

平成 30 年 8 月 30 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10202

研究課題名(和文)胆道癌の主病巣と進展・転移部における腫瘍進展因子と治療抵抗因子の相違に関する解析

研究課題名(英文)Analyses regarding heterogeneity of resistance for chemo- or chemo-radiation therapy in biliary tract cancer

研究代表者

小林 省吾 (Kobayashi, Shogo)

大阪大学・医学系研究科・講師

研究者番号：30452436

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：胆道癌は膵癌に次ぐ死亡率を持つが、有効な治療法の開発は遅れているため、われわれは術前治療の可能性を探ってきた。現在、安全性と有効性を検証しながら症例を蓄積中である。また、これまでの胆道癌に関する基礎研究で、癌中心部と先進部の進展様式や治療抵抗性が異なることが示唆されたため、今回、術前治療による影響を分子生物学的に解析した。その結果、先進部において化学療法や化学放射線療法の治療効果がより認められること、癌中心部においては化学放射線療法より化学療法の方がより効果的であること、新規追加薬剤としてnab-PTXを使用することで治療効果の増強が期待できることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)： Due to poor prognosis, severe surgery, and postoperative organ impairment in biliary tract cancers (BTC), we are exploring the possibility of preoperative treatment and confirming the feasibility and the efficacy. From the data of cancer progress mechanism in BTC, the factors regarding invasion, metastasis, treatment-resistance were different between the center and invasive front of cancers, and we examined these parameters after preoperative chemotherapy or chemoradiation therapy. The data showed that chemotherapy and chemoradiation therapy were more effective at the invasive front than those at the center, chemotherapy was more effective at the center of cancer than chemoradiation, and nab-PTX could be expected for the additional agents to the conventional chemotherapy for BTC.

研究分野：消化器外科

キーワード：胆道癌 化学療法 化学放射線療法 外科治療 術前治療

1. 研究開始当初の背景

難治性悪性腫瘍のなかで、胆道癌は膀胱に次ぐ発生率と死亡率もち、その年間死亡患者数は2万人に及ぶ。国際的には本邦と東南アジアに多く発生するが、欧米諸国における患者数も増加しており、近年、その報告数が(本邦からというよりむしろ欧米諸国から)増えつつある。治療方針は、切除または切除不能病変(再発・遠隔転移)に対する化学療法であるが、推奨される化学療法はゲムシタピンを主軸としたシスプラチン併用療法1つのみであること、切除の治療成績は不十分である一方で推奨される手術後補助療法はなく、術前補助療法に関するエビデンスもほとんどないことが問題となっている。

研究者はこの切除と1つの化学療法以外に確立された治療法のない胆道癌に対して、臨床と基礎の両側面から治療成績向上のための術後補助療法開発(**J Cancer Ther 2011**)と癌の進展形式の分子生物学的解析(**J Clin Invest. 2006, Eur J Cancer 2013**)

化学療法耐性の解明に関する研究(科研費若手スタートアップ **2007-2008**、科研費若手 **B 2010-2011, Ann Surg Oncol 2014**)を進めており、それらの結果は胆道癌は高度侵襲手術(大量肝切除)が多いため十分な術後補助療法が行えないこと(**Cancer Chemother Pharmacol. 2014**)、胆道癌は常に閉塞黄疸や胆管炎による胆道炎症を伴うがその炎症は癌の進展・リンパ節転移に関与しており、化学療法抵抗性を誘導する可能性があること(**Gastroenterology 2005, 2007, Hepatology 2005, Eur J Cancer 2013, 科研費 基盤 C(2012-2014)**)を示唆していた。以上のことから、術後ではなく術前に化学療法が必要で、さらに放射線療法を追加する必要があり、特に癌の進展部(先進部)の制御が必要であると判断し、局所進展と局所リンパ節転移を照射野に含んだ術前化学放射線療法を開発した。プレリミナリーなデータでは、**R0** 切除率(病理学的な癌遺残のない切除)が**88%**で、本邦の**R0** 切除率約**70%**や当施設の**Historical control** の**R0** 切除率約**80%**より高く、一定の効果が得られていると考えている。その理由の一つとして、切除標本における病理学的リンパ節転移の割合が**4%**であったことか考えられ、胆道癌切除における病理学的リンパ節転移に関する諸報告や施設の**Historical control** の値(約**40-50%**)と比較して著しく低い。一方で癌主病巣においてはこれほどの治療効果は得られていないことから、これは、癌進展部やリンパ節転移部における抗腫瘍効果の違いを示唆しており、癌主病巣と局所進展部、局所リンパ節転移部における化学放射線療法の治療効果の差異に影響を与える因子すなわち癌動態を検討する必要があると考えた。

2. 研究の目的

本邦に多く、欧米諸国でも罹患率が増えて

いる一方で、切除とゲムシタピン+シスプラチン併用療法しか有効な治療が開発されていない胆道癌に対して、臨床および基礎に関するわれわれのこれまでの検討から、術前化学放射線療法が必要であると考えている。胆道炎症は癌の進展・転移や化学療法抵抗性に関与していたこと、術前化学放射線療法後では局所リンパ節転移率が低かったことから、本研究においては、癌主病巣と進展・局所リンパ節転移部における化学放射線療法の抗腫瘍効果の違いを、われわれが解明してきた胆道癌における癌治療抵抗性のメカニズムを中心に検討するとともに、それぞれの癌進展の違いについても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

胆道癌の主病巣と進展・転移部における腫瘍進展因子と治療抵抗因子の相違に関する解析を行うために、術前治療を行った切除検体を用いて検討を行った。研究期間終了までの術前化学放射線療法の症例、術前化学療法の症例、コントロール群として術前治療非施行の症例を追加し、合計133例で検討した。(1)術前化学放射線療法の安全性、(2)術前化学放射線療法の臨床病理学的効果、(3)術前化学放射線療法の生存期間延長効果、(4)術前化学放射線療法と術前化学療法との分子生物学的検討を行った。特に(4)については、われわれが細胞実験で同定してきた化学療法抵抗因子や癌進展因子(上皮間葉転換、癌間質、炎症性サイトカイン、癌幹細胞、シグナル伝達経路、アポトーシス関連蛋白)について検討し、それぞれの部位における化学放射線療法の抗腫瘍効果と抵抗性や癌進展における違いについて検討し、胆道癌の主病巣と進展・転移部における腫瘍進展因子と治療抵抗因子の相違を明らかにすることを試みた。

4. 研究成果

(1) 術前化学放射線療法の安全性の評価

上記症例のうち、術前治療としてゲムシタピン+放射線を用いた化学放射線療法症例のうち、始めの25例において安全性を評価した。薬剤の相対用量強度は84%で、放射線の平均線量は53.8Gyであった。術前化学放射線中には84%に有害事象が生じ、最多は白血球減少(44%)で、次いで血小板減少(32%)、好中球減少(28%)、貧血(28%)であった。胆道癌は経過中に胆道閉塞や胆管炎を伴い、胆道ステントの挿入や交換が必要となるが、治療中に必要となった症例は44%で、肝障害は40%に認められた。

(2) 術前化学放射線療法の臨床病理学的効果

表1に腫瘍縮小効果について示した。画像的血管浸潤や臓器浸潤については、われわれの報告してきたCTステージングを用いた(**J Surg Oncol 2010**)。腫瘍マーカーとしてのCA19-9の著明な減少、画像的臓器浸潤の改善

(74% 33%)が認められ、奏効率は70%であったが、画像的血管浸潤や画像的リンパ節転移の改善は認められなかった。なお、胆道癌における化学療法の一般的な奏効率は20-30%に留まる。

表1

		治療前	治療後	P値
CEA	5以上	11%	11%	0.9999
CA19-9	40以上	56%	30%	0.0541
画像診断	動脈浸潤	30%	22%	0.5346
	臓器浸潤	74%	33%	0.0027
	リンパ節転移	4%	4%	0.9999
CR+PR		70%		
SD		30%		
PD		0%		

表2に術前治療後の画像診断の感度、特異度、正診率、陽性的中率を示す。画像的臓器浸潤においては、術前治療の有無にかかわらず陽性的中率が70%であったが、動脈浸潤においてはそれぞれ33%と18%、リンパ節転移においては0%と80%であり、化学放射線療法後においては、特に画像的リンパ節転移診断にすいては、非常に陽性的中率が低いことが明らかとなった。

表2

	画像診断	感度	特異度	陽性的中率
術前治療なし	動脈浸潤	67%	88%	18%
	臓器浸潤	45%	72%	62%
	リンパ節転移	11%	97%	80%
術前治療あり	動脈浸潤	100%	84%	33%
	臓器浸潤	55%	81%	67%
	リンパ節転移	0%	96%	0%

表3に臨床病理学的効果について、2000-2005年の胆管癌症例と比較して示した。R0切除率(病理学的な癌遺残のない切除)は96%であり、本邦のR0切除率約70%や当施設のHistorical controlのR0切除率約80%より高かった。また、切除標本における病理学的リンパ節転移の割合は16%であり、既報告や施設のHistorical controlの値(約40-50%)と比較して著しく低かった。組織型においては、高分化型腺癌が52%と多く、また神経浸潤が少なく認められた。臓器浸潤や血管浸潤の差は認められなかった。

表3：術前治療なし群との比較

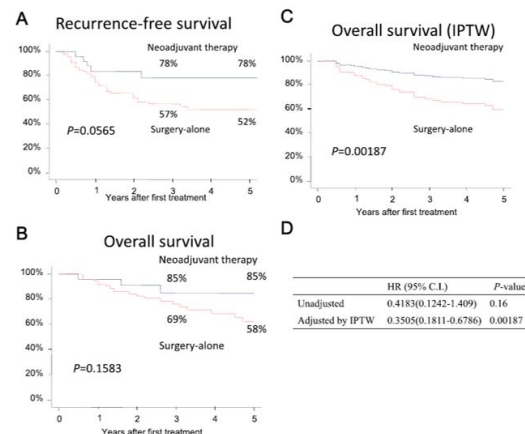
		術前治療あり	術前治療なし	P値
病理学的リンパ節転移あり		16%	47%	0.0148
R0切除(病理学的遺残のない切除)		96%	74%	0.0220
組織型	高分化型管状腺癌	52%	26%	0.0161
肝臓または膵臓への臓器浸潤		36%	45%	0.4584
血管浸潤		12%	17%	0.6041

(3)術前化学放射線療法の生存期間延長効果

術前治療を行わなかった79例と比較した。検討症例において、術前化学放射線療法群は、画像的臓器浸潤を伴う症例が多く、若年者

(<69歳)画像的動脈浸潤を伴う症例が多い傾向が認められた。治療開始前の腫瘍マーカーや画像的血管浸潤、臓器浸潤、リンパ節転移で症例をマッチングさせ、IPTW解析を行ったところ、術前化学放射線療法施行症例において、優位に生存期間が延長した(H.R.=0.3505(95% C.I. 0.1811-0.6786), p=0.00187、図1)。

図1



本研究の結果を踏まえて、さらなる治療効果を求めて、胆道癌に対するゲムシタピンとシスプラチン併用の術前化学放射線療法における安全性および有効性の評価(UMIN000020964)を開始し、3例実施した。**(4)術前化学放射線療法と術前化学療法の分子生物学的検討**

化学放射線療法を行った21例、化学療法を行った8例、術前治療を行っていない28例の切除標本を用いて、癌中心部および癌先進部における、これまでわれわれが報告してきたFANCD2, SMAD4, SPARCについて評価を行った。FANCD2はDNAリペアシステムの一つであり、これまでに胆道癌の癌幹細胞との関連性を報告した(Cancer Sci 2015)。胆道癌切除検体においては、中心部によく発現しており、化学療法施行症例において、予想と反して発現が低下していた。SMAD4は癌の先進部において強く発現し、化学療法抵抗性との関連性を以前報告した(Eur J Cancer 2013)。化学療法、化学放射線療法施行例ともに癌先進部における発現は低下していた。以上の結果は予想と反しており、癌中心部よりむしろ先進部において、化学療法、化学放射線療法ともに、より治療効果が認められることが明らかとなった。

SPARCの発現と胆道癌治療成績について前に報告している(J Surg Oncol 2014)。またSPARCはnab-PTXの効果との関連性が示唆されている。SPARCは先進部は化学放射線療法における減少率が高い中心部においては化学放射線療法によって逆に上昇することが明らかになった。FANCD2とSPARCの発現は化学療法後と化学放射線療法後に、特に癌中心部において乖離があり、化学療法の方がより効果的であったことを示唆していた。こ

れは、われわれのプレリミナリーな検討において、より先進部において治療効果があったことに一致する。そして、SPARC の発現からは nab-PTX の効力の及ぶ余地があることを示唆していた。以上の結果を踏まえて、nab-PTX の追加効果を期待し、病理学的リンパ節転移を認める 進行胆道癌 に対する GEM/Cisplatin/nab-PTX 療法の第 I/II 相試験 (UMIN000029490) を開始し、1 例実施した。

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 10 件)

1. Kobayashi S, Tomokuni A, Takahashi H, Akita H, Marubashi S, Gotoh K, Yanagimoto Y, Takahashi T, Sugimura K, Miyorhi N, Moon JH, Yasui M, Omori T, Miyata T, Ohue M, Fujiwara Y, Yano M, Sakon M. Laparoscopic hilar lymph node sampling in patients with biliary tract cancers that are rarely associated with nodal metastasis. *Surg Laparosc Endosc Percutan Tech.* 2018;28(2):90-95.
2. Kobayashi S, Fukui K, Takeda Y, Nakahira S, Tsujie M, Shimizu J, Miyamoto A, Eguchi H, Nagano H, Doki Y, Mori M. Short-term outcomes of open liver resection and laparoscopic liver resection: Secondary analysis of data from a multicenter prospective study (CSGO-HBO-004). *Ann Gastroenterol Surg* 2018; 2(1): .87-94.
3. Kobayashi S, Tomokuni A, Takahashi H, Akita H, Sugimura K, Miyoshi N, Moon JH, Yasui M, Omori T, Ohue M, Fujiwara Y, Yano M, Sakon M. The clinical significance of alpha-fetoprotein mRNAs in patients with hepatocellular carcinoma *Gastrointestinal Tumors* 2016;3:141-152.
4. Kobayashi S, Tomokuni A, Gotoh K, Takahashi H, Akita H, Marubashi S, Yamada T, Teshima T, Fukui K, Fujiwara Y, Sakon M. A retrospective analysis of the clinical effects of neoadjuvant combination therapy with full-dose gemcitabine and radiation therapy in patients with biliary tract cancer. *Eur J Surg Oncol.* 2017;43(4):763-771.
5. Kobayashi S, Gotoh K, Takahashi H, Akita H, Marubashi S, Yamada T, Teshima T, Nishiyama K, Yano M, Ohigashi H, Ishikawa O, Sakon M. Clinicopathological Features of Surgically-resected Biliary Tract Cancer Following Chemo-radiation Therapy. *Anticancer Res.* 2016;36(1):335-42.
6. Sakamoto T, Kobayashi S, Yamada D, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Noda T, Gotoh K, Asaoka T, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M. A

Histone Deacetylase Inhibitor Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition and Attenuates Chemoresistance in Biliary Tract Cancer. *PLoS One.* 2016;11(1):e0145985.

7. Kobayashi S, Takeda Y, Nakahira S, Tsujie M, Shimizu J, Miyamoto A, Eguchi H, Nagano H, Doki Y, Mori M. Fibrin Sealant with Polyglycolic Acid Felt vs Fibrinogen-Based Collagen Fleece at the Liver Cut Surface for Prevention of Postoperative Bile Leakage and Hemorrhage: A Prospective, Randomized, Controlled Study. *J Am Coll Surg.* 2016;222(1):59-64.

8. Kobayashi S, Tomokuni A, Gotoh K, Takahashi H, Akita H, Marubashi S, Yamada T, Teshima T, Nishiyama K, Yano M, Ohigashi H, Ishikawa O, Sakon M. Evaluation of the safety and pathological effects of neoadjuvant full-dose gemcitabine combination radiation therapy in patients with biliary tract cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;76(6):1191-8.

9. Kanai M, Hatano E, Kobayashi S, Fujiwara Y, Marubashi S, Miyamoto A, Shiomi H, Kubo S, Ikuta S, Yanagimoto H, Terajima H, Ikoma H, Sakai D, Kodama Y, Seo S, Morita S, Ajiki T, Nagano H, Ioka T. A multi-institution phase II study of gemcitabine/cisplatin/S-1 (GCS) combination chemotherapy for patients with advanced biliary tract cancer (KHBO 1002). *Cancer Chemother Pharmacol.* 2015;75(2):293-300.

10. Nakashima S, Kobayashi S, Nagano H, Tomokuni A, Tomimaru Y, Asaoka T, Hama N, Wada H, Kawamoto K, Marubashi S, Eguchi H, Doki Y, Mori M. BRCA/Fanconi Anemia Pathway Implicates Chemo-resistance to Gemcitabine in Biliary Tract Cancer. *Cancer Sci.* 2015;106(5):584-91.

[学会発表](計 13 件)

1. 小林省吾、友國 晃、秋田裕史、高橋秀典、杉村啓二郎、三吉範克、文正浩、安井昌義、大森 健、宮田博志、大植雅之、藤原義之、矢野雅彦、左近賢人 腫瘍栓を伴う肝細胞癌に対する治療戦略第 72 回日本消化器外科学会総会 2017 年

2. Shogo Kobayashi, Akira Tomokuni、Hidenori Takahashi、Hirofumi Akita、Yoshitomo Yanagimoto、Yusuke Takahashi、Kei-jiro Sugimura、Norikatsu Miyoshi、Jeong Ho Moon、Masayoshi Yasui、Takeshi Omori. Survival analysis by preoperative CT-based staging of neoadjuvant full-dose gemcitabine and radiotherapy in patients with biliary tract cancer. 29th JSHBPS, 2017 年

3. 小林省吾 肝臓癌・胆道癌手術の進歩と課題 術前放射線治療の可能性 日本放射線腫瘍学会第 30 回学術大会(招待講演) 2017 年

4. 小林省吾、江口英利、寺嶋宏明、宮本敦史、柳本泰明、竹村茂一、味木徹夫、落合登志哉、猪飼伊和夫、金沢景繁、生駒久視、瀬尾智、武田裕、波多野悦朗、永野浩昭 胆道癌の病期や手術内容に応じた集学的治療の開発 第 79 回日本臨床外科学会総会 2017 年

5. 小林省吾、友国晃、後藤邦仁、高橋秀典、秋田裕史、杉村啓二郎、三吉範克、本告正明、出村公一、大森健、能浦真吾、宮田博志、大植雅之、藤原義之、矢野雅彦、石川治、左近賢人胆道癌に対するゲムシタピン併用術前化学放射線療法第 116 回日本外科学会定期学術集会 2016 年 04 月 14 日~04 月 16 日 大阪市

6. 小林省吾、友国 晃、秋田裕史、高橋秀典、杉村啓二郎、三吉範克、文正浩、安井昌義、大森 健、宮田博志、大植雅之、藤原義之、矢野雅彦、左近賢人切除可能胆道癌に対する術前化学放射線療法に関する検討第 41 回日本外科系連合学会・学術集会 2016 年 06 月 15 日~06 月 17 日 大阪市

7. 小林省吾、友国晃、高橋秀典、秋田裕史、杉村啓二郎、三吉範克、文正浩、安井昌義、大森健、宮田博志、大植雅之、藤原義之、矢野雅彦、左近賢人胆道癌に対する術前化学放射線療法の開発第 52 回胆道学会学術集会 2016 年 09 月 29 日~09 月 30 日 横浜市

8. 小林省吾、友国 晃、秋田裕史、高橋秀典、杉村啓二郎、三吉範克、文正浩、安井昌義、大森 健、宮田博志、大植雅之、藤原義之、矢野雅彦、左近賢人 非切除胆道癌に対する 化学放射線療法後の 胆道癌切除例の検討第 78 回日本臨床外科学会総会 2016 年 10 月 24 日~10 月 26 日 東京都

9. 小林省吾 肝門部胆管癌に対する術前化学放射線療法 第 51 回 日本胆道学会学術集会 2015 年 09 月 17 日~09 月 18 日 宇都宮市

10. 小林省吾 胆道癌切除術における術前化学放射線療法の意義 第 23 回日本消化器関連学会週間 2015 年 10 月 08 日~10 月 11 日 東京都

11. 小林省吾 当施設における肝内胆管癌の治療成績と病理学的リンパ節転移に関する検討 第 51 回日本肝癌研究会 2015 年 07 月 23 日~07 月 24 日 神戸市

12. 阪本卓也 胆道癌における HDAC 阻害剤を用いた上皮間葉転換と化学療法抵抗性の制御第 115 回日本外科学会定期学術集会 2015 年 04 月 16 日~04 月 18 日 名古屋市

13. 中島慎介 DNA 相同組換え修復阻害は胆道癌におけるゲムシタピン感受性を増加させ癌幹細胞分画を減少させる 第 115 回日本外科学会定期学術集 2015 年 04 月 16 日~04 月 16 日 名古屋市

〔図書〕(計 3 件)

1. 小林省吾、江口英利、後藤邦仁、和田浩志、友国晃、高橋秀典、秋田裕史、岩上佳史、山田大作、浅岡忠史、野田剛広、大植雅之、矢野雅彦、左近賢人、土岐祐一郎、森正樹 治療開始前にリンパ節転移陽性と診断した胆嚢癌に対する治療戦略 胆と膵 2018; 39(3): 275-281

2. 小林省吾、江口英利、後藤邦仁、和田浩志、友国晃、高橋秀典、秋田裕史、岩上佳史、山田大作、浅岡忠史、野田剛広、大植雅之、矢野雅彦、左近賢人、土岐祐一郎、森正樹 胆道癌に対する術前治療の可能性 臨床外科 2017; 742(13): 1440-1445

3. 小林省吾、後藤邦仁、丸橋繁、高橋秀典、秋田裕史、杉村啓二郎、三吉範克、本告正明、大森健、岸健太郎、能浦真吾、藤原義之、大植雅之、矢野雅彦、石川治、左近賢人 FDG-PET による胆嚢癌進展度診断 胆と膵 2015;36(1) 41-46

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)
取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 省吾(KOBAYASHI SHOGO)
大阪大学・医学系研究科・講師
研究者番号: 30452436

(2)研究分担者

1. 高橋 秀典(TAKAHASHI HIDENORI)
大阪国際がんセンター・消化器外科・副部長
研究者番号: 90601120

2. 井上 徳光(INOUE TOKUMITSU)
大阪国際がんセンター・研究所・総括研究員
(腫瘍免疫学部門長)
研究者番号: 80252708

3. 秋田 裕史(AKITA HIROFUMI)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 70528463

4. 後藤邦仁(GOTOH KUNIHITO)
大阪大学・医学系研究科・助教
研究者番号: 10362716

5. 冨田 裕彦(TOMITA YASUHIKO)
国際医療福祉大学・医学部・教授
研究者番号: 60263266

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし