

図2 抗体による抗腫瘍活性の機序

を形成し細胞内のチロシンキナーゼ(TK)が自己リン酸化を起こし、シグナルを下流へ伝える働きをもつ⁶⁾。EGFRは多くの正常なヒト組織に発現しているが、多くのがんで過剰発現していることが知られており、大腸がん25~77%、食道がん43~89%、頭頸部がん80~100%、前立腺がん40~80%、膵がん30~89%、腎細胞がん50~90%、非小細胞肺がん40~80%、神経膠腫40~63%と報告されている。これらEGFRの過剰発現は、血管新生の誘導や、アポトーシス阻害と関連しており、シグナルの遮断により腫瘍の増殖を抑制できると考えられた。EGFR抗体はEGFRに結合し、抗体が結合したEGFRは細胞質内へ内在化(internalize)される。これにより細胞表面のEGFR数が減少し、結果としてリガンドの結合とその後の2量体の形成(dimerization)ならびにシグナル伝達を抑制する。Gefitinibやerlotinibなどのチロシンキナーゼ阻害剤はダイマーを形成したのちのEGFRの自己リン酸化を阻害することで、シグナルを遮断するといわれている(図3)。EGFR抗体は、担がんマウスモデルで腫瘍増殖抑制を示し⁷⁾、EGFRをターゲットにした分子標的治療

薬開発が盛んに行われた。

現在いくつかのEGFRをターゲットにした抗体薬剤が開発中あるいはすでに使用中であり、それぞれについて解説を加える。

2. Cetuximab(IMC-C225)(Erbixax[®])

CetuximabはEGFRをターゲットにしたヒト-マウスキメラIgG1抗体である。EGFRへの親和性は内在性のリガンドよりも1対数単位高いため、競合的に拮抗作用を示す。Cetuximabの投与により細胞周期阻害、アポトーシス誘導、血管新生阻害、転移浸潤抑制が認められ⁸⁾⁹⁾、これが抗腫瘍効果につながっていると考えられている。担がんマウスでの実験では、イリノテカンとの併用による相乗効果や、イリノテカン不応となった後にcetuximabとイリノテカンを併用することで、抗腫瘍効果が再び認められることが示され¹⁰⁾、臨床試験に期待が集まった。

まずEGFR陽性イリノテカン不応大腸がん患者57名に対してcetuximab単剤投与が行われた¹¹⁾。PRとなった症例は5名(8.8%)であったが、これは免疫染色でのEGFRの発現強度と相関は認められなかった。また、有害反応として、grade 3/4

表1 現在臨床導入されている抗体療法とその適応

がん種	抗原	抗体	タイプ	臨床試験
非ホジキンリンパ腫	CD20	Rituximab	キメラ	2001日本承認
	CD20	⁹⁰ Y-ibritumomab tiuxetan	マウス+放射性同位元素	2002FDA承認
	CD20	¹³¹ I-tositumomab	マウス+放射性同位元素	2003FDA承認
	CD22	Epratuzumab	ヒト化	Phase I - II
	CD22	⁹⁰ Y-epratuzumab	ヒト化+放射性同位元素	Phase I
急性骨髄性白血病	HLA-DR	Remitogen	ヒト化	Phase II
	CD33	Gemtuzumab ozogamicin	ヒト化+抗がん剤	2000FDA承認
B細胞性慢性リンパ球性白血病 大腸がんなど	CD52	Alemtuzumab	ヒト化	2001FDA承認
	EGFR	Cetuximab	キメラ	2004FDA承認
	EGFR	Panitumumab	ヒト	Phase III
	EGFR	h-R3	ヒト化	Phase I / II
大腸がん, 肺がんなど 大腸がん(術後)	VEGF	Bevacizumab	ヒト化	2004FDA承認
	Epithelial cellular- adhesion molecule	Edrecolomab	マウス	1995ドイツ承認
乳がんなど 上皮がんなど 固形腫瘍 大腸がん 腎細胞がん 上皮がん	HER2/neu	Trastuzumab	ヒト化	2001日本承認
	CEA	⁹⁰ Y-CEA-cide	ヒト化+放射性同位元素	Phase I / II
	VEGFR2	IMC-1C11	キメラ	Phase II / III
	A33	huA33	ヒト化	Phase I / II
	G250/MN	G250	キメラ	Phase I / II
	Lewis Y 抗原	SGN-15	キメラ	Phase I / II
		Hu3S193	ヒト化	Phase I
メラノーマ	GD3	KW-2871	キメラ	Phase I

(文献³⁷⁾より改変)

のアクネ様皮疹が16%, アレルギー反応が5%, 倦怠感が4%に認められたが, 皮疹のgradeによる解析では, grade 0, 1-2, 3-4の皮疹が起こった群それぞれの生存期間中央値は1.9か月, 6.4か月, 9.5か月であり, 症例数は少ないながらも皮疹が抗腫瘍効果の指標となりうる可能性を示した。

BOND studyではEGFR陽性イリノテカン不応大腸がん患者をランダム化し, cetuximab単独群と, cetuximab+イリノテカン群とで比較した¹²⁾。抗腫瘍効果は奏効率が単独群で11%, 併用群で23%と有意に併用群で優れていた(表2-a, b, c)。有害事象では併用群において, より下痢, 倦怠感, アクネ様皮疹, 好中球減少などが多く発現した。BOND studyでも同様に, 皮疹が起こった症例は起こらない症例に比べて生存が長い傾向が示され, これは単独群, 併用群ともに認められた。

BOND2 studyはBOND studyと同様の対象患者(イリノテカン不応)に対してイリノテカン+cetuximab+bevacizumab併用群(CBI)と, cetuximab+bevacizumab併用群(CB)に分けて比

較した試験である¹³⁾。BOND studyのそれぞれのarmにbevacizumabを上乗せした格好だが, CBI群とCB群の奏効率はそれぞれ37%と20%であり, 無増悪生存期間はそれぞれ7.9monと5.6monであった。この試験の意義は, cetuximabの有効性というよりも, 分子標的治療薬同士の併用によりさらなる効果が期待できることを示したことにあった。しかし, そのことは同時に医療費の高騰という問題が身近になっていることを示唆していた。

Cetuximabは, 初回治療例に対しても, 既存の抗がん剤との併用により高い抗腫瘍効果を示している(表3)。これらの結果は, いずれもphase IIのものであり, 臨床の現場に取り入れられるには現在行われているphase IIIの結果を待たなくてはならない。

臨床で用いる場合に注意すべき有害事象は, 皮疹と点滴時の過敏症である。皮疹はEGFR阻害剤であるgefitinibと同様に, いわゆるアクネ様皮疹が特徴的であるが, 75%に出現し, grade 3以上になる割合は, 単剤投与で5.2%, イリノテカ

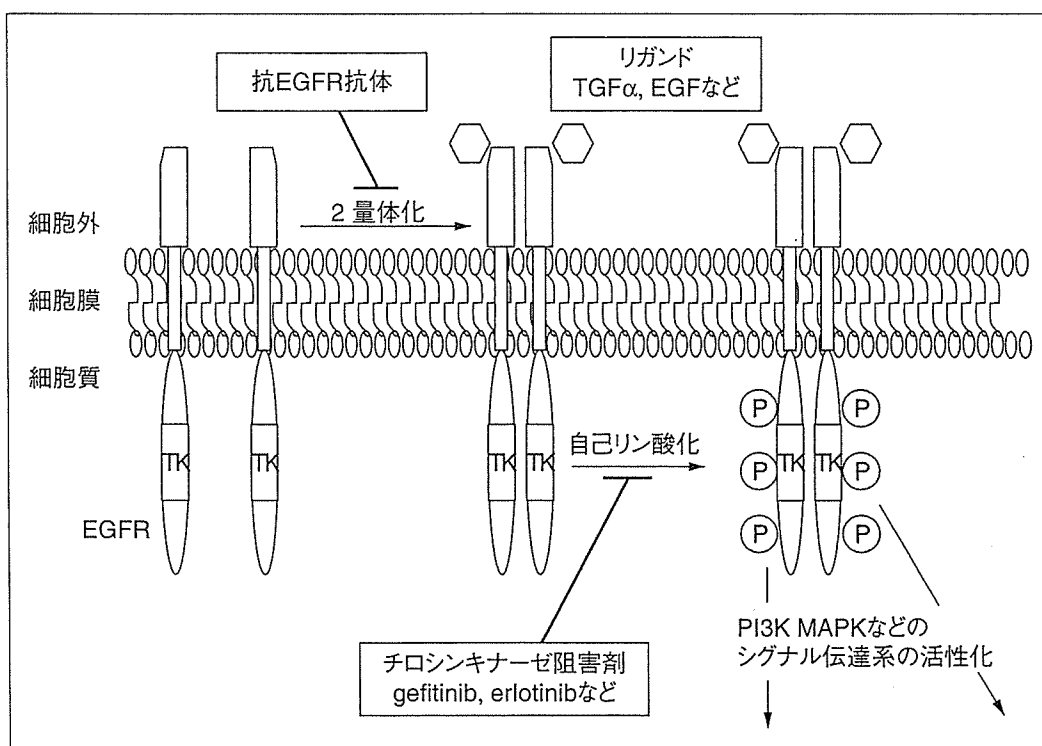


図3 EGFRと活性化のメカニズム(文献³⁶⁾より引用改変)

ンとの併用で9.3%と報告されている¹⁴⁾。Grade 2までの場合、ビタミンDやミノマイシンの投与、メトロニダゾールクリームなどの塗布を行うが、grade 3以上の場合には休薬が勧められる。また、点滴時の過敏反応(infusion reaction)は、初回投与時に出ることが多く、その症状は微熱、悪寒、呼吸困難などである。血圧低下、気道狭窄などのgrade 3以上の反応をきたす症例は3%程度であるが、0.1%の症例で致死経過をたどることがあり、注意が必要である。抗アレルギー薬の前投薬が推奨されている。

3. Matuzumab(EMD72000)

Matuzumabは、EGFRに対するヒト化IgG1抗体である。すなわち、抗原を認識する部分である相補性決定部位のみマウス由来のタンパクで、それ以外の95%はヒト由来のタンパクでできている抗体である。第I相試験では標準治療に不応となったEGFR陽性の大腸がん、食道がん、頭頸部がんの患者22名に投与され、PR 23%、SD 27%、アクネ様皮疹の割合は64%と報告されている¹⁵⁾。本邦でもEGFR陽性の大腸がん、胃がん、食道がん患者26名に第I相試験として投与され、大腸がんにおいて2例のPR、10例のSD症例を認

めている¹⁶⁾。現在化学療法との併用による胃がんでの検討¹⁷⁾や、頭頸部がんでの検討¹⁸⁾が行われている。

4. Panitumumab (ABX-EGF)

PanitumumabはEGFRに対するヒトIgG2抗体である。100%ヒト由来のタンパクでできているため、薬剤に対する抗体ができないのが特徴で、他の抗EGFR抗体よりもより薬物動態プロファイルの改善が期待できる。Panitumumab単剤投与では、標準的治療に不応になった結腸直腸がん患者に対するphase IIにおいて、PR 11%、SD 36%と良好な成績を取めた¹⁹⁾。皮膚毒性は95%に認められたが、grade 3以上の頻度は7%であった。皮膚毒性以外では、倦怠感51%(grade 3以上9%)、嘔気39%(同3%)、下痢36%(2%)、腹痛30%(3%)、などであった。Cetuximabに認められるinfusion reactionも認められていない。また、2005年11月には、標準的治療に不応となった463名をランダム化して行われたphase III試験において、panitumumab単剤投与はbest supportive care群に比べて有意に無増悪生存期間を延長すると発表された。これにより2006年にはアメリカで承認される見込みである。また、非小細

表 2-a BOND study—抗腫瘍効果—

	CPT11+ Cetuximab (n=218)	Cetuximab (n=111)	p
CR+PR	23%	11%	0.0074
CR+PR+SD	56%	32%	0.0001
MedianTTP	4.1mon	1.5mon	<0.0001
MST	8.6mon	6.9mon	0.48

胞肺がん、前立腺がん、腎細胞がんについても臨床第Ⅱ相試験が行われており、併用療法についても検討されている。

5. EGFR発現と抗腫瘍効果

乳がんの治療におけるtrastuzumabは、標的分子であるErbB2の発現と抗腫瘍効果がよく相関することが知られている。Cetuximabも当初EGFR陽性大腸がんに対して治療開発が進められてきたが、BOND studyでも示されたように、cetuximabの抗腫瘍効果はEGFRの発現強度とまったく相関を認めなかった。同じくEGFRを標的とするgefitinibも同様に抗腫瘍効果と発現強度が相関しないことが一つの謎であったが、EGFRのATP結合部位(exon 19)の変異が効果予測因子になるとの報告がなされた²⁰⁾。大腸がんでも同様の検討がなされたが、大腸がんでのEGFRの変異はほとんど認められなかった。EGFR遺伝子の増幅が抗腫瘍効果と相関するとの報告もある²¹⁾が、さらなる検討が必要と思われる。

VEGF (vascular endothelial growth factor) を標的にした抗体療法

1. がんとVEGF

血管新生は、組織の増殖において、重要な役割を担っていると考えられている。それはがんの増殖でも同様である。血管新生を阻害することで抗腫瘍効果が発揮されるという仮説が、1971

表 2-b BOND study—有害事象 (grade 3/4)—

	CPT11+ Cetuximab (n=218)	Cetuximab (n=111)
下痢	45(21.2%)	2(1.7%)
倦怠感	29(13.7%)	12(10.4%)
アクネ様皮疹	20(9.4%)	6(5.2%)
好中球減少	20(9.5%)	0
嘔気/嘔吐	15(7.1%)	5(4.3%)
貧血	10(4.8%)	3(2.7%)
腹痛	7(3.3%)	6(5.2%)
血小板減少	1(0.5%)	1(0.9%)
過敏症	0	4(3.5%)
Cetuximab関連死	0	0

表 2-c BOND study—皮膚毒性と抗腫瘍効果の関係—

	CPT11+Cetuximab		Cetuximab	
	RR	MST	RR	MST
皮膚毒性なし	6%	3.0mon	0%	2.5mon
皮膚毒性あり	26%	9.1mon	13%	8.1mon

年にFolkmanらにより示唆され²²⁾、がんが増殖するためには必要な酸素や栄養を提供し、不要な代謝物を排除するための血管網の構築が、どのように行われているかについての研究が、この数十年行われてきた。

1980年代、Sengerらは移植腫瘍による腹水貯留の機序の研究において、腫瘍細胞から分泌され血管透過性を更新するポリペプチドの存在を報告し、VPF(vascular permability factor)と命名した。また、Ferraraらは、下垂体の濾胞細胞の培養液から血管内皮細胞の増殖を促進する因子を同定、VEGF(vascular endothelial growth factor)と命名したが、両者は同一の物質であることが後に判明した²³⁾。

VEGF-Aには、8つのスプライシングバリエントがあることが知られ、それぞれ若干細胞への親和性などが異なるといわれている。大まかな

表 3 大腸がん初回治療例に対するcetuximab+抗がん剤併用療法phaseⅡの成績

	IFL +Cetuximab (n=29)	CPT11/5FU/LV(AIO) +Cetuximab (n=21)	FOLFIRI +Cetuximab (n=22)	FOLFOX +Cetuximab (n=62)
CR+PR	48%	67%	46%	81%
SD	41%	29%	41%	17%
PD	11%	5%	14%	2%
Ref.	AH. Rosenberg ASCO2002 ³⁸⁾	G. Folprecht ASCO2005 ³⁹⁾	P. Rougier ASCO2004 ⁴⁰⁾	E. Díaz Rubio ASCO2005 ⁴¹⁾

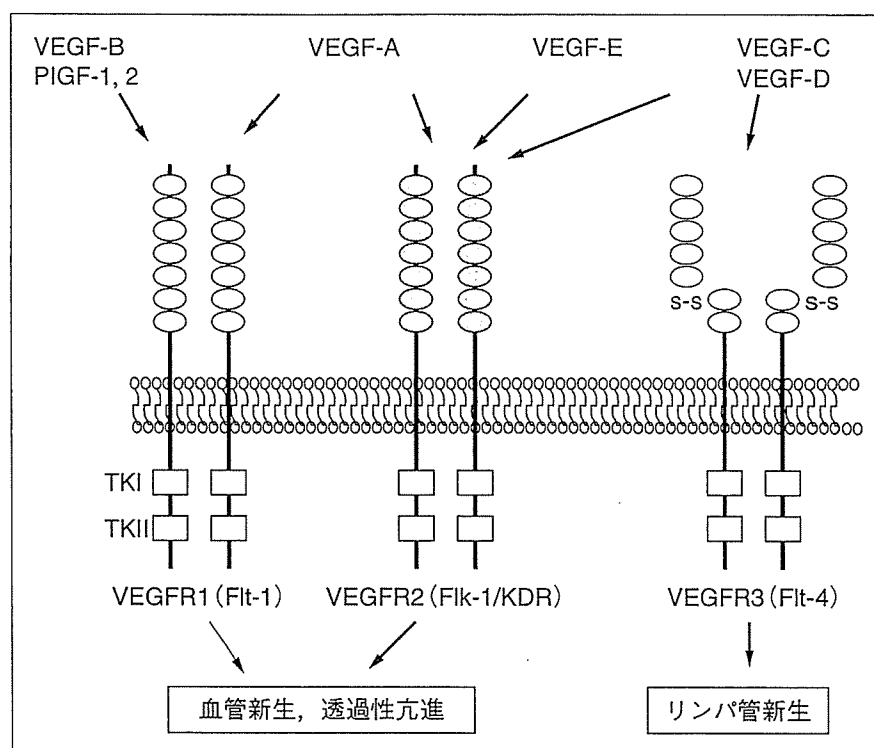


図4 VEGFとVEGFR(文献²⁴⁾より改変)

作用として、動脈、静脈そしてリンパ管の内皮細胞の増殖であるが、細胞飢餓に伴うアポトーシスから内皮細胞を守る働きや、管腔形成の促進、凝固線溶系タンパク質の産生、細胞接着因子の誘導など、さまざまな働きがあることがわかっている。VEGF関連遺伝子としては、VEGF-B、-C、-D、-Eが同定されており、同様に血管新生、リンパ管新生などに関与することがいわれている。このあたりはがんというよりも再生医学領域でも注目を集めている。

VEGFの受容体であるVEGFRには、VEGFR-1(Flt-1)とVEGFR-2(KDR/Flk-1)、VEGFR-3(Flt-4)の3種類がある(図4)。VEGFRは受容体型チロシンキナーゼで、リガンドであるVEGFの結合により細胞内にあるチロシンキナーゼ(TKI, TKII)がリン酸化され、シグナルが下流へ伝わっていく。これらの構造は、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)や、GISTなどで過剰発現しているc-kitチロシンキナーゼと類似しており、VEGFR2, PDGFR, c-kitを抑えるSU11248やVEGFR-1, -2, -3, PDGFR, c-kitを抑えるPTK787/ZK222584などはマルチチロシンキナーゼ阻害剤としてGISTや大腸がんをはじめとする多くのがんで臨床試

験が行われている。

VEGFの過剰発現は肺がん、乳がん、消化器がん、腎細胞がん、卵巣がんと多くのがんで認められている。がん遺伝子であるsrcやras, bcr-abl, がん抑制遺伝子であるp53はVEGF発現制御機構の上流にあり、これらの遺伝子の変異により、がんにおけるVEGFの過剰発現がみられると考えられている²⁴⁾。担がんマウスの系では、抗VEGF抗体と化学療法、放射線療法との併用で相乗効果が認められており、抗VEGF抗体による血管の正常化と、それに伴う抗がん剤組織移行の上昇、酸素化などがその一因であると考えられている²⁵⁾。

2. Bevacizumab(Avastin®)

BevacizumabはVEGF-Aに対するヒト化抗体であり、血中のVEGF-Aに結合し中和することでVEGFRに結合するVEGF-Aを減少させ、結果としてVEGFR以下のシグナルを阻害する。Bevacizumabは大腸がんのみならず、肺がん²⁶⁾、乳がん²⁷⁾においても臨床開発が行われ、有効性が証明されている。大腸がんでは、IFL療法+placebo群と、IFL療法にbevacizumab 5 mg/kgを隔週併用投与した群、そして5 FU/LVにbevacizumab 5 mg/kgを併用群の3群で比較試験(AVF2107g)を

表4 Bevacizumab関連有害事象

	Hurwitz JCO 23, 2005			Giantonio ASCO2005		
	IFL (%) (n=397)	IFL/BV (%) (n=393)	5FU/BV (%) (n=109)	FOLFOX4 (%) (n=282)	FOLFOX4/BV (%) (n=286)	
血栓塞栓症	Grade 1-4	16.2	19.4	13.8	2.8	4.4
出血	Grade 3,4	2.5	3.1	6.4	<1	3
高血圧	Grade 1-4	8.3	22.4	33.9	—	—
	Grade 3	2.3	11.0	18.3	2	5
	Grade 4	0	0	0	<1	1
タンパク尿	Grade 1-4	21.7	26.5	34.9	—	—
	Grade 3	0.8	0.8	1.8	1	0
消化管穿孔		0	1.5	0	1	0

(文献²⁸⁾²⁹⁾より引用)

表5 CPT11不応大腸がんに対する臨床第III相試験(ECOG3200)

	ECOG3200			Rosenberg 2003
	BV (n=230)	FOLFOX4/BV (n=271)	FOLFOX4 (n=271)	FOLFOX4 (n=272)
RR (%)	3.0	21.8	9.2	9.9
TTP (mon)	2.7	7.2	4.8	4.6
MST (mon)	10.2	12.9	10.8	9.8

(文献²⁹⁾より引用)

行い、それぞれ生存期間中央値(IFL群15.6m vs. IFL+bevacizumab群20.3m vs. 5FU/LV+bevacizumab群 18.3m)とbevacizumabの上乗せにより生存期間の延長が示された²⁸⁾。また、有害事象としては、高血圧がplacebo群で8.3%であったのに対し、bevacizumab群で22.4%と有意に高かった。これ以外にも出血やタンパク尿など、従来の抗がん剤とは毒性のプロファイルが異なるということが示唆されたが、とくに注意すべき点はbevacizumab併用群で消化管穿孔が数例に認められたことで、今後実際にbevacizumabが臨床の場で使用されるにあたり、慎重な対応が必要である(表4)。

また、CPT11不応症例に対する二次治療としてFOLFOX4単独群と、FOLFOX4+bevacizumab 10mg/kg群で行われたECOG3200試験(表5)では、生存期間中央値は(10.8m vs. 12.9m)と、bevacizumab併用群で有意な生存期間の延長が認められ、bevacizumabが大腸がんの化学療法[key drug]の一つであるという認識を確固たるものにした²⁹⁾。これを受けて、進行中であったSWOG0303など

bevacizumabなしのarmをもつ臨床試験が、エントリーが少なくなり中止になった。初回治療例に対しては、mFOLFOX6療法と、bFOL療法と、XELOX(CapeOx)療法の3群にそれぞれbevacizumabを併用したランダム化第II相試験が行われた(TREE-2)³⁰⁾。プライマリーエンドポイントは毒性であり、G3/4の毒性については、各群で許容できるとの結論であった。しかし、bevacizumab群では2.8~4.2%の消化管穿孔が認められ、創傷治癒遅延なども特徴的な毒性としてあげられた。有効性については、奏効率はそれぞれTREE1(mFOLFOX6 40.8% vs. bFOL 20.0% vs. CapeOx 27.1%)、TREE2(mFOLFOX6+bevacizumab 52.1% vs. bFOL+bevacizumab 34.3% vs. CapeOx+bevacizumab 45.8%)とbevacizumabの上乗せ効果が示唆された。

一方で、オキサリプラチン、イリノテカン不応となった大腸がんの3rd lineとして5FU/LV+bevacizumabを投与された100名では、奏効率はわずか1%³¹⁾であり、比較的早期での使用が推奨される。

表6 現在進行中(中止含む)の抗体薬剤による大腸がん化学療法, 主な臨床第III相試験

Trial	対象	Protocol	Phase
NO16996	初回例	XELOX±BV vs. FOLFOX4±BV	Phase III
SWOG0303	初回例	XELOX±BV vs. mFOLFOX6±BV	中止
CALGB80404	初回例	FOLFOX or FOLFIRI +BV vs. +C225 vs. +BV+C225	Phase III
CALGB80203	初回例	FOLFIRI±C225 vs. FOLFOX4±C225	中止
CRYSTAL	初回例	FOLFIRI vs. FOLFIRI+C225	Phase III
EXPLORE	既治療例	FOLFOX4 vs. FOLFOX4+C225	Phase III
EPIC	FOLFOX不応	CPT11 vs. CPT11+C225	Phase III
CONCEPT	初回例	継続型mFOLFOX7+BV±Mg/Ca vs. 間欠型mFOLFOX7+BV±Mg/Ca	Phase III
BOND3	FOLFOX+BV不応	CPT11+BV+C225 vs. BV+C225	Phase III
PACCE	初回例	FOLFOX or FOLFIRI +BV vs. +BV+Panitumumab	Phase III
OPTIMOX3	初回例	(FOLFOX7+BVX6 → FOLFOX7+BVX6) + Erlotinib vs. (XELOX+BVX6 → XELOX+BVX6) + Erlotinib	Phase III

3. IMC-1C11

IMC-1C11はVEGFR-2に対するキメラ抗体である。VEGFR-2を介したシグナル伝達を抑制することで、抗腫瘍効果を発揮する。Phase Iではgrade 3/4の毒性は認められず、投与した14例中4例にSDが認められている³²⁾。

Edrecolomab (17-1A)

Edrecolomabは、細胞表面の糖タンパク17-1Aをターゲットにした単クローンマウスIgG2a抗体である。189名のstage IIIの大腸がん術後補助療法として17-1Aを投与されたランダム化試験では、手術単独群に比べて、17-1A投与群において、有意に生存期間の延長を認めた³³⁾。しかしその後edrecolomab単独群、5FU/LV(Mayo regimen)単独群とそれにedrecolomabを上乗せした群とを比較したランダム化試験³⁴⁾では、毒性などには差を認めなかったものの、生存期間や無病生存期間において、edrecolomabの上乗せ効果は認められず、edrecolomab単独群は、5FU/LV群と比べて、有意に3年無病生存期間(53.0% vs. 65.5%, $p < 0.0001$)で劣っていた。

現在進行中の臨床試験と今後の展望

現在進行中のcetuximab, bevacizumab, panitumumab関連の主な臨床試験を表6に示す。Bevacizumab, cetuximabともに初回治療例でのポジティブな結果が、2006年早々にも発表され

ると期待される。一方で、抗体療法の普及に伴う医療費の高騰はすでに欧米でも問題視されており³⁵⁾、その膨大な医療費は誰が負担するのか、はたして強力な治療を必要としているのはどのような患者群であるのか、などの議論が盛んに行われている。2006年には日本の大腸がん化学療法も分子標的治療時代へ突入すると思われる。効果のある治療法をすみやかに導入することが重要であるが、そういった社会的側面もあることを頭に入れておく必要がある。

文 献

- 1) Miller RA, Maloney DG, Warnke R, et al. Treatment of B-cell lymphoma with monoclonal anti-idiotypic antibody. *N Engl J Med* 1982 ; 306 : 517.
- 2) Takahashi T, Yamaguchi T, Kitamura K, et al. Clinical application of monoclonal antibody-drug conjugates for immunotargeting chemotherapy of colorectal carcinoma. *Cancer* 1988 ; 61 : 881.
- 3) Morrison SL, Johnson MJ, Herzenberg LA, et al. Chimeric human antibody molecules : mouse antigen-binding domains with human constant regions domains. *Proc Natl Acad Sci USA* 1984 ; 81 : 6851.
- 4) Verhoeyen M, Cesar M, Winter G, et al. Reshaping human antibodies : grafting an antilysozyme activity. *Science* 1988 ; 239 : 1534.
- 5) Mendez MJ, Green LL, Corvalan JFR, et al. Functional transplant of megabase human immunoglo-

- bulin loci recapitulates human antibody response in mice. *Nat Genet* 1998 ; 15 : 146.
- 6) Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer : the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer* 2005 ; 5 : 341.
 - 7) Goldstein NI, Prewett M, Zuklys K, et al. Biological efficacy of a chimeric antibody to the epidermal growth factor receptor in a human tumor xenograft model. *Clin Cancer Res* 1995 ; 1 : 1311.
 - 8) Huang SM, Bock JM, Harari PM. Epidermal growth factor receptor blockade with C225 modulates proliferation, apoptosis, and radiosensitivity in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer Res* 1999 ; 59 : 1935.
 - 9) Huang SM, Harari PM. Modulation of radiation response after epidermal growth factor receptor blockade in squamous cell carcinomas : inhibition of damage repair, cell cycle kinetics, and tumor angiogenesis. *Clin Cancer Res* 2000 ; 6 : 2166.
 - 10) Prewett MC, Hooper AT, Bassi R, et al. Enhanced antitumor activity of anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody IMC-C225 in combination with irinotecan (CPT-11) against human colorectal tumor xenografts. *Clin Cancer Res* 2002 ; 8 : 994.
 - 11) Saltz LB, Meropol NJ, Loehrer PJ Sr, et al. Phase II trial of cetuximab in patients with refractory colorectal cancer that expresses the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 1201.
 - 12) Cunningham D, Humblet Y, Siena S, et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2004 ; 351 : 337.
 - 13) Saltz LB, Lenz H-J, Hochster H, et al. Randomized phase II trial of cetuximab/bevacizumab/irinotecan (CBI) versus cetuximab/bevacizumab (CB) in irinotecan-refractory colorectal cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 3508.
 - 14) Segal S, Van Cutsem E. Clinical signs, pathophysiology and management of skin toxicity during therapy with epidermal growth factor receptor inhibitors. *Ann Oncol* 2005 ; 16 : 1425.
 - 15) Vanhoefler U, Tewes M, Rojo F, et al. Phase I study of the humanized anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody EMD72000 in patients with advanced solid tumors that express the epidermal growth factor receptor. *J Clin Oncol* 2004 ; 22 : 175.
 - 16) Doi T, Ohtsu A, Saijo N, et al. A phase I study of a humanized monoclonal anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody "EMD72000 (Matuzumab)" administered weekly in Japanese patients with advanced solid tumors ; safety, PK and PD results of skin biopsies. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 3077.
 - 17) Rao S, Starling N, Cunningham MD, et al. Phase I study of the humanized epidermal growth factor receptor (EGFR) antibody EMD 72000 (matuzumab) in combination with ECX (epirubicin, cisplatin and capecitabine) as first line treatment for advanced oesophagogastric (OG) adenocarcinoma. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 4028.
 - 18) Blohmer J, Gore M, Kuemmel S, et al. Phase II study to determine response rate, pharmacokinetics (PK), pharmacodynamics (PD), safety, and tolerability of treatment with the humanized anti-epidermal growth factor receptor (EGFR) monoclonal antibody EMD 72000 (matuzumab) in patients with recurrent cervical cancer. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 2534.
 - 19) Malik I, Hecht JR, Patnaik A, et al. Safety and efficacy of panitumumab monotherapy in patients with metastatic colorectal cancer (mCRC). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 3520.
 - 20) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, et al. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 2129.
 - 21) Moroni M, Veronese S, Benvenuti S, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to anti-EGFR treatment in colorectal cancer : a cohort study. *Lancet Oncol* 2005 ; 6 : 279.
 - 22) Folkman J. Tumor angiogenesis : therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971 ; 285 : 1182.
 - 23) Ferrara N, Hillan KJ, Novotny W. Bevacizumab

- (Avastin), a humanized anti-VEGF monoclonal antibody for cancer therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 2005 ; 333 : 328.
- 24) Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 1011.
 - 25) Jain RK. Normalizing tumor vasculature with anti-angiogenic therapy : a new paradigm for combination therapy. *Nat Med* 2001 ; 7 : 987.
 - 26) Available from : URL : <http://www.cancer.gov/newscenter/pressreleases/AvastinLung>.
 - 27) Available from : URL : <http://www.cancer.gov/newscenter/pressreleases/AvastinBreast>.
 - 28) Hurwitz HI, Fehrenbacher L, Hainsworth JD, et al. Bevacizumab in combination with fluorouracil and leucovorin : an active regimen for first-line metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2005 ; 23 : 3502.
 - 29) Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al. High-dose bevacizumab improves survival when combined with FOLFOX4 in previously treated advanced colorectal cancer : results from the Eastern Cooperative Oncology Group (ECOG) study E3200. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 2.
 - 30) Hochster HS, Welles L, Hart L, et al. Safety and efficacy of bevacizumab (Bev) when added to oxaliplatin/fluoropyrimidine (O/F) regimens as first-line treatment of metastatic colorectal cancer (mCRC): TREE 1 & 2 Studies. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 3515.
 - 31) Chen HX, Mooney M, Boron M, et al. Bevacizumab (BV) plus 5-FU/leucovorin (FU/LV) for advanced colorectal cancer (CRC) that progressed after standard chemotherapies : an NCI Treatment Referral Center trial (TRC-0301). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2004 ; 22 : 3515.
 - 32) Posey JA, Ng TC, Yang B. A phase I study of anti-kinase insert domain-containing receptor antibody, IMC-1C11, in patients with liver metastases from colorectal carcinoma. *Clin Cancer Res* 2003 ; 9 : 1323.
 - 33) Riethmuller G, Holz E, Schlimok G, et al. Monoclonal antibody therapy for resected Dukes' C colorectal cancer : seven-year outcome of a multicenter randomized trial. *J Clin Oncol* 1998 ; 16 : 1788.
 - 34) Punt CJ, Nagy A, Douillard JY, et al. Edrecolomab alone or in combination with fluorouracil and folinic acid in the adjuvant treatment of stage III colon cancer : a randomised study. *Lancet* 2002 ; 360 : 671.
 - 35) Uyl-de Groot CA, Giaccone G. Health economics : can we afford an unrestricted use of new biological agents in gastrointestinal oncology? *Curr Opin Oncol* 2005 ; 17 : 392.
 - 36) Venook AP. Epidermal growth factor receptor-targeted treatment for advanced colorectal carcinoma. *Cancer* 2005 ; 103 : 2435.
 - 37) Harris M. Monoclonal antibodies as therapeutic agents for cancer. *Lancet Oncol* 2004 ; 5 : 292.
 - 38) Rosenberg AH, Loehrer PJ, Needle MN, et al. Erbitux (IMC-C225) plus weekly irinotecan (CPT-11), fluorouracil (5FU) and leucovorin (LV) in colorectal cancer (CRC) that expresses the epidermal growth factor receptor (EGFr). *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2002 ; 20 : 536.
 - 39) Folprecht G, Lutz MP, Seufferlein T, et al. Cetuximab and irinotecan/5-FU/FA (AIO) as first line treatment in metastatic colorectal cancer (mCRC): final results and pharmacokinetic data of a phase I / II a study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 3640.
 - 40) Rougier P, Raoul J-L, Van Laethem J-L, et al. Cetuximab + FOLFIRI as first-line treatment for metastatic colorectal CA. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2004 ; 22 : 3513.
 - 41) Díaz Rubio E, Tabernero J, van Cutsem E, et al. Cetuximab in combination with oxaliplatin/5-fluorouracil (5-FU)/folinic acid (FA) (FOLFOX-4) in the first-line treatment of patients with epidermal growth factor receptor (EGFR)-expressing metastatic colorectal cancer : an international phase II study. *J Clin Oncol (Meeting Abstracts)* 2005 ; 23 : 3535.

* * *

S-1の基礎と臨床

結腸・直腸癌

結腸・直腸癌に対するS-1単剤療法の意義

江口 貴子 白尾 国昭*

(Jpn J Cancer Chemother 33(Suppl 1):121-124, June, 2006)

S-1 as a Single Agent for Colorectal Cancer: Takako Eguchi and Kuniaki Shirao (Dept. of Gastrointestinal Oncology, National Cancer Center Hospital)

Summary

Chemotherapy for colorectal cancer is now improving rapidly due to new drugs like oxaliplatin and molecular targeting drugs. The key drug, however, is still 5-fluorouracil (5-FU). S-1 is an oral 5-FU anti-tumor drug that combines three pharmacological agents: tegafur, 5-chloro-2,4-dihydropyridine, which inhibits dihydropyrimidine dehydrogenase activity, and potassium oxonate, which reduces gastrointestinal toxicity.

The results of the phase II study suggested that S-1 as a single agent was active against metastatic colorectal cancer: CR rate was 36-40% and MST was about one-year. Toxicity was all tolerable. Clinical trials of S-1 with oxaliplatin or CPT-11 combination chemotherapy are ongoing in Japan. S-1 with molecular targeting drugs will also be studied. Therefore, S-1 is expected to play an important part in chemotherapy for colorectal cancer. Key words: S-1, Colorectal cancer, Corresponding author: Takako Eguchi, Department of Gastrointestinal Oncology, National Cancer Center Hospital, 5-1-1 Tsukiji, Chuo-ku, Tokyo 104-0045, Japan

要旨 進行再発結腸・直腸癌に対する化学療法の進歩は目覚ましいものがあるが、依然として key drug は 5-fluorouracil (5-FU) である。S-1 は 5-FU の prodrug である tegafur に、DPD 阻害剤である 5-chloro-2, 4-dihydropyridine と消化管毒性軽減作用を有する potassium oxonate とを配合した経口抗癌剤である。S-1 の結腸・直腸癌に対する第II相試験の成績は良好で、奏効率 36~40%, MST は 1 年前後が得られ、毒性も tolerable であった。2003 年 12 月結腸・直腸癌に対して保険適用となった後は、結腸・直腸癌に対する S-1 を組み入れた新たな治療戦略が検討されるようになった。現在は、高齢者や全身状態不良例に対する選択肢として日本のガイドラインにあげられているが、今後 oxaliplatin, CPT-11, 分子標的薬剤などとの併用も含め、S-1 が世界的な標準治療に組み込まれるか否かは今後の臨床試験の結果しだいである。

はじめに

近年、日本でも大腸癌罹患率が漸増しており死亡者数も増加している。大腸癌による年間死亡者数は 2003 年では年間 3.9 万人であったが、2015 年には 6 万人にも上ると推定されている。大腸癌治療の中心は外科的切除であるが、Stage IV の結腸・直腸癌の 5 年生存率はそれぞれ 12.8, 13.1% と十分ではなく、外科的切除によって治療しない患者に対する治療法を確立することが急務となっている。

irinotecan (CPT-11) や oxaliplatin (L-OHP) など

の新薬、さらには分子標的薬剤まで導入され進行再発結腸・直腸癌に対する化学療法の進歩は目覚ましいものがあるが、依然として key drug は 5-fluorouracil (5-FU) である。5-FU は生体内で特に肝臓に存在する dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) によりその 80~90% が分解されて不活性化される。その 5-FU の pro drug である tegafur と DPD 阻害剤を組み合わせることにより 5-FU の F-beta-alanine (FBAL) への代謝を阻害し、効果増強を企図した薬剤を DPD inhibitory fluoropyrimidine (DIF) と総称する。DIF は DPD を阻害することにより、生物活性を高める、血中における 5-

FUの薬物動態の個人差を少なくする、DPD発現腫瘍での抗腫瘍効果を高めかつ5-FUの代謝産物による毒性を軽減する、などの効果をもつ。DIFにはUFT、BOF-A2、S-1があるが最も強いDPD阻害活性を配合したBOF-A2は毒性のため第II相試験で開発が中止され、現在UFTとS-1が日常臨床に汎用されている。S-1はtegafurにDPD阻害剤としてuracilの約200倍の阻害活性をもつ5-chloro-2,4-dihydropyridine (CDHP)と、消化管に高濃度で存在する5-FUのリン酸化酵素であるorotate phosphoribosyl transferaseを可逆的に拮抗阻害するpotassium oxonate (Oxo) (これにより用量制限毒性である消化管毒性を軽減する)とを1:0.4:1のモル比で配合した経口抗癌剤である。S-1は進行・再発胃癌に対する第II相試験において単剤でも奏効率44.6%、MST 8か月、2年生存率17%と良好な成績を示し注目されていたため^{1,2)}、結腸・直腸癌でも同様の単剤での試験が行われた。その良好な結果をもって2003年12月、日本において保険適用となったが、現在では結腸・直腸癌に対するS-1を組み入れた新たな治療法が検討されるようになってきている。本稿では結腸・直腸癌に対するS-1単剤療法の意義、位置付けについて述べることにする。

I. 本邦における結腸・直腸癌に対する化学療法の変遷

大腸癌領域では、世界中で多くの大規模第III相試験が行われるようになり、その結果を基に標準治療が決定されるようになった。残念ながら日本はこれら世界中で行われる開発試験に参加しておらず、海外で証明された治療が日本の標準治療として採用されずにきた。しかし最近では日本も世界の標準治療を受け入れる傾向にあり、一部未承認のために使用できない治療法があるものの基本は世界の治療体系と同様である。

数年前までの本邦における進行再発大腸癌に対する化学療法は経口フッ化ピリミジン製剤が主流であった。しかしながら経口剤の利便性のみが強調され、臨床的有用性が臨床試験で検証されずに頻用されてきた。1994年にはCPT-11が承認され、また1999年に本邦での後期第II相試験の結果を基に5-FU/LV療法がRosewell Park Memorial Institute (RPMI)のレジメンとして承認され、ごく最近まで頻用されていた。2003年には後述する第II相試験の結果を基にS-1が承認された。

このころより本邦でも世界の標準治療を受け入れる気運が高まり、本邦でもCPT-11+5-FU/LV (IFL)の第I/II相試験で日本人における投与量の検討が行われ、標準治療として使用されるようになった。しかしその後米国で行われたIFLを含む二つの第III相試験 (N 9741,

C 89803)の解析で、IFL療法の60日以内の早期死亡例が高いこと、また5-FU持続静注を用いるレジメンより骨髄抑制や下痢などの副作用が強くでやすく毒性の強いレジメンであることが問題となったこともあり³⁾、現在では欧米はもとより本邦でもその使用は減少しつつある。その後CPT-11+5-FU/LV (FOLFIRI)療法の投与量に関する検討も行われ、さらにはL-OHPが承認されL-OHP/5-FU/LV (FOLFOX)療法も日本で使用できるようになった。現在bavacizumab, cetuximabなどの分子標的薬剤に関しては治験が行われている段階である。以上より現在の標準治療はFOLFOX, FOLFIRI, CPT-11単剤などであり、これが適応とならない全身状態不良例に対しては5-FU/LV, FU系単剤などを使用することと考えられる。

II. 結腸・直腸癌に対するS-1単剤臨床試験

本邦で行われたS-1の結腸・直腸癌に対する第II相試験の成績を紹介する。まず各種悪性腫瘍35例を対象として行われた第I相試験の成績を最初に述べるが、75 mg/body, 1日2回, 28日間連日投与14日間休薬が推奨用量となり、用量制限毒性は白血球減少を主とする骨髄抑制であった⁴⁾。その後5-FU系前治療ありの症例を含む結腸・直腸癌31例を対象として前期第II相試験が行われ、50 mg/body/day, 1日2回, または75 mg/body/day, 1日2回で28日間連日投与14日間休薬を1コースとし、奏効率16.7%、MST 358日であった⁵⁾。この前期第II相試験の結果から、体表面積換算で90 mg/m²/day未満の投与が行われた症例において有害反応による中止率が低かったことから、引き続き行われた二つの後期第II相試験では体表面積換算で80 mg/m², 1日2回, 28日間連日投与14日間休薬が推奨用量となった。2000年に報告されたOhtsuらの結腸・直腸癌初回治療例62例を対象として行われた後期第II相試験では、奏効率35.5%、MST 378日であった。原発巣別効果では結腸34.9%、直腸36.8%、部位別効果では肝27.5%、肺39.3%であった。毒性についてはgrade 3以上の好中球減少を13%に認めたが、その他のgrade 3以上の毒性はいずれも10%未満と軽微であった (Table 1)⁶⁾。また、同様の対象38例に対して行われたShiraoらの後期第II相試験では奏効率39.5%、MST 358日が得られ、原発巣別効果では結腸44%、直腸33%、部位別効果では肝38%、肺27%、リンパ節30%であった。grade 3以上の毒性はいずれも10%未満であり (Table 2)、S-1の有効性と安全性が再現された⁷⁾。以上のような後期第II相試験の成績から、S-1は胃癌に引き続き結腸・直腸癌においても承認を受けた。

Table 1 Toxicity data of S-1 phase II study

Toxicity	grade				Incidence of ≥ grade 3 (%)
	(No. of patients)				
	1	2	3	4	
Haematological					
Leukopenia	17	10	1	2	4.8
Neutropenia	4	11	7	1	12.9
Anemia	5	11	4	0	6.5
Thrombocytopenia	5	2	0	5	8.1
Non-haematological					
Stomatitis	8	2	0	0	—
Diarrhea	2	6	1	0	1.6
Anorexia	7	11	3	0	4.8
Nausea/vomiting	7	4	1	0	1.6
Skin rash	2	4	0	0	—
Pigmentation	11	0	0	0	—
Malaise	9	2	1	0	1.6

(Ohtsu, *et al*, 2000)

III. 今後の展望—S-1 の位置付け—

世界の標準治療という観点からみると FOLFIRI→FOLFOX 6 という群と、その逆の群の 2 アームの第 III 相試験では前者で 74%，後者で 62% の患者が second-line を受けた上で両アームとも同等に約 20 か月の MST を得ることができており⁸⁾、またその後いくつかの RCT の結果から 5-FU, CPT-11, L-OHP の 3 剤使用率と生存期間は正比例することがわかり、3 剤をうまく組み合わせることが進行大腸癌の化学療法において重要であると考えられている⁹⁾。開発された時期により後治療に差はあるものの S-1 をはじめとする経口フッ化ピリミジン単剤では、いずれも MST は 1 年程度である。これらは再現性のあるデータであり、結腸・直腸癌に対する化学療法においては経口フッ化ピリミジン単剤の限界を表すものである。そこで、最近これらの経口剤と CPT-11 や L-OHP との併用療法が注目されるようになり、有望な成績が報告されつつある¹⁰⁻¹²⁾。S-1 についてはいくつかの S-1+CPT-11 併用第 II 相試験が本邦で終了しているが、その結果は他章に譲る。S-1+L-OHP については現在第 II 試験が治験として進行中でありその結果が期待される。以上、大腸癌を対象にした S-1 の複数の臨床試験が日本で行われたが、いまだ第 III 相試験の結果は示されていない。一方、capecitabine (本邦未承認) や UFT/LV などの経口フッ化ピリミジン薬剤はすでに第 III 相試験で 5-FU/LV との同等性が示されており、現在これらに CPT-11 や oxaliplatin の上乗せ効果が検討されている段階である。この点からも、S-1 はいまだ大腸癌領域では標準治療として認められるには不十分なデータしか得られていないといえる。しかし、単剤の試験結果で示

Table 2 Toxicity data of S-1 phase II study

Toxicity	grade				grade ≥ 3 (%)
	1	2	3	4	
	Anemia	7	7	3	
Leukopenia	7	10	0	0	0
Neutropenia	4	10	2	0	5.3
Thrombocytopenia	4	1	0	0	0
Diarrhea	5	8	1	0	2.6
Nausea/vomiting	8	7	0	0	0
Anorexia	15	4	0	0	0
Stomatitis	11	3	0	0	0
Hand-foot syndrome	2	0	0	0	0
Pigmentation	15	0	0	0	0
Malaise	17	2	0	0	0
Bilirubinemia	— ^a	14	3	0	7.9

(Shirao, *et al*, 2004)

^a: grade 1 bilirubinemia is not defined in the toxicity criteria of the Japan Society for Cancer Therapy. (Japan Society for Cancer Therapy: Criteria for the evaluation of the clinical effects of solid cancer chemotherapy. *J Jpn Soc Cancer Ther* 28: 101-130, 1993.)

たとおり、その成績は効果、毒性ともに大きな期待を抱かせるものであり、今後の迅速な開発が待たれるところである。現段階での本邦における S-1 の位置付けについて明確な見解はないが、FOLFOX や FOLFIRI が適応とならない全身状態不良例における 5-FU/LV, UFT/LV に次ぐ治療として考えるべきと思われる。

bavacizumab, cetuximab などの分子標的薬剤は現在それぞれ FOLFOX, CPT-11 との併用第 II 相試験が行われている段階で、近い将来本邦でも承認される見込みである。しかし医療経済的観点から考えると、すべての患者に同じ治療を行うのではなく確実な標的、感受性をもった患者群に対し適切に治療を選択していく、すなわちテーラーメイド治療が今後課題となってくるだろう。5-FU に関する感受性予測、予後予測については今までに多数の報告がされている。Metzger らは、大腸癌の組織内の mRNA の発現と 5-FU/LV 療法に対する抗腫瘍効果との関係について報告しており、それによると 5-FU/LV 療法の奏効率は、全例の奏効率が 29% であるのに対して、TS 低発現例 57%，TP 低発現例 39%，TS, TP 両方の低発現例では奏効率 79% であり、5-FU の効果発現には、TS, TP の発現が低いことが必要であるとしている¹³⁾。さらに同グループの Salonga らは DPD のデータを加え、5-FU/LV 療法の奏効した症例はすべて DPD, TS, TP の三つの酵素発現が低い症例であり、DPD, TS および TP のいずれか一つが高発現していた症例では奏効例はなかったと報告し、5-FU の効果発現には DPD, TS, TP のすべてが低いことが必要であると

している¹⁴⁾。本邦では市川らが腫瘍内の酵素発現と大腸癌に対する5-FU系薬剤の治療効果予測について、low DPDかつlow TPかつhigh OPRTの症例では、5-FU系薬剤に対する奏効率が100%であるのに対して、それ以外の症例では奏効率が23%と低く生存期間にも有意な差がみられたと報告している¹⁵⁾。以上、DPDが高値の患者に対する5-FU系薬剤の投与については、S-1をはじめとするDPD阻害剤を含むDIF製剤が適切と考えられる。しかしこれらの因子はいずれも5-FUの効果予測因子としてだけでなく予後因子である可能性があり、テーラーメイド治療に寄与するにはさらなる検討が必要と思われる。

おわりに

消化器癌の化学療法において、フッ化ピリミジン系薬剤はいまだkey drugであり続けている。その経口薬であるS-1は、患者のquality of lifeを低下させるような重篤な毒性の頻度が少ない、外来治療が可能である、通院回数を減らせるなどの利点をもつ有望な薬剤であり、今後第III相試験を通じて世界的標準治療のなかに組み込まれていくことが期待される。さらに今後の化学療法のためめざす方向性の一つであるテーラーメイド治療におけるkey drugの一つとなる可能性が高い薬剤といえる。本邦は欧米に先駆けてS-1の開発を行ってきた経緯があり、今後もその発展に寄与すべく検討を重ねていく責務があると考えられる。

文 献

- 1) Sakata Y, Ohtsu A, Horikoshi N, *et al*: Late phase II study of novel oral fluoropyrimidine anticancer drug S-1 (1 M tegafur-0.4 m gimestat-1 M otastat potassium) in advanced gastric cancer patients. *Eur J Cancer* 34: 1715-1720, 1996.
- 2) Koizumi W, Kurihara M, Nakano S, *et al*: Phase II study of S-1, a novel oral derivative of 5-fluorouracil, in advanced gastric cancer. *Oncology* 58: 191-197, 2000.
- 3) Rothenberg ML, Meropol NJ, Poplin EA, *et al*: Mortality associated with irinotecan plus bolus fluorouracil/leucovorin: Summary findings of an independent panel. *J Clin Oncol* 19: 3801-3807, 2001.
- 4) 田口鐵男, 犬山征夫, 金丸龍之介・他: S-1の臨床第I相試験. *癌と化学療法* 24(15): 2253-2264, 1997.
- 5) Sugimachi K, Maehara Y, Horikoshi N, *et al*: An early phase II study of oral S-1, a newly developed 5-fluorouracil derivative for advanced and recurrent gastrointestinal cancers. *Oncology* 57: 202-210, 1999.
- 6) Ohtsu A, Baba H, Sakata Y, *et al*: Phase II study of S-1, a novel oral fluoropyrimidine derivative, in patients with metastatic colorectal carcinoma. *Br J Cancer* 83: 141-145, 2000.
- 7) Shirao K, Ohtsu A, Takada H, *et al*: Phase II study of S-1 for treatment of metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 100: 2355-2361, 2004.
- 8) Tournigand C, André T, Achille E, *et al*: FOLFIRI followed by FOLFOX 6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: A randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22: 229-237, 2004.
- 9) Grothey A, Sargent D, Goldberg RM, *et al*: Survival of patients with advanced colorectal cancer improves with the availability of fluorouracil-leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin in the course of treatment. *J Clin Oncol* 22: 1209-1214, 2004.
- 10) Douillard J, Bennouna J, Artru P, *et al*: UFT/LV combination based regimens with oxaliplatin or irinotecan as first line treatment for patients with non respectable metastatic colorectal cancer: Results of two multicentric phase II trials. *Proc ASCO* # 3545, 2004.
- 11) Baletta E, Di Bartolomeo M, Mariani J, *et al*: Randomized multicenter Phase II trial of two different schedules of irinotecan combined with capecitabine as first-line treatment in metastatic colorectal carcinoma. *Cancer* 100: 279-287, 2004.
- 12) Cassidy J, Tabernero J, Twelves C, *et al*: XELOX (capecitabine plus oxaliplatin): Active first-line therapy for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22: 2084-2091, 2004.
- 13) Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, *et al*: High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 4: 2371-2376, 1998.
- 14) Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, *et al*: Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6: 1322-1327, 2000.
- 15) 市川 度, 植竹宏之, 桐原正人・他: DPD・TS発現からみた進行再発大腸癌に対する5FUの治療効果予測. *日癌治療会誌* 35(2): 342, 2000.

Pharmacodynamic Studies of Gefitinib in Tumor Biopsy Specimens From Patients With Advanced Gastric Carcinoma

Federico Rojo, Josep Tabernero, Joan Albanell, Eric Van Cutsem, Atsushi Ohtsu, Toshihiko Doi, Wasaburo Koizumi, Kuniaki Shirao, Hiroya Takiuchi, S. Ramon Cajal, and José Baselga

From the Medical Oncology Service, Vall d'Hebron University Hospital, Barcelona, Spain; the University Hospital Gasthuisberg, Leuven, Belgium; the National Cancer Center Hospital E, Chiba; the Kitasato University E Hospital, Kanagawa; the National Cancer Centre Hospital, Tokyo; and the Osaka Medical College, Osaka, Japan.

Submitted February 27, 2006; accepted May 17, 2006.

Supported by AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom.

Presented in part at the 39th Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology, Chicago, IL, May 31, June 3, 2003.

Terms in blue are defined in the glossary, found at the end of this article and online at www.jco.org.

Authors' disclosures of potential conflicts of interest and author contributions are found at the end of this article.

Address reprint requests to José Baselga, MD, Medical Oncology Service, Vall d'Hebron University Hospital, P. Vall d'Hebron 119-129, 08035 Barcelona, Spain; e-mail: jbaselga@vhebron.net.

© 2006 by American Society of Clinical Oncology

0732-183X/06/2426-4309/\$20.00

DOI: 10.1200/JCO.2005.04.2424

ABSTRACT

Purpose

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is highly expressed in some gastric cancers and is implicated in cancer cell growth and proliferation. The objective of this study was to assess the in situ biologic activity of the EGFR tyrosine kinase inhibitor gefitinib in gastric tumor samples in a phase II study.

Methods

Patients with previously treated stage IV adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction were randomly assigned to receive gefitinib (250 or 500 mg/d). Tumor biopsies, obtained at screening and on day 28 of treatment, were assessed for biomarker expression using immunohistochemistry and analysis of apoptosis.

Results

One hundred sixteen tumor samples from 70 patients were available, 70 were baseline and 46 were on-therapy biopsies. At baseline, levels of EGFR expression significantly correlated with levels of phosphorylated EGFR (pEGFR; $P < .001$) and Ki67 expression ($P = .011$), but not with phosphorylated mitogen-activated protein kinase (pMAPK). After gefitinib treatment, levels of pEGFR in tumor cells were significantly reduced ($P = .001$); this was not the case for pMAPK and phosphorylated Akt (pAkt). However, in some cases gefitinib inhibited pAkt and these tumors had enhanced apoptosis. Likewise, there was a significant correlation between increased exposure to gefitinib and enhanced apoptosis.

Conclusion

Gefitinib reached the tumors at concentrations sufficient to inhibit EGFR activation in advanced gastric carcinoma patients, although this did not translate into clinical benefit. Overall, intratumoral phosphorylation of MAPK and Akt was not significantly inhibited by gefitinib. However, the finding that decreases in pAkt correlated with enhanced apoptosis deserves further exploration.

J Clin Oncol 24:4309-4316. © 2006 by American Society of Clinical Oncology

INTRODUCTION

Gastric cancer is one of the most common causes of cancer deaths—worldwide it is second only to lung cancer.¹ Prognosis for patients with advanced stomach cancer is poor; the 5-year survival rate for patients with localized disease is approximately 60%, whereas for those with distant disease it is only 2%.² Therefore, there is clearly a need for new therapeutic approaches, among them the development of agents against molecular targets.³

Epidermal growth factor receptor (EGFR) is a member of the ErbB family of receptors—a family of receptors that plays a major role in promoting proliferation and the malignant growth of a variety of epithelial tumors (see review in Yarden and

Sliwkowski⁴). EGFR is highly expressed in approximately one third of advanced-stage gastric cancers⁵ and has been shown to be a modest prognostic indicator.⁶ Recently, agents targeting the EGFR have been shown to have meaningful clinical activity in a variety of tumor types (see review in Baselga and Arteaga⁷).

In order to study the effects of anti-EGFR therapy in patients with advanced gastric cancer, we conducted the current phase II study with gefitinib (Iressa; AstraZeneca, Macclesfield, Cheshire, United Kingdom), an orally active EGFR tyrosine kinase inhibitor that blocks receptor-dependent signal transduction and that shown to be active in patients with non-small-cell lung cancer.⁸ Our aim was to determine the antitumor activity of gefitinib in

patients with advanced gastric cancer and to study the effects of gefitinib on EGFR phosphorylation and on the two major receptor signaling pathways, the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway and the phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K)/Akt pathway, as well as its effects on proliferation and apoptosis.

In the first phase II study of gefitinib in patients with advanced gastric cancer, gefitinib was well tolerated and demonstrated modest clinical activity with disease control rates of 13.9% and 22.9% at 250 mg/d and 500 mg/d, respectively.⁹ The clinical results will be reported elsewhere (Van Cutsem et al, manuscript in preparation). Results from the sequential tumor biopsy study to study the effects of gefitinib on EGFR signaling are reported in this article.

METHODS

Study Design

This was a randomized, double-blind, parallel-group, multicenter, two-stage, phase II study. The exploratory objectives of this study were to investigate the pharmacodynamic parameters at steady state and to evaluate whether EGFR expression correlates with the antitumor activity of gefitinib.

Patients

Eligible patients had histologically confirmed stage IV adenocarcinoma of the stomach or gastroesophageal junction and had failed one or two prior chemotherapy regimens. In addition, patients were required to have at least one measurable lesion as defined in Response Evaluation Criteria in Solid Tumors, a WHO performance status of 0 to 2, life expectancy of 12 weeks or longer, the ability to ingest food, and to be age 18 years or older. Patients who had received more than two previous chemotherapy treatments or who had their last anticancer therapy within 21 days of the start of gefitinib treatment were excluded.

All eligible patients had to provide written informed consent and the study was conducted in accordance with good clinical practice guidelines and the Declaration of Helsinki.

Treatment

Treatment was divided into four strata: two ethnic groups of patients (Japanese and non-Japanese) randomly assigned to receive gefitinib at either 250 mg/d or 500 mg/d as an oral dose. Patients continued with their assigned dose until disease progression and any patient showing evidence of response could continue with therapy outside of the core treatment period into an extension period.

Characteristic	No.	%
Patients	75	
Sex	83	17
Male:female	62:13	
Age, years		
Median	60	
Range	33-83	
Race	57	43
White: Japanese	43:32	
Prior therapy		
Experienced ≥ 1 failed chemotherapy regimen	39	52
Experienced 2 failed chemotherapy regimens	36	48
Dose, mg/d		
250	37	49
500	38	51

Table 2. Tumor Biopsies Available for Analysis

Type	No.
Primary tumor biopsies	70
Assessable primary tumor biopsies	67
On-therapy day 28 biopsies	35
Evaluable day 28 tumor biopsies	32
Sequential paired biopsies	32
Available paired samples with baseline biomarker expression above than 0	
EGFR	20
pEGFR	17
pMAPK	31
pAkt	26
Ki67	32
p27 ^{KIP1}	32

Abbreviations: EGFR, epidermal growth factor receptor; pEGFR, phosphorylated EGFR; pMAPK, phosphorylated mitogen-activated protein kinase; pAkt, phosphorylated Akt.

Pharmacokinetic Analysis

Venous blood samples for pharmacokinetic analysis were taken at screening, pregefitinib treatment, and at 1 hour, 3 hours, 5 hours, 7 hours, 12 hours, and 24 hours postgefitinib treatment on day 28 of treatment period 1. Complete pharmacokinetic data were available from 44 treated patients. In addition, a pregefitinib treatment sample was also taken on day 28 of each subsequent treatment period. Plasma was isolated from blood samples by centrifugation (10 minutes at 1,000 g) and was analyzed using high-performance liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection. The C_{max} and t_{max} values for each patient were derived from the plasma concentration-time profile and the area under the time-concentration curve (AUC)₍₀₋₂₄₎ was calculated using the linear trapezoidal rule.

Biopsy Samples

Tumor biopsies were obtained at screening (pregefitinib treatment), on day 28 of treatment, and, if possible, at disease progression. Fresh tissue samples were collected from either the primary tumor or from metastatic sites. As much tissue as possible was collected, such that the total sample volume was at least 3 × 3 × 3 mm. For endoscopic biopsies, eight to 10 samples of 1 × 1 mm were allowed. Biopsies from liver metastases were taken using a computed tomography scan-guided 18 G core needle. All samples were fixed immediately after removal in a 10% buffered formalin solution for a maximum of 48 hours at room temperature before being dehydrated and paraffin embedded under vacuum. To allow comparative biomarker studies, subsequent biopsies were taken from the same site as the screening biopsy.

Antibodies

The following antibodies were used for the detection of pharmacodynamic markers: anti-EGFR (mouse monoclonal antibody [MAb] clone

Table 3. Baseline Tumor Characteristics

Tumor Characteristic	No.	%
Location*		
Stomach	54	77.2
Gastroesophageal junction	15	21.4
Unknown	1	1.4
Type*		
Intestinal	35	50
Diffuse	27	38.6
Unknown	8	11.4

*n = 70.

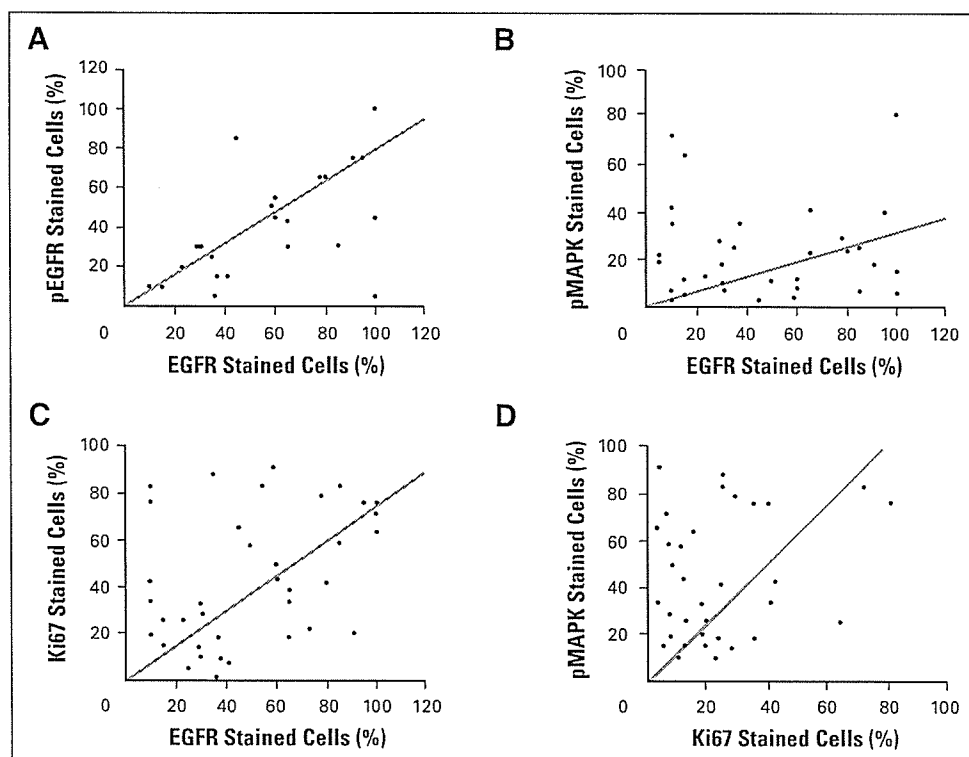


Fig 1. Baseline correlation in biomarker expression (epidermal growth factor receptor [EGFR] v phosphorylated EGFR [pEGFR]; EGFR v phosphorylated mitogen-activated protein kinase [pMAPK]; EGFR v Ki67; Ki67 v pMAPK). Significant correlations were calculated using Pearson's correlation test for EGFR versus pEGFR ($P < .001$), EGFR versus Ki67 ($P = .011$), and Ki67 versus pMAPK ($P = .01$).

2-18C9), anti-Ki67 (mouse MAb clone MIB1), and anti-p27^{kip1} (mouse MAb clone SX53G8) were obtained from DAKO (Carpinteria, CA), antiphosphorylated EGFR (pEGFR; mouse MAb clone 74) was obtained from Chemicon (Temecula, CA), anti-TGF- α (mouse MAb clone Ab-2) was obtained from Oncogene (San Diego, CA), antiphosphorylated p42/44 MAPK (pMAPK; rabbit polyclonal phosphorylated-p44/42 MAPK at Thr202/Tyr204) and antiphosphorylated Akt (pAkt; rabbit polyclonal phosphorylated-Akt at Ser473) were obtained from Cell Signaling Technology (Beverly, MA).

Immunohistochemistry

Immunostaining was performed on 4 μ m tissue sections mounted onto positively charged glass slides. After removal of paraffin in xylene and graded alcohols, sections were hydrated. Epitope retrieval was performed when necessary in 10 mmol/L EDTA buffer, pH 8 for 10 minutes in a pressure cooker (pEGFR, pMAPK, pAkt, Ki67, and p27^{kip1}) or using proteinase K digestion for 5 minutes (EGFR) at room temperature. Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) did not require antigen retrieval. After target retrieval, endogenous peroxidase was blocked by immersing the sections in .03% hydrogen peroxide for 5 minutes. Incubation with primary antibodies was performed at room temperature for 1 hour using the following dilutions: EGFR 1:1, pEGFR 1:500, TGF- α 1:100, pMAPK 1:80, pAkt 1:50, Ki67 1:100, and p27^{kip1} 1:100. Peroxidase-conjugated goat antirabbit (pMAPK and pAkt) or antimouse (EGFR, TGF- α , Ki67, and p27^{kip1}) were used to detect antigen-antibody reaction (En Vision+ System; DAKO) for 30 minutes at room temperature. For pEGFR, an enhanced signal amplification method (CSA; DAKO) was used as described in the manufacturer's guidelines. Sections were visualized with 3,3'-diaminobenzidine as a chromogen for 5 minutes and counterstained with Mayer's hematoxylin. Positive and negative controls were included in each experiment.

To score a tumor cell as positive, membrane staining was required for total EGFR, membrane or cytoplasmic staining for pEGFR, cytoplasmic staining for TGF- α , cytoplasmic and nuclear staining for pAkt, and nuclear staining for pMAPK, Ki67, and p27^{kip1}. Samples were assessed blind by investigators (F.R. and J.A.). For quantitative analysis, the percentage of stained tumor cells with each antibody in representative sections in 10 high power fields ($\times 400$)

was used to calculate the average percentage of cells staining in every sample. A tumor was considered as positive with at least 1% of stained cells. Scoring was performed blind to clinical data (F.R.) and was used for statistical analysis.

Terminal Deoxynucleotide Transferase-Mediated dUTP Nick End Labeling Assay

Determination of apoptosis was measured by TUNEL (Terminal deoxynucleotide transferase [TdT]-mediated dUTP Nick End Labeling) assay on tissue sections using fluorescein-labeled 12-dUTP-TdT (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) after proteinase K digestion of the tissue. The apoptotic index was expressed as a percentage calculated from the number of green fluorescent cells in 10 high-power fields of the tumor tissue ($\times 400$ optical magnification) using a fluorescence Elipse E400 Nikon microscope (Nikon, Kanagawa, Japan). Absolute differences between apoptotic index in pre- and on-therapy samples were calculated.

Statistical Methods

Statistical analyses were carried out using the SPSS data analysis program, version 10.0 (SPSS Inc, Chicago, IL). The Spearman's correlation test was used to analyze statistical significance of continuous variables. Mann-Whitney U test was used to compare group means. Paired pre- and on-therapy samples were analyzed using the Wilcoxon signed rank test and Pearson χ^2 . Significance was exclusively calculated on paired biopsies with pretherapy expression higher than 0. All statistical tests were conducted at the two sided .05 level of significance.

RESULTS

Patients and Biopsies

In total, 75 patients were randomly assigned to receive gefitinib. Of these patients, 37 received gefitinib 250 mg/d and 38 received gefitinib 500 mg/d. Patient demographics are summarized in Table 1. From this population, 105 tumor samples were available from 70

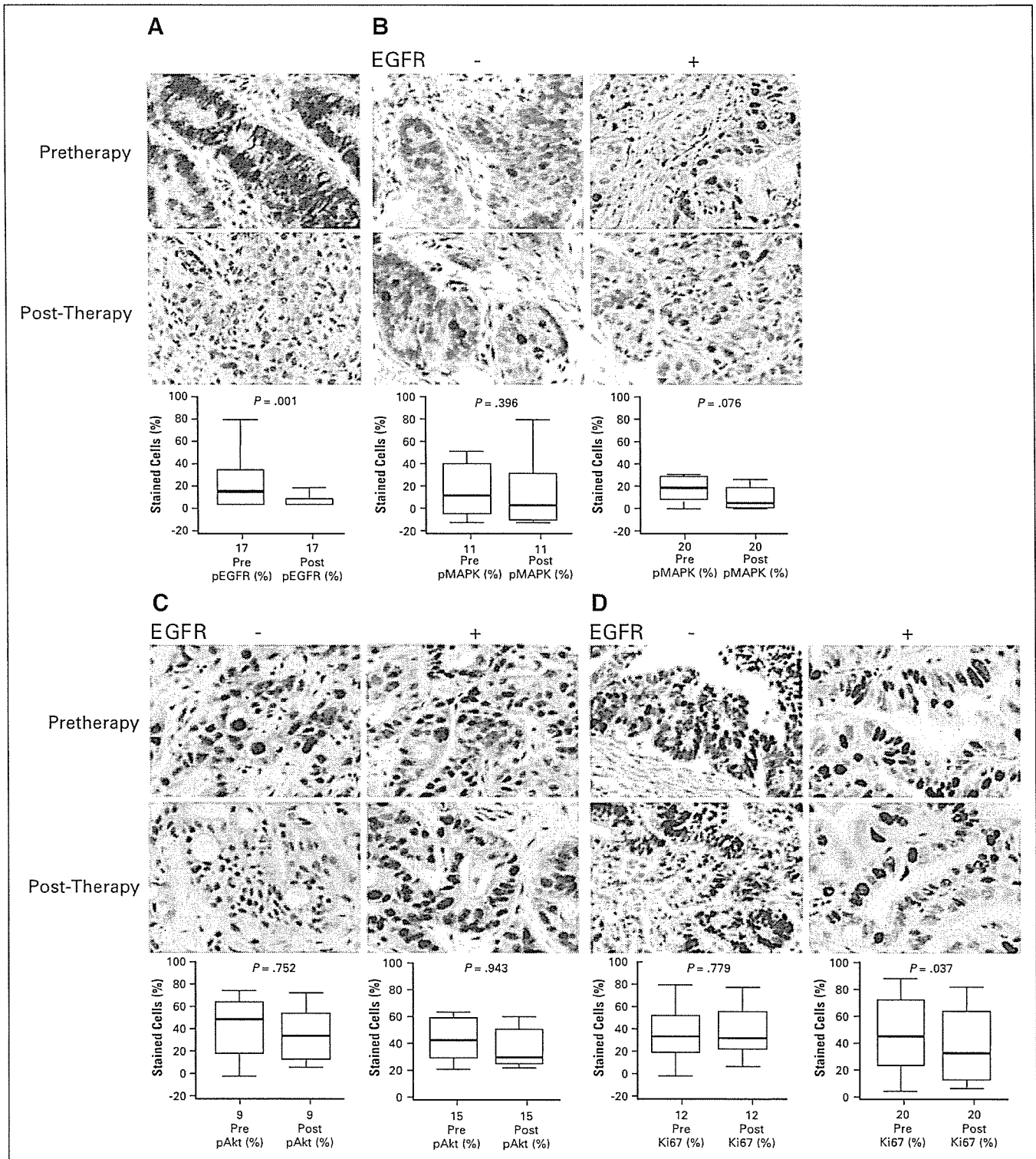


Fig 2. Basal and on-therapy levels of (A) phosphorylated epidermal growth factor receptor (pEGFR); (B) phosphorylated mitogen-activated protein kinase (pMAPK); (C) phosphorylated Akt (pAkt); and (D) Ki67. For each marker a representative case is shown in addition to the full analysis. Boxes show median and range percentage cell stained and Wilcoxon signed rank test was calculated for paired pre- and post-therapy samples.

patients (Table 2) and of these samples, 70 were baseline tumor biopsies and 35 were on-therapy biopsies. From these samples, 67 baseline tumor biopsies and 32 sequential paired biopsies (baseline and on-

therapy) were of sufficient quality for immunohistochemistry assays. The baseline tumor characteristics (tumor biomarker, location, and type) are presented in Table 3. The majority of tumor samples were

obtained from the stomach (77.2%) compared with the gastroesophageal junction (21.4%). EGFR expression was detected in 41 baseline tumor biopsies (58.6%). pEGFR was observed in the same areas of tumor as EGFR expression. pMAPK expression was also mainly located in the infiltrating borders of the tumors. In samples that included gastric mucosa, EGFR, pMAPK, and pAkt were expressed in differentiated cells, as expected, while Ki67 was located in the proliferating intermediate area of gastric glands. pAkt, Ki67, p27^{kip1}, and TGF- α were diffusely expressed in tumors. However, the expression of pAkt appeared more intense in well differentiated areas of tumors.

Correlation Between Different Biomarkers at Baseline

Results from immunohistochemistry studies showed that, at baseline, in tumors positive for EGFR, receptor expression in tumor cells was significantly correlated with levels of pEGFR expression ($P < .001$) and Ki67 expression ($P = .011$), with expression levels of both increasing as EGFR expression levels increased. No significant correlation was identified between EGFR expression levels and pMAPK expression ($P = .720$; Figure 1). However, Ki67 expression and pMAPK expression were significantly related ($P = .01$), with expression of Ki67 increasing with increasing levels of pMAPK (Fig 1). No correlations with p27^{kip1} were demonstrated in tumors.

Effects of Gefitinib Treatment on Biomarker Expression

After gefitinib treatment (day 28) at both 250 mg and 500 mg dose levels, inhibition of EGFR activation in tumor cells was observed in all 17 patients with detectable baseline EGFR activation, regardless of the dose level. The degree of EGFR inhibition was highly significant and almost complete ($P = .001$; Fig 2A). The reduction in levels of pEGFR expression occurred in tumors regardless of their level of EGFR expression, such that tumors with low, intermediate, or high expression showed a similar pattern of changes. The levels of MAPK phosphorylation at day 28 of gefitinib treatment were not significantly reduced compared with baseline phosphorylation levels in tumor samples that were considered to be EGFR negative (11 patients) nor in those considered to be EGFR positive (20 patients; $P = .396$ and $P = .076$, respectively; Fig 2B). However, in those gastric tumors with activated EGFR expression, a significant reduction of pMAPK was demonstrated ($P = .036$) after gefitinib administration at day 28. A good control in these tumors was provided by levels of pMAPK in stromal cells that remained unchanged with therapy. Interestingly, in those patients with a reduction in tumor levels of pMAPK showed a significant inhibition of tumor proliferation—Ki67—($P = .015$) in comparison to patients with increased pMAPK levels after therapy. Gefitinib treatment did not significantly reduce the levels of basal pAkt in either EGFR-negative (9 patients) or EGFR-positive tumors (15 patients; $P = .752$ and $P = .943$, respectively; Figure 2C). No significant difference was recorded between baseline and on-therapy expression of Ki67 in EGFR-negative tumors ($P = .779$); however, for tumors that expressed EGFR, Ki67 levels were significantly reduced by gefitinib ($P = .037$; Figure 2D). No significant changes in p27^{kip1} expression were detected after gefitinib administration in EGFR-negative or EGFR-positive tumors ($P = .756$ and $P = .881$, respectively). Finally, analysis of tumors according to changes in tumor proliferation revealed that those patients with a reduction in tumor levels of Ki67 showed a significant inhibition of pMAPK ($P = .025$) in comparison with patients with increased Ki67 levels after therapy.

Apoptosis in EGFR-Positive Tumors: Correlation With pAkt and Pharmacokinetic Parameters

An enhanced apoptosis index was observed in some on-therapy tumor biopsies. Seeking for potential correlations between apoptosis and other pharmacodynamic markers, we observed as correlation between inhibition of Akt phosphorylation and enhanced apoptosis. As mentioned herein, there was not an overall significant decrease of pAkt with gefitinib treatment; however, there were six patients whose tumors underwent a detectable decrease of pAkt with treatment. In those patients, there was an increase in apoptosis when compared to those tumors with lack of pAkt inhibition ($P = .030$; Fig 3). Among the 18 patients who did not have inhibition of Akt phosphorylation, increased apoptosis was observed in only six patients (33%). A closer look at this later group reveals that three patients had no change in pAkt and of these, two had also an increase in the apoptosis index. The remaining 15 patients had an increase in pAkt and enhanced apoptosis was only observed in three of these 15 patients (20%). It is not possible to establish a correlation between absolute values of apoptosis and inhibition of Akt inhibition given the limited size of our study. However, the tumors that displayed the highest levels of apoptosis were those with Akt inhibition. On the contrary, the majority of the tumors that had an increase in Akt phosphorylation had either no change or even a decrease in apoptosis.

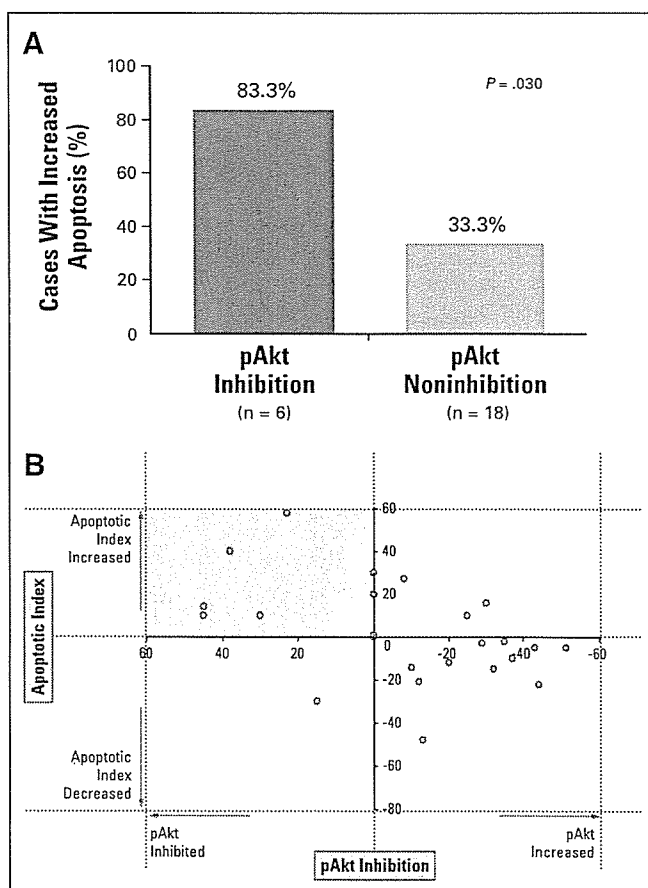


Fig 3. Positive correlation between decrease in phosphorylated Akt (pAkt) levels after gefitinib administration and tumor apoptotic index. (A) Overall correlation. (B) Individual patient display of the absolute values for pAkt inhibition and apoptosis index after gefitinib therapy. In the shadowed square the cases with increased apoptosis and pAkt reduction (five patients) are shown.

A detailed description of the clinical benefit of this study will be reported elsewhere. As a summary, and in order to be able to explore a potential association with apoptosis, disease control was observed in 13 patients (one partial response and 12 stable disease 4 weeks or longer). On-therapy biopsies were only available in six patients with clinical benefit and no on-therapy biopsy was available in the patient who achieved a partial response. Although the limited number of patients precludes any analysis, the two patients with the highest level of apoptosis as shown in Figure 3 had both a prolonged clinical benefit. The patient with an apoptotic index of 60 was on-therapy for a total of 180 days, and the patient with an apoptotic index of 40 was on-therapy for 113 days. This observation suggests a positive correlation between increased apoptosis and clinical benefit and deserves further exploration.

We also found a significant correlation between increased exposure to gefitinib and enhanced apoptosis. In those patients with assessable tumor samples for apoptotic index and pharmacokinetic assessments, there was a strong correlation between a positive apoptotic index average and enhanced gefitinib concentration, calculated as C_{max} ($P < .001$), and total exposure, calculated as $AUC_{(0-24)}$ ($P < .001$; Fig 4). No statistical differences in apoptosis and pharmacokinetic

parameters were detected between Japanese and non-Japanese population, and between sex, age, and patients with disease control versus those with progression of the disease.

DISCUSSION

In this study, we evaluated evidence of biologic activity of gefitinib in gastric tumor samples. Expression of the biomarkers EGFR, pEGFR, MAPK, Akt, p27^{kip1}, and Ki67 was assessed before and after treatment in sequential tumor biopsy samples from 70 patients with advanced gastric cancer.

Gefitinib demonstrated activity against its target, the EGFR; in these gastric tumors, resulting in a complete and statistically significant inhibition of EGFR phosphorylation in tumors. However, inhibition of EGFR phosphorylation was not accompanied by significant inhibition of MAPK and Akt activation as measured by their phosphorylation status. However, there were hints of biologic effects of EGFR inhibition in some tumors. For example, the proliferation marker Ki67 was significantly inhibited in EGFR-positive tumors

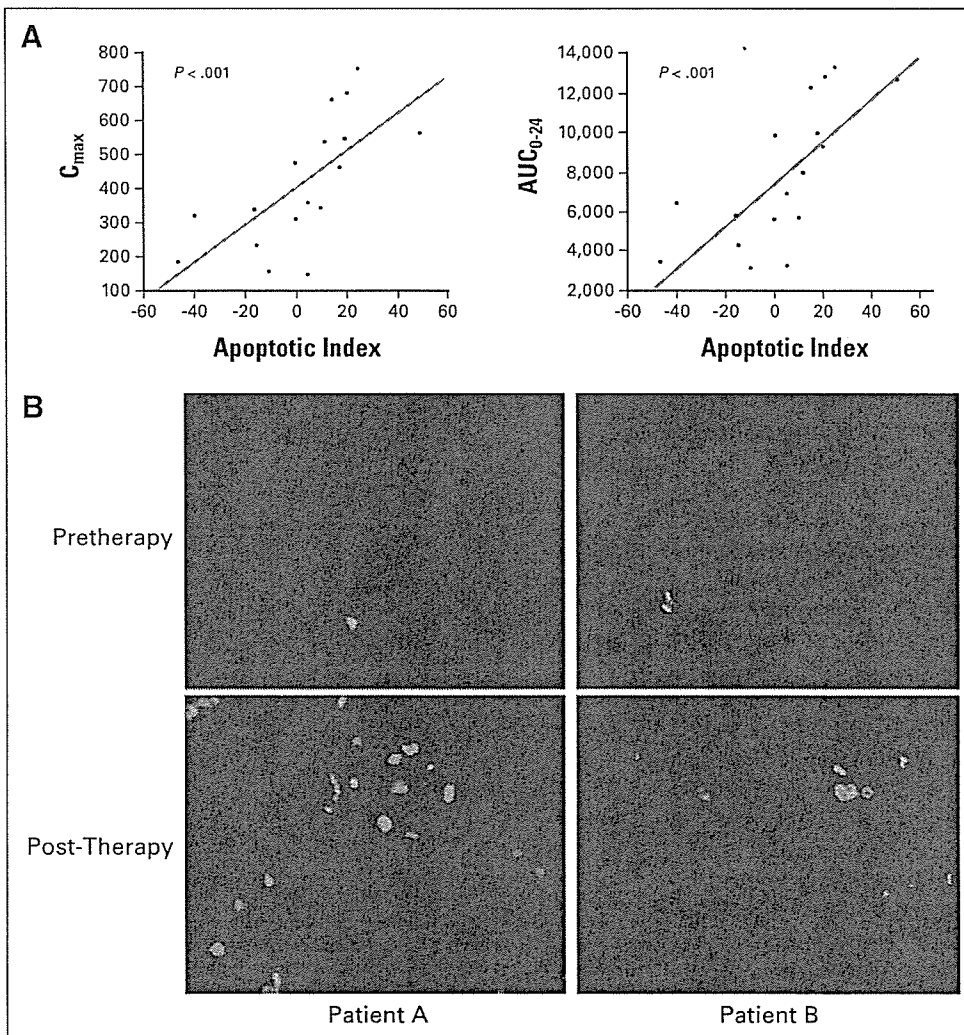


Fig 4. Correlation between pharmacokinetic parameters and apoptosis. (A) An average of apoptotic index between pre- and post-therapy samples was correlated with maximum concentration (C_{max}) and area under the time-concentration curve ($AUC_{(0-24)}$). (B) Two representative patients are shown. Increased apoptosis is observed in patient A after gefitinib treatment in contrast with patient B. Higher gefitinib concentration and total exposure was demonstrated in patient A.

treated with gefitinib and this inhibition in proliferation correlated with a significant reduction in the activation of MAPK. Likewise, those patients who had a decrease in pAkt had enhanced apoptosis in comparison with tumors without change in pAkt. This is an indication that gefitinib may inhibit tumor proliferation and/or induce apoptosis within a subgroup of EGFR-sensitive patients; however, the insensitive patients may result in a dilution of any observable benefit.¹⁰ One might speculate the reasons underlying the lack of Akt inhibition in the majority of tumors. Activation of PI3K/Akt is also mediated via ErbB2 through *trans*-activation and phosphorylation of ErbB3.¹¹ ErbB2 is highly expressed in 8% to 40% of gastric cancers, depending on disease stage, and ErbB3 is highly expressed in 72% to 86% of advanced gastric carcinomas.⁵ However, some studies have shown that gefitinib does prevent EGFR and ErbB2-mediated activation of ErbB3.^{12,13} Alternative mechanisms of Akt activation, independent of ErbB receptors, may be at play in gastric cancer, including loss of activity of the tumor suppressor gene *PTEN* that results in enhanced PI3K-Akt activity and resistance to EGFR inhibitors.¹⁴ In gastric cancer, evidence suggests that a reduction in *PTEN* expression contributes to the malignant transformation of the gastric mucosa.^{15,16} This ErbB-independent Akt activation may be therapeutically exploitable.¹⁷ Our findings would support a combined anti-EGFR and anti-PI3Kinase approach as these agents become available for clinical testing.

Other pharmacodynamic studies of gefitinib have been performed in skin biopsy samples¹⁸ and in tumor biopsies from patients with advanced breast cancer¹⁹ and colorectal cancer.²⁰ The results from skin biopsy analysis described an abolition of EGFR and most of EGFR downstream signaling pathways.¹⁸ The pharmacodynamic study of gefitinib in breast cancer demonstrated an almost total loss of EGFR phosphorylation and a decrease in MAPK phosphorylation after gefitinib treatment. Clinical disease stabilization was observed in some patients. Furthermore, a reduction in Ki67 expression levels was observed only in tumors with low pAkt levels,¹⁹ suggesting elements of the PI3K pathway may be involved in resistance to gefitinib therapy and this may, in part, explain the results presented herein. In colorectal carcinoma, a recent study with gefitinib has reported lack of inhibition of EGFR.²⁰ However, other studies with anti-EGFR agents have been reported to inhibit EGFR activation in patients with advanced colon cancer.^{21,22} Therefore, there is mounting evidence that EGFR inhibition in the tumor is achieved in the different tumor types, although clinical responses and downstream signaling inhibition may depend on EGFR sensitivity of a given tumor type.

In conclusion, in this first study using sequential biopsies from patients with advanced gastric cancer, gefitinib demonstrated biologic activity to effectively inhibit EGFR activation. Gefitinib had modest clinical efficacy as well as limited effects on EGFR downstream signaling pathways. However, a subpopulation of gastric tumors have evidence of EGFR sensitivity, as demonstrated by decrease in proliferation and increased apoptosis, which warrants further study.

REFERENCES

- Hohenberger P, Gretschel S: Gastric cancer. *Lancet* 362:305-315, 2003
- Jemal A, Murray T, Samuels A, et al: Cancer Statistics, 2003. *CA Cancer J Clin* 53:5-26, 2003
- Tabernero J, Macarulla T, Ramos FJ, et al: Novel targeted therapies in the treatment of gastric and esophageal cancer. *Ann Oncol* 16:1740-1748, 2005
- Yarden Y, Sliwkowski M: Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2:127-137, 2001
- Salomon D, Brandt R, Ciardiello F, et al: Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. *Crit Rev Oncol Hematol* 19:183-232, 1995
- Nicholson RI, Gee JM, Harper ME: EGFR and cancer prognosis. *Eur J Cancer* 37:S9-15, 2001 (suppl 4)
- Baselga J, Arteaga CL: Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol* 23:2445-2459, 2005
- Herbst RS, Fukuoka M, Baselga J: Gefitinib: A novel targeted approach to treating cancer. *Nat Rev Cancer* 4:956-965, 2004
- Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: First results of the ATAC randomised trial. *The Lancet* 359:2131-2139, 2002
- Dancey JE, Freidlin B: Targeting epidermal growth factor receptor: Are we missing the mark? *Lancet* 362:62-64, 2003
- Vivanco I, Sawyers CL: The phosphatidylinositol 3-Kinase-Akt pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2:489-501, 2002
- Engelman JA, Janne PA, Mermel C, et al: ErbB-3 mediates phosphoinositide 3-kinase activity in gefitinib-sensitive non-small cell lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3788-3793, 2005
- Moasser MM, Basso A, Averbuch SD, et al: The tyrosine kinase inhibitor ZD1839 ("Iressa") inhibits HER2-driven signaling and suppresses the growth of HER2-overexpressing tumor cells. *Cancer Res* 61:7184-7188, 2001
- Bianco R, Shin I, Ritter CA, et al: Loss of PTEN/MMAC1/TEP in EGF receptor-expressing tumor cells counteracts the antitumor action of EGFR tyrosine kinase inhibitors. *Oncogene* 22:2812-2822, 2003
- Fei G, Ebert MPA, Mawrin C, et al: Reduced PTEN expression in gastric cancer and in the gastric mucosa of gastric cancer relatives. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 14:297-303, 2002
- Li Y-L, Tian Z, Wu D-Y, et al: Loss of heterozygosity on 10q23.3 and mutation of tumor suppressor gene PTEN in gastric cancer and precancerous lesions. *World J Gastroenterol* 11:285-288, 2005
- Castillo SS, Brognard J, Petukhov PA, et al: Preferential inhibition of Akt and killing of Akt-dependent cancer cells by rationally designed phosphatidylinositol ether lipid analogues. *Cancer Res* 64:2782-2792, 2004
- Albanell J, Rojo F, Averbuch S, et al: Pharmacodynamic studies of the epidermal growth factor receptor inhibitor ZD1839 in skin from cancer patients: Histopathologic and molecular consequences of receptor inhibition. *J Clin Oncol* 20:110-124, 2002
- Baselga J, Albanell J, Ruiz A, et al: Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer. *J Clin Oncol* 23:5323-5333, 2005
- Rothenberg ML, LaFleur B, Levy DE, et al: Randomized Phase II trial of the clinical and biological effects of two dose levels of gefitinib in patients with recurrent colorectal adenocarcinoma. *J Clin Oncol* 23:9265-9274, 2005
- Casado E, Folprecht G, Paz-Ares L, et al: A phase I/IIA pharmacokinetic (PK) and serial skin and tumor pharmacodynamic (PD) study of the EGFR irreversible tyrosine kinase inhibitor EKB-569 in combination with 5-fluorouracil (5FU), leucovorin (LV) and irinotecan (CPT-11) (FOLFIRI regimen) in patients (pts) with advanced colorectal cancer (ACC). *J Clin Oncol* 22:255, 2004 (abstr 3543)
- Salazar R, Tabernero J, Rojo F, et al: Dose-dependent inhibition of the EGFR and signalling pathways with the anti-EGFR monoclonal antibody (MAb) EMD 72000 administered every three weeks (q3w): A phase I pharmacokinetic/pharmacodynamic (PK/PD) study to define the optimal biological dose (OBD). *J Clin Oncol* 14S:127, 2004 (suppl)