

## 進行乳癌に対するドセタキセルとドキシフルリジン併用化学療法抗腫瘍効果、有害事象、効果予測因子の検討

山本 裕

**目的:**ドセタキセル (Doc) はチミジン・フォスホリラーゼ (TP) の誘導により、ドキシフルリジン (5' DFUR) の効果を増強し、両薬剤の併用は、乳癌移植モデルにおいて相乗的な抗腫瘍効果を示すことが報告されている。我々は、進行乳癌を対象に、隔週 Doc と 5' DFUR 連日経口投与による併用療法の臨床試験を行っている。今回、当教室で本併用療法を受けた症例を対象に治療効果、有害事象さらに効果予測因子を検討した。

**患者と方法:**当教室において本併用療法を受けた進行乳癌患者25例を対象とした。これらの症例のうち、原発腫瘍の免疫組織化学的検討が可能であり、治療効果が判明している17例において、BRCA1、TP 発現量と治療効果との相関をみた。

**結果:**1) 臨床的検討;本併用療法の奏効率は68.1% (15/22, 3例は治療効果の判定不能)であった。グレード3または4の有害事象は20% (5/25)に認められた。2) 効果予測因子の検討; BRCA1 と TP のどちらか一つが陽性の症例の奏効率は92.3% (12/13), ともに陰性の症例の奏効率は0% (0/4)であった ( $P=0.003$ )。多変量解析において、BRCA1 陽性、TP 陽性は、それぞれ奏効を予測する独立因子であった。

**結論:**本併用療法は、進行乳癌患者に対し、安全に投与が可能であり、強い抗腫瘍効果を示した。本併用療法の効果予測因子として、原発腫瘍のBRCA1 と TP 発現状況が有用なことが示唆された。

(平成18年10月17日受理)

### Tumor Responses, Adverse Events and Predictive Factors for Response in Advanced Breast Cancer Patients Treated with Combined Chemotherapy with Docetaxel and Doxifluridine

Yutaka YAMAMOTO

**Purposes:** It is reported that docetaxel (Doc) up-regulates thymidine phosphorylase (TP) expression and combined treatment with Doc and doxifluridine (5' DFUR) synergistically inhibits the growth of human breast cancer xenografts. We have conducted phase trials for combined chemotherapy with intravenous bi-weekly Doc and oral daily 5' DFUR in patients with advanced breast cancer. Tumor responses, adverse events and predictive factors for response were investigated in patients treated with this combined chemotherapy.

**Patients and Methods:** A total of 25 patients with advanced breast cancer were treated with this combined therapy in our department. Expression levels of BRCA1 and TP were analyzed by

immunohistochemistry in primary tumor samples. Relation among their levels and objective response (OR) rates were studied in 17 patients with assessable lesions.

**Results:** 1) Clinical study: the OR rate to this combined therapy was 68.1% (15/22, response could not be evaluated in three patients). Grade 3 or grade 4 toxicity was observed in 20% (5/25) of the patients. 2) Investigation on predictive factors: the OR rate was 92.3% (12/13) in BRCA1-positive and/or TP-positive tumors and 0% (0/4) in BRCA1-negative and TP-negative tumors, respectively ( $P=0.003$ ). Multivariate analysis revealed that either BRCA1-positivity or TP-positivity is an independent predictive factor for objective response to this combined chemotherapy.

**Conclusion:** These findings suggest that this combined therapy is active and safe in patients with advanced breast cancer and that the immunohistochemical analysis on BRCA1 and TP expression in primary tumors may be predictive for response to this combined therapy. (Accepted on October 17, 2006) *Kawasaki Medical Journal* 33(2):107-114, 2007

**Key Words** ① Breast cancer ② Docetaxel ③ Doxifluridine ④ BRCA1  
⑤ Thymidine phosphorylase

## はじめに

前臨床試験ならびに臨床試験において、1) ドキシフルリジン (5' DFUR) はチミジン・フォスフォリラーゼ (TP) により活性化を受け抗腫瘍効果を示す、2) ドセタキセル (Doc) は腫瘍組織における TP 発現を誘導する、3) Doc は 5' DFUR の効果を増強し、両薬剤の併用は相乗的な抗腫瘍効果を示すことが、すでに検証されている<sup>1),2)</sup>。

最近我々は、中国四国乳癌化学療法研究会に参加し、隔週毎の Doc 静脈内注射と連日経口 5' DFUR 投与の併用療法の第 I 相試験を行い、Doc 40 mg/m<sup>2</sup>、5' DFUR 600 mg/body の推奨用量が決められた<sup>3)</sup>。現在、この推奨用量による第 II 相試験が進行している。今回、当教室で行われた本併用療法の治療効果及び完全性について検討した。

最近、家族性乳癌・卵巣癌の原因遺伝子 BRCA1 がタキサン系薬剤に対する感受性を規定する因子であることが基礎的研究により示された<sup>4)</sup>。さらに我々は、BRCA1 発現の欠失した進行乳癌患者では、タキサン系薬剤による治療の無進行生存期間が短いことを報告した<sup>5)</sup>。

これらの所見は、BRCA1 がタキサン系薬剤の効果予測因子として有用なことを示唆している。

そこで、本併用療法 of 感受性予測因子を探索する目的で、進行乳癌患者の原発腫瘍における BRCA1 及び TP 発現を免疫組織化学的に検討した。

## 患者と方法

### 患者

2002年4月～2006年4月の間に当教室において本併用療法を受けた進行乳癌患者25例を対象とし、治療効果と安全性について検討した。治療効果の判定は、乳癌取扱い規約(第14版)に従った<sup>6)</sup>。有害事象は、Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0に従い評価した<sup>7)</sup>。

### 免疫組織化学的検討

原発乳癌の病理組織標本が入手でき、治療効果の判定が可能であった17症例において、BRCA1 と TP の免疫染色を行い、本併用療法の治療効果との相関を分析した。

免疫染色は、ホルマリン固定、パラフィン包

埋された原発乳癌組織標本から厚さ  $5 \mu\text{m}$  の切片を作製し、脱パラフィン後、抗原賦活化 (BRCA1 は電子レンジ, TP はオートクレーブを用いた) を行った。その後、3%過酸化水素を用い内因性ペルオキシダーゼ活性を阻止し、1次抗体 (BRCA1 はマウスモノクローナル抗体 [CALBIOCHEM 社], TP はマウスモノクローナル抗体 [中外製薬]) と反応させた。Envision 法 (DAKO 社) で処理後、ジアミノベンチジンにて発色、ヘマトキシリンで核染色を行い、光学顕微鏡で観察した。

BRCA1 発現の判定は、腫瘍細胞の核が10%以上染色された場合を陽性とした (Fig. 1)<sup>5)</sup>。TP 発現の判定は、腫瘍細胞の細胞質の染色強度を 0, 1 (弱く染色), 2 (中等度染色), 3

(強く染色) に分け、この染色強度に染色細胞陽性率 (%) をかけ合わせた数値を算出し、200以上を陽性とした (Fig. 2)<sup>8)</sup>。

#### 統計学的処理

免疫染色の結果と奏効率の相関に関して、単変量および多変量解析を行った。単変量解析は分割表分析 ( $\chi^2$  乗検定) を用い、多変量解析は重回帰分析を用いた。重回帰分析では、奏効の有無を目的変数とし、治療効果との相関が予想される 9 因子 (BRCA1 発現, TP 発現, 年齢, 活動状況 [PS], 前化学療法のレジメン数, 主評価病巣, エストロゲン受容体 [ER] 状況, プロゲステロン受容体 [PgR] 状況) を説明変数とした。P 値が  $0.05$  未満を有意とした。

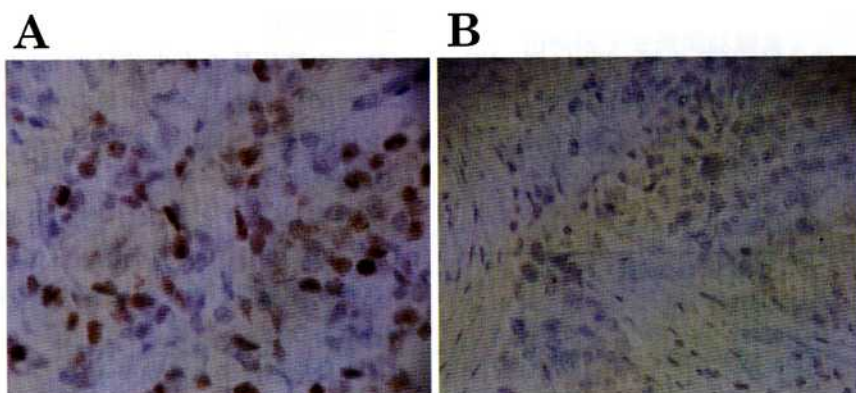


Fig. 1. BRCA1 免疫染色所見 (x400). A: 陽性例 (陽性率90%), B: 陰性コントロール

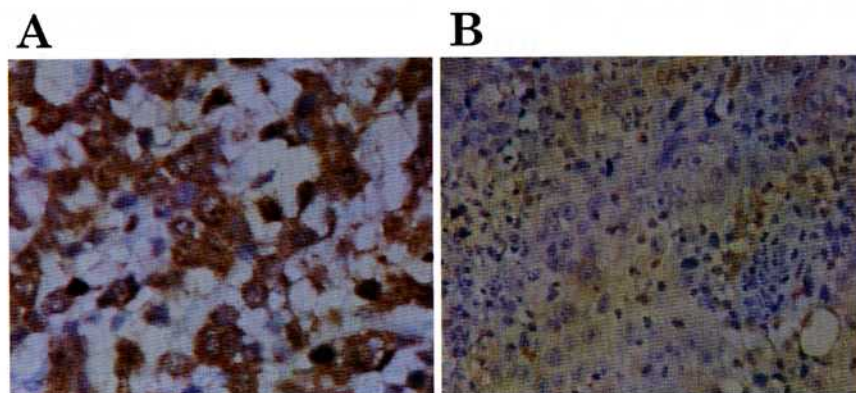


Fig. 2. TP 免疫染色所見 (x400). A: 陽性例 (スコア300), B: 陰性コントロール

## 結 果

## 1. 臨床的検討

## 1) 患者背景 (Table 1)

年齢の中央値は56歳。再発乳癌が11例(44%)と最も多く、治療効果の評価病変は、骨転移が13例、軟部組織病変が11例、内臓転移が9例であった。前化学療法数の中央値は2レジメンであった。PSは0が17例(68%)、1が8例であった。ER陽性率は39%、PgR陽性率は32%、HER2陽性率は29%であった。

## 2) 治療内容

Docの投与量の中央値は60 mg/body (範囲: 40-80)、投与サイクル数の中央値は5サイクル(範囲: 1-38)であった。5' DFURは全例に600 mg/body 経口投与された。

## 3) 治療効果

奏効率は68.1% (CR 1例, PR 14例, NC 6例, PD 1例: 3例は治療効果の評価不能)であった。また再発例(11例)における無進行

生存期間の中央値は9ヵ月(範囲: 1-38)であった。

## 4) 有害事象 (Table 2)

爪の変化が13例(52%)と最も多く発生したが、多くの有害事象はグレード1から2と軽度であった。グレード3以上の有害事象(血液毒性、悪心・嘔吐)は5例(20%)に認められた。

## 2. 感受性予測因子の検討

## 1) 患者背景

年齢の中央値は56歳。再発乳癌が8例(47%)と最も多く、評価病変は、骨転移が7例、軟部組織病変が6例、内臓転移が4例であった。前化学療法レジメン数の中央値は2レジメン(範囲: 1-5)であった。PSは0が13例(76%)、1が4例であった。ER陽性率は35%、PgR陽性率は29%、HER2陽性率は29%であった。

## 2) 治療内容

Docの投与量の中央値は60 mg/body (範囲: 40-80)、投与サイクル数の中央値は5サイクル(範囲: 1-38)であった。

## 3) 治療効果

奏効率は70.6% (CR 1例, PR 11例, NC 4例, PD 1例)で、再発例(8例)における無進行生存期間の中央値は8ヵ月(範囲: 1-38)であった。

## 4) 免疫染色結果と奏効率

BRCA1陽性率は59% (10/17)、TP陽性率

Table 1. 患者の背景

年齢	中央値 56 歳 (範囲: 36-79)	
病態	局所進行	7 例
	病期IV	7 例
	再発	11 例
評価病変*	骨転移	13 例
	軟部組織	11 例
	臓器転移	9 例
前化学療法数	中央値 2 レジメン (範囲: 1-5)	
PS	0	17 例
	1	8 例
ER	陽性	9 例
	陰性	14 例
	不明	2 例
PgR	陽性	7 例
	陰性	15 例
	不明	3 例
HER2	陽性	6 例
	陰性	15 例
	不明	4 例

\*重複あり

Table 2. 有害事象

	グレード			
	1	2	3	4
好中球減少	0*	7	2	1
嘔心・嘔吐	6	3	2	0
脱毛	7	4	—**	—
手足症候群	4	3	0	—
爪の変化	4	9	0	—
しびれ	4	0	0	0
下痢・便秘	5	1	0	0
その他	8	2	0	0

\*症例数 (全症例数17)

\*\*該当グレードなし

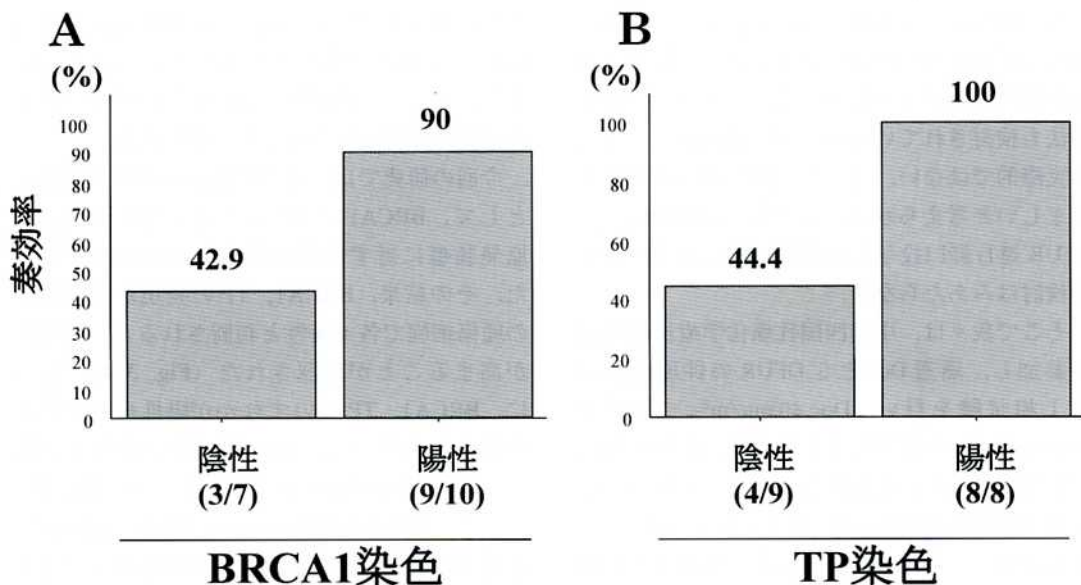


Fig. 3. BRCA1, TP 発現状況別の奏効率. A: BRCA1染色との相関, B: TP染色との相関

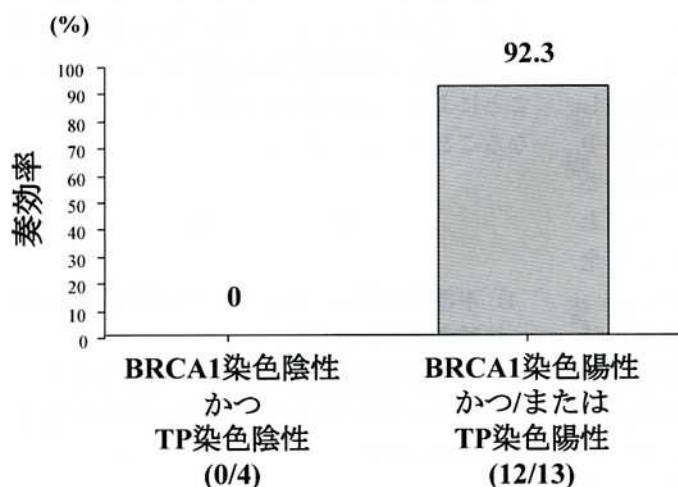


Fig. 4. BRCA1 と TP 発現の組み合わせ別の奏効率

は71% (12/17)であった。BRCA1発現状況別の奏効率は、陽性で90% (9/10)、陰性で42.9% (3/7)であった ( $P = 0.112$ , Fig. 3A)。TP発現状況別の奏効率は、陽性で100% (8/8)、陰性で44.4% (4/9)であった ( $P = 0.045$ , Fig. 3B)。BRCA1, TPのどちらかが陽性症例の奏効率は92.3% (12/13)、ともに陰性症例の奏効率は0% (0/4)であった ( $P = 0.003$ , Fig. 4)。

治療効果に影響のある他の7因子を加え多変量解析を行ったところ、BRCA1陽性 ( $P = 0.0016$ ) およびTP陽性 ( $P = 0.004$ ) は、奏効を予測する独立因子であった。

#### 考 察

Docは再発乳癌に対して、1次治療、2次治療いずれにおいても有用な治療薬であり<sup>9),10)</sup>、さらに術前療法<sup>11)</sup>や術後補助療法<sup>12)</sup>においても有用な治療薬である。

一方、5' DFURは経口の5-fluorouracil (FU) 系製剤であり、主に再発乳癌の治療に用いられている。本剤はTPによって5-FUに変換され、抗腫瘍効果を発揮することが知られている。

前臨床試験や臨床試験において、DocはTPを誘導することが知られている。また、乳癌ヌードマウス移植モデルにおいて、Docと5' DFURの併用による相乗的な抗腫瘍効果が報告されている<sup>1),2),13)</sup>。

Docは通常3週間隔で投与されているが、高度な好中球減少の発生頻度が高く、外来における通院治療には不向きである。また、毎週投与法も検討されているが、通院回数が増えるため実際的ではない。そこで、隔週投与法がより望ましいと考えられる。しかし、隔週Docと5' DFUR 連日経口投与との併用療法に関する臨床的検討はみあたらない。

そこで我々は、中国四国乳癌化学療法研究会に参加し、隔週Docと5' DFURの併用療法の第I相試験を行い、Doc 40 mg/m<sup>2</sup>、5' DFUR 600 mg/bodyの推奨用量を得た<sup>3)</sup>。対象症例数は少ないものの、進行乳癌に対し、本併用療法は高い抗腫瘍効果を示し、有害事象も容認でき、外来で安全に施行可能な治療法であることが検証された<sup>3)</sup>。現在、本推奨用量を用いた第II相試験が進行中である。

今回の研究では、これらの臨床試験に登録した症例を含め、我々の教室で本併用療法を行った25症例に関し、治療効果と有害事象を検討した。その結果、前化学療法歴(レジメン数の中央値2)を有する進行乳癌を対象に、68.1%と高い奏効率が得られ、さらに、グレード3以上の有害事象は20%の症例にしかみられず、安全で有用な治療法であることが確認された。

5' DFURの効果予測因子として、本剤の活性化酵素であるTPの発現状況の有用性が報告されている<sup>14)-16)</sup>。また、Docの効果予測因子に関しても多くの研究が行われている。Docのターゲットである微小管を不安定にさせるclass III  $\beta$ -tubulinの高発現、およびDocを代謝するCYP3A4の高発現は、Doc耐性に関与し<sup>17),18)</sup>、逆に増殖因子受容体であるHER2の高発現は、Docの効果予測因子である<sup>19)</sup>。さらに最近、タキサン系薬剤であるパクリタキセルによるストレス応答性アポトーシス誘導には、BRCA1を介したJNK経路の活性化が関わっており<sup>20)</sup>、BRCA1発現を抑制するとパクリタキセルに対する感受性が低下し、アポトーシスが減少することが基礎研究により示されている<sup>21)</sup>。また、BRCA1はDNA修復遺伝子で

あり、BRCA1発現の低下は、DNA障害性抗癌剤の抗腫瘍効果を高めることも示されている<sup>22)</sup>。従って、BRCA1は抗癌化学療法に対する感受性を規定する重要な因子である。

今回の研究では、本併用療法の効果予測因子として、BRCA1とTPの発現状況に注目し、原発腫瘍に対する免疫組織化学的検討を行った。その結果、BRCA1、TPの発現が原発腫瘍の腫瘍細胞で各々陽性と判断されると、奏効率が上がるということが確認された(Fig. 3, 4)。さらに、BRCA1、TPのいずれかが陽性症例の奏効率はきわめて高く、逆にBRCA1、TPともに陰性の症例では奏効例を認めなかった(Fig. 5)。従って、BRCA1、TPいずれかが陽性であれば、本併用療法により高い確率で奏効が得られると考えられた。

これらの研究結果は、本併用療法の有用性を検証したばかりでなく、BRCA1とTPの発現を原発腫瘍において免疫組織化学的に検討することにより、治療効果を予測することが可能となることを示唆している。

## 結 語

- 1) 本併用療法は、進行・再発乳癌に対し、強い抗腫瘍効果を示した。
- 2) また本併用療法の感受性子予測因子として、原発腫瘍のBRCA1とTP発現状況が有用なことが示唆された。

## 謝 辞

本研究を遂行するに当たり、御指導と御高閣を賜りました川崎医科大学外科学(乳腺甲状腺)教室 園尾博司教授に深甚なる謝意を表します。また研究の技術的な面で御支援頂いた川崎医科大学外科学(乳腺甲状腺)教室 紅林淳一助教授、田中克浩講師に謝意を表すとともに、免疫組織染色法を直接御助言、御指導頂いた川崎医科大学病理部 定平吉都教授、濱崎周次教授をはじめとする病理部員各位に深謝致します。なお、本研究の一部は川崎医科大学プロジェクト研究費(課

題番号 16-501S, 17-113S) および文部科学省・学術振興会科学研究費補助金(課題番号18591448)の援助により行われた。

## 文 献

- 1) Sawada N, Ishikawa T, Fukase Y, *et al*: Induction of thymidine phosphorylase activity and enhancement of capecitabine efficacy by taxol/taxotere in human cancer xenografts. *Clin Cancer Res* 4 : 1013-1019, 1998
- 2) Kurosumi M, Tabei T, Suemasu K, *et al*: Enhancement of immunohistochemical reactivity for thymidine phosphorylase in breast carcinoma cells after administration of docetaxel as a neoadjuvant chemotherapy in advanced breast cancer patients. *Oncol Rep* 7 : 945-948, 2000
- 3) 池田雅彦, 園尾博司, 田中克浩, 他: 進行・再発乳癌に対する Bi-weekly Docetaxel と 5-DFUR の併用化学療法における安全性と効果の検討 第 I 相試験癌と化学療法 33 : 767-771, 2006
- 4) Kennedy RD, Quinn JE, Mullan PB, *et al*: The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 96 : 1659-1668, 2004
- 5) Kurebayashi J, Yamamoto Y, Kurosumi M, *et al*: Loss of BRCA1 expression may predict shorter time-to-progression in metastatic breast cancer patients treated with taxanes. *Anticancer Res* 26 : 695-701, 2006
- 6) 日本乳癌学会: 乳癌取り扱い規約第14版, 金原出版株式会社, pp 57-68, 2000
- 7) Common Terminology Criteria for Adverse Events (CTCAE) v3.0日本語訳 JCOG/JSCO 版, <http://jcog.jp>
- 8) Lee AH, Dublin EA, Bobrow LG: Angiogenesis and expression of thymidine phosphorylase by inflammatory and carcinoma cells in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Pathol* 187 : 285-290, 1999
- 9) Chan S, Friedrichs K, Noel D, *et al*: Prospective randomized trial of docetaxel versus doxorubicin in patients with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 17 : 2341-2354, 1999
- 10) Ten Bokkel Huinink WW, Prove AM, Piccart M, *et al*: A phase II trial with docetaxel (Taxotere) in second line treatment with chemotherapy for advanced breast cancer. A study of the EORTC Early Clinical Trials Group. *Ann Oncol* 5 : 527-532, 1994
- 11) Bear HD, Anderson S, Smith RE, *et al*: Sequential preoperative or postoperative docetaxel added to preoperative doxorubicin plus cyclophosphamide for operable breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-27. *J Clin Oncol* 24 : 2019-2027, 2006
- 12) Boer K, Lang I, Juhos E, *et al*: Adjuvant therapy of breast cancer with docetaxel-containing combination (TAC). *Pathol Oncol Res* 9 : 166-169, 2003
- 13) Yamamoto S, Kurebayashi J, Kurosumi M, *et al*: Combined effects of docetaxel and fluoropyrimidines on tumor growth and expression of interleukin-6 and thymidine phosphorylase in breast cancer xenografts. *Cancer Chemother Pharmacol* 48 : 283-288, 2001
- 14) Patterson AV, Zhang H, Moghaddam A, *et al*: Increased sensitivity to the prodrug 5'-deoxy-5-fluorouridine and modulation of 5-fluoro-2'-deoxyuridine sensitivity in MCF-7 cells trans-fected with thymidine phosphorylase. *Br J Cancer* 72 : 669-675, 1995
- 15) Evrard A, Cuq P, Robert B, *et al*: Enhancement of 5-fluorouracil cytotoxicity by human thymidine-phosphorylase expression in cancer cells: *in vitro* and *in vivo* study. *Int J Cancer* 80 : 465-470, 1999
- 16) Kanyama H, Tomita N, Yamano T, *et al*: Enhancement of the anti-tumor effect of 5'-deoxy-5-fluorouridine by transfection of thymidine phosphorylase gene into human colon cancer cells. *Jpn J Cancer Res* 90 : 454-459, 1999
- 17) Liu B, Staren E, Iwamura T, *et al*: Taxotere resistance in SUIT Taxotere resistance in pancreatic carcinoma cell line SUIT 2 and its sublines. *World J Gastroenterol* 7 : 855-859, 2001
- 18) Miyoshi Y, Taguchi T, Kim SJ, *et al*: Prediction of response to docetaxel by immunohistochemical analysis of CYP3A4 expression in human breast cancers. *Breast Cancer* 12 : 11-15, 2005

- 19) Durbecq V, Paesmans M, Cardoso F, *et al* : Topoisomerase-II alpha expression as a predictive marker in a population of advanced breast cancer patients randomly treated either with single-agent doxorubicin or single-agent docetaxel. *Mol Cancer Ther* 3 : 1207 - 1214, 2004
- 20) Lafarge S, Sylvain V, Ferrara M, *et al* : Inhibition of BRCA1 leads to increased chemoresistance to microtubule-interfering agents, an effect that involves the JNK pathway. *Oncogene* 20 : 6597 - 6606, 2001
- 21) Quinn JE, Kennedy RD, Mullan PB, *et al* : BRCA1 functions as a differential modulator of chemotherapy-induced apoptosis. *Cancer Res* 63 : 6221 - 6228, 2003
- 22) Kennedy RD, Quinn JE, Mullan PB, *et al* : The role of BRCA1 in the cellular response to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 96 : 1659 - 1668, 2004