

機関番号：37104

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 2008 年度 ～ 平成 2010 年度

課題番号：20591597

研究課題名 (和文) 大腸癌に対するメトロノミック化学療法における循環血管内皮前駆細胞の意義

研究課題名 (英文) Significance of circulating endothelial progenitor cells in metronomic chemotherapy against colorectal cancer

研究代表者 緒方 裕 (Yutaka Ogata)

久留米大学・医学部・教授

研究者番号：20177124

研究成果の概要 (和文)：

(Preclinical model)

マウス背部皮下大腸癌移植モデルを用いたCPT-11およびbevacizumabによる抗腫瘍効果の検討から、metronomic CPT群 (2回/週の低用量頻回投与群) はMTD CPT群 (2週間隔投与群) に比べ有意に強い増殖抑制効果を示した。特異的血管新生阻害剤bevacizumabとmetronomic CPT併用では、さらに強い抗腫瘍効果がみられた。

コントロールとMTD群では循環内皮前駆細胞 (CEP) および循環血管内皮細胞 (CEC)、いずれも経時的に増加するのに対し、metronomic群やbevacizumab併用群ではDays-0, 4, 8, 15におけるCEPは低値で増加を認めなかった。Day-15のCEPはコントロールに比べ有意に低値であった。一方、CECは抗腫瘍効果の強いmetronomic群やbevacizumabとmetronomic CPT併用群ではdays-4, 8に一過性に増加し、day-15で低下するパターンを示した。Day-15の腫瘍組織の血管密度はmetronomic群とbevacizumab併用群で有意に低値であった。

以上より、CPT-11を用いたmetronomic therapyの血管新生抑制作用による抗腫瘍効果が示唆された。また、循環内皮前駆細胞のモニタリングは血管新生抑制のサロゲートマーカーになり得ることが示された。

(進行・再発大腸癌臨床例)

FOLFOX または FOLFIRI 施行例 (MTD 治療、n=3) と経口剤を用いた XELOX (metronomic 治療、n=4) 前後の CEP の推移を検討した。初回治療前と 2 週後に CEPs を測定した。臨床例における CEPs は個人差が大きく、前後値の増減により metronomic 治療における CEPs の抑制効果を検討している。現在まで、CEPs の減少は MTD 群が 3 例中 1 例、metronomic 群が 4 例中 2 例にみられたが、今後症例の集積が必要である。

研究成果の概要 (英文)：

Aim of the study is to clarify the antitumor efficacy of metronomic chemotherapy using irinotecan (CPT-11) combined with or without bevacizumab against colon cancer, and the significance of circulating endothelial cell (CEC) and endothelial progenitor cell (CEP) as a surrogate marker for the metronomic chemotherapy. KM12SM cells were implanted into the subcutis of nude mouse. After confirming that the implanted tumor had grown 5 mm in size, the Group A received intraperitoneal injection of 40 mg/kg CPT-11 every two weeks for 4 weeks [conventional maximum tolerated dose (MTD)], the Group B received 10 mg/kg twice per week (metronomic), the Group C received 10 mg/kg

twice per week combining with 5 mg/kg bevacizumab twice per week (metronomic+antiangiogenic), and the Control Group received 0.2 ml of PBS every week. Serial changes of CEC and CEP in peripheral blood and microvessel density (MVD) in tumor tissues was evaluated. The results show that the antitumor activity in the Group B and in the Group C was significantly higher than that in the Group A. A significant inhibition in CEP on day 15 in the metronomic therapy Group B and Group C was found compared with that in the Control Group. Whereas there was no significant difference in CEC and CEP between each group on days 4 and 8, there was difference in pattern of changes between CEP and CEC in the metronomic groups. The CEP was consistently inhibited until day 15, while the CEC tended to increase at day 4 and then decrease at day 15. The MVD on day 15 in the metronomic groups was significantly lower than that in the Group A. In conclusion, metronomic chemotherapy of CPT-11 with or without bevacizumab for colon cancer was more effective than the MTD therapy via antiangiogenic effects. Sequential measurement of CEP may be a predictive factor for the efficacy and a decisive factor for optimal dose of metronomic therapy in colon cancer.

#### 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
平成 20 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成 21 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
平成 22 年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科

キーワード： Metronomic chemotherapy、CPT-11、循環内皮前駆細胞（CEP）、循環血管内皮細胞（CEC）、Colon cancer、腫瘍内血管密度、Bevacizumab、血管新生抑制

#### 1. 研究開始当初の背景

5-fluorouracil (5-FU)/ロイコボリン(LV)に塩酸イリノテカン(CPT-11)やプラチナ製剤オキザリプラチン(L-OHP)を加えた併用療法(FOLFOX, FOLFIRI)が大腸癌に対する標準治療として確立している。さらに欧米では、vascular endothelial growth factor (VEGF)やepidermal growth factor receptor (EGFR)に対する抗体など分子標的治療剤の上乗せ効果が示されており(Hurwitz et al. JCO 2004;350:2235-42, 2004)、本邦でもVEGF抗体bevacizumabが保険承認された。しかし、分子標的薬剤には費用対効果など医療経済

面からの懸念があり、適性使用にあたっては効果予測因子などから効果例選別の必要性が指摘されている。

一方、Karbelら(J Clin Invest. 2000;105:R15-24, Nat Rev Cancer 2004; 4:423-36)によって提唱されているmetronomic chemotherapyは、抗癌剤の血管内皮細胞や骨髄の内皮前駆細胞に対する持続的阻害による血管新生抑制効果を期待した化学療法であり、休薬期間を設けず抗癌剤を低用量・頻回または持続投与することによって抗腫瘍効果がもたらされる。本邦で頻用さ

れている経口フッ化ピリミジンはかかる観点から最適の薬剤であり (Kato H et al. *N Engl J Med.* 2004;350:1713-21, Munoz R et al. *Cancer Res* 2006;66:3386-91)), 大腸癌に対する経口剤を併用した metronomic chemotherapy の確立が期待される。

従来、血管新生は局所に存在する分化した血管内皮細胞の分裂により起こると考えられてきたが、骨髄由来の循環内皮前駆細胞 (CEP) が VEGF により末梢血管に移動させられ腫瘍血管新生に関与することが明らかにされた (Asahara T et al. *Science* 1997;275:964, Rafii S et al. *Nat Rev Cancer* 2002; 2:826) (図1)。抗血管新生効果を得るためには CEP の動員や生存を抑制することが必要となってくる。担癌マウスを用いた実験で、抗癌剤の最大耐容量 (MTD) 投与群では投与期間中に減少した CEP が休薬期間に著増したのに対して、metronomic chemotherapy 群では CEP はほぼ消失し、腫瘍の増殖もみられないことが報告されている (Bertolini F et al. *Cancer Res* 2003;63:4342-6)。また、CEP の生存率も MTD 群に比べ metronomic chemotherapy 群が低率であった。以上より、metronomic chemotherapy および血管新生阻害剤を用いた治療では CEP が用量、用法設定の指標や効果の surrogate marker となる可能性が期待される。

本邦では進行・再発大腸癌に対し経口フッ化ピリミジンを併用した IRIS (CPT-11/S-1) 療法が検討され、phase II 臨床試験にて FOLFIRI と同等の効果が示唆されている (Goto A et al. *Ann Oncol.* 2006 Jun;17(6):968-73)。また、欧米では L-OHP/capecitabine 併用療法の FOLFOX と同等の抗腫瘍効果が示されており (Santini D et al. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2006 Aug 31; [Epub ahead of print])、経口フッ化ピリミジンを併用した metronomic

chemotherapy の展開が期待される。しかし、経口剤に併用する薬剤の用量設定や用法を metronomic chemotherapy として、どのように確立していくか重要な課題があり、また経口剤に併用する薬剤を metronomic に投与することの意義や metronomic chemotherapy に血管新生阻害剤を併用する意義については不明な点が多い。

## 2. 研究の目的

metronomic chemotherapy や血管新生阻害剤 (bevacizumab) の効果予測因子としての CEP の意義を明らかにする。

ヌードマウス移植大腸癌における CPT-11 投与方法別 (MTD と metronomic 分割頻回投与)、bevacizumab 投与方法別およびその併用投与の経時的 CEP および循環血管内皮細胞 (CEC) と抗腫瘍効果との関連を明らかにし、CEP が metronomic chemotherapy としての CPT-11 投与方法を決定する指標、また bevacizumab 治療における血管新生抑制の surrogate marker に成り得るか検討する。

## 3. 研究の方法

方法1 マウス背部皮下腫瘍移植モデルを用いたCPT-11およびBevacizumabによる抗腫瘍効果の検討

動物：ヌードマウス (BALB/c nu/nu)

細胞：VEGF高発現大腸癌株 KM12SM

薬剤：CPT-11、Bevacizumab (VRGF抗体、血管新生阻害剤)

- ① KM12SM  $10^6$  cells/0.2ml PBSをヌードマウス背部皮下に移植。
- ② CPT-11の2週間における総投与量を40 mg/kgに設定し、2週間隔投与群 (MTD 投与)、低用量頻回投与群 (2回/1週) (metronomic投与) に分け腫瘍径約5mmの時点よりそれぞれCPT-11の腹腔内投与を開始。

- ③ Bevacizumabにおいては、5mg/kgを2回/1週の間隔で腫瘍径約5mmの時点より腹腔内投与を開始。
- ④ それぞれの群において腫瘍径・推定腫瘍重量の測定をDay1～Day29まで行い抗腫瘍効果について検討。
- ⑤ さらにはCPT-11の低用量頻回投与とB evacizumab併用による抗腫瘍効果についても検討。

#### 方法2 フローサイトメトリーを用いた血管内皮細胞および血管内皮前駆細胞の測定

- ① CPT-11およびB evacizumabによる抗腫瘍効果の検討と平行して、Flowcytometryによる血管内皮細胞および血管内皮前駆細胞の測定。
- ② 検体はマウス末梢血。犠牲死させ心臓より採取。
- ③ 血管内皮細胞の同定: CD45- Flk+ CD31+ CD117-
- ④ 血管内皮前駆細胞の同定: CD45- Flk+ CD31+ CD117+
- ⑤ さらにViable cell、Apoptosis cellを7AADにて判別。

#### 方法3 免疫組織学的検討

腫瘍増殖抑制効果の検討に使用した腫瘍組織を用いて、免疫組織学的染色によってVEGF発現やanti-mouse CD31を用いた微小血管密度を評価し、metronomic chemotherapyのVEGF発現への影響や抗血管新生作用について検討し、さらにはフローサイトメーターによって得られたCEPやCECとの関連性を解析する。

#### 4. 研究成果

マウス背部皮下大腸癌移植モデルを用いたCPT-11およびbevacizumabによる抗腫瘍効果の検討から、metronomic CPT群（2回/週の低用量頻回投与群）はMTD CPT群（2週間隔投与群）に比べ有意に強い増殖抑制

効果を示した。特異的血管新生阻害剤bevacizumabとmetronomic CPT併用では、さらに強い抗腫瘍効果がみられた。

コントロールとMTD群では循環内皮前駆細胞（CEP）および循環血管内皮細胞（CEC）、いずれも経時的に増加するのに対し、metronomic群やbevacizumab併用群ではDays -0, 4, 8, 15におけるCEPは低値で増加を認めなかった。Day-15のCEPはコントロールに比べ有意に低値であった。一方、CECは抗腫瘍効果の強いmetronomic群やbevacizumabとmetronomic CPT併用群ではdays-4, 8に一過性に増加し、day-15で低下するパターンを示した。Day-15の腫瘍組織の血管密度はmetronomic群とbevacizumab併用群で有意に低値であった。

以上より、CPT-11を用いたmetronomic therapyの血管新生抑制作用による抗腫瘍効果が示唆された。また、循環内皮前駆細胞のモニタリングは血管新生抑制のサロゲートマーカーになり得ることが示された。（進行・再発大腸癌臨床例）

FOLFOX または FOLFIRI 施行例（MTD治療、n=3）と経口剤を用いた XELOX（metronomic治療、n=4）前後のCEPの推移を検討した。初回治療前と2週後にCEPsを測定した。臨床例におけるCEPsは個人差が大きく、前後値の増減によりmetronomic治療におけるCEPsの抑制効果を検討している。現在まで、CEPsの減少はMTD群が3例中1例、metronomic群が4例中2例にみられたが、今後症例の集積が必要である。

#### 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3件）

1. Mizobe T, Ogata Y, Murakami H, Akagi Y,

- Ishibashi N, Mori S, Sasatomi T, Shirouzu K: Efficacy of the combined use of bevacizumab and irinotecan as a postoperative adjuvant chemotherapy in colon carcinoma. *Oncol Rep*, 20:517-523, 2008 (査読有り)
2. Ogata Y, Sasatomi T, Akagi Y, Ishibashi N, Mori S, Shirouzu K: Dosage escalation study of S-1 and irinotecan in metronomic chemotherapy against advanced colorectal cancer. *Kurume Med J*, 56:1-7, 2009 (査読有り)
  3. Murakami H, Ogata Y, Akagi Y, Ishibashi N, Shirouzu K: Circulating endothelial progenitor cells in metronomic chemotherapy using irinotecan and/or bevacizumab for colon carcinoma: Study of their clinical significance. *Exp Ther Med*, 2:595-600, 2011 (査読有り)

[学会発表] (計 4 件)

1. 第54回国際外科学会日本部会 (東京) 2008年6月7日 Murakami H, Ogata Y, et al. Antitumor efficacy of metronomic chemotherapy using CPT-11 and bevacizumab for colon cancer in nude mice.
2. The 20<sup>th</sup> International Union Against Cancer (UICC) World Cancer Congress (ジュネーブ) 2008年8月30日 Murakami H, Ogata Y, et al. Antitumor efficacy of metronomic chemotherapy using CPT-11 and bevacizumab for colon carcinoma in nude mice.
3. 第46回日本癌治療学会総会 (名古屋) 2008年10月31日 村上英嗣、緒方 裕、他 大腸癌に対するCPT-11低用量頻回投与 (metronomic chemotherapy)

およびbevacizumab併用療法の抗腫瘍効果についての検討

4. The 34<sup>th</sup> ESMO (ベルリン) 2009年9月23日 Ogata Y, Murakami H, et al. A significance of circulating endothelial progenitor cells in metronomic chemotherapy using CPT-11 and bevacizumab for colon carcinoma.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 出願年月日：  
 国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
 発明者：  
 権利者：  
 種類：  
 番号：  
 取得年月日：  
 国内外の別：

[その他]

ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

緒方 裕 (Yutaka Ogata)  
 久留米大学・医学部・教授  
 研究者番号：20177124

##### (2) 研究分担者

村上英嗣 (Hidetsugu Murakami)  
 久留米大学・医学部・助教  
 研究者番号：40421317

##### (3) 連携研究者

( )  
 研究者番号：