

ORIGINAL ARTICLE – GASTROINTESTINAL ONCOLOGY

Prevention of Severe Pelvic Abscess Formation Following Extended Radical Surgery for Locally Recurrent Rectal Cancer

Mamoru Uemura, MD, PhD, Masataka Ikeda, MD, PhD, Mitsugu Sekimoto, MD, PhD, Naotsugu Haraguchi, MD, PhD, Tsunekazu Mizushima, MD, PhD, Hirofumi Yamamoto, MD, PhD, Ichiro Takemasa, MD, PhD, Hideshi Ishii, MD, PhD, and Masaki Mori, MD, PhD

Department of Surgery, Gastroenterological Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University, Osaka, Japan

ABSTRACT

Background. For treatment of locally recurrent rectal cancer (LRRC), extended radical surgery is sometimes required to obtain a negative margin. Such surgery is often associated with severe postoperative pelvic abscess (PA) formation. The aim of this study was to determine the effects of reconstructive surgery using a large rectus abdominis myocutaneous (RAM) flap and anal preservation surgery on the incidence of severe PA.

Method. Between February 1998 and June 2008, 44 patients underwent extended surgery for LRRC. Patients were divided into the pre-2004 group ($n = 15$) and the post-2004 group ($n = 29$). To reduce the risk of infections, we modified the surgical approach after 2004 to include a larger volume of RAM flap (modified RAM flap) and implemented anal preservation surgery.

Results. The overall incidence of severe PA was significantly lower in the post-2004 group [6 of 29 (21%)] than the pre-2004 group [9 of 15 (60%), $P = 0.017$]. The incidence of severe PA was lower in the anal preservation group [1 of 12 (8.3%)] compared with those who did not undergo such surgery [14 of 32 (44%), $P = 0.035$]. Modified RAM flap reduced the incidence of severe PA, albeit insignificantly (pre-2004 group: 57%, post-2004 group: 23%). All three patients who underwent anal preservation and modified RAM flap reconstruction did not develop severe PA. Multiple logistic analysis identified no anal preservation (Odds ratio [OR] = 10.6) and performing of sacrectomy (OR = 20.0) as risk factors for severe PA.

Conclusion. Anal preservation surgery is an effective measure against the development of severe PA after radical resection of LRRC.

Local recurrence of rectal cancer (LRRC) is a formidable problem after surgery for primary advanced rectal cancer. The reported incidence of LRRC ranges between 5% and 30% after curative resection.^{1,2} The prognosis of these patients is usually poor in terms of survival and quality of life. Since 20%–50% of these patients have local recurrence in the absence of distant metastasis, surgical intervention is one of the best treatment choices for cure.^{1,3} However, extended radical surgery including sacrectomy is required to obtain negative surgical margin.^{4–8} Pelvic abscess (PA) frequently develops after such radical surgeries with large pelvic defect and could cause severe infection and septicemia. Jimenez et al. reported that the incidence of severe PA after total pelvic exenteration for colorectal cancer was 20%.⁹ Furthermore, Moriya et al. reported that pelvic sepsis occurred in 39% of patients who underwent total pelvic exenteration with distal sacrectomy for LRRC.⁶

Several reports indicate that pelvic reconstruction after extended pelvic surgery using vertical rectus abdominis myocutaneous (RAM) flap is useful in preventing various perineal wound complications.^{10–14} To reduce both pelvic defect and wound dehiscence, we have used various techniques with the aim of preserving the anal region, especially in cases with sufficient distal surgical margin. To our knowledge, there are no reports on the oncological criteria of anal preservation. The purpose of this study was to determine the impact of RAM flap reconstruction and anal preservation on prevention of severe perineal wound complications after resection of LRRC.

© Society of Surgical Oncology 2009

First Received: 8 December 2008;

Published Online: 9 June 2009

M. Ikeda, MD, PhD

e-mail: miked@gesurg.med.osaka-u.ac.jp

PATIENTS AND METHODS

Between February 1998 and June 2008, 59 patients underwent resection for LRRC. Among them, 44 patients underwent extended surgery for curative intent. In this study, extended rectal surgery is defined as resection of LRRC with resection of adjacent organs such as urogenital organs and sacral bone. The patients included 32 males (73%) and 12 females (27%), with a median age of 59 years (range, 28–74 years). Patient data including age, gender, height, weight, smoking habit, history of diabetes, preoperative albumin level, preoperative hemoglobin level, the American Society of Anesthesiologists (ASA) score as determined by the anesthesiology team, the use of preoperative chemoradiotherapy, procedures performed, duration of operation, perioperative transfusion, intraoperative contamination, and nature of the primary surgery were examined.

In this study, severe PA was defined as: (1) infection in the pelvis with large wound dehiscence lasting more than 8 weeks, (2) infection in pelvis that needs not only drainage but also reoperation because of large dead space (larger than a fist size) with large wound break down was left after drainage, and (3) infection in the pelvis that resulted in septicemia. PA was defined as mild and small abscess when it did not fulfill the criteria of severe PA; it required drainage by interventional radiology or direct drainage through the wound dehiscence, but did not require reoperation. Severe PA was clinically diagnosed by the confirmation of computed tomography (CT) scan and/or purulent drainage. Perineal wound infection was defined as infection at the site of surgical incision and abbreviated as SSI (superficial or deep) of perineal or sacral wound, as defined by the National Nosocomial Infection Surveillance system.¹⁵ The criteria for superficial incisional SSI were an infection that occurred at the incision site within 30 days after surgery involving only the skin and subcutaneous tissue, and at least one of the following: purulent discharge from the incision; an organism isolated from a culture of fluid from the incision; incisional pain, tenderness, localized swelling, redness, or heat; and opening of the wound. The criteria for deep incisional SSI were an infection that occurred within 30 days after surgery involving the muscle and fascial layers but not organ space, and at least one of the following: purulent discharge from the deep incision, an incision that spontaneously dehiscenced or was deliberately opened by a surgeon in the presence of signs, and symptoms of infection described previously. Superficial and deep incisional SSIs were combined under the same diagnosis of incisional SSI because it was difficult to determine the exact type in some cases, which might have led to misclassification.

We examined the relationship between surgical procedure and wound complications by dividing patients into the pre-2004 group (1998–2004) and the post-2004 group (2004–2008) for the following reasons. After 2004, in order to reduce the risk of severe infections after resection, we introduced radical changes to the strategy of resection for LRRC: (1) increasing the volume of the RAM flap and (2) aggressive efforts to preserve the anal region. Before 2004, we did not include preservation of the anal region routinely in our management because it was technically demanding in terms of securing a negative surgical margin.

Technique of RAM Flap Reconstruction

Before scheduling the surgical procedure, blood flow in the inferior epigastric artery was examined by ultrasonography to confirm adequate flap blood flow. The right rectus muscle was usually chosen to allow for colostomy through the left rectus muscle. The RAM flap was designed over the rectus abdominis muscle, including the overlying fat and skin. In the post-2004 group of patients, we increased the volume of the flap by retrieving the fat and muscle from a wider area. The flap was fully mobilized with the inferior epigastric artery pedicle. The rectus abdominis muscle was used for filling the pelvic defect, and the attached skin was used for the reconstruction of the perineal defect when required. These procedures are shown in Fig. 1.

The decision whether or not to use a RAM flap was based on several factors. In other words, there were no strict or definitive guidelines for the use of such flap. Generally speaking, the decision to use a flap depended on the size of the pelvic defect and the volume of the rectus abdominis muscle. The final decision was left to two or more plastic surgeons and two rectal surgeons.

Criteria for Anal Preservation

To successfully preserve the anal region, careful preoperative and intraoperative assessments are crucial. When the LRRC was ≥ 4.0 cm (the most distal resection line was just above the internal sphincter level) from the anal verge, the anal region could be preserved. The use of this criterion allowed us to obtain optimal distal margin in all cases.

Independent Variables in Univariate and Multivariate Analysis

Patient age (< 60 , ≥ 60 years), body mass index (BMI) (< 25 , ≥ 25 kg/m²), preoperative serum albumin level (≤ 3.6 , > 3.6 g/dL), ASA score (≤ 2 , ≥ 3), duration of operation (< 910 , ≥ 910 min), and intraoperative blood loss (< 5200 , ≥ 5200 mL) were evaluated as categorical variables. Anemia was defined as a preoperative hemoglobin

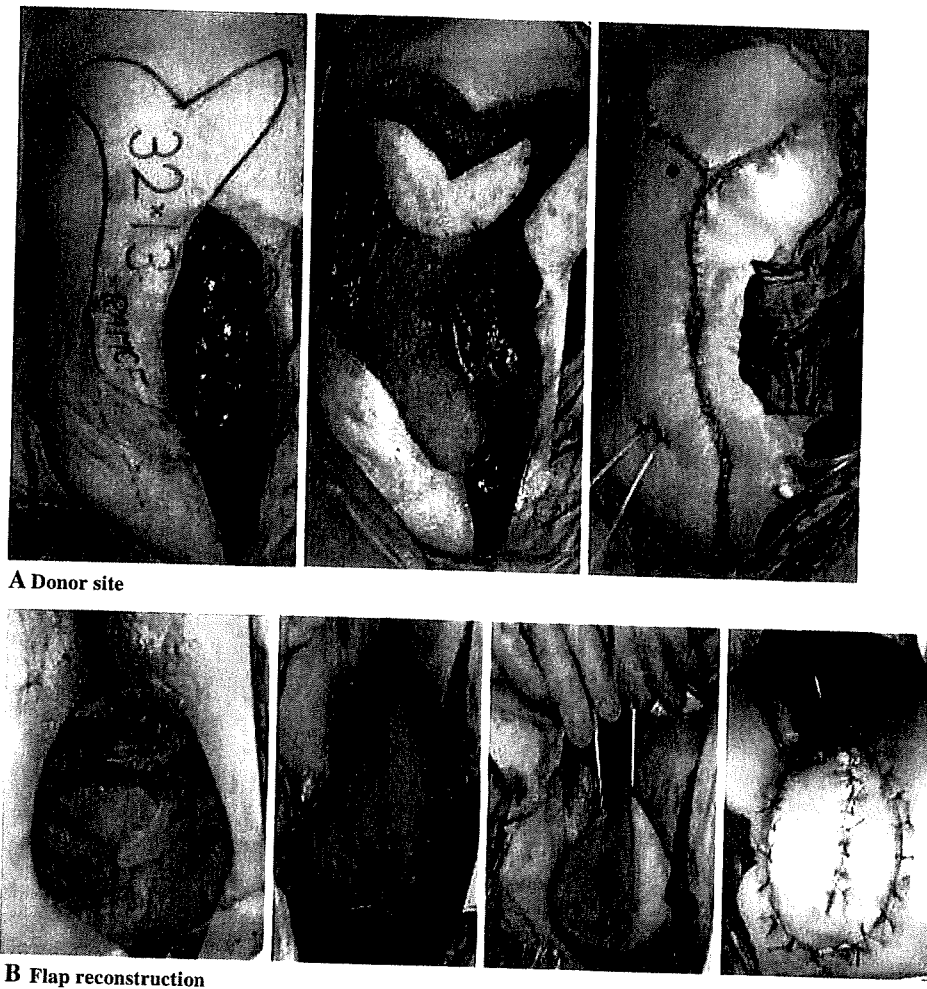


FIG. 1 Intraoperative photographs showing the technique of RAM flap construction

level <11.0 g/dL. Other variables were categorical variables and are presented in the Results.

As for smoking cessation, we chose the cut-off point based on the following reason. Ideally, patients should refrain from smoking for at least 4 weeks prior to surgery because 4 weeks of abstinence from smoking reduces the incidence of wound infections after surgery, and the Centers for Disease Control and Prevention (CDC) recommends smoking cessation at least 30 days prior to surgery.^{15,16}

Statistical Analysis

Continuous data were expressed as median and range. Statistical analysis was performed using the χ^2 test or Fisher exact test for categorical data and Mann-Whitney *U* test for nonparametric data. Independent variables with a *P* value < 0.1 in the univariate analysis were entered into a multivariate logistic regression model. Anal preservation is

one of the most important factors (another one is technical modifying of RAM flap reconstruction) by which the classification of pre/post-2004 was decided. So we believe it is inappropriate to include it in the multivariate analysis because of the problems of both multicollinearity and interpretability in the multivariate fitting. A *P* value less than .05 was considered significant. All statistical analyses were conducted using StatView 5.0 J (SAS Institute Inc, Cary, NC).

RESULTS

Surgical Procedure

Among the 44 patients, 25 underwent total pelvic exenteration, while 7 patients received abdominoperineal resection, 9 low anterior resection, and 3 patients underwent other procedures (with resection of part of the urogenital system). Sacral bone resection was concomitantly performed

TABLE 1 Surgical procedures

Surgical procedure	Pre-2004 group <i>n</i> = 15	Post-2004 group <i>n</i> = 29
Low anterior resection		
Without sacrectomy	0	1
With sacrectomy	1	7
Abdominoperineal resection		
Without sacrectomy	1	2
With sacrectomy	1	3
Total pelvic exenteration		
Without sacrectomy	1	6
With sacrectomy	9	9
Others (with resection of urogenital organs)		
Without sacrectomy	1	0
With sacrectomy	1	1
Sacral resection	12/15	19/29

in 31 patients (70%) (Table 1). There were no significant differences in surgical procedures between the pre-2004 and post-2004 groups.

Patient Characteristics

Table 2 lists the characteristics of patients of the two groups. There were no significant differences in age, gender, operation time, intraoperative blood loss, tumor diameter, RAM flap reconstruction of defect, and concomitant sacrectomy between the two groups. The percentages of patients who received preoperative chemoradiation therapy ($P < 0.0001$) and anal preservation ($P = 0.0352$) were significantly higher in the post-2004 group. Almost all patients who received anal preservation were from the post-2004 group. However, there was no

significant difference in the median distance between the lower border of the tumor and the anal verge between the two groups [pre-2004 group: 7 cm, post-2004 group: 4.5 cm, $P = 0.1719$].

Wound Complications

For the entire group of 44 patients, 33 (75%) developed postoperative wound complications. Among the affected patients, 15 (34%) had severe PA. There were no significant differences in the incidence of postoperative abdominal wound complications, perineal wound complications, and PA formation between the two groups (Table 3). Despite the larger number of patients who received preoperative chemoradiotherapy, the incidence of severe PA was significantly lower in the post-2004 group than the pre-2004 group ($P = 0.0174$).

Impact of Anal Preservation

The anal region was preserved in 12 patients. The incidence of severe PA was lower in the anal preservation group: 1 of 12 (8.3%) vs 14 of 32 (44%), $P = 0.035$ (Table 4).

Impact of RAM Flap

A total of 20 patients received RAM flap reconstruction. Among these, 7 patients were of the pre-2004 group and 13 of the post-2004 group. Preoperative chemoradiotherapy was provided to 9 patients of the post-2004 group but to none of patients of the pre-2004 group ($P = 0.0047$). Although there was no significant difference in the incidence of severe PA between the two groups, the number of patients who developed this complication postoperatively was lower in the post-2004 group [pre-2004 group: 4 of 7 (57%), post-2004 group: 3 of 13 (23%), $P = 0.17$]. All three patients of the post-2004 group who developed severe PA received preoperative chemoradiotherapy.

TABLE 2 Patients' characteristics

Factor	Pre-2004 group (<i>n</i> = 15)	Post-2004 group (<i>n</i> = 29)	<i>P</i> value
Age (years)	60 (47–74)	58 (28–70)	0.2706
Sex (male:female)	12:3	20:9	0.5000
Operation time (min)	855 (512–1,025)	915 (440–1,350)	0.3727
Intraoperative blood loss (mL)	5,580 (1,100–13,340)	5,060 (2,000–17,300)	0.7011
Tumor diameter (cm)	4.6 (2.4–6.5)	4.6 (2.0–7.0)	0.7544
Preservation of the anal region (yes:no)	1:14	11:18	0.0352
Flap reconstruction of defect (yes:no)	11:4	24:5	0.4640
Sacrectomy (yes:no)	12:3	19:10	0.4884
Preoperative chemoradiotherapy (yes:no)	1:14	21:8	<0.0001

TABLE 3 Summary of wound complications in the pre-2004 and post-2004 groups

Wound complication	Pre-2004 group (n = 15)	Post-2004 group (n = 29)	P value
None	3	8	0.7222
Abdominal wound	3	2	0.3187
Perineal wound	3	12	0.1948
Pelvic abscess	1	5	0.6467
Severe pelvic abscess	9 (60%)	6 (21%)	0.0174

TABLE 4 Perineal wound infection, severe pelvic abscess and preservation of the anal region

	Anal preservation (+) n = 12	Anal preservation (-) n = 32	P value
Perineal wound infection (+)	4	11	>0.9999
Pelvic abscess (+)	2	4	0.6577
Severe pelvic abscess (+)	1 (8.3%)	14 (44%)	0.0352

Results of Univariate Analysis

The development of severe AP did not correlate with any of the variables related to patients' characteristics (Table 5). However, smokers tended to develop severe PA ($P < 0.1$). Table 6 shows the association between surgical characteristics and severe PA. Preservation of the anal region and sacrectomy were significantly associated with a high incidence of severe PA.

Results of Multivariate Analysis

Univariate parameters with a P value less than .1 were entered into multivariate analysis. Preservation of the anal region and sacrectomy were identified as two independent and significant determinants of development of severe PA (Table 7). Smoking was also an independent factor for severe PA, although with a marginal P value ($P = 0.0547$).

Other Complications

None of the patients in the post-2004 group developed ventral hernia postoperatively, compared with 1 of the pre-2004 group (6.7%, $P = 0.34$). Table 8 lists all other complications encountered in these patients, in addition to wound complications. There were no significant differences between the two groups with respect to the incidence of these complications.

TABLE 5 Patients' characteristics and severe pelvic abscess

Variable	n	Severe pelvic abscess (+) %	P value
Sex			0.171
Female	12	16.7	
Male	32	40.6	
Age (years)			0.525
<60	23	30.4	
≥60	21	38.1	
BMI (kg/m ²)			0.646
<25	38	16.7	
≥25	6	36.8	
Diabetes mellitus			0.540
+	2	0	
-	42	35.7	
Albumin (g/dL)			0.525
≤3.6	21	30.1	
>3.6	23	30.4	
Anemia			0.695
+	9	22.2	
-	35	30.4	
Smoking habit			0.071
Smoking/cessation <1 month	12	58.3	
None/cessation ≥1 month	32	25	
ASA score			0.646
1, 2	39	35.6	
≥3	5	20	

DISCUSSION

Resection of LRRC is a high-risk procedure. SSI such as severe PA is a potentially fatal complication.^{6,9} Prevention of severe PA following extended radical surgeries for LRRC is very important. Since curability is the most important issue in such invasive surgery, we started preoperative chemoradiotherapy since 2004 with the aim of preventing local re-recurrence and expansion of operative indications for LRRC. However, preoperative radiation is an independent risk factor for SSI in rectal surgery.¹⁷ Therefore, we started to preserve the anal region and to enlarge the volume of RAM flap to reduce the risk of severe infections after resection. Before 2004, we did not attempt to preserve the anal region on a routine basis because we thought it was technically demanding and we could not confirm its oncological feasibility. Histopathological examination of the resected specimens of patients of the pre-2004 group led us to design a safe procedure for preservation of the anal region by using the criteria listed in the Patients and Methods. We could not make definitive conclusions because the numbers of patients were small,

TABLE 6 Surgical characteristics and severe pelvic abscess

Variable	n	Severe pelvic abscess (+) %	P value
Preoperative chemoradiotherapy			>0.9999
+	22	31.8	
-	22	36.4	
Sacrectomy			0.033
+	31	45.2	
-	13	7.7	
Flap reconstruction of defect			>0.9999
+	35	34.3	
-	9	33.3	
RAM flap reconstruction of defect			0.1738
Pre-2004 group	7	57.1	
Post-2004 group	13	23.1	
Preservation of the anal region			0.035
+	23	8.3	
-	32	43.4	
In the pre- or post-2004 group			0.0174
Pre-2004 group	15	60.0	
Post-2004 group	29	20.7	
Operation time (min)			0.525
<910	22	27.3	
≥910	22	40.1	
Intraoperative blood loss (mL)			0.202
<5200	22	22.7	
≥5200	22	45.5	
Blood transfusion			>0.9999
+	42	33.3	
-	2	50	
Intraoperative contamination			>0.9999
+	3	33.3	
-	41	34.1	
Region of primary rectal cancer			0.736
Rb	31	32.3	
Others	13	38.5	

TABLE 7 Results of multivariate analysis

Variable	OR	95%CI	P value
Preservation of the anal region (-)	10.6	1.0-109.9	0.0463
Sacrectomy (+)	20.0	1.7-236.3	0.0173
Smoking habit (-)	6.4	0.9-42.6	0.0547

though there was no significant difference in the local re-recurrence rate between with/without anal preservation groups [with anal preservation group: 3 of 12 (25%), without anal preservation group: 12 of 32 (37.5%), $P = 0.50$]. There is, however, a need to confirm that anal preservation is a safe oncological procedure.

Multivariate analysis identified anal preservation and sacrectomy as independent factors that influence the incidence of severe PA. These results indicate that large pelvic defect is one of the main factors that contributes to the development of severe PA, and thus anal preservation is a recommended procedure when applicable.

Before 2004, reconstruction was performed using RAM flaps for patients with large pelvic defects. However, in some patients, the volume of RAM flap was too small to fill up the defect resulting, in PA. Accordingly, we started to increase the volume of the RAM flap in subsequent years to resolve this problem. To assess the effect of this modification, we compared the incidence of severe PA in the pre-2004 and post-2004 groups with RAM flap reconstruction. There was no significant difference between the two groups, but the incidence of severe PA was lower in the post-2004 group compared with the pre-2004 group. Most patients of the post-2004 group received preoperative chemoradiotherapy, though it is a known risk factor for postoperative infections. Despite this unfavorable background, the incidence of severe PA was lower in the post-2004 group. Several reports indicated that pelvic reconstruction after extensive pelvic surgery using vertical RAM flap can reduce perineal wound complications.¹⁰⁻¹⁴ Furthermore, in the present study population, none of the patients suffered from the aftereffects of pelvic reconstruction using the RAM flap. Taking this into consideration, modified RAM flap reconstruction and anal preservation are reasonable techniques to prevent severe PA. Thus, aggressive reconstruction using a RAM flap is preferable when pelvic defect is large, but only introducing modified RAM flap reconstruction is sometimes insufficient to prevent severe PA as our data had shown. The need for adding not only modified RAM flap but also other techniques is suggested. However, to confirm the positive effect of RAM flap on prevention of pelvic defect, there is a need to establish standards for indication of RAM flap. Further studies are needed in large population samples to make definitive conclusions on the modified RAM flap reconstruction.

There is little or no information on the usefulness of anal preservation in the prevention of severe PA after resection of LRRc. Reconstruction by RAM flap is a common technique to reduce dead space after resection, but the procedure is sometimes inadequate to completely fill the space. Our approach was that adequate preservation of the anal region could help reduce the incidence of postoperative complications. Accordingly, we introduced anal preservation procedure to reduce the incidence of postoperative severe PA formation. The results showed that anal preservation surgery significantly reduced the incidence of severe pelvic abscess. Analysis of patients who received preoperative chemoradiotherapy ($n = 22$) showed that none of the patients who later underwent anal preservation

TABLE 8 Postoperative complications other than wound infection

Complication	Pre-2004 group (n = 15)	Post-2004 group (n = 29)	P value
Urinary tract infection	2 (13%)	1 (3.5%)	0.2643
Ventral hernia	1 (6.7%)	0	0.3409
Postoperative hemorrhage	2 (13%)	2 (6.9%)	0.5962
Bowel obstruction	1 (6.7%)	5 (17%)	0.6467

surgery developed severe PA, while 58% of those who did not developed this problem ($P = 0.0053$). These results emphasize the importance of not only RAM flap but also anal preservation surgery in reducing the risk of severe PA especially in patients who receive preoperative chemoradiotherapy.

In conclusion, anal preservation surgery reduce the likelihood of severe PA after resection of LRRC. Anal preservation surgery based on precise preoperational and intraoperational assessments is recommended aggressive surgical treatment for patients with LRRC. It is possible that the lack of difference is the result of the small population of the present study. Further studies are needed in larger population samples to determine the overall effect of preoperative chemoradiotherapy, reconstructive surgery using a large RAM flap and anal preservation surgery on the survival rate of patients with LRRC.

REFERENCES

- McDermott FT, Hughes ES, Pihl E, Johnson WR, Price AB. Local recurrence after potentially curative resection for rectal cancer in a series of 1008 patients *Br J Surg*. 1985;72:34-7.
- Sagar PM, Pemberton JH. Surgical management of locally recurrent rectal cancer *Br J Surg*. 1996;83:293-304.
- Bozzetti F, Bertario L, Rossetti C, Gennari L, Andreola S, Baratti D, et al. Surgical treatment of locally recurrent rectal carcinoma *Dis Colon Rectum*. 1997;40:1421-4.
- Wanebo HJ, Antoniuk P, Kones R, Levy A, Vezeridis M, Cohen SI, et al. Pelvic resection of recurrent rectal cancer: technical considerations and outcomes *Dis Colon Rectum*. 1999; 42:1438-48.
- Maetani S, Nishikawa T, Iijima Y, Tobe T, Kotoura Y, Shikata J, et al. Extensive en bloc resection of regionally recurrent carcinoma of the rectum *Cancer*. 1992;69:2876-83.
- Moriya Y, Akasu T, Fujita S, Yamamoto S. Total pelvic exenteration with distal sacrectomy for fixed recurrent rectal cancer in the pelvis *Dis Colon Rectum*. 2004;47:2047-54.
- Takagi H, Morimoto T, Hara S, Suzuki R, Horio S. Seven cases of pelvic exenteration combined with sacral resection for locally recurrent rectal cancer *J Surg Oncol*. 1986;32:184-8.
- Temple WJ, Ketcham AS. Sacral resection for control of pelvic tumors *Am J Surg*. 1992;163:370-4.
- Jimenez RE, Shoup M, Cohen AM, Paty PB, Guillem J, Wong WD. Contemporary outcomes of total pelvic exenteration in the treatment of colorectal cancer *Dis Colon Rectum*. 2003;46:1619-25.
- Radice E, Nelson H, Mercill S, Farouk R, Petty P, Gunderson L. Primary myocutaneous flap closure following resection of locally advanced pelvic malignancies *Br J Surg*. 1999;86:349-54.
- Smith HO, Genesen MC, Runowicz CD, Goldberg GL. The rectus abdominis myocutaneous flap: modifications, complications, and sexual function *Cancer*. 1998;83:510-20.
- Chessin DB, Hartley J, Cohen AM, Mazumdar M, Cordeiro P, Disa J, et al. Rectus flap reconstruction decreases perineal wound complications after pelvic chemoradiation and surgery: a cohort study *Ann Surg Oncol*. 2005;12:104-10.
- Bell SW, Dehni N, Chaouat M, Lifante JC, Parc R, Tiret E. Primary rectus abdominis myocutaneous flap for repair of perineal and vaginal defects after extended abdominoperineal resection *Br J Surg*. 2005;92:482-6.
- Buchel EW, Finical S, Johnson C. Pelvic reconstruction using vertical rectus abdominis musculocutaneous flaps *Ann Plast Surg*. 2004;52:22-6.
- Mangram AJ, Horan TC, Pearson ML, Silver LC, Jarvis WR. Guideline for prevention of surgical site infection, 1999. Hospital Infection Control Practices Advisory Committee *Infect Control Hosp Epidemiol*. 1999;20:250-78; quiz 279-80.
- Sorensen LT, Karlsmark T, Gottrup F. Abstinence from smoking reduces incisional wound infection: a randomized controlled trial *Ann Surg*. 2003;23:1-5.
- Konishi T, Watanabe T, Kishimoto J, Nagawa H. Elective colon and rectal surgery differ in risk factors for wound infection: results of prospective surveillance *Ann Surg*. 2006;244:758-63.

大腸癌に対する化学療法, 分子標的治療

Chemotherapy and molecular targeting therapeutics for colorectal cancer

植村 守 UEMURA Mamoru	山本 浩文 YAMAMOTO Hirofumi	原口 直紹 HARAGUCHI Naotsugu	竹政伊知朗 TAKEMASA Ichiro
水島 恒和 MIZUSHIMA Tsunekazu	池田 正孝 IKEDA Masataka	石井 秀始 ISHII Hideshi	関本 貢嗣** SEKIMOTO Mitsugu
上岐祐一郎* DOKI Yuichiro	森 正樹* MORI Masaki		

特集

消化管疾患—診断と治療の進歩

Key words 多剤併用 分子標的薬 バイオマーカー KRAS

現在大腸癌の治療に利用される化学療法剤としては, 5-fluorouracil(5-FU), L-OHP(oxaliplatin), CPT-11(irinotecan), I-LV(leucovorine)の4剤が主であり, 通常I-LV(leucovorine)は5-FUのbiological modulatorとしてセットで使用される(表1). なかでも5-FUは1957年に開発されて以来, 中心的な薬剤として使われている. さらにCPT-11, L-OHPなど新規抗癌剤が加わり, 多くの臨床試験の結果から5-FU/LVはCPT-11やL-OHPと組み合わせて多剤併用療法(FOLFOX, FOLFILI, IFL)として利用されるようになった.

さらに分子標的モノクローナル抗体が導入されることにより, 抗腫瘍効果と延命効果の著しい向上が獲得されてきた(図1). 大腸癌に対する分子標的治療薬としてすでに臨床効果の認められているものは, 抗EGFR(epidermal growth factor receptor)抗体と抗VEGF(vascular endothelial growth factor)抗体のふたつが代表的であるが, これらの分子標的治療薬も多くの臨床試験の結果, 従来の多剤併用療法との組み合わせで臨床の場に登場した.

各薬剤の作用機序と薬物動態

大腸癌に対する化学療法剤や分子標的治療剤などの抗悪性腫瘍剤のなかで, 代表的なもの(表1)について以下にその作用機序と薬理動態について解説する.

1. フッ化ピリミジン系抗癌剤

1) 5-FU

2大作用機序として, DNA合成阻害とRNA機能障害があげられる. 5-FUは最終的な活性代謝物であるフルオロデオキシウリジン一リン酸(5-fluorodeoxyuridine monophosphate; FdUM)またはフルオロウリジン三リン酸(5-fluorouridine triphosphate; 5-FUTP)まで代謝されて抗腫瘍効果を発揮する.

同化代謝(作用系)では, 主にオロチン酸ホスホリボシルトランスフェラーゼ(orotate phosphori-

大阪大学大学院医学系研究科外科学講座消化器外科学 *教授
**准教授

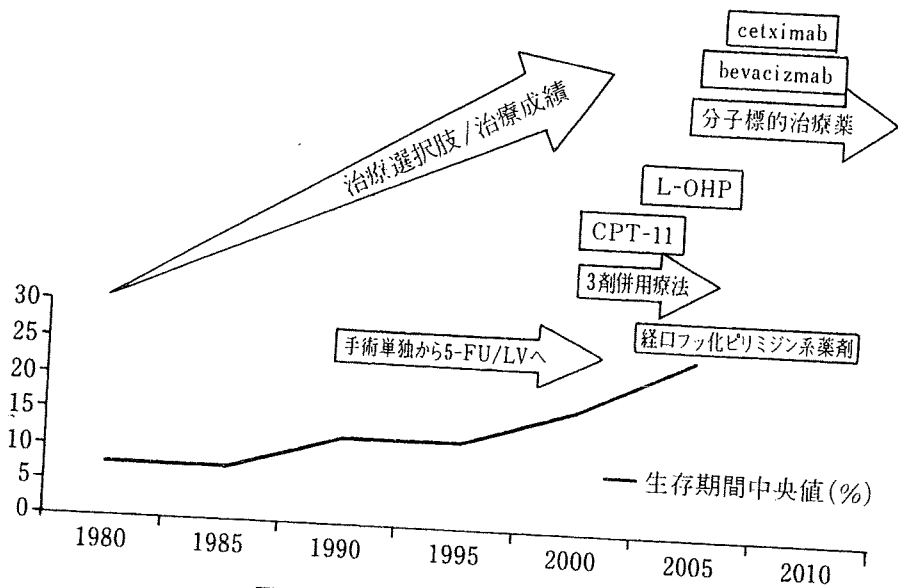


図1 大腸癌における治療方法の変遷

表1 消化器癌に対する主な抗悪性腫瘍の分類

化学療法薬	
1. ピリミジン代謝拮抗薬	
5-Fuorouracil (5-FU)	
Tegafur/Oteracil/Gimeracil (S-1)	
Capecitabine	
Tegafur/Uracil (UFT)	
2. プラチナ化合物	
Oxaliplatin (L-OHP)	
3. I型トポイソメラーゼ阻害薬(カンプトテシン類)	
Irinotecan hydrochloride (CPT-11)	
分子標的薬(抗体)	
1. 抗VEGF抗体 Bevacizumab (Avastin®)	
2. 抗EGFRモノクローナル抗体(Cetuximab: Erbitux®)	
その他	
Leucovorine (LV)	

ンテトラヒドロ葉酸(5,10-CH₂-THF)の存在下でTSと Ternary complex(ターナリーコンプレックス:三者複合体)を形成することにより増強される。

RNA機能障害は、5-FUからフルオロウリジン三リン酸(5-fluorouridine triphosphate; 5-FUTP)が生成され、F(フッ素)がついた5-FUTPがウリジン三リン酸(Uridine triphosphate; UTP)の代わりにRNAに取り込まれ、Fが結合しているために、正常なRNA機能を障害することによる。

5-FUの異化代謝(分解系)では、主にジヒドロピリミジンデヒドロゲナーゼ(dihydropyrimidine dehydrogenase; DPD)により分解されF-β-Alaとなり尿中に排泄される。このF-β-Alaが神経毒性あるいは、手足症候群を引き起こす。

上述のように、5-FUがDNA合成阻害とRNA機能障害を持っているが、この機序はリボヌクレオシドリダクターゼ(Ribonucleotide reductase; RNR)の飽和により機序が変化すると考えられている。5-FUを少量持続型で投与すると、RNRが飽和しないためにFdUMPを継続的に生成するので、主にDNA合成を阻害すると考えられる。一方、5-FUを大量間歇型で投与すると、RNRが飽和するために、FUTP生成が増大する。したがっ

bosyltransferase; OPRT)により、FdUMPなどの活性代謝物が生成される。

DNA合成阻害は、活性代謝物のFdUMPがDNA合成経路のデオキシウリジン一リン酸(deoxyuridine monophosphate; dUMP)からデオキシチミジン一リン酸(deoxythymidine monophosphate; dTMP)への代謝に必要なチミジル酸合成酵素(thymidylate synthase; TS)の活性を抑制し、その結果としてデオキシチミジン三リン酸(deoxythymidine triphosphate; dTTP)が枯渇しDNA合成が阻害されることによる。このTS阻害は、FdUMPが活性型葉酸である5,10メチレ

て, 主にRNA機能を障害すると考えられる。FOLFOXやFOLFIRI療法などは2つの投与法を組み合わせ使用されており, 5-FUの作用を最大限に活用していると考えられる。

2) Tegafur/Oteracil/Gimeracil (S-1)

5-FUのプロドラッグであるテガフルに, DPDを阻害するギメラシルを含んだ5-FU系の抗癌剤で, オテラシルカリウムが消化管毒性の増強を軽減することに成功した抗癌剤である。

テガフルは, 肝臓にあるチトクロームP-450によって5-FUへと代謝されるが, 80~90%が分解されてしまうため, 分解を抑えるためにギメラシルが配合されている。また, オテラシルは経口投与されると消化管粘膜に局在し, OPRTを選択的に阻害することにより5-FUからフルオロウリジン酸(FUMP)への生成を選択的に抑制し, 下痢や口内炎などの消化管障害を軽減させる。骨髄細胞での活性化は, 配合という手法では抑制できなかったため, TS-1の用量制限毒性は好中球減少を主体とした骨髄抑制となる。

3) Capecitabine

副作用を軽減し, また抗腫瘍効果を高めるため, 腫瘍組織内で高発現の酵素により5-FUに変換されることを目的として開発された5FUのプロドラッグの5'-DFUR(フルツロン)の, さらにプロドラッグであるフルオロシチジン誘導体である。以下に述べる3つの代謝過程を経て5-FUに変換され, はじめて薬理活性を示す。

まず腸管から未変化体のまま吸収され, 肝臓で活性の高いカルボキシルエステラーゼ(CE)により5'-deoxy-5-fluorocytidine(5'-DFUR)に変換され, 次に肝臓および腫瘍で活性の高いシチジンデアミナーゼ(CD)で5'-DFURに変換される。さらに, 腫瘍組織で活性の高いチミジンホスホリラーゼ(TP)で5-FUに変換されて抗腫瘍効果を示す。

本剤に特徴的な副作用として手足症候群(Hand-foot syndrome)があげられる。手足症候群では手掌および足底に湿性落屑, 皮膚潰瘍, 水疱, 疼痛, 知覚不全, 有痛性紅斑, 腫脹等の症状が見ら

れる。

4) Tegafur-Uracil (UFT)

5-FUのプロドラッグであるテガフル(TS-1の項参照)に, 5-FUの分解阻害作用を有するウラシルを配合した抗悪性腫瘍剤である。

2. プラチナ化合物

L-OHP (oxaliplatin)

プラチナ原子に1,2-ジアミノシクロヘキサン(DACH)およびシユウ酸基が付加したものである。作用機序は他の白金系抗癌剤と同様, DNA塩基との架橋形成によるDNA合成阻害, 蛋白合成阻害と考えられている。白金系抗癌剤は, 脱離基が水あるいは環境中の求核分子に置換されることにより, 生体内分子との反応性を発現させる。この変換過程は酵素反応を伴わないことから, biotransformation(生体内変換)と定義されている。オキサリプラチンは, モノアクオモノクロロ1,2-ジアミノシクロヘキサン(DACH)白金やジアクオDACH白金等の生体内変換体を形成し, 腫瘍細胞内のDNA鎖と共有結合することにより, DNA鎖内および鎖間の両者に白金-DNA架橋を形成する。これらの架橋がDNAの複製および転写を阻害し, 細胞増殖抑制作用を発現すると考えられている。

本剤は主に尿中に排泄され, 投与後48時間に一掃される。また, 本剤投与にあたって大量輸液は不要である。特徴的な副作用としては, 手足や口唇周囲部等の感覚異常または知覚不全(末梢神経症状)が, 本剤投与直後からほぼ全例にあらわれる。また, 咽頭喉頭の絞扼感(咽頭喉頭感覚異常)があらわれることもある。

3. トポイソメラーゼI阻害剤

Irinotecan hydrochloride (CPT-11)

CPT-11は, 中国原産の喜樹(Camptotheca acuminata)から抽出された植物アルカロイド20(S)-camptothecin(CPT)の半合成誘導体である。CPT-11の抗腫瘍効果は, topoisomerase I活性を

選択的に阻害することによってもたらされる。topoisomerase は、DNA の複製/転写のときに重要な働きを示す蛋白であり、このうち topoisomerase I は、DNA の1本鎖に nick を生じさせる。DNA のリン酸基に共有結合し、DNA のホシホジルエステル結合を切断し、DNA 複製がスムーズに行われるようにする働きをする。CPT は、この DNA と topoisomerase I の共有結合部(DNA topoisomerase I cleavable complex)に結合し、DNA 複製を停止させることで細胞増殖を抑制する。CPT-11は静脈内投与後 carboxylesterase により活性型 SN-38に変換される。SN-38の約70%は、肝臓にて glucuronidation を受け SN-38 glucuronide となり、SN-38やCPT-11とともに胆汁中に排泄される。副作用としては、骨髄抑制と遅発性下痢が特徴的である。

4. 分子標的薬

1) 抗 VEGF 抗体(Bevacizumab)

Bevacizumab は、VEGF(VEGF-A)に特異的に結合するヒト化 IgG1モノクローナル抗体で、VEGF がその受容体(VEGF-1および VEGF-2)に結合するのを阻止することで VEGF の生物活性を抑制する。VEGF の生物学的活性は、血管内皮細胞増殖、血管内皮細胞の遊走、未熟な内皮細胞の生存などである。半減期は2~3週間である。血管新生阻害剤のなかで、他に先んじてその有効性が証明された薬剤である。

抗体医薬の効果や副作用は、細胞毒性抗がん剤と異なり個体差の大きいことが知られている。Bevacizumab の毒性は比較的軽微とされるが、時に消化管穿孔・血痰などの出血症状がみられる。とくに消化管穿孔に関しては、種々の固形癌のなかでも大腸癌症例においてリスクが高いとされており、ハイリスク症例には慎重な判断が必要である¹⁾。

2) 抗 EGFR 抗体(Cetuximab)

上皮増殖因子受容体(EGFR)の構造的特性やシグナル伝達、癌における発現調節異常については

専門書を参照されたい。Cetuximab はマウスとヒト IgG1のキメラ型モノクローナル抗体(ヒト95%、マウス5%)であり、ヒト EGFR の細胞外ドメインに EGF の5倍の親和性をもって特異的に結合し、内因性の増殖因子である EGF や TGF- α を競合阻害する。EGFR は Cetuximab と結合すると細胞内に取り込まれ(Internalization)ライゾームにより分解され、細胞内への増殖シグナルが遮断される。その他のメカニズムとして、宿主免疫を介した ADCC(antibody-dependent cellular cytotoxicity)や補体を介した CDC(complement dependent cytotoxicity)などの関与も想定されている。また免疫染色により大腸癌の75~82%に EGFR の過剰発現がみられることが報告されている。

Cetuximab は呼吸困難、低血圧を含む重篤な副作用を引き起こしうるため、投与前に抗ヒスタミン剤を前投薬することが望ましい。

5. その他

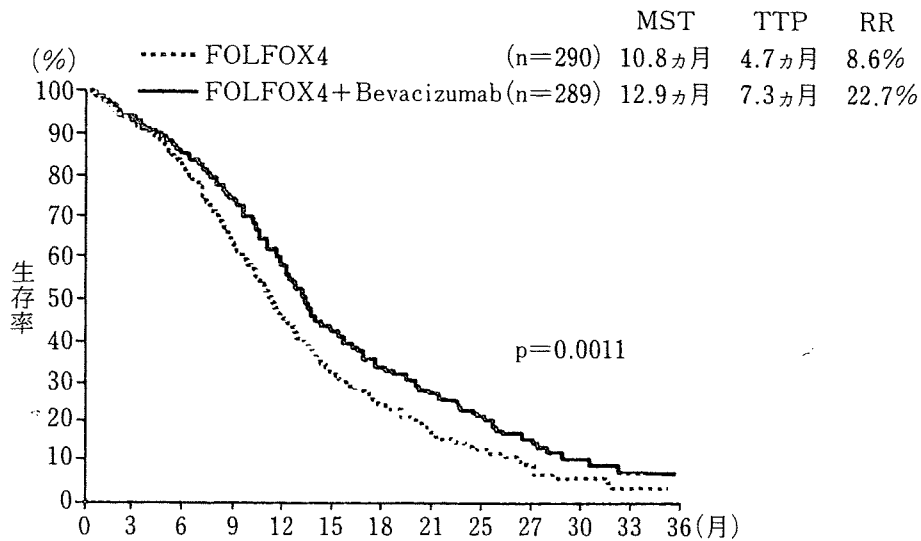
LV

本邦では、大腸癌に対して LV の光学異性体の活性体である1体のみを成分としたアイソボリン(1-LV)が1999年に承認された。還元型葉酸である LV は細胞内で還元され5,10-CH₂-FH₄に代謝され、上述のように FdUMP、TS と三者複合体を形成し TS の解離を遅延させ、5-FU の抗腫瘍効果を増強させる。

化学療法のレジメン

1. 5-FU/LV

5-FU 単独と5-FU/LV のメタ・アナリシスの結果、奏効率は5-FU 単独11%、5-FU/LV 群21%で併用群の奏効率は約2倍であった(P<0.0001)。さらに生存期間の中央値(mean survival time; MST)においても、5-FU 単独群10.5ヵ月に対して5-FU/LV 群は11.7ヵ月と有意な延長(P<0.004)が示された²⁾。



(Bruce J, et al: J Clin Oncol: 25, 1539, 2007より)

図2 E3200: FOLFOX4 vs FOLFOX4+Bevacizumab

2. IFL

Saltzらは、低用量LVと5-FUbolus投与を併用するregimenにCPT-11を組み合わせ、転移性大腸癌に対するfirst line治療としての効果をLV/5-FU(Mayo regimen)とCPT-11単独を比較検討した結果、IFLのRRは39%、PFS中央値が7ヵ月、MSTが14.8ヵ月ときわめて高かった³⁾。この時のLV/5-FU+CPT-11をSaltz regimen(IFL)と呼ぶが、投与後60日以内の死亡率が6.7%と高く問題視された。その後CPT-11の投与量を抑えたModified IFLが多くの施設で行われ、死亡率も1.3%に減少することも報告された。しかし、補助化学療法としての有用性は確立されていない。

3. FOLFOX regimen

LVと5-FU持続静注の併用regimenにL-OHPを投与するregimenであり、de GramontらによってASCO1994で報告された。その後改良regimenが次々と報告されてきている。Goldbergらは、当時米国で主流であったSaltzレジメン(IFL)とFOLFOXおよびCPT-11+L-OHPの3群比較試験を行った結果、FOLFOXレジメンの奏効率が明らかに高く、副作用も少なかった⁴⁾。

E3200試験では、FOLFOX4療法にBevacizumab

を追加投与された患者は、FOLFOX4のみの患者に比べて、主要評価ポイントである死亡のリスクを22%減少させることが明らかになっている。FOLFOX4とBevacizumabの併用投与を受けた患者の平均生存期間は13.0ヵ月で、FOLFOX4単独投与患者の10.8ヵ月と比べて長かった(図2)⁵⁾。

また、近年種々の固形癌に対する化学療法において好中球減少と予後との関連に関して報告がなされているが、大腸癌においても一次治療としてFOLFOX療法を受けた転移性大腸癌症例において、好中球減少が良好な予後予測因子となることが示唆されている⁶⁾。

4. FOLFIRI

FOLFOXと並ぶ標準的レジメンである。5-FU/LV(5-FU持続点滴静注)にCPT-11を併用するphaseⅢが行われ、RR、MST、TTPともにLV/5-FUより優れた成績が得られた⁷⁾。2日間の5-FU持続静注+LVにCPT-11を併用するregimenをFOLFIRIと総称としている。

一次治療としてのFOLFIRIに対してCetuximabの上乗せ効果を検討したCRYSTAL試験では、Cetuximab群において無再発生存期間の改善がみられ、とくに後述のようにKRAS野生型群において明らかな上乗せ効果がみられた(表2)⁸⁾。

表2 The CRYSTAL trial

	ITT		KRAS 野生型		KRAS 変異型	
	FOLFIRI (n=599)	Cetuximab + FOLFIRI (n=599)	FOLFIRI (n=176)	Cetuximab + FOLFIRI (n=172)	FOLFIRI (n=87)	Cetuximab + FOLFIRI (n=105)
奏効率(%)	39	47	43	59	40	36
	p=0.0038		p=0.0025		p=0.46	
mPFS*(月)	8.0	8.9	8.7	9.9	8.1	7.6
HR**	0.85	p=0.048	0.68	p=0.017	1.07	p=0.75

*median progression free survival **hazard ratio

分子標的治療に関する最近の話題

第45回 Annual Meeting of the American Society of Clinical Oncology (ASCO 2009, 5/29-6/2) において、II期またはIII期の結腸癌に対する術後療法として、mFOLFOX6療法と mFOLFOX6+ Bevacizumab 併用療法とを比較する第III相試験 (NSABP C-08試験)の結果が報告され、術後補助療法としての Bevacizumab の有用性は否定された。しかしながら、同様の試験である AVANT BO17920の結果報告はまだされておらず、この試験の結果も加味して術後補助化学療法における Bevacizumab の効果を判断すべきだと思われる。

また、未治療の転移性大腸癌症例に対する Capecitabine+L-OHP+Bevacizumab±Cetuximab 療法を比較検討した結果、KRAS 野生型群においても Cetuximab の上乗せ効果は認められなかった⁹⁾。このように非常に有用であると思われる分子標的治療においても、適応症例と各種薬剤の組み合わせを十分に吟味する必要があると考えられる。

ポストゲノム研究

ポストゲノム時代に突入し、臓器・個体レベルでの解析の重要性が再認識されてきている。その一例として K-ras 変異と治療効果に関する臨床試験等を概説する。

一次治療として、FOLFIRI±cetuximab 治療を受けた転移性結腸直腸癌患者の KRAS 遺伝子型

と有効性に与える影響に関する検討 (The CRYSTAL trial) では、1,198例のうち540例の患者で KRAS の評価が行われた。KRAS の野生型は540例中348例(64.4%)、KRAS の変異型は540例中192例(35.6%)で認められた。野生型と変異型では、FOLFIRI に cetuximab を併用すると FOLFIRI 単独と比較して、野生型では無増悪生存期間が 9.9ヵ月と8.7ヵ月で FOLFIRI+Cetuximab で有意に延長し(p=0.0167)、奏効率も59%と43%で FOLFIRI+Cetuximab で有意(p=0.0025)に上昇した。変異型では、Cetuximab を併用しても上乗せ効果は認められなかった⁸⁾。このように K-ras 変異の有無が cetuximab の効果予測に利用できる可能性が複数の試験にて示唆されていた。この結果を受け ASCO は、Clinical opinion として Cetuximab 投与予定症例においては KRAS 変異の有無を検索すべきであり、KRAS 変異症例においては Cetuximab を投与すべきではないと結論付けている¹⁰⁾。

また、ASCO 2009において進行再発大腸癌における KRAS と新バイオマーカーに関する報告が複数なされ、KRAS 野生型で Epireregulin (EREG) や Amphiregulin (AREG) が高発現群では Cetuximab の効果が高いことや、BRAF 変異症例では KRAS 野生型であっても Cetuximab の効果が減弱することが示唆された。

終わりに

大腸癌は、過去においては化学療法があまり効かないタイプの固形腫瘍と考えられていたが、

5FU/LV, CPT-11, Oxaliplatin の開発利用によって化学療法がひとつの治療オプションとし位置づけされるようになり多剤併用療法時代を迎えた。それからほどなく Bevacizumab や Cetuximab のような分子標的薬が登場し, 治療選択肢が増え治

療成績の明らかな向上がみられてきている。大腸がん治療に携わる医師や医療関係者は, 続々と発信される新しい治療効果・副作用情報を常に更新し, 患者に up to date な治療を提供せねばならないと言える。

文 献

- 1) Hapani S, Chu D, Wu S : Risk of gastrointestinal perforation in patients with cancer treated with bevacizumab : a meta-analysis. *Lancet Oncol* 10 : 559-568, 2009.
- 2) Thirion P, Michiels S, Pignon JP, et al : Modulation of fluorouracil by leucovorin in patients with advanced colorectal cancer : an updated meta-analysis. *J Clin Oncol* 22 : 3766-3775, 2004.
- 3) Saltz LB, Cox JV, Blanke C, et al : Irinotecan plus fluorouracil and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *Irinotecan Study Group. N Engl J Med* 343 : 905-914, 2000.
- 4) Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al : A randomized controlled trial of fluorouracil plus leucovorin, irinotecan, and oxaliplatin combinations in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 22 : 23-30, 2004.
- 5) Giantonio BJ, Catalano PJ, Meropol NJ, et al : Bevacizumab in combination with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin (FOLFOX4) for previously treated metastatic colorectal cancer : results from the Eastern Cooperative Oncology Group Study E3200. *J Clin Oncol* 25 : 1539-1544, 2007
- 6) Shitara K, Matsuo K, Takahari D, et al : Neutropaenia as a prognostic factor in metastatic colorectal cancer patients undergoing chemotherapy with first-line FOLFOX. *Eur J Cancer* 45 : 1757-1763, 2009.
- 7) Douillard JY, Cunningham D, Roth AD, et al : Irinotecan combined with fluorouracil compared with fluorouracil alone as first-line treatment for metastatic colorectal cancer : a multicentre randomised trial. *Lancet* 355 : 1041-1047, 2000.
- 8) Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al : Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360 : 1408-1417, 2009.
- 9) Tol J, Koopman M, Cats A, et al : Chemotherapy, bevacizumab, and cetuximab in metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 360 : 563-572, 2009.
- 10) Allegra CJ, Jessup JM, Somerfield MR, et al : American Society of Clinical Oncology provisional clinical opinion : testing for KRAS gene mutations in patients with metastatic colorectal carcinoma to predict response to anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody therapy. *J Clin Oncol* 27 : 2091-2096, 2009.

外科学会会員のための企画

癌幹細胞研究の最前線

消化器癌領域における癌幹細胞研究の現状

1) 大阪大学大学院外科学講座消化器外科, 2) 九州大学生体防御医学研究所分子腫瘍学

竹政伊知朗¹⁾, 石井 秀始¹⁾, 原口 直紹¹⁾, 三森 功士²⁾, 田中 文明²⁾
永野 浩昭¹⁾, 関本 貢嗣¹⁾, 土岐祐一郎¹⁾, 森 正樹¹⁾

キーワード 消化器癌, 癌幹細胞

I. 内容要旨

癌組織を構成する細胞は等しく腫瘍形成能を有するのではなく、腫瘍形成能を有する癌幹細胞と腫瘍形成能を有しない細胞に区別できるという癌幹細胞仮説が提唱され、ここ数年注目されている。癌幹細胞は癌の発生や維持のメカニズム解明に重要な鍵を握るだけでなく、外科的根治術後もしくは抗癌剤など術後補助療法後でも再発・転移をきたす原因として、癌幹細胞の残存が深く関係していると考えられ、癌治療の真の標的細胞として注目されるようになった。最初に白血病で癌幹細胞の存在が報告された後、大腸癌、膵臓癌、肝臓癌など消化器癌でも癌幹細胞もしくはこれに近い性質をもつとされる TI-C (tumor initiating cells) が同定されているが、固形腫瘍でも血液腫瘍と同様の知見が当てはまるのかまだ不明な点が多く精力的な検証が進められている段階である。また、宿主側の癌幹細胞の微小環境 (ニッチ) が癌の転移形成に重要であることも指摘されるようになった。消化器癌幹細胞研究の成果を治療に臨床応用するためには、正常組織幹細胞の存在の証明と分化メカニズムの解明など基礎的知見を十分に集積し、癌細胞側因子としての癌幹細胞と宿主側環境因子としての微小環境 (ニッチ) の両面の細胞学的・遺伝子学的特徴を俯瞰的に解明することが必要であると考えられる。今後、癌幹細胞仮説の導入

による新たな腫瘍学に基づいた消化器癌治療法の確立が期待される。

II. はじめに

癌組織は多様性 (heterogeneity) のある細胞の集団である。従来、癌細胞はすべてに自己複製能があり、その結果として多様性のある癌が発生、増殖すると考えられてきた¹⁾。これに対して、腫瘍を構成する細胞は等しく腫瘍形成能を有するのではなく、腫瘍形成能を有する癌幹細胞と腫瘍形成能を有しない細胞に区別できるという癌幹細胞仮説が提唱され、ここ数年注目されている。癌幹細胞は自己複製能、多分化能に加え腫瘍形成能をあわせもつ少数の細胞で、正常組織での分化過程と同様に、癌幹細胞を頂点として階層的に分化することにより、細胞形態学的・細胞機能学的に多様性のある癌組織を形成するという考え方である (図 1)。

この癌幹細胞仮説は、すでに 1960 年代に提唱されていたが²⁾、それを実験的に証明することが困難であった。しかし、近年の技術的な進歩として、フローサイトメトリー (FACS: fluorescence activated cell sorting) の解析精度が向上し任意の細胞集団の分離が可能となったこと、組織体性幹細胞が発見されその解明が進んだこと、NOD/SCID (nonobese diabetic/severe combined immunodeficient) マウスの開発で

PERSPECTIVES ON CURRENT STATUS AND FUTURE DIRECTIONS FOR CANCER STEM CELLS THEORY IN GASTROINTESTINAL CANCER

Ichiro Takemasa¹, Hideshi Ishii¹, Naotsugu Haraguchi¹, Koshi Mimori², Fumiaki Tanaka², Hiroaki Nagano¹, Mitsugu Sekimoto¹, Yuichiro Doki¹ and Masaki Mori¹

Division of Gastroenterological Surgery, Department of Surgery, Graduate School of Medicine, Osaka University¹, Department of Molecular & Surgical Oncology, Medical Institute of Bioregulation, Kyushu University²

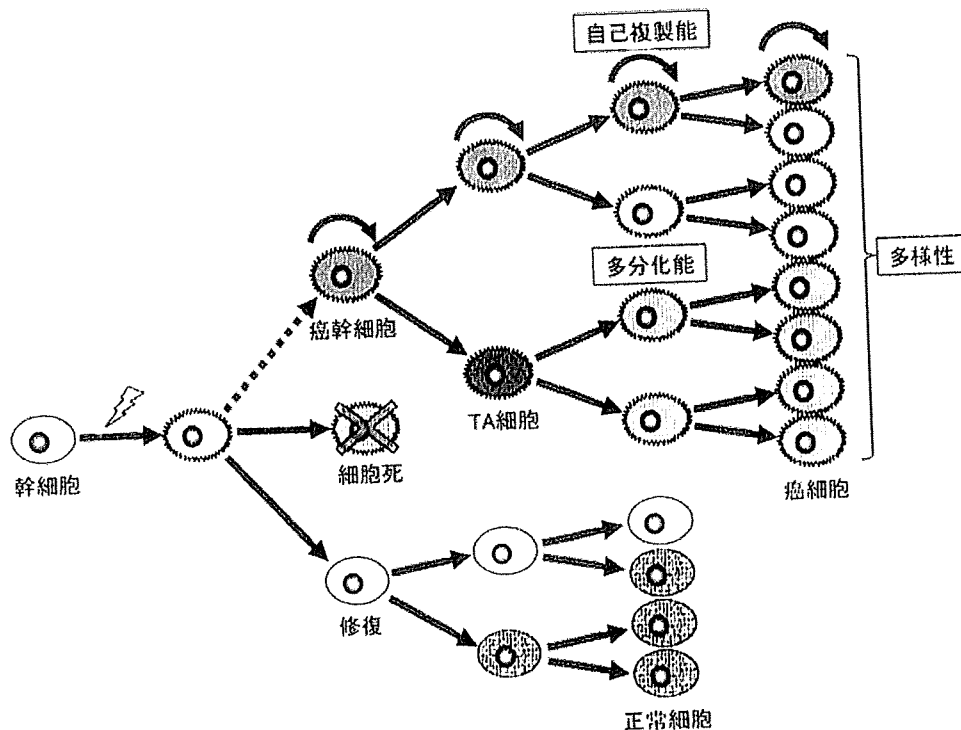


図 1

腫瘍の移植実験が容易にできるようになったことにより、1997年に急性骨髄性白血病（AML）におけるCD34+/CD38-細胞が癌幹細胞として報告された³⁾。それ以来、癌幹細胞は癌の発生や維持のメカニズム解明に重要な鍵を握るだけでなく、癌幹細胞の残存が治療後の癌の再発・転移と深く関係していると考えられ、癌治療の真の標的細胞として注目されるようになった。アメリカでは白血病幹細胞を標的とした治療が開発され臨床応用に向けて準備が進んでいる。一方、固形腫瘍では、2003年に乳癌でCD24-/CD44+細胞が癌幹細胞として報告され⁴⁾、引き続き脳腫瘍、消化器癌、頭頸部を含む固形腫瘍で報告された（文献5に総説）。特に消化器癌では、われわれが大腸癌・肝臓癌などの癌幹細胞研究を報告し^{6)~8)}、引き続き膵臓癌⁹⁾、肝臓癌¹⁰⁾でも癌幹細胞もしくはこれに近い性質をもつとされるTI-C (tumor initiating cells) が報告された。このようにこの分野は開発競争が激しい。消化器癌のような固形腫瘍では、癌幹細胞の発生起源が推定困難なこと、癌幹細胞同定のための表面抗原が十分に明らかになっていないこと、異種細胞移植、移植経路など癌幹細胞を同定する過程での技術的な問題点も指摘されており¹¹⁾、血液腫瘍と同様の知見が当てはまるのかまだ不明な点が多く精力的な検証が進められている段階である。

本稿では、消化器癌を中心に癌幹細胞研究の現状と今後の展望について、当科での知見を含め概説する。

III. 正常と癌の幹細胞

正常組織幹細胞は各組織に僅かに存在し、一定の幹細胞を保つための自己複製能と多系統の分化細胞への多分化能を有する細胞と定義される。正常な腸管上皮組織では、腸管上皮幹細胞が階層的な非対称性分裂により増殖し、細胞死、損傷組織の修復に関わり、組織としての恒常的な機能維持と、腸管上皮を構成する全分化細胞の由来となると考えられている。癌幹細胞仮説に基づけば、癌の発生、進展は癌幹細胞の発生から始まることになる。現時点で癌幹細胞の起源は明らかになっていないが、癌幹細胞と正常組織幹細胞の性質には自己複製能や多分化能など共通点多ことより、癌が発生する組織の組織幹細胞もしくは前駆細胞から発生するという考え方が有力視されている。一方、幹細胞を頂点とした分化は一方通行的な事象とされてきたが、分化細胞の先祖帰り（リプログラミング）が実際に起こりうることも指摘されている。2007年、Yamanakaらグループは、マウス線維芽細胞にOct3/4・Sox2・Klf4・c-Mycの4遺伝子を導入し、ES(Embryonic stem cell)細胞様の人工多能性幹細胞(iPS: Induced pluripotent stem cells)細胞の樹立に成功し

表1 固形腫瘍で同定されている癌幹細胞の表面マーカー

乳癌	CD44+/CD24-/lowESA+
脳腫瘍	CD133+
大腸癌	CD133+
	EpCAMhigh/CD44+/ (CD166+)
	CD44+CD133+
肝細胞癌	CD90+/CD45-
頭頸部癌	CD44+
	CD20+
	ABC5
膵臓癌	CD44+/CD24+/ESA+
	CD133+
前立腺癌	CD44+/a2b1high/CD133+

(clinical sample を用いたもののみ表記)

た¹²⁾。この iPS 細胞の概念は分化した細胞を人工的に幹細胞に戻すものであり、癌の発生過程においても、遺伝子変異によって分化した癌細胞もしくは正常細胞がゲノム変化を経て幹細胞化する可能性を示している。このような分化異常の過程には、消化器癌のような上皮性悪性腫瘍の場合、癌の先進部細胞の EMT (epithelial-mesenchymal transition: 上皮-間葉転換) との関係も注目されている¹³⁾。

大腸癌では正常大腸粘膜上皮から腺腫を経て癌に至る adenoma carcinoma sequence¹⁴⁾が多段階発癌のモデルとしてよく知られている。大腸の正常幹細胞は陰窩の基底膜直上に存在し、分化した細胞は消化管内皮下に向かって移動し約 2~5 日でアポトーシスを起こして消化管内に脱落する。このような短時間に段階的な遺伝子異常の蓄積が起こる確率は低いと考えられる。よって、腸管上皮に長い期間存在する正常幹細胞もしくは前駆細胞に遺伝子変化が蓄積され、通常は厳密にコントロールされている細胞周期がこの遺伝子変化によって破綻することで癌化するという考え方には矛盾がないと思われる。実際に造血系幹細胞における研究では加齢に伴い癌化につながる遺伝子変異が正常幹細胞に蓄積されるという報告があり¹⁵⁾、消化器癌でも幹細胞の存在は癌の発生に深く関与していると考えられている。

IV. 消化器癌における癌幹細胞研究の動向

臨床検体を用いた最も一般的な癌幹細胞の同定法は、各種表面マーカーを用いた方法である。フローサ

イトメトリーを用いて細胞膜上に存在する表面蛋白マーカーを指標として、検体癌組織細胞を分画し、NOD/SCID マウスに移植して腫瘍形成能を解析する。CD133 (prominin-1) は造血系および神経系の幹細胞/前駆細胞だけでなく、白血病、脳腫瘍、肝臓癌、前立腺癌などさまざまな癌腫における幹細胞マーカーとして知られている (表 1)。その他、side population (SP) 分離法、浮遊細胞塊 (sphere) を用いる方法が癌幹細胞の同定法として用いられている。SP 分離法は組織幹細胞濃縮方法のひとつで、Hoechst33342 という色素を細胞内に取り込ませ、Verapamil など ABC トランスポーター阻害剤を用いて薬剤の排出能力をフローサイトメトリーで解析する方法である。SP 細胞は抗癌剤抵抗性をもち腫瘍形成能が高く、癌幹細胞様の特徴をもっていることが明らかになっている。浮遊細胞塊は細胞を特殊条件下で培養することで得られる球形の細胞集団であり、幹細胞様の性質をもつ細胞を濃縮することが報告されている。

大腸癌では、ヒト大腸癌切除組織よりフローサイトメトリーを用いて分離した CD133+細胞が、EGF および FGF2 を添加した無血清培養条件下で浮遊細胞塊 (sphere) を形成し、NOD/SCID マウスにおいて造腫瘍能が高いことが報告され、CD133+細胞が大腸癌の前駆細胞を発生させている可能性が示唆された^{6)~8)}。一方、Dalerba らは EpCAM (high)/CD44+細胞の腫瘍形成能が高いことを示し、CD133-の腫瘍でも EpCAM (high)/CD44+細胞は腫瘍形成能を示し、CD133 より EpCAM や CD44 の方が大腸癌幹細胞の分離マーカーとして重要である可能性を示した¹⁶⁾。また、Shmelkov らは、大腸癌の肝転移症例から CD133+細胞と CD133-細胞を分離し、それぞれ NOD/SCID マウスへ繰り返し移植した結果、どちらの細胞からも腫瘍を形成し、むしろ CD133-細胞の方が CD133+細胞よりも大きな腫瘍を形成し悪性度が高かったと報告している¹⁷⁾。われわれは、臨床大腸癌手術検体を用いて、CD133 と CD44 を用いた multi-color によるフローサイトメトリー解析を行い、NOD/SCID マウスへの皮下投与による腫瘍形成能を検討した。その結果、CD133+および CD44+細胞では腫瘍形成を認めたが、CD133-および CD44-細胞では造腫瘍能を認めず、また CD133 と CD44 の発現による 4 群展開では、CD133+/CD44+細胞においてのみ腫瘍形成を認めたことより、CD133+/CD44+が大腸癌幹細胞の絞り込みに有用であると報告した¹⁸⁾。

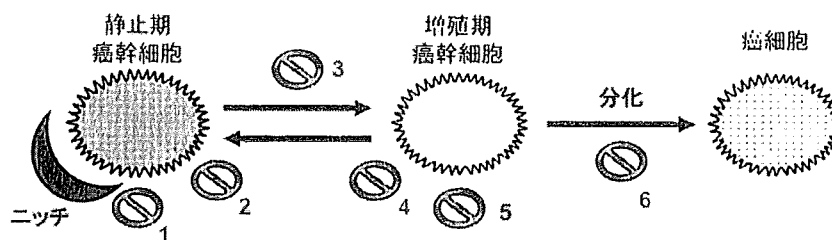


図 2

膵癌では、Liらがヒト膵癌組織をNOD/SCIDマウスの皮下に移植し単離された癌細胞からフローサイトメトリーを用いて分離したCD44+/CD24+/ESA+細胞が限定的に高い腫瘍増殖能を示し、膵癌の発生に関与する重要な増殖シグナルのHedgehogのリガンドであるsonic hedgehog (SHH)の発現が亢進していたことより、膵癌幹細胞である可能性が高いと報告している⁹⁾。Hermannらはヒト膵癌組織の癌浸潤先進部から分離したCD133+/CXCR4+細胞だけが肝転移巣を形成すること、CXCR4中和抗体が肝転移を抑制することを示し、膵癌の転移にSDF-1/CXCR4経路が深く関与することを報告した¹⁹⁾。

肝細胞癌では、Chibaraらがフローサイトメトリーを用いて肝癌細胞株Huh7、PLC/PRF/5細胞中にわずかしか存在しないSP細胞をNOD/SCIDマウスに移植することによって、限局した腫瘍形成能と多分化能を有する癌幹細胞の分離が可能であることを示した²⁰⁾。またMaらは、ヒト肝細胞癌細胞にCD133+細胞には高頻度にprogenitor cellsが存在し、β-カテニン、Oct-3/4、Bmi1、SMO、Notchなどのstemness geneの発現が亢進していることを報告した²¹⁾。Yamashitaらはフローサイトメトリーを用いてヒト肝細胞癌を2種のsubtype (EpCAM+/AFP+肝細胞癌細胞とEpCAM-/AFP-肝細胞癌細胞)に分離し、遺伝子発現プロファイルとpathway分析し、EpCAM+/AFP+に肝細胞癌幹細胞が含まれる可能性を示した¹⁰⁾。

V. 癌幹細胞を標的とした治療法の開発

外科的根治術後の再発や術後長期経過後の再発には、臨床的に同定困難な微量の遊離癌細胞が遺残していることが示唆される。癌細胞が他の臓器に転移するためには、その細胞が原発巣から遊離するだけでなく、到達した部位で新しく癌を形成する能力が必要となることから、転移においても癌幹細胞が関与するこ

とが示唆されている。また抗癌剤など術後補助療法を附加したにも関わらず再発転移を来し、再発した場合多くは完治しえないことも知られている。抗癌剤や放射線に対する耐性獲得は、癌治療における最大の問題点の一つであり、治療耐性に関わる一群の細胞集団を含む癌組織の多様性がその原因と考えられている。癌幹細胞には強力な抗癌剤排出・中和能力があること、また癌幹細胞は通常、細胞分裂を停止したG0期にあり、正常組織幹細胞と同様に特別な微小環境(ニッチ)内で休眠状態として存在するため、従来使用されている多くの細胞周期依存性の抗癌剤や、増殖が活発な細胞に効果的な放射線に耐性を示すと考えられている(図2, 3)。また、循環血液中出现する骨髓由来細胞が幹細胞ニッチを形成し、癌の転移形成に重要な役割を担う可能性も指摘されはじめた²²⁾。このように、癌克服のためには癌細胞側因子として癌幹細胞と宿主側環境因子としてニッチの両面の俯瞰的研究が必要であり、癌幹細胞を選択的に除去する方法、癌幹細胞を分化誘導する方法、ニッチを制御する方法などの開発が進められている。

白血病幹細胞研究は、造血幹細胞システムを正常モデルとして対比させることにより進められ、治療法が開発されている。CMLでは、チロシンキナーゼ阻害剤であるImatinibが臨床応用され、画期的治療薬として治療成績の向上に貢献している。またAML, ALLでは、静止期の造血幹細胞を高率に細胞周期に入らせるmTOR阻害剤のRapamycinの有効性が確認されつつある。AMLではニッチで働く接着分子のCD44に対する抗体療法や、CMLでは幹細胞維持に重要なPMLを亜ヒ素により阻害する新規治療法が考案されている。しかし、いずれも服用を中止した後に多くの症例で再発し、完全に白血病幹細胞を根絶できていないと考えられ、より直接幹細胞を標的とした治療法の開発が必要とされる。

固形腫瘍では乳癌で、CD44+/CD24-細胞を取り

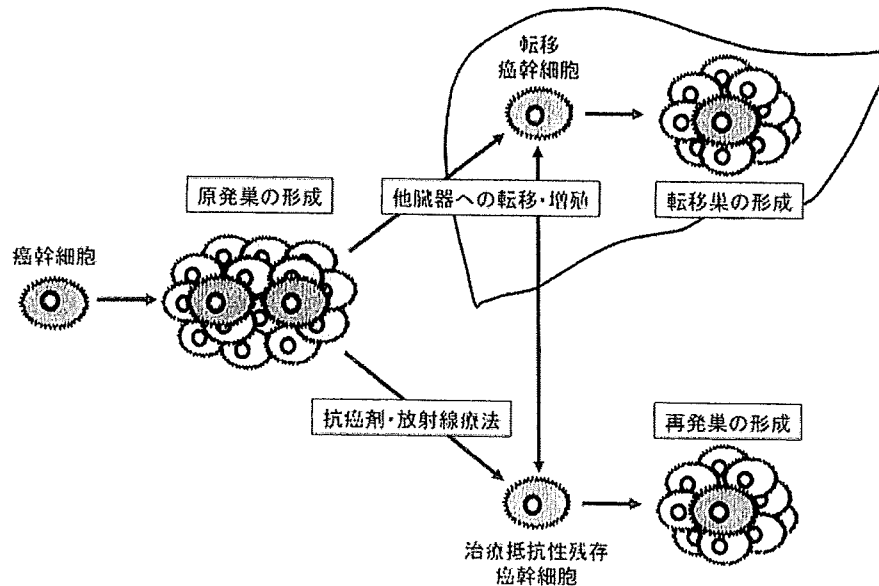


図 3

除く治療法が重要であり、チロシンキナーゼ阻害剤で Akt 経路, MAP キナーゼ経路を阻害できる Lapatinib と化学療法の併用により高い治療効果が得られることが報告された²³⁾。また、正常幹細胞と同様に癌幹細胞では活性酸素 (ROS: reactive oxygen species) 濃度が低く遺伝子損傷が発生しにくいことが放射線治療抵抗性の一因となっていること, ROS スカベンジャーの抑制により抵抗性を克服できる可能性が示された²⁴⁾。大腸癌細胞株では Oxaliplatin の持続曝露により耐性化に EMT が関与する可能性が報告されている²⁵⁾。消化器領域での組織正常幹細胞と癌幹細胞の同定, それぞれの類似点と相違点, 癌の遺伝子変化がどの段階でおこるのか理解がすすめば, 癌幹細胞を標的とした新たな消化器癌の治療法の開発につながると考えられる。

VI. おわりに

近年, 消化器癌領域においても癌幹細胞研究が急速に進み始め, 正常組織幹細胞の存在の証明, 癌幹細胞の発生起源の推定, 分化メカニズムの解明など基礎的知見が徐々に集積されつつある。また, 癌幹細胞および宿主側の微小環境 (ニッチ) 両者間におけるシグナル伝達あるいは細胞間反応, EMT, miR-124 や miR-137 など一部の microRNA なども含め, 癌幹細胞仮説を中心とした消化器癌の再発・転移メカニズム, 抗癌剤や放射線抵抗性のメカニズムの解明も進められている。さらには, 癌遺伝子の c-Myc やレトロウイルス

を用いずに iPS 細胞の樹立が可能であることが示され, 癌研究と再生医療の接点としても新たな局面を迎えている。今後, 癌幹細胞仮説の導入による新たな腫瘍学に基づいた消化器癌治療法の確立が期待される。

文 献

- 1) Nowell PC: The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*, 194: 23—28, 1976.
- 2) Bruce WR, Van der gaag H: A quantitative assay for the number of murine lymphoma cells capable of proliferation in vivo. *Nature*, 199: 79—80, 1963.
- 3) Bonnet D, Dick JE: Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med*, 3: 730—737, 1997.
- 4) Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al.: Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100: 3983—3988, 2003.
- 5) Ishii H, Iwatsuki M, Ieta K, et al.: Cancer stem cells and chemoradiation resistance. *Cancer Science*, 99: 1871—1877, 2008.
- 6) Haraguchi N, Utsunomiya T, Inoue H, et al.: Characterization of a side population of cancer cells from human gastrointestinal system. *Stem Cells*, 24: 506—513, 2006.
- 7) O'Brien CA, Pollett A, Gallinger S, et al.: A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, 445: 106—110, 2007.
- 8) Ricci-Vitiani L, Lombardi DG, Pilozzi E, et al.: Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature*, 445: 111—115, 2007.

- 9) Li C, Heidt DG, Dalerba P, et al. : Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*, 67 : 1030—1037, 2007.
- 10) Yamashita T, Ji J, Budhu A, et al. : EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology*, 136 : 1012—1024, 2009.
- 11) Quintana E, Shackleton M, Sabel MS, et al. : Efficient tumour formation by single human melanoma cells. *Nature*, 456 : 593—598, 2008.
- 12) Okita K, Ichisaka T, Yamanaka S : Generation of germline-competent induced pluripotent stem cells. *Nature*, 448 : 313—317, 2007.
- 13) Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. : The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, 16 : 704—715, 2008.
- 14) Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, et al. : Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med*, 319 : 525—532, 1988.
- 15) Rossi DJ, Bryder D, Zahn JM, et al. : Cell intrinsic alterations underlie hematopoietic stem cell aging. *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 : 9194—9199, 2005.
- 16) Dalerba P, Dylla SJ, Park IK, et al. : Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 : 10158—10163, 2007.
- 17) Shmelkov SV, Butler JM, Hooper AT, et al. : CD133 expression is not restricted to stem cells, and both CD133+ and CD133- metastatic colon cancer cells initiate tumors. *J Clin Invest*, 118 : 2111—2120, 2008.
- 18) Haraguchi N, Ohkuma M, Sakashita H, et al. : CD133+CD44+ population efficiently enriches colon cancer initiating cells. *Ann Surg Oncol*, 15 : 2927—2933, 2008.
- 19) Hermann PC, Huber SL, Herrler T, et al. : Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, 13 : 313—323, 2007.
- 20) Chiba T, Kita K, Zheng YW, et al. : Side population purified from hepatocellular carcinoma cells harbors cancer stem cell-like properties. *Hepatology*, 44 : 240—251, 2006.
- 21) Ma S, Chan KW, Hu L, et al. : Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem/progenitor cells. *Gastroenterology*, 132 : 2542—2556, 2007.
- 22) Bertolini F, Shaked Y, Mancuso P, et al. : The multifaceted circulating endothelial cell in cancer : towards marker and target identification. *Nat Rev Cancer*, 6 : 835—845, 2006.
- 23) Li X, Lewis MT, Huang J, et al. : Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*, 100 : 672—679, 2008.
- 24) Diehn M, Cho RW, Lobo NA, et al. : Association of reactive oxygen species levels and radioresistance in cancer stem cells. *Nature*, 458 : 780—783, 2009.
- 25) Yang AD, Fan F, Camp ER, et al. : Chronic oxaliplatin resistance induces epithelial-to mesenchymal transition in colorectal cancer cell lines. *Clin Cancer Res*, 12 : 4147—4153, 2006.