

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：82402

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K09051

研究課題名(和文) 直腸癌に対するTAS-102を用いた化学放射線療法の開発

研究課題名(英文) Development of chemoradiotherapy using TAS-102 for rectal cancer

研究代表者

西川 武司 (Nishikawa, Takeshi)

地方独立行政法人埼玉県立病院機構埼玉県立がんセンター(臨床腫瘍研究所)・病院 消化器外科・医長

研究者番号：00749799

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌細胞株HT-29を用いて4Gyの放射線照射を行い、Trifluridineが放射線照射後の大腸癌細胞において細胞増殖を抑制することを示した。また、Trifluridineによりアポトーシスは増加しないが、細胞周期がG2/Mで停止し、細胞増殖を抑制することを示した。さらに、Western blottingを用いて放射線照射によりHIF-1 の発現を定量化し放射線照射によりHIF-1 の発現が増進することを確認した。またこの系に、Trifluridinを加え、放射線により誘導されたHIF-1 が抑制されることを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

直腸癌に対する放射線治療抵抗性の原因の一つにhypoxia-inducible factor (HIF)-1

の活性化が挙げられるが、TAS-102によってHIF-1 を抑制することで放射線感受性を高めることができる可能性が示唆された。さらにそのメカニズムの一部を解明することで今後の放射線抵抗性の克服に向けたさらなる研究へとつながる重要な成果が得られたと思われる。

研究成果の概要(英文)：Using the HT-29 colon cancer cell line, we showed that trifluridine inhibits cell proliferation in colon cancer cells after irradiation with 4 Gy of radiation. Trifluridine also suppressed cell proliferation by arresting the cell cycle at G2/M, but not by increasing apoptosis. Furthermore, the expression of HIF-1 was quantified by western blotting, and it was confirmed that the expression of HIF-1 was increased by irradiation. Trifluridin was added, and it was confirmed that radiation-induced HIF-1 was suppressed.

研究分野：下部消化管外科

キーワード：Trifluridine 放射線療法 大腸癌

1. 研究開始当初の背景

下部直腸癌に対する術前化学放射線療法 (Chemoradiotherapy, CRT) は側方リンパ節への転移を制御し局所再発率を低下させることが知られ、欧米では標準治療となっている。当科では 1985 年より直腸癌に対する術前放射線療法を行いこれまで良好な成績を報告してきた (Int J Colorectal Dis. 2011 Jan;26(1):45-51)。しかし CRT は症例により奏効率に差があり、効果の低い症例では局所の再発が多いのみならず、CRT の照射野の外の遠隔転移もまた多いことが知られる (右図)。CRT が十分に奏効すれば CRT のみで癌を根治することも可能であるが (pathological Complete Response, pCR) 従来のレジメでは pCR の率は 10%程度であり、満足のいく数字ではなかった。これまで我々は CRT が癌細胞に HIF-1 α を誘導し放射線抵抗性の原因となること、CRT に CPT-11 を加えることで HIF-1 α の発現を抑制し、放射線奏効率を改善することができることを報告してきた。(基盤研究 (C) (課題番号 26462005、Anticancer research. Jun 2018;38(6):3323-3331。)) 一方 TAS-102 (Trifluridine/Tipiracil) は日本で開発され大腸癌に対し保険適用となった新しい抗癌剤である。近年我々はこの TAS-102 の有効成分である Trifluridine が大腸癌細胞株に対し放射線感受性を増強させること、その効果は従来の CRT レジメで用いられる 5FU よりも高いことを見だし報告した (Biochem Biophys Res Commun. 2017 Dec 9;494(1-2):249-255。)) 次のステップとして Trifluridine の感受性増強のメカニズムを解明することが必要と考えた。

2. 研究の目的

以上のこれまでの研究成果から以下の仮説及び研究計画を立てた。大腸癌に対し放射線照射を行った際、HIF-1 α の発現が増強するが、Trifluridine は CPT-11 と同様放射線により誘導された HIF-1 α を抑制する。HIF-1 α の発現増強及び抑制のメカニズムとして産生亢進/抑制と分解促進/抑制が考えられるが、いずれのメカニズムによるものを解明する。Preliminary な検討では Trifluridine を加えた Radiation により HIF-1 α のアンチセンス mRNA の増加が測定された。この anti-HIF-1 α mRNA による HIF-1 α の合成が阻害されるメカニズムが最も可能性が高いと考えている。本研究では大腸癌細胞株を用いて上記仮説を検証する。これまで Trifluridine の放射線増感作用に着目した研究はなく、全くの新しい着眼点であると言える。

3. 研究の方法

In vitro での検討: ヒト大腸癌培養細胞株 (HT-29・LoVo・DLD-1・SW480・Colo201 等) を正常酸素ならびに低酸素環境下で培養する。培養時に Trifluridine を 0~4 μ M の濃度で添加し、その後放射線を 0~8Gy 照射する。Trifluridine による放射線の効果への影響を以下の通り検討する。HIF-1 α mRNA/anti-HIF-1 α mRNA/HIF-1 α 蛋白それぞれの発現量の変化を測定: mRNA については当科と共同研究の契約を結んでいる大鵬薬品工業にて行う。蛋白の発現は Western blotting 及び Flow-cytometry を用いて測定する。細胞増殖能の検討: MTS assay・Colony forming assay を用いて検討する。Apoptosis/Cell viability の検討: AnnexinV-PI の 2 重染色による Flow-cytometry を用いた Apoptosis の検出・TUNEL 法による検出・Caspase・Fas・p53 等の apoptosis 関連タンパクの Western blotting による検討を行う。Cell cycle の検討: Cell cycle detection kit による Flow-cytometry を用いた Cell cycle の変化を検討する。基盤研究 (C) (一般) 3 【1 研究目的、研究方法など(つづき)】 siRNA による HIF-1 α の Knock-down: HIF-1 α の Knock-down の手技はすでに確立している (Hongo et al. J Surg Res. 2013 Jun 1;182(1):75-84。) HIF-1 α を Knock-down した細胞について ~ の検討を行い SN-38 の投与により得られた結果と比較する。上記 ~ の変化のうちいずれが HIF-1 α 阻害の機序に由来するものであるのかを検討する。これらの手技はいずれもすでに手法として確立している。

4. 研究成果

直腸癌に対して術前化学放射線療法が広く行われ、欧米では標準治療とされている。我々は放射線照射により大腸癌細胞に hypoxia-inducible factor (HIF)-1 α の活性化が誘導され、これが放射線耐性の機序となっていること、CPT-11 がこの活性化した HIF-1 α を抑制し放射線感受性を増強することを解明してきた。一方 TAS-102 は近年開発された大腸癌に対する新しい抗癌剤であり、最近の我々の研究でその有効成分である Trifluridine が CPT-11 同様放射線感受性を増強する効果を有することが明かとなりつつある。そこで本研究では特に HIF-1 α に着目しそのメカニズムを明かすこと、動物実験により実際の治療効果を確認することを目的とする。まず、大腸癌細胞株 HT-29 を用いて 4Gy の放射線照射を行い、Trifluridine が放射線照射後の大腸癌細胞において細胞増殖を抑制することを示した。

また、Trifluridine によりアポトーシスは増加しないが、細胞周期が G2/M で停止し、細胞増殖を抑制することを示した。さらに、Western blotting を用いて放射線照射により HIF-1 α の発現を定量化し放射線照射により HIF-1 α の発現が亢進することを確認した。またこの系に、Trifluridin を加え、放射線により誘導された HIF-1 α が抑制されることを確認した。Real time PCR にて HIF1 α mRNA と antisense-HIF1 α RNA を検証したところ、放射線照射にて HIF 1 α mRNA 発現は上昇し、antisense-HIF1 α RNA の発現は低下した。そのため、Trifluridine が antisense-HIF1 α RNA の発現上昇に関与している可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ozaki Kosuke, Kawai Kazushige, Nozawa Hiroaki, Sasaki Kazuhito, Murono Koji, Emoto Shigenobu, Abe Hiroyuki, Ushiku Tetsuo, Ishihara Soichiro	4. 巻 37
2. 論文標題 Impact of the viability assessment of lateral lymph node metastasis in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiotherapy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 467 ~ 473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-021-04085-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Kosuke, Kawai Kazushige, Nozawa Hiroaki, Sasaki Kazuhito, Murono Koji, Emoto Shigenobu, Iida Yuuki, Ishii Hiroaki, Yokoyama Yuichiro, Anzai Hiroyuki, Sonoda Hirofumi, Sugihara Kenichi, Ishihara Soichiro	4. 巻 36
2. 論文標題 Therapeutic effects and limitations of chemoradiotherapy in advanced lower rectal cancer focusing on T4b	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Colorectal Disease	6. 最初と最後の頁 1525 ~ 1534
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00384-021-03936-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Ozaki Kosuke, Kawai Kazushige, Nozawa Hiroaki, Sasaki Kazuhito, Murono Koji, Ishihara Soichiro	4. 巻 26
2. 論文標題 Development of a novel apoptosis-based tumor regression grade to assess the efficacy of preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer: a retrospective single-center study	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 1679 ~ 1688
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10147-021-01948-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	石原 聡一郎 (Ishihara Soichiro) (00376443)	東京大学・医学部附属病院・教授 (12601)	
研究分担者	野澤 宏彰 (Nozawa Hiroaki) (80529173)	東京大学・医学部附属病院・准教授 (12601)	
研究分担者	川合 一茂 (Kawai Kazushige) (80571942)	東京大学・医学部附属病院・届出研究員 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関