

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591935

研究課題名(和文) 調節性T細胞制御による放射線療法後遠隔転移の抑制法に関する研究

研究課題名(英文) Mechanism of distant metastasis after radiotherapy for rectal cancer.

研究代表者

東島 潤 (HIGASHIJIMA, Jun)

徳島大学・大学病院・特任助教

研究者番号：30467815

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：【目的】直腸癌放射線治療後の遠隔転移増加のメカニズム解明、抑制法開発のため、調節性T細胞を中心とした免疫機構に注目し研究を行った。【方法】Balb/cヌードマウスの直腸前壁を切開、後壁に癌細胞(H T-29)5×10<sup>6</sup>個を移植。移植後7日目から局所放射線治療群と非照射群で各免疫因子につき比較検討した。【結果】腫瘍中Foxp3, Notch1, Jagged1 mRNA発現に差を認めなかった。腫瘍+放射線照射群では、Control群、腫瘍単独群と比較し脾臓中のFoxp3が高い傾向を認めた。【結論】腫瘍に放射線治療を加えると血中Foxp3が上昇し免疫寛容誘導により、遠隔転移が増加する可能性が示唆された

研究成果の概要(英文)：(Aim)To clarify the mechanism of distant metastasis after radiotherapy for rectal cancer.(Methods)We used Balb/c nude mice. We cut anterior wall of rectum, and implanted HT-29 cells into posterior wall. Seven days after, we compared the several immune factors between radiation therapy group and non-therapy group using RT-PCR and flow cytometric analysis.(Result)In radiotherapy group, Foxp3, Notch 1, Jagged1 mRNA ratio in tumor were not significantly increased compared with non-therapy group. Foxp3 ratio in spleen tended to be higher in radiotherapy group, compared with control and non-therapy group.(Conclusion)In radiotherapy for rectal cancer, immune tolerance by Foxp3 up-regulation in blood may increase distant metastasis. Foxp3 may be a important factor to regulate distant metastasis in rectal cancer patients with radiotherapy or chemoradiotherapy.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：直腸癌 術前放射線治療 調節性T細胞 Foxp3 Notchシグナル Delta Jagged

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 放射線による遠隔転移増加

直腸癌に対しては局所再発抑制と肛門温存のために術前に放射線治療が行われてきた。しかし最近の RCT 報告でも放射線治療の局所再発率は 6.3% (非施行は 12.7%) であるが、全体の再発率は 31.7% で非施行 30% と差を認めない (Ann Surg 2007)。このことは直腸癌に対する放射線治療によって局所再発は制御されるものの遠隔転移が増加し、結果的には生存率の改善に結びつかないということを示している。放射線治療の効果向上のためには、直腸癌に対する放射線治療によって起こる遠隔転移増加のメカニズムおよびその抑制法の開発が必要である。

### (2) 腫瘍免疫における調節性 T 細胞

放射線治療によって起こる遠隔転移増加のメカニズム解明のために、今回は腫瘍免疫の特に調節性 T 細胞に注目した。免疫系は自己反応性の細胞障害性 T 細胞 (cytotoxic T lymphocyte: CTL) の誘導を制御する、種々の制御システムを備えており、その 1 つが調節性 T 細胞 (regulatory T cell: Treg 細胞) である。Treg 細胞は CD25 および Foxp3 を発現する CD4<sup>+</sup>T 細胞 (CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup>T 細胞) で、Foxp3 は Treg 細胞の発生、分化と機能を司る遺伝子である。我々は Treg 細胞と癌との関係について膵癌患者で末梢血中 Treg 細胞数が上昇し、TNM stage と相関することを報告し (Pancreas 2006)、平成 17 年度科学研究費補助金 (萌芽研究) では大腸癌肝転移モデルで脾摘により肝内 Foxp3 mRNA の上昇を確認した。遠隔転移が成立するには局所で宿主の免疫応答が抑制され免疫寛容状態で、Treg 細胞が転移成立に重要な役割を果たしている可能性があり、T リンパ球の活性化を人為的に制御することが出来れば癌に対する免疫療法も可能になると期待される。

### (3) Notch シグナル

我々は平成 18 年度科学研究費補助金 (特定領域研究) 「Notch リガンドによる抗腫瘍免疫療法の開発」で、Notch リガンドの一つである Delta1 と Notch2 の相互作用が CTL を分化誘導するために必須であることを突き止め、Delta1 を過剰発現させた樹状細胞は著明な抗腫瘍効果を発揮できることを明らかにし、CTL の機能発現に Notch2 シグナルが非常に重要な役割を担っていることを明らかにした。発癌や癌の進展に関与している Notch シグナルが Treg 細胞のマスター遺伝子である Foxp3 の発現を制御しており、を標的とした Treg 細胞を制御の可能性も考えられる。

以上のことから放射線治療の効果向上を目指し、放射線治療によって起こる遠隔転移増加のメカニズムおよびその抑制法の開発

のため、Treg 細胞を中心とした免疫機構に注目して研究を行うこととした。

## 2. 研究の目的

(1) 直腸癌に対する放射線治療によって局所は制御されるが遠隔転移が増加し、結果的に生存率の改善に結びつかない。これまで放射線治療による遠隔転移増悪のメカニズム解明とその抑制に関する研究は皆無であり、放射線治療の効果向上のためには、そのメカニズムおよび抑制法の開発は必要不可欠かつ急務である。

(2) 腫瘍免疫 (調節性 T 細胞、Notch シグナル) に注目して局所の腫瘍と遠隔転移臓器の免疫機構の変化に焦点を当て、調節性 T 細胞制御によって T リンパ球の活性化を制御する癌に対する免疫療法の観点から、放射線治療によって起こる遠隔転移増加のメカニズム解明およびその抑制を遺伝子とタンパクレベルから目指すことを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1) 放射線療法による免疫機構の変化の解明  
放射線治療による局所 (直腸) 末梢血中および遠隔転移部位 (リンパ節、肺、肝) における免疫機構の変化を明らかにするため、Balb/c ノードマウスに放射線 1.5Gy (150kv, 5mA) / 日, 4 日毎, 5 回照射を行った群と非照射群で以下の項目を比較検討する。放射線照射は実臨床に近づけるため、以前から用いている shield box にマウスを入れ骨盤部のみ照射する。

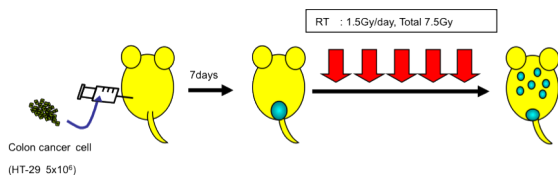
免疫細胞因子 (NK 細胞数、Treg 細胞数)  
Treg 細胞の分化、生存に必要な因子 (Foxp3, IL-2, TGF- $\beta$ , VEGF)  
Notch 関連因子 (リガンド (Delta, Jagged) とターゲット遺伝子 (Hes-1, Hes-5, PTEN))

以上の因子について局所 (直腸) 末梢血中および遠隔転移部位 (リンパ節、肺、肝) それぞれで、免疫細胞因子は FACS-scan を行い、Treg 細胞の分化、生存に必要な因子、Notch 関連因子は mRNA を PCR で、タンパクレベルでの測定を Western blot 法、免疫組織化学染色 (抗 Delta1,3,4, Jagged1,2 抗体など) で検討する。

(2) 放射線療法後の癌転移成立メカニズムの解明

担癌同所性モデルに対する放射線治療による局所癌組織および遠隔転移腫瘍組織の免疫機構の変化を明らかにするため、以前にも使用した HT-29 (ATCC® Number: HTB-38) のヒト大腸癌高転移株を用いた同所性モデルで、腫瘍移植後 28 日目に肝転移、肺転移、リンパ転移を確認している転移モデルを用

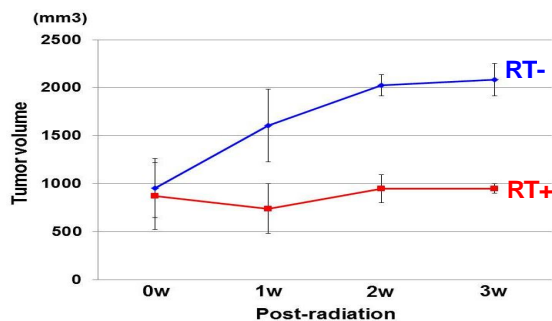
いる。Balb/c ノードマウスの直腸前壁に切開を加え、後壁に癌細胞 (HT-29)  $5 \times 10^6$  個を移植する。移植後 7 日目から上記同様に局所放射線治療を開始する群と非照射群で比較検討する。



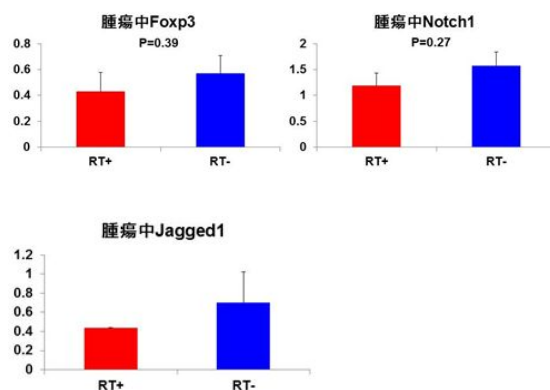
局所癌組織、遠隔転移腫瘍組織ならびに局所、遠隔転移周囲の非癌部についても上記の免疫細胞因子、Treg 細胞の分化、生存に必要な因子、Notch 関連因子に関して、FACS-scan、PCR、Western blot 法、免疫組織化学染色で検討する。

#### 4. 研究成果

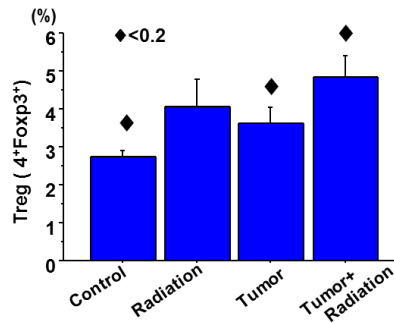
(1) RT(+) 群は RT(-) 群と比較して有意に Tumor volume が小さかった。



(2) 腫瘍中 Foxp3, Notch1, Jagged1 mRNA 発現は両群間で差を認めなかった。



(3) 腫瘍+放射線照射群 (n=3,  $3.967 \pm 1.626$ ) では、Control 群 (n=3,  $3.133 \pm 0.681$ )、腫瘍単独群 (n=3,  $3.633 \pm 0.666$ ) と比較して脾臓細胞中の Foxp3 が高い傾向を認めた。



#### 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 12 件)

1. Takasu C, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Miyatani T, Kashiwara H, Utsunomiya T, Uehara H.

Survivin expression can predict the effect of chemoradiotherapy for advanced lower rectal cancer.

Int J Clin Oncol 2013;18(5):869-876. 査読有 doi: 10.1007/s10147-012-0470-0.

2. Takasu C, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Miyatani T, Kashiwara H, Utsunomiya T.

Impact of C-reactive protein on prognosis of patients with coorectal carcinoma. Hepatogastroenterology.

2013;60(123):507-511. 査読有

3. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T.

Clinicopathological Analysis of Distal Margin for Rectal Cancer after Preoperative Chemoradiation Therapy. Hepatogastroenterology.2012;59(119):214

2-2146. 査読有

4. Iwata T, Shimada M, Kurita N, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Nakao T, Komatsu M.

Evaluation of relation of RAD51 and the effect of chemo-radiation therapy for advanced rectal cancer. Hepatogastroenterology.

2012;59(116):990-993. 査読有

doi: 10.5754/hge10068.

5. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T.

Clinicopathological analysis of distal

margin for rectal cancer after preoperative chemoradiation therapy. Hepatogastroenterology.2012;59(119):214-2146. 査読有

6. Hotchi M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T, Mikami C, Kashihara H.

Short-term results of laparoscopic surgery after preoperative chemoradiation for clinically staged T3 and T4 rectal cancer. Asian J Endosc Surg. 2012;5(4): 157-163. 査読有

doi: 10.1111/j.1758-5910.2012.00148.x.

7. Miyatani T, Kurita N, Utsunomiya T, Iwata T, Nishioka M, Yoshikawa K, Higashijima J, Kashihara H, Takasu C, Fukushima M, Shimada M.

Platelet-derived endothelial cell growth factor/thymidine phosphorylase inhibitor augments radiotherapeutic efficacy in experimental colorectal cancer.

Cancer Lett 2012;318(2):199-205. 査読有  
doi: 10.1016/j.canlet.2011.12.010.

8. Nishioka M, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Miyatani T.

Gene expression profile can predict pathological response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer.

Cancer Genomics & Proteomics. 2011;8(2):87-92. 査読有

9. Higashijima J, Kurita N, Miyatani T, Yoshikawa K, Morimoto S, Nishioka M, Iwata T, Shimada M.

Expression of histone deacetylase 1 and metastasis associated protein 1 as prognostic factors in colon cancer.

Oncol Rep. 2011 Aug; 26(2):343-348. 査読有  
doi: 10.3892/or.2011.1312.

〔学会発表〕(計12件)

1. 第68回 日本大腸肛門病学会学術集会  
2013年11月15日-16日 東京都(京王プラザホテル)

佐藤宏彦, 島田光生, 栗田信浩, 吉川幸造, 東島潤

進行下部直腸癌に対する術前化学放射線療法の長期成績について

2. JDDW 2013 2013年10月9-12日 東京都(グランドプリンスホテル新高輪)

東島潤, 佐藤宏彦, 栗田信浩, 岩田貴, 吉川幸造, 近清素也, 西正暁, 柏原秀也, 松本規子, 島田光生

局所進行下部直腸癌に対する術前化学放射線療法併用内肛門括約筋切除術(ISR)の成績

3. 第72回 日本癌学会学術総会

2013年10月3日-5日 神奈川県(パシフィコ横浜)

栗田信浩, 島田光生, 岩田貴, 佐藤宏彦, 吉川幸造, 東島潤, 近清素也, 西正暁, 柏原秀也, 松本規子, 江藤祥平

癌幹細胞制御におけるソニックヘッジホッグシグナルの意義

4. International Association of Surgeons, Gastroenterologists and Oncologists 2013(IASGO) 2013年9月18-21日 ルーマニア(The Palace of the Parliament)

Higashijima J, Shimada M, Kurita N, Iwata T, Sato H, Yoshikawa K, Chikakiyo M, Nishi M, Kashihara H, Matsumoto N.

Predictive Factors in Chemoradiotherapy for Rectal Cancer.

5. 第71回 日本癌学会学術総会

2012年9月19日-21日 北海道(ロイトン札幌)

宮谷知彦, 島田光生, 宇都宮徹, 栗田信浩, 岩田貴, 佐藤宏彦, 吉川幸造, 東島潤, 高須千絵, 柏原秀也, 松本規子

Predictive factors in chemoradiotherapy for rectal cancer.

6. 第112回 日本外科学会学術集会

2012年4月12日-14日 千葉県(幕張メッセ)

東島潤, 島田光生, 西岡将規, 栗田信浩, 岩田貴, 佐藤宏彦, 森本慎也, 吉川幸造, 宮谷知彦, 後藤正和, 小松正人, 高須千絵, 柏原秀也

大腸癌におけるmicroRNA223発現の意義についての研究(第二報)

7. 第98回 日本消化器病学会総会

2012年4月19日-21日 栃木県(京王プラザ)

宮谷知彦, 島田光生, 佐藤宏彦, 栗田信浩, 岩田貴, 西岡将規, 森本慎也, 吉川幸造, 東島潤, 柏原秀也, 高須千絵

CD133はmicroRNAの制御により直腸癌の化学放射線療法耐性に関与する

8. ASCO-GI 2012 1月19-21日アメリカ(The Moscone West Building)

Miyatani T, Utsunomiya T, Kurita N, Iwata T, Sato H, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Kashihara H, Takasu C, Shianda M.

Randomized clinical trial of preoperative chemoradiotherapy by S-1 versus UFT to rectal cancer for personalized therapy

9. 第22回 日本消化器癌発生学会総会

2011年11月25日-26日 佐賀県(ホテルニューオータニ佐賀)

高須千絵, 島田光生, 栗田信浩, 岩田貴, 佐藤宏彦, 西岡将規, 森本慎也, 吉川幸造, 宮谷知彦, 東島潤, 柏原秀也  
miRNA-223による直腸癌の化学放射線療法効果予測は可能か?

10.102d American Association for Cancer Research(AACR2011)

2011年4月2日-6日アメリカ(Orange Country Convention Center)

Iwata T, Shimada M, Kurita N, Nishioka M, Morimoto S, Yoshikawa K, Higashijima J, Mikami C, Kashihara H.

Investigation of expression of RAD51 in biopsied appecimen as a predictive factor of chemo-radiation therapy for advancer rectal cancer.

11.第111回 日本外科学会定期学術集会

2011年4月 (震災のため紙面開催)

東島潤, 島田光生, 三上千絵, 西岡将規, 岩田貴, 栗田信浩, 森本慎也, 吉川幸造, 宮谷知彦, 柏原秀也, 宇都宮徹, 三宅秀則  
直腸癌の化学放射線療法耐性における mi-croRNA223と癌修復遺伝子RAD51の関係に関する研究.

12.第111回 日本外科学会定期学術集会

2011年4月 (震災のため紙面開催)

江藤祥平, 島田光生, 栗田信浩, 岩田貴, 西岡将規, 森本慎也, 吉川幸造, 東島潤, 宮谷知彦, 柏原秀也, 三上千絵, 三宅秀則  
直腸癌の化学放射線療法耐性における癌幹細胞およびmiRNAの検討

〔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) 研究代表者

東島潤(HIGASHIJIMA, Jun)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号: 30467815

### (2) 研究分担者

安友康二(YASUTOMO, Koji)

徳島大学・大学院ヘルスバイオ

サイエンス研究部・教授

研究者番号: 30333511

西岡将規(NISHIOKA, Masanori)

徳島大学・病院・助教

研究者番号: 50398020

池本哲也(IKEMOTO, Tetsuya)

徳島大学・大学院ヘルスバイオ

サイエンス研究部・助教

研究者番号: 20398019

高須千絵(TAKASU, Chie)

徳島大学・大学院ヘルスバイオ

サイエンス研究部・特任助教

研究者番号: 70582823

西正暁(NISHI, Masaaki)

徳島大学・病院・医員

研究者番号: 70464344

### (3) 連携研究者

なし