

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月25日現在

機関番号：72602

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591741

研究課題名（和文） 大腸癌化学療法-血管新生阻害剤に対するバイオマーカー

研究課題名（英文） Biomarkers in advance colorectal cancer patients treated with bevacizumab-containing chemotherapy.

研究代表者

松阪 諭（MATSUSAKA SATOSHI）

公益財団法人がん研究会・がん化学療法センター臨床部・研究員

研究者番号：80396572

研究成果の概要（和文）：

大腸癌に対する bevacizumab の効果予測因子として、末梢循環癌細胞 (CTC)、末梢循環血管内皮細胞 (CEC) および末梢循環血管内皮前駆細胞 (CEP) に注目し研究を行った。bevacizumab の効果予測に、治療開始前の CEC、特に CXCR4 陽性 CEC および bevacizumab 投与 4 日目の CEP が有用であることを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

This study investigated the prognosis of metastatic colorectal cancer treated with bevacizumab in combination with chemotherapy, focusing on circulating tumor cells, endothelial cells, and endothelial progenitors. We concluded the CEC status at the baseline and CEP on the day4 was correlated with the prognosis of patients treated with bevacizumab, suggesting that CEC, especially CXCR4-positive CEC, and CEP status may be useful in estimating prognosis.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	3,000,000	900,000	3,900,000
2010年度	500,000	150,000	650,000
2011年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	4,000,000	1,200,000	5,200,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌、化学療法薬、バイオマーカー、血管新生抑制剤、bevacizumab、末梢循環癌細胞 (CTC)、末梢循環血管内皮細胞 (CEC)、末梢循環血管内皮前駆細胞 (CEP)

1. 研究開始当初の背景

大腸癌に対する化学療法薬のバイオマーカーとして最も汎用されているのは、腫瘍マーカーでの一つである CEA であるが、オキ

サリプラチン併用化学療法においては、治療効果良好な症例においても、投与後一過性に CEA が上昇することがあり、CEA 値に

よる効果判定は推奨できない事が ASCO 勧告で報告されている。新規化学療法薬の開発により、腫瘍マーカー以外の有用なバイオマーカーの確立が必要である。大腸癌化学療法における化学療法の飛躍的な効果を認めるに至る薬剤として、分子標的治療薬のうち、抗 EGFR 抗体薬の効果予測因子として KRAS 遺伝子変異検査が有用であることが確認された。しかし血管新生抑制剤である bevacizumab の効果予測因子は確立されていない。

## 2. 研究の目的

Bevacizumab はこれまでの薬剤と異なり、標的とする細胞が血管内皮細胞であること、さらに大腸癌においては、bevacizumab は抗がん剤との併用投与のため、bevacizumab の効果予測因子の探索は非常に困難である。本研究では、末梢循環癌細胞 (CTC)、末梢循環血管内皮細胞 (CEC) および末梢循環血管内皮前駆細胞 (CEP) における Bevacizumab の効果予測における有用性を検討した。

## 3. 研究の方法

### 1. CTC 測定法

1.1. 末梢静脈血 10ml を採血し、保存剤入り専用採血管に注入する。検体は室温で保存し採血後 72 時間以内に解析を開始する。

1.2. 上皮細胞接着分子 Epithelial Cell Adhesion Molecule (EpCAM) に対する抗体に鉄を結合させたものを細胞と反応させ磁気で収集し、上皮細胞を濃縮させる (CellSearch System)。

1.3. 核の認識は蛍光核酸染色 4,2-diamidino-2phenylindole dihydrochloride (DAPI) にて発色させて行う。

1.4. 上皮細胞の標識は phycoerthrin (PE)

蛍光標識した抗 cytokeratin 8, 18, 19 モノクローナル抗体を反応させて行う。

1.5. 白血球の認識は allophycocyan (APC) 蛍光標識した抗 CD45 モノクローナル抗体を反応させて行う。

1.6. 癌細胞の候補である cytokeratin 陽性、CD45 陰性細胞、DAPI 陽性細胞を CellSpotter Analyzer によって蛍光合成イメージで収集する。

1.7. 破損した癌細胞および断片のイメージを除外し、形態が保全された細胞を癌細胞として同定しカウントする。

### 2. CEC の測定法

2.1. 末梢静脈血 10ml を採血し、保存剤入り専用採血管に注入する。検体は室温で保存し、採血後 72 時間以内に解析を開始する。

2.2. CD146 に対する抗体に鉄を結合させたものを細胞と反応させ磁気で収集し、上皮細胞を濃縮させる (CellSearch System)。

2.3. 核の認識は蛍光核酸染色 4,2-diamidino-2phenylindole dihydrochloride (DAPI) にて発色させて行う。

2.4. 内皮細胞の標識は phycoerthrin (PE) 蛍光標識した抗 CD105 抗体を反応させて行う。

2.5. 白血球の認識は allophycocyan (APC) 蛍光標識した抗 CD45 モノクローナル抗体を反応させて行う。

2.6. CEC である CD105 陽性、CD45 陰性細胞、DAPI 陽性細胞を CellSpotter Analyzer によって蛍光合成イメージで収集する。

2.7. 破損した細胞および断片のイメージを除外し、形態が保全された細胞を同定しカウントする。

3. 治療開始時の CTC および CEC の測定
- 3.1. 治療開始予定患者に採血 20ml を行う。

4. 治療 2 週間後、1 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後の CTC および CEC の測定
- 4.1. 治療 2 週間後、1 ヶ月後、2 ヶ月後、4 ヶ月後に採血 20ml を行う。

5. フローサイトメーター法による解析
- 5.1. CEC は、CD146 抗体陽性、CD31 抗体陽性、CD133 陰性、CD45 抗体陰性の細胞として分類し、CEP は、CD146 抗体陽性、CD31 抗体陽性、CD133 陽性、CD45 抗体陰性の細胞として分類し測定する。
- 5.2. 採取された血液細胞の表面マーカー (CD146, CD31, CD133, CD34, CD105, CD45, VEGFR1, VEGFR2, CXCR4, Tie-2 等) の発現をフローサイトメーター法で解析する。

#### 4. 研究成果

末梢循環大腸癌細胞 (Circulating tumor cell : CTC) が、bevacizumab 併用化学療法の効果予測因子として有効であることを本邦で初めて報告した。さらに FOLFOX の効果療法群における CEA の一過性偽上昇の症例に対しても、CTC は治療開始 2 週間目 (2 コース開始前) に 3 以下になることを明らかにした。しかし FOLFOX においても、FOLFOX+bevacizumab においても、CTC 値が 3 個以上の症例は治療効果を認めない事は明らかであるが、bevacizumab 自体の治療効果の予測は不可能であった。そこで末梢血中血管内皮細胞 (Circulating endothelial cell: CEC) および血管内皮前駆細胞 (Circulating endothelial progenitor: CEP) に注目した。Bevacizumab 併用療法において、治療開始前の CEC 値が

低値症例は、高値症例に比べ PFS および OS が有意に延長する事を明らかにした。また、高値症例は FOLFOX 症例群の PFS とほぼ同じであり、Bevacizumab を併用する benefit を認めない事が示唆された。さらに bevacizumab 治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が、さらに bevacizumab 治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が、bevacizumab の治療効果予測因子であることを報告した。PD 症例は non-PD 症例に比べ有意に治療開始前の CXCR4 陽性 CEC が高値であること、治療開始前の CXCR4 陽性 CEC 値が低値症例は、高値症例に比べ PFS および OS が有意に延長する事を報告した。Bevacizumab 投与 4 日目の CEP 値が低値症例は、CEP 値が高値症例に比べて、PFS および OS が有意に延長することを報告した。

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 15 件)

1. Matsusaka S, Mishima Y, Suenaga M, Terui Y, Kuniyoshi R, Mizunuma N, Hatake K. Circulating endothelial progenitors and CXCR4-positive circulating endothelial cells are predictive markers for bevacizumab. *Cancer*. 117: 4026-32, 2011.
2. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Kuniyoshi R, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci*. 102(6):1188-92, 2011.

3. Matsusaka S, Suenaga M, Mishima Y, Takagi K, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating endothelial cells predict for response to bevacizumab-based chemotherapy in metastatic colorectal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol.* 68(3):763-8, 2011
  4. Suenaga M, Matsusaka S, Ueno M, Yamamoto N, Shinozaki E, Mizunuma N, Yamaguchi T, Hatake K. Predictors of the efficacy of FOLFIRI plus bevacizumab as second-line treatment in metastatic colorectal cancer patients. *Surgery Today.* 41(8):1067-74, 2011.
  5. Suenaga M, Matsusaka S, Watanabe T, Kuboki Y, Shinozaki E, Chin K, Mizunuma N, Ueno M, Yamaguchi T, Hatake K. How do we apply adjuvant FOLFOX to Japanese patients with curatively resected colorectal cancer? *Asia Pac J Clin Oncol.* 7(2):129-35, 2011.
  6. Matsusaka S, Chin K, Ogura M, Suenaga M, Shinozaki E, Mishima Y, Terui Y, Mizunuma N, Hatake K. Circulating tumor cells as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer. *Cancer Sci.* 101(4):1067-71, 2010.
  7. Suenaga M, Mizunuma N, Kobayashi K, Shinozaki E, Matsusaka S, Chin K, Kuboki Y, Ichimura T, Ozaka M, Ogura M, Fujiwara Y, Matsueda K, Konishi E, Hatake K. Management of venous thromboembolism in colorectal cancer patients treated with bevacizumab. *Med Oncol.* 27(3):807-14, 2010.
  8. Suenaga M, Mizunuma N, Chin K, Matsusaka S, Shinozaki E, Oya M, Ueno M, Yamaguchi T, Muto T, Konishi F, Hatake K. Chemotherapy for small-bowel Adenocarcinoma at a single institution. *Surg Today.* 39(1):27-31, 2009.
  9. Suenaga M, Mizunuma N, Shouji D, Shinozaki E, Matsusaka S, Chin K, Oya M, Yamaguchi T, Muto T, Hatake K. Modified irinotecan plus bolus 5-fluorouracil/L-leucovorin for metastatic colorectal cancer at a single institution in Japan. *J Gastroenterol.* 43(11):842-8, 2009.
  10. 松阪 諭 抗体医薬に対するバイオマーカー *医学のあゆみ* 228: 1105-1108, 2009
  11. 松阪 諭 CEC とベバシズマブ感受性予測 *腫瘍内科* 3: 229-232, 2009
  12. 松阪 諭 抗 VEGF モノクローナル抗体 Bevacizumab とバイオマーカー *大腸癌 FRONTIER* 2: 39-43, 2009
  13. 松阪 諭 大腸癌化学療法のバイオマーカー *癌と化学療法* 36(1): 11-14, 2009
  14. 松阪 諭 CRO と SMO Drug Delivery System *25(6): 615-616, 2010*
  15. 松阪 諭 Bevacizumab のバイオマーカー *腫瘍内科* 6(3): 261-265, 2010
- [学会発表] (計 6 件)
1. Matsusaka S, et al. Circulating Tumor Cells and Circulating Endothelial Cells are useful as surrogate

- markers for FOLFOX4 with or without bevacizumab in mCRC.  
ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2009
2. Matsusaka S, et al.  
Circulating tumor cells (CTCs) as a surrogate marker for determining response to chemotherapy in advanced gastric cancer (AGC)  
ASCO annual meeting, Orlando, FL, 2009
3. Matsusaka S, et al.  
Are circulating tumor cells (CTC) and EGFR status of CTC useful as a surrogate marker for determining response to cetuximab in metastatic colorectal cancer?  
ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2010
4. Matsusaka S, et al.  
Use of day 4 CEP and baseline CXCR4 plus CEC as predictive markers for bevacizumab in mCRC.  
ASCO annual meeting, Chicago, 2010
5. Matsusaka S, et al.  
Use of circulating tumor cells to predict response to chemotherapy in patients with advanced gastric cancer.  
ASCO Gastrointestinal Cancer Symposium, San-Francisco, 2011
6. Matsusaka S, et al.  
Tie2-expressing myeloid cells are predictive marker for bevacizumab-containing chemotherapy in metastatic colorectal cancer.  
The European Multidisciplinary Cancer Congress, Stockholm, 2011

〔図書〕(計1件)  
松阪 諭 CTC によるトランスレーショナル  
ルレサーチ  
細胞工学別冊がん転移臨床と研究の羅針盤  
176-179, 2010

〔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  
なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者 (松阪 諭)

研究者番号：80396572

(2)研究分担者 ( )

研究者番号：

(3)連携研究者 ( )

研究者番号：