

図1 Stage II 大腸癌における漢方薬併用の有無での生存曲線(文献18より)

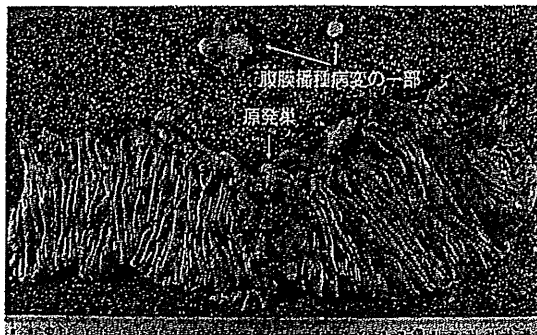


図2 摘出標本(80歳, 男性)  
上行結腸に5 × 7 cmの全周性, 2型腫瘍と腹膜播種病巣の一部(最大1.5 cm)を示した。

最大1.5 cmの小さな播種を全体に認めた。さらに、小骨盤腔内や左横隔膜下にも1～2 mmの結節を多数認めた。摘出標本を図2に示す。病理組織結果から、上行結腸癌, 2型, tub1, 5 × 7 cm, pSE, pN1, H0, P3, M0, stageIVであった。術前CT画像を再検すると大網に腫瘍を認め、腹膜播種と考える病変であった(図3)。術後経過は良好であった。症例は80歳と高齢者であったが、毎日5 km以上の散歩を日課としている元気な症例であった。患者への十分な説明のもと、術後2週目から全身化学療法(CPT-11+TS-1)と十全大補湯を開始した。化学療法はCPT-11を80 mg/m<sup>2</sup>を2週ごとに全身投与した。TS-1は100 mgを週5日間連続で服用した。経過を図4に示した。化学療法前のCEA値は12.5 ng/dlで

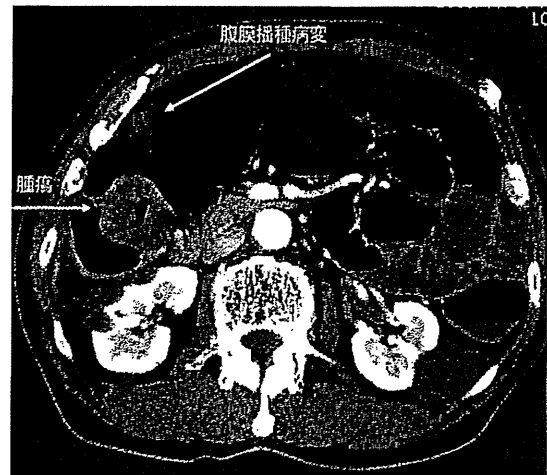


図3 原発病巣と大網の腹膜播種病変  
横隔膜下や小骨盤腔内の小結節は認識できなかった。

あったものが、化学療法により20ヵ月前値を上回ることにはなかった。1<sup>st</sup> lineの化学療法施行中、血液毒性などで治療を延期した回数は8回で、1～2週の休薬で次の治療が可能であった。治療開始後23ヵ月目にCTで肝転移を認めた。しかし、明らかな腹膜播種を認めなかった。血小板の減少傾向がみられたため、漢方薬を人參養榮湯に、2<sup>nd</sup> lineの化学療法としてmFOLFOX6に変更した。本治療の9ヵ月間に血液毒性で5回の治療延期が必要であったが、全身状態は良好であった。しかし、死亡の4ヵ月ほど前から腹水の貯留、そ

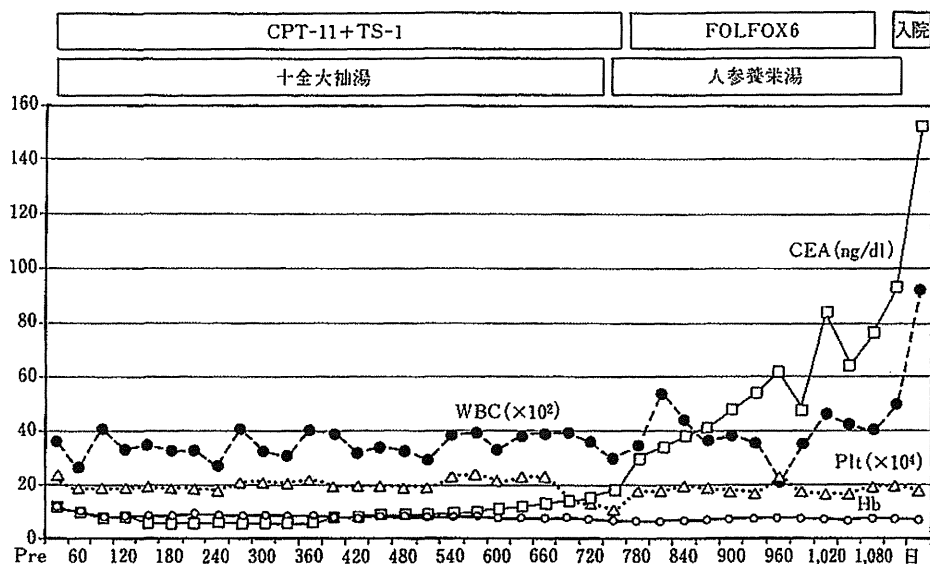


図4 腹膜播種(P3)症例(80歳, 男性)

右結腸切除術後, 全身化学療法を開始。1<sup>st</sup> line 治療で2年間 CEA 上昇を抑えた。漢方薬は十全大補湯を使用し, 血小板減少と 2<sup>nd</sup> line 変更時に人參養榮湯に変更した。終末期の2ヵ月以外は外来治療で, 化学療法開始後36.9ヵ月生存した。

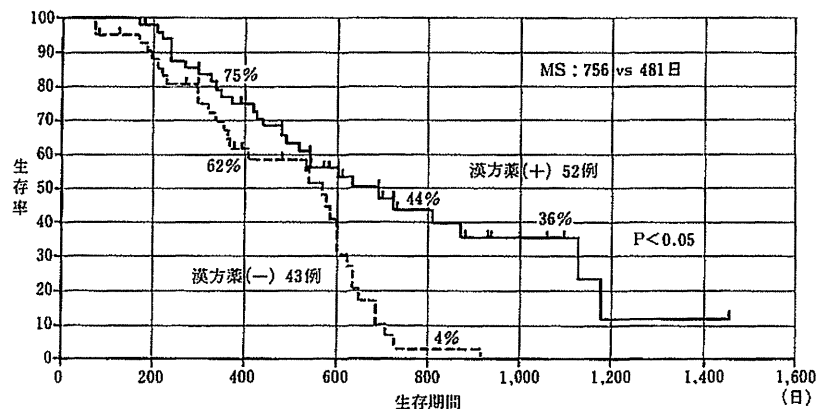


図5 切除不能大腸癌に対する漢方薬併用の有無による生存曲線  
有意に漢方薬併用で生存期間の延長がみられた。

れによる食欲不振, 腰痛がみられ, 化学療法を終了した。在宅で生活していたが最後の2ヵ月間は入院治療となった。

本症例のように広範な腹膜播種を認めたものに対し, 積極的腫瘍切除術に腹腔内温熱化学療法の有用性がRCTで報告されている<sup>22)</sup>。これによる

と5-FU/LVの標準治療群の12.6Mに対して22.2Mと平均生存期間(MST)が有意に延長しており, 症例によっては長期生存例も報告している。しかし, 本治療法は決して一般的でないとASCO 2008 Educational Bookの中で述べられており<sup>23)</sup>, 現時点での標準的な治療法は全身化学

療法の施行と考えられている。

今回の症例は80歳以上の超高齢大腸癌症例で36.9ヵ月の生存が得られた。これは特筆に値する効果が漢方薬の併用で得られた可能性があると考えている。

### 3. 切除不能症例に併用する漢方薬併用の効果

切除不能進行大腸癌症例に対しての化学療法が一定化した後の症例に対し、漢方薬併用の有無で生存に対する効果の検討が2009年の ASCO に採用された<sup>24)</sup>。その後の症例を追加して検討を加えた。症例数は87例で、漢方薬併用症例は47例(漢方薬群)であった。漢方薬は十全大補湯、補中益気湯、小柴胡湯を使用した。漢方薬の使用については、抗がん剤の説明時と同時に行い、患者が選

択した。漢方薬群の1, 2, 3年生存率は各々75, 44, 36%で、対照群の62, 4, 0%に比べ有意に良好であった(図5)。Takegawa ら<sup>16)</sup>が報告した子宮頸癌症例に対する漢方薬の有意な生存率改善効果と同様に、進行大腸癌症例でも漢方薬による有意な生存期間延長効果を認めた。

### ま と め

漢方薬は基礎的研究で明らかになったように癌に対する細胞レベルでの有用な直接作用や間接作用を有している。これらの作用により癌患者において生存期間の改善効果が得られるようになったことを報告した。漢方診療は今後の癌治療において重要な役割を果たす可能性を持った興味深い分野のひとつであると考えている。

### 文 献

- 厚生労働省大臣官房：人口動態統計。2010. 5.
- 佐々木一晃, 平田公一：術後の免疫機能改善に対する漢方薬の有用性。現代東洋医学 14: 45-48, 1993.
- 漢方は面白い, 日本医事新報 4505: 4-5, 2010.
- 佐々木一晃, 高島 健, 北川一彦ほか：漢方薬による大腸癌術後免疫賦活化と肝転移抑制効果について。Prog Med 12: 1652-1655, 1992.
- Iijima K, Sun S, Cyong JC, et al: Juzen-taiho-to, a Japanese herbal medicine, modulates type 1 and type 2 T cell responses in old BALB/c mice. Am J Chin Med 27: 191-203, 1999.
- Ohnishi Y, Fujii H, Hayakawa Y, et al: Oral administration of a Kampo (Japanese herbal) medicine Juzen-taiho-to inhibits liver metastasis of colon 26-L5 carcinoma cells. Jpn J Cancer Res 89: 206-213, 1998.
- Utsuyama M, Seidler H, Kitagawa M, et al: Immunological restoration and anti-tumor effect by Japanese herbal medicine in aged mice. Mech Ageing Dev 122: 341-352, 2001.
- 中島 泉：癌免疫賦活と漢方。癌医療への漢方の寄与。丸山孝士(編), pp137-149, 篠原出版新社, 東京, 2003.
- Matsuo M, et al: Organ selectivity of Juzen-taiho-to and Ninjin-yoei-to in the expression of anti-metastatic efficacy. J Trad Med 19: 93-97, 2002.
- Tagami K, Niwa K, Lian Z, et al: Preventive Effect of Juzen-taiho-to on Endometrial Carcinogenesis in Mice is Based on Shimotsu-to Constituent. Biol Pharm Bull 27: 156-161, 2004.
- Onogi K, Niwa K, Tang L, et al: Inhibitory effects of Hochu-ekki-to on endometrial carcinogenesis induced by N-methyl-N-nitrosourea and 17beta-estradiol in mice. Oncol Rep 16: 1343-1348, 2006.
- Lin J, Dong HF, Oppenheim JJ, et al: Effects of astragal radix on the growth of different cancer cell lines. World J Gastroenterol 9: 670-673, 2003.
- Kurashige S, Akuzawa Y, Endo F: Effects of astragal radix extract on carcinogenesis, cytokine production, and cytotoxicity in mice treated with a carcinogen, N-butyl-N'-butanolnitrosoamine. Cancer Invest 17: 30-35, 1999.
- 日本東洋医学会：漢方治療におけるエビデンスレポート。日東洋医学会誌 56, 2005.
- 西田欣広, 川野由紀枝, 橋原久司ほか：担癌患者における漢方治療と Interleukin 6 を用いた新しい評価。漢方と最新治療 19: 63-69, 2010.
- Takegawa Y, Ikushima H, Ozaki K, et al: Can Kampo therapy prolong the life of cancer patients? J Med Invest 55: 99-105, 2008.
- 西館敏彦, 古畑智久, 目黒 誠ほか：大腸癌術後化補助療法における十全大補湯の有効性の検討(中間報告)。日本癌治療学会抄録集, 2007.
- 佐々木一晃, 高坂 一, 古畑智久ほか：癌化学療法と漢方診療。外科治療 97: 504-510, 2007.
- 佐々木一晃, 平田公一：漢方による転移性肝癌治療。癌医療への漢方の寄与。丸山孝士(編), pp95-10. 篠原出版新社, 東京, 2003.
- 佐々木一晃, 高坂 一, 平田公一：漢方薬による転移性肝癌の抑制。癌の臨床 48: 171-176, 2002.
- 佐々木一晃, 平田公一：転移性肝癌における漢方治療。肝疾患の漢方治療。別冊・医学のあゆみ。山内 浩, 鍋谷欣市(編), pp152-154. 医歯薬出版, 東京, 1998.
- Verwaal VJ, Bruin S, Boot H, et al: 8-year follow-up of randomized trial: cytoreduction and hyperthermic intraperitoneal chemotherapy versus systemic chemotherapy in patients with peritoneal carcinomatosis of colorectal cancer. Ann Surg Oncol 15: 2426-2432, 2008.
- Levine EA, Ronnett BM, Mansfield PF, et al: Overview of Cytoreductive Surgery and Intraperitoneal Hyperthermic Chemotherapy for Peritoneal Dissemination of Appendiceal and Colorectal Neoplasms. ASCO 2008 Educational Book 153-159, 2008.
- Sasaki K, Ohno K, Harada K, et al: Can Kampo medicine prolong the life of metastatic colorectal cancer (MCRC) patients with chemotherapy? J Clin Oncol 27: (suppl; abstr e18120) 2009.

## 原発巣切除 versus 非切除 — 根治切除不能 StageIV 大腸癌に対する治療方針 —

古畑 智久    沖田 憲司    西舘 敏彦    久木田和晴  
山口 洋志    木村 康利    水口 徹    平田 公一

### 要 旨

これまで、根治切除不能 StageIV 大腸癌に対する治療方針は、まず原発巣の切除を行い、その後に切除不能な病変を対象に化学療法を行うことが標準的とされてきた。しかし、最近の大腸癌に対する薬物療法の著しい進歩により、その治療方針は徐々に変化してきている。原発巣による症状を有している症例においては、現在においても原発巣切除が必要と考えられるが、無症状の症例においては、最新の化学療法を施行可能であれば、多くの場合、経過中に原発巣に対する処置を必要としないとの報告がある。5-FU、イリノテカン、オキサリプラチンの細胞障害性薬剤にベバシズマブ、セツキシマブといった分子標的治療薬を加えることにより転移巣のみならず、原発巣のコントロールも可能と考えられてきており、さらに著効例では根治切除可能となる場合もある。今後、切除不能 StageIV 大腸癌に対する原発巣切除の意義について、論議されていくことが予測される。

Key Words : 大腸癌, StageIV, 原発巣切除, 化学療法, 腹腔鏡下手術

### 緒 言

根治切除不能 StageIV 大腸癌における原発巣切除の意義については、これまでの多くの議論がなされてきた。原発巣切除を先行させた場合、術後合併症などにより、化学療法の開始の遅れが懸念され、一方、化学療法を先行させた場合、治療中に原発巣による合併症が出現し、緊急的な処置を必要とする可能性が懸念される。原発巣による症状を有する場合は、切除を先行させるべきとの報告が多いが、症状を有しない場合の治療方針は、化学療法の進歩とともに徐々に変化してきているものと考えられる。本稿では、化学療法の進

歩とともに変化してきている原発巣切除の意義について文献的に解説する。

### 大腸癌に対する化学療法の変遷

2000年ころまでは、切除不能に対する化学療法は5-FU/ロイコボリンが中心であり生存期間の中央値は11~14カ月程度あった<sup>1)</sup>。その後、イリノテカン、オキサリプラチンを加えたFOLFIRI, FOLFOXなどの多剤併用療法が報告され、生存期間の中央値は20ヶ月に達するまでに至った<sup>2-4)</sup>。5-FU, イリノテカン, オキサリプラチンの3種類の薬剤を最終的に全て使い切ることが、患者の生存期間の延長において重要と考えられるようになった<sup>5)</sup>。その後、腫瘍の血管新生阻害作用を有する抗 VEGF 抗体ベバシズマブ、腫瘍増殖に関連するシグナル伝達を阻害する抗 EGFR 抗体セ

札幌医科大学第1外科

本論文の要旨は、平成22年2月20日に行われた日本外科学会北海道地区生涯教育セミナーにおいて講演されたものである。

ツキシマブが登場し、これらを加えることによって生存期間の延長が認められている<sup>6-9)</sup>。この10年間に於ける化学療法の著しい進歩により、初診時には切除不能と考えられた症例が切除可能となり長期生存を得たとの報告や経過中に原発巣による症状をコントロールし得たとの報告がなされている<sup>10)</sup>。外科医はこの現状を十分に把握し、適切な時期に、適切な術式を選択することが求められていると思われる。原発巣切除の意義を論じる場合は、化学療法の変遷を時代背景として考慮することが必要であるので、本稿では①オキサリプラチン、イリノテカンを含まない化学療法を施行していた時期 (Ox, IRI 登場以前)、②オキサリプラチン、イリノテカンを含む化学療法を施行していた時期 (Ox, IRI 登場以降)、③分子標的薬剤を加えた化学療法が施行可能となった時期 (分子標的薬剤登場以降) の3つの時期に分けて解説していく。

#### Ox, IRI 登場以前

この時代の化学療法は、5-FUとロイコボリンの併用療法が中心であり、奏効率は30%程度と考えられる<sup>1)</sup>。

Law ら<sup>11)</sup>による報告は、1996年～1999年における原発巣による症状を有する根治切除不能 Stage IV 大腸癌症例を対象としている。これらの症例における予後に関わる因子として、原発巣の切除、腹膜播種、両葉の肝転移、化学療法が統計学的に有意と解析されている。原発巣切除群と非切除群の生存期間中央値は、7.1ヶ月と4.0ヶ月であり、切除群で予後が良好であっ

た。しかし、切除後の周術期死亡率は6.7%と高率であり、腹膜播種のある症例や両葉の肝転移のある症例では、手術適応の判定は慎重にするべきであると述べている (表1)。

Konyalian ら<sup>12)</sup>は、1991年～2002年における根治切除不能 Stage IV 大腸癌の全症例を対象としている。原発巣切除を先行させた群 (切除群) と原発巣切除を行わず化学療法などを施行し、必要に応じ人工肛門造設などを行った群 (非切除群) に分けて解析している。平均生存期間の中央値は、切除群12.5ヶ月、非切除群4.6ヶ月で切除群において有意に良好であった (表1)。2群間における背景の差が考えられるが、年齢、CEA 値、血液生化学検査値については差を認めていなかった。著者らは、診断時の症状の有無にかかわらず、Stage IV 大腸癌の診療において、原発巣切除は姑息的であっても必須と結論している。

#### Ox, IRI 登場以降

5-FU/ロイコボリンにオキサリプラチンもしくはイリノテカンを加える多剤併用療法の登場により奏効率は50～60%までにも上昇し、この時期を境に、大腸癌の治療戦略に大きな変化を認めた<sup>2-4)</sup>。

Muratore ら<sup>13)</sup>の報告は、2000～2004年における症状のない切除不能 Stage IV 大腸癌症例を対象に検討している。この報告の特徴は、全例に対し第一治療として化学療法を行い、治療レジメがFOLFOX6に統一されていることである。FOLFOX6の奏効率は68.6%であり、化学療法中に原発巣による合併症の発生率は8.6%であり、手術を要したのは、わずか2.8%と報告されている。また、化学療法後に根治切除可能となった症例は、42.9%に達している (表2)。以上より、無症状の症例においては、オキサリプラチンを使用した化学療法は第一治療法として安全な治療戦略である述べている。

表1 Ox, IRI 登場以前 原発巣切除、非切除の生存期間と術後成績

著者・発表年度		生存期間中央値	術後合併症発生率	周術期死亡率
Law ら (2004年)	切除	7.1ヶ月	18.7%	6.7%
	非切除	4.0ヶ月	16.7%	23.3%
Konyalian ら (2006年)	切除	12.5ヶ月	19.4%	4.8%
	非切除	4.6ヶ月	6.4%	6.4%

表2 Ox, IRI および分子標的薬剤登場以降化学療法後の根治切除施行率と原発巣による合併症発生率

著者・発表年度	化学療法レジメ (施行率)	分子標的薬剤の使用 (施行率)	根治切除施行率	原発巣による合併症発生率
Muratore ら (2007年)	FOLFOX6 (100%)	なし	42.9%	8.6%
Poultsides ら (2009年)	FOLFOX (60%) FOLFIRI, IFL (40%)	ペバシズマブ 一次治療 (48.1%) 二次治療以降 (69.5%)	20.2%	11.2%

### 分子標的薬剤登場以降

分子標的薬剤は、これまで使用されてきた細胞障害性薬剤とは全く異なる作用機序であることから多くの治療レジメに上乗せ効果をもたらしている<sup>6-9)</sup>。

2009年に報告された Poultides ら<sup>10)</sup>の検討では、2000～2006年の遠隔転移を伴う、閉塞、出血など原発巣による症状の無い Stage IV 大腸癌を対象にしている。第一治療として、オキサリプラチンもしくはイリノテカンを含むレジメの化学療法が行われており、約半数の症例にペバシズマブが使用されている。化学療法中に、原発巣による合併症の発生率は11.2%で、手術を必要とした症例はわずか7%と報告されている。また、化学療法後に根治切除が可能となった症例は20.2%にまで達していることから、今後、化学療法が根治切除のためのひとつのツールとして位置付けられることが考えられる(表2)。切除不能大腸癌に対して、原発巣切除を行わずに化学療法を第一治療とすることは、合理的な選択と思われるが、化学療法中に原発巣による合併症のために緊急もしくは準緊急的に手術を行った症例の12.5%に術後30日以内の死亡を認めていることから、化学療法中においては原発巣および全身状態を十分に把握し、手術のタイミングと術式の選択を誤らないことが肝要と思われる。

### Stage IV 大腸癌に対する腹腔鏡下手術

腹腔鏡下大腸切除術は、低侵襲手術としてのコンセンサスは定着し、広く行われるようになってきた。Fukunaga ら<sup>14)</sup>は、Stage IV 大腸癌に対する腹腔鏡下手術の安全性に関する検討を行っている。Stage IV と Stage 0～Ⅲ 腹腔鏡下手術症例の2群に分けて解析しており、術中出血量、手術時間、術後合併症、開腹手術移行率において両群に差を認めないと報告している(表3)。腹腔鏡下手術は、術後在院日数や職場への復帰までの期間を短縮させるとの報告<sup>15-16)</sup>もあるこ

表3 腹腔鏡下大腸切除における術中・術後成績

	Stage IV	Stage 0～Ⅲ
手術時間	189.0min	182.5min
術中出血量	95.0g	60.0g
開腹移行率	4.6%	2.7%
術後合併症発生率	12.3%	15.1%
周術期死亡率	0.0%	0.0%

とからよりスムーズな化学療法への移行が可能と考えられ、考慮すべき術式と思われる。この報告では、巨大な腫瘍、大腸閉塞、大腸穿孔、下部直腸癌、癌性腹水を認める症例などは除外しているため、全ての Stage IV 大腸癌における腹腔鏡下手術の安全性が確認されているわけではない。したがって、Stage IV 症例に対し腹腔鏡下手術を行う場合は、症例の選択に関して十分な検討を行うべきであると考えられる。

### 考 察

原発巣による症状としては、出血、腸閉塞が主であり、薬剤などによるコントロールは困難であり、切除が最も有効な対処法である。また、頻度は高くはないものの、腫瘍部分の穿孔による腹膜炎は、致死率が高く重篤な病態である。したがって、症状を有する場合は、化学療法が進歩した現在においても、切除が原則と考えられる。その際、広範な肝転移、多量の腹水を認める症例や Performance status や栄養状態が不良な場合は、術後合併症や周術期死亡率が高率であるため、手術を行うにあたっては、できるだけ低侵襲となるような術式を選択する必要がある。

原発巣による症状が無い場合、もしくは軽度の場合は、化学療法が進歩した現在では、原発巣の予防的切除の必要性については議論を要する。オキサリプラチン、イリノテカンを用いた多剤併用化学療法、さらには分子標的治療薬を加えた場合は、高い奏功率が得られるようになった。化学療法を第一治療として行った場合、治療中に原発巣による合併症の発生率は10%程度であり、多くの症例で手術を必要とすることはないと報告されている<sup>10,13)</sup>。しかしながら、生存期間の比較においては、化学療法を第一治療とするより、予防的原発巣切除施行後、化学療法を行ったほうが予後良好とする報告が多い<sup>17)</sup>。これは、オキサリプラチンやイリノテカンを用いた化学療法を施行した症例においても報告されている結果である。手術症例に全身状態良好例が偏っているなどのバイアスによるものとの考えもあるが、患者背景のケースマッチが行われた Galzia ら<sup>18)</sup>の報告においても切除を行った群において有意に生存期間が良好であった。予防的原発巣切除は化学療法開始を遅延させるが、予後に及ぼす影響は少ないと考えられる。生存期間の延長をエンドポイントとした場合、化学療法が進歩した現在においても、化学療法のみでは、原発巣切除と化学療法を組み合わせ

た治療戦略には及ばないというのが現時点でのコンセンサスと考えられる。したがって、根治切除不能大腸癌に遭遇した場合、臨床上重要と考えられることは、第一治療として切除と非切除のどちらを選択するかではなく、原発巣による症状の程度、耐術能、化学療法感受性などを注意深く観察し、総合的に治療法を適時選択していく知識と経験であると考えられる（図1）。

### おわりに

原発巣切除は、姑息的であっても生存期間を延長するとの報告が多かった。しかし、今後、分子標的治療薬をはじめとする化学療法の進歩によって、切除の位置付けが変化していく可能性もあるので、常に最新の情報を収集し、適切な治療方針を選択していくことが重要と考えられる。

### 文 献

- 1) de Gramont A, Bosset JF, Milan C, et al. Randomized trial comparing monthly low-dose leucovorin and fluorouracil bolus with bimonthly high-dose leucovorin and fluorouracil bolus plus continuous infusion for advanced colorectal cancer: a French intergroup study. *J Clin Oncol* 1997; 15 : 808-815.
- 2) 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* 2000; 355 : 1041-1047.
- 3) Goldberg RM, Sargent DJ, Morton RF, et al. Randomized controlled trial of reduced-dose bolus fluorouracil plus leucovorin and irinotecan or infused fluorouracil plus leucovorin and oxaliplatin in patients with previously untreated metastatic colorectal cancer: a North American Intergroup Trial. *J Clin Oncol* 2006; 24 : 3347-3353.
- 4) Tournigand C, Andre T, Achille E, et al. FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 2004; 22 : 229-237.
- 5) 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* 2004; 22 : 1209-1214.
- 6) 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* 2007; 25 : 1539-1544.
- 7) Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, et al. Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 2008; 26 : 2013-2019.
- 8) Van Cutsem E, Kohne CH, Hitre E, et al. Cetuximab and chemotherapy as initial treatment for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 2009; 360 : 1408-1417.
- 9) Bokemeyer C, Bondarenko I, Makhson A, et al. Fluoro-

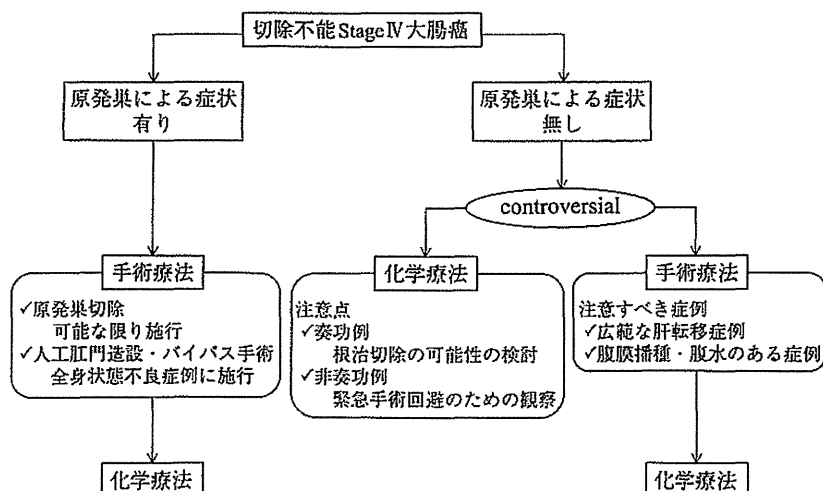


図1 切除不能 Stage IV 大腸癌に対する治療方針

ouracil, leucovorin, and oxaliplatin with and without cetuximab in the first-line treatment of metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 663-671.

- 10) Poultides GA, Servais EL, Saltz LB, et al. Outcome of primary tumor in patients with synchronous stage IV colorectal cancer receiving combination chemotherapy without surgery as initial treatment. *J Clin Oncol* 2009 ; 27 : 3379-3384.
- 11) Law WL, Chan WF, Lee YM, et al. Non-curative surgery for colorectal cancer: critical appraisal of outcomes. *Int J Colorectal Dis* 2004 ; 19 : 197-202.
- 12) Konyalian VR, Rosing DK, Haukoos JS, et al. The role of primary tumour resection in patients with stage IV colorectal cancer. *Colorectal Dis* 2007 ; 9 : 430-437.
- 13) Muratore A, Zorzi D, Bouzari H, et al. Asymptomatic colorectal cancer with un-resectable liver metastases: immediate colorectal resection or up-front systemic chemotherapy? *Ann Surg Oncol* 2007 ; 14 : 766-770.
- 14) Fukunaga Y, Higashino M, Tanimura S, et al. Laparoscopic surgery for stage IV colorectal cancer. *Surg Endosc* 2009 Dec24 [Epub ahead of print]
- 15) Clinical Outcomes of Surgical Therapy Study Group. A comparison of laparoscopically assisted and open colectomy for colon cancer. *N Engl J Med* 2004 ; 350 : 2050-2059.
- 16) Veldkamp R, Kuhry E, Hop WC, et al. Laparoscopic surgery versus open surgery for colon cancer: short-term outcomes of a randomised trial. *Lancet Oncol* 2005 ; 6 : 477-484.
- 17) Stillwell AP, Buettner PG, Ho YH. Meta-analysis of survival of patients with stage IV colorectal cancer managed with surgical resection versus chemotherapy alone. *World J Surg* 2010 ; 34 : 797-807.
- 18) Galizia G, Lieto E, Orditura M, et al. First-line chemotherapy vs bowel tumor resection plus chemotherapy for patients with unresectable synchronous colorectal hepatic metastases. *Arch Surg* 2008 ; 143 : 352-358.

## Summary

### The value of primary tumor resection in patients with unresectable Stage IV colorectal cancer

Tomohisa FURUHATA, Kenji OKITA  
Toshihiko NISHIDATE, Kazuharu KUKITA  
Hiroshi YAMAGUCHI, Yasutoshi KIMURA  
Toru MIZUGUCHI, Koichi HIRATA

First Department of Surgery, School of Medicine, Sapporo Medical University

Primary tumor resection followed by systemic chemotherapy in patients with Stage IV colorectal cancer is the standard treatment strategy. However, this strategy is gradually changing due to recent advances in systemic chemotherapy for Stage IV colorectal cancer. For patients presenting symptoms caused by the primary tumor, resection is considered necessary as the first-line treatment. On the other hand, in asymptomatic colorectal cancer, there are several reports that most cases do not require any surgical intervention for primary-tumor-related complications if patients undergo the latest chemotherapies, which are combinations of infusional 5-FU/leucovorin with oxaliplatin or irinotecan. Furthermore, the addition of molecular target agents to the above combinations has provided clinically meaningful improvement in response rates and occasionally enables curative resection. The discussion about the value of primary tumor resection for unresectable Stage IV colorectal cancer hereafter will grow heated.



## ● 原 著 ●

## 切除不能進行・再発大腸癌に対する二次治療としての Bevacizumab 併用化学療法

小山 基<sup>\*1</sup> 村田 暁彦<sup>\*1</sup> 木村 寛<sup>\*1</sup> 坂本 義之<sup>\*1</sup> 諸 橋 一<sup>\*1</sup>  
 木村 憲央<sup>\*1</sup> 賀佐富二彦<sup>\*1</sup> 佐藤 淳也<sup>\*2</sup> 照井 一史<sup>\*2</sup> 栗津 朱美<sup>\*3</sup>  
 袴田 健一<sup>\*1</sup>

[*Jpn J Cancer Chemother* 37(6): 1069-1073, June, 2010]

**Bevacizumab in Combination with mFOLFOX6 or FOLFIRI for Previously Treated Metastatic Colorectal Cancer:** Motoi Koyama<sup>\*1</sup>, Akihiko Murata<sup>\*1</sup>, Yutaka Kimura<sup>\*1</sup>, Yoshiyuki Sakamoto<sup>\*1</sup>, Hajime Morohashi<sup>\*1</sup>, Norihisa Kimura<sup>\*1</sup>, Fujihiko Gasa<sup>\*1</sup>, Junya Sato<sup>\*2</sup>, Kazushi Terui<sup>\*2</sup>, Akemi Awatsu<sup>\*3</sup> and Kenichi Hakamada<sup>\*1</sup> (<sup>\*1</sup>Dept. of Gastroenterological Surgery, Hirosaki University Graduate School of Medicine, <sup>\*2</sup>Dept. of Pharmaceutical Sciences, <sup>\*3</sup>Dept. of Nursing, Hirosaki University Hospital)

### Summary

We retrospectively investigated the safety and efficacy on outpatient chemotherapy including bevacizumab (BV) as second-line therapy for inoperable metastatic colorectal cancer. Analytical subjects were thirty patients treated with chemotherapy including BV as second-line therapy after first disease progression. All patients were treated with BV 5 mg/kg. Concurrent therapy was given mFOLFOX6 (2 patients) and FOLFIRI (28 patients). The BV treatment frequency and all course treatment frequency including the prior regimens averaged 20 and 37 times, respectively. The overall response rate was 24. 1% (PR, 7 patients; SD, 17 patients; PD, 5 patients), and the median duration of progression-free survival was 8. 0 months. The median duration of survival after addition of BV was 20. 3 months. The adverse events were 84% (>grade 3, 9%), BV-associated adverse events were GI perforation (1 patient), GI hemorrhage (1 patient), grade 3 hypertension (1 patient) and grade 2 epistaxis (2 patient). Although it is necessary to be careful about GI hemorrhage and GI perforation, we could safely continue the treatment with BV on outpatient chemotherapy. We confirmed that the chemotherapy including BV as second-line therapy had high antitumor effect and patient benefit. **Key words:** Chemotherapy of colorectal cancer, Second-line therapy, Bevacizumab (Received Oct. 21, 2009/Accepted Dec. 9, 2009)

**要旨** 切除不能進行・再発大腸癌に対する二次治療における bevacizumab (以下 BV) を併用した外来化学療法の安全性と抗腫瘍効果を retrospective に検討した。対象は初回治療増悪後の二次治療として施行した BV 併用療法の 30 例であった。BV は全例 5 mg/kg で投与し、併用療法は mFOLFOX6 が 2 例、FOLFIRI が 28 例。BV 施行回数は平均 20 回で、前治療を含めた全コース施行回数は平均 37 回。BV 併用二次治療における抗腫瘍効果は PR 7 例、SD 17 例、PD 5 例 (奏効率 24%) で、無増悪生存期間の中央値は 8.0 か月、BV 開始後の生存期間中央値は 20.3 か月であった。有害事象は 93% であったが、grade 3 以上は 20% で、BV に特有な有害事象は消化管出血・穿孔・高血圧が各 1 例でみられた。BV 併用療法は消化管出血や穿孔を念頭において治療に当たる必要があるが、外来化学療法で安全に継続可能であり、二次治療においても抗腫瘍効果は高く有用性が確認できた。

### はじめに

切除不能進行・再発大腸癌に対する化学療法として従来の FOLFOX/FOLFIRI 療法に bevacizumab (以下

BV) が併用され、現在では標準治療として位置付けられている<sup>1-7)</sup>。当教室では 2007 年 8 月から BV を導入しており、今回は二次治療として施行された BV を併用した外来化学療法の安全性と抗腫瘍効果を retrospective に

<sup>\*1</sup> 弘前大学大学院医学研究科・消化器外科学講座

<sup>\*2</sup> 弘前大学医学部附属病院・薬剤部

<sup>\*3</sup> 同 看護部

表 1 Bevacizumab 併用療法 (二次治療)

性別	男性 15 例, 女性 15 例
平均年齢	61.4 歳 (47~78 歳)
原発巣	結腸 13 例, 直腸 17 例
同時性/異時性	同時性 12 例, 異時性 18 例
標的臓器	1 臓器 13 例, 2 臓器 9 例, 3 臓器 8 例
BV 投与量	全例 5 mg/kg
併用療法	mFOLFOX6 2 例, FOLFIRI 28 例
全コース施行回数	37.2 回 (7~79 回)
BV 施行回数	19.5 回 (3~48 回)
BV 併用化学治療継続中	8 例
BV 併用化学治療中止	22 例
中止理由	病勢増悪 19 例 有害事象 2 例 患者希望 1 例

BV: bevacizumab

検討した。

## I. 対象および方法

### 1. 対象と方法

2006 年 1 月~2008 年 12 月に経験した外来化学療法は 80 例で, 一次治療は mFOLFOX6, 二次治療は FOLFIRI を基本レジメンとしている。BV 併用化学療法は 80 例中 38 例に施行され, 一次治療の BV 併用療法が 8 例であり, 初回治療増悪後の二次治療として施行された BV 併用療法の 30 例を今回の対象とした。BV は全例 5 mg/kg で投与し, 併用療法として mFOLFOX6 が 2 例, FOLFIRI が 28 例で施行された (表 1)。一次治療の mFOLFOX6 増悪後にセカンドレジメンとして BV 併用 FOLFIRI に移行した症例が 17 例であり, 二次治療として FOLFIRI を継続中に, 当院で BV 使用が可能となった 2007 年 8 月以降にサードレジメンとして BV 併用 FOLFIRI に移行した症例が 11 例であった。mFOLFOX6 と併用した 2 例は, ファーストレジメンの mFOLFOX6 による神経毒性のためにセカンドレジメン FOLFIRI に変更して, 初回増悪後にサードレジメンとして BV 併用 FOLFOX に移行した症例であった。

患者背景は男性 15 例, 女性 15 例で, 平均年齢は 61 歳。原発巣は結腸 13 例, 直腸 17 例で, 標的臓器は 1 臓器が 13 例, 2 臓器が 9 例, 3 臓器以上が 8 例であった。

### 2. 治療法

治療対象は以下の適応とした。① ECOG PS が 0~1, ② 主要臓器機能が保持されている, ③ 心血管系や脳梗塞・出血の既往がない。

### 3. 評価項目

抗腫瘍効果の評価には Response Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) を用いた。有害事象の grade は National Cancer Institute Common Toxicity

表 2 抗腫瘍効果

(全症例: 29 例)	CR 0 例, PR 7 例, SD 17 例, PD 5 例 奏効率 (CR+PR) 24% 病勢制御率 (CR+PR+SD) 83%
(セカンドレジメン: 16 例)	CR 0 例, PR 4 例, SD 8 例, PD 4 例 (奏効率 25%, 病勢制御率 75%)
(サードレジメン: 13 例)	CR 0 例, PR 3 例, SD 9 例, PD 1 例 (奏効率 23%, 病勢制御率 92%)

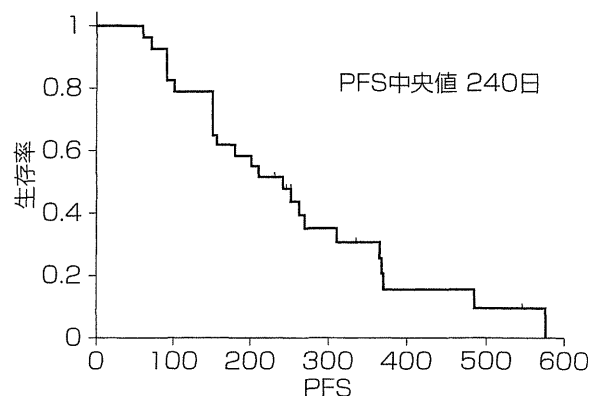


図 1 Bevacizumab 併用療法の二次治療における無増悪期間 (PFS)

Criteria (NCI-CTC) version 3.0 を採用した。

## II. 結 果

### 1. 抗腫瘍効果

BV 開始前の FOLFOX/FOLFIRI 療法の前治療コース施行回数は平均 18 (4~52) 回であった。BV 施行回数は平均 20 (3~48) 回であり, 前治療を含めた全コース施行回数は平均 37 (7~79) 回。BV 併用化学療法を治療継続中は 8 例であり, 中止例 22 例の中止理由の内訳は病勢増悪が 19 例, 有害事象が 2 例, 患者希望が 1 例であった。病勢増悪の 19 例中 10 例は三次治療として cetuximab 併用化学療法に移行した (表 1)。

BV を 4 回以上施行した 29 例の抗腫瘍効果は PR 7 例, SD 17 例, PD 5 例。奏効率 (CR+PR) は 24%であり, 病勢制御率 (CR+PR+SD) は 83%であった。セカンドレジメンとして施行した 16 例では PR 4 例, SD 8 例, PD 4 例 (奏効率 25%, 病勢制御率 75%), サードレジメンの 13 例では PR 3 例, SD 9 例, PD 1 例 (奏効率 23%, 病勢制御率 92%) で, 両群の抗腫瘍効果に差異はみられなかった (表 2)。

BV 併用後の二次治療における無増悪期間 (PFS) 中央値は 240 日 (8.0 か月) で (図 1), 前治療を除いた二次治療からの全生存期間中央値 (MST) は 610 日 (20.3

表 3 有害事象

有害事象	grade 1	grade 2	grade 3	grade 4	全イベント
ヘモグロビン		4 (13%)			4 (13%)
白血球	5 (17%)	6 (20%)	3 (10%)		14 (47%)
血小板	11 (37%)				11 (37%)
疲労倦怠感	17 (57%)	4 (13%)			21 (70%)
悪心・嘔吐	9 (30%)	3 (10%)			12 (40%)
食欲不振	10 (33%)				10 (33%)
顔面潮紅		1 (3%)			1 (3%)
口内炎	3 (10%)	3 (10%)			6 (20%)
脱毛	2 (7%)				2 (7%)
下痢	5 (17%)	1 (3%)			6 (20%)
末梢神経障害	5 (17%)				5 (17%)
消化管出血	1 (3%)		1 (3%)		2 (7%)
鼻出血	4 (13%)	2 (7%)			6 (20%)
高血圧	1 (3%)	1 (3%)	1 (3%)		3 (10%)
消化管穿孔			1 (3%)		1 (3%)
全有害事象	7 (23%)	15 (50%)	6 (20%)		28 (93%)

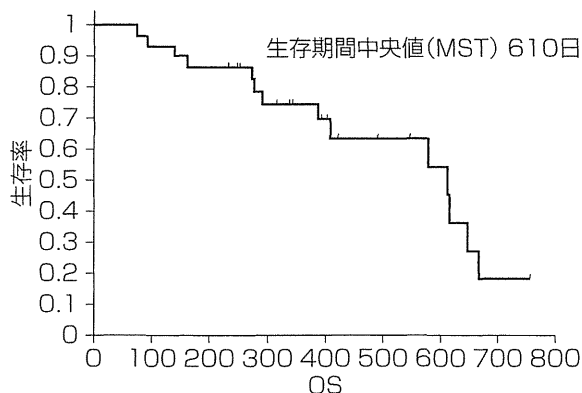


図 2 Bevacizumab 併用後の二次治療における全生存期間 (OS)

か月)であった(図2)。

## 2. 有害事象

BV 併用の二次治療における有害事象は 28 例 (93%) でみられたが, grade 3 以上は 6 例 (20%) であり, その内訳は白血球・好中球減少の血液毒性が 3 例で, 非血液毒性として消化管出血・消化管穿孔・高血圧が各 1 例であった。全 grade における BV に特有な有害事象としては, 鼻出血 6 例 (20%), 高血圧 3 例 (10%), 消化管出血 2 例 (7%), 消化管穿孔 1 例 (3%) がみられたが, 動静脈血栓症は認めなかった (表 3)。

## Ⅲ. 考 察

最近では生物学的に重要な経路を標的とする新規治療薬の開発により, 切除不能進行・再発大腸癌に対する治療の選択肢は大きく広がり, 患者の生存期間および無増悪生存期間は著しく延長している<sup>1,2)</sup>。BV は血管内皮増殖因子 (VEGF) に結合してこの作用を阻害する遺伝子組換えヒト化モノクローナル抗体であり<sup>3)</sup>, 一次または

二次化学療法に BV を併用することでさらなる生存期間が得られることが報告され<sup>4-7)</sup>, 現在では標準治療として位置付けられている。しかし, BV の至適な投与方法や投与順序については明確になっていない<sup>8)</sup>。

本邦においても, 切除不能進行・再発大腸癌に対する化学療法として, 従来の FOLFOX/FOLFIRI 療法に加えて BV を併用した化学療法が一次治療として標準化されつつある。しかし一方で, 多くの施設では外科医が主体となって大腸癌化学療法を担っているのが現状である。したがって実際の診療においては, 手術直後であることや外来化学療法における安全性を理由として, 一次治療から BV 併用療法を使用できない場合も少なくない。これまでに BV 併用の二次治療における文献的な報告は E3200 試験などのみであり<sup>4)</sup>, 本邦の報告例は 1983~2009 年の期間について医学中央雑誌で「ベバシズマブ」「大腸癌」「二次治療」をキーワードとして検索し得る限りでは認められない。そこで今回は, 初回治療増悪後の二次治療として施行された BV 併用の外来化学療法における安全性と抗腫瘍効果を retrospective に検討した。

大腸癌術後の化学療法患者が増加の一途をたどる現状において, 当教室では外来化学療法で継続可能なレジメンを選択し, 一次治療は mFOLFOX6, 二次治療は FOLFIRI を基本レジメンとして, 最近では一次治療から BV を併用している。2006 年 1 月に外来化学療法室が開設して以来, 2008 年 12 月までに経験した大腸癌化学療法は 80 例で, 遠隔転移の肝肺転移が切除可能となった 6 例を除いた 74 例のなかで, FOLFOX のみは 8 例で, FOLFOX/FOLFIRI は 28 例であった。その多くの症例は, 当院で BV 使用が可能となった 2007 年 8 月以

前に治療中止や転院となった症例であり、BV 導入後は二次治療の FOLFIRI 施行中でもサードレジメンとして BV 併用 FOLFIRI 療法に移行した。今回の対象は、BV 併用療法を施行した 38 例のうち、二次治療として施行された BV 併用の外来化学療法の 30 例である。

今回の二次治療における抗腫瘍効果は、奏効率は 24%、BV 開始後の PFS は 8.0 か月で、MST は 20.3 か月であった。一次治療における BV 併用化学療法では、奏効率 26~58%、PFS は 9.0~11.2 か月で、MST は 16.6~27.3 か月と報告されている<sup>5-7,9-12)</sup>。今回の抗腫瘍効果は奏効率では劣っているが病勢制御率は 83% と良好であり、MST は前治療期間を除いた二次治療でありながら 20 か月という結果が得られた。さらに、BV が導入される以前の FOLFOX4/6 や FOLFIRI による二次治療の治療成績は、奏効率 4~15%、PFS 2.5~4.7 か月と報告されており<sup>4,13-15)</sup>、今回の BV 併用二次治療の奏効率 24%、PFS 8.0 か月と比較すると、二次治療からであっても BV を併用する有用性が確認できた。

BV 併用化学療法の有害事象は、これまでの欧米の大規模試験や本邦の市販後調査における報告では<sup>4,11,12,16)</sup>、高血圧 13.5~29.9% (grade 3 以上 0.4~6.2%)、出血 11.8~31.0% (grade 3 以上 1.3~3.4%)、蛋白尿 4.6~10.4% (grade 3 以上 0.1~1.1%)、消化管穿孔 0.9~2.0% (grade 3 以上 0.9~1.8%)、静脈血栓症 1.3% (grade 3 以上 1.3%)、動脈血栓症 0.4~3.4% (grade 3 以上 0.3~3.4%) とされている。今回の BV 併用の外来化学療法に際しては、有害事象対策として点滴施行前に末梢血・生化学検査を行い、月一度の尿検査と D-ダイマーの測定を定期的に行った。今回の有害事象は全 grade を総合すると 84% であったが、grade 3 以上は 9% と少なかった。これは、前治療の FOLFOX/FOLFIRI を施行している段階で、血液毒性に対する 5-FU 減量などの対策が講じられていたことに起因すると考えられる。一方で、BV に特有な有害事象とされている高血圧・鼻出血の多くは grade 1~2 であったが、grade 3 の消化管出血と消化管穿孔の各 1 例を経験し、入院治療を必要とした。

消化管出血の 1 例は BV 併用の二次治療を 3 コース施行後に少量の一時的な下血が出現したが、貧血の進行もないため治療を継続していた。6 コース施行した 3 日後に、約 400 mL の下血が出現して同日入院となった。大腸内視鏡検査で骨盤内リンパ節再発の病巣が腸管に浸潤して、腸管内に再発腫瘍が露出していた。貧血に対して輸血による治療を必要としたが、自然に止血が得られた。1 週間後に退院となったが、この後は化学療法を希望せず、best supportive care を継続中である。また、消化管

穿孔の 1 例は超低位前方切除後の肝転移・局所再発に対して、BV 併用の二次治療を 6 コース施行後に肛門周囲膿瘍が出現した。肛門縁から 4 cm の前回吻合部付近に局所再発が存在して、腫瘍自体が穿孔して肛門周囲の坐骨直腸窩に膿瘍を形成していた。入院として切開ドレナージを行い、後日に腸管ストーマ造設術を施行した。BV による腸管穿孔・創傷治癒遅延の影響が否定できないために、膿瘍が治癒した後に、BV を cetuximab に変更して、cetuximab 併用化学療法に変更した。しかし、cetuximab 4 回施行後に同様の肛門周囲膿瘍が出現して再度切開ドレナージを行った。したがって、化学療法の治療効果による腫瘍縮小・壊死に伴って腸管穿孔が引き起こされたものと推測された。

今回、grade 3 の消化管出血と消化管穿孔を経験したが、必要に応じて入院加療を併用して治療を継続することが可能であった。BV 併用化学療法は二次治療であっても外来化学療法は継続可能なレジメンであるが、これら特有な有害事象を念頭において治療に当たる必要がある。

切除不能進行・再発大腸癌に対する二次治療としての BV 併用化学療法について、安全性と抗腫瘍効果の両面から検討した。今回の結果から、BV 併用療法は安全性からも外来化学療法が可能であり、二次治療においても抗腫瘍効果は高く有用性が確認できた。

## 文 献

- 1) Golfopoulos V, Salanti G, Pavlidis N, *et al*: Survival and disease-progression benefits with treatment regimens for advanced colorectal cancer: a meta-analysis. *Lancet Oncol* 8: 898-911, 2007.
- 2) Kabbinnar FF, Hambleton J, Mass RD, *et al*: Combined analysis of efficacy: the addition of bevacizumab to fluorouracil/leucovorin improves survival for patients with metastatic colorectal cancer. *J Clin Oncol* 23: 3706-3712, 2005.
- 3) Presta LG, Chen H, O'Connor SJ, *et al*: Humanization of an anti-vascular endothelial growth factor monoclonal antibody for the therapy of solid tumors and other disorders. *Cancer Res* 57: 4593-4599, 1997.
- 4) 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.
- 5) Hurwitz H, Fehrenbacher L, Novotny W, *et al*: Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N Engl J Med* 350: 2335-2342, 2004.
- 6) Kabbinnar FF, Schulz J, McCleod M, *et al*: Addition of bevacizumab to bolus fluorouracil and leucovorin in first-line metastatic colorectal cancer: results of a randomized phase II trial. *J Clin Oncol* 23: 3697-3705, 2005.
- 7) Hochster HS, Hart LL, Ramanathan RK, *et al*: Safety and efficacy of oxaliplatin and fluoropyrimidine regimens

- with or without bevacizumab as first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results of the TREE study. *J Clin Oncol* 26: 3523-3529, 2008.
- 8) Grothey A, Sugrue MM, Purdie DM, *et al*: Bevacizumab beyond first progression is associated with prolonged overall survival in metastatic colorectal cancer: results from a large observational cohort study (BRiTE). *J Clin Oncol* 26: 5326-5334, 2008.
  - 9) Fuchs CS, Marshall J, Mitchell E, *et al*: Randomized, controlled trial of irinotecan plus infusional, bolus, or oral fluoropyrimidines in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: results from the BICC-C Study. *J Clin Oncol* 25: 4779-4786, 2007.
  - 10) Saltz LB, Clarke S, Diaz-Rubio E, *et al*: Bevacizumab in combination with oxaliplatin-based chemotherapy as first-line therapy in metastatic colorectal cancer: a randomized phase III study. *J Clin Oncol* 26: 2013-2017, 2008.
  - 11) Kozloff MF, Sugrue MM, Purdie DM, *et al*: Safety and effectiveness of bevacizumab and chemotherapy in elderly patients with metastatic colorectal cancer: Results from the BRiTE observational cohort study. ASCO 2008 poster #4026.
  - 12) Berry RS, Van Cutsem E, Kretzschmar A, *et al*: Final efficacy results for bevacizumab plus standard first-line chemotherapies in patients with metastatic colorectal cancer: First BEAT. ASCO 2008 poster #4025.
  - 13) Rothenberg ML, Oza AM, Bigelow RH, *et al*: Superiority of oxaliplatin and fluorouracil-leucovorin compared with either therapy alone in patients with progressive colorectal cancer after irinotecan and fluorouracil-leucovorin: interim results of a phase III trial. *J Clin Oncol* 21: 2059-2069, 2003.
  - 14) Tournigand C, Andre T, Achille E, *et al*: FOLFIRI followed by FOLFOX6 or the reverse sequence in advanced colorectal cancer: a randomized GERCOR study. *J Clin Oncol* 22: 229-237, 2004.
  - 15) Andre T, Louvet C, Maindrault-Goebel F, *et al*: CPT-11 (irinotecan) addition to bimonthly, high-dose leucovorin and bolus and continuous-infusion 5-fluorouracil (FOLFIRI) for pretreated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer* 35: 1343-1347, 1999.
  - 16) 植竹宏之, 白尾國昭, 土井俊彦・他: 抗 VEGF 抗体製剤アバスタチン (ベバシズマブ (BV)) の結腸直腸癌全例調査報告結果. 第 64 回日本消化器外科学会総会, 2009, O-2-45.

RESEARCH ARTICLE

Open Access

# Anti-apoptotic effect of claudin-1 in tamoxifen-treated human breast cancer MCF-7 cells

Harue Akasaka<sup>1</sup>, Fuyuki Sato<sup>1\*</sup>, Satoko Morohashi<sup>1</sup>, Yunyan Wu<sup>1,2</sup>, Yang Liu<sup>1,2</sup>, Jun Kondo<sup>1</sup>, Hiroki Odagiri<sup>3</sup>, Kenichi Hakamada<sup>3</sup>, Hiroshi Kijima<sup>1</sup>

## Abstract

**Background:** Claudin-1 is a membrane protein of tight junctions, and is associated with the development of various cancers. However, the significance of claudin-1 expression in cancer cells is not well understood. Here, we showed for the first time the anti-apoptotic effect of claudin-1 in human breast cancer MCF-7 cells.

**Methods:** Human breast cancer MCF-7 and T47 D cells were treated with or without tamoxifen, siRNA against claudin-1, or tamoxifen and claudin-1 siRNA. The samples were analyzed by RT-PCR, Western blotting or immunofluorescent staining.

**Results:** The expression of claudin-1 was upregulated in tamoxifen-treated MCF-7 cells, whereas the expression of claudin-1 was not altered in tamoxifen-treated T47 D cells. Knockdown of claudin-1 by siRNA increased the amount of poly (ADP-ribose) polymerase (PARP) regardless of tamoxifen treatment in MCF-7 cells, but not T47 D cells. In the cell membranes of the MCF-7 cells, tamoxifen treatment increased the amount of claudin-1, but decreased the amount of  $\beta$ -catenin. Claudin-1 siRNA increased the amount of E-cadherin in the cytoplasm of the MCF-7 cells as well as the amount of  $\beta$ -catenin in their cell membranes.

**Conclusion:** These results indicate that claudin-1 has anti-apoptotic effects, and is involved in the regulation of the expression and subcellular localization of  $\beta$ -catenin and E-cadherin in MCF-7, but not T47 D cells.

## Background

Breast cancer is the second most common cause of female mortality in United States. The breast cancer incidence and mortality rates were about 190,000 and 40,000, respectively, in 2009 [1]. The majority of breast cancers are sporadic, and most risk factors for the disease are related to estrogen exposure. This suggests that insufficient apoptosis in cancer cells is involved in their survival as insufficient apoptosis leads to the development of chemotherapy resistance and carcinogenesis [2].

Tamoxifen is one of most widely used anti-estrogen drugs for the treatment of human breast cancer [3]. Tamoxifen treatment leads to a rapid decrease in number of S-phase cells, an accumulation of cells in the G1-fraction [4], and the induction of apoptosis *in vivo* and *in vitro* [5-7]. Tamoxifen induces apoptosis through several distinct pathways including a mitochondria-dependent

pathway, the induction of c-Myc, the activation of members of the mitogen-activated protein kinases (MAPK) family, and the upregulation of p53 [7-11]. However, the detailed molecular mechanisms by which tamoxifen induces apoptosis are not well understood.

Tight junctions and adherens junctions proteins, including claudins, E-cadherin,  $\beta$ -catenin, and ZO proteins, are responsible for the maintenance of epithelial cell-cell adhesion and defining cell polarity, and are also involved in cell signaling events [12]. Changes in claudin expression are also involved in invasion, metastasis, and colony formation in various cancer cells [13-15]. In a previous study, the mRNA expression of claudin-1 was decreased in the tumor group compared with the control (normal) group in breast cancer tissues [16]. Decreased expression of claudin-1 was also correlated with breast cancer recurrence [17]. However, the relationship between claudin-1 and chemotherapy is poorly understood.

In the present study, we investigated the relationship between claudin-1 and tamoxifen treatment in human

\* Correspondence: fsato@cc.hirosaki-u.ac.jp

<sup>1</sup>Department of Pathology and Bioscience, Hirosaki University Graduate School of Medicine, Hirosaki 036-8562, Japan

Full list of author information is available at the end of the article

breast cancer MCF-7 and T47 D cells. The expression of claudin-1 was upregulated by tamoxifen treatment in MCF-7 cells. Combination treatment with both claudin-1 siRNA and tamoxifen significantly increased the amount of cleaved PARP. Knockdown of claudin-1 affected the expression and subcellular localization of  $\beta$ -catenin and E-cadherin in MCF-7 cells. Our results suggest that claudin-1 has an anti-apoptotic effect, involving the regulation of  $\beta$ -catenin and E-cadherin, in MCF-7 cells.

## Methods

### Cell culture and treatment

MCF-7 and T47 D cells were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). These cells were cultured in Dulbecco's Modified Eagle's Medium-high glucose (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% fetal bovine serum at 37°C in a humidified atmosphere of 95% air and 5% CO<sub>2</sub>. When the MCF-7 cells were treated with 40  $\mu$ M of tamoxifen (Sigma) for 20 h, apoptotic reactions were detected as described below. However, the incubation with 40  $\mu$ M of tamoxifen for more than 24 h resulted in the severe toxicity to cells, and more than 90% of cells were detached from the plates (data not shown). Therefore, we treated the cells with 40  $\mu$ M of tamoxifen for 20 h in the follow experiments. In addition, we treated MCF-7 cells with 1, 10 or 20  $\mu$ M of tamoxifen for 48 h in some experiments to observe the longer effects.

### Reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and real-time PCR

Total RNA was isolated using an RNeasy RNA isolation kit (QIAGEN, Hilden, Germany). First-strand cDNA was synthesized from 1  $\mu$ g of total RNA using ReverTra Ace (TOYOBO, Osaka, Japan). RT-PCR was performed using an aliquot of first-strand cDNA as a template under standard conditions with Taq DNA polymerase (QIAGEN). The primers were designed to perform optimal RT-PCR by DNASIS software, and the primers used were as follows: claudin-1-F: 5'-CAGCTGTTGGGCTTCATTCTC-3', claudin-1-R: 5'-ATCACTCCAGGAGGATGCC-3'; claudin-4-F: 5'-ATGGCCTCCATGGGGCTACA-3', claudin-4-R: 5'-AGCGAGTCGTACACCTTGCA-3'; E-cadherin-F: 5'-ACATTGTACCTCGCAGAC-3', E-cadherin-R: 5'-GCGGATTGTAGAAGTCTTGG-3'; GAPDH-F: 5'-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3', GAPDH-R: 5'-AGACCACCTGGTGCTCAGTGTAGC-3'. The amplified products of claudin-1, claudin-4, E-cadherin, and GAPDH were 277 bp, 208 bp, 336 bp, and 696 bp, in length, respectively. The cDNA for claudin-1, claudin-4, E-cadherin, and GAPDH were amplified for up to 25 cycles.

The PCR products were separated on 1.5% (w/v) agarose gels.

The real-time PCR was carried out using SYBER Green Master Mix (Applied Biosystems, Tokyo, Japan). The primers used as follows: claudin-1-F: 5'-AGATGAG-GATGGCTGTCATTGG-3', claudin-1-R: 5'-CATGCTGTGGCAGCTAAAATAGC-3'; E-cadherin-F: 5'-ACATGTGCACCTCGCAGAC-3', E-cadherin-R: 5'-GCGGATTGTAGAAGTCTTGG-3'; 18 S rRNA-F: 5'-GTAACCGTTGAACCCCAT-3', 18 S rRNA-R: 5'-CCATCCAATCGGTAGTAGCG-3'. The amplified products of claudin-1, E-cadherin, and 18 S rRNA were 72 bp, 336 bp, and 150 bp, in length, respectively.

### Short interference RNA (siRNA)

Short interference RNA (siRNA) against claudin-1 were synthesized by QIAGEN. The sequences for the sense and anti-sense claudin-1 siRNA were 5'-r (GCAUGGUAUGG-CAAUAGAA) d (TT) -3' and 5'-r (UUCUAUUGC-CAUACCAUGC) d (TG) -3', respectively. We also used another siRNA against claudin-1 (claudin-1 siRNA2). The sequences for the sense and anti-sense claudin-1 siRNA2 were 5'-r (CGAAUUGUUACAAUAGAA) d (TT) -3' and 5'-r (UUCUAUUGUAACAAUUCG) d (TT) -3'. The negative control (scrambled) siRNA sequences were 5'-r (UUCUCCGAACGUGUCACGU) d (TT) -3' and 5'-r (ACGUGACACGUUCGGAGAA) d (TT) -3'. For the siRNA transfection experiments, MCF-7 and T47 D cells were seeded at  $5 \times 10^4$  cells per 35-mm well. Twenty-four h later, the siRNA were transfected into the cells using the Lipofectamine RNA iMAX reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). After transfection, the cells were incubated for 48 h and subjected to various analyses.

### Western Blotting

The cells transfected with siRNA were lysed using M-PER lysis buffer (PIERCE, Rockford, IL, USA). Protein concentrations were determined using the bicinchoninic acid (BCA) assay. The obtained lysates (10  $\mu$ g protein) were subjected to SDS-PAGE, and the acquired proteins were transferred to PVDF membranes (Immobilion P, Millipore, Tokyo, Japan). The membranes were then incubated with antibodies specific for claudin-1 (1:10,000), claudin-4 (1:20,000), and claudin-7 (1:2,000), which were purchased from Invitrogen; E-cadherin (1:1,000), which was purchased from Takara, Shiga, Japan;  $\beta$ -catenin (1:30,000), Bcl-2 (1:2,000), and p21 (1:1,000), which were purchased from EPITOMICS, CA, USA; cyclin D1 (1:1,000), which was purchased from Merck, Darmstadt, Germany; PARP (1:1,000) and cleaved caspase-8 (1:10,000), which were purchased from Cell Signaling Technology, Inc Danvers, MA, USA; Bax (1:1,000), which was purchased from Santa Cruz,

CA, USA; p53 (1:2,000), which was purchased from Abcam, Cambridge, UK; and actin (1:30,000) (Sigma), followed by treatment with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (IBL, Gunma, Japan). Can Get Signal Immunoreaction Enhancer Solution 1 (TOYOBO) was used to dilute the primary antibody. The ECL, ECL-plus, or ECL-advance Western Blotting Detection System (Amersham, Uppsala, Sweden) was used for detection. The intensity of the bands was quantified by using the National Institute of Health Image computer program. The signal intensities were compensated by actin as internal controls.

#### Immunofluorescent staining

MCF-7 and T47 D cells were seeded on a 4-chamber slide glass and incubated overnight. The cells were then washed with phosphate-buffered saline (PBS) and fixed with ice-chilled methanol for 30 min, before being permeabilized with 0.2% Triton-X-100 in PBS for 30 min. The permeabilized cells were then washed in PBS twice and treated with 5% normal horse serum in PBS for 30 min (to minimize the non-specific adsorption of antibodies), before being incubated with anti-claudin-1 (1:200), anti- $\beta$ -catenin (1:300), or anti-E-cadherin (1:300) antibodies at 4°C overnight. The cells were then incubated for 1 h with goat anti-rabbit IgG antibody conjugated to Alexa 488 dye (Molecular Probes, Inc, Tokyo, Japan), while nuclear staining was performed using 4', 6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) or Hoechst 33258. Hoechst 33258 staining was used to examine nuclear condensation. The cells were visualized using confocal laser scanning microscopy (Zeiss, LSM 710, Wetzlar, Germany), and the number of cells that were intensely stained with Hoechst 33258 was counted.

## Results

### Tamoxifen treatment induces apoptosis and upregulates the expression of claudin-1 in MCF-7 cells

We investigated the endogenous expression of claudin-1 in two breast cancer cell lines by Western blotting. The endogenous protein expression of claudin-1 was weak in MCF-7 cells, whereas it was abundantly expressed in T47 D cells (Figure 1A and 1B). In addition, E-cadherin was abundantly expressed in both MCF-7 and T47 D cells. Next, we examined the relationship between tamoxifen and claudin-1. We examined how the protein expression of claudin-1 was affected by tamoxifen treatment. MCF-7 and T47 D cells were treated with various concentrations of tamoxifen for 20 h. Cell lysates were prepared from cells and subjected to Western blot analysis. The protein expression of claudin-1 was slightly increased by treatment with 20  $\mu$ M tamoxifen in MCF-7 cells, and the cells treated with 30 or 40  $\mu$ M of tamoxifen treatment showed clear increases in their claudin-1

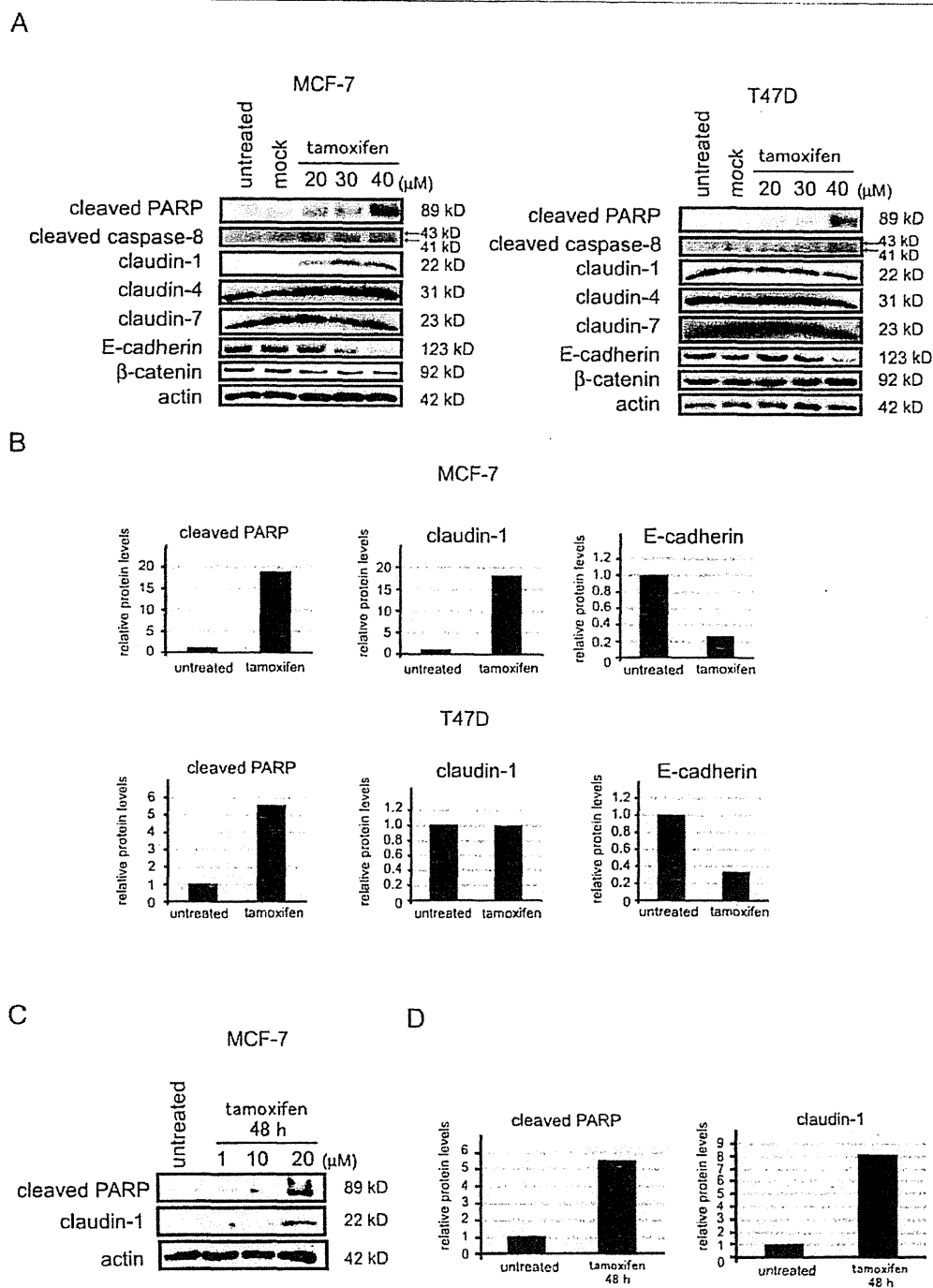
protein levels. Twenty, 30, or 40  $\mu$ M of tamoxifen treatment also increased the amounts of cleaved PARP and caspase-8 in the MCF-7 cells, but decreased their expression of  $\beta$ -catenin. The protein expression of E-cadherin was decreased in MCF-7 cells after treatment with 30 or 40  $\mu$ M of tamoxifen. We also examined whether the longer exposure to tamoxifen affects the expression of claudin-1 in MCF-7 cells. The expression of claudin-1 and the amount of cleaved PARP were significantly increased in the cells treated with 20  $\mu$ M of tamoxifen for 48 h (Figure 1C and 1D). In T47 D cells, the amounts of cleaved PARP and caspase-8 were increased, whereas the expression of E-cadherin was decreased after 40  $\mu$ M of tamoxifen treatment. However, the protein expression levels of claudin-1, claudin-4, claudin-7, and  $\beta$ -catenin in T47 D cells were almost unaffected by tamoxifen treatment. We also examined whether the expression of claudin-1 mRNA was affected by tamoxifen treatment. MCF-7 and T47 D cells were treated with various concentrations of tamoxifen for 20 h, and RNA samples were prepared from the cells and subjected to RT-PCR and real-time PCR analyses for claudin-1, claudin-4, E-cadherin, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), and 18 S rRNA (Figure 2A and 2B). The mRNA levels of claudin-1 were significantly increased in MCF-7 cells after treatment with 30 or 40  $\mu$ M of tamoxifen, whereas tamoxifen treatment did not affect the expression of claudin-1 in T47 D cells. The mRNA expression of E-cadherin was decreased in both MCF-7 and T47 D cells after treatment with 40  $\mu$ M of tamoxifen. On the other hand, tamoxifen treatment did not affect the expression of claudin-4 in MCF-7 or T47 D cells.

Nuclear condensation is one of the features of apoptosis. Using immunofluorescent staining, we examined whether tamoxifen treatment induces nuclear condensation. MCF-7 and T47 D cells were treated with tamoxifen, fixed, and then stained with Hoechst 33258. Nuclear condensation was increased about 9 or 5-fold in MCF-7 or T47 D cells, respectively, treated with 40  $\mu$ M of tamoxifen compared with that in the untreated-control cells (Figure 3A and 3B).

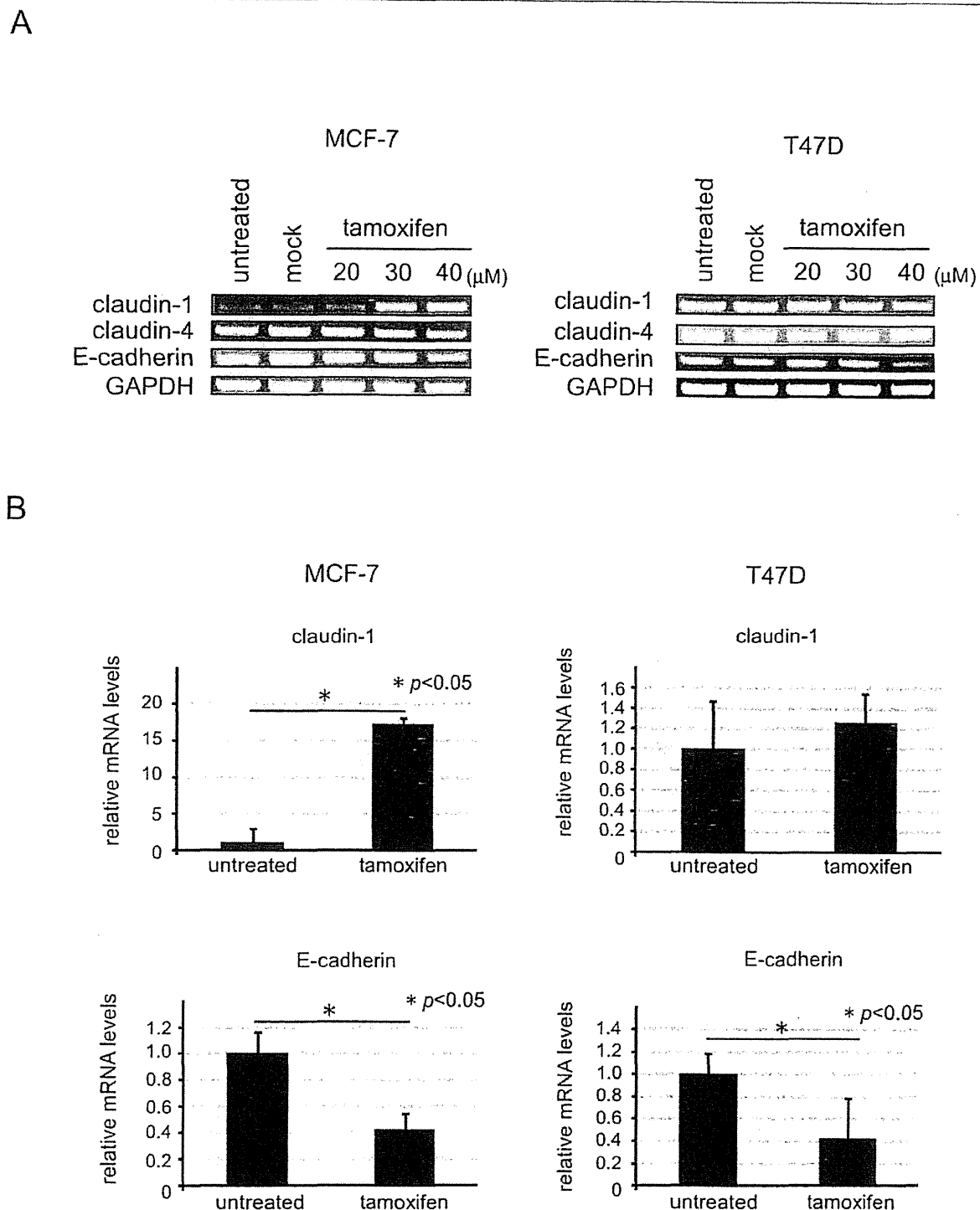
### Claudin-1 has anti-apoptotic effects under tamoxifen treatment in MCF-7 cells

To understand the mechanism of the upregulation of claudin-1 expression by tamoxifen treatment, we examined whether the transfection of claudin-1 siRNA affected the expression of factors related to apoptosis. MCF-7 cells were transfected with control siRNA or siRNA against claudin-1. After 48 h of transfection, the cells were treated with 40  $\mu$ M of tamoxifen for 20 h. The cell lysates were then subjected to Western blot analyses for claudin-1, cleaved PARP, cleaved caspase-8,

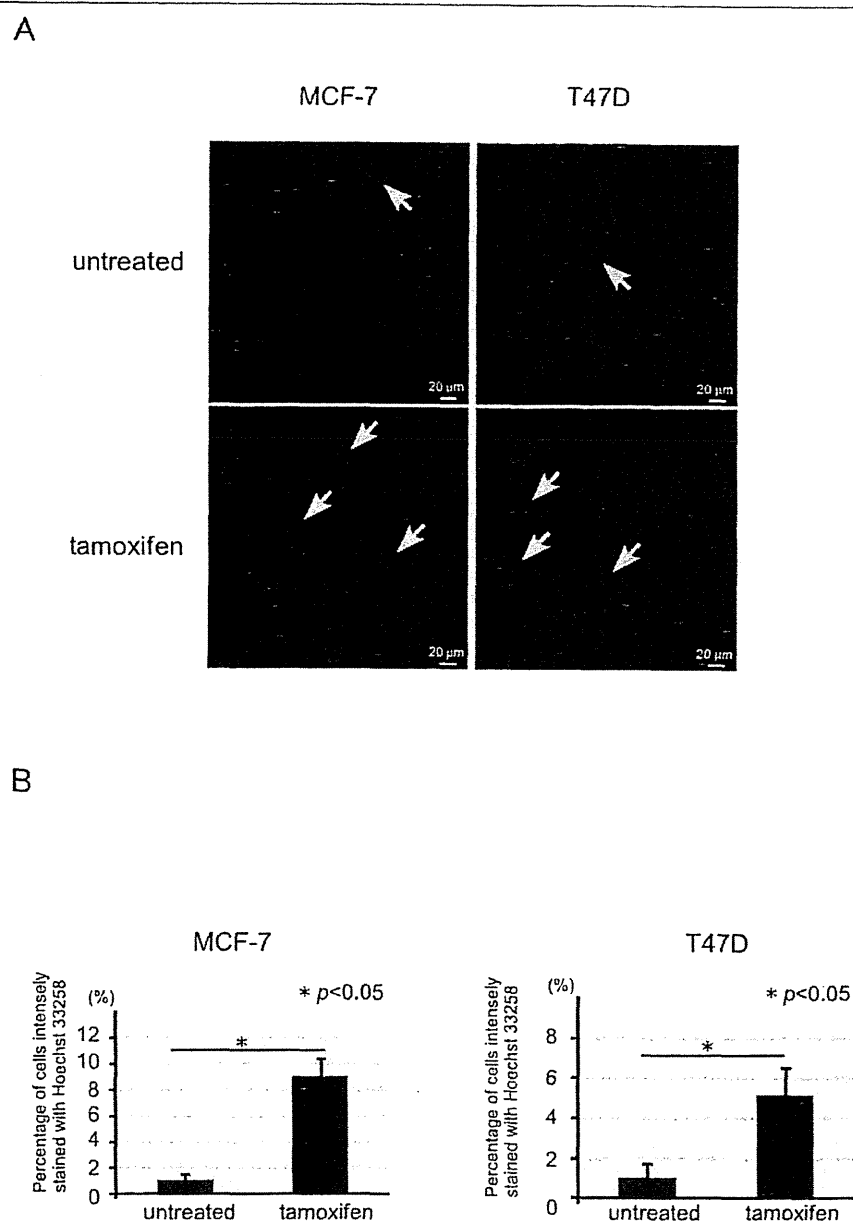




**Figure 1** The protein levels of claudin-1 were increased in MCF-7 cells treated with tamoxifen. (A) MCF-7 and T47 D cells were treated with the control treatment (buffer alone: Mock) for 20 h or 20, 30, or 40 μM of tamoxifen for 20 h, cell lysates were prepared and subjected to Western blot analyses for cleaved PARP, claudin-1, claudin-4, claudin-7, E-cadherin, cleaved caspase-8, and actin. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (B) The intensity of the bands for cleaved PARP, claudin-1 and E-cadherin in untreated and tamoxifen (40 μM) - treated cells were quantified. (C) MCF-7 cells were treated with or without 1, 10 or 20 μM of tamoxifen for 48 h, cell lysates were prepared and subjected to Western blot analyses for cleaved PARP, claudin-1 and actin. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (D) The intensity of the bands for cleaved PARP and claudin-1 in untreated and tamoxifen (40 μM) - treated cells were quantified.



**Figure 2 The mRNA levels of claudin-1 were increased in MCF-7 cells treated with tamoxifen.** (A) After the MCF-7 and T47 D cells had been treated with various concentrations of tamoxifen for 20 h and subjected to RT-PCR analyses. One representative of at least three independent experiments with similar results is shown. (B) MCF-7 and T47 D cells were treated with or without 40 μM of tamoxifen for 20 h, and subjected to real-time PCR analyses for claudin-1 and E-cadherin. Each value represents the mean + SE (bars) of three independent experiments \**p* < 0.05, according to the *t*-test.



**Figure 3 Nuclear condensation was detected by tamoxifen treatment both in MCF-7 and T47 D cells. (A)** MCF-7 and T47 D cells were seeded in a 4-chamber slide glass and incubated overnight. The cells were treated with or without 40  $\mu$ M of tamoxifen for 20 h, fixed, and stained with Hoechst 33258. The arrows show nuclear condensation. **(B)** Percentage of cells intensely fragmented and condensed in nuclei with Hoechst 33258 were counted as positive cells. About 100 total cells were counted in individual ten random microscopic fields at  $\times 40$  magnification. Each value represents the mean + SE (bars) of two independent experiments \* $p < 0.05$ , according to the t-test.

E-cadherin,  $\beta$ -catenin, Bax, Bcl-2, cyclinD1, p53, p21, and actin (Figure 4A and 4B). Claudin-1 knockdown by siRNA significantly reduced the expression of claudin-1 with or without tamoxifen treatment, and the transfection of claudin-1 siRNA increased the amounts of cleaved PARP and caspase-8 with or without tamoxifen

treatment. The expression of E-cadherin was upregulated by claudin-1 knockdown without tamoxifen treatment, while the expression of E-cadherin in the presence of claudin-1 siRNA and tamoxifen treatment was slightly increased. On the other hand, the expression of cyclinD1 was downregulated by claudin-1

