることを報告し[53]、Engelman らは非小細胞性肺癌 (NSCLC) における gefitinib(EGFR-TKI)の抵抗性は、MET 増幅による ErbB3 依存性の PIK3 経路の活性化によって引き起こされることを報告した[54]。また、Xu らは、NSCLC において、EGFR が、HIF-1α (hypoxia inducible factor 1α) を介して、MET レベルや癌浸潤を調整している可能性を示唆している[55]。大腸癌においても、MET 活性化が抗 EGFR 抗体の抵抗性に関与していることが報告されている[43]。これらの過去の報告から、EGFR を含めた ErbB ファミリーと HGF/MET 経路には cross talk が存在していることが考えられ、HGF/MET 経路に強く依存している症例に関しては、抗 EGFR 抗体の抵抗性に関与している可能性が示唆される。

HGF/MET 経路を標的とした分子標的治療薬の臨床試験においては、固形癌を対象として TAK701、AMG102 (rilotumumab：抗 HGF 抗体)、SCH900105 (AV299)などの第 1 相試験、第 2 相試験が行われ、*KRAS* 野生型の大腸癌においては、抗 EGFR 抗体である panitumumab 単剤と panitumumab＋rilotumumab 併用療法のランダム化第 2 相臨床試験が報告されている[56]。panitumumab と rilotumumab 併用療法は、panitumumab 単剤と比較して、ORR(31% vs 21%)では良好な成績であった。本試験においては、免疫染色による MET 発現を評価したバイオマーカー研究も行われたが、有効性と MET 発現強度に相関関係は認められなかった。しかし、大腸癌は不均一な腫瘍組織を特徴としており、免疫染色で MET 発現が十

分に評価できたかは疑問が残り、今後の開発を進めていく上では HGF/MET 経路に真に依存している症例を絞り込むための新規のバイオマーカーの開発が必要と考えられる。

EREG は EGFR と ErbB4 に結合するリガンドとして知られているが、基礎研究においては、EGF よりも結合力は弱いとされる一方で、EGFR、ErbB2、ErbB3、ErbB4 のリン酸化を誘導することが報告されている[57]。臨床においては予後因子として、口腔扁平上皮癌、乳癌、大腸癌、悪性線維性組織球腫などで報告がある[58-60]。大腸癌においては、Khambata-Ford らが、治療開始前の腫瘍組織における EREG ならびに AREG の mRNA 高値である症例は、抗 EGFR 抗体である cetuximab の有効性が高いことを報告した[61]。これは EREG、AREG が EGFR に依存していることを示している。この報告においては、EREG の組織内の mRNA 発現と血中タンパクの発現の相関を検討しているが、明らかな相関関係は認めなかったとされている。本研究においては血清タンパクの発現を評価したが、腫瘍組織とは逆で EREG 高値群では治療効果が乏しく、予後が悪い傾向が認められている。我々は別の研究で、抗 EGFR 抗体治療患者の腫瘍組織 mRNA 発現（非腫瘍組織との比較）を評価し、腫瘍組織で EREG、AREG の mRNA 発現が高い場合に OS が良好であることを報告した(EREG:HR 0.326, p=0.011, AREG:HR 0.277, p=0.019)[62]。以上から、腫瘍組織（mRNA 発現）と血清（タンパク濃度）では EREG 発現に相関は認めず、検体の種類によってバイオマーカーの意義が異なる可能性が示唆された。この違いの理由としては、腫瘍細胞内で EREG 遺伝子の転写後に様々な修飾(miRNA、ユビキチン化、ADAM ファミリーなど)が、リガンドの蛋白発現と細胞外分泌に影響を与えている可能性が考えられる[63-65]。また、血清リガンド濃度は腫瘍組織だけではなく、正常組織のリガンド発現の影響も受けている可能性が考えられる。現時点では、腫瘍組織検体か血清検体のどちらで評価する方がバイオマーカーとして意義があるかについて報告はなく、今後の課題として挙げられる。

抗 EGFR 抗体は、複数のリガンドに対して、競合して EGFR に結合し、EGFR 下流シグナルを抑制することで抗腫瘍効果を発揮する。しかし、必ずしも全てのリガンドが抗 EGFR 抗体の治療効果に影響を与えるわけではないことが本研究の結果から示唆された。その背景には、各リガンドの EGFR を含めた ErbB ファミリー受容体への結合力や、結合後の下流シグナルの活性化の程度の違いが考えられる[66]。実際に抗 EGFR 抗体治療中に、各リガンドがどれほど下流シグナルに影響を与えているか検討した過去の報告はないが、EREG 発現が他のリガンドと異なるメカニズムで抗 EGFR 抗体の効果に関与していることを明らかにすることができれば、将来的な治療標的として有望である。小林らは、大腸癌細胞において LRG5(大腸などの正常腸管細胞の幹細胞マーカーのひとつとして示唆されている[67])の発現がある細胞が、化学療法後に耐性をもった LRG5 陰性細胞に変換するこ

とを発見し、この現象を有する細胞には EREG 発現が認められていることから、がん幹細胞様の現象を有する EREG 発現の大腸癌細胞は新たな標的となる可能性を示唆した[68]。また、乳癌細胞においては、肺転移に関連する 4 つの遺伝子として EREG、COX-2、MMP-1、MMP-2 が大きく関与しており、これら全ての遺伝子を抑制するとがん増殖を抑えることができたという報告がある[69]。

本研究では、EREG、HGF 以外のリガンドに関しては、リガンド血清濃度と抗 EGFR 抗体治療の予後との間に強い関連性が認められなかったが、前臨床研究レベルの過去の報告では、EGFR 阻害薬の抵抗に関与することが報告されている。これは、血清リガンド濃度と腫瘍組織の発現が必ずしも一致していない可能性があること、本研究が探索研究であることによる limitation が影響した可能性などが考えられる。TGF-αは EGFR の特異的なリガンドであるが、TGF-αが過剰発現すると、EGFR と MET の相互作用を引き起こし、MET のリン酸化と MET 経路の活性化することが cetuximab を用いた大腸癌細胞の基礎研究にて報告されている [48]。また、EGFR 特異的なリガンドである TGF-αと AREG に関して、EGFR 阻害により分泌が誘導されることは大腸癌細胞レベルで確認されており、周囲の抗 EGFR 抗体に感受性のある細胞の EGFR/ERK 経路を活性化して EGFR 阻害の抵抗性に関与することが報告されている [49]。また、EGFR 阻害効果を有するものの中でも、チロシンキナーゼ阻害剤よりも抗 EGFR 抗体による EGFR 阻害下において、血液中の TGF-α増加が確認されている [70]。NRG (heregulin) は、HER3、HER4 に特異的なリガンドであり、過去の報告において抗 EGFR 抗体治療の抵抗性に関与することが示唆されている。川上らは、cetuximab の感受性があり NRG が発現した大腸癌細胞を用いて、抗 EGFR 抗体を投与すると EGFR 発現ならびに ERK のリン酸化は抑制されたが、HER2/HER3 発現ならびに下流シグナルである AKT のリン酸化の抑制が得られなかったことを確認し、更に抗 EGFR 抗体に抗 HER3 抗体を追加投与すると HER2/HER3 発現ならびに ERK、AKT のリン酸化の抑制が認められることを報告した [50]。これにより、抗 EGFR 抗体投与下に NRG による HER2/HER3 から下流シグナルの PIK3/AKT 経路の活性化が考えられ、これが抵抗性のひとつになっている可能性が示唆される。IGF-1 は過去の報告では、IGF-1/IGF-1R から下流シグナルの AKT 経路にかけての活性化が EGFR 阻害の抵抗性に関与することが示唆されている[42]。また、腫瘍組織における免疫染色による IGF-1 の発現が、大腸癌の抗 EGFR 抗体の予後不良(OS)に関与しているという報告がある(HR=0.47, $p<0.0001$) [51]。

本研究で考えられる limitation として以下のようなことが挙げられる。本研究はバイオバンク検体を利用した探索的な研究であり、バイオバンクに同意のない症例、保存検体量が不十分であった症例を除外していることから、選択的バイアスが存在している可

能性がある。血清リガンド測定に関しては、血清濃度そのものが、腫瘍組織におけるリガンドの発現を表しているとは限らず、腫瘍病変の部位や腫瘍量などによる影響や正常組織からのリガンド分泌などの影響を受けている可能性を考慮する必要がある。また、保存されている血清検体量が限られているため、過去の文献から抗 EGFR 抗体に影響を与える可能性のあるものを選択したため、他の測定しなかった関連リガンドに関しては評価できておらず、その臨床意義は不明である。HB-EGF、betacelulin、epigen に関しては、前臨床研究において、大腸癌細胞の EGFR 阻害の抵抗性に関する機序などを検討した報告はないが、EREG 同様に EGFR と ErbB4 に結合するリガンドであることから、ErbB4 を介した下流シグナル活性化が耐性に寄与している可能性がある。本研究は 103 症例と少数例の探索的研究であることから、今後はさらに症例を増やし、前向き臨床試験で血液検体を収集し、本研究の結果を検証する必要がある。

今回の検討は、抗 EGFR 抗体の治療抵抗性のバイオマーカーとして血清 HGF、EREG の値が使用可能であることを示唆しているが、治療が全く奏功しないことを示す物では無い。治療無効を証明するためには、血清 HGF、EREG のそれぞれの高値・低値群において、抗 EGFR 抗体治療群と無治療群（緩和治療群：BSC 群）を比較する必要があるが、BSC 群を統計処理できるだけの数揃えることはできない。そのため、今回の検討は、治療抵抗性のバイオマーカーであり、治療無効性のバイオマーカーでは無いことを示すに留まることを留意する必要がある。さらに今回使用した対象において、血清 HGF、EREG が、他治療での治療抵抗性のバイオマーカーとなっているかは検証していない。他治療においてはバイオマーカーとならず、抗 EGFR 抗体治療においてのみ治療抵抗性のバイオマーカーであれば特異的指標と考えることもできるが、他治療においても治療抵抗性のバイオマーカーとなるのであれば、疾患(大腸癌)そのものが治療抵抗性を持つことを示している可能性、すなわち予後因子として捉えることが可能と考える。

第３章 総括

本研究では、バイオバンクの血清検体を用いて、*KRAS exon 2* 野生型の大腸癌患者の血清リガンド濃度と抗 EGFR 抗体の有効性ならびに予後との関連性を評価した。治療前の血清 HGF ならびに EREG 低値の症例は、抗 EGFR 抗体治療における予後良好な因子であった。逆に、治療前の HGF、EREG が高値の症例や、治療後に上昇する症例に関しては、予後が悪い傾向が認められた。*KRAS/NRAS/BRAF/PIK3CA* の下流シグナル遺伝子変異がない大腸癌患者においては、血清リガンドの予後因子としてのバイオマーカーとしての意義が示唆

された。今後、HGF、EREG に関しては、抗 EGFR 抗体治療における治療効果、予後、ならびに治療抵抗性に関連した治療モニタリング マーカーとしての有用性を前向き研究により検証を行っていく。また、このリガンドが治療抵抗に強く関与することが証明することができれば、新たな治療標的薬として抗 EGFR 抗体との併用療法の可能性を探っていく。

第４章 引用文献

1. Jemal A, et al. *Global cancer statistics. CA Cancer J Clin*, 2011; **61**: 69-90.
2. 国立がん研究センターがん情報サービス『がん登録・統計』. http://ganjoho.jp/reg_stat/index.html
3. Raghunathan K1, Priest DG. Modulation of fluorouracil antitumor activity by folic acid in a murine model system. *Biochem Pharmacol*. 1999; **58**: 835-839.
4. Köhne CH, et al. Randomized phase III study of high-dose fluorouracil given as a weekly 24-hour infusion with or without leucovorin versus bolus fluorouracil plus leucovorin in advanced colorectal cancer: European organization of Research and Treatment of Cancer Gastrointestinal Group Study 40952. *J Clin Oncol*. 2003; **21**: 3721-3728.
5. Saltz LB, et al. Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. Irinotecan Study Group. *N Engl J Med*. 2000; **343**: 905-914.
6. Fuchs CS, et al. Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol*. 2007; **25**: 4779-4786.
7. Goldberg RM, et al. A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2004. **22**: 23-30.
8. Hurwitz H, et al. Bevacizumab plus Irinotecan, Fluorouracil, and Leucovorin for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med*. 2014; **371**: 1609-1618.
9. Saltz LB et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol*. 2008; **26**: 2013-2019.
10. Bennouna J, Continuation of bevacizumab after first progression in

metastatic colorectal cancer (ML18147): a randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2013; **14**: 29-37.

11. Tabernero J, et al. Ramucirumab versus placebo in combination with second-line FOLFIRI in patients with metastatic colorectal carcinoma that progressed during or after first-line therapy with bevacizumab, oxaliplatin, and a fluoropyrimidine (RAISE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2015; **16**: 499-508.
12. Bokemeyer C et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. Eur J Cancer. 2012; **48**: 1466-1675.
13. Van Cutsem E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*. 2009; **360**: 1408-1417.
14. Bokemeyer C, et al. Fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2009; **27**: 663-671.
15. Jonker DJ, et al. Cetuximab for the treatment of colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2007; **357**: 2040-2048
16. Cunningham D, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med*, 2004. **351**: 337-345.
17. Sobrero AF, et al. EPIC: phase III trial of cetuximab plus irinotecan after fluoropyrimidine and oxaliplatin failure in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2008. **26**: 2311-2319.
18. Boku N, et al. Panitumumab in Japanese Patients with Unresectable Colorectal Cancer: A Post-marketing Surveillance Study of 3085 Patients. *Jpn J Clin Oncol* 2014; **44**: 214-223.
19. Price TJ, Panitumumab versus cetuximab in patients with chemotherapy-refractory wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer (ASPECCT): a randomised, multicentre, open-label, non-inferiority phase 3 study. *Lancet Oncol*. 2014; **15**: 569-579.
20. Douillard JY, et al. Randomized, phase III trial of panitumumab with

infusional fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (FOLFOX4) versus FOLFOX4 alone as first-line treatment in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: the PRIME study. *J Clin Oncol*. 2010; **28**: 4697-4705.

21. Peeters, et al. Randomized phase III study of panitumumab with fluorouracil, leucovorin, and irinotecan (FOLFIRI) compared with FOLFIRI alone as second-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2010; **28**: 4706-4713.

22. Van Cutsem, E, et al. Open-label phase III trial of panitumumab plus best supportive care compared with best supportive care alone in patients with chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*, 2007; **25**: 1658-1664.

23. De Roock W, et al. Effects of KRAS, BRAF, NRAS, and PIK3CA mutations on the efficacy of cetuximab plus chemotherapy in chemotherapy-refractory metastatic colorectal cancer: a retrospective consortium analysis. Lancet Oncol. 2010; **11**: 753-762.

24. Peeters M, et al. Mutant KRAS codon 12 and 13 alleles in patients with metastatic colorectal cancer: assessment as prognostic and predictive biomarkers of response to panitumumab. *J Clin Oncol.* 2013; **31**: 759-765

25. Bokemeyer C, et al. FOLFOX4 plus cetuximab treatment and RAS mutations in colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2015; **51**: 1243-1252.

26. Stintzing S, et al. FOLFIRI plus cetuximab versus FOLFIRI plus bevacizumab for metastatic colorectal cancer (FIRE-3): a post-hoc analysis of tumour dynamics in the final RAS wild-type subgroup of this randomised open-label phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2016; S1470-2045: 30269-8 [Epub ahead of print].

27. Schwartzberg LS, et al. PEAK: a randomized, multicenter phase II study of panitumumab plus modified fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (mFOLFOX6) or bevacizumab plus mFOLFOX6 in patients with previously untreated, unresectable, wild-type KRAS exon 2 metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2014; **32**: 2240-2247.

28. Yoshino T, et al. Clinical Validation of a Multiplex Kit for RAS

Mutations in Colorectal Cancer: Results of the RASKET (RAS KEy Testing) Prospective, Multicenter Study. *EBioMedicine*. 2015; **2**: 317-323.

29. Masui H, et al. Growth inhibition of human tumor cells in athymic mice by anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 1984; **44**: 1002-1007.

30. Chung KY, et al. Cetuximab shows activity in colorectal cancer patients with tumors that do not express the epidermal growth factor receptor by immunohistochemistry. *J Clin Oncol*. 2005; **23**: 1803-1810.

31. Hecht JR, et al. Lack of correlation between epidermal growth factor receptor status and response to Panitumumab monotherapy in metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2010; **16**: 2205-2213.

32. Li Z, et al. Heterogeneity in primary colorectal cancer and its corresponding metastases: a potential reason of EGFR-targeted therapy failure? *Hepatogastroenterology.* 2011; **58**: 411-416.

33. Laurent-Puig, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol*. 2009; **27**: 5924-5930.

34. Scartozzi M, et al. Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) gene copy number (GCN) correlates with clinical activity of irinotecan-cetuximab in K-RAS wild-type colorectal cancer: a fluorescence in situ (FISH) and chromogenic in situ hybridization (CISH) analysis. *BMC Cancer*. 2009; **9**: 303.

35. Di Nicolantonio F, et al. Wild-type BRAF is required for response to panitumumab or cetuximab in metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol*. 2008. **26**: 5705-5712.

36. Bokemeyer C, et al. Addition of cetuximab to chemotherapy as first-line treatment for KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: pooled analysis of the CRYSTAL and OPUS randomised clinical trials. *Eur J Cancer*. 2012; **48**: 1466-1475.

37. Mao C, et al. PIK3CA exon 20 mutations as a potential biomarker for resistance to anti-EGFR monoclonal antibodies in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer: a systematic review and meta-analysis. *Ann*

Oncol. 2012; **23**: 1518-1525.

38. Karapetis CS, et al. PIK3CA, BRAF, and PTEN status and benefit from cetuximab in the treatment of advanced colorectal cancer--results from NCIC CTG/AGITG CO.17. *Clin Cancer Res.* 2014. **20**: 744-753.

39. Loupakis F et al. PTEN expression and KRAS mutations on primary tumors and metastases in the prediction of benefit from cetuximab plus irinotecan for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2009; **27**: 2622-2629.

40. Laurent-Puig P, et al. Analysis of PTEN, BRAF, and EGFR status in determining benefit from cetuximab therapy in wild-type KRAS metastatic colon cancer. *J Clin Oncol.* 2009; **27**: 5924-5930.

41. Peeters M, et al. Massively parallel tumor multigene sequencing to evaluate response to panitumumab in a randomized phase III study of metastatic colorectal cancer. Clin Cancer Res. 2013; **19**: 1902-1912.

42. Van der Veeken J, et al. Crosstalk between epidermal growth factor receptor- and insulin-like growth factor-1 receptor signaling: implications for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets.* 2009; **9**: 748-760.

43. Bardelli A, et al. Amplification of the MET receptor drives resistance to anti-EGFR therapies in colorectal cancer. *Cancer Discov* 2013; **3**: 658-673.

44. Jacobs B, et al.: Amphiregulin and epiregulin mRNA expression in primary tumors predicts outcome in metastatic colorectal cancer treated with cetuximab. *J Clin Oncol.* 2009; **27**: 5068-5074.

45. Baker JB, et al. Tumour gene expression predicts response to cetuximab in patients with KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2011; **104**: 488-495.

46. Maughan TS, et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011; **377**: 2103-2114.

47. Seligmann JF, et al. Combined Epiregulin and Amphiregulin Expression

Levels as a Predictive Biomarker for Panitumumab Therapy Benefit or Lack of Benefit in Patients With RAS Wild-Type Advanced Colorectal Cancer. *JAMA Oncol.* 2016 Feb 11.[Epub ahead of print]

48. Troiani T, et al. Increased TGF-α as a mechanism of acquired resistance to the anti-EGFR inhibitor cetuximab through EGFR-MET interaction and activation of MET signaling in colon cancer cells. *Clin Cancer Res.* 2013; **19**: 6751-6765.

49. Hobor S et al. TGFα and amphiregulin paracrine network promotes resistance to EGFR blockade in colorectal cancer cells. *Clin Cancer Res.* 201; **20**: 6429-6438.

50. Kawakami H, et al. The anti-HER3 antibody patritumab abrogates cetuximab resistance mediated by heregulin in colorectal cancer cells. *Oncotarget.* 2014; **5**: 11847-11856.

51. Scartozzi M, et al. Analysis of HER-3, insulin growth factor-1, nuclear factor-kB and epidermal growth factor receptor gene copy number in the prediction of clinical outcome for K-RAS wild-type colorectal cancer patients receiving irinotecan-cetuximab. *Ann Oncol.* 2012; **23**: 1706-1712.

52. Wheeler DL, et al. Mechanisms of acquired resistance to cetuximab: role of HER (ErbB) family members. *Oncogene* 2008; **27**: 3944-3956.

53. Yano S, et al. Hepatocyte growth factor induces gefitinib resistance of lung adenocarcinoma with epidermal growth factor receptor-activating mutations. *Cancer Res* 2008; **68**: 9479-9487.

54. Engelman JA, et al. MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling. *Science* 2007; **316**: 1039-1043.

55. Xu L, et al. Epidermal growth factor receptor regulates MET levels and invasiveness through hypoxia-inducible factor-1alpha in non-small cell lung cancer cells. *Oncogene* 2010; **29**: 2616-2627.

56. Van Cutsem E, et al. Randomized phase Ib/II trial of rilotumumab or ganitumab with panitumumab versus panitumumab alone in patients with wild-type KRAS metastatic colorectal cancer. *Clin Cancer Res.* 2014; **20**: 4240-4250.

57. Shelly M, et al. Epiregulin is a potent pan-ErbB ligand that

preferentially activates heterodimeric receptor complexes. *J Biol Chem* 1998; **273**: 10496-10505.

58. Yamamoto T, et al. Expression of betacellulin, heparin-binding epidermal growth factor and epiregulin in human malignant fibrous histiocytoma. *Anticancer Res* 2004; **24**: 2007-2010.

59. Shigeishi H, et al. Expression of epiregulin, a novel epidermal growth factor ligand associated with prognosis in human oral squamous cell carcinomas. *Oncol Rep* 2008; **19**: 1557-1564.

60. Re´villion F, et al. ErbB/HER ligands inhuman breast cancer, and relationships with their receptors, the bio-pathological features and prognosis. *Ann Oncol* 2008; **19**: 73-80.

61. Khambata-Ford S, et al. Expression of epiregulin and amphiregulin and K-ras mutation status predict disease control in metastatic colorectal cancer patients treated with cetuximab. *J Clin Oncol* 2007; **25**: 3230-3237.

62. Takahashi N, et al. Prognostic role of ERBB2, MET and VEGFA expression in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR antibodies. *Br J Cancer*. 2016; **114**: 1003-1011.

63. Mlcochova J, Faltejskova P, Nemecek R, et al. MicroRNAs targeting EGFR signalling pathway in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; **39**: 1615-1624.

64. Lu Y, Li X, Liang K, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR) ubiquitination as a mechanism of acquired resistance escaping treatment by the anti-EGFR monoclonal antibody cetuximab. *Cancer Res* 2007; **67**: 8240-8247.

65. Rossello A, Nuti E, Ferrini S, et al. Targeting ADAM17 Sheddase Activity In Cancer. *Curr Drug Targets*.2016; Epub ahead of print.

66. Roepstorff K, Grandal MV, Henriksen L, et al. Differential effects of EGFR ligands on endocytic sorting of the receptor. *Traffic* 2009; **10**: 1115-1127.

67. Vermeulen L, et al. Wnt activity defines colorectal cancer stem cells and is regulated by the microenviroment. *Nat Cell Biol* 2010; **12**: 468-

476.

68. Kobayashi S, et al. LGR5-positive colon cancer stem cells interconvert with drug resistant LGR5-negative cells and are capable of tumor reconstitution. *Stem Cells* 2012; **30**: 2631-2644.

69. Gupta GP, et al. Mediators of vascular remodeling coopted for sequential steps in lung metastasis. *Nature* 2007; **446**: 765-770.

70. Mutsaers AJ, et al. Dose-dependent increases in circulating TGF-alpha and other EGFR ligands act as pharmacodynamic markers for optimal biological dosing of cetuximab and are tumor independent. *Clin Cancer Res*. 2009; **15**: 2397-2405.

第５章 化学療法レジメン

- 5-FU/LV: LV と 5-FU を併用したレジメン。LV を点滴し、5-FU の急速静注と持続静注を組み合わせたレジメン(sLV5FU2)が広く用いられる。1 コース＝2 週間で投与する。
- IFL: CPT-11、5-FU、LV を併用したレジメン。CPT-11 を点滴した後に、5-FU と LV を並列で点滴する。これを 1 週間ごとに 4 回投与する。1 コース＝6 週間で投与する。
- CapeIRI: カペシタビン(経口剤)、CPT-11 を併用したレジメン。1 日目に CPT-11 を点滴静注し、カペシタビンを 1 日目から 2 週間内服する。1 コース＝3 週間で投与する。
- FOLFIRI: CPT-11、5-FU、LV を併用したレジメン。LV と CPT-11 を並列で点滴し、終了後に 5-FU を急速静注し、5-FU 持続静注を行う。1 コース＝2 週間で投与する。
- FOLFOX: 5-FU、LV、L-OHP を併用したレジメン。L-OHP と LV を並列で点滴し、終了後に 5-FU を急速静注し、5-FU 持続静注を行う。投与量や投与方法により FOLFOX7 まである。よく用いられる FOLFOX4 や mFOLFOX6 は、1 コース＝2 週間で投与する。
- XELOX： カペシタビン、L-OHP を併用したレジメン。1 日目に L-OHP を点滴し、カペシタビンを 1 日目から 2 週間内服する。1 コース=3 週間で投与する。
- Bevacizumab： 必ず化学療法と併用する。投与量は、1 コース=2 週間のレジメンに併用する場合には 5mg/kg（FOLFOX、FOLFIRI、sLV5FU2 など）、1 コース=3 週間の場合には 7.5mg/kg（XELOX など）であり、1 日目に点滴静注する。
- Ramucirumab： 大腸癌では 2 次治療の FOLFIRI と併用する。投与量は 8mg/kg で FOLFIRI 療法と併用し、2 週間ごとに点滴静注する。
- Cetuximab： 単剤もしくは化学療法と併用する。初回投与時は 400mg/m^2、2 回目以降は 250mg/m^2 で投与する。1 週間ごとに点滴静注する。
- Panitumumab: 単剤もしくは化学療法と併用する。投与量は 6mg/kg で 2 週間ごとに点滴静注する。

第６章　謝辞

本研究ならびに論文作成を進めるにあたり、熱心かつ丁寧なご指導を賜りました、国立がん研究センター中央病院の消化器内科、病理部の先生ならびに研究員の方々、筑波大学医学医療系　兵頭一之介 教授に厚く御礼申し上げます。

第 7 章　本研究の倫理委員会承認、研究費

本研究は、国立がん研究センター中央病院の倫理委員会の承認を得て行っている。研究課題番号ならびに研究課題名は、2012-031：「消化器がんにおける ErbB ファミリーを中心としたがん増殖因子受容体とリガンドに関する探索的バイオマーカー研究」である。本研究は、2018 年まで倫理委員会の承認を得ている。

本研究は、研究開発費（23-B-14：ヒトゲノムおよびプロテオームテーラーメード医療の実用化に関する研究）の一部を用いて行った。

第 8 章　筆者の本研究における貢献

本研究では、患者背景や治療成績などをまとめた臨床データベース、過去に行ったダイレクトシークエンスによる遺伝子変異解析の結果を遺伝子データベースとしてまとめた。また、バイオバンクの血清検体の抽出と ELISA によるリガンド蛋白測定を行った。これらのデータベースと ELISA の結果をまとめ、統計解析を行った。その後、論文作成を行った。

第 9 章　参考論文

1. Takahashi N, Yamada Y, Furuta K, et al. Serum levels of hepatocyte growth factor and epiregulin are associated with the prognosis on anti-EGFR antibody treatment in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2014; **110**: 2716-27.

2. Takahashi N, Yamada Y, Taniguchi H, et al. Combined assessment of epidermal [corrected] growth factor receptor dual color in situ hybridization and immunohistochemistry with downstream gene mutations in prediction of response to the anti-EGFR therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *Arch Med Res.* 2014; **45**: 366-74.

3. Takahashi N, Yamada Y, Furuta K, et al. Association between serum ligands and the skin toxicity of anti-epidermal growth factor receptor antibody in metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci.* 2015; **106**: 604-10.

4. Takahashi N, Yamada Y, Taniguchi H, et al. Prognostic role of ERBB2, MET and VEGFA expression in metastatic colorectal cancer patients treated with anti-EGFR antibodies. *Br J Cancer.* 2016; **114**: 1003-11.