

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 16 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25462051

研究課題名(和文) 直腸癌術前化学放射線療法後の再発機序と宿主依存性因子の解明

研究課題名(英文) Identification of host-related factors of tumor recurrence and prognosis in rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy

研究代表者

三枝 晋 (SAIGUSA, SUSUMU)

三重大学・医学(系)研究科(研究院)・リサーチアソシエイト

研究者番号：10632383

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：直腸癌術前化学放射線療法(CRT)後再発・予後関連因子を癌間質に着目し検討した。癌間質CD26発現は再発・予後と有意な関連を認め、癌間質特異的な再発・予後関連因子が存在することが示された。癌間質CD8及びFoxp3陽性細胞と再発・予後に有意な関連を認め、T細胞活性を制御するprogrammed death ligand 1(PD-L1)発現とCD8陽性細胞数は、負の相関を認め、PD-L1高発現は、再発・予後に有意に関連していた。これらの結果から、直腸癌術前CRT後再発・予後における癌間質の重要性が示され、癌間質の制御が治療効果の向上、再発・予後の改善に寄与する可能性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study is to clarify host-related factors of tumor recurrence and prognosis in rectal cancer patients treated with preoperative chemoradiotherapy (CRT). Stromal CD26 expression, but not cancer CD26 expression, was significantly correlated with tumor recurrence and prognosis. High levels of both infiltrating CD8- and Foxp3-positive cells in cancer stroma were significantly associated with tumor recurrence and poor prognosis. programmed death ligand 1(PD-L1) expression which play a central role in tumor-immune system interactions was significantly associated with tumor recurrence and poor prognosis. Our data reveal important roles of cancer stroma for tumor recurrence and prognosis and suggest that combination of preoperative CRT and immunotherapy such as ant-PD-L1 antibody may contribute to enhancement of therapeutic effect and improvement of prognosis in patients with rectal cancer after preoperative CRT.

研究分野：消化器癌

キーワード：直腸癌 化学放射線療法 癌間質 再発・予後

1. 研究開始当初の背景

直腸癌の治療成績は、術前化学放射線療法 (chemoradiotherapy: CRT) 及び直腸間膜全切除により、局所再発率約 5% と良好な成績が報告されている。しかしながら、遠隔再発率は未だ 15~20% と未だ高率である。このように、直腸癌の遠隔再発の制御無くして、更なる予後の改善は期待できない。癌間質は癌周囲の線維芽細胞、炎症細胞、血管及びリンパ管内皮細胞、細胞外基質等から構成されており、近年、癌-癌間質の相互作用が癌増殖・進展に重要な役割を担っていることが報告されている。癌増殖・進展・転移に癌間質の重要性が注目されつつあるが、直腸癌 CRT 後癌間質の評価に関する報告は未だ少なく、癌-癌間質の相互作用の解明は、更なる治療効果の向上及び予後の改善に繋がると考えられる。

2. 研究の目的

本邦において、直腸癌に対し、術前 CRT を施行している施設は未だ少ない。当科では 2000 年より、術前 CRT を積極的に導入しており、現在までに 100 例以上の症例蓄積を認める。この臨床検体を用い、癌間質の遺伝子・蛋白発現を検討し、術前 CRT 後再発・予後に関連する因子を同定する。CRT 後の微小環境：癌間質は、術前補助療法未施行症例と比し、異なることが報告されており、その相違、変化の解析は直腸癌 CRT 後局所、遠隔再発の機序解明に大きな進展を与えられとされる。CRT 後においても、癌のみならず、癌間質の制御は重要と考えられ、癌-癌間質の相互作用の解明は、更なる治療効果の向上及び予後の改善に繋がると考えられる。本研究は癌間質に注目し、直腸癌 CRT 後の癌増殖・進展・転移に関わる宿主依存性因子を遺伝子・蛋白発現レベルで検討する。近年、オキサリプラチンやイリノテカンなどの新規抗癌剤の導入、更にペバシツマブやセツキシマブなどの分子標的治療剤の導入により、大腸癌化学療法の治療成績は大きく改善された。しかしながら、抗癌剤の標的の主は、癌細胞であり、癌微小環境を制御しているとは言えない。癌増殖、転移に宿主環境が大きく影響しており、サイトカイン・ケモカインは癌-間質相互作用に重要な役割を担っていると考えられる。更に、免疫担当細胞 (tumor infiltrating lymphocytes: TILs) の役割も重要であり、これらの機序を明らかにし、癌増殖・浸潤に有利に働くサイトカイン・ケモカイン及び宿主反応を制御することにより、更なる治療効果が期待できると考えられる。更に、癌免疫療法の発展も著しく、CRT 後癌間質の免疫担当細胞の動態を解明することで、CRT と癌免疫療法の併用療法へのエビデンス確立にも貢献する可能性がある。

3. 研究の方法

本研究計画は、当科において直腸癌と診断され、術前化学放射線療法 (CRT) を施行した症例を対象に行った。切除標本のパラフィン

包埋切片より、マイクロダイセクション法にて癌間質を採取し、RNA 抽出後、マイクロアレイにて再発症例において特異的に高い遺伝子 (サイトカイン・ケモカイン) の同定を試みたが、癌間質より採取した cDNA の quality にばらつきを認めたため、マイクロアレイは施行せず、蛋白発現に重点を置き、免疫組織化学染色を主たる評価方法とした。<癌間質免疫担当細胞と前術補助療法後癌再発・予後の評価>

免疫組織化学染色を用い、癌間質 CD8 陽性細胞 (cytotoxic T cell)、Foxp3 陽性細胞 (regulatory T cell) を評価し、術前放射線療法後食道癌及び術前 CRT 後直腸癌の再発・予後との関連を検討した。

<癌間質 CD26/DPPIV、programmed death ligand 1(PD-L1)発現の検討>

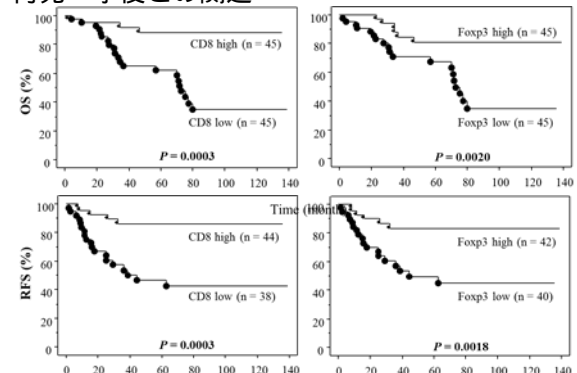
癌間質の CD26/DPPIV 及び癌細胞の programmed death ligand 1(PD-L1)発現に注目し、免疫組織学的染色を行った。CD26 発現については、癌間質より抽出し得た cDNA を用い、real-time PCR にて、遺伝子発現も検討した。癌細胞 PD-L1 発現については、その受容体である PD-1 との相互作用により、T 細胞活性を抑制し、腫瘍免疫における重要な役割を担っていることが知られているため、癌間質の CD8、Foxp3 陽性細胞との関連及び臨床病理学的因子との関連を検討した。更に、大腸癌細胞株 (DLD1、SW480、HT29、LoVo) を用い、放射線照射による PD-L1 発現の変化についても評価した。

<二光子レーザー顕微鏡によるマウス生体内免疫担当細胞の観察>

マウス大腸癌同所移植モデルの作成を行い、マウス大腸癌同所移植モデルの作成後、マウス免疫細胞の採取を試みるも採取量は微量であり、また、viable な状態での免疫染色は困難であったため、当初計画していた二光子レーザー顕微鏡を用いた in vivo study は断念することとした。

4. 研究成果

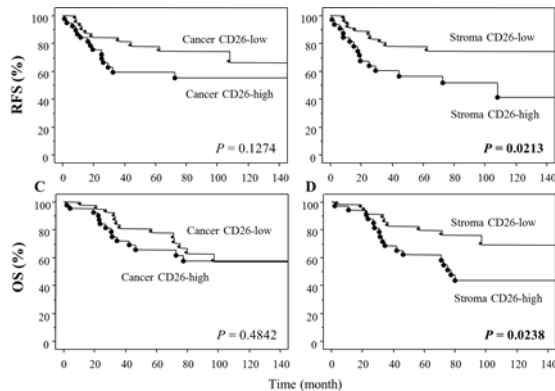
<術前 CRT 後癌間質 CD8、Foxp3 陽性細胞と再発・予後との関連>



CRT 後癌間質 CD8、Foxp3 陽性細胞数の多い症例において、無再発生存率 (RFS) 及び全生存率 (OS) は有意に良好であった。また、CD8 陽性細胞数高値は、リンパ節転移とともに独立した予後規定因子であった。この結果

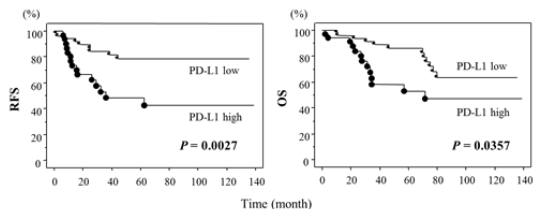
は、術前 CRT 後においても、免疫担当細胞の重要性を示しており、放射線療法と免疫療法併用による新たな治療戦略の可能性を示唆している。

<術前 CRT 後癌及び癌間質 CD26/DPPIV 発現と再発・予後との関連>

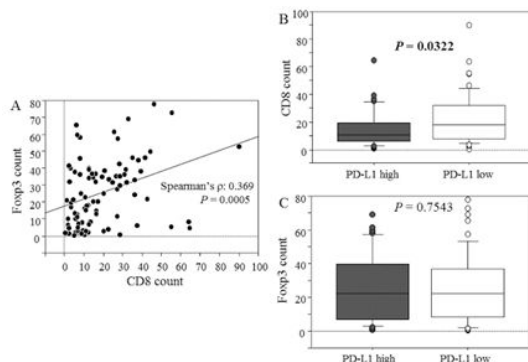


癌間質 CD26 発現は、RFS、OS ともに不良であった。一方、癌細胞における CD26 発現は再発・予後に関連しなかった。同様に、癌間質 CD26 遺伝子発現陽性例では、RFS、OS ともに不良であった。また、癌間質 CD26 発現は、独立した再発・予後規定因子でもあった。この結果は、癌間質に依存した再発・予後関連因子が存在することを示しており、癌間質制御の重要性を示唆している。

<術前 CRT 後癌 PD-L1 発現と再発・予後との関連及び PD-L1 発現と免疫担当細胞との関連>



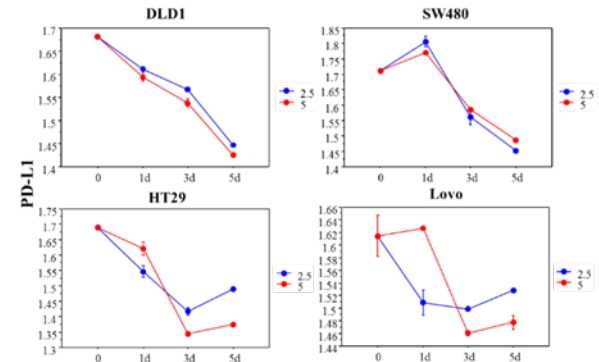
PD-L1 高発現群では、RFS、OS ともに不良であった。



癌間質 CD8、Foxp 陽性細胞は有意な正の相関を認めた。PD-L1 高発現群では、癌間質 CD8 陽性細胞は有意に減少していた。近年、PD-L1 発現と癌悪性度、予後との関連が多く報告されており、また、PD-L1 抗体の臨床治験も進行中である。我々の結果は、術前補助療法により、TILs が増加、誘導されるとの報告もあり、PD-L1 発現抑制により、更なる治療効果

が期待され、直腸癌においては、術前 CRT との併用により、局所再発の制御、resectability の向上へ寄与する可能性が期待される。

<大腸癌細胞株を用いた放射線による PD-L1 発現変化>



大腸癌細胞株 (DLD1、SW480、HT29、LoVo) に、2.5Gy、5Gy を単照射し、1、3、5 日目の PD-L1 遺伝子発現を確認すると、すべて細胞株において、PD-L1 発現の低下を認めた。この結果は、放射線療法が、PD-L1 発現を抑制することを示しており、放射線療法の間接的な効果を示唆している可能性がある。直腸癌における術前 CRT+抗 PD-L1 抗体併用が更なる治療効果については、完全奏効率向上への可能性が示唆される。

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 6 件)

1. Susumu Saigusa, Yasuhiro Inoue, Yuji Toiyama, Koji Tanaka, Koichiro Mori, Shozo Ide, Hiroki Imaoka, Mikio Kawamura, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki

Implication of programmed cell death ligand 1 expression with tumor recurrence and prognosis in rectal cancer with neoadjuvant chemoradiotherapy

Int J Clin Oncol. 2016 DOI 10.1007/s10147-016-0962-4 (査読有り)

2. Susumu Saigusa, Yuji Toiyama, Koji Tanaka, Yasuhiro Inoue, Koichiro Mori, Shozo Ide, Hiroki Imaoka, Mikio Kawamura, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki

Prognostic relevance of stromal CD26 expression in rectal cancer after chemoradiotherapy

Int J Clin Oncol. 2015 21(2): 350 - 8 (査読有り)

3. Koichiro Mori, Yuji Toiyama, Susumu Saigusa, Hiroyuki Fujikawa, Junichiro Hiro, Minako Kobayashi, Masaki Ohi, Toshimitsu Araki, Yasuhiro Inoue, Koji Tanaka, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki
Systemic analysis of predictive biomarkers for recurrence in colorectal cancer patients treated with curative

surgery
Dig Dis Sci 2015 60(8): 2477 - 87 (査読有り)

4. Susumu Saigusa, Koji Tanaka, Masaki Ohi, Yuji Toiyama, Hiromi Yasuda, Takahito Kitajima, Yoshinaga Okugawa, Yasuhiro Inoue, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki
Clinical implications of Fas/FasL expression in esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant chemoradiotherapy

Mol Clin Oncol. 2015 3: 151-156 (査読有り)

5. Susumu Saigusa, Yasuhiro Inoue, Koji Tanaka, Yoshinaga Okugawa, Yuji Toiyama, Keiichi Uchida, Yasuhiko Mohri, Masato Kusunoki

Lack of M30 expression is correlated with factors reflecting tumor progression in rectal cancer with preoperative chemoradiotherapy

Mol Clin Oncol. 2014 2:99-104 (査読有り)

6. Susumu Saigusa, Yasuhiko Mohri, Koji Tanaka, Masaki Ohi, Tadanobu Shimura, Takahito Kitajima, Yoshito Ishino, Hiromi Yasuda, Yoshinaga Okugawa, Yuji Toiyama, Yasuhiro Inoue, Keiichi Uchida, Masato Kusunoki

Impact of extracapsular lymph node involvement on tumor progression in esophageal squamous cell carcinoma after neoadjuvant therapy and effects on lymph nodes induced by chemotherapy and chemoradiotherapy

Esophagus 2014 11:108-116 (査読有り)

〔学会発表〕(計6件)

1. 直腸癌化学放射線療法後 Tumor infiltrating lymphocytes と臨床病理学的因子との関連

三枝 晋、問山裕二、田中光司、井上靖浩、森浩一郎、井出正造、今岡裕基、藤川裕之、奥川喜永、廣純一郎、毛利靖彦、楠 正人

第77回日本臨床外科学会総会

平成27年11月27日

福岡国際会議場(福岡県・福岡市)

2. 直腸癌化学放射線療法後 Programmed Death Ligand 1 発現に関する検討

三枝 晋、問山裕二、井上靖浩、田中光司、今岡裕基、井出正造、森浩一郎、野口智史、川村幹雄、藤川裕之、廣純一郎、毛利靖彦、楠 正人

第13回日本消化器外科学会大会(第23回日本消化器関連学会週間)

平成27年10月9日

グランドプリンスホテル新高輪(東京都・港区)

3. 食道・直腸癌における術前補助療法による Prognostic nutritional index 変化に関する検討

三枝 晋、毛利靖彦、井上靖浩、問山裕二、田中光司、大井正貴、安田裕美、川村幹雄、

廣 純一郎、楠 正人

第70回日本消化器外科学会総会

平成27年7月17日

アクトシティ浜松(静岡県・浜松市)

4. 直腸癌術前化学放射線療法後遺残癌病理組織学的特徴と臨床病理学的因子との関連

三枝 晋、井上靖浩、問山裕二、田中光司、奥川喜永、廣純一郎、藤川裕之、浦谷 亮、毛利靖彦、楠 正人

第115回日本外科学会定期学術集会

平成27年4月17日

名古屋国際会議場(愛知県・名古屋市)

5. 術前化学放射線療法後直腸癌間質 CD26 発現と予後との関連

三枝 晋、井上靖浩、田中光司、北嶋貴仁、近藤 哲、今岡裕基、井出正造、奥川喜永、廣純一郎、問山裕二、毛利靖彦、楠 正人

第12回日本消化器外科学会大会(第22回日本消化器関連学会週間)

平成26年10月25日

神戸国際展示場(兵庫県・神戸市)

6. 食道扁平上皮癌術前化学放射線療法後 Ki67, CD95 発現と臨床病理学的因子との関連

三枝 晋、毛利靖彦、大井正貴、田中光司、安田裕美、沖上正人、志村匡信、北嶋貴仁、近藤 哲、問山裕二、荒木俊光、井上靖浩、楠 正人

第114回日本外科学会定期学術集会

平成26年4月5日

国立京都国際会館(京都府・京都市)

〔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

三枝 晋(SAIGUSA SUSUMU)

三重大学・大学院医学研究科・リサーチア
ソシエイト
研究者番号：10632383

(2)研究分担者

田中光司 (TANAKA KOJI)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10345986
井上靖浩 (INOUE YASUHIRO)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324535
楠 正人 (KUSUNOKI MASATO)
三重大学・医学研究科・教授
研究者番号：50192026

(3)連携研究者

()

研究者番号：