

切除不能進行再発大腸癌における
セツキシマブ療法に対する治療効果
予測因子としてのFc γ RとEGFRの
遺伝子多型の有用性についての検討

氏名 井上 由佳

所属 山口大学大学院医学系研究科
応用分子生命科学系専攻
消化器・腫瘍外科学分野

平成 26 年 12 月

目次

1. 要旨	1
2. 背景	2
3. 目的	3
4. 患者と方法	3
5. 結果	6
6. 考察と結語	7
7. 謝辞	9
8. 参考文献	10
9. 図	13
10. 表	14

1. 要旨

セツキシマブは KRAS 野生型の切除不能進行大腸癌に対する治療薬である。セツキシマブの細胞傷害の機序として、Epidermal growth factor receptor (EGFR) シグナル伝達経路の阻害を介する直接的効果に加え、IgG1 抗体であるセツキシマブには抗体依存性細胞傷害活性 (ADCC) を介する抗腫瘍メカニズムが関与しているとの報告がなされている。我々は、切除不能進行大腸癌に対する 2 次治療としてのセツキシマブと FOLFIRI 併用療法に関する臨床試験 (FLIER 試験) における治療効果と、Fc gamma receptors (FcGR) と EGFR の遺伝子多型との関連について検討を行った。

FLIER 試験登録症例のうち KRAS (コドン 12, 13) および BRAF 野生型の 57 症例を対象とした。宿主遺伝子多型として、FcGR II a (H131R)、FcGR III a (V158F)、EGFR (R521K)、EGFR intron1 CA リピートを解析し、奏効率、progression-free survival (PFS)、overall survival (OS) との関連をそれぞれ検討した。

EGFR CA リピート ≥ 36 が ≤ 35 よりも OS を延長する傾向を認めた (600 vs. 483 days; $P=0.051$)。また、FcGR のハプロタイプ解析では 131H-158V のアレルがそれ以外と比べて奏効率が有意に低く ($P=0.018$; Fisher's exact test)、ディプロタイプ解析においても HV のアレルをもつ症例で奏効率が有意に低かった ($P=0.038$; Trend test)。FcGR II a、FcGR III a、EGFR (R521K)、EGFR イントロン 1 CA リピートと奏効率、PFS に相関は認めなかった。

今回の検討では、FcGR と EGFR CA リピートが切除不能進行大腸癌に対する 2 次治療としてのセツキシマブと FOLFIRI 併用療法の治療効果予測因子に成りうる可能性が示唆された。しかしながら、これらの結果はこれまでに報告されている結果とは異なるものであり、これを確証するためには更なる検討が必要と考える。

2. 背景

大腸癌は全世界において罹患率と死亡率が高い。2012年には男性では罹患率は第2位(9%)、女性では第3位(8%)であった[1]。日本では、およそ92000人が新たに大腸癌と診断されている[2]。EGFR(上皮成長因子受容体)を標的とするIgG1キメラ型ヒト/マウスモノクローナル抗体であるセツキシマブは切除不能進行大腸癌に高い効果を示す[3, 4]。KRAS変異ではセツキシマブの効果がないことが報告されて以来[5, 6]、更なるバイオマーカーの探索が試みられている。

免疫学的機序もセツキシマブの作用機序において重要な機序の一つである可能性が報告されている。マクロファージやナチュラルキラー(NK)細胞などのような免疫細胞によるFc γ 受容体を介した抗体依存性細胞傷害(ADCC)活性がIgG1抗体の抗腫瘍効果に重要な役割を果たしているとの報告がある[7]。マクロファージに主に発現しているFcGR II aや、主にNK細胞やマクロファージに発現しているFcGR III aのようなIgGのFc受容体の活性化に関与する遺伝子多型はヒトにおけるIgGの結合性に関与している。これらの遺伝子多型はFcGR II aの131番に存在するヒスチジン(H)/アルギニン(R)、FcGR III aの158番に存在するバリン(V)/フェニルアラニン(F)からなる[8]。結合力の違いにより、FcGR II a-131H/HとFcGR III a-158V/Vの遺伝子型の患者において、モノクローナル療法に対して、より強力なADCCの抗腫瘍効果をもたらすことが予測される[9-11]。濾胞性リンパ腫に対する一次治療としてのリツキシマブ療法、および転移性乳癌に対するトラスツズマブ併用療法の臨床試験において、FcGR II a-131H/H[12, 13]とFcGR III a-158V/V[12-14]のジェノタイプで治療効果が高いことが明らかになっている。In vitroの研究においてもセツキシマブにADCCの誘導能があることが明らかになっている[15, 16]。しかしながら、転移性大腸癌に対するセツキ

シマブ療法における臨床効果では異なった結果が報告されている[17-19]。

さらに、EGFR 遺伝子の転写に関与する intron-1 の CA リピート数が抗 EGFR 抗体薬の効果に影響している。いくつかの研究で、EGFR 遺伝子の intron-1 の遺伝子多型が EGFR 阻害剤の効果と関連があることが報告されている。頭頸部腫瘍では EGFR intron-1 CA リピート数の短い症例で EGFR の発現が増強され、抗 EGFR 抗体薬の抗腫瘍効果が高く [20]、転移性大腸癌においてはリピート数が短い症例でセツキシマブとイリノテカンの治療に高い治療効果が得られたとの報告がある [21]。

また、EGFR の多型は EGFR 細胞外ドメインであるコドン 521 のアルギニン (R) がリジン (K) に置換することで生じる [22]。521R アレル野生型と比べて、521K アレル変異型がリガンドとの結合性が高く、これがセツキシマブの効果と関与する可能性があるとの報告がある [22-24]。

3. 目的

今回の研究の目的は、切除不能進行大腸癌に対し、セツキシマブと 5-Fu/イリノテカン (FOLFIRI) 併用療法を行った 57 症例について、その治療効果と FcGR IIa と FCGR IIIa および、EGFR の遺伝子多型、EGFR 遺伝子 intron-1 CA リピート数との関連について評価を行うことである。

4. 患者と方法

4-1 適格症例

我々は、EGFR 陽性および KRAS コドン 12/13 野生型の切除不能進行再発大腸癌に対する 2 次治療としてのセツキシマブと FOLFIRI 併用療法の試験を計画した。この試験は多施設共同 Phase II 試験で FLIER 試験 (UMIN000002094) と名付けた。詳細な選択基準は下記に示した通りである。病理組織学的に大腸癌であることが確認された症例で、固形がんの治療効果判定のためのガイドライン (RECIST

ガイドライン) に基づいて、少なくとも一つの測定可能病変を有する切除不能進行大腸癌を対象とした。ECOG の PS で 0 か 1 の症例で主要臓器の機能が十分に保持された患者であること。また、全患者が 20 歳以上であり、本併用療法投与開始から少なくとも 3 ヶ月以上の生存が見込まれる症例であること。本試験の初回治療の少なくとも 28 日以内に、オキザリプラチンを含んだ抗癌剤治療の治療歴があること。この試験に本登録するために、原発巣あるいは転移巣の組織から EGFR の発現を免疫染色で確認し、更に KRAS コドン 12 と 13 が野生型であることを確認した。試験に仮登録された患者はすでに切除術を受け、腫瘍サンプルが保存されていた[25]。BRAF 変異症例は極めて予後不良であることから、我々の検討では BRAF 変異症例は除外した。試験のプロトコールはヘルシンキ宣言に基づいており、山口大学の倫理委員会で承認されたものである。全患者に対し、試験に参加する前に説明・同意文書を用いて十分に説明を行い、同意を取得した。セツキシマブを標準的な投与量である $400\text{mg}/\text{m}^2$ を 2 時間かけて点滴静注し、その後は 1 週間ごとに $250\text{mg}/\text{m}^2$ を 1 時間で、日本で FOLFIRI と呼ばれる標準的なレジメンとの併用投与を行った。FOLFIRI とは、イリノテカン $150\text{mg}/\text{m}^2$ とロイコボリン $200\text{mg}/\text{m}^2$ を 90 分かけて点滴静注し、初日に 5-Fu $400\text{mg}/\text{m}^2$ を急速静注で投与を行う。さらに 5-Fu $2400\text{mg}/\text{m}^2$ を 2 週間ごとに 46 時間持続点滴を行うレジメである。

4-2. 臨床的有効性評価

全患者が測定可能病変を有し、治療効果は 2 ヶ月ごとに CT を用いて、RECIST ver1.0 による分類、完全奏効 (CR)、部分奏効 (PR)、安定 (SD)、進行 (PD) で評価を行った。

4-3. 免疫染色による EGFR の発現の評価

10%中性緩衝ホルマリンで固定し、パラフィン包埋した組織を $4\mu\text{m}$ の厚さに

薄切した。切片の免疫染色は、EGFR pharmDx™ kit (Dako 社, Glostrup, Denmark) を用いて行った。EGFR 発現は、腫瘍細胞の細胞膜が免疫染色により茶色に染色されたものを発現ありと評価した。細胞膜の染色が腫瘍全体に均一に発現しているものや腫瘍の一部のみに不均一に発現しているものも、背景よりも染色されている場合には発現していると判断した。原発巣では、腫瘍細胞の1%が染色されていれば発現ありと判断した。

4-4. KRAS および BRAF 変異と、EGFR CA intron1 リピート数の評価

DNA の抽出には QIAamp DNA FFPE Tissue kit (QIAGEN, Tokyo, Japan) を用いた。KRAS コドン 12・13 および BRAF コドン 600 の変異は以前報告した通り、ダイレクトシーケンス法を用いて評価した[26, 27]。

4-5. FcGR II a、FcGR III a と EGFR の遺伝子型の評価

抗凝固剤として EDTA-2Na 入りの採血管に末梢血を採取し、ゲノム DNA は簡易的な NaI 法[28]にて抽出を行った。FcGR II a-H131R rs180127 と FcGR III a-V158F rs396991 と、EGFR-R521K rs2227983 の遺伝子多型は TaqMan 法を用いて解析した。測定機器には ABI Prism 7900HT (Applied Biosystems) を用い、下記条件で解析を行った。TaqMan SNP Genotyping Assay はそれぞれ C 9077561 10、C 25815666 10 と C 16170352 20 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) を用いた。384 ウェルを使用し、TaqMan Genotyping Master Mix (Applied Biosystems) と蒸留水で希釈した genomic DNA を 20-40ng 含め、全量 5 μ l で解析を行った。PCR は 50°C で 2 分、95°C で 10 分間インキュベートしたあと、40 回 (95°C-15 秒と 60°C-1 分間) PCR 増幅後、アレルの識別解析を行った。

4-6. 統計学的解析

遺伝子多型と奏効率との関係は Fisher の正確検定と trend test を用い、P 値を算出した。OS は登録日からあらゆる原因での死亡までの期間と定義した。PFS

は登録日からあらゆる原因における死亡あるいは増悪を認めた日までの期間と定義し、これも解析を行った。患者背景と OS は Cox 比例ハザードモデルを用いて HR と 95%信頼区間 (95%CI) を算出した。各々の遺伝子多型と OS や PFS は Kaplan-Meier 曲線と log-rank test にて解析を行った。いずれの解析も SPSS for windows (version 20; SPSS, Chicago, IL, USA) を用いて行った。P 値は両側検定で < 0.05 を統計的有意とみなした。

5. 結果

2008 年 12 月から 2009 年 12 月の期間中に、112 人の患者が仮登録された。このうち KRAS コドン 12 変異を 37 人に、コドン 13 変異を 8 人に認めいずれも除外した。EGFR 陽性で KRAS exon2 野生型の 67 症例のうち、60 症例の適格症例が最終的に FLIER 試験に登録された。BRAF CD600 変異型の 3 症例を除いた 57 症例について最終的に分析を行った。Figure. 1 に患者選択のフローチャートを示す。また、57 症例の患者背景について Table. 1 に示す。

5-1. 患者背景と OS

Table. 2 に患者背景と OS との関係を示した。多変量解析では、EGFR CA リピート数が OS の独立した予後予測因子であった (HR=1.97, 95% CI 1.02-3.78, P=0.04)。

5-2. 遺伝子多型と抗腫瘍効果

それぞれの遺伝子多型と腫瘍縮小効果との関連については Table 3 に示す。FcGR II a、FcGR III a と EGFR (R521K) の遺伝子多型と EGFR CA repeat 数と奏効率と関連は認めなかった (P=0.487, P=0.410, P=0.934, P=0.220; Fisher's exact test)。

5-3. 遺伝子多型と PFS と OS

それぞれの遺伝子多型と PFS や OS との関連については Table 4 に示す。EGFR CA

repeat 数が 36 以上の症例で 35 以下と比べ OS が延長する傾向を認めた (600 vs 483 日 ; $P=0.051$, Log-Rank Test)。FcGR II a、FcGR III a と EGFR (R521K) の遺伝子多型、EGFR CA repeat 数と PFS に関連は認めなかった。

5-4. FcGR のハプロタイプおよびディプロタイプと治療効果

FcGR のハプロタイプと効果との関連は Table5 に示す。131H と 158V を含むハプロタイプがそれ以外と比べ、有意に奏効率が低かった ($P=0.018$; Fisher' s exact test)。FcGR のハプロタイプと PFS や OS には関連は認めなかった (データは掲載せず)。FcGR のディプロタイプと効果との関連については Table6 に示す。131H と 158V のアレルを含むディプロタイプにおいて、それ以外と比べて有意に奏効率が低かった ($P=0.038$; Trend test)。FcGR のディプロタイプと PFS や OS とに関連は認めなかった (データは掲載せず)。

6. 考察と結語

今回の検討において 2 つの重要な発見があった。まず第一に、FcGR II a-131H と FcGR III a-158V のアレルを含むハプロタイプが、その他と比べて有意に奏効率が低かったこと (Table5, $P=0.018$; Fisher' s exact test)、さらに、FcGR II a-131H と FcGR III a-158V のアレルを持つディプロタイプがその他と比べて有意に奏効率が低かった (Table6, $P=0.038$; Trend test) ことが挙げられる。いくつかの研究において、FcGR 遺伝子多型と臨床効果との関連を明らかにしようと試みられているが、これらの結果は一貫していない。切除不能進行大腸癌に対するセツキシマブ療法において、FcGR III a-158F/F の患者において治療効果が高く、PFS も有意に延長したとの報告があり [18, 19]、これらの結果は我々の結果を支持するものである。しかしながら一方では、in vitro で FcGR III a-158V/V が IgG1 との結合親和性が高いことが報告されている [10]。さらに、この多型においてハーセプチンやリツキシマブに高い反応性を示すことが報告されている [13,

14]。切除不能進行大腸癌に対するセツキシマブ療法の別の試験では、FcGR III a-158V/Vにおいて良好な成績が得られたことが報告されている[17]。また、FcGR II a と FcGR III a の遺伝子多型を組み合わせた解析を行った試験もある。ある試験では FcGR II a-131H と FcGR III a-158F をいずれも、あるいはいずれかを持つ症例において、有意に高い腫瘍効果と PFS の延長が認められたと報告している[18]。一方で、FcGR II a-131H と FcGR III a-158V をいずれも、あるいはいずれかを持つ症例において抗腫瘍効果が得られたとする報告や[29]、PFS を延長したとの報告もある[17]。これらの矛盾は以下のように考察した。特に進行した癌患者においては、NK 細胞の機能不全によって ADCC が損なわれているとの報告がある[30]。さらに、腫瘍の微小環境においてはレギュラトリーT 細胞 (Treg) や骨髄由来抑制細胞 (MDSC) [31] などの免疫抑制細胞が増殖することにより、セツキシマブによる ADCC が損なわれている可能性がある。これらの理由から、in vitro では ADCC が誘導されているのは明らかな事実であるが、実際の癌患者においては同様の効果が得られない可能性があると考えられた。このため、今回の結果では FcGR の遺伝子多型が治療効果予測因子となる可能性が示唆されたが、更なる検討を要すると考えられた。

第二に、我々の研究では EGFR intron-1 CA リピート数が 36 以上の症例で 35 以下の症例と比べて、OS を延長する傾向を認めた (600 vs 487 日, $P=0.051$; log-rank test, Table3)。EGFR の CA リピート数は遺伝子転写効果に関与し、in vitro では CA repeat 数が増えると転写効率が落ちるとされている[32]。さらに、EGFR 抗体に対する反応性にも関与しているとされる。頭頸部癌の細胞株においては in vitro において、EGFR intron-1 CA repeat 数が少ない方が EGFR の発現が増加し、抗 EGFR 抗体薬に対する感受性も高かったとの報告がある[20]。また、切除不能進行大腸癌において、EGFR intron-1 CA repeat 数が少ない方が

セツキシマブとイリノテカン併用療法の感受性がより高かったとの報告もなされている[19, 21]。このように、これまでに報告されている結果は、我々の結果とは矛盾した結果となっている。さらに、我々の結果では、EGFR R521K の遺伝子多型と奏効率やPFS、OSに相関は認めなかった。521Rのアレル野生型に比べ、521Kのアレル変異型はリガンドへの結合性を弱め、癌原遺伝子を誘導することにより、セツキシマブの効果に悪影響を与える可能性がある[22-24]。KRもしくはKKの多型の患者において、RRの患者よりも有意に奏効率が高く、PFSやOSも有意に長かったことから[24]、この遺伝子多型は切除不能進行大腸癌に対するセツキシマブ療法の治療効果予測因子となり得るとされている。

これらの矛盾は以下のように説明できるのではないだろうか。BOND studyのサブグループ解析において、EGFRの発現した腫瘍細胞の割合も細胞あたりの最大の染色強度のいずれのEGFR発現の程度も、奏効率と有意な相関を認めなかった[33]。これらの結果からもEGFRの遺伝子多型とセツキシマブの効果について、相反する結果がでていることが説明できるのではないだろうか。

我々の検討の結果、KRAS野生型切除不能進行大腸癌に対する2次治療としてのセツキシマブとFOLFIRI併用療法において、FcGRとEGFR CAリポート数の多型が予後予測因子となりうる可能性が示唆された。しかし、これらの結果については未だ混沌としており、更なる検討が必要と考える。

7. 謝辞

本研究を遂行するにあたり、直接指導いただきました山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 碓 彰一准教授に感謝致します。また、実験にご協力いただきました山口大学医学部附属病院検査部 岡山 直子先生、山口大学大学院医学系研究科 臨床検査・腫瘍学 日野田 裕治前教授（現 北海道看護専門学校校長）に感謝いたします。本研究遂行にあたり、ご指導・ご助

言をいただきました山口大学大学院医学系研究科 消化器・腫瘍外科学 岡
正朗教授（現 山口大学 学長）に深謝いたします。

8. 参考文献

1. Siegel R, DeSantis C, Virgo K, Stein K, Mariotto A, Smith T et al. Cancer treatment and survivorship statistics, 2012. *CA Cancer J Clin.* 2012;62(4):220-41. doi:10.3322/caac.21149.
2. Tsukuma H, Ajiki W, Ioka A, Oshima A. Survival of cancer patients diagnosed between 1993 and 1996: a collaborative study of population-based cancer registries in Japan. *Jpn J Clin Oncol.* 2006;36(9):602-7. doi:10.1093/jjco/hyl068.
3. Maughan TS, Adams RA, Smith CG, Meade AM, Seymour MT, Wilson RH et al. Addition of cetuximab to oxaliplatin-based first-line combination chemotherapy for treatment of advanced colorectal cancer: results of the randomised phase 3 MRC COIN trial. *Lancet.* 2011;377(9783):2103-14. doi:10.1016/s0140-6736(11)60613-2.
4. Tveit KM, Guren T, Glimelius B, Pfeiffer P, Sorbye H, Pyrhonen S et al. Phase III trial of cetuximab with continuous or intermittent fluorouracil, leucovorin, and oxaliplatin (Nordic FLOX) versus FLOX alone in first-line treatment of metastatic colorectal cancer: the NORDIC-VII study. *J Clin Oncol.* 2012;30(15):1755-62. doi:10.1200/jco.2011.38.0915.
5. Lievre A, Bachet JB, Le Corre D, Boige V, Landi B, Emile JF et al. KRAS mutation status is predictive of response to cetuximab therapy in colorectal cancer. *Cancer Res.* 2006;66(8):3992-5. doi:10.1158/0008-5472.can-06-0191.
6. Karapetis CS, Khambata-Ford S, Jonker DJ, O'Callaghan CJ, Tu D, Tebbutt NC et al. K-ras mutations and benefit from cetuximab in advanced colorectal cancer. *The New England journal of medicine.* 2008;359(17):1757-65. doi:10.1056/NEJMoa0804385.
7. Weiner GJ. Monoclonal antibody mechanisms of action in cancer. *Immunol Res.* 2007;39(1-3):271-8.
8. van Sorge NM, van der Pol WL, van de Winkel JG. FcγR polymorphisms: Implications for function, disease susceptibility and immunotherapy. *Tissue Antigens.* 2003;61(3):189-202.
9. Parren PW, Warmerdam PA, Boeije LC, Arts J, Westerdal NA, Vlug A et al. On the interaction of IgG subclasses with the low affinity FcγRIIa (CD32) on human monocytes, neutrophils, and platelets. Analysis of a functional polymorphism to human IgG2. *J Clin Invest.* 1992;90(4):1537-46. doi:10.1172/jci116022.
10. Koene HR, Kleijer M, Algra J, Roos D, von dem Borne AE, de Haas M. FcγRIIIa-158V/F polymorphism influences the binding of IgG by natural killer cell FcγRIIIa, independently of the FcγRIIIa-48L/R/H phenotype. *Blood.* 1997;90(3):1109-14.

11. Strome SE, Sausville EA, Mann D. A mechanistic perspective of monoclonal antibodies in cancer therapy beyond target-related effects. *Oncologist*. 2007;12(9):1084-95. doi:10.1634/theoncologist.12-9-1084.
12. Weng WK, Levy R. Two immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms independently predict response to rituximab in patients with follicular lymphoma. *J Clin Oncol*. 2003;21(21):3940-7. doi:10.1200/jco.2003.05.013.
13. Musolino A, Naldi N, Bortesi B, Pezzuolo D, Capelletti M, Missale G et al. Immunoglobulin G fragment C receptor polymorphisms and clinical efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with HER-2/neu-positive metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008;26(11):1789-96. doi:10.1200/jco.2007.14.8957.
14. Cartron G, Dacheux L, Salles G, Solal-Celigny P, Bardos P, Colombat P et al. Therapeutic activity of humanized anti-CD20 monoclonal antibody and polymorphism in IgG Fc receptor Fc γ RIIIa gene. *Blood*. 2002;99(3):754-8.
15. Kawaguchi Y, Kono K, Mimura K, Sugai H, Akaike H, Fujii H. Cetuximab induce antibody-dependent cellular cytotoxicity against EGFR-expressing esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2007;120(4):781-7. doi:10.1002/ijc.22370.
16. Kurai J, Chikumi H, Hashimoto K, Yamaguchi K, Yamasaki A, Sako T et al. Antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by cetuximab against lung cancer cell lines. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(5):1552-61. doi:10.1158/1078-0432.ccr-06-1726.
17. Bibeau F, Lopez-Crapez E, Di Fiore F, Thezenas S, Ychou M, Blanchard F et al. Impact of Fc γ RIIa-Fc γ RIIIa polymorphisms and KRAS mutations on the clinical outcome of patients with metastatic colorectal cancer treated with cetuximab plus irinotecan. *J Clin Oncol*. 2009;27(7):1122-9. doi:10.1200/jco.2008.18.0463.
18. Zhang W, Gordon M, Schultheis AM, Yang DY, Nagashima F, Azuma M et al. FCGR2A and FCGR3A polymorphisms associated with clinical outcome of epidermal growth factor receptor expressing metastatic colorectal cancer patients treated with single-agent cetuximab. *J Clin Oncol*. 2007;25(24):3712-8. doi:10.1200/jco.2006.08.8021.
19. Pander J, Gelderblom H, Antonini NF, Tol J, van Krieken JH, van der Straaten T et al. Correlation of FCGR3A and EGFR germline polymorphisms with the efficacy of cetuximab in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer*. 2010;46(10):1829-34. doi:10.1016/j.ejca.2010.03.017.
20. Amador ML, Oppenheimer D, Perea S, Maitra A, Cusatis G, Iacobuzio-Donahue C et al. An epidermal growth factor receptor intron 1 polymorphism mediates response to epidermal growth factor receptor inhibitors. *Cancer Res*. 2004;64(24):9139-43. doi:10.1158/0008-5472.can-04-1036.

21. Graziano F, Ruzzo A, Loupakis F, Canestrari E, Santini D, Catalano V et al. Pharmacogenetic profiling for cetuximab plus irinotecan therapy in patients with refractory advanced colorectal cancer. *J Clin Oncol.* 2008;26(9):1427-34. doi:10.1200/jco.2007.12.4602.
22. Zhang W, Stoehmacher J, Park DJ, Yang D, Borchard E, Gil J et al. Gene polymorphisms of epidermal growth factor receptor and its downstream effector, interleukin-8, predict oxaliplatin efficacy in patients with advanced colorectal cancer. *Clinical colorectal cancer.* 2005;5(2):124-31.
23. Goncalves A, Esteyries S, Taylor-Smedra B, Lagarde A, Ayadi M, Monges G et al. A polymorphism of EGFR extracellular domain is associated with progression free-survival in metastatic colorectal cancer patients receiving cetuximab-based treatment. *BMC Cancer.* 2008;8:169. doi:10.1186/1471-2407-8-169.
24. Hsieh YY, Tzeng CH, Chen MH, Chen PM, Wang WS. Epidermal growth factor receptor R521K polymorphism shows favorable outcomes in KRAS wild-type colorectal cancer patients treated with cetuximab-based chemotherapy. *Cancer science.* 2012;103(4):791-6. doi:10.1111/j.1349-7006.2012.02225.x.
25. Iwamoto S, Hazama S, Kato T, Miyake Y, Fukunaga M, Matsuda C et al. Multicenter Phase II Study of Second-line Cetuximab plus Folinic Acid/5-Fluorouracil/Irinotecan (FOLFIRI) in KRAS Wild-type Metastatic Colorectal Cancer: The FLIER Study. *Anticancer Res.* 2014;34(4):1967-73.
26. Okayama N, Nishioka M, Hazama S, Sakai K, Suehiro Y, Maekawa M et al. The importance of evaluation of DNA amplifiability in KRAS mutation testing with dideoxy sequencing using formalin-fixed and paraffin-embedded colorectal cancer tissues. *Jpn J Clin Oncol.* 2011;41(2):165-71. doi:10.1093/jjco/hyq173.
27. Maruta Y, Okayama N, Hiura M, Suehiro Y, Hirai H, Hinoda Y. Determination of ancestral allele for possible human cancer-associated polymorphisms. *Cancer genetics and cytogenetics.* 2008;180(1):24-9. doi:10.1016/j.cancergencyto.2007.09.011.
28. Wang L, Hirayasu K, Ishizawa M, Kobayashi Y. Purification of genomic DNA from human whole blood by isopropanol-fractionation with concentrated NaI and SDS. *Nucleic Acids Res.* 1994;22(9):1774-5.
29. Rodriguez J, Zarate R, Bandres E, Boni V, Hernandez A, Sola JJ et al. Fc gamma receptor polymorphisms as predictive markers of Cetuximab efficacy in epidermal growth factor receptor downstream-mutated metastatic colorectal cancer. *Eur J Cancer.* 2012;48(12):1774-80. doi:10.1016/j.ejca.2012.01.007.
30. Kono K, Takahashi A, Ichihara F, Sugai H, Fujii H, Matsumoto Y. Impaired antibody-dependent cellular cytotoxicity mediated by herceptin in patients with gastric cancer. *Cancer Res.* 2002;62(20):5813-7.

31. Sasada T, Kimura M, Yoshida Y, Kanai M, Takabayashi A. CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with gastrointestinal malignancies: possible involvement of regulatory T cells in disease progression. *Cancer*. 2003;98(5):1089-99. doi:10.1002/cncr.11618.
32. Gebhardt F, Zanker KS, Brandt B. Modulation of epidermal growth factor receptor gene transcription by a polymorphic dinucleotide repeat in intron 1. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(19):13176-80.
33. Cunningham D, Humblet Y, Siena S, Khayat D, Bleiberg H, Santoro A et al. Cetuximab monotherapy and cetuximab plus irinotecan in irinotecan-refractory metastatic colorectal cancer. *The New England journal of medicine*. 2004;351(4):337-45. doi:10.1056/NEJMoa033025.

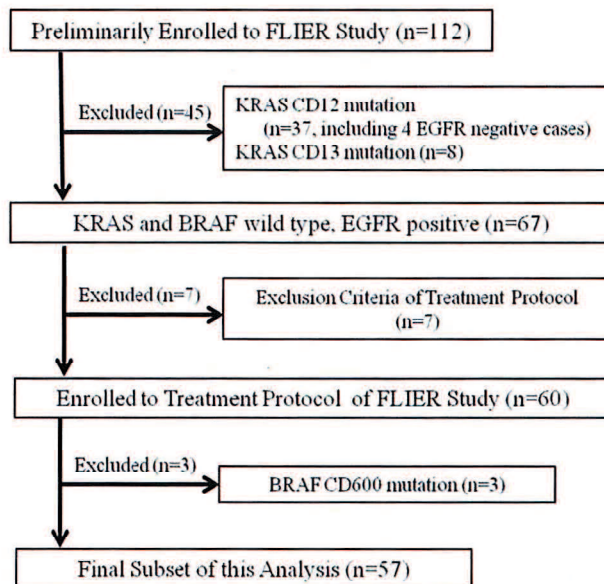


Fig.1 CONSORT diagram

Fig.1 CONSORT diagram.

FLIER study: cetuximab plus folinic acid / 5-fluorouracil / irinotecan in KRAS wild-type metastatic colorectal cancer as a second-line treatment, CD: codon, EGFR: epidermal growth factor receptor.

Table 1. Patient characteristics

Characteristics	n = 57
Age	
Average	62.7
Range	37 - 82
Sex	
Men	37
Women	20
Pattern of metastatic disease	
Liver	35
Lung	21
Other	17
1st line regimen	
FOLFOX + bevacizumab	29
FOLFOX	14
FOLFOX+cediranib/placebo	11
Other	3

FOLFOX: bolus/infusional fluorouracil and leucovorin with oxaliplatin.

Table 2. Associations between patient's characteristics and OS

Characteristics	n = 57	Univariate			Multivariate		
		HR	95% CI	P	HR	95% CI	P
Age							
≤65	35	0.95	0.53-1.70	0.86	0.84	0.46-1.53	0.57
≥65	22						
Sex							
Men	37	1.12	0.62-2.04	0.70	1.22	0.66-2.23	0.53
Women	20						
No. of metastatic sites							
1	12	1.20	0.60-2.41	0.61			
≥ 2	45						
EGFR (CA repeat)							
≤35	15	1.86	0.99-3.52	0.06	1.97	1.02-3.78	0.04
≥36	42						
FcγR polymorphisms							
Both FcγRIIa-131H and FcγRIIIa-1	17	0.94	0.50-1.76	0.84			
Others	40						

OS: overall survival, HR: hazard ratio, CI: confidence interval, EGFR: epidermal growth factor receptor, FcγR: fragment C γ receptor

Table 3. Associations between *FcγR* and *EGFR* genotypes and objective response

Genotype	Detail	Objective response			
		Response		P value	
		CR+PR	SD+PD	Fisher's exact test	C.-A. trend test
<i>FcγR IIa</i> (II131R)	III	10	25	0.487	0.239
	HR	6	9		
	RR	3	3		
<i>FcγR IIIa</i> (V158F)	FF	15	22	0.410	0.173
	FV	3	11		
	VV	1	4		
<i>EGFR</i> (R521K)	RR	7	12	0.934	0.613
	KR	9	17		
	KK	3	8		
<i>EGFR</i> (CA repeat)	≤35	3	12	0.220	
	≥36	16	25		

CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease, *FcγR*: fragment C γ receptor, *EGFR*: epidermal growth factor receptor, C.-A.: Cochran-Armitage.

Table 4. Associations between *FcγR* and *EGFR* polymorphisms and OS and PFS

Polymorphisms	Detail	No.	PFS		OS	
			median (days)	P values of log-rank test	median (days)	P values of log-rank test
<i>FcγR IIa</i> (H131R)	HH	35	254	0.747	553	0.991
	HR	16	203		663	
	RR	6	277		549	
<i>FcγR IIIa</i> (V158F)	FF	37	277	0.907	553	0.234
	FV	15	286		737	
	VV	5	154		270	
<i>EGFR</i> (R521K)	RR	11	230	0.236	566	0.386
	KR	26	315		553	
	KK	20	159		330	
<i>EGFR</i> (CA repeat) (<35, ≥36)	S	15	307	0.954	483	0.051
	L	42	254		600	

PFS: progression-free survival, OS: overall survival, *FcγR*: fragment C γ receptor, *EGFR*: epidermal growth factor receptor, S: CA repeats ≤ 35 , L; CA repeats ≥ 36 .

EGFR CA repeat数と OS

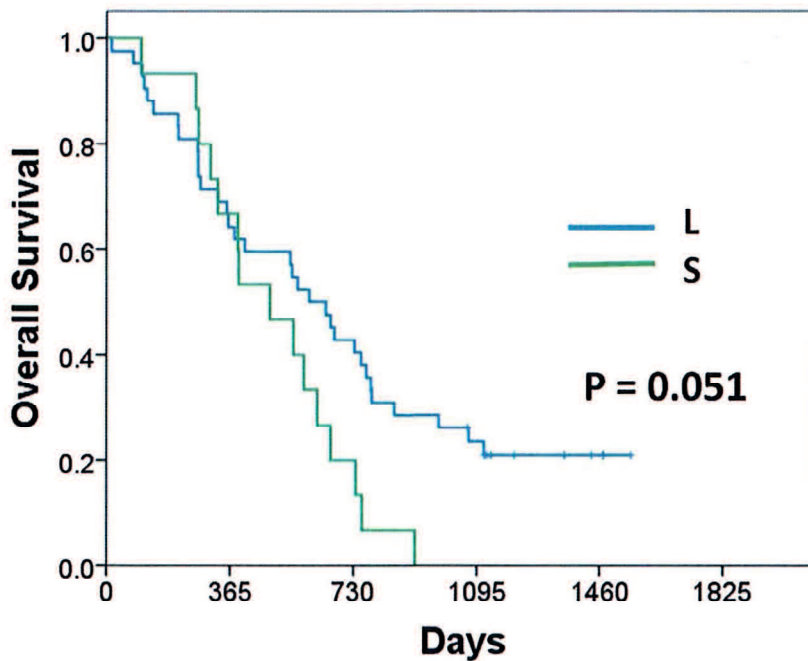


Table 5. Associations between *FcγR* haplotypes and objective response

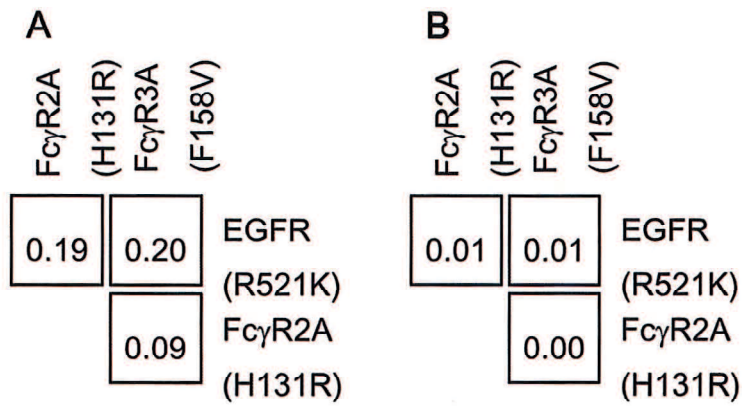
Haplotype of <i>FcγRIIa</i> -H131R and <i>FcγRIIIa</i> -V158F	Allele Frequency	Objective response (n= 112)		
		Response		<i>P</i> value
		CR+PR	SD+PD	Fisher's exact test
HF	0.589	24	42	0.549
without HF		14	32	
RF	0.196	9	13	0.460
without RF		29	61	
HV	0.170	2	17	0.018
without HV		36	57	
RV	0.045	3	2	0.334
without RV		35	72	

CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease, *FcγR*: fragment C γ receptor, EGFR: epidermal growth factor receptor.

Table 6. Associations between *FcγR* diplotypes and objective response

Diplotype of <i>FcγRIIa</i> -H131R and <i>FcγRIIIa</i> -V158F	Allele Frequency	Objective response (n = 56)			
		Response		<i>P</i> value	
		CR+PR	SD+PD	Fisher's exact test	C.-A. trend test
HV/HV	0.071	0	4	0.162	0.038
HV/nonHV	0.196	2	9		
nonHV/nonHV	0.732	17	24		

CR: complete response, PR: partial response, SD: stable disease, PD: progressive disease, *FcγR*: fragment C γ receptor, EGFR: epidermal growth factor receptor, C.-A.: Cochran-Armitage.



Supporting Figure S1. Pairwise linkage disequilibrium relationships between the *EGFR* and *FcγRIIa*, and *FcγRIIIa* variants. The Lewontin's coefficient D' (A) and the correlation coefficient r^2 (B) are represented as values in each box.