

内 容 要 旨 目 次

主 論 文

Clinical Outcomes of Women with Ovarian Metastases of Colorectal Cancer Treated with Oophorectomy with respect to their Somatic Mutation Profiles

(卵巣摘出術を受けた大腸癌の卵巣転移巣を有する女性の体細胞変異プロファイルと臨床成績)

母里淑子、入谷光洋、安井和也、戸嶋俊明、河合 毅、谷口文崇、木村圭佑、稲田 涼、西崎正彦、原賀順子、中村圭一郎、榎田祐三、岸本浩行、藤原俊義、堅田洋佑、山口佳之、永坂岳司

Oncotarget (掲載予定)

平成 29 年 6 月 The 19th European Society for Medical Oncology World Congress on
Gastrointestinal Cancer 2017 に発表

主 論 文

Clinical Outcomes of Women with Ovarian Metastases of Colorectal Cancer Treated with Oophorectomy with respect to their Somatic Mutation Profiles

(卵巣摘出術を受けた大腸癌の卵巣転移巣を有する女性の体細胞変異プロファイルと臨床成績)

【緒言】

卵巣転移は卵巣悪性腫瘍のおよそ 5-30%をしめ、その原発は大腸癌からの転移が最も多く、次いで子宮内膜癌、胃癌、虫垂癌、乳癌である。転移性卵巣癌のおよそ 12.5-49%は大腸癌由来であるが、一方、進行大腸癌は卵巣以外への転移の方が多く、卵巣転移は比較的稀である。女性大腸癌の同時性卵巣転移は 9%、異時性卵巣転移は 7%と報告されている。

ここ10年の間、特にオキサリプラチンやイリノテカン、分子標的治療薬を含む効果的な全身化学療法の導入により進行大腸癌の治療は著しく発展してきた。これらの新規治療により奏効率や全生存率は改善している。しかしながら未だ大腸癌卵巣転移はその他の部位への大腸癌転移に比べて予後不良である。

卵巣転移が卵巣以外への転移に比べて予後不良なのが、卵巣転移固有の特性のためか化学療法耐性のためかは不明である。ある最近の報告では大腸癌卵巣外転移に比べて大腸癌卵巣転移は化学療法の奏効が悪かったことを報告している。また 5FU ベースの化学療法が卵巣外転移への奏効が 40%であったのに対し卵巣転移の奏効は 5%であったと報告している。22 人の大腸癌卵巣転移患者で奏効しなかったのに対し卵巣外転移の 65%に病勢コントロールが得られたという報告もあり、一貫した傾向を示している。Lee らは大腸癌卵巣転移の切除を施行してから化学療法を行った群は 28.1 ヶ月の生存期間であったのに対し、卵巣切除を行わなかった群の生存期間は 21.2 ヶ月であり、卵巣切除の方が予後良好であったと報告している。彼らの多変量解析では卵巣切除無施行が相対危険度 1.954 で独立した予後不良因子であった。即ち卵巣転移の切除は大腸癌患者の予後を改善すると考えられる。

近年、進行大腸癌治療は遺伝子変異プロファイルに基づいた個別化治療の方向へ向かっている。即ち原発巣と転移巣の遺伝子プロファイルが治療戦略決定において重要である。しかしながら我々の知る限り、大腸癌卵巣転移の *BRAF* 変異、*KRAS* 変異、マイクロサテライト不安定性 (MSI) のといった遺伝子プロファイルと臨床成績を評価した報告は認めない。

この研究では 666 例の大腸癌患者の卵巣転移の頻度を評価し、遺伝子変異プロファイルと治療戦略と予後の関係性を評価した。さらに我々は卵巣転移患者の臨床病理学的背景を評価し、卵巣切除の効果との関連について検討した。

【材料（対象）と方法】

研究対象

2007年1月から2015年9月までに岡山大学病院で手術を行った大腸癌666例を後方視的に解析した。そのうち296例が女性であり、うち20例で片側又は両側の卵巣切除が行われていた。我々の部署では画像検査で卵巣転移が疑われた症例は全て卵巣切除の適応としている。故に卵巣転移患者で手術を行わなかった症例が含まれていない。手術記録と病理記録、画像データの詳細を確認し、1人の卵巣切除患者は腹膜播種巣の直接浸潤であったので除外した。最終的に19例の大腸癌卵巣転移手術患者を解析し評価した（図1）。

全ての患者は片側または両側の開腹卵巣切除を行った。同時に原発巣や卵巣外の転移巣を切除した患者も含まれる。また主治医の判断や患者の希望によって術前または術後にmFOLFOX6、FOLFIRI、capecitabine、CPT-11、bevacizumab、cetuximab、panitumumabの投与を行った。

全生存期間（OS）は原発巣の初回治療（手術や化学療法）の開始日から死亡日または最終生存確認日までと定義した。卵巣切除特異的全生存期間（Ovarian-specific OS）は初回の卵巣切除術から死亡日または最終生存確認日までとした。卵巣切除特異的無増悪生存期間（Ovarian-specific PFS）は初回卵巣切除から2-3ヶ月毎に施行された定期的CTまたはMRIにより局所または遠隔転移再発・再燃または新規病変を認めた日までとした。

奏効の判定はResponse Evaluation Criteria in Solid Tumors (RECIST) guideline version 1.1に基づきCRは全ての標的病変の消失、PRは標的病変の径和がベースラインに比べて30%以上縮小した場合、PDは標的病変の最小径和に比べ20%以上の増大を認めた場合、SDはPRもPDも満たさない縮小または増悪とした。病理診断は少なくとも2人以上の病理医が判定した。全ての患者は岡山大学の倫理委員会によって認められた手術標本組織を研究に用いる事に対する説明同意文書により同意を得た。

BRAF exon 15とKRAS exon 2の遺伝子変異解析

原発腫瘍部と同一患者の卵巣転移部のパラフィン包埋組織または凍結組織からDNAを抽出し、*BRAF* exon 15のcodon 600と*KRAS* exon 2の遺伝子変異の解析をサンガーシーケンスで行った。*BRAF* exon 15と*KRAS* exon 2のPCRプライマーやPCR条件は以前に報告した方法を使用した。PCR産物はQIAquick PCR purification kit (Qiagen) で精製し、ABI PRISM 3100-Avanta Genetic Analyzer (Applied Biosystems) でダイレクトシーケンスを行った。*BRAF*変異と*KRAS*変異の解析結果は補足資料図1に例示した。

マイクロサテライト不安定性解析

全ての大腸癌原発組織と転移性卵巣腫瘍のMSIステータス解析は4つのモノヌクレオチドリピート座（BAT26、NR21、NR27、CAT25）で行った（既報告）。少なくとも1つのモノヌクレオチドリピートマーカを示したものはMSIと判定し、全てのマーカで不安定性を示さなかったものはnon-MSIとした。MSI解析の結果は補足資料図1に例示した。

統計解析

統計解析はJMPソフトver10.02 (SAS Institute, Inc) にて行った。カテゴリー変数の比較はX²乗検定を行った。Ovarian-specific OSとPFSはカプランマイヤー法にて単変量解析を行った。OSの単変量及び多変量解析にはCox比例ハザード解析を行った。比例ハザード解析には年齢、原発巣の部位、UICCステージ、組織型、卵巣転移の*BRAF*、*KRAS*、MSIステータスといった臨床病理学的因子を含めた。Ovarian-specific OSと初回卵巣切除時期（卵巣転移診断から切除術までの期間）の関連の解析、Ovarian-specific OSと化学療法中の卵巣外転移の腫瘍縮小率の解析にはスピアマンの順位相関係数を用いた。P値は両側検定で<0.05をもって有意とした。

【結果】

大腸癌女性における卵巣転移の臨床病理学的背景

296名の女性大腸癌患者の卵巣転移の頻度を評価した（図1）。女性大腸癌患者を、卵巣癌転移を有する大腸癌群（19例、6.4%）卵巣外転移のみを有する大腸癌群（96例、32.4%）、転移再発のない大腸癌群（181例、61.1%）の3群に分けた。卵巣転移を有する患者は卵巣外転移のみを有する患者よりも若く（ $P<0.0001$ ）初めて卵巣転移と診断される年齢の中央値は51歳（34-80歳）であった。19人中9人（47.4%）の患者は50歳未満で診断されていた。原発部位は19例中18例（94.7%）が結腸で、直腸原発は1例のみであった。

卵巣転移を有する大腸癌患者の遺伝子プロファイル

表1に示すように原発巣の*KRAS*変異の頻度は3群間で同等であり、卵巣癌転移を有する大腸癌19例中5例（26.3%）、卵巣外転移のみを有する大腸癌96例中35例（36.5%）、転移再発のない大腸癌181例中66例（36.5%）であった。原発巣の*BRAF* exon15変異では296例の女性大腸癌患者の内23例（7.8%）に*BRAF*変異を認め、いずれもV600E変異であった。*BRAF* V600E変異患者では有意差は無いが卵巣転移患者（19例中3例 15.8%）では卵巣外転移患者（96例中6例 6.3%）や転移再発のない症例（181例中14例 7.7%）に比べて頻度がより高い傾向があった。MSIは卵巣転移患者では1例も認めなかったのに対し、卵巣外転移（96例中6例 6.3%）や転移再発のない患者（181例中15例 8.3%）では同程度に認めた。

女性大腸癌患者の臨床成績

296例の女性大腸癌患者の観察期間中央値は30ヶ月（0-108ヶ月）であった。年齢、原発部位、組織型、MSIステータスと患者の予後は補足資料図2に示した。大腸癌女性のUICCステージI、II、III、IV毎の5年生存率はそれぞれ100%、79.3%、76.0%、17.6%であった。卵巣癌転移を有する大腸癌、卵巣外転移のみを有する大腸癌、転移再発のない大腸癌の5年生存率はそれぞれ24.7%、34.5%、91.3%であった（ $P<0.0001$ 、図2B）。*BRAF*変異大腸癌、*KRAS*変異大腸癌、*KRAS/BRAF*野生型大腸癌の3年全生存率はそれぞれ43.6%、86.5%、73.3%であった（ $P<0.0001$ 、図2C）。115人の同時性又は異時性転移を有する大腸癌患者（76例は初診時Stage IV、39例は根治切除後の再発）

の初回治療後の増悪又は再発までの中央値は *BRAF* 変異癌で 21 ヶ月 (95%信頼区間 1-22 ヶ月) *BRAF* 野生型癌で 36 ヶ月 (95%信頼区間 26-42 ヶ月) であった ($P=0.0014$ 、図 2D)。

表 2 に OS の単変量・多変量解析を示す。単変量解析、多変量解析では UICC ステージ、組織型、卵巣転移ステータス、*BRAF*, *KRAS* 変異が OS と有意な関連が認められた。

原発巣の遺伝子変異と卵巣転移遺伝子変異の一致率

補足資料表 1 に 19 人の卵巣転移女性 (片側卵巣切除 8 例と両側卵巣切除 11 例) についての遺伝子変異一致率を含む臨床病理学的背景を示す。19 例のうち 18 例で原発巣と卵巣腫瘍それぞれの遺伝子解析が可能であった。18 例全てで *BRAF* 変異と MSI ステータスは一致した。一方で *KRAS* 変異は 16.7% (18 例中 3 例) で原発と卵巣転移間で異なっていた。加えて原発巣では *KRAS* 変異型であった 2 例で卵巣転移では *KRAS* G12S と G12V を認めた。もう 1 例は原発巣では *KRAS* G12D を認めたが、卵巣転移巣では変異を認めなかった。

卵巣転移を有する大腸癌患者の術前化学療法感受性

19 例の卵巣と卵巣外転移を有する患者のうち 10 人で術前化学療法の奏効が評価可能であった。ほとんどの卵巣転移は術前化学療法に反応しなかったが、卵巣外転移には良好な奏効が得られた (図 3A、補足資料表 2)。術前化学療法を行った 10 人のうち 9 人には卵巣外に測定可能病変があり、その 9 人の内 5 人 (56%) が部分奏効 (PR) または完全奏効 (CR) を認めた。一方で卵巣転移は 9 人中 1 人 (11%) のみが SD で、9 人中 8 人 (89%) が PD であった。

大腸癌卵巣転移患者の手術時期と予後

卵巣転移を伴う大腸癌患者の Ovarian-specific OS 中央値は 25 ヶ月 (95%信頼区間 15-40 ヶ月) (補足資料図 2A) であり、Ovarian-specific PFS 中央値は 5 ヶ月 (95%信頼区間 3-12 ヶ月) であった (補足資料図 2B)。

BRAF V600E 変異女性大腸癌は *BRAF* 野生型 (*KRAS* 変異型と *KRAS/BRAF* 野生型を含む) に比べて予後不良であった (図 2C と 2D)。その為、115 人の異時性または同時性の卵巣を含む女性の転移性大腸癌の臨床的背景を *BRAF* 変異ステータス毎に検討した。96 例の卵巣外転移のみの患者の初回治療から転移・増悪までの期間中央値は、*BRAF* 変異群では 13 ヶ月 (95%信頼区間 1-22 ヶ月)、*BRAF* 野生型群では 34 ヶ月 (95%信頼区間 22-58 ヶ月) であった ($P=0.0033$ 、図 4A)。

19 例の卵巣転移のうち、15 例は初診時 Stage IV、4 例は原発巣根治切除後の再発であった。その 4 例の異時性卵巣転移例のうち、2 例は原発巣が *BRAF* V600E 変異、1 例は原発巣が *KRAS* 変異、1 例は原発巣が *KRAS/BRAF* 野生型で卵巣転移は *KRAS* 野生型であった。4 例の異時性卵巣転移に対する初回治療からの全生存は、2 例の *BRAF* 変異癌ではそれぞれ 22 ヶ月と 24 ヶ月であったのに対し、1 例の *KRAS* 変異の患者では 50 ヶ月、1 例の *KRAS/BRAF* 野生型の患者では 50 ヶ月であった。(卵巣転移が *KRAS* 変異であった 2 例ではいずれも 50 ヶ月であった)。卵巣転移患者の初回大腸癌治療から転移・増悪までの期間の中央値は、*BRAF* 変異では 22 ヶ月 (95%信頼区間 21-25 ヶ月)、*BRAF* 野生型では 38 ヶ月 (95%信頼区間 24-42 ヶ月) であった ($P=0.0398$ 、図 4B)。Ovarian-specific

OS 中央値は *BRAF* 変異型では 13 ヶ月 (95%信頼区間 7-16 ヶ月)、*BRAF* 野生型では 27 ヶ月 (95%信頼区間 16-41 ヶ月) であった ($P=0.0091$ 、図 4C)。

予想されたとおり、初回卵巣切除時の根治度は予後に影響した。根治度 R0/R1 症例の Ovarian-specific OS 中央値は 43 ヶ月 (95%信頼区間 16 ヶ月-算定不能) であったが、根治度 R2 では 16 ヶ月 (95%信頼区間 12-38 ヶ月) であった ($P=0.0058$ 、補足資料図 3C)。一方で卵巣転移の診断から初回卵巣切除までの期間と Ovarian-specific OS には関連は認めなかった ($\rho = -0.073$ 、図 4D)。卵巣外転移の化学療法による縮小率と Ovarian-specific OS には弱い正の相関を示したが、有意差はなかった ($\rho = 0.477$ 、図 4E)。

さらに、卵巣切除標本の病理所見からは卵巣では潜伏癌の可能性にも注意を要することが示された。11 例の両側卵巣切除例のうち 9 例では術前診断や術中診断では片側転移との診断かもしくは転移無し、と診断されていたものであった。しかしながらその 9 例中 5 例 (56%) には病理診断で両側転移を認めている。

【考察】

転移性卵巣腫瘍は増大に伴い、腹痛や腹部膨満感、便秘、頻尿や食欲不振といった著しい臨床症状を来す。全身化学療法はたとえ近年の分子標的治療薬であってもこれらの症状を改善しない。この後方視的検討では大腸癌卵巣転移の頻度、予後、治療戦略をその体細胞変異プロファイルによって検討した。

以前の報告では大腸癌の卵巣転移患者は比較的若く、80%以上が結腸由来であった。我々の研究でも同様に 19 例中 18 例 (95%) は結腸由来であった。この傾向は、卵巣転移は血行性やリンパ行性転移よりも播種性に発生するという理論に矛盾しない結果である。しかしながら諸家の報告と異なり、我々のコホートでは T 因子と卵巣転移の頻度に相関は認めなかった。

原発巣と卵巣転移において *BRAF* 変異と MSI は 100% (18 例中 18 例) 一致していたが、*KRAS* 変異の一致率は 83.3% (18 例中 15 例) であった。Baas らは原発巣と転移巣の *KRAS* 変異の一致について 21 の研究をまとめ、93% (75-100%) と報告している。我々のケースのうち原発巣は *KRAS* 野生型で、卵巣転移巣では *KRAS* G12S と G12V 変異であった 2 例はいずれも抗 EGFR 薬は使用していなかった。この結果から、新しい獲得変異は抗 EGFR 薬の使用が原因ではないと示唆された。

我々の検討では化学療法の奏効率は卵巣外転移に比べて卵巣転移で不良であった (0% vs 50%)。同様に、Goere らは 20 人の患者を評価し、殺細胞剤による化学療法の奏効率は卵巣外転移に比べて卵巣転移で不良であった (0% vs 35%)。Lee らは 33 例の卵巣切除術を施行していない症例において化学療法の奏効率は卵巣転移で 18.2%、卵巣外転移で 33.3%であった。大腸癌卵巣転移は化学療法の反応が悪いことに比べ、手術療法は術後生存延長に寄与し、術後生存期間中央値は R0/R1 切除で 43 ヶ月、緩和的 R2 切除で 16 ヶ月であった。たとえ姑息的切除であっても、卵巣転移による悲惨な腹部症状や食欲不振を回避できる期間を延長できるということは注目すべき点である。我々は卵巣転移は全例切除としているため、卵巣切除を行わなかった症例の検討が出来なかったが、Lee らは 130 例の大腸癌卵巣転移を評価し、卵巣切除を行った 83 例の術後生存期間中央値は

20.8ヶ月であったのに対し、非切除群47例では10.9ヶ月であったと報告している。従って、我々の検討や他の報告から、卵巣転移に対する卵巣切除術は一般的ではなかったが、大腸癌卵巣転移患者において卵巣切除は妥当な治療選択肢である。卵巣転移は転移よりも播種再発の性格が強く、卵巣切除術は局所コントロールに重要な役割を果たす。限局性の大腸癌腹膜播種の患者には手術もいくらかの利があるであろうが、逆に腹膜播種に対する化学療法の効果には限界がある。*BRAF* V600E 変異の進行再発大腸癌は予後不良であるという近年の報告を元に、我々の女性大腸癌コホートの遺伝子変異背景と予後の関連を解析した。予想どおり *BRAF*V600E 変異の女性大腸癌は最も予後不良であった。この傾向は卵巣以外の転移の患者と同様に、卵巣転移患者においても、初回治療後の全生存や卵巣切除後の全生存は *BRAF* V600E 変異で不良であった。さらに、4例の原発巣根治切除後に卵巣転移を来した症例のうち、2例は原発巣が *BRAF*V600E 変異のものであった。*BRAF* 変異癌のOSは1次化学療法のランダム化第三相試験によると9から15ヶ月である。我々の検討では卵巣外転移の *BRAF*変異癌のOSは13ヶ月であったのに対し、*BRAF*変異の卵巣転移癌では22ヶ月であった。

我々の研究や他の報告が示すように、大腸癌卵巣転移は化学療法耐性である。卵巣転移患者では比較的 *BRAF* 変異の割合が高いが、卵巣転移か卵巣外転移かに依らず、*BRAF* 変異癌の予後は不良であった。従って、たとえ卵巣外転移には化学療法の効果があっても卵巣転移には効果がほとんど無い理由は、*BRAF*/*KRAS* 変異やMSIステータスでは説明できない。本研究の19例のうち、*BRAF* 変異癌は3例で認め、それぞれの卵巣転移から卵巣切除までの期間は0、5.5、12.0ヶ月であり、卵巣切除後の生存期間は *BRAF* 野生型癌に比べて短かった (図4D)。生存期間は違ったが、2例の *BRAF* 変異癌の卵巣外転移に対する化学療法の奏効割合は19%と50%であり、平均的であった。しかし卵巣切除後の予後が *BRAF* 野生癌に比べて短かった (図4E)。このことから *BRAF* 変異癌大腸癌も化学療法によって縮小はするが、その後のPFSが短いのであろうと推測される。

本研究には以下の制限がある。後方視的検討であること、卵巣非切除の卵巣転移症例がないこと、単施設の検討であることである。しかしながら、この研究により大腸癌卵巣転移について、いくつかの重要な発見があった。第一に、大腸癌の卵巣転移はおよそ7%であり、これまでの報告と一致したこと。第二に、大腸癌女性の *BRAF*変異癌は卵巣転移の有無に依らず、予後不良で有り、卵巣転移では他の女性大腸癌に比べて *BRAF*変異癌の割合が多かったこと。第三に、全身化学療法はたとえ、卵巣外転移に有効であっても卵巣転移には無効であること。従って、その遺伝子変異プロファイルに依らず、卵巣が移転医の病勢コントロールが良い時に卵巣転移切除を行うことが、卵巣転移を伴う大腸癌患者の予後に寄与するであろう。

【結論】

大腸癌卵巣転移に対する卵巣切除術は遺伝子変異プロファイルに関わらず有効である可能性がある。