

令和元年6月5日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K19881

研究課題名(和文)膵癌に対する化学放射線治療が癌微小環境に与える影響の探索と治療への応用

研究課題名(英文) Exploring the effect of chemoradiotherapy on cancer microenvironment and its clinical application in patients with pancreatic adenocarcinoma

研究代表者

村田 泰洋 (Murata, Yasuhiro)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20572655

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,500,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌に対する術前治療の組織学的効果は、切除前に評価することが困難であり、有用な治療効果マーカーの同定と応用が必要である。細胞外マトリックスの一つである Tenascin-C(TN-C)は癌細胞周囲に発現し、癌の浸潤・転移の促進への関与が示唆されており、化学放射線治療(CRT)が癌間質内TN-C発現に与える影響を解析し、治療効果マーカーとしての有用性を検証した。CRT施行後に膵切除術を施行した局所進行切除不能膵癌45例と膵切除術を先行した12例を対象に癌間質内のTNC発現を免疫組織学的に評価した結果、TN-C発現はCRTの組織学的効果と予後を反映する有用なマーカーである可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は予後不良の難治性消化器癌であり、外科治療のみではなく化学療法や放射線治療を主軸とした集学的治療の重要性が注目されている。膵癌に対する術前治療の組織学的効果は、切除前に評価することが困難であり、治療成績の向上のためには組織学的効果を反映するマーカーの同定が必要である。本研究の結果、膵癌間質内TNC発現は術前治療の組織学的効果判定や予後予測に有用な surrogate markerである可能性が示唆された。今後、血清や超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診などによる腫瘍内TNC発現のモニタリングが可能となれば、治療効果判定や切除適応決定など臨床応用が期待され、膵癌の予後改善に貢献することが期待される。

研究成果の概要(英文)：Tenascin-C (TN-C) is an extracellular matrix protein that is up-regulated in pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) stroma and associated with tumor invasion. We examined intratumor stromal expression of TN-C in resected specimens as an indicator of histological response to chemoradiotherapy (CRT) and prognosis in locally advanced unresectable (UR-LA) PDAC. TN-C expression was immunohistologically evaluated in 45 UR-LA PDAC patients who underwent resection after CRT and 12 who underwent up-front surgery. The intratumor expression of TN-C is significantly higher in the naive tumor tissue for 12 patients with up-front surgery than that for 45 UR-LA PDAC patients who were treated with CRT. Tenascin-C expression was inversely correlated with histologic response to CRT. In multivariate analysis, TN-C expression was a significant prognostic factor. Intratumor expression of TN-C may be useful as a surrogate for histological response and prognosis in PDAC patients with resection after CRT.

研究分野：膵臓外科学

キーワード：浸潤性膵管癌 化学放射線治療 組織学的効果 細胞外マトリックス Tenascin-C 癌微小環境

## 1. 研究開始当初の背景

浸潤性膵管癌(以下、膵癌)は予後不良の難治性消化器癌である。わが国における膵癌の年間死亡数は、厚生労働省平成29年人口統計では3万4224人と増加の一途をたどり、平成30年がん統計予測によると、年間罹患数が40000名に対して年間死亡数が34900名と、年間の罹患数と死亡数がほぼ同数となっている。診断時に切除可能と評価された膵癌に対しては、外科的切除すなわち癌遺残のない治療切除(R0切除)が、最も根治性の高い治療法であるが、膵癌は特徴的な自覚症状に乏しく、大部分の症例は発見時に切除不能な状態で診断されるほか、切除例の予後も本邦の膵癌登録報告(2001~2004年)によると3年生存率は23.2%であり、到底満足のいく成績ではない。これらを背景に、膵癌治療は外科治療のみではなく、化学療法を主軸とした集学的治療の重要性が注目されるようになり、局所進行切除不能膵癌や境界切除可能膵癌に対する化学療法と放射線治療を併用した化学放射線治療(CRT)を先行した手術治療が導入されるようになった結果、初回診断時に切除不能膵癌と診断された症例においても、腫瘍の縮小・消失が得られ、根治的な膵切除術を達成し得た症例の報告が増加し、その有効性が示されている。研究代表者の施設では2005年2月から、超音波内視鏡下穿刺吸引生検法(EUS-FNAB)にて膵癌の病理学的診断が得られた画像検査上、遠隔転移のない局所性膵癌を対象に、CRTを行い、再評価の後に、治療切除を目指した膵切除術を行う治療プロトコールの第II相試験を開始した。2017年6月までに計300例の膵癌症例に、本治療を実施し、抗癌剤は2005年2月~2011年10月までに登録した114例はgemcitabine(GEM)を、2011年11月から2017年6月までに登録した186例はS-1/GEM療法を用いた。300例中、CRT施行後に膵切除術を施行し得た膵癌172例の切除標本におけるCRTの組織学的効果をsuper responder(90%以上の腫瘍壊死、n=35)とnon-super responder(10%以下の腫瘍壊死、n=137)に分類し、R0切除率、予後との関係を検証した結果、super responderのR0切除率はnon-super responderよりも有意に高く(100 vs. 77.4%)、3、5年疾患特異的生存率(3、5-yr DSS rate)も有意に良好であることを明らかにしている(82.1、39.8 vs. 36.9、31.0%, p<0.01)。しかし、本治療の問題点として、Multidetector CTなどの鋭敏な画像検査を用いても、CRTの組織学的効果による腫瘍壊死(線維置換組織)と遺残腫瘍(viable tumor)を区別することが難しく、治療効果の判定が困難である点やCRT後の再評価にて潜在性遠隔転移が顕在化する症例や開腹手術時に腹膜播種、肝転移などの遠隔転移の存在が確認される症例も多数存在し、かかる症例の予後は有意に不良であった。これらの背景から、膵癌の治療成績のさらなる向上のためには、膵癌に対するCRTの組織学的治療効果を鋭敏に反映する生物学的指標の同定とその臨床応用が必須であると考えられる。

癌細胞の増殖には癌細胞を取りまく微小環境が重要であることが指摘されている。癌の間質には線維芽細胞、炎症細胞、免疫担当細胞のほか、結合組織が存在して特徴的な微小環境を構築している。癌微小環境は多様であり、癌細胞の増殖・浸潤・転移様式は、がん細胞自体のもつ特性のみならず、癌細胞と微小環境との相互関係が深く関わっている。膵癌は他の癌腫と比較して、豊富な細胞外基質を伴う過剰な間質増生(desmoplasia)を病理組織学的特徴とし、間質と癌細胞の相互作用がその進展に関わっており、特に細胞外マトリックスの一つであるTenascinC(TN-C)は、活性化膵星細胞により産生され、癌細胞周囲に発現し、癌の浸潤・転移の促進への関与が示唆されている。

これらを背景として、CRTが膵癌の癌微小環境に与える影響と治療抵抗性に関連する癌微小環境の特性を明らかにし、CRTの治療効果の代替マーカーを同定し、その臨床応用を行うために本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

本研究は、膵癌治療の主軸をなす化学放射線治療が、膵癌に特異的な癌微小環境に与える影響を明らかにし、治療効果の判定に有用となる生物学的指標を同定し、その臨床応用の可能性を検証する。具体的には(1)化学放射線治療が、膵癌の間質に存在する特異的な癌微小環境に与える影響を明らかにする。(2)化学放射線治療に抵抗性を示す膵癌細胞とそれらを取り巻く癌微小環境の特性を明らかにする。(3)化学放射線治療の治療効果を反映する生物学指標を同定し、臨床応用が可能かを明らかにすることである。

## 3. 研究の方法

CRTが癌間質内の細胞外マトリックスであるTN-Cの発現に与える影響をCRT施行例とCRT未施行例の膵癌組織を比較することによって解析するとともに、CRT施行例においてはCRTの組織学的効果との関連性を解析した。さらに予後因子解析を行うことにより、治療効果の代替マーカーとしての有用性を検証した。具体的にはCRT施行、CRT未施行例の膵癌患者を対象とし、ホルマリン固定切除標本を用いて、残存腫瘍細胞周囲間質のTN-Cの発現を免疫組織化学にて解析した。また、血清TN-CのCRT治療前後の動態を解析し、治療効果の代替マーカーとしての可能性を検証した。

対象：2005年2月から2015年12月に当院のCRTプロトコールに導入された局所進行切除不能膵癌110例のうち、CRT後に切除に至った46例においてCRTの組織学的評価を行うとともに、腫瘍が完全に消失した1例を除いた45例の切除標本において癌間質内TN-C発現を免疫組

組織学的に評価した。また Control として、CRT を施行せずに臍切除した up-front surgery 12 例においても同様に TN-C 発現を評価した。

CRT の組織学的効果は臍癌取り扱い規約第 7 版に基づいて評価し、high (50%以上腫瘍壊死; grade 2,3,4) と low responder (50%未満腫瘍壊死; grade 1a,1b) に分類した。また、免疫組織学的検討では、TN-C 染色領域が癌間質全体に占める割合が 5%以下の症例を negative、5%をこえて 20%以下の症例を weak、20%をこえて 60%未満の症例を intermediate、60%以上をこえる症例を strong と定義し、さらに negative と weak を TN-C 陰性、intermediate と strong を TN-C 陽性と分類定義した。Smooth muscle cells を internal positive control として用いて評価を行った。さらに、組織学的発現と血清 TN-C との関係性を調べる目的で最近(2015 年 2 月~2016 年 6 月)の CRT 前後の臍癌患者(n=48)の血清 TNC 値を ELISA 法で測定し、コントロール(健常者(n=3))と比較検討した。また、血清 TN-C の測定を行った 48 例中、CRT 後に臍切除術を施行した 9 例の切除標本における臍癌間質内 TN-C 発現との関連性を解析した。尚、本研究は、三重大学医学部倫理委員会の承認 (No. 2955, 3149) のもと実施、対象患者からは本臨床研究に対するインフォームドコンセントを得た。

#### 4 . 研究成果

研究代表者らは、CRT を施行した 45 例の局所進行切除不能臍癌と CRT を施行しなかった 12 例の切除可能臍癌の切除標本における癌細胞周囲に発現した臍癌関連細胞外マトリックスである TN-C 発現を比較検討した。CRT の組織学的効果と癌遺残度、予後(疾患特異的生存期間:DSS)との関係を見ると、high responder(n=12)は low responder (n=34)よりも高率に R0 切除(組織学的に遺残腫瘍なし)を達成しており(high vs. low responder の R0 切除率:83.3% vs. 47.1%)、DSS は high responder で有意に延長した (high vs. low responder の MST: 29.8 vs. 21 ヶ月、 $p=0.056$ )。この結果から、局所進行切除不能臍癌に対する CRT の組織学的効果は切除断端の陰性化に貢献することにより予後を改善する可能性が示唆された。免疫組織化学では TN-C は癌細胞周囲の間質に特異的に発現を認め、CRT の治療効果との関連を検証した結果、CRT 施行例は CRT 未施行例よりも有意に癌細胞周囲の TN-C 発現が低下していることを明らかにした(CRT 施行 vs. CRT 未施行の TNC 陽性率: 51.1 vs. 91.7%,  $p<0.01$ )。この結果から、CRT の影響により、臍癌間質内 TN-C 発現は低下する可能性が示唆された。また、CRT の組織学的効果と臍癌間質内 TN-C 発現との関係を見ると、high responder (n=12)は、low responder (n=34)よりも臍癌間質内 TN-C の発現が有意に低下していることを証明した(high vs. low responder の TN-C 発現陽性率: 18.2 vs. 61.8%,  $p=0.014$ )。CRT の組織学的効果(腫瘍壊死率)と臍癌間質内 TN-C の発現は逆相関を示し、CRT 施行後切除標本における臍癌間質内の TN-C 発現評価は CRT の組織学的治療効果を反映しており、surrogate marker としての有用性が示唆された。ついで、臍癌間質内 TNC 発現と予後(DSS)との関係を見ると、TN-C 陽性例(n=23) vs. TN-C 陰性例(n=22)の生存期間中央値、2、5 年生存率は 17.1、15.2、N/A vs. 29.3 か月、74.6%、13.8%であり、TN-C 発現陰性例の DSS は TN-C 陽性例よりも有意に良好であった( $p=0.001$ )。臨床病理学的因子による予後解析を行うと単変量解析では、化学放射線治療プロトコール(Gemcitabine/S1 plus gemcitabine)、リンパ管侵襲(Iy1-3/Iy0)、CRT の組織学的効果(low responder/high responder)、癌間質内 TN-C 発現(TN-C 陽性/TN-C 陰性)、術後補助化学療法の有無(無し/有り)が有意な因子であり、多変量解析では、癌間質内 TNC 発現(TN-C 陽性/TN-C 陰性)が疾患特異的生存期間の独立した予後規定因子であった(HR(95% CI): 0.20 (0.07-0.59),  $p=0.003$ )。組織学的効果(low responder/high responder)と癌間質内 TN-C 発現(TN-C 陽性/TN-C 陰性)の組み合わせによって、4 群間で予後解析を行った結果、high responder/TN-C 陰性(n=9)の予後は最も良好であり、high responder/TN-C 陽性(n=2)よりも有意に DSS が延長した。また、low responder/TNC 陰性(n=13)は low responder/TNC 陽性(n=21)よりも DSS が延長した。CRT 前臍癌患者(n=48) vs. CRT 後臍癌患者(n=48) vs. 健常者(n=3)の血清 TNC 値(中央値)は 34.3 vs. 48.9 vs.60.2 ng/ml で臍癌患者は健常者よりも血清 TNC 値が高値を示し、CRT 後にはさらに高値を示した(CRT 前 vs. CRT 後の血清 TN-C: 48.9 vs. 60.2,  $p=0.083$ )。CRT 後に臍切除を行った 9 例を対象に、血清 TN-C 値の変化と切除標本における臍癌間質内 TN-C 発現との関連性を検証したが、有意な関連性を認めず、血清 TN-C の治療効果マーカーとしての有用性はさらなる検証を要すると考えられた。

以上の結果から、残存癌間質 TNC 発現の存在は残存腫瘍の viability を反映し、CRT の治療効果、予後をより正確に surrogate する可能性が示唆された。今後、血清あるいは超音波内視鏡下穿刺吸引細胞診・生検(EUS-FNA)検体による腫瘍内 TNC 発現のモニタリングが可能となれば、術前治療後の臍切除術の適応決定にも応用するなど臨床応用、治療への応用が期待され、臍癌の予後改善に貢献することが期待される。

#### 5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Hayasaki A, Murata Y, Usui M, Hibi T, Ito T, Iizawa Y, Kato H, Tanemura A, Azumi Y, Kuriyama N, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Yoshida T, Isaji S. Clinical

Significance of Histological Effect and Intratumor Stromal Expression of Tenascin-C in Resected Specimens After Chemoradiotherapy for Initially Locally Advanced Unresectable Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Pancreas*. 2018 Apr;47(4):390-399. (査読あり)

早崎碧泉、村田泰洋、吉田利通、伊佐地秀司、局所進行膵癌に対する化学放射線治療の効果判定 組織学的効果判定と膵癌間質内 Tenascin-C 発現について(解説/特集)、胆と膵. 2017.05;38(5):485-492. (査読なし)

[学会発表](計6件)

早崎碧泉、村田泰洋、臼井 正信、飯澤 祐介、加藤 宏之、種村 彰洋、栗山 直久、安積 良紀、岸和田 昌之、水野 修吾、櫻井 洋至、吉田 利通、伊佐地 秀司、局所進行切除不能膵癌に対する化学放射線治療先行手術の治療成績-病理学的効果判定における癌間質 TenascinC 発現評価の重要性-第 21 回 日本外科病理学会学術集会、2016 年

Murata Y, Usui M, Hayasaki A, Iizawa Y, Kato H, Tanemura A, Kuriyama N, Azumi Y, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Yoshida T, Isaji S, Clinical significance of conversion surgery after gemcitabine plus S-1 based chemoradiotherapy in patients with initially locally advanced unresectable pancreatic adenocarcinoma: application of intratumoral expression of Tenascin C as a surrogate marker, 第 47 回日本膵臓学会大会、2016 年

村田 泰洋、早崎 碧泉、臼井 正信、栗山 直久、安積 良紀、岸和田 昌之、水野 修吾、櫻井 洋至、吉田 利通、伊佐地 秀司、局所進行膵癌に対する化学放射線治療における癌間質 Tenascin C 発現の surrogate marker としての有用性、第 28 回日本肝胆膵外科学会・学術集会、2016 年

村田 泰洋、臼井 正信、早崎 碧泉、飯澤 祐介、加藤 宏之、種村 彰洋、栗山 直久、安積 良紀、岸和田 昌之、水野 修吾、櫻井 洋至、吉田 利通、伊佐地 秀司、浸潤性膵管癌に対する化学放射線治療の組織学的効果の意義 膵癌間質内 Tenascin C 発現の biomarker としての有用性の検証、第 116 回日本外科学会定期学術集会、2016 年

Hayasaki A, Murata Y, Usui M, Kishiwada M, Mizuno S, Sakurai H, Yoshida T, Isaji S, Intratumoral Expression of Tenascin C is a Potential Surrogate Marker for Histological Effect of Chemoradiotherapy in Locally Advanced Pancreatic Cancer Patients, 46<sup>th</sup> Annual Meeting of American Pancreatic Association, 2015 年

村田 泰洋、臼井 正信、岸和田 昌之、加藤 宏之、種村 彰洋、栗山 直久、安積 良紀、水野 修吾、櫻井 洋至、吉田 利通、伊佐地 秀司、局所進行膵癌に対する化学放射線治療における腫瘍内 TenascinC 発現の臨床的意義の検討、第 46 回日本膵臓学会、2015 年

村田 泰洋、臼井 正信、水野 修吾、岸和田 昌之、加藤 宏之、種村 彰洋、栗山 直久、安積 良紀、櫻井 洋至、吉田 利通、伊佐地 秀司、浸潤性膵管癌に対する化学放射線治療法後切除例における組織学的効果の臨床的意義 腫瘍内 Tenascin C 発現の surrogate marker としての有用性の検討、第 115 回日本外科学会定期学術集会、2015 年

[図書](計0件)

[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)研究分担者

研究分担者氏名:

ローマ字氏名:

所属研究機関名:

部局名:

職名:

研究者番号(8桁):

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：  
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。