

研究計画書

研究課題名：大腸癌の転移・浸潤因子および抗癌剤感受性関連因子の包括的検討

【研究の背景・目的】当科（あるいは旧外科下部消化管チーム）では、大腸癌の転移に関与する血管新生因子 vascular endothelial growth factor (VEGF)・リンパ管新生関連因子 (VEGF-C,-D)やこれらの受容体を含む関連諸因子の腫瘍内発現を蛋白レベル（免疫組織学的染色や ELISA 法）、mRNA レベル、あるいは血中蛋白レベルで検討してきた。また、浸潤に関与する matrix metalloproteinases(MMPs)/tissue inhibitors of metalloproteinase s(TIMPs)の発現と大腸癌の転移・再発の関係についても検討してきた。さらに、これらを検討した症例を中心に、大腸癌化学療法の効果予測に関連する酵素発現を mRNA レベルや蛋白発現レベル（免疫組織学的染色や ELISA 法）で検討し、各種学術雑誌や学術集会で発表してきた（研究業績リスト）。

これらの研究は臨床検体（組織・血液サンプルなど）の保存と利用について、提供者（患者）の同意を文書で得た場合のみ行い、他施設との共同研究の場合や、遺伝子配列（多型の解析など）に関連する研究については、埼玉医科大学あるいは埼玉医科大学総合医療センターの倫理委員会で承認を受けて行ってきた（承認済み研究リスト）。従来行ってきた各々の研究は限られたサンプルで行われたものが多く、また、研究結果の相互関係を十分検討するまでには至らなかった。

今回、従来行ってきた研究に、新たに検討する因子を加えるとともに、より多くのサンプルで転移・浸潤因子と抗癌剤効果予測因子との関連などを包括的に検討することを目的としている。

【材料と方法】

材料

1996年1月から2009年12月の間に総合医療センター消化管一般外科（あるいは旧外科）で、患者から文書で研究に対する検体の保存と利用に同意が得られ、消化管・一般外科で凍結保存してある、血液（血漿・血清）、検査で採取、あるいは手術で摘出した組織（正常大腸粘膜、大腸癌、あるいは転移巣とその隣接正常臓器）、およびホルマリン固定パラフィン包埋ブロック、など。血液約 700 症例、大腸癌腫瘍組織や隣接正常臓器（大腸粘膜など）が約 600 症例、保管されている。

方法

1. 大腸癌患者の VEGF, VEGF-C, VEGF-D やそのその受容体である flt-1, KDR, flt-4 などの血液レベルを ELISA 法で測定する。また、大腸癌組織中の発現を蛋白レベル (ELISA 法) で解析する。また、real time RT-PCR 法を用いて mRNA レベルの発現も解析する。これらの発現因子に対する抗体を用いた免疫組織学的染色を行い、発現部位と強度を解析し、血液レベル、蛋白発現レベル、mRNA 発現レベルで得られた結果との関係も検討する。（過去に行った症例数を含め、最大 500 検体までの検討予定）。
2. 1 と同様に、大腸癌患者の MMPs (MMP-2,-7,-9 など) / TIMPs (TIMP-1,-2) や、これ

らの発現と血管新生に密接に関与している interleukin(IL)-8 などの血液レベル (ELISA 法) と大腸癌組織レベル (mRNA レベルあるいは ELISA 法による蛋白発現レベル) の発現の相互関係について検討する。また、免疫組織学的染色を行い、1 と同様の検討を行う (1 同様, 最大 500 検体までの検討予定)。

3. 現在大腸癌に対し、世界的に用いられている薬剤は 5-fluorouracil (FU)(葉酸を併用), irinotecan (CPT-11), oxaliplatin (L-OHP) の 3 剤である。これらの薬剤に対する腫瘍側の効果予測因子として、5-fluorouracil(FU)あるいは葉酸代謝に関連する thymidine syntase (TS), orotate phosphoribosyltransferase (OPRT), dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD), thymidine phosphorylase (TP), folypolyglutamate synthetase (FPGS), gamma-glutamyl hydrolase (GGH), dihydrofolate reductase (DHFR), methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR), methylenetetrahydrofolate dehydrogenase (MTHFD), folate receptor alpha (FOLRA), CPT-11 に関連する topoisomerase-I (Topo-I), L-OHP に関与する excision repair cross-complementing gene-1(ERCC-1), ERCC-2 などがあげられる。また、抗癌剤の耐性に関与する GST- π , multi-drug resistance (MDR)-1, p53 などがある。これらの因子 (大多数が代謝関連酵素) の大腸癌腫瘍組織中の発現を mRNA レベル, 蛋白発現レベル (ELISA 法, Western blotting 法, 免疫組織学的染色など) で検討し, 各因子間発現量 (程度) の関係や, 異なる検討方法における各因子の発現量 (程度) の関係を解析する。また, 5-FU, CPT-11, L-OHP などを使用した患者の腫瘍組織における各因子の発現量 (程度) と抗腫瘍効果についても検討する。臨床効果は RECIST 分類で, 腫瘍の増大・縮小について評価する。その他, progression-free survival, overall survival との関係についても解析する (最大 300 検体までの検討予定)。なお, 3. の研究で解析予定の諸因子の解析根拠について, 説明が必要と思われるものについては後述した (各種抗癌剤感受性予測因子を検討する文献的根拠)。
4. 1, 2, 3 の結果を総合的に解析し, 一般的に検討されている臨床病理学的項目や腫瘍マーカー (CEA, CA19-9, 抗 p53 抗体など) とともに, 多変量解析を行い, 新たな予後規定因子 (stage I-III), 抗癌剤効果予測因子 (stage IV・再発の切除不能例) などについて明らかにする。

【研究期間・研究場所など】

研究期間は倫理委員会承認後, 10 年間の予定。研究場所は総合医療センター外科研究室, 消化器・肝臓内科研究室, 病理部, 共同研究利用施設, 研究部 (研究室), 国際医療センターTR センター, ゲノム医学研究センター

研究業績リスト

【血管新生／リンパ管新生】

1. 石塚直樹 他：VEGF および VEGF-C 高発現を呈し、急速な転帰をとった結腸内分泌細胞癌の 1 例. 日本大腸肛門病雑誌 60:269-275,2007
2. 権田剛 他：大腸癌肝転移における肝動注療法の効果と血漿中 VEGF, Soluble Flt-1 の関係. 癌と化学療法 33:1841-1844,2006
3. 三橋敏武 他：大腸癌原発巣,肝転移巣における脈管形成,血管新生関連遺伝子の解析と臨床病理学的検討. 日本外科学会雑誌 106:366,2005(会議録)
4. 牧田陽一郎 他：大腸癌原発巣におけるリンパ管新生関連分子の発現レベル解析. 日本外科学会雑誌 106:365,2005(会議録)
5. Ishida H, et al. : Plasma Levels of Big Endothelin-1 in Patients with Colorectal Cancer: Correlation with Liver Metastasis. 日本外科系連合学会誌 29:980-987,2004
6. 石田秀行 他：大腸癌組織中 VEGF-C,-D 発現の検討 VEGF, thymidine phosphorylase 発現との関連. 日本大腸肛門病雑誌 57:602,2004(会議録)
7. 中田博 他：進行大腸癌における血清 soluble flt-1 測定の意義. 日本大腸肛門病学会雑誌 57:829,2004(会議録)
8. 大澤智徳 他：大腸癌における血漿 VEGF-C,D 値の検討. 日本大腸肛門病学会雑誌 57:829,2004(会議録)
9. 石田秀行 他：大腸癌原発巣における VEGF,Flt-1,KDR の発現と血中 VEGF, soluble Flt-1 測定の臨床的意義. 日本外科学会雑誌 105:519,2004(会議録)
10. 白川一男 他：mRNA 発現レベルからみた大腸癌原発巣,同時性肝転移巣における Topoisomerase-1 発現と脈管形成,血管新生,リンパ管新生関連遺伝子との関係. 日本外科学会雑誌 105:638,2004(会議録)
11. 岡田典倫 他：肝動注療法の効果と血漿中 VEGF の関係. 癌と化学療法 30:1639-1642,2003
12. 石田秀行 他：血漿 VEGF165 測定は大腸癌血行性再発の予測に有用である. 日本大腸肛門病学会雑誌 55:586,2002(会議録)

【MMPs/TIMPs】

1. Nemoto T, et al. : Ornithine decarboxylase, mitogen-activated protein kinase and matrix metalloproteinase-2 expressions in human colon tumors. World J Gastroenterol. 11:3065-9,2005
2. Ishida H, et al. : Serum Levels of Tissue Inhibitor of Metalloproteinases-1 (TIMP-1) in Colorectal Cancer Patients. Surgery Today 33:885-892,2003
3. Ishida H, et al. : Determining the levels of matrix metalloproteinase-9 in portal and peripheral blood is useful for predicting liver metastasis of colorectal cancer. Jpn J Clin Oncol. 33:186-91,2003
4. Okada N, et al. : Matrix metalloproteinase-2 and -9 in bile as a marker of liver

metastasis in colorectal cancer. *Biochem Biophys Res Commun.* 288:212-6,2001

【抗癌剤】

1. 石橋敬一郎 他：びまん浸潤型大腸癌における Thymidine Synthase, Thymidine Phosphorylase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Orotate Phosphoribosyltransferase mRNA 発現. *癌と化学療法* 34:1073-1077,2007
2. 石田秀行 他：大腸癌組織中 Orotate phosphoribosyltransferase mRNA 発現と臨床病理学的因子および 5-Fluorouracil 系抗癌剤の臨床的効果との関係. *日本外科系連合学会誌* 30:126-133,2005
3. 石田秀行 他：大腸癌における DNA Topoisomerase-I mRNA 半定量の臨床的意義. *癌と化学療法* 32:1295-1299,2005
4. 石田秀行 他：大腸癌原発巣における Thymidylate Synthase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase, Orotate Phosphoribosyltransferase mRNA 発現の相互関係と 5-FU 系抗癌剤の効果予測. *癌と化学療法* 32:1929-1934,2005
5. 石田秀行 他：大腸癌腫瘍内 Dihydropyrimidine Dehydrogenase 発現と 5-Fluorouracil+Leucovorin+UFT 療法の効果. *癌と化学療法* 31:883-887,2004
6. 傍島潤 他：大腸癌における Thymidine phosphorylase(TP),Dihydropyrimidine dehydrogenase(DPD)の発現 ELISA 法による蛋白発現 vs.LCM 法による mRNA 発現. *日本大腸肛門病学会雑誌* 58:812,2005(会議録)
7. 石田秀行 他：原発巣の Topoisomerase-II α , Glutathione S-Transferase- π mRNA 発現からみた大腸癌肝転移に対する Degradable Starch Microsphere 併用 Adriamycin・Mitomycin C 肝動注療法の効果. *癌と化学療法* 31:1803-1805,2004
8. 石田秀行 他：Dukes'C 大腸癌に対する予防的肝動脈化学療法の成績 原発巣の TS,DPD,p53 及び OPRT 発現との関係. *癌と化学療法* 30:1621-1626,2003
9. 山田博文 他：大腸癌に対する 5-Fu 系経口抗癌剤投与後の再発と Dihydropyrimidine Dehydrogenase(DPD):DPD タンパク量と DPD 免疫染色性の対比. *日本癌治療学会誌* 37:318,2002(会議録)
10. 石田秀行 他：高齢者大腸癌腫瘍組織内 Thymidine Phosphorylase 及び Dihydropyrimidine Dehydrogenase 発現の検討. *癌と化学療法* 28:809-814,2001
11. 石田秀行 他：原発巣の Thymidine Phosphorylase, Dihydropyrimidine Dehydrogenase 発現からみた大腸癌肝転移に対する Doxifluridine 併用 5-Fluorouracil 肝動注療法の効果. *癌と化学療法* 28:1624-1627,2001
12. 石田秀行 他：大腸癌原発巣・肝転移巣における Dihydropyrimidine Dehydrogenase 定量の意義. *癌と化学療法* 27:1879-1882,2000

承認を受けた研究リスト

- 1) Laser captured microdissection 法による大腸癌核酸代謝酵素 mRNA の解析 (300)
- 2) ELISA 法による大腸癌核酸代謝酵素蛋白量の解析 (医療センター倫, 43,43-II)
- 3) ERCC1 および TS の発現を指標とした切除不能の進行・再発・結腸・直腸癌に対する modified FOLFOX6 療法の効果予測 (522, 2008.6 改訂申請が承認済み)
- 4) 切除不能・再発大腸癌に対する mFOLFOX6 療法とテガフル・ウラシル (UFT) ロイコボリン (Leucovorin) 療法における Modified OPTIMOX の探索的検討 (174)

各種抗癌剤感受性予測因子を検討する文献的根拠

1) **TS (thymidylate synthase)** : 5-FU の標的酵素であり、転移性・進行大腸癌において、腫瘍内 mRNA 発現量あるいはタンパク発現量の低い症例は、高い症例に比べて 5-FU 療法が奏効すると報告されている¹⁾⁵⁾。一方、術後補助化学療法の対象では、原発巣における TS タンパク高発現症例の方が 5-FU 術後補助化学療法が奏効するとの報告もある⁶⁾⁸⁾。大腸癌原発巣と転移巣の TS レベルは一致しないとの報告もあり^{9),10)}、さらなる研究が必要と思われる。

2) **DPD (dihydropyrimidine dehydrogenase)** : 5-FU の分解酵素であり、進行頭頸部癌において、酵素活性が低い症例の方が 5-FU 療法が奏効するとの報告がある¹¹⁾。また、転移性大腸癌では、TS および TP に加え DPD の腫瘍内 mRNA 発現量も検討することで、5-FU 療法のより正確な効果予測が可能になると報告されている¹²⁾。

3) **TP (thymidine phosphorylase)** : 5-FU の代謝に関係するだけでなく、血管新生因子 PD-ECGF (platelet-derived endothelial cell growth factor) としても知られる酵素である。TS と同様、転移性大腸癌では腫瘍内 TP mRNA 発現量の高い症例は 5-FU 療法の効果が低いとの報告がある一方¹³⁾、術後補助化学療法の対象では TP 高発現症例の方で予後が良いとの報告もある¹⁴⁾。

4) **OPRT (otate phosphoribosyl transferase)** : 5-FU のリン酸化 (活性化) 酵素であり、大腸がんにおいて腫瘍部の酵素活性が正常部に比して有意に高値を示し、腫瘍部の活性が 5-FU 療法の効果予測因子になることや、腫瘍部と正常部における酵素活性の比ががんの進行度やリンパ節転移と関連することなどが報告されている¹⁵⁾。大腸がんにおいて、手術摘出腫瘍組織の OPRT 活性が術後の予後や 5-FU 感受性と関連しているという報告がある^{16),17)}。また、OPRT と DPD の mRNA 発現量比は、各々単独の mRNA 発現量よりも 5-FU 系抗癌剤の感受性とより相関していた¹⁷⁾。

5) **FPGS (folylpolyglutamate synthetase)** : 6)参照

6) **GGH (gamma-glutamyl hydrolase)** : FPGS は還元型葉酸にグルタミン酸(Glu)を重合させる酵素である。生体内に投与された還元型葉酸は、monoglutamateとして細胞膜を通過するが、細胞内ではFPGSにより、グルタミン酸が付加されたpolyglutamateになり、細胞内に保持される。5-FUの作用機作の1つであるTSの阻害においては、methylenetetrahydrofolateがTS、FdUMPとともに三元複合体(ternary complex:TC)を形成する。この際、TCの安定性はmethylenetetrahydrofolateに結合したグルタミン酸の数が多いほど高い。したがって、5-FU系抗悪性腫瘍剤の効果予測因子としての意義が注目される^{18)・20)}。一方、GGHはFPGSとは逆にpolyglutamateを加水分解する酵素である。GGH遺伝子発現量が、大腸癌の腫瘍組織内methylenetetrahydrofolateと逆相関する傾向が認められている²¹⁾。したがって、FPGSとGGHの酵素量の比率が、5-FUの腫瘍縮小効果に影響を及ぼす可能性は十分考えられる。腫瘍細胞ではFPGS/GGHのmRNA発現量比が0.23で、GGH優位という報告がある²²⁾。

7) **DHFR (dihydrofolate reductase)** : ジヒドロ葉酸の還元酵素であり、葉酸拮抗剤であるmethotrexateの標的である。腫瘍組織中の本因子のmRNA量と抗癌剤感受性との関連が報告されている²³⁾。

8) **MTHFR (methylenetetrahydrofolate reductase)** : ethylenetetrahydrofolateを5-methyltetrahydrofolateに変換する酵素である。MTHFRの一遺伝子多型(A1298C)がある症例では、大腸癌の腫瘍内還元型葉酸量が有意に低値であったという報告がある²⁴⁾。また、他の一遺伝子多型(C667T)がある症例では、女性の大腸癌症例にとって予後因子であるという報告がある²⁵⁾。

9) **MTHFD (methylenetetrahydrofolate dehydrogenase)** : MTHFDはmethylenetetrahydrofolateを5,10-methynyl tetrahydrofolateに変換する酵素であるので、MTHFD活性が高いと腫瘍内還元型葉酸量が下がり、5-FUに抵抗性になると予想される²⁶⁾。大腸癌細胞株を用いた検討では、MTHFD遺伝子発現量が高い細胞ほど5-FUに対する感受性が低かったという報告がある。

10) **FOLRA (folate receptor alpha)** : 葉酸の細胞内取り込みに関与する膜輸送タンパクである。 α 、 β 、 γ が存在する。LVによる5-FU系抗癌剤の抗腫瘍作用増強効果に影響を及ぼす可能性が考えられる²⁷⁾。

11) **GART (glycinamide ribonucleotide formyltransferase)** : 10-formyl tetrahydrofolateからtetrahydrofolateへの変換を司る酵素である。プリン合成に必要な遺伝子であり、阻害するとプリンリボヌクレオチドが枯渇する。GART阻害剤が抗癌作用を有することが知られて

いる²⁸⁾.

12) ERCC-1 (**excision repair cross-complementing gene-1**): DNA 損傷の修復にかかわる因子で、特にシスプラチンやオキサリプラチンの DNA 障害の修復をつかさどり、薬剤感受性を低下させることが知られている。これまでの文献でも本酵素の mRNA 発現量と大腸癌の 5-FU/オキサリプラチン併用療法に対する感受性との関連を示唆する報告が見られる²⁹⁾。

13) ERCC-2 (**excision repair cross-complementing gene-2**): ERCC-1 同様、DNA 損傷の修復にかかわる因子で、ERCC-2 の遺伝子多型と oxaliplatin ベースの化学療法との関連性が報告されている³⁰⁾。

14) MDR-1 (**multi-drug resistance-1**): P-glycoprotein は ATP の加水分解によるエネルギーを利用して種々の抗癌剤を細胞外に排出するポンプとして働くことが知られており、MDR-1 は P-glycoprotein を coding する遺伝子である。大腸癌における MDR-1 mRNA の発現と予後の関連性について報告されている³¹⁾。

15) GST-pi (**glutathione s-transferase pi**): 一般に薬剤耐性に関与する代表的な酵素であるが、GST-pi の遺伝子多型と FOLFOX 療法の効果との間で関連性が報告されている³²⁾。

文献リスト

1. Bathe OF, Franceschi D, Livingstone AS, Moffat FL, Tian E, Ardalán B. Increased thymidylate synthase gene expression in liver metastases from colorectal carcinoma: implications for chemotherapeutic options and survival. *Cancer J Sci Am* 5:34-40,1999
2. Cascinu S, Aschele C, Barni S, Debernardis D, Baldo C, Tunesi G, et al. Thymidylate synthase protein expression in advanced colon cancer: correlation with the site of metastasis and the clinical response to leucovorin-modulated bolus 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 5:1996-9,1999
3. Leichman CG, Lenz HJ, Leichman L, Danenberg K, Baranda J, Groshen S, et al. Quantitation of intratumoral thymidylate synthase expression predicts for disseminated colorectal cancer response and resistance to protracted-infusion fluorouracil and weekly leucovorin. *J Clin Oncol* 15:3223-9,1997
4. Lenz HJ, Hayashi K, Salonga D, Danenberg KD, Danenberg PV, Metzger R, et al. p53 point mutations and thymidylate synthase messenger RNA levels in disseminated colorectal cancer: an analysis of response and survival. *Clin Cancer Res* 4:1243-50,1997
5. Paradiso A, Simone G, Petroni S, Leone B, Vallejo C, Lacava J, et al. Thymidylate synthase and p53 primary tumour expression as predictive factors for advanced

- colorectal cancer 60 patients. *Br J Cancer* 82:560-7,2000
6. Edler D, Glimelius B, Hallstrom M, Jakobsen A, Johnston PG, Magnusson I, et al. Thymidylate synthase expression in colorectal cancer: a prognostic and predictive marker of benefit from adjuvant fluorouracil-based chemotherapy. *J Clin Oncol* 20:1721-8,2002
 7. Johnston PG, Fisher ER, Rockette HE, Fisher B, Wolmark N, Drake JC, et al. The role of thymidylate synthase expression in prognosis and outcome of adjuvant chemotherapy in patients with rectal cancer. *J Clin Oncol* 12:2640-7,1994
 8. Takenoue T, Nagawa H, Matsuda K, Fujii S, Nita ME, Hatano K, et al. Relation between thymidylate synthase expression and survival in colon carcinoma, and determination of appropriate application of 5-fluorouracil by immunohistochemical method. *Ann Surg Oncol* 7:193-8,2000.
 9. Aschele C, Debernardis D, Tunesi G, Maley F, Sobrero A. Thymidylate synthase protein expression in primary colorectal cancer compared with the corresponding distant metastases and relationship with the clinical response to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 6:4797-802,2000.
 10. Findlay MP, Cunningham D, Morgan G, Clinton S, Hardcastle A, Aherne GW. Lack of correlation between thymidylate synthase levels in primary colorectal tumours and subsequent response to chemotherapy. *Br J Cancer* 75:903-9,1997
 11. Etienne MC, Cheradame S, Fischel JL, Formento P, Dassonville O, Renee N, et al. Response to fluorouracil therapy in cancer patients: the role of tumoral dihydropyrimidine dehydrogenase activity. *J Clin Oncol* 13:1663-70,1995
 12. Salonga D, Danenberg KD, Johnson M, Metzger R, Groshen S, Tsao-Wei DD, et al. Colorectal tumors responding to 5-fluorouracil have low gene expression levels of dihydropyrimidine dehydrogenase, thymidylate synthase, and thymidine phosphorylase. *Clin Cancer Res* 6:1322-7, 2000
 13. Metzger R, Danenberg K, Leichman CG, Salonga D, Schwartz EL, Wadler S, et al. High basal level gene expression of thymidine phosphorylase (platelet-derived endothelial cell growth factor) in colorectal tumors is associated with nonresponse to 5-fluorouracil. *Clin Cancer Res* 4:2371-6,1998
 14. Saito S, Tsuno N, Nagawa H, Sunami E, Zhengxi J, Osada T, et al. Expression of platelet-derived endothelial cell growth factor correlates with good prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 88:42-9,2000
 15. Ochiai T, Sugitani M, Nishimura K, Noguchi H, Watanabe T, Sengoku H, et al. [Correlation between clinical pathophysiologic factors and expression of orotate phosphoribosyl transferase (OPRT), thymidylate synthase (TS), and dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) in colorectal cancer]. *Gan To Kagaku Ryoho* 29:413-20,2002
 16. Ochiai T, Nishimura K, Noguchi H, Kitajima M, Tsukada A, Watanabe E, et al.

- Prognostic impact of orotate phosphoribosyl transferase among 5-fluorouracil metabolic enzymes in resectable colorectal cancers treated by oral 5-fluorouracil-based adjuvant chemotherapy. *Int J Cancer* 118: 3084-88,2006
17. Ichikawa W, Uetake H, Shiota Y, Yamada H, Takahashi T, Nihei Z, et al. Both gene expression for orotate phosphoribosyltransferase and its ratio to dihydropyrimidine dehydrogenase influence outcome following fluoropyrimidine-based chemotherapy for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer* 89:1486-92,2003
 18. Chazal M, Cheradame S, Formento JL, Francoual M, Formento P, Etienne MC, et al. Decreased folylpolyglutamate synthetase activity in tumors resistant to fluorouracil-folinic acid treatment: clinical data. *Clin Cancer Res* 3:553-7,1997
 19. Sohn KJ, Smirnakis F, Moskovitz DN, Novakovic P, Yates Z, Lucock M, et al. Effects of folylpolyglutamate synthetase modulation on chemosensitivity of colon cancer cells to 5-fluorouracil and methotrexate. *Gut* 53:1825-31,2004
 20. Sakamoto E, Tsukioka S, Oie S, Kobunai T, Tsujimoto H, Sakamoto K, et al. Folyl-polyglutamate synthase and g-glutamyl hydrolase regulate leucovorin-enhanced 5-fluorouracil anticancer activity. *BBRC* (in press)
 21. Kawakami K, Ruszkiewicz A, Fukushima M, Minamoto T, Iacopetta B. mRNA expression of gamma glutamyl hydrolase (GGH) is negatively associated with DNA methylation status in primary colorectal cancer. Annual meeting of American Association for Cancer Research: 2007. Abstract #2849.
 22. Odin E, Wettergren Y, Nilsson S, Willen R, Carlsson G, Spears CP, et al. Altered gene expression of folate enzymes in adjacent mucosa is associated with outcome of colorectal cancer patients. *Clin Cancer Res* 9:6012-9,2003.
 23. Satta T, Isobe K, Yamauchi M, Nakashima I, Akiyama S, Itou K, et al. Establishment of drug resistance in human gastric and colon carcinoma xenograft lines. *Jpn J Cancer Res* 82: 593-8,1991
 24. Kawakami K, Ruszkiewicz A, Bennett G, Moore J, Watanabe G, Iacopetta B. The folate pool in colorectal cancers is associated with DNA hypermethylation and with a polymorphism in methylenetetrahydrofolate reductase. *Clin Cancer Res* 9:5860-5,2003.
 25. Zhang W, Press OA, Haiman CA, Yang DY, Gordon MA, Fazzone W, et al. Association of methylenetetrahydrofolate reductase gene polymorphisms and sex-specific survival in patients with metastatic colon cancer. *J Clin Oncol* 25:3726-31,2007.
 26. Iacopetta-B, Methyl-group metabolism and the response of colorectal cancer to 5-fluorouracil. *Crit Rev Oncog* 12:115-26,2006
 27. Shia J, Klimstra DS, Nitzkorski JR, Low PS, Gonen M, Landmann R, Weiser MR, Franklin WA, Prendergast FG, Murphy L, Tang LH, Temple L, Guillem JG, Wong WD,

- Party PB. Immunohistochemical expression of folate receptor alpha in colorectal carcinoma: patterns and biological significance. *Hum Pathol* 39:498-505, 2008
28. Faessel HM, Slocum HK, Rustum YM, Greco WR. Folic acid-enhanced synergy for the combination of trimetrexate plus the glycinamide ribonucleotide formyltransferase inhibitor 4-[2-(2-amino-4-oxo-4, 6,7,8-tetrahydro-3H-pyrimidino [5,4,6][1.4] thiazin-6-yl)-(s)-etyl]-2,5-thienoylamino-L-glutamic acid (AG2034): comparison across sensitive and resistant human tumor cell lines. *Biochem Pharmacol* 57:567-577,1999
29. Shirota Y, Stoehmacher J, Brabender J, et al. ERCC1 and thymidylate synthase mRNA levels predict survival for colorectal cancer patients receiving combination oxaliplatin and fluorouracil. *J Clin Oncol* 19: 4298–4304, 2001
30. Park DJ, Stoehmacher J, Zhang W, et al. A Xeoderma pigmentosum group D gene polymorphism predicts clinical outcome to platinum-based chemotherapy in patients with advanced colorectal cancer. *Cancer Res* 61: 8654-58, 2001
31. Motoo Y, Su SB, Nakatani MY, Sawada N. Expression of multidrug resistance gene (mdr-1) mRNA in gastroic and colorectal cancers. *Anticancer Res* 18(3B): 1903-1906, 1998
32. Stoehmacher J, Park DJ, Zhang W, et al. A multivariate analysis of genomic polymorphism; prediction of clinical outcome to 5-FU /oxaliplatin combination chemotherapy in refractory colorectal cancer. *Br J Cancer* 91:344-54, 2004