

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 13 日現在

機関番号：24701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013 年

課題番号：22591414

研究課題名（和文） 抗癌剤・放射線感受性遺伝子解析を応用した直腸癌に対する  
新規術前化学放射線療法

研究課題名（英文） Preoperative chemo-radiation therapy for rectal cancer by analysis of  
chemo-radiation sensitizing gene expression

研究代表者

堀田 司 (HOTTA TSUKASA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50244744

研究成果の概要（和文）：進行直腸癌 24 例に対して、術前に化学放射線療法を施行したのち根治手術を施行し、摘出標本の薬物・放射線治療の組織学的効果判定基準から低感受性群と高感受性群に分類し、術前因子・stage 変化・腫瘍組織因子・摘出標本の抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現・化学放射線療法の副作用・術後合併症・合併症のない症例の術後 1 週間の QOL 調査 (SF-8)・再発の有無を比較検討した。高感受性群 13 例中 12 例に低感受性群 11 例中 10 例に化学放射線療法により stage down 可能であった。化学放射線療法後の内視鏡生検結果は高感受性群では group1 が 13 例中 11 例、低感受性群では group1 が 11 例中 2 例であった。摘出標本の腫瘍壁深達度は高感受性群では消失 4 例を認め、摘出標本のリンパ節構造のない壁外非連続性癌進展病巣の存在は高感受性群 13 例中 2 例であったが低感受性群では 11 例中 7 例あった。抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現の関与は明らかではなかった。

研究成果の概要（英文）：This study tried to demonstrate the effect of chemo-radiation therapy for 24 patients with rectal cancer including 13 high sensitive patients for chemo-radiation (high sensitive group) and 11 low sensitive patients for chemo-radiation (low sensitive group) as to analysis of chemo-radiation sensitizing gene expression. Twelve of 13 patients in high sensitive group resulted in down stage, whereas 10 of 11 patients in low sensitive group resulted in down stage. Eleven of 13 patients in high sensitive group resulted in group1 for colonoscopic biopsy after chemo-radiation, whereas 2 of 11 patients in low sensitive group resulted in group1. Four of 13 patients in high sensitive group resulted in histopathological complete cure in excised organ after surgery. There were extramural cancer deposits without lymph node structures in 2 of 13 patients in high sensitive group, whereas 7 of 11 patients in low sensitive group. It was not clear of the effect of chemo-radiation sensitizing gene expression.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012 年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：医師薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・外科学一般

キーワード：外科総論

## 1. 研究開始当初の背景

直腸癌は結腸癌と比較して長期成績が不良であることから、高リスク症例に対してはより強力な治療が必要である。そのため拡大リンパ節郭清（側方リンパ節郭清）や、術前あるいは術後の放射線化学療法（付加）が行われている。今回の研究目標は、術前放射線療法により抗腫瘍効果が期待できる症例を選別することにより卓越した治療成果をあげることにある。拡大郭清（側方リンパ節郭清）に関しては、2001年に術前放射線照射+側方リンパ節郭清群と術前放射線照射+側方リンパ節非郭清群の成績を比較した RCT の結果が報告され、腫瘍学的な成績には差がなく、機能障害は拡大郭清群に有意に多いことが示された

(Nagawa H et al. *Dis Colon Rectum* 44: 1274-1280, 2001)。しかし、国内においては側方リンパ節郭清が主流であり、術前あるいは術後の放射線化学療法（付加）は浸透していない。また、放射線療法よりも化学放射線療法の方が局所制御の点で有用性が高いと証明されている

(Gerard JP et al. *J Clin Oncol* 24: 4620-4625, 2006, Bosset JF et al. *N Engl J Med* 355: 1114-1123, 2006)。また、術前放射線療法の方が術後化学放射線療法よりも有用であることも証明されている (Sauer R et al. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 57: 124-125, 2003, Sauer R et al. *N Engl J Med* 351: 1731-1740, 2004)。術前放射線療法の利点は、癌病巣自体が縮小し切除不能症例が切除可能になる可能性がある。特に、肛門側に進展する癌細胞

を死滅させることにより、腫瘍の肛門側切離線を、放射線照射前より肛門から離れて設定することができる。これにより、永久的人工肛門造設をする腹会陰式直腸切断術の適応であった腫瘍が、肛門括約筋温存の適応である腫瘍に変わる可能性がある。また、直腸周囲の、神経、リンパ節、血管、他臓器などにある微小転移巣を死滅させることにより、術後の局所再発を抑制する。また、局所再発を抑制するため、わが国で積極的に行われている、側方リンパ節郭清を省略できる可能性が生じる。その結果、自律神経温存手術の適応が広がり、直腸癌手術後の、性機能障害や排尿障害を防ぐことが可能になる。化学療法（併用）による術前放射線療法によりこれらの効果が増強すると考えられている。このように、放射線療法が直腸癌術後の局所制御をする上で有用であることは明らかになっているが、排便障害など照射後長期に発生する合併症が問題となる。他の問題点としては、放射線療法や化学療法に対する感受性が症例によって異なる点である。従って、放射線療法による照射効果と化学療法による抗腫瘍効果が期待できる症例を選別して治療を行うことが重要であり、効果が期待出来ない症例や、高頻度に副作用の出現が予測される症例に対しては化学放射線療法による不利益を回避する必要がある。これまでに免疫染色や網羅的遺伝子発現解析など照射効果の予測を行う検討がされてきたが臨床的に応用できる段階には至っていない (Fu CG et al. *Dis Colon*

Rectum 41: 68-74, 1998, Komuro Y et al. Cancer 95: 1199-1205, 2002, Watanabe T et al. Cancer Res 66: 3370-3374, 2006)。また化学療法に関しても癌に対してより高い抗腫瘍効果が期待でき、ホストにとってより副作用が少ない薬剤を選択することも重要である。化学療法の効果予測としては、感受性試験や薬剤代謝酵素とそれを規制する遺伝子の発現からアプローチする方法が検討されており (Ichikawa W et al. Br J Cancer 89: 1486-1492, 2003)、我々も、これまで、消化器癌に対する化学療法の効果予測を証明してきた (Yamaue H et al. Br J Cancer 66: 794-799, 1992, Yamaue H et al. Dis Colon Rectum 39: 416-422, 1996, Hotta T et al. Oncol Rep 16: 177-182, 2006, Iwahashi M et al. Anticancer Res 25: 3453-3460, 2005)。現在、大腸癌化学療法のキードラッグは 5-FU であり、その効果を規定する 5-FU 代謝関連遺伝子 [Thymidylate synthase (TS) ・ Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) ・ Orotate phosphoribosyl transferase (OPRT) ・ Thymidine phosphorylase (TP)] が判明している。放射線療法の効果として Apoptosis 誘導が考えられており (Fu CG et al. Dis Colon Rectum 41: 68-74, 1998, Komuro Y et al. Cancer 95: 1199-1205, 2002, Watanabe T et al. Cancer Res 66: 3370-3374, 2006)、apoptosis 関連遺伝子として Bax、Bcl-2、Bcl-xL が関与していることが報告されている (Violette S et al. Int J Cancer 98: 498-504, 2002)。また、直腸周囲の微小転移巣として直腸間膜内に存在する小癌巣・脈管侵襲・神経周囲侵襲・少し大きめの癌病巣があり、これらはリンパ節構造のない壁外非連続性癌

進展病巣として大腸癌取扱い規約では 2006 年 3 月に改訂された第 7 版においてはじめてその存在に言及されたが staging 上の位置づけは確立されておらず、日常臨床において検索されていない。化学放射線療法の病理組織学的効果判定にこれらの因子を加えることにより詳細な解析が可能となる。術前化学放射線療法により抗腫瘍効果が期待できる症例の選別や、効果が期待できず高頻度に副作用の出現が予測される症例の選別ができれば、これまでにない卓越した治療成果が期待できるとともに不利益を回避することも可能になる。これら予測診断法の確立が急務である。

## 2. 研究の目的

進行直腸癌の術前化学放射線療法において、感受性遺伝子発現の有無と臨床的な効果に関する前向き治療効果判定はいまなお不明である。抗癌剤や放射線に対する感受性の差異を個人の遺伝子発現の違いとして捉え、抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現と抗癌剤放射線感受性との相関関係を解析することによって、効率的で副作用のない術前化学放射線療法を確立することを目的とする。そのために、進行直腸癌に対して 1. 分子生物学的手法により抗癌剤感受性遺伝子 (DPD, TS, TP, OPRT) や放射線感受性遺伝子 (Bcl-2, Bcl-X1, Bax,) の発現を解析する。2. 臨床的効果 (抗癌剤と放射線の併用効果・腫瘍縮小効果・副作用・合併症) の確実な予測診断を確立する。3. 以上の結果に基づいた前向き治療による予後の改善を証明する

## 3. 研究の方法

[対象]

組織学的に確定診断された進行直腸癌 24 例

[方法]

手術による切除標本から腫瘍組織を採取し、total RNAを抽出した。逆転写反応を行いcDNAを作製し、real-time RT-PCRを施行して5-FU代謝関連遺伝子[Thymidylate synthase (TS)・Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD)・Orotate phosphoribosyl transferase (OPRT)・Thymidine phosphorylase (TP)]や放射線感受性遺伝子としてのapoptosis関連遺伝子(Bax、Bcl-2、Bcl-xL)の発現量について化学放射線療法の前後において定量的に検討した(GAPDHとの比率)。手術切除標本材料における抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現の相関性を確認する。また、手術切除標本材料はホルマリン固定後 stagingのための病理検索とともにリンパ節構造のない壁外非連続性癌進展病巣の検索も行う。抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現と術前化学放射線療法の効果(抗癌剤と放射線の併用効果・腫瘍縮小効果・副作用・合併症)の相関を検討した。具体的には次の項目を検討した。術前骨盤照射 1.8Gy x 25Fr 計 45Gyの照射日にあわせ capecitabine 825mg/m<sup>2</sup> bid 内服施行。術前放射線化学療法終了後5週間以上あけて根治手術施行した。摘出標本の薬物・放射線治療の組織学的効果判定基準の Grade0(無効)・Grade1(軽度の効果)を低感受性群とし、Grade2(かなりの効果)・Grade3(著効)を高感受性群とし、年齢・性別・化学放射線療法後の内視鏡生検結果・化学放射線療法前術後の stage 変化・化学放射線療法前術後の PET SUVmax 変化・組織型(消失症例は術前内視鏡結果)・摘出標本の壁深達度・摘出標本のリンパ管侵襲・摘出標本の静脈侵襲・摘出標本のリンパ節転移・摘出標本の腸管壁外のリンパ節構造のない壁外非連

続性癌進展病巣の存在・摘出標本の

OPRT/GAPDH/・Bcl-2/GAPDH・

Bcl-xL/GAPDH・Bax/GAPDH・化学放射線療法の副作用・術後合併症・合併症のない症例の術後1週間のQOL調査(SF-8)・再発の有無を比較検討した。

統計処理は、Student's t-test、chi-squared test または Fisher's exact test を施行し、p<0.05を有意差ありとした。

#### 4. 研究成果

- 1.年齢は高感受性群：低感受性群 64±10歳：67±7歳であった(P=0.312)。
- 2.性別は高感受性群：低感受性群 男8例女5例：男5例女6例であった(P=0.431)。
- 3.化学放射線療法後の内視鏡生検結果は高感受性群：低感受性群 group1が11例 group5が2例：group1が2例 group5が9例であった(P=0.003)。
- 4.化学放射線療法前から術後の stage 変化は高感受性群では、化学放射線療法前 stage II から術後 stage 0 に変化ありが1例、化学放射線療法前 stage II から術後 stage I に変化ありが3例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage IIIa が1例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage 0 に変化ありが2例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage I に変化ありが2例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage II に変化ありが1例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage 0 に変化ありが1例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage II に変化ありが0例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage IIIa に変化ありが0例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage IIIb が0例、化学放射線療法前 stage II から術後 stage II が2例であった。一方、化学放射線療法前から術後の stage 変化は低感受性群では、化学放射線療法前 stage II から術後 stage 0 に

変化ありが 0 例、化学放射線療法前 stage II から術後 stage I に変化ありが 2 例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage IIIa が 1 例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage 0 に変化ありが 0 例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage I に変化ありが 0 例、化学放射線療法前 stage IIIa から術後 stage II に変化ありが 3 例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage 0 に変化ありが 0 例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage II に変化ありが 1 例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage IIIa に変化ありが 1 例、化学放射線療法前 stage IIIb から術後 stage IIIb が 1 例、化学放射線療法前 stage II から術後 stage II が 2 例であった (P=0.355)。

5.化学放射線療法前 PET SUVmax は高感受性群：低感受性群 7.799±3.509 : 8.013±1.854 (P=0.878)、化学放射線療法後 PET SUVmax は高感受性群：低感受性群 4.583±1.768 : 4.130±1.971 (P=0.586)であった。化学放射線療法前後の PET SUVmax の減少は高感受性群：低感受性群 3.892±2.916 : 3.655±1.431 であった (P=0.837)。

6.腫瘍組織型は高感受性群：低感受性群 高分化腺癌 9 例 中分化腺癌 4 例：高分化腺癌 4 例 中分化腺癌 7 例 であった (P=0.218)。

7.摘出標本の腫瘍壁深達度は高感受性群：低感受性群 M1 例 SM0 例 MP4 例 A4 例 消失 4 例：M0 例 SM1 例 MP1 例 A9 例 であった (P=0.047)。

8.摘出標本のリンパ管侵襲は高感受性群：低感受性群 ly0 が 9 例 ly1 が 1 例 ly3 が 0 例 ly- が 3 例:ly0 が 7 例 ly1 が 3 例 ly3 が 1 例 ly- が 0 例 であった (P=0.163)。

9.摘出標本の静脈侵襲は高感受性群：低感受性群 ly0 が 9 例 ly1 が 1 例 ly2 が 0 例 ly- が 3 例 : ly0 が 6 例 ly1 が 4 例 ly2 が 1 例 ly- が 0 例 であった (P=0.099)。

10.摘出標本のリンパ節転移は高感受性群：低感受性群 なし 2 例あり 11 例：なし 3 例あり 8 例 であった (P=0.630)。

11.摘出標本のリンパ節構造のない壁外非連続性癌進展病巣の存在は高感受性群：低感受性群 なし 11 例あり 2 例：なし 4 例あり 7 例 であった (P=0.033)。

12.摘出標本の OPRT/GAPDH は高感受性群：低感受性群 0.008180941±0.005946681 : 0.008629761±0.005055426 (P=0.846)、摘出標本の Bcl-2/GAPDH は高感受性群：低感受性群 0.000003122±0.000002944 :

0.000005264±0.000007392 (P=0.347)、摘出標本の Bcl-xL/GAPDH は高感受性群：低感受性群 0.000079286±0.000093013 :

0.000093013±0.000041002 (P=0.466)、摘出標本の Bax/GAPDH は高感受性群：低感受性群 0.001436544±0.000692470 :

0.001846155±0.001128712 (P=0.287) であった。DPD, TS, TP, は assay 不成功で測定できなかった。

13.化学放射線療法の副作用は高感受性群では Grade2 肝機能低下 1 例、Grade1 白血球減少 1 例、Grade2 白血球減少 1 例、Grade1 好中球減少 1 例であった、一方、化学放射線療法の副作用は低感受性群では Grade1 白血球減少 2 例、Grade2 白血球減少 1 例 であった (P=0.642)。

14.術後合併症は、高感受性群では腸閉塞 1 例、骨盤内膿瘍 1 例、縫合不全 1 例であった。一方、術後合併症は高感受性群では腸閉塞 2 例 であった (P=0.574)。

15.合併症のない症例の術後 1 週間の QOL 調査 (SF-8) では高感受性群と低感受性群には差がなかった。

16.再発は高感受性群：低感受性群 0 例 : 2 例 であった。

17.術前化学放射線療法開始前における内視

鏡下生検組織による抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現解析や前向き治療による予後の改善効果や従来の側方リンパ節郭清との比較検討は患者の同意が得られず施行できなかつた。放射線化学療法後の摘出標本では腫瘍の変性により正しい抗癌剤感受性遺伝子や放射線感受性遺伝子の発現解析ができなかつた可能性があつた。

## 5. 主な発表論文等

現時点で未発表

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

堀田 司 (HOTTA TSUKASA)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：50244744

### (2)研究分担者

山上 裕機 (YAMAUE HIROKI)

和歌山県立医科大学・医学部・教授

研究者番号：20191190

瀧藤 克也 (TAKIFUJI KATSUNARI)

和歌山県立医科大学・医学部・講師

研究者番号：00254540

横山 省三 (YOKOYAMA SHOZO)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：90398462

中村 公紀 (NAKAMURA MASAKI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：80364090

松田 健司 (MATSUDA KENJI)

和歌山県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：30398458

### (3)連携研究者

なし