

平成30年6月6日現在

機関番号：32607

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K10148

研究課題名(和文) 臨床応用を目指した直腸癌術前放射線化学療法感受性における骨髄由来抑制細胞の意義

研究課題名(英文) Roles of myeloid-derived immunosuppressive cells in chemo-radiosensitivity of advanced rectal cancer.

研究代表者

加藤 弘 (KATOH, Hiroshi)

北里大学・医学部・講師

研究者番号：20337950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：進行直腸癌における術前放射線化学療法前の白血球数分画中の単球数が多い症例は予後が悪い傾向が認められた。単球由来のCD33陽性骨髄由来抑制細胞の動員は治療感受性と関連しなかったが、CD163陽性M2マクロファージ動員が抵抗性に関与しており、患者選択や治療標的としての可能性が示唆された。この結果を元に、前向き研究を開始しており、血液検体では免疫担当細胞プロファイルのみならず、動員ネットワークに関与するサイトカインを同定し、治療標的としての可能性も探る予定である。一方、放射線療法感受性にCRBP1発現が関連しており、今後CRBP1と免疫担当細胞動員ネットワークにおける意義を検討していく予定である。

研究成果の概要(英文)：We aimed to predict sensitivity to neoadjuvant chemoradiotherapy in advanced rectal cancer. Analysis of routine peripheral leukocyte fraction revealed that patients with high monocyte fraction showed poor prognosis. Immunohistochemistry indicate that accumulation of CD163+ tumor-associated macrophage was associated with refractoriness to neoadjuvant chemoradiotherapy among immunocytes (eg. myeloid-derived suppressor cells, macrophages) derived from circulating monocytes. Comprehensive molecular exploration identified CRBP1 gene as a determinant of radiation sensitivity. CRBP1 silencing by its promoter methylation was related to refractoriness to neoadjuvant chemoradiotherapy in patients with advanced rectal cancer.

In the next steps, we analyze the network between CRBP1 and recruitment of CD163 macrophage including cytokine system. These results would lead to a novel approach to clarify a mechanism of chemoradiosensitivity.

研究分野：腫瘍外科学

キーワード：術前放射線化学療法 放射線感受性 進行直腸癌 CD163 腫瘍関連マクロファージ

## 1. 研究開始当初の背景

### 直腸癌における術前放射線化学療法の有用性と問題点

世界において大腸癌は癌腫中 2 番目の罹患率を示し増加傾向にある。死亡率は 4 番目であり社会的に極めて重要な疾患である。本邦においても罹患率は肺癌、胃癌について 3 番目でかつ増加傾向にあり、診断治療法の進展は世界的な重要課題であるといえる。近年の早期診断技術の進歩・スクリーニングの広まりにより、根治可能な早期大腸癌の発見率は向上している。進行大腸癌においても根治外科手術・術後化学療法の進歩により死亡率は低下しているが、未だ満足するレベルにあるとはない。中でも直腸癌は結腸癌に比較して低い生命予後を示し、骨盤内局所再発の予防と生命予後改善が強く求められている。世界的に行われている直腸間膜全切除によって局所再発は減少しているが未だ良好な生命予後は得られていない。また、進行直腸癌において側方リンパ節転移は悪性予後因子であり、とくに下部直腸癌根治手術における側方リンパ節郭清は局所再発や生命予後改善のメリットが報告されており、本邦では標準術式となっている。しかし、手術侵襲の増加や術後の自律神経機能障害等の合併症の問題から欧米では側方郭清は施行されておらず術前放射線(+化学療法)を併用し、本邦では神経温存術式での側方郭清と術前放射線化学療法の併用が主流となっている。術前放射線化学療法は術後補助放射線化学療法よりも局所再発率を有意に減少させたランダム化研究の報告もあり、術前放射線化学療法が世界的に標準治療となりつつある。

我々は進行直腸癌の術前放射線化学療法を施行し 24% の CR 例を含め奏効率約 60% と良好な予後を得ており、根治手術と肛門温存適応症例の範囲拡大の両立も可能になってきている。しかしながら、約 40% の症例は NC もしくは PD であり、こうした症例にとっては術前放射線化学療法後の観察期間を含めた 3-4 ヶ月間が不利益となる可能性がある。したがって、患者選択と治療方針決定のために、術前放射線化学療法感受性予測マーカー開発の必要性は極めて大きい。

### 化学療法耐性における骨髄由来抑制細胞 MDSC の意義

がんの進展は宿主による免疫監視からの腫瘍細胞の逃避にも依存している。大腸癌などの固形癌においては、Th1 細胞と Th2 細胞との不均衡や、骨髄由来抑制細胞 (myeloid-derived suppressor cell: MDSC)

あるいは制御性 T 細胞など免疫抑制細胞の亢進が生じている。MDSC は細胞障害性 T 細胞や NK 細胞の機能を抑制することにより癌細胞の免疫逃避に貢献する。申請者は、腫瘍細胞が CXCR2 ケモカインリガンドを産生することにより、CXCR2 発現 MDSC を動員し、MDSC によって惹起される免疫寛容が大腸腫瘍進展において不可欠であることを明らかにした(Cancer Cell, 2013)。

血中の MDSC の数が大腸癌の臨床病期や遠隔転移と相関することが報告されている。一方、MDSC が抗癌剤耐性の中心的惹起することが知られており、進行直腸癌に対する術前放射線化学療法感受性に関わることが予想される。さらに、感受性に関わる場合、MDSC の腫瘍への動員を抑制することによって術前放射線化学療法の効果の改善が期待できる。

以上、免疫担当細胞を標的とした新規診断・治療法の開発の可能性が示唆されている。

## 2. 研究の目的

まず術前放射線化学療法をしなかった直腸癌の術前末梢血白血球分画と手術検体における、免疫担当細胞の原発巣浸潤の臨床病理学的意義を予後を含めて評価する。次に術前放射線化学療法施行症例で治療前・中・後の末梢血白血球分画と生検組織の免疫担当細胞浸潤と術前放射線化学療法の効果との関連を解析する。さらに手術検体における免疫担当細胞浸潤と治療効果・予後を評価する。以上から、術前放射線化学療法感受性に関わる免疫担当細胞を絞り込む。

さらに大腸癌株化細胞を使用した前臨床実験で、絞り込んだ免疫担当細胞動員抑制による放射線照射や抗癌剤投与による腫瘍進展への影響を比較検討する。以上から、原発巣もしくは血中の免疫担当細胞数による術前放射線化学療法感受性評価ができるか、免疫担当細胞動員抑制で感受性上昇効果があるのか、を明らかにしようとする基盤研究を展開する。

## 3. 研究の方法

### 1. 末梢血中白血球分画の臨床病理学的解析

当施設では H17 年から H22 年までで 115 症例の stagelI/III 進行直腸癌に対して術前放射線化学療法を施行しており、これら症例では 5 年生存率を含めた解析が可能である。術前放射線化学療法前・後の通常採血の白血球数とその分画を含めて術前放射線化学療

法の効果を含めて臨床病理学的に解析する。

## 2. 原発巣生検・手術検体組織における免疫担当細胞の動員

上記症例の治療前・後内視鏡下生検検体および手術検体の免疫担当細胞を免疫染色で評価し、臨床病理学的な意義を解析する。CD33 (MDSC)・CD68 (マクロファージ)・M2マクロファージ (CD163)・リンパ球 (CD3, CD4, CD8)等を使用して免疫染色を施行する。ヒトの場合 MDSC のマーカーとして CD11b<sup>+</sup>CD33<sup>+</sup>(HLA-DR<sup>-</sup>Lin<sup>-</sup>)<sup>0</sup>が提唱されている。CD33<sup>+</sup>細胞は骨髄由来前駆細胞(骨髄由来未熟細胞)を示しているが、腫瘍局所ではほとんどの CD33<sup>+</sup>細胞が MDSC の特徴を有しているといわれており、実際我々の予備実験では CD33<sup>+</sup>細胞のほとんどが CD11b<sup>+</sup>であった。そこで、抽出した上記手術検体及び術前生検検体をモノクローナル CD33 抗体 (Leica 社) で免疫染色することで MDSC 細胞数が反映されると考えられた。

## 3. 進行直腸癌症例における前向き検討

後ろ向き解析の結果に基づいて、本学倫理委員会承認後に進行直腸癌術前放射線化学療法適応症例において、内視鏡生検組織・手術検体に加え、術前放射線化学療法前後・手術後等経時的に血液検体を採取し、原発巣および血液検体での FACS を施行する。原発巣と末梢血中の免疫細胞プロファイルを解析し、放射線化学療法感受性や予後との関連等を調べる。また ELISA で IL-8 や TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ その他サイトカインを調べる予定である。

## 4. 免疫担当細胞動員抑制による放射線化学療法感受性への影響の検討

以上の研究で放射線化学療法感受性との関連が指摘された免疫担当細胞とその動員機序を標的とする前臨床研究を行う。NOG マウスを使用したヒト大腸癌細胞株 (DLD-1, HCT116) 同所移植もしくは Balb/c を使用し、マウス大腸癌細胞株 CT-26 同所移植モデルを作成し、免疫担当細胞動員抑制による放射線化学療法感受性への影響を調べる。

また癌細胞側からのアプローチとして、ヒト大腸癌細胞株での放射線療法感受性に関わる分子を調べる。まずは放射線療法感受性株と抵抗性株の遺伝子発現プロファイルを行い、候補遺伝子をピックアップする。さらに感受性株において繰り返し放射線照射による抵抗性株を作成し、候補遺伝子から関連する遺伝子を抽出する。同定された分子と免疫担当細胞動員ネットワークにおける関連を検討する。

## 4. 研究成果

### (1) 末梢血中白血球分画の臨床病理学的解析

H17 年から H22 年までの術前放射線化学療法を施行した stage II/III 進行直腸癌症例の臨床病理学的解析の結果、pCR 率 24.1% と術前放射線化学療法の有効性を再確認できた。まず、治療前後の末梢血球数をあわせて解析した結果、術前放射線化学療法前の白血球数が多い症例ほど予後が良い結果となった。分画では顆粒球分画が多い症例は予後が良好であり、単球分画が相対的に多い症例は無再発生存率(RFS)が悪い傾向が認められた (図 1)。

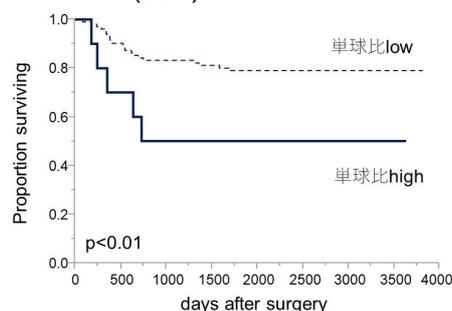


図1 術前放射線化学療法前単球比と無再発生存率

しかしながら、末梢血球数と放射線化学療法の感受性とは有意な相関はみとめなかった。現在、術前放射線化学療法後の末梢血球数との相関や、術前放射線化学療法前後の血球数の変化も含めて解析を続けている。

### (2) 原発巣生検・手術検体組織における免疫担当細胞の動員

術前放射線化学療法前の末梢血中単球数が多い群で無再発生存率 (RFS) が悪いという上記結果から、骨髄由来単球系免疫担当細胞が進行直腸癌の治療抵抗性や悪性度に関わっている可能性が示唆された。まず骨髄由来抑制細胞 MDSC を反映する CD33 陽性細胞や、腫瘍関連マクロファージ (TAM) である M2 マクロファージを表す CD163 陽性細胞等の原発巣への動員を検討した。治療前内視鏡下生検組織および手術切除検体を CD33, CD163 その他表面マーカーで免疫染色を施行した。治療前腫瘍組織中の CD33 陽性細胞数は治療効果や予後と明らかな関

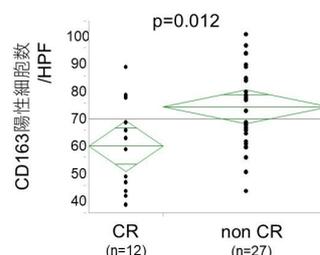


図2 生検組織CD163陽性細胞数と術前放射線化学療法CR

連はみとめなかったが, M2 マクロファージのマーカーである CD163 陽性細胞数が多い群では有意に CR 率が低かった (図 2). 同様に CD163 陽性細胞数が多い群で有意に悪性

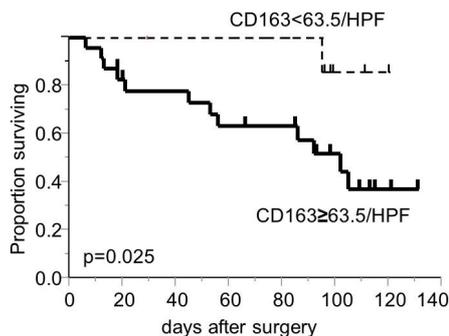


図3 生検組織CD163陽性細胞数と無再発生存率

予後を示した (図 3).

現在, 骨髄からの単球系免疫担当細胞の動員に関連すると考えられる IL-8 をはじめとした各種サイトカインやケモカインの原発巣での発現との相関を, 術前放射線化学療法前後の変化も含めて解析を続けている.

### (3) 免疫担当細胞動員抑制による放射線化学療法感受性への影響の検討

放射線療法感受性に関わる分子を同定するため, ヒト大腸癌細胞株において感受性株と抵抗性株の遺伝子発現プロファイル調べ候補遺伝子を抽出した. 放射線照射によって感受性株で誘導される遺伝子発現として cellular retinol binding protein 1 (CRBP1) が同定された (図 4).

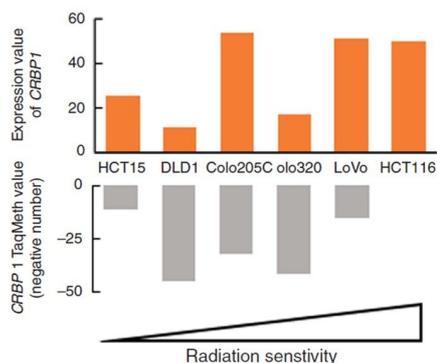


図4 放射線照射によるCRBP1発現と放射線感受性.

CRBP1 発現は DNA プロモーターメチル化によって制御されており, 放射線抵抗性株ではメチル化により, CRBP1 発現が抑制されていた (図 5A). 実際に, 術前放射線化学療法後の手術検体原発巣において CRBP1 メチル化値が低い群では有意に術前放射線化学療法組織学的奏効率が高かった (図 5B). また放射線抵抗性株に CRBP1 を導入すると, 放射線感受性が増加した (図 6).

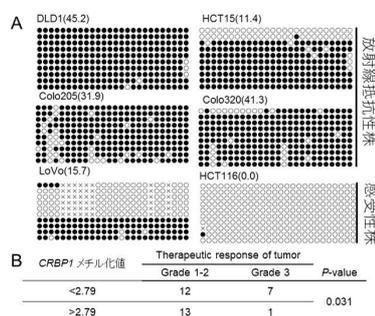


図5 CRBP1 DNAプロモーターメチル化と放射線感受性.

A 細胞株におけるメチル化. ()内はメチル化値.

B CRBP1メチル化値と術前放射線化学療法後の組織学的効果判定

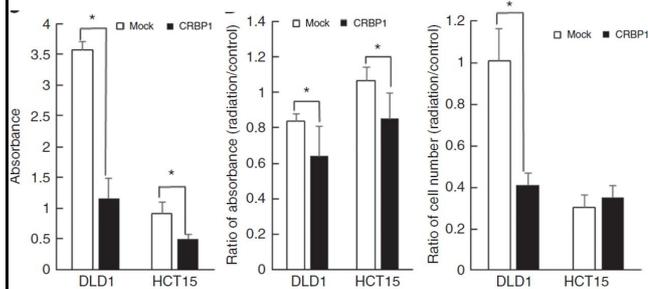


図6 放射線抵抗性株での CRBP1 導入による放射線感受性の回復

以上, 本研究では, CD163 陽性 M2 マクロファージ動員が進行直腸癌における術前放射線化学療法抵抗性に関与していることが示唆された. 患者選択や治療標的としての可能性が提案された. この結果を元に, 前向き研究を開始しており, 術前放射線化学療法適応症例の進行直腸癌において, 経時的な血液検体・内視鏡生検組織・手術検体の収集と解析をすすめている. 血液検体では免疫担当細胞プロファイルのみならず, 動員ネットワークに関与するサイトカインを同定し, 治療標的としての可能性も探る予定である.

一方, 放射線療法感受性に CRBP1 発現が関連しており, 今後 CRBP1 と免疫担当細胞動員ネットワークにおける意義を検討していく予定である.

### 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 2 件)

1. Yokoi K, Yamashita K, Ishii S, Tanaka T, Nishizawa N, Tsutsui A, Miura H, Katoh H, Yamanashi T, Naito M, Sato T, Nakamura T, Watanabe M: Comprehensive molecular exploration identified promoter DNA methylation of the CRBP1 gene as a determinant of radiation sensitivity in rectal cancer. *Br J Cancer*. 2017 Apr 11;116(8):1046-1056. doi: 10.1038/bjc.2017.65. 査読あり.
2. Katoh H, Watanabe M: Myeloid-derived suppressor cells and therapeutic strategies

in cancer. Mediators Inflamm.  
2015;2015:159269. doi:  
10.1155/2015/159269. 査読あり.

〔学会発表〕(計9件)

1. Kojima K, Ishii S, Tanaka T, Nishizawa N, Katoh H, Sato T, Nakamura T, Watanabe M : Promoter DNA Hypermethylation of CDO1 Gene and High Chemosensitivity Through Modification of Mitochondrial Membrane Potential in Colorectal Cancer. Society Surgical Oncology, 2017 (国際学会).
2. 横井圭悟, 山下継史, 石井智, 田中俊道, 西澤伸恭, **加藤弘**, 渡邊昌彦: 大腸癌細胞株における放射線感受性規定因子の検索. 日本癌治療学会学術集会, 2016.
3. 横井圭悟, 山下継史, 石井智, 田中俊道, 西澤伸恭, 五十嵐一晴, 大泉陽介, 小島慶太, 南谷菜穂子, **加藤弘**, 渡邊昌彦: CDO1 遺伝子プロモーター領域のメチル化は Stage III 結腸癌における抗がん剤感受性亢進と関連する. 日本癌学会総会, 2016.
4. 田中俊道, 山下継史, 石井智, 西澤伸恭, 横井圭悟, 牛久秀樹, 菊池真理子, 古城憲, 南谷菜穂子, **加藤弘**, 澤登雅和, 渡邊昌彦: 大腸癌の薬剤感受性機序解明を目指した包括的遺伝子検索. 日本癌治療学会学術集会, 2016.
5. 横井圭悟, 山下継史, 石井智, 田中俊道, 西澤伸恭, 江間玲, **加藤弘**, 渡邊昌彦: CDO1 遺伝子プロモーター領域の高メチル化は Stage III 結腸癌における化学療法感受性と関連する. 日本外科学会定期学術集会, 2016.
6. 横井圭悟, 山下継史, 石井智, 田中俊道, 西澤伸恭, **加藤弘**, 渡邊昌彦: CRBP1 遺伝子プロモーターのDNAメチル化は直腸癌における放射線感受性を予測する. 日本分子腫瘍マーカー研究会, 2016.
7. 田中俊道, 山下継史, 甲斐田武志, 田中蓉子, 原田宏輝, 横田和子, 石井智, 西澤伸恭, 横井圭悟, 牛久秀樹, 菊池真理子, 古城憲, 南谷菜穂子, **加藤弘**, 渡邊昌彦: 大腸癌の薬剤感受性機序解明を目指した包括的遺伝子検索. 日本分子腫瘍マーカー研究会, 2016.
8. **加藤弘**, 山下継史, Raymond N. DuBois, 渡邊昌彦: 大腸癌進展における骨髄由来抑制細胞の意義 Critical roles of myeloid-derived suppressor cells in colorectal cancer and the clinical relevance. 日本がん転移学会学術総会, 2015.
9. **加藤弘**, 山下継史, 渡邊昌彦 : PPAR $\delta$ は CD11b+CD103+ 樹状細胞を介して炎症関連大腸腫瘍進展を促進する Peroxisome proliferator-activated receptor  $\delta$  promotes colitis-associated tumor progression via recruitment of CD11b+CD103+ dendritic cells. 日本癌学会学術総会, 2015.

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

加藤 弘 (KATOH, Hiroshi)  
北里大学・医学部・講師  
研究者番号: 20337950

(2) 研究分担者

( )

研究者番号:

(3) 連携研究者

( )

研究者番号:

(4) 研究協力者

山下継史 (YAMASHITA, Keishi)  
北里大学・医学部・教授

渡邊昌彦 (WATANABE, Masahiko)  
北里大学・医学部・教授

佐藤武郎 (SATO, Takeo)  
北里大学・医学部・講師

中村隆俊 (NAKAMURA, Takatoshi)  
北里大学・医学部・准教授

( )

