

- 1984
- 14) McCall JL, Cox MR, Wattchow DA : Analysis of local recurrence rates after surgery alone for rectal cancer. *Int J Colorectal Dis* 10 : 126—132, 1995
  - 15) Wanebo HJ, Marcove RC : Abdominal sacral resection of locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg* 194 : 458—471, 1981
  - 16) 加藤知行, 平井 孝, 荒井保明 : 直腸癌治療の進歩 直腸癌局所再発の治療. *消外* 17 : 317—324, 1994
  - 17) 赤須孝之, 森谷宜皓, 杉原健一ほか : 再発大腸癌の治療 再発大腸癌の治療方針と治療成績. *臨外* 50 : 889—897, 1995
  - 18) Wanebo HJ, Antoniuk P, Koness RJ et al : Pelvic resection of recurrent rectal cancer : technical considerations and outcomes. *Dis Colon Rectum* 42 : 1438—1448, 1999
  - 19) Moriya Y, Akasu T, Fujita S et al : Total pelvic exenteration with distal sacrectomy for fixed recurrent rectal cancer in the pelvis. *Dis Colon Rectum* 47 : 2047—2053, 2004
  - 20) Yamada K, Ishizawa T, Niwa K et al : Pelvic exenteration and sacral resection for locally advanced primary and recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 45 : 1078—1084, 2002
  - 21) 森谷宜皓, 山口高史, 赤須孝之ほか : 【大腸癌の術後再発をめぐって】骨盤内局所再発癌に対する積極的外科治療. *臨外* 56 : 759—765, 2001
  - 22) Maetani S, Onodera H, Nishikawa T : Significance of local recurrence of rectal cancer as a local or disseminated disease. *Br J Surg* 85 : 521—525, 1998
  - 23) Hahnloser D, Nelson H, Gunderson LL et al : Curative potential of multimodality therapy for locally recurrent rectal cancer. *Ann Surg* 237 : 502—508, 2003
  - 24) Hashiguchi Y, Sekine T, Sakamoto H et al : Intraoperative irradiation after surgery for locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 42 : 886—893, 1999
  - 25) Suzuki K, Dozois RR, Devine RM et al : Curative reoperations for locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 39 : 730—736, 1996
  - 26) Saito N, Koda K, Takiguchi N et al : Curative surgery for local pelvic recurrence of rectal cancer. *Dig Surg* 20 : 192—199, 2003
  - 27) 斎藤典男, 更科広実, 布村正夫 : 直腸癌における骨盤内臓器全摘術 (TPE) の適応と予後. *日本大腸肛門病会誌* 48 : 381—388, 1995
  - 28) 山口高史, 森谷宜皓, 赤須孝之ほか : 【高度進行大腸癌治療の最前線】外科切除例 T4 直腸癌, 局所再発直腸癌に対する外科治療. *消外* 24 : 1369—1377, 2001
  - 29) Bedrosian I, Giacco G, Pederson L et al : Outcome after curative resection for locally recurrent rectal cancer. *Dis Colon Rectum* 49 : 175—182, 2006
  - 30) Yamada K, Ishizawa T, Niwa K et al : Patterns of pelvic invasion are prognostic in the treatment of locally recurrent rectal cancer. *Br J Surg* 88 : 988—993, 2001
  - 31) Valentini V, Morganti AG, De Franco A et al : Chemoradiation with or without intraoperative radiation therapy in patients with locally recurrent rectal carcinoma : prognostic factors and long term outcome. *Cancer* 86 : 2612—2624, 1999
  - 32) 山田 滋, 安田茂雄, 北林宏之ほか : 直腸癌局所再発に対する重粒子線治療. *消外* 29 : 95—103, 2006

The Effect of Surgical Treatment for Local Recurrence after Rectal Cancer Surgery :  
An Analysis based on the Preoperative Imaging Studies

Kazunari Misawa, Tomoyuki Kato, Yukihide Kanemitsu,  
Koji Komori and Takashi Hirai

Department of Gastroenterological Surgery, Aichi Cancer Center Hospital

**Background** : Although surgical resection is the only therapeutic option for curing patients with local recurrence after rectal cancer surgery, the dismal prognosis often fails to justify the degree of adverse events associated with major surgery. To reassess the relevance of surgery, we analyzed the outcome of patients based on the site or extent of local recurrence classified based on preoperative imaging studies. **Patients and Methods** : Between 1981 and 2002, 84 patients with locally recurrent rectal cancer underwent curative surgery. They were classified into three groups based on the preoperative computed tomography or magnetic resonance imaging : recurrent tumors invading or touching the piriform muscles or internal obturator muscles, or touching the upper sacrum (S1, S2) (group A) ; recurrent tumors invading or touching the lower sacrum (S3, S4, S5) or the pelvic organs such as the prostate, the uterus, the seminal vesicles or the urinary bladder (group B) ; and recurrent tumors localized at the anastomosis site (group C). Prognostic data for 19 patients diagnosed during the same period who were found to have extensive tumoral invasion and were not indicated for surgery or failed to undergo resection were used for comparison (nonresection group). **Results** : Curative resection in all patients was 61.9%. That in group A was 31.8%, in group B 80.6%, and in group C 81.3%. Five-year survival following resection was 30.0% in all patients, 5.9% in group A, 32.7% in group B, and 67.0% in group C. The incidence of locoregional failure and distant metastasis following surgery for recurrent disease was significantly higher for Group A. The median interval between primary diagnosis of local recurrence and detection of distant metastasis was 8.4 months for group A and 18.0 months for the nonresection group, although no difference in overall survival was observed between the two groups. **Conclusions** : Patients in group A suffered from poor curative resection and early emergence of locoregional failure or distant metastasis, leading to a dismal prognosis. The indication for surgery, the optimal extent of surgical resection, and the application of adequate adjuvant therapies should therefore be seriously reconsidered for this subset of patients.

**Key words** : rectal cancer, surgery, local recurrence, site of local recurrence, preoperative imaging studies

[Jpn J Gastroenterol Surg 39 : 1787—1796, 2006]

**Reprint requests** : Kazunari Misawa Department of Gastroenterological Surgery, Nagoya University Graduate School of Medicine  
65 Tsurumai-cho, Showa-ku, Nagoya, 466-8550 JAPAN

**Accepted** : April 26, 2006

## Extensive but Hemiallelic Methylation of the hMLH1 Promoter Region in Early-Onset Sporadic Colon Cancers With Microsatellite Instability

YASUYUKI MIYAKURA,<sup>\*,†</sup> KOKICHI SUGANO,<sup>\*,§</sup> TAKAYUKI AKASU,<sup>||</sup> TERUHIKO YOSHIDA,<sup>§</sup> MASATO MAEKAWA,<sup>¶</sup> SOH SAITOH,<sup>#</sup> HIDEYUKI SASAKI,<sup>\*\*</sup> TADASHI NOMIZU,<sup>††</sup> FUMIO KONISHI,<sup>†,§§</sup> SHIN FUJITA,<sup>||</sup> YOSHIHIRO MORIYA,<sup>||</sup> and HIDEO NAGAI<sup>†</sup>

\*Oncogene Research Unit/Cancer Prevention Unit, Tochigi Cancer Center Research Institute, Tochigi; †Department of Surgery, Jichi Medical School, Tochigi; §Genetic Counseling Clinic, National Cancer Center Hospital, Tokyo; ||Department of Surgery, National Cancer Center Hospital, Tokyo; ¶Department of Laboratory Medicine, Hamamatsu Medical University, Hamamatsu; #Department of Gastroenterology, Aomori Prefectural Central Hospital, Aomori; \*\*Department of Surgery, Hachinohe City Hospital, Aomori; ††Hoshi General Hospital, Fukushima; and §§Department of Surgery, Jichi Medical School, Omiya Medical Center, Saitama, Japan

**Background & Aims:** Methylation of the hMLH1 promoter region is frequently observed in microsatellite instability (MSI)-positive sporadic colorectal carcinomas. We studied hMLH1 promoter methylation in peripheral blood lymphocytes of 87 index patients representing 29 cases of hereditary nonpolyposis colorectal cancers (HNPCCs), 28 cases of atypical HNPCCs, and 30 sporadic cases of the development of early-onset colorectal carcinomas or multiple primary cancers. **Methods:** Methylation of the hMLH1 promoter region was analyzed by Na-bisulfite polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism analysis or methylation-specific polymerase chain reaction. MSI, allelic status of the hMLH1 locus, and loss of hMLH1 protein expression were examined in cases for which tumor tissues were available. **Results:** Extensive methylation of the hMLH1 promoter was detected in peripheral blood lymphocytes of 4 of 30 patients with sporadic early-onset colon cancer, among whom multiple primary cancers (1 colon and 1 endometrial cancer) developed in 2 cases. This methylation was not detected in analyses of HNPCC or atypical HNPCC groups or healthy control subjects. MSI was positive, and extensive methylation was detected in both cancers (colon and endometrial cancer) and normal tissues (colon, gastric mucosa, endometrium, and bone marrow) in all of the examined cases (3 of 3). Analysis of a polymorphic site in the hMLH1 promoter in 2 informative cases showed that methylation was hemiallelic. In 1 case, the unmethylated allele was lost in the colon cancer but not in the metachronous endometrial cancer. **Conclusions:** Constitutive, hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region was shown to be associated with carcinogenesis in sporadic, early-onset MSI-positive colon cancers.

**H**ereditary nonpolyposis colorectal cancer (HNPCC) is an autosomal dominantly inherited syndrome predisposing to cancers of the colorectum, endometrium, ovary,

small intestine, and upper urinary tract.<sup>1</sup> The majority (85%–95%) of HNPCC tumors show microsatellite instability (MSI), which leads to the accumulation of deletion and insertion mutations at simple repeated sequences. In HNPCC, MSI is caused by germline mutations of mismatch repair genes (*MMR* genes) such as hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2, and hMSH6.<sup>2–7</sup> Among these *MMR* genes, mutations of hMSH2 and hMLH1 are known to be responsible for up to 45%–64% of HNPCCs.<sup>8,9</sup> HNPCCs are characterized phenotypically by early-onset colorectal carcinoma (CRC), prevalent tumor location in the proximal colon, and an increased risk of developing multiple CRCs and other malignancies.<sup>10–13</sup> On the other hand, some (10%–15%) sporadic CRCs also show MSI,<sup>14–16</sup> and methylation of the hMLH1 promoter region has been suggested to be the major mechanism in these cases.<sup>17–19</sup> Methylation of the hMLH1 promoter region and subsequent transcriptional silencing have been demonstrated in the formation of MSI-positive cancers.<sup>17–21</sup> In a previous study, methylation of the hMLH1 promoter region induced transcriptional silencing of both of the hMLH1 alleles in cell lines showing MSI<sup>22</sup> and this epigenetic mechanism of gene inactivation is in line with Knudson's two-hit hypothesis.<sup>23</sup> The proximal region of the hMLH1 promoter contains cis-elements important for regulating gene expression.<sup>24</sup> Methylation of an adjacent CpG site inhibits binding of the core binding

*Abbreviations used in this paper:* BIPS, Na-bisulfite treatment and PCR single-strand conformation polymorphism; CRC, colorectal carcinoma; HNPCC, hereditary nonpolyposis colorectal cancer; LOH, loss of heterozygosity; *MMR* gene, mismatch repair gene; MSI, microsatellite instability; MSI-H, high-frequency MSI; MSP, methylation-specific PCR; PBL, peripheral blood lymphocyte; PCR, polymerase chain reaction; RT-PCR, reverse-transcription PCR; SSCP, single-strand conformation polymorphism.

© 2004 by the American Gastroenterological Association  
1542-3565/04/\$30.00

PII: 10.1053/S1542-3565(03)00314-8

factor to the CCAAT box in this region and is one of the causes of *hMLH1* gene silencing in colon cancer cells.<sup>25</sup> We reported that extensive methylation (designated as full methylation) of the *hMLH1* promoter region played a crucial role in *hMLH1* gene inactivation,<sup>26</sup> and that full methylation occurred in both alleles of the *hMLH1* promoter region in high-frequency MSI (MSI-H) colon cancers.<sup>27</sup> In one third of the CRCs showing full methylation, methylation was also detected in the adjacent normal colonic mucosa, although it was confined to the most upstream region of the *hMLH1* promoter sequences (designated as partial methylation).<sup>27</sup> Sporadic MSI-positive CRCs show different clinicopathological characteristics from those of HNPCC in that they are preferentially associated with late-onset proximal colonic cancer in female patients,<sup>26,28</sup> suggesting that changes of hormonal status might be related to the development of the *hMLH1* promoter methylation. Recently, Gazzoli et al.<sup>29</sup> examined 14 cases of suspected HNPCC with MSI-H but no detectable germline mutations of *hMSH2*, *hMLH1*, and *hMSH6* for hypermethylation of the *hMLH1* promoter region, and they reported a case in which 1 allele of *hMLH1* was methylated in DNA isolated from blood, and biallelic inactivation of the *hMLH1* gene in the tumor was caused by a loss of heterozygosity (LOH) of the other allele. They suggested that this was a novel mode of germline inactivation of a cancer susceptibility gene.

In this study we analyzed the methylation status of the *hMLH1* promoter region in peripheral blood lymphocytes (PBLs) of patients referred to genetic counseling clinics because of the suspicion of an HNPCC. We detected constitutive methylation of the *hMLH1* promoter region in 4 cases of early-onset sporadic MSI-H CRCs. They displayed hemiallelic but full methylation of the *hMLH1* promoter region in normal tissues such as PBLs, normal colonic mucosa, endometrium, gastric mucosa, and bone marrow, exhibiting distinctly different clinical characteristics from both cases of HNPCC and cases of sporadic MSI-H CRC.

## Materials and Methods

### Patients

The study protocol was carried out after receiving institutional review board approval and written informed consent for the study from 87 index patients. PBLs were obtained from the 87 index patients, who visited genetic counseling clinics because of suspicion of HNPCC. All of these patients developed CRCs, and 29 of them fulfilled 1 of the 2 HNPCC criteria, i.e., the Amsterdam's minimum criteria or the modified Amsterdam criteria.<sup>30-32</sup> Twenty-eight kindred were classified as having atypical HNPCC, because they had at least 1 first-degree relative with CRC but did not fulfill the above-

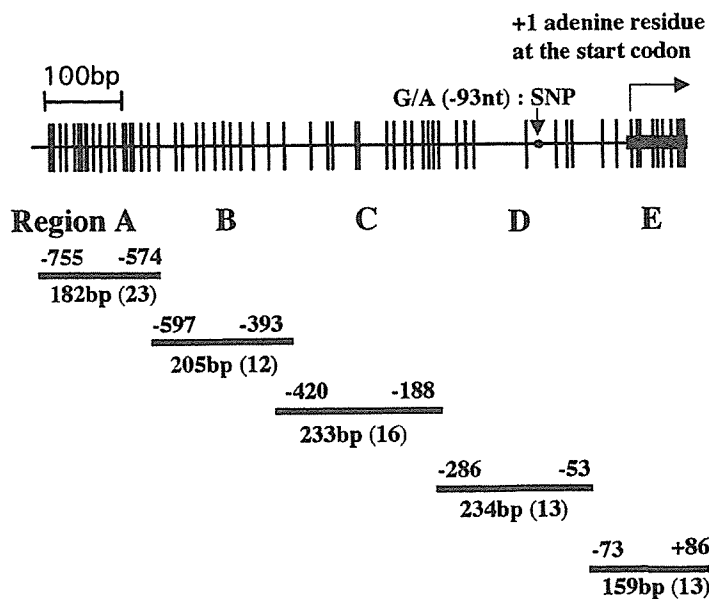
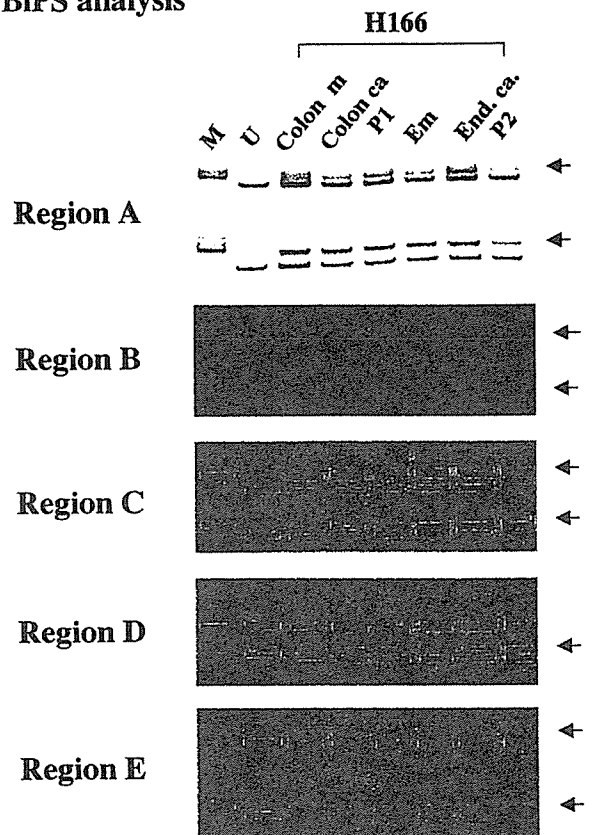
mentioned criteria. Of the kindred with atypical HNPCC, 13 kindred fulfilled the second (B-2) and/or fourth (B-4) criteria of the Bethesda guidelines,<sup>33</sup> i.e., individuals with 2 HNPCC-related cancers, including synchronous and metachronous CRCs or associated extracolonic cancers (5 cases) (B-2), individuals with CRC or endometrial cancer diagnosed at age younger than 45 years (6 cases) (B-4), and 2 cases fulfilled both of these 2 criteria (B-2 + B-4). Thirty kindred fulfilled neither the criteria for HNPCC nor atypical HNPCC. They developed early-onset CRCs when younger than the age of 50 years or multiple CRCs and/or extracolonic cancers, without showing familial predisposition to HNPCC-related tumors in their first-degree relatives. As to the relation with the Bethesda guidelines, the number of cases fulfilling the second or fourth criteria of the Bethesda guidelines was 4 (B-2), 20 (B-4), and 2 (B-2 + B-4), respectively. Regarding case H403, a case of sporadic CRC showing constitutive methylation of the *hMLH1* promoter region, the proband's sister visited the clinic for genetic counseling, and her PBLs were examined for methylation. The methylation status of the *hMLH1* promoter region was also examined in PBLs from 100 normal healthy control subjects older than 50 years undergoing routine health checkups. Before the analysis, samples were made unlinkable as to their personal information.

### Analysis of MSI

In 4 cases showing aberrant methylation of the *hMLH1* promoter region, the MSI status was examined in all available samples, including tumor tissues and normal tissues such as PBLs, colonic mucosa, gastric mucosa, endometrium, and bone marrow aspirate. Genomic DNAs were subjected to polymerase chain reaction (PCR) amplification at 9 microsatellite repeat loci (*D2S123*, *D5S346*, *D17S250*, *BAT26*, *BAT25*, *MSH3*, *MSH6*, *TGFBR2*, and *BAX*). Analysis of MSI was performed as described previously.<sup>26</sup> The definition of MSI status was as follows: high-frequency MSI (MSI-H), when 30% or greater of the 9 markers showed MSI, in accordance with the recommendation of the National Cancer Institute Workshop.<sup>34</sup>

### Methylation Analysis of the *hMLH1* Promoter Region

Na-bisulfite PCR/single-strand conformation polymorphism (SSCP) (BiPS) analysis was performed as described previously<sup>26,35</sup> (Figure 1). With the adenine residue at the start codon numbered as +1nt, the *hMLH1* promoter (-755 to +86) was divided into 5 regions (region A [from -755 to -574, containing 23 CpG sites], B [from -597 to -393, 12 CpG sites], C [from -420 to -188, 16 CpG sites], D [from -286 to -53, 13 CpG sites], and E [from -73 to +86, 13 CpG sites]) and was amplified with 5 sets of PCR primers. Each primer set was designed to anneal to both methylated and unmethylated DNAs, of which the amplicons could be separated by SSCP analysis. Amplified DNA fragments were visualized by using SYBR Gold nucleic acid gel stain (Cosmo Bio

**A** *hMLH1* promoter region**B** BiPS analysis

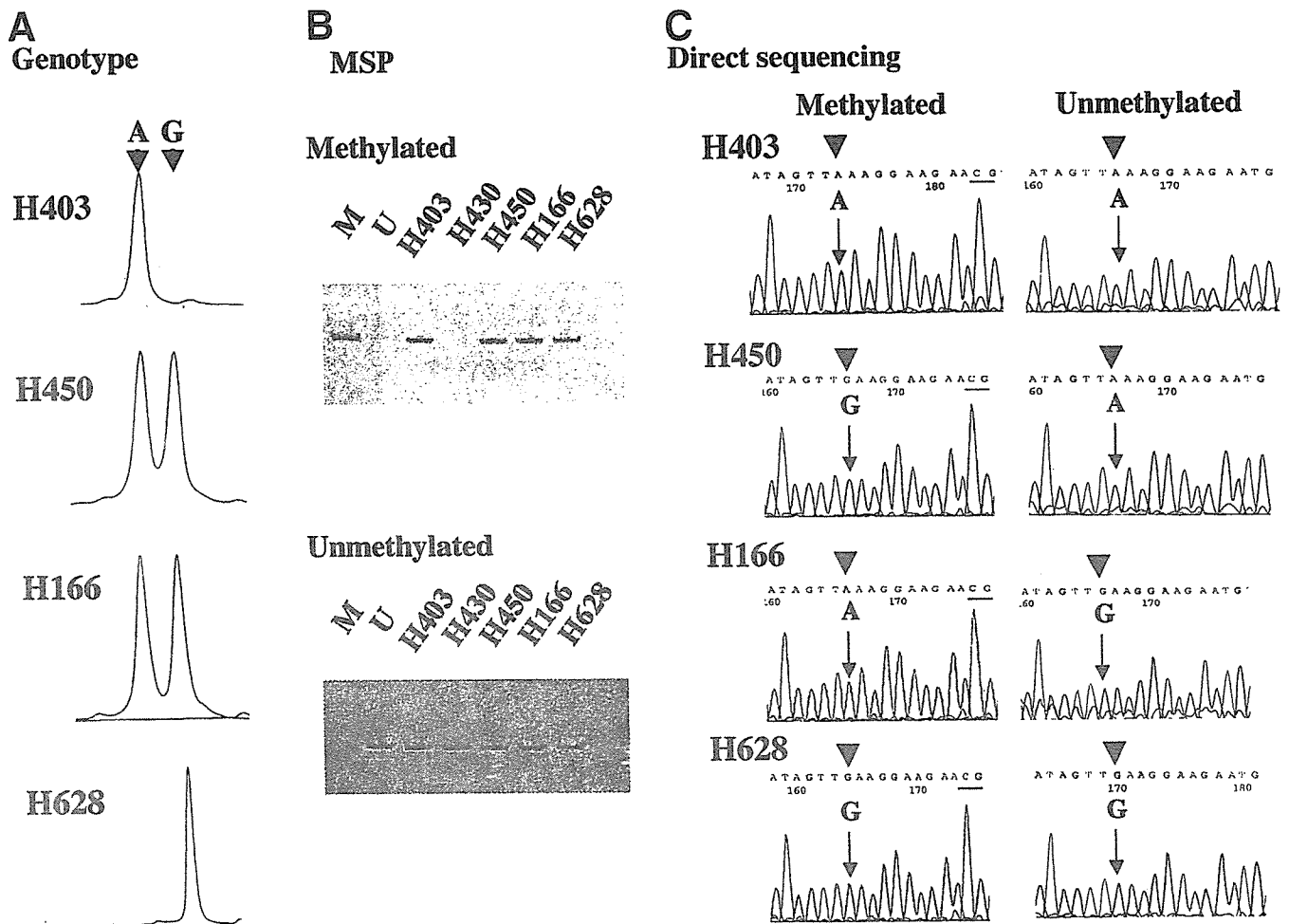
**Figure 1.** BiPS analysis of *hMLH1* promoter region and methylation profiles of various tissues in case H166. (A) Map of the 5' CpG islands of the *hMLH1* gene. CpG sites are indicated by vertical lines. The arrow indicates G/A polymorphism at position -93nt in the *hMLH1* promoter region. The expected PCR products for regions A, B, C, D, and E are shown. Their positions relative to the adenine residue at the start codon and the sizes of the amplified DNA fragments are indicated. Figures in the parentheses indicate the numbers of CpG sites in each region. (B) Na-bisulfite treatment and PCR-SSCP (BiPS) analysis of the *hMLH1* promoter region in each tissue of case H166 (M, control methylated DNA; U, control unmethylated DNA; Colon m, colon normal mucosa; Colon ca, colon cancer; P1, PBLs obtained at 34 years of age (diagnosed with colon cancer); Em, endometrium; Eca, endometrial cancer; P2, PBLs obtained at 44 years of age (diagnosed with endometrial cancer)). We divided the *hMLH1* promoter into 5 regions (regions A-E) and examined the methylation status. DNAs from all samples in case H166 showed methylated bands in all regions, indicating full methylation of the *hMLH1* promoter region, which was confirmed by direct sequencing of the mutated bands (data not shown).

Co., Tokyo, Japan) and scanned with a Fluorescent Image Analyzer Model FLA-3000G (Fuji Photo Film Co., Tokyo, Japan). When the bands showed mobility shifts, they were cut from the gel, reamplified, and directly sequenced without subcloning by using an ABI 310 PRISM sequencer (Perkin-Elmer Co., Branchburg, NJ) with a Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Full methylation was defined as the state in which all CpG sites from regions A through E were methylated.<sup>26,27</sup> The allelic status of methylation was examined by direct sequencing of the G/A polymorphic site at -93nt in region D.<sup>36</sup> Furthermore, the methylation status of the *hMLH1* promoter region D was also analyzed by methylation-specific PCR (MSP) as described previously<sup>27</sup> (Figure 2B and C). The PCR product was mixed with 5× loading buffer, electrophoresed on a nondenaturing 8% polyacrylamide gel, stained with ethidium bromide, and scanned with a Fluorescent Image Analyzer Model FLA-3000G. DNA fragments amplified by MSP were subjected to direct sequencing, and

G/A polymorphism was examined to determine whether the methylation was a biallelic or hemiallelic event.

### Mutation Analysis of the *hMSH2* and *hMLH1* Genes

Total RNA was extracted from the PBLs treated with puromycin by using the acid guanidine phenol chloroform method.<sup>37</sup> Long reverse-transcription (RT)-PCR was carried out from RNAs extracted from PBLs incubated in the presence of puromycin, according to the method we reported previously.<sup>38,39</sup> Signals from mutated alleles are enhanced after puromycin treatment as a result of the suppression of nonsense-mediated mRNA decay and easily distinguishable from signals from the wild-type allele. This approach is a sensitive method to screen deleterious mutations such as nonsense or frameshift mutations and large genomic disorganizations resulting in genomic deletion or partial duplication of the *hMLH1* gene.<sup>39</sup> Sequencing reactions were performed by using a Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction kit. Elec-



**Figure 2.** Uniparental methylation of the *hMLH1* promoter region. (A) PCR/SSCP analysis of the SNP at position -93nt was used to determine the genotype of 4 cases, i.e., A/A for H403, A/G for H450 and H166, and G/G for H628. (B) MSP analysis of the *hMLH1* promoter region D. M, control methylated DNA; U, control unmethylated normal DNA. DNA derived from H403, H450, H166, and H628 showed a methylated band in the promoter region D. DNA derived from H430 (unaffected sister of H403) did not show a methylated band. In addition, DNA derived from all cases showed an unmethylated band in the same region. (C) Direct sequencing of the PCR products derived from the methylated and unmethylated fragments in MSP analysis. The arrow indicates G/A polymorphism at position -93nt in the *hMLH1* promoter region. One allele (allele G in H450, allele A in H166) was observed to be a methylated fragment, and the other allele (allele A in H450, allele G in H166) was observed to be an unmethylated fragment.

trophoresis was carried out by using an ABI 310 PRISM sequencer. Primers used for direct sequencing were described in a previous report.<sup>38</sup> All mutations detected by direct sequencing were confirmed by PCR-based sequencing of the corresponding region of genomic DNA.

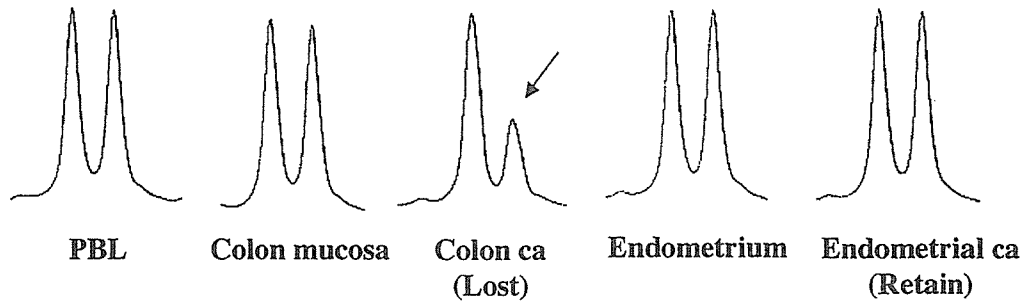
#### Analysis of Allelic Loss of *hMLH1*

Analysis of LOH of *hMLH1* was performed as described previously<sup>27,40</sup> (Figure 3). Briefly, an ALFexpress DNA sequencer (Pharmacia, Tokyo, Japan) was used for SSCP analysis. Electrophoresis was performed at 20W for 1500 minutes with a 15% polyacrylamide gel. During electrophoresis, the gel was kept at a constant temperature of 16°C by using a circulating water bath. The data were analyzed by using the software package Fragment Manager (Pharmacia, Tokyo, Japan). LOH was defined when the peak height of the signal

from either allele was decreased more than 50% as compared with that of the normal control.

#### Immunohistochemical Examination of *hMLH1*

Immunohistochemistry was performed as described previously<sup>26</sup> (Figure 4). Briefly, tissue sections were deparaffinized with xylene and dehydrated by using a graded series of ethanol. Antigen retrieval was performed in citrate buffer by using a heat-induced microwave oven. The avidin-biotin-conjugated immunoperoxidase technique was performed by using a DAKO LSAB2 Kit (DAKO, Carpinteria, CA). Endogenous peroxidase activity was blocked by methanol supplemented with 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Sections were immersed in 4% commercial nonfat skim milk powder to inhibit nonspecific antibody binding. The sections were then incubated overnight



**Figure 3.** Electropherograms of SSCP analysis showing allelic loss of *hMLH1* in colon and endometrial tissues of case H166. Allelic loss was detected only in the colon cancer, and the position of the lost allele is indicated by an arrow.

**LOH of the *hMLH1* locus (H166)**

with mouse monoclonal antibody to the *hMLH1* gene product (clone G168-15; PharMingen, San Diego, CA) (at a 1:50 dilution) and then with biotinylated secondary antibody and peroxidase-labeled avidin-biotin complex for 30 minutes, and staining was visualized by incubating the sections with 0.02% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 0.02% diaminobenzidine in methanol for 10 minutes.

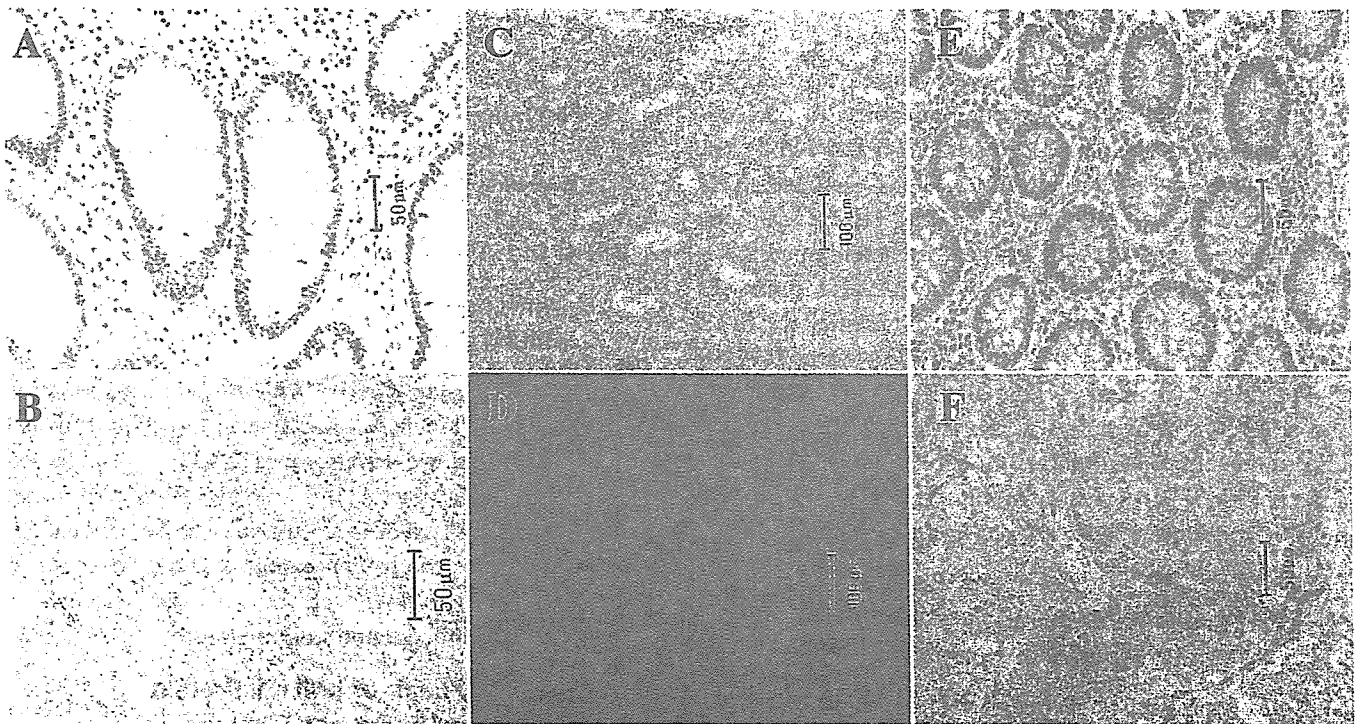
**Results**

**Characteristics of Four Cases With Extensive Methylation of *hMLH1* Promoter Region in PBLs**

Analysis of PBLs from 87 index patients in whom HNPCC was suspected revealed extensive methylation of the *hMLH1* promoter region in 4 cases (H166, H403,

H450, and H628), whose characteristics are shown in Table 1. They were characterized by early-onset colon cancer and absence of family history of CRC in their first-degree relatives. Case H166 developed ascending colon cancer and endometrial cancer at the ages of 38 and 44 years, respectively, and PBL samples taken after the onset of each cancer showed extensive methylation of the *hMLH1* promoter region. Case H628 developed descending colon cancer at 29 years of age and had a history of left colectomy as a result of descending colon cancer at 17 years of age.

We examined MSI and methylation status of the *hMLH1* promoter region in colon cancer (H403, H166, and H628), endometrial cancer (H166) tissues, and in their normal counterparts (Figure 1B, Table 1). All of the



**Figure 4.** Immunohistochemical staining for *hMLH1* expression in colon tissues of case H166 (A, B) and H628 (E, F) and endometrial tissues of case H166 (C, D). Positive nuclear staining was observed in normal colonic mucosa (A, E) and endometrium (C), whereas a lack of positive nuclear staining was observed in carcinomas of the colon (B, F) and endometrium (D).

**Table 1.** Characteristics of Patients With Extensive Methylation of *hMLH1* Promoter Region in Lymphocyte Cells

Case	Age <sup>a</sup>	Sex	Site	Family history		Genotype <sup>c</sup>	Specimen	MSI	<i>hMLH1</i>			<i>hMSH2</i> mutation
				CRC <sup>b</sup>	Other cancer				Methylation	Mutation <sup>d</sup>	IHC	
H166	38	F	A	-	-	A/G	PBL	38 yr	MSS	Full	-	-
							Colon mucosa		MSS	Full		+
							Colon cancer		MSI-H	Full		-
							PBL	44 yr	MSS	Full		-
							Endometrium		MSS	Full		+
							Endometrial cancer		MSI-H	Full		-
							Colon mucosa	45 yr (biopsy)	MSS	Full		
H403	28	M	T	-	Gastric cancer (grandfather)	A/A	Gastric mucosa		MSS	Full	-	-
							Bone marrow		MSS	Full		-
							PBL		MSS	Full		N.D.
H450	23	F	A	-	Pancreas cancer (grandmother)	A/G	Colon mucosa		MSI-H	Full		N.D.
							PBL		MSS	Full		-
H628	29	M	D (17 yr)	-	Gastric cancer (grandfather)	G/G	Colon mucosa		MSS	Full		-
							PBL		MSS	N.D.		+
							Colon mucosa (biopsy)		MSI-H	N.D.		-
							Colon cancer (biopsy)		MSS	Full		
							Colon mucosa (biopsy)		MSS	Full		
			A (29 yr)	-	Breast cancer (aunt)		Colon mucosa		MSS	Full		-
							Colon mucosa (biopsy)		MSS	Full		-
					Breast cancer (aunt)		Gastric mucosa		MSS	Full		-

IHC, immunohistochemical analysis; A, ascending colon; MSS, MSI-stable; T, transverse colon; N.D., not done; D, descending colon; PBL, peripheral blood lymphocyte; MSI-H, high-frequency MSI; +, positive staining; -, negative staining.

<sup>a</sup>CRC onset age.

<sup>b</sup>No family history of CRC.

<sup>c</sup>*hMLH1* promoter genotype (-93 nt from translation start site).

<sup>d</sup>Mutation negative.

tumors showed MSI-H, and extensive methylation of the *hMLH1* promoter region was demonstrated in both tumors and normal mucosa. In cases H166 and H628, the patients underwent further examinations postoperatively such as digestive endoscopy (H166 and H628) and bone marrow aspiration (H166) for persistent leukopenia.

In both cases, methylation of the *hMLH1* promoter region was shown to be constitutive and hemiallelic in all samples examined. PBLs of case H403's sister (H430) did not show the methylation (Figure 2B). The PBLs of the other family members were not available. No germline mutations were detected in the *hMLH1* or *hMSH2* genes of these 4 patients. Methylation of the *hMLH1* promoter region was not detected in the PBLs of 100 healthy blood donors.

#### Hemiallelic Methylation of *hMLH1* Promoter Region in Normal Tissues

We previously reported that methylation of the *hMLH1* promoter region was a biallelic event in MSI-positive CRCs.<sup>27</sup> To determine whether methylation of the *hMLH1* promoter region in PBL is a biallelic epige-

netic event, we examined the methylation status of this region by using G/A polymorphism at position -93nt in the *hMLH1* promoter by use of MSP combined with DNA sequencing (Figures 1 and 2A). In the 2 informative cases, we could confirm that methylation was hemiallelic (allele G in H450, allele A in H166) in all specimens.

#### Immunohistochemical Assessment of *hMLH1* Protein Expression

To determine whether *hMLH1* gene inactivation was caused by extensive methylation of the *hMLH1* promoter region, we investigated *hMLH1* protein expression in colon (cases H166 and H628) and endometrial (case H166) tissues by immunohistochemistry (Figure 4). *hMLH1* protein expression was not detected in colon or endometrial cancer, but it was detected in normal colonic mucosa and endometrium.

#### Cause of Lack of *hMLH1* Protein Expression in Cancer Tissues

To determine how the hemiallelic methylation of the *hMLH1* promoter region induced silencing of



*hMLH1* protein expression in cancer tissues, we investigated the LOH of *hMLH1* in case H166 (Figure 3). Analysis of the colon cancer showed somatic loss of the G allele at the *hMLH1* locus, and biallelic inactivation of the *hMLH1* gene was caused by extensive methylation of allele A, followed by loss of the opposite allele. However, analysis of the endometrial cancer did not show LOH, and thus we could not identify the cause of the reduced expression of *hMLH1* protein in endometrial cancer.

## Discussion

In the present study we examined the methylation status of the *hMLH1* promoter region in 87 index patients in whom HNPCC was suspected. The 87 index cases included 30 cases that were sporadic but had developed early-onset CRCs or multiple primary cancers. We identified 4 of 30 sporadic cases with extensive methylation of the *hMLH1* promoter region in PBLs. They all developed CRCs at a very young age (the age at onset for a first cancer varied from 17 through 38 years of age), and there were no HNPCC-related cancers in their first-degree relatives. Analysis of 2 cases heterozygous for a G/A polymorphism at position -93nt showed that the methylation was hemiallelic (Figure 2C). These findings were in accord with those of a case reported by Gazzoli et al.<sup>29</sup> Those authors reported hypermethylation of the *hMLH1* promoter region in 1 allele in the DNA from PBLs of a CRC patient with young age (25 years) at onset and without family history of CRC. We examined the methylation status of the *hMLH1* promoter region in DNAs from various tissues, including normal mucosa of the colon, stomach, and endometrium and bone marrow, and the methylation was invariably detected in all tissues examined. Methylation occurred as a constitutive, hemiallelic event. All of these 4 cases were early-onset, and they were also sporadic without family history of HNPCC-related tumors in their first-degree relatives. PBLs of case H403's sister (H430) did not show the methylation (Figure 2B). The PBLs of the other family members were not available. Constitutive methylation of the *hMLH1* promoter region was not detected in analyses of HNPCC or atypical HNPCC groups or healthy control subjects. Taken together, these findings suggest that hemiallelic methylation was not heritable, and that it was inconsistent with the mode of autosomal dominant mendelian inheritance, although aberrant methylation might be due to other unknown genetic mechanisms.

In MSI-H CRCs, methylation of the *hMLH1* promoter region has been reported to be extensive, usually occurring in both alleles of the *hMLH1* promoter, and strong association has been observed between the meth-

ylation profile of the *hMLH1* promoter region and the clinicopathologic background of the cases, i.e., preferential occurrence in the proximal colon, female predominance, and older age at onset.<sup>26,28</sup> The 4 cases studied here showed different characteristics from ordinary MSI-H tumors in that the methylation was a constitutive but hemiallelic event, preferentially observed in early-onset CRC and without gender specificity (2 male and 2 female patients). The frequency of constitutive methylation of the *hMLH1* promoter region was 13.3% (4 of 30 cases) in the cases of sporadic CRCs we examined, suggesting that hemiallelic methylation of the *hMLH1* promoter region accounts for a subset of early-onset sporadic CRCs with MSI-H. Liu et al.<sup>41</sup> identified 1 case of germline mutation in early-onset CRC showing MSI, but the previously reported rates of detection of mutations in the *MMR* genes in early-onset CRCs were low.<sup>42-44</sup> A study of 31 patients younger than 35 years of age and not fulfilling the Amsterdam minimum criteria, in which MSI was exhibited in 18 cases (58%), was also reported.<sup>45</sup> Twelve of those cases were evaluated for alterations of *MMR* genes, and 5 (42%) were found to harbor germline mutations of either *hMSH2* or *hMLH1*. Germline mutations of *MMR* genes might account for a part of early-onset CRCs, and some of them are suspected to be *de novo* mutations.

In our analysis of 30 sporadic cases, we detected 3 cases of germline mutations of the *MMR* genes (data not shown), whereas no germline mutations of *hMSH2* or *hMLH1* were detected in analyses of the 4 patients described here. Genomic disorganizations such as large deletions or duplications of the *MMR* genes have been thought to occur in a considerable proportion of HNPCC cases.<sup>46,47</sup> Previously, we reported 2 cases of genomic deletion and 1 case of partial duplication of the *hMLH1* gene that were detected by using long RT-PCR from puromycin-treated samples, and this method is sensitive enough to screen large genomic disorganizations of the *MMR* genes.<sup>39</sup> Recently, several genes were reported to be involved in familial predisposition to CRC.<sup>48-50</sup> In the case of *hMSH6*, many of the mutation carriers develop carcinomas of the distal colon and endometrium, and analysis of tumor tissues showed that half of them were MSI-negative.<sup>48</sup> As for *MYH*, the mutation carriers showed autosomal recessive inheritance, whereas their phenotypes were characterized by the presence of multiple colorectal adenomas.<sup>49,50</sup> The clinical characteristics of our cases seem to be incompatible with mutations of these 2 genes.

In case H166, biallelic inactivation of the *hMLH1* gene in colon cancer was caused by an LOH of the

unmethylated allele (Figure 3). Gazzoli et al.<sup>29</sup> reported that biallelic inactivation resulted in loss of hMLH1 protein expression in the tumor and suggested a novel mode of germline inactivation of a cancer susceptibility gene. These results were inconsistent with our previous study showing that allelic loss of the hMLH1 locus was infrequent, and methylation was biallelic in the majority of the ordinary MSI-H sporadic CRCs.<sup>27</sup> All of the 4 cases examined here were postoperative, and it remains unclear when the methylation of the hMLH gene occurred.

In case H166, the patient developed ascending colon cancer at the age of 38 years and endometrial cancer at the age of 44 years. In case H628, the patient developed descending colon cancer at the age of 17 years and ascending colon cancer at the age of 29 years (Table 1). In retrospective analysis, MSI-positive sporadic CRC patients have been reported to be at risk for developing extracolonic cancers and metachronous multiple CRCs.<sup>51-54</sup> Full methylation of the hMLH1 promoter region in PBLs might have a significant influence on the carcinogenesis of these multiple primary cancers and might be a potent diagnostic marker for identifying individuals at high risk of developing cancer.

In conclusion, we have tentatively identified a rare group of patients who have the MSI-H phenotype, show early-onset colon cancers without a family history of CRC, and exhibit extensive but hemiallelic methylation of the hMLH1 promoter region in PBLs and other normal tissues.

## References

- Lynch HT, de la Chapelle A. Genetic susceptibility to non-polyposis colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:801-818.
- Fishel R, Lescoe MK, Rao MR, Copeland NG, Jenkins NA, Garber J, Kane M, Kolodner R. The human mutator gene homolog MSH2 and its association with hereditary nonpolyposis colon cancer. *Cell* 1993;75:1027-1038.
- Leach FS, Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Jen J, Parsons R, Peltomaki P, Sistonen P, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Guan XY, Zhang J, Meltzer PS, Yu JW, Kao FT, Chen DJ, Carosaletti KM, Fournier REK, Todd S, Lewis T, Leach RJ, Naylor SL, Weissenbach J, Mecklin JP, Jarvinen H, Petersen GM, Hamilton SR, Green J, Jass J, Watson P, Lynch HT, Trent JM, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutations of a mutS homolog in hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *Cell* 1993;75:1215-1225.
- Bronner CE, Baker SM, Morrison PT, Warren G, Smith LG, Lescoe M, Kane M, Earabino C, Lipford J, Lindblom A, Tannergard P, Bollag RJ, Godwin AR, Ward DC, Nordenskjold M, Fishel R, Kolodner R, Liskay RM. Mutation in the DNA mismatch repair gene homologue hMLH1 is associated with hereditary non-polyposis colon cancer. *Nature* 1994;368:258-261.
- Nicolaides NC, Papadopoulos N, Liu B, Wei YF, Carter KC, Ruben SM, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Dunlop MG, Hamilton SR, Petersen GM, de la Chapelle A, Vogelstein B, Kinzler KW. Mutations of two PMS homologues in hereditary nonpolyposis colon cancer. *Nature* 1994;371:75-80.
- Papadopoulos N, Nicolaides NC, Wei YF, Ruben SM, Carter KC, Rosen CA, Haseltine WA, Fleischmann RD, Fraser CM, Adams MD, Venter JC, Hamilton SR, Petersen GM, Watson P, Lynch HT, Peltomaki P, Mecklin JP, de la Chapelle A, Kinzler KW, Vogelstein B. Mutation of a mutL homolog in hereditary colon cancer. *Science* 1994;263:1625-1629.
- Akiyama Y, Sato H, Yamada T, Nagasaki H, Tsuchiya A, Abe R, Yuasa Y. Germ-line mutation of the hMSH6/GTBP gene in an atypical hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindred. *Cancer Res* 1997;57:3920-3923.
- Liu B, Parsons R, Papadopoulos N, Nicolaides NC, Lynch HT, Watson P, Jass JR, Dunlop M, Wyllie A, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW. Analysis of mismatch repair genes in hereditary non-polyposis colorectal cancer patients. *Nat Med* 1996;2:169-174.
- Wijnen J, Khan PM, Vasen H, van der Klift H, Mulder A, van Leeuwen-Cornelisse I, Bakker B, Losekoot M, Moller P, Fodde R. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer families not complying with the Amsterdam criteria show extremely low frequency of mismatch-repair-gene mutations. *Am J Hum Genet* 1997;61:329-335.
- Mecklin JP, Jarvinen HJ. Tumor spectrum in cancer family syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer). *Cancer* 1991;68:1109-1112.
- Lynch HT, Smyrk TC, Watson P, Lanspa SJ, Lynch JF, Lynch PM, Cavalieri RJ, Boland CR. Genetics natural history, tumor spectrum, and pathology of hereditary nonpolyposis colorectal cancer: an updated review. *Gastroenterology* 1993;104:1535-1549.
- Aarnio M, Mecklin JP, Aaltonen LA, Nystrom-Lahti M, Jarvinen HJ. Life-time risk of different cancers in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) syndrome. *Int J Cancer* 1995;64:430-433.
- Kinzler KW, Vogelstein B. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 1996;87:159-170.
- Aaltonen LA, Peltomaki P, Leach FS, Sistonen P, Pylkkanen L, Mecklin JP, Jarvinen H, Powell SM, Jen J, Hamilton SR, Petersen GM, Kinzler KW, Vogelstein B, Chapelle A. Clues to the pathogenesis of familial colorectal cancer. *Science* 1993;260:812-816.
- Thibodeau SN, Bren G, Schaid D. Microsatellite instability in cancer of the proximal colon. *Science* 1993;260:816-819.
- Kim H, Jen J, Vogelstein B, Hamilton SR. Clinical and pathological characteristics of sporadic colorectal carcinomas with DNA replication errors in microsatellite sequences. *Am J Pathol* 1994;145:148-156.
- Kane MF, Loda M, Gaida GM, Lipman J, Mishra R, Goldman H, Jessup JM, Kolodner R. Methylation of the hMLH1 promoter correlates with lack of expression of hMLH1 in sporadic colon tumors and mismatch repair-defective human tumor cell lines. *Cancer Res* 1997;57:808-811.
- Cunningham JM, Christensen ER, Tester DJ, Kim CY, Roche PC, Burgart LJ, Thibodeau SN. Hypermethylation of hMLH1 promoter in colon cancer with microsatellite instability. *Cancer Res* 1998;58:3455-3460.
- Herman JG, Umar A, Polyak K, Graff JR, Ahuja N, Issa JP, Markowitz S, Willson JK, Hamilton SR, Kinzler KW, Kane MF, Kolodner RD, Vogelstein B, Kunkel TA, Baylin SB. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:6870-6875.
- Esteller M, Levine R, Baylin SB, Ellenson LH, Herman JG. MLH1 promoter hypermethylation is associated with the microsatellite instability phenotype in sporadic endometrial carcinomas. *Oncogene* 1998;17:2413-2417.
- Leung SY, Yuen ST, Chung LP, Chu KM, Chan AS, Ho JC. hMLH1 promoter methylation and lack of hMLH1 expression in sporadic

- gastric carcinomas with high-frequency microsatellite instability. *Cancer Res* 1999;59:159–164.
22. Veigl ML, Kasturi L, Olechnowicz J, Ma A, Lutterbaugh JD, Periyasamy S, Li G-M, Drummond J, Modrich PL, Sedwick WD, Markowitz SD. Biallelic inactivation of *hMLH1* by epigenetic gene silencing, a novel mechanism causing human MSI cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8698–8702.
  23. Jones PA, Laird PW. Cancer epigenetics comes of age. *Nat Genet* 1999;21:163–167.
  24. Deng G, Chen A, Hong J, Chae HS, Kim YS. Methylation of CpG in a small region of the *hMLH1* promoter invariably correlates with the absence of gene expression. *Cancer Res* 1999;59:2029–2033.
  25. Deng G, Chen A, Pong E, Kim YS. Methylation in *hMLH1* promoter interferes with its binding to transcription factor CBF and inhibits gene expression. *Oncogene* 2001;20:7120–7127.
  26. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Ichikawa A, Maekawa M, Shitoh K, Igarashi S, Kotake K, Koyama Y, Nagai H. Extensive methylation of *hMLH1* promoter region predominates in proximal colon cancer with microsatellite instability. *Gastroenterology* 2001;121:1300–1309.
  27. Miyakura Y, Sugano K, Konishi F, Fukayama N, Igarashi S, Kotake K, Matsui T, Koyama Y, Maekawa M, Nagai H. Methylation profile of the *MLH1* promoter region and their relationship to colorectal carcinogenesis. *Genes Chromosomes Cancer* 2003;36:17–25.
  28. Young J, Simms LA, Biden KG, Wynter C, Whitehall V, Karamatic R, George J, Goldblatt J, Walpole I, Robin SA, Borten MM, Stitz R, Searle J, McKeone D, Fraser L, Purdie DR, Podger K, Price R, Buttenshaw R, Walsh MD, Barker M, Leggett BA, Jass JR. Features of colorectal cancers with high-level microsatellite instability occurring in familial and sporadic settings: parallel pathways of tumorigenesis. *Am J Pathol* 2001;159:2107–2116.
  29. Gazzoli I, Loda M, Garber J, Syngal S, Kolodner RD. A hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma case associated with hypermethylation of the *MLH1* gene in normal tissue and loss of heterozygosity of the unmethylated allele in the resulting microsatellite instability-high tumor. *Cancer Res* 2002;62:3925–3928.
  30. Benatti P, Sassatelli R, Roncucci L, Pedroni M, Fante R, Di Gregorio C, Losi L, Gelmini R, Ponz de Leon M. Tumour spectrum in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) and in families with “suspected HNPCC”: a population-based study in northern Italy—Colorectal Cancer Study Group. *Int J Cancer* 1993;54:371–377.
  31. Bellacosa A, Genuardi M, Anti M, Viel A, Ponz de Leon M. Hereditary nonpolyposis colorectal cancer: review of clinical, molecular genetics, and counseling aspects. *Am J Med Genet* 1996;62:353–364.
  32. Syngal S, Fox EA, Li C, Dovidio M, Eng C, Kolodner RD, Garber JE. Interpretation of genetic test results for hereditary nonpolyposis colorectal cancer. *JAMA* 1999;282:247–253.
  33. Rodriguez-Bigas MA, Boland CR, Hamilton SR, Henson DE, Jass JR, Khan PM, Lynch H, Perucho M, Smyrk T, Sobin L, Srivastava S. A National Cancer Institute workshop on hereditary nonpolyposis colorectal cancer syndrome: meeting highlights and Bethesda guidelines. *J Natl Cancer Inst* 1997;89:1758–1762.
  34. Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. *Cancer Res* 1998;58:5248–5257.
  35. Maekawa M, Sugano K, Kashiwabara H, Ushima M, Fujita S, Yoshimori M, Kakizoe T. DNA methylation analysis using bisulfite treatment and PCR-single-strand conformation polymorphism in colorectal cancer showing microsatellite instability. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;262:671–676.
  36. Ito E, Yanagisawa Y, Iwahashi Y, Suzuki Y, Nagasaki H, Akiyama Y, Sugano S, Yuasa Y, Maruyama K. A core promoter and a frequent single-nucleotide polymorphism of the mismatch repair gene *hMLH1*. *Biochem Biophys Res Commun* 1999;256:488–494.
  37. Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 1987;162:156–159.
  38. Nomura S, Sugano K, Kashiwabara H, Taniguchi T, Fukayama N, Fujita S, Akasu T, Moriya Y, Ohhigashi S, Kakizoe T, Sekiya T. Enhanced detection of deleterious and other germline mutations of *hMSH2* and *hMLH1* in Japanese hereditary nonpolyposis colorectal cancer kindreds. *Biochem Biophys Res Commun* 2000;271:120–129.
  39. Sumitsuji I, Sugano K, Matsui T, Fukayama N, Yamaguchi K, Akasu T, Fujita S, Moriya Y, Yokoyama R, Nomura S, Yoshida T, Kodama T, Ogawa M. Frequent genomic disorganization of *MLH1* in hereditary non-polyposis colorectal cancer (HNPCC) screened by RT-PCR on puromycin treated samples. *J Med Genet* 2003;40:e30.
  40. Sugano K, Nakashima Y, Yamaguchi K, Fukayama N, Maekawa M, Ohkura H, Kakizoe T, Sekiya T. Sensitive detection of loss of heterozygosity in the *TP53* gene in pancreatic adenocarcinoma by fluorescence-based single-strand conformation polymorphism analysis using blunt-end DNA fragment. *Genes Chromosomes Cancer* 1996;15:157–164.
  41. Liu B, Nicolaidis NC, Markowitz S, Willson LKV, Parsons R, Jen J, Papadopoulos N, Peltomaki P, de la Chapelle A, Hamilton SR, Kinzler KW, Vogelstein B. Mismatch repair gene defects in sporadic colorectal cancers with microsatellite instability. *Nat Genet* 1995;2:48–55.
  42. Yuan Y, Han HJ, Zheng S, Park JG. Germline mutations of *hMLH1* and *hMSH2* genes in patients with suspected hereditary nonpolyposis colorectal cancer and sporadic early-onset colorectal cancer. *Dis Colon Rectum* 1998;41:434–440.
  43. Verma L, Kane MF, Brassett C, Schmeits J, Evans DG, Kolodner RD, Maher ER. Mononucleotide microsatellite instability and germline *MSH6* mutation analysis in early onset colorectal cancer. *J Med Genet* 1999;36:678–682.
  44. Shin KH, Shin JH, Kim JH, Park JG. Mutational analysis of promoters of mismatch repair genes *hMSH2* and *hMLH1* in hereditary nonpolyposis colorectal cancer and early onset colorectal cancer patients: identification of three novel germ-line mutations in promoter of the *hMSH2* gene. *Cancer Res* 2002;62:38–42.
  45. Liu B, Farrington SM, Petersen GM, Hamilton SR, Parsons R, Papadopoulos N, Fujiwara T, Jen J, Kinzler KW, Wylie A, Vogelstein B, Dunlop M. Genetic instability occurs in the majority of young patients with colorectal cancer. *Nat Med* 1995;1:348–352.
  46. Wijnen J, van der Klift H, Vasen H, Khan PM, Menko F, Tops C, Meijers Heijboer H, Lindhout D, Moller P, Fodde R. *MSH2* genomic deletions are a frequent cause of HNPCC. *Nat Genet* 1998;20:326–328.
  47. Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D, McElgunn CJ, Schouten JP, Menko FH. Genomic deletions of *MSH2* and *MLH1* in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer* 2002;87:892–897.
  48. Berends MJ, Wu Y, Sijmons RH, Mensink RG, van der Sluis T, Hordijk-Hos JM, de Vries EG, Hollema H, Karrenbeld A, Buys CH, van der Zee AG, Hofstra RM, Kleibeuker JH. Molecular and clinical characteristics of *MSH6* variants: an analysis of 25 index carriers of a germline variant. *Am J Hum Genet* 2002;70:26–37.
  49. Jones S, Emmerson P, Maynard J, Best JM, Jordan S, Williams GT, Sampson JR, Cheadle JP. Biallelic germline mutations in *MYH* predispose to multiple colorectal adenoma and somatic G:C→T:A mutations. *Hum Mol Genet* 2002;11:2961–2967.

50. Al-Tassan N, Chmiel NH, Maynard J, Fleming N, Livingston AL, Williams GT, Hodges AK, Davies DR, David SS, Sampson JR, Cheadle JP. Inherited variants of MYH associated with somatic G:C→T:A mutations in colorectal tumors. *Nat Genet* 2002;30:227–232.
51. Horii A, Han HJ, Shimada M, Yanagisawa A, Kato Y, Ohta H, Yasui W, Tahara E, Nakamura Y. Frequent replication errors at microsatellite loci in tumors of patients with multiple primary cancers. *Cancer Res* 1994;54:3373–3375.
52. Masubuti S, Konishi F, Togashi K, Okamoto T, Senba S, Shitoh K, Kashiwagi H, Kanazawa K, Tsukamoto T. The significance of microsatellite instability in predicting the development of metachronous multiple colorectal carcinomas in patients with nonfamilial colorectal carcinoma. *Cancer* 1999;85:1917–1924.
53. Yamashita K, Arimura Y, Kurosawa S, Itoh F, Endo T, Hirata K, Imamura A, Kondo M, Sato T, Imai K. Microsatellite instability in patients with multiple primary cancers of the gastrointestinal tract. *Gut* 2000;46:790–794.
54. Shitoh K, Konishi F, Miyakura Y, Togashi K, Okamoto T, Nagai H. Microsatellite instability as a marker in predicting metachronous multiple colorectal carcinomas after surgery: a cohort-like study. *Dis Colon Rectum* 2002;45:329–333.

---

Address reprint requests to: Kokichi Sugano, M.D., Oncogene Research Unit/Cancer Prevention Unit, Tohigi Cancer Center Research Institute, 4-9-13 Yohnan, Utsunomiya, Tohigi 320-0834, Japan. e-mail: ksugano@tcc.pref.tohigi.jp; fax: (81) 28-684-5756.

Supported in part by Grants-in-Aid for Cancer Research and for the Second Term Comprehensive 10-Year Strategy for Cancer Control from the Ministry of Health, Labor and Welfare, Japan, and a Grant-in-Aid from Public Trust Haraguchi Memorial Cancer Research Fund.

The authors thank Ayumi Kobayashi, Eri Yamauchi, and Noriko Fukayama for their excellent technical assistance and Nanri Fujiwara for her secretarial work.

[連載]

# 最新 癌の化学療法マニュアル

## 第①回 総論

島田安博\*

### はじめに—抗癌薬治療の意義

消化器癌をはじめとする固形癌に対する抗癌薬治療は、癌患者の多くをその治療対象とするが、有効な抗癌薬がなく、しばしば臨床的意義が疑問視されていた。すなわち、消化器毒性、血液毒性、神経毒性などの有害事象(副作用)と臨床効果とのバランスが妥当であるかという点である。手術不能癌に対する治療法として、抗癌薬治療の選択肢しか考慮されなかった時代には、患者の全身状態が不良であってもわずかの可能性に期待して抗癌薬治療を実施することもあった。最近では、ランダム化比較試験(RCT)により、抗癌薬治療を用いない群と積極的に抗癌薬治療を用いる群の治療成績を生存期間で比較・検討した結果が報告されている。胃癌や大腸癌では生存期間が2~3倍に延長することが示され、全身状態の良い患者に対して積極的に抗癌薬治療が実施されている。これらのデータは抗癌薬治療が可能であった群と不可能であった群の比較でないことが重要である。不可能である群は、予後不良な患者が多く含まれ治療効果を見かけ上わるくみせるからである。

### ① 抗癌薬治療の適応とインフォームド・コンセント

抗癌薬治療の適応については、一般に以下の適

応規準が用いられている。一般診療においては、これらを遵守することができない状況も起りうるが、そのさいには患者自身に十分に治療の必要性を説明する必要がある。

- 1) 組織学的に癌の診断がされている。
- 2) 転移を有し、治癒切除が不能である。術後補助療法の場合には、治癒切除が実施されたが、術後再発のリスクが高いと判断される症例。術前投与の場合には、抗癌薬投与後に治癒切除が期待される症例
- 3) 全身状態の指標であるPS(performance status)が0~1である。PS 2以上については有害事象が高度になる可能性も高く、適応を慎重に判断する。PS 4は一般に適応はない。
- 4) 年齢: 20~75歳を目安とする。全身状態が良好であれば高齢者への抗癌薬治療は必ずしも禁忌ではないが、臓器機能が潜在的に低下している可能性があり、慎重な適応判断が必要である。
- 5) 主要臓器機能が保たれている。WBC, PLTなどの血液検査, T-Bil, AST/ALT, 血清CREなどで規準を規定する。
- 6) 術前・術後の抗癌薬治療については、対象とする病期, 根治度, 治療開始と手術との間隔の規定などが必要である。術後補助療法では、手術の影響から回復を待つて4~8週を目処に抗癌薬治療を開始することが多い。
- 7) 患者本人からインフォームド・コンセントが得られている。治療に関する説明と同意に関しては多くの議論が行われてきたが、現在では十分

\* Y. Shimada(医長): 国立がんセンター中央病院消化器内科(〒104-0045 東京都中央区築地5-1-1)。

な説明の後、本人より文書にて同意を得ることが標準的である。癌の診断名、病期、治療内容、有害事象、合併症、治療関連死亡、医療費、他の治療法の選択肢などについて事前に説明し、患者自身から治療に関する同意を得ることが必須である。とくに試験的治療では、施設倫理審査委員会(IRB)の承認済みの書類にて実施することが義務づけられている。多忙な臨床現場で、このような時間を要する説明を行うことはたいへんであるが、治療を患者と医療者の共同作業と理解すれば、重要であることは明らかである。

8) 治療の妨げとなる合併症は除外するか、適切に治療を行いコントロールすることが必要である。高血圧、糖尿病、心臓病など、患者の高齢化に伴い生活習慣病を合併する患者は多くなっている。

## II 標準治療の確立とRCT—治療ガイドラインの意義

最近では多くの癌腫に対して治療ガイドラインが作成され発表されている。医師向けあるいは患者・家族向けが公表され、情報公開、情報共有にきわめて重要な役割を担っている。ガイドラインは本来RCTによる臨床試験成績に基づき、作成委員会でエビデンスが選別され、素案が作成される。その後、作成とは関連のない評価委員会にて科学的臨床的な妥当性が外部評価され、公表される。新規エビデンスが発表されると再度吟味されて改訂される。抗癌薬治療に関しては海外での多くのRCTによるエビデンスに基づき、エビデンスレベルと推奨度が決定されて公表されている。しかしながら、診断法や手術方法などに関しては、歴史的にRCTになじまず、手技の工夫、発明により進歩し、安全性、有効性が確認され臨床に受け入れられている。したがって、欧米式のガイドラインには厳密には当てはまらないが、国内を中心に多くの臨床実績が積み重ねられており、これらを基礎に一般臨床を実施することは妥当であると考えられる。臨床実績が学会などの全国規模の組織で管理、維持されて一定の質が保証されており、膨大な症例数を経験しているがんセンターなどの専門

病院の臨床成績に基づくのであれば、受け入れは可能と考える。当然、将来的にRCTを計画実施して新規エビデンスの創生が必要であることはいうまでもない。

「標準治療」という言葉がガイドラインではしばしば使用されている。これの対語としては「試験治療」がある。胃癌治療ガイドラインでは、混乱した臨床現場を整理する目的もあり、治療法を「日常診療におけるStage分類別の治療法の適応」と「臨床研究としてのStage分類別の治療法の適応」に二分し、これになじみ深いT分類、N分類に基づくStage分類を重ねて整理している。「日常診療」ではここまでは実施しても過去の臨床実績からは治療成績は保証できる(確立された治療法)と明示している。一方、「臨床研究」に含まれる治療法は、現在検討中であり、確立された治療法ではないことを示している。もちろん、経験のある施設では「臨床研究」の治療法が「日常診療」になっていることもありうる。しかしながら、個々の治療法が現時点で確立された「日常診療」であるか、未確定要素を含んだ「臨床研究」であるかを治療担当医に認識してほしいということがガイドライン作成委員会の強い意向である。

臨床実績から臨床試験へ、データからエビデンスへ、今外科医が大きく変貌しつつあると内科医からもしっかりと認識される。胃癌における大動脈周囲リンパ節郭清意義を検証するRCT、噴門部胃癌に対する開胸アプローチを検証するRCT、胃癌脾摘の意義を検証するRCT、胃癌腹腔鏡手術の意義を検証するRCT、直腸癌側方リンパ節郭清の意義を検証するRCT、結腸癌腹腔鏡手術の意義を検証するRCTなど手術手技を検証する多くのRCTが国内で実施されている。数年後には国内発のRCTエビデンスによるガイドラインの改訂が現実のものになることは確実である。このような臨床試験指向の中で、再度抗癌薬治療に関するRCTも見直されている。多くの術後補助療法や化学放射線療法のRCTがきわめて質の高い試験として実施されている。臨床医が臨床試験の意義に目覚めたともいえる大きな意識変化である。国内での臨床実績をRCTという国際共通語

で翻訳し、海外に向けて積極的に情報発信を目指しているのである。

治療ガイドラインを通じて日本全国の治療担当医が共通の認識で治療を行うことにより、治療格差が最小となることが理想である。さらに、ガイドラインに採用されている治療レジメンの根拠やその実際に関する多くの雑誌で取り上げられているので参考にさせていただきたい。また、各学会のホームページや日本病院機能評価機構のMINDSのウェブサイトでも概要や主要文献の抄録が確認できる。

### III 補助療法と転移性癌に対する抗癌薬治療

抗癌薬治療は、大きく分けて主たる治療法である手術療法と関連して実施される術前・術後補助療法と、切除不能進行・再発の転移性癌に対する抗癌薬治療の二つがある。

治療の目的は、前者は治癒切除の効果をより増強し治癒を目指す目的であり、後者は腫瘍増大による症状コントロールが目的である。したがって、治療方針に関しても若干異なる。補助療法では、転移性癌で有用性の確認された治療レジメンを最大限の支持療法を行って治療強度を維持して実施する。一方、転移性癌に対する治療も同様ではあるが、減量や休薬を適宜行い、腫瘍増大を抑制する期間を延長することがポイントとなる。このコンセプトは、従来行われてきた補助療法は少量長期間経口抗癌薬投与というものとまったく異なる。最近では、術後補助療法が転移性癌を対象としたRCTで評価された治療レジメンを減量なしにそのまま適応して再発抑制を確認していることが多く、結果的にもこの戦略により、術後補助療法の標準治療が確立されてきている。Stage III 結腸癌に対する5-FU/leucovorin(LV), FOLFOX, 胃癌に対するS-1などはこの開発戦略による成果である。術後の回復状態が不十分であるので、減量して実施する、あるいは再発までの長期間継続することについての十分なエビデンスはないと考えられ、現状では臨床試験で規定された治療期間を基本として一般臨床では実施すべきと考えられる。

### IV 経口抗癌薬の臨床的意義—日本における問題点

消化器癌や乳癌では、従来から治療担当医が外科医であることが通常であった。これは国内の癌治療が診断は内科、外科治療・抗癌薬は外科というすみ分けが行われてきたこと、さらには海外のような腫瘍内科医が育成されなかったことなどによると考えられる。臨床現場の多忙や静注治療を実施するための外来治療センターなどの基盤整備が不十分であったことから、抗癌薬治療の主役は静注抗癌薬よりも経口抗癌薬にならざるをえなかったのはやむをえない。結果的に世界的にもっとも経口抗癌薬の臨床経験に富む国となった。しかしながら、経口抗癌薬の表面的な利便性や有害事象が少ないというイメージのみが先行し、臨床的意義である生存期間や無再発生存期間などの評価項目での臨床評価が遅れてしまった。UFTやdoxifluridine, S-1あるいはcapecitabineなどの国内発の優れた経口抗癌薬の5-FU/LVとの大腸癌での直接比較であるRCTは海外において実施され、UFT/LVとcapecitabineの非劣性が検証されたのは最近のことである。この間に、大腸癌治療は再度静注治療法が主役となり、IFL, FOLFOX, FOLFIRIなど多忙な国内医療環境になじまない複雑な治療レジメンが標準治療と位置づけられるというジレンマを経験することになる。国内においてこれら静注治療法を導入しているあいだに海外ではcapecitabineの併用療法であるXELOX(capecitabine+oxaliplatin)療法が積極的に評価され、転移性大腸癌ではXELOX療法とFOLFOX4療法の非劣性が検証されている。すなわち、経口抗癌薬の併用療法が静注療法に置き換え可能であるという証明がされたのである。経口抗癌薬の先進国であった日本が、結果としてその長所を生かすことなく欧米の後追いをしている現実はきわめて残念である。今後は、経口抗癌薬の長所をさらに伸ばすために術後補助療法での評価が実施されることになることが予想される。この点で、ACTS-GC試験により胃癌術後補助療法におけるS-1の臨床評価が国内で実施完了したこと



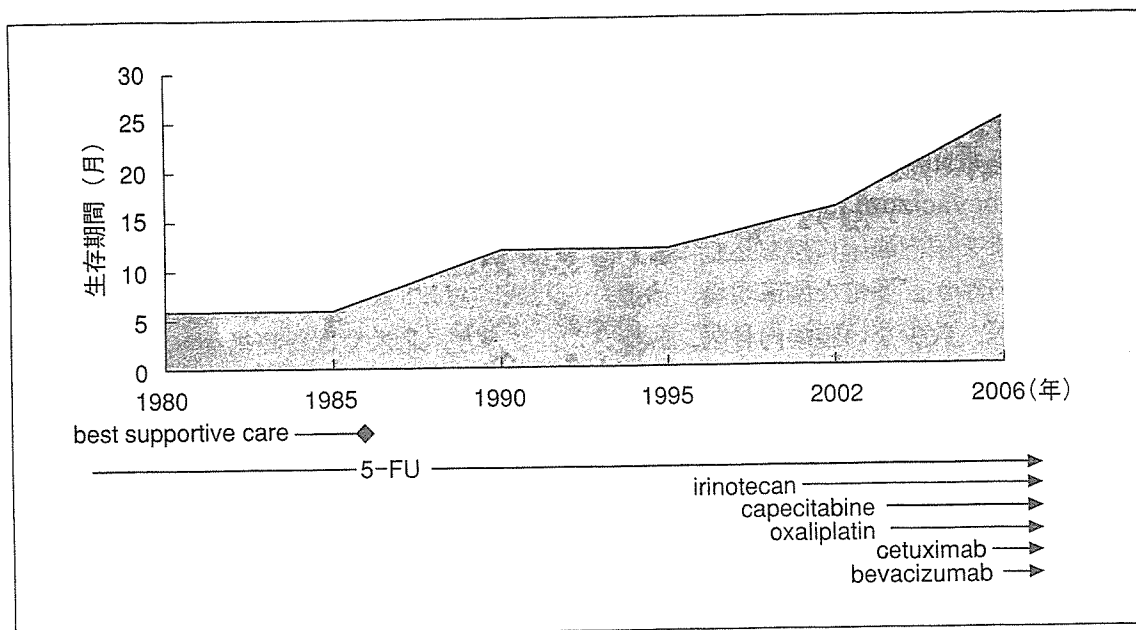


図1. 転移性大腸癌治療成績の進歩. 新薬登場と生存期間の延長

は特筆すべき快挙である。長期的戦略のもとに、全国規模で臨床試験を展開すれば十分国際的に評価される臨床試験を実施できるのである。このような実績をもとに、海外との国際共同試験における主要メンバーとしての参加が可能となると考えられる。

#### Ⅴ 新規薬剤の臨床的意義(図1)

大腸癌治療を例にとると2005年のoxaliplatin承認以降、新規抗癌薬であるbevacizumabやcetuximabなどに多くの期待が寄せられている。患者数を考慮すると乳癌に対するtrastuzumabやリンパ腫に対するrituximab以上のインパクトが予想される。すでに多くの海外臨床成績が報告され、一次治療、二次治療での有効性や、5-FU/LV, IFL, FOLFOX4などの基本抗癌薬治療との併用の組み合わせでの有効性が確認されている。bevacizumabではさらに大きな期待が寄せられている。このような分子標的治療薬や抗体医薬品は新しい治療の可能性を開拓した点では大きな進歩である。癌の生物学的特徴の解析が臨床で開花したともいえる。しかしながら、その特異的な作用機序のために従来経験したことのない有害事象が報告されている。高血圧、腸管穿孔、血管塞栓

などである。頻度は必ずしも高くはないが、経験がない事象ではしばしば発見、対応が遅れることがあるので十分に観察する必要がある。また、臨床的な有用性が認められた患者集団を再度確認する必要がある。治療抵抗性となった全身状態不良の患者に対する魔法の薬でないことは明らかである。適応対象を慎重に選択し、標準投与量をスケジュールに従い投与し、有害事象の発現に応じて適切に減量、休薬を実施することにより最大限の治療効果を実現できるのである。もちろん、併用される抗癌薬治療レジメンも今までの臨床試験成績を参考に、標準的投与量で実施すべきである。安全性を優先して、低用量で実施することで期待される有効性を実現することは一般に不可能である。また、分子標的治療薬は有害事象がなく、長期間腫瘍増大をきたさないという当初のキャッチフレーズは現在では受け入れられていないので、使用に関しては十分な知識が必要となる。

#### Ⅵ 先行する海外臨床試験の国内導入

海外臨床試験成績が海外学会やインターネットなどで先行発表される時代となり、国内臨床現場での混乱がみられる。国内メディアの偏向報道にも一因がある。毒性や医療費に関するマイナス面



に関する報道が不十分である。臨床医は、臨床試験成績を包括的に概観し、新治療によるベネフィットとリスクについて十分に自ら理解しなければならない。常に最先端には未知のリスクが伴う。すでに述べた bevacizumab に関しても、海外臨床成績をそのまま国内臨床に持ち込むことが現実的に可能であろうか。多忙な臨床現場、治療の主体を担う外科医、数少ない腫瘍内科医、医療費への無関心など多くの国内医療環境の問題点がある。海外との医療レベルを比較することは、国内での医療格差を考慮すればむしろ難しいことは容易に理解できるが、国内の標準的医療をどのレベルに求めるかは医療関係者のみならず、患者や医療費支払機関、さらには国民の合意が必要な大きな問題である。欧米と同様の最先端医療を享受したいのは患者の希望である。しかし、海外では医療を受けることのできない患者も多数おり、国家単位の医療レベルでは日本は決して低い国ではない。いわゆる先進医療をどの程度、どの時期に、誰が負担して国内導入に踏み切るか、最近の新規有効抗癌薬が登場したこの時期にこそ十分な議論が必要と考える。

## Ⅶ 異なる国内医療環境における新治療の適応

国内の癌治療は X 線検査、内視鏡検査、病理検査などの診断学、外科治療学を中心に臓器ごとに進歩してきた。この結果、治療成績はきわめて順調に向上してきたのも事実である。しかしながら対照的に、転移、再発癌患者の治療成績の進歩がみられないことも明らかとなった。

このような中、海外を中心に臨床評価された新規抗癌薬の登場により転移・再発癌の治療成績は着実に向上している。新規薬剤を国内導入するさいには、海外と比較して診断学、外科治療学の進歩している国内環境が大きなアドバンテージを有していることは明らかである。

ACTS-GC による胃癌の術後補助療法や NSAS-CC および TAC-CR による直腸癌の術後補助療法の成績は国内の優れた外科手術と、多くの切除リンパ節を検索してくれる病理医の共同作業が基礎にある。残念ながら海外では数施設以外に国内医療を再現することはむしろ難しいであろう。

一方、北米では胃癌術後補助療法は化学放射線療法であり、大腸癌術後補助療法が oxaliplatin 併用の FOLFOX 療法に移行している状況をみると、癌治療は診断、外科、抗癌薬治療(放射線治療)の集学的治療のたまものと再認識する。

治療戦略が異なる領域や、臨床試験が実施可能な領域では、国内環境への導入の可否につきなんらかの臨床試験で確認していく必要があると考えている。保守的な考えとの批判はあるが、臨床医として「エビデンスと経験」に基づいた医療を患者に提供するためには、海外データの直輸入には抵抗を感じてしまう。

臨床試験により多くのエビデンスが創生され構築された。治療成績が進歩したことも事実である。しかし、大多数の臨床現場でその事実を再現し、治療の進歩を患者に提供するためには、臨床医には多くの仕事が残されている。

## おわりに

最近の抗癌薬治療の進歩は目覚ましい。これらは多くの海外臨床試験成績に基づくものである。患者は最善の治療効果を期待するのは当然であり、臨床医はそれに応える努力が必要である。しかし、医療の現場は日本国内の医療現場である。海外での治療進歩を目の前の癌患者でいかにして再現するかはまだ多くの問題を抱えているが、多くの臨床医が着実な進歩を実感しているのも事実である。第一線の臨床医が抗癌薬治療に精通して治療成績を向上することにおおいに期待したい。

\*

\*

\*

## 特集 変わってきた癌化学療法

### 大腸癌の化学療法

*Systemic chemotherapy for metastatic colorectal cancer in 2006*

高張 大亮 島田 安博  
TAKAHARI Daisuke SHIMADA Yasuhiro

切除不能転移性大腸癌に対する化学療法は、1990年代後半から10年足らずの間に大きな進歩が見られている。長年のKey Drugであった5FUに加え、新規薬剤としてCPT-11やoxaliplatinが臨床導入され、さらに経口抗癌剤の臨床評価により、簡便性、安全性が客観的に検証された。最近では分子標的治療薬の大腸癌における有用性が示されることになり、切除不能転移性大腸癌の生存期間は無治療の8ヵ月から今や2年を超える時代となった。臨床現場では適切な薬剤選択と治療継続の判断を行うことがますます重要となっている。国際的標準治療の変化を常にフォローしながら、最善の治療法を患者に提供することが求められている。

#### はじめに

国立がんセンターホームページに掲載されている「がんの統計'05」<sup>1)</sup>によると、本邦における結腸・直腸癌の年齢調整死亡率(2003年)は男性で肺癌、胃癌、肝臓癌に次いで4番目、女性ではついに胃癌を抜き1番目となっている。大腸癌による年間死亡者数は2005年には年間3.9万人であったが、2015年には6万人にのぼると推定されている。大腸癌治療の中心はあくまで外科的切除であるが、一方で外科的切除によって治癒し得ない、いわゆる切除不能転移性大腸癌の治療法の確立と普及が本邦において急務となっている。

本稿では、切除不能転移性大腸癌に対する化学療法につき解説する。

#### I. 切除不能転移性大腸癌に対する化学療法の適応

切除不能転移性大腸癌の予後はBSC(best supportive care)群では8ヵ月とされ、化学療法により12ヵ月に延長することが可能であるというメタアナリシスの報告がある<sup>2)</sup>。これを根拠として、全身状態のよい症例では、積極的に化学療法を行うことが勧められている。大腸癌では、切除不能転移病巣を有する症例においても自覚症状や臨床検査値異常を認めることは少なく、食欲不振、下痢、悪心・嘔吐、白血球減少などの化学療法に伴う有害事象による全身状態の一過性の低下との兼ね合いで治療を考慮する必要がある。なお、骨転

国立がんセンター中央病院消化器内科

**Key words** : 大腸癌 / 化学療法 / 5FU / CPT-11 / oxaliplatin / 分子標的治療薬

移や脳転移などを認める症例では、化学療法の選択よりも、局所症状のコントロールを目的として放射線照射や適応がある場合には手術療法が選択される。

## II. 切除不能転移性大腸癌に対する化学療法の変遷

大腸癌の化学療法は、1950年代に開発された5FUに代表されるフッ化ピリミジン系抗癌剤をkey drugとして進歩してきた。しかし、その後は約40年の長きにわたりフッ化ピリミジン系抗癌剤の至適投与法の検討や、Biochemical modulationの理論に基づいた抗腫瘍効果の増強に主眼が置かれていた。1980年代には5FUとロイコボリン(LV)の併用療法が注目され、5FU単剤に比べ、奏効率は上昇したが、生存期間を有意に延長させることはできなかった。

### 1. 5FU投与法の検討—5FU+LVの至適投与法

5FU+LVの投与方法については5FUの急速静注によるRPMI(Rosewell Park Memorial Institute)のweekly法<sup>3)</sup>、Mayo clinicの5日間法<sup>4)</sup>、5FUの持続点滴によるde Gramont法<sup>5)</sup>やAIO法<sup>6)</sup>がある(表1)。従来、特にアメリカではRPMIのweekly法のような急速静注法が汎用されてきていたが、一方、ヨーロッパではフランス中心に持続点滴法が検討され、LVの2時間点滴直後に5FUの急速静注と22時間の持続点滴を2日間にわたり実施するde Gramont法が有害事象の点で優れるとして汎用されている。Mayo Clinic法とde Gramont法との第III相試験の結果、後者が消化器症状や白血球減少などの有害事象で頻度や程度が低く、奏効率や無増悪期間・生存期間で優れると報告されている<sup>5)</sup>。最近では、CPT-11やoxaliplatinなどとの併用療法の第III相試験成績により、5FU+LVの投与方法も急速静注から持続点滴へと移行している。

### 2. CPT-11の臨床評価と新しい併用療法

1990年代に入り、CPT-11が登場し、大腸癌化学療法は新たな局面を迎えることになった。CPT-11は、日本国内で開発されたI型DNAトポイソメラーゼ阻害剤であり、5FU耐性大腸癌に対しても有効であることが報告されている<sup>7)</sup>。1998年、イギリス中心に5FU治療抵抗性症例を対象としたBSC群との第III相試験により二次治療としての臨床的意義が検証された<sup>8)</sup>。その後、2000年にはアメリカおよびヨーロッパにおいて一次治療としての意義が検討され、アメリカでは急速静注、ヨーロッパからは持続点滴、と投与スケジュールは異なるものの従来の5FU+LVとの比較においてCPT-11併用群の生存期間の延長が検証された<sup>9)10)</sup>。これにより、転移性大腸癌の標準治療は5FU+LVから5FU+LV+CPT-11併用療法へと書き換えられることとなった。アメリカでは急速静注法であるIFL療法(表1)が標準とされ、転移性大腸癌や術後補助療法の第III相試験での対照群として設定された。その後、アメリカで行われた2つの第III相試験(N9741試験、C89803試験)において、IFL療法での有害事象の頻度および60日以内の早期死亡例が問題となり、投与スケジュールの修正がなされている<sup>11)</sup>(表1)。

一方、ヨーロッパでは、de Gramont法にCPT-11を併用するFOLFIRI療法(表1)が検討され、高い奏効率と認容性が報告されている<sup>12)</sup>。主たる副作用は下痢、悪心・嘔吐、白血球減少であるが、2週ごとの投与が可能である。また、後述するoxaliplatinと異なり、蓄積性の末梢神経障害がないことから、まだCPT-11の臨床的価値は十分認められると考えられる。

### 3. Oxaliplatinの臨床評価と新しい標準療法

Oxaliplatinはcisplatinとは抗腫瘍スペクトラムが異なる本邦で開発された第3世代白金系抗がん剤である<sup>13)</sup>。本邦での臨床開発では十分な臨床効果を示すことができず、フランスを中心とした海外臨床試験の結果、その有効性が見出され、単独よりも5FU+LVとの併用療法にて高い奏効率

表1 切除不能転移性大腸癌に対する化学療法レジメン(文献41より改変)

study	Common dosing regimens	Cycle Frequency
Rosewell Park (RPMI) (3)	5FU 500mg/m <sup>2</sup> day1~5 LV 500mg/m <sup>2</sup> day1~5	Weekly×6, Every 8weeks
Mayo clinic (4)	5FU 425mg/m <sup>2</sup> day1~5 LV 20mg/m <sup>2</sup> day1~5	Every 4~5weeks
de Gramont (5) (LV5FU2)	5FU 400mg/m <sup>2</sup> bolus 5FU 600mg/m <sup>2</sup> CI 22hrs LV 200mg/m <sup>2</sup> (days1,2)	Every 2weeks
AIO (6)	5FU 2000mg/m <sup>2</sup> CI 24hrs LV 500mg/m <sup>2</sup> (day1)	Weekly×6, Every 8weeks
IFL (10)	CPT-11 125mg/m <sup>2</sup> LV20mg/m <sup>2</sup> 5FU 500mg/m <sup>2</sup> (day1)	Weekly×4, Every 6weeks
reduced IFL (11)	CPT-11 100mg/m <sup>2</sup> LV20mg/m <sup>2</sup> 5FU 400mg/m <sup>2</sup> (day1)	Weekly×4, Every 6weeks
FOLFIRI (12)	CPT-11 180mg/m <sup>2</sup> day1 LV500mg/m <sup>2</sup> day1 5FU 400mg/m <sup>2</sup> bolus days1,2 5FU 2.4~3g/m <sup>2</sup> CI 46hrs day1~2	Every 2weeks
FOLFOX4 (15)	L-OHP 85mg/m <sup>2</sup> day1 LV200mg/m <sup>2</sup> day1,2 5FU 400mg/m <sup>2</sup> bolus days1,2 5FU 600mg/m <sup>2</sup> CI 22hrs days1,2	Every 2weeks
modified - FOLFOX6 (22)	L-OHP 85mg/m <sup>2</sup> day1 LV200mg/m <sup>2</sup> day1 5FU 400mg/m <sup>2</sup> bolus days1 5FU 2,400mg/m <sup>2</sup> CI 46hrs days1~2	Every 2weeks
mFOLFOX6 +BV (32)	BV 5mg/m <sup>2</sup> day1 L-OHP 85mg/m <sup>2</sup> day1 LV350mg/m <sup>2</sup> day1 5FU 400mg/m <sup>2</sup> bolus days1 5FU 2,400mg/m <sup>2</sup> CI 46hrs days1~2	Every 2weeks

LV : Leucovolin BV : bevacizumab

が報告された。悪心・嘔吐，食欲低下，下痢，白血球減少，血小板減少，肝機能低下などの有害事象が認められるが，腎機能低下は少ない。しかし，特異的な有害事象として咽頭・喉頭の違和感，末梢神経炎がある。とくに後者は蓄積性があり，850 mg/m<sup>2</sup> 以上でその頻度が高くなり，回復性が遷延するとされる<sup>14)</sup>。もっとも有名な併用療法は，FOLFOX4 療法<sup>15)</sup>，すなわち de Gramont 法に，oxaliplatin 85 mg/m<sup>2</sup> を併用し，2 週ごとに繰り返す方法である(表1)。IFL 療法抵抗性症例を対象とした二次治療での FOLFOX 療法の評価は，de Gramont 法や oxaliplatin 単独と比較

して，奏効率，無増悪生存期間などで優れる結果が報告されている<sup>16)</sup>。これらの臨床試験成績から，oxaliplatin の大腸癌治療における意義は徐々に認知されるようになったが，最終的にはアメリカでの Intergroup 試験である N9741 試験<sup>17)</sup> の結果がもっとも大きなインパクトを与えた。N9741 試験は，初回化学療法症例を対象として IFL 療法を対照群とし，FOLFOX4 療法と IROX (CPT-11+oxaliplatin) 療法を試験群とした 3 アームの第 III 相試験である。2003 年の ASCO において中間解析結果が報告され，FOLFOX4 療法が奏効率(45%)，無増悪期間(8.7 ヶ月)，全生存期間