

令和元年6月19日現在

機関番号：32612

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K09290

研究課題名(和文) 胃癌の分子生物学的特徴に基づく、小線源療法を主軸とした個別化治療戦略

研究課題名(英文) Personalized treatment with brachytherapy based on molecular biological characteristics of gastric cancer

研究代表者

柏木 和弘 (Kashiwagi, Kazuhiro)

慶應義塾大学・医学部(信濃町)・講師

研究者番号：60265791

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：胃癌細胞株(低分化腺癌と高分化腺癌)に対する<sup>125</sup>Iの小線源療法(hot)の増殖抑制効果が観察された。免疫染色、caspase-3の活性を調べたところ、小線源療法によるアポトーシス誘導が観察された。次に、in vivoでのhot群の安全性と増殖抑制効果を検討するため、ヌードマウスの胃癌播種モデルを構築し、アプリケーターにより腫瘍内部に小線源を投与した。cold群と比べ、hot群では優位に腫瘍量が少なく、2週間後には播種巣は、定常状態となった。胃癌細胞株全てにおいて腫瘍抑制効果が観察され、免疫染色により、hot群ではアポトーシスが誘導されたことが証明された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

放射線治療は、周辺臓器が多く、呼吸性変動、蠕動運動の多い胃では、十分かつ副作用の少ない照射は現時点では困難である。しかし、前立腺癌で施行されてきた小線源療法は、胃癌部へのアプローチが克服できれば、この点において非常に優れ、最も治療効果が期待できる放射線療法といえる。特に局所進行胃癌で狭窄をきたし、通過障害のため経口摂取が困難かつ手術適応外の症例では、この治療法による局所コントロールやQOLの向上が多いに期待できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Human gastric cancer cell lines(well-differentiated and poor-differentiated cancer) were treated with cold or hot seeds in vitro and in nude mouse injected by applicator. Cell viability, apoptosis, caspase-3 assay, and cell-cycle distribution were studied in vitro. Body weight and tumor volumes of nude mice with cancer cells subcutaneously injected were measured, and in vivo cell proliferation and apoptosis assays were also evaluated by Ki67 and TUNEL double staining. Hot seeds reduced cell viability and induced cell apoptosis through the activation of caspase-3, and resulted in the accumulation of cells in the G2/M phase in vitro. It also suppressed the growth of gastric cancer xenografts in nude mice, while inhibiting cell proliferation and inducing apoptosis were demonstrated by proliferation assay or double staining. Thus, these results suggest that hot seeds, regardless of histological origin, might be a safe and promising new option as one of gastric cancer treatment.

研究分野：消化器病学

キーワード：胃癌 放射線療法 アポトーシス

## 1. 研究開始当初の背景

胃癌学会のガイドラインでは、切除不能あるいは再発進行胃癌の治療の第1選択は、HER2陰性の場合、S-1+CCDP併用療法とされている。放射線療法には、治癒可能を目指した根治療法と、再発・転移、切除不能など治癒不可能な病期・病態に対して施行される、緩和・姑息的治療がある。胃癌に対する放射線療法は、欧米においては頭頸部癌、食道癌、膵癌などと同様に、標準的な治療の選択肢の一つとして施行されている。本邦でも、切除不能進行胃癌に対する、新規抗癌剤と放射線の併用療法の治療効果と安全性についての報告が相継いでいる。当院でも、根治切除困難な進行胃癌に対する化学放射線療法により、組織学的完全奏功を認めた長期無再発生存例を経験している。一方、放射線療法を併用しない群で根治切除が可能であった例では、組織学的奏功度はGrade2までであり、胃癌における治療においても放射線治療は重要な役割を果たすと期待される。

近年、三次元原体照射 (three dimensional radiation therapy; 3DCRT) や強度変調放射線治療 (intensity modulated radiation therapy; IMRT) などの技術進歩により、胃原発巣と所属リンパ節に、これまで以上にピンポイントに放射線照射が可能となってきた。しかし、立体構造を有し、呼吸性変動の大きな胃のような管腔臓器では、近接した他臓器による照射により重篤な合併症をもたらす危険がある。前立腺癌に対する小線源療法は、前立腺内に放射性線源を挿入する結果、前立腺の移動の問題は生じない利点があり、加えて通常の外部照射より高線量が投与可能であり、低リスク群では10年の治療成績が手術に匹敵する。

胃癌は heterogeneity な性質をもつ癌種で、その遺伝子変異は多岐にわたり、高頻度の機能獲得性のドライバー変異は報告されていない。しかし近年、次世代型シーケンサーによるゲノム解析の結果、新たな分子標的薬のターゲットの探索が進んでいる。悪性黒色腫などに効果のある、免疫チェックポイント阻害剤 (PD-1抗体) は、PD-L1陽性の腫瘍に著効するため、PD-L1免疫染色による発現の多寡は、この阻害剤の predictive marker となりえると考えられる。PD-L1/2の発現増加がみられるびまん性胃癌は、免疫チェックポイント阻害剤の一つである、Nivolumabの効果が期待できるが、放射線照射により細胞死した腫瘍細胞上に癌抗原が表出され、抗腫瘍免疫の増強やリンパ球の活性化が誘導されるため、放射線療法とPD-1抗体の併用は、非常に期待できる治療法といえよう。

## 2. 研究の目的

切除不能進行胃癌の標準治療には、本邦では、放射線治療は含まれていないものの、その効果は臨床的には証明されており、欧米では標準治療の一つとされている。前立腺癌で効果の高い小線源療法は、胃癌部までのアプローチが可能であれば、蠕動や呼吸性変動が多く、周囲に他臓器の多い胃の特殊性を考慮すると、非常に有望な治療選択の一つとなりうる。そこで、我々は、手術不能な局所進行胃癌に対する、超音波内視鏡を用いた<sup>125</sup>I投与による小線源療法の有用性・安全性、さらに癌の分子生物学的特徴 (バイオマーカー) に基づく個別化分子標的治療の可能性 (免疫チェックポイント阻害剤など新規抗癌剤との併用療法) について追究する。

## 3. 研究の方法

胃癌に対する<sup>125</sup>Iを用いた小線源療法の安全性の確認、臨床的効果の検討と方法の確立を目指す。

- (1) 胃癌細胞株や線維芽細胞株に対する両治療法 (通常の<sup>60</sup>Co放射線照射、或いは<sup>125</sup>Iによる小線源療法) の増殖抑制効果、アポトーシス誘導の有無などを調べる。
- (2) 胃癌細胞株をヌードマウスに皮下接種して作った腫瘍モデルを用いて、<sup>125</sup>I seedを打ち込んで、in vivoでの効果や安全性を検討する。

- (3) 単独でも胃癌への治療効果が期待されている免疫チェックポイント阻害剤 (PD-1 抗体) を小線源療法と併用することにより、抗腫瘍効果の増強を調べると同時に、腫瘍内での PD-1 や PD-L1 の発現が治療効果予測のバイオマーカーとなりうるか、検討する。
- (4) 動物モデルとしてブタを用いて、全身麻酔下に超音波内視鏡を介した seed の打ち込みを行い技術の習得、確立を目指す。

#### 4. 研究成果

- (1) 胃癌細胞株 (2 種の低分化腺癌と 1 種の高分化腺癌) に対する小線源療法の増殖抑制効果を調べるため、proliferation assay を行ったところ、いずれも有意差をもって増殖が抑制された。この増殖抑制におけるアポトーシスの関与を調べるため、annexin V と propidium iodide による二重染色、アポトーシスの主要な mediator である caspase-3 の活性を調べた。その結果、小線源療法は、アポトーシスを誘導することによって、分化度を問わず、胃癌細胞の増殖を、in vitro で抑制したことを証明した。
- (2) in vivo での小線源療法の安全性と増殖抑制効果を検討するため、ヌードマウスを用いた胃癌播種モデルを構築した。<sup>125</sup>I の seed (hot 群) をアプリケーターにより腫瘍内部に打ち込み、主腫瘍量や生存率、合併症の有無、ならびに sacrifice 後解剖し、転移巣の数や大きさを基に、その治療効果を調べた。no seed 群、cold seed 群と比較して、hot 群では投与 2 週間までは、3 群で腫瘍量に差を認めなかったものの、その後は hot 群では、他の 2 群より優位に腫瘍量が少なく、定常状態となった。驚くべきことに、使用した胃癌細胞株全て (高分化型、低分化型、びまん型) において腫瘍抑制効果が観察され、免疫染色により、hot 群ではアポトーシスが誘導されたことが証明された。
- (3) 大腸内視鏡挿入トレーニングのための大腸モデルを用いて、管腔の狭い部位、屈曲部位などで、内視鏡下での超音波検査のトレーニングを行い、安全面での確認を行い技術を確立した。

以上より、胃癌の分化度と無関係に、<sup>125</sup>I による小線源療法の安全性と腫瘍抑制効果が in vivo でも確認できた。当初、予定していた免疫チェックポイント阻害剤 (PD-1 抗体) との併用療法の有効性・安全性に関しては、検討できていない。研究機関内に、胃癌に対する PD-1 抗体が実臨床で使用開始され、一部の症例では著効を示しており、この併用療法は、安全かつ非常に期待できる治療法になりうることを期待される。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 (計 3 件)

吉田諭史、馬場保昌、杉野吉則、井上詠、柏木和弘、清野隆史、岩男泰、 スキルス胃癌の X 線診断、外科、2019、Vol.81、No.1、p22-28、査読有

Kashiwagi K, Inoue N, Yoshida T, Bessyo R, Yoneno K, Imaeda H, Ogata H, Kanai T, Sugino Y, Iwao Y. The impact of visceral adipose tissue as best predictor for difficult colonoscopy and the clinical utility of a long small-caliber scope as rescue. PLoS One. 2017; 12(12):e0189817. 査読有

Kashiwagi K, Inoue N, Yoshida T, Bessyo R, Yoneno K, Imaeda H, Ogata H, Kanai T, Sugino Y, Iwao Y. Polyp detection rate in transverse and sigmoid colon significantly increases with longer withdrawal time during screening colonoscopy. PLoS One. 2017; 12(3): e0174155. 査読有

〔学会発表〕（計1件）

Kashiwagi K, Inoue N, Yoshida T, Bessyo R, Yoneno K, Imaeda H, Ogata H, Kanai T, Sugino Y, Iwao Y. What do we endoscopists need for the quality control of colonoscopy exam ?  
Digestive Disease Week 2017 May Chicago, USA

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：なし

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：宮永 亮一

ローマ字氏名：(MIYANAGA, Ryouichi)

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。