

免疫化学療法による消化器癌の tumor dormancy therapy

岐阜大学第2外科

杉山 保幸 佐治 重豊 安田 邦彦
森 茂 松尾 篤 渡辺 敦

免疫療法と低用量化学療法の併用による消化器癌の tumor dormancy therapy の確立を目的として、基礎的、臨床的検討を行った。OK-432, PSK, lentinan は in vitro で胃癌細胞のアポトーシスを誘導した。また、単独では細胞傷害作用を示さない低濃度の FUra と CDDP を併用した場合にもアポトーシスが誘導され、これに lentinan を加えるとさらにアポトーシス陽性細胞が増加する場合も観察された。胃癌6例、大腸癌19例の切除標本から採取した癌組織を、CD-DST 法で単独では効果がみられない低濃度の FUra と CDDP を併用して接触させた結果、10例で増殖抑制効果が認められた。さらに、評価可能病変を有する進行胃癌9例に低用量 CDDP・FUra+lentinan 療法を可能な限り反復した結果、直接効果は PR:2例, MR:1例, NC:5例, PD:1例であり、特記すべき副作用は認められなかった。以上から、本療法は癌細胞のアポトーシスを効率的に誘導する優れた消化器癌の治療戦略の1つであることが示された。

1. はじめに

『Tumor dormancy therapy』とは、臨床的には『long no change(NC)』や『腫瘍との共存下での長期生存』、『腫瘍の慢性化』を期待する治療であり、癌微小環境においては癌細胞の増殖とアポトーシスを主体とする細胞死との間に均衡を保って腫瘍の発育を停止させることである。しかし、最近では細胞死が優位になって癌が肉眼的に縮小、消失するものまでも含めた積極的な戦略も含まれている。今回、低用量化学療法と免疫療法を併用することで癌細胞のアポトーシスを誘導する tumor dormancy therapy の確立を企図して、基礎的・臨床的検討を行ったので報告する。

2. 研究方法

1) 治療に用いる薬剤のアポトーシス誘導能の検索
非特異的免疫賦活剤であるピシバニール(OK-432), クレスチン(PSK), レンチナン(LNT)を所定の濃度に調整して,1時間だけ胃癌株 KATO-III(印環細胞癌)と接触させた後,薬剤を含まない培地で48時間培養した場合の増殖抑制程度を MTT (3[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay

にて調べた。また、各々の癌細胞を回収して TUNEL 染色およびアガロースゲル電気泳動を行ってアポトーシス誘導の有無を調べた。化学療法剤であるフルオロウラシル(FUra)およびシスプラチン(CDDP)についても、所定の濃度に調整して、各々単独あるいは併用して胃癌株 MKN-45(低分化腺癌)と24時間接触させた後、TUNEL 染色を実施してアポトーシス陽性細胞を計数し、その比率を apoptotic index(AI)として算出した。さらに、胃癌株 GSS(低分化腺癌)と MKN-28(高分化型腺癌)を標的細胞として FUra, CDDP, LNT を単独あるいは併用して接触させた場合のアポトーシス陽性細胞の頻度も調べた。

2)FUra と CDDP の併用投与がアポトーシス関連蛋白に及ぼす影響

FUra の濃度を100 μ g/ml, CDDP の濃度を20 μ g/ml とし,両薬剤を併用して MKN-45に接触させ,6, 12, 24および48時間後におけるアポトーシス関連蛋白の推移を western blotting 法にて調べた。検討する蛋白として,Bcl-2ファミリーではアポトーシスを促進するとされる Bax と抑制作用を有する Bcl-2を,細胞外の刺激を核内での転写活性の増減に変換するシグナル伝達経路で重要な役割を担う MAP キナーゼスーパーファミリーでは,増殖刺激の伝達に関与する ERK,ストレス刺激に反応してアポトーシスを誘導するとされる

* 第55回日消外会総会シンポ9・消化器癌における tumor dormancy therapy
<2000年12月19日受理> 別刷請求先:杉山 保幸
〒500 8705 岐阜市司町40 岐阜大学医学部第2外科

p38 増殖刺激とストレス刺激の両方からのカスケードの下流にある JNK を ,アポトーシスの最終的な実行過程を担うカスパーゼファミリーでは caspase-9 と caspase-3 ,およびカスパーゼの基質の1つである PARP を選択した .

3) 化学療法剤に対する感受性試験

胃癌 6 症例および大腸癌 19 症例の手術時切除標本から癌組織を採取し , succinate dehydrogenase inhibition (SDI) 法にて FUra または CDDP 単独による薬剤感受性を , collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) 法により低用量 CDDP と FUra を併用した場合の薬剤感受性を調べた .

4) 低用量化学療法 + 免疫療法の臨床効果

評価可能病変を有する進行・再発胃癌 9 症例に対して FUra を $200 \sim 350 \text{ mg/m}^2/\text{day}$, CDDP を $4 \sim 5 \text{ mg/body/day}$ で 5 日間投薬 , 2 日間休薬を 1 コースとし , 各コースの第 1 日目に LNT 2 mg/body を点滴静注するという全身免疫化学療法を可能な限り継続し , 治療効果とその継続期間および副作用を調査した . なお治療効果については日本癌治療学会固形がん化学療法直接効果判定基準に準じて評価し , 副作用は WHO handbook 副作用記載様式に基づいて程度を決定した .

3. 結 果

1) 薬剤によるアポトーシス誘導

非特異的免疫賦活剤の KATO-III に対する増殖抑制作用は MTT assay にて設定した濃度の範囲内ではほ

とんど認められなかった . 一方 , OK-432 を 1.0 KE/ml , PSK を $1,000 \mu\text{g/ml}$, LNT を $100 \mu\text{g/ml}$ の濃度に調整して KATO-III と 1 時間接触させ , その後 48 時間培養した際の TUNEL 染色陽性細胞数は , 薬剤を接触させなかった場合と比べて増加し (Fig. 1) , アガロースゲル電気泳動にて梯子 (ladder) 状のパターンが観察された .

次に , FUra の濃度は $200 \mu\text{g/ml}$, CDDP の濃度は $50 \mu\text{g/ml}$ として , おのおの単独で MKN-45 と 24 時間接触させた場合の AI はおのおの 15.2% , 14.6% であったが , 各用量の 1/10 量で両剤を併用して接触させた場合には陽性細胞比率が 39.3% まで増加した . さらに , FUra , CDDP , LNT を単独あるいは併用して MKN-28 に接触させた場合には FUra と CDDP の併用によるアポトーシスの誘導増強は軽度であり , LNT の併用効果もみられなかった . しかし , GSS を用いた場合には FUra と CDDP の併用でアポトーシスをきたした細胞の比率は著明に増加し , LNT の併用はさらにそれを高めた (Fig. 2) .

2) アポトーシス関連蛋白の推移

Bax は 6 時間後で増加が観察されたが , Bcl-2 の変動はみられなかった . また , ERK-1 , ERK-2 はともに変化がみられなかったが , p38 は 24 時間後 , 48 時間後に増加が観察された . JNK-2 は時間の経過とともに増加したが , JNK-1 の変動はみられなかった . さらに , caspase-9 および caspase-3 の変化は判然としなかったが ,

Fig. 1 Induction of apoptosis of gastric cancer cells by immunopotentiators (TUNEL stain)

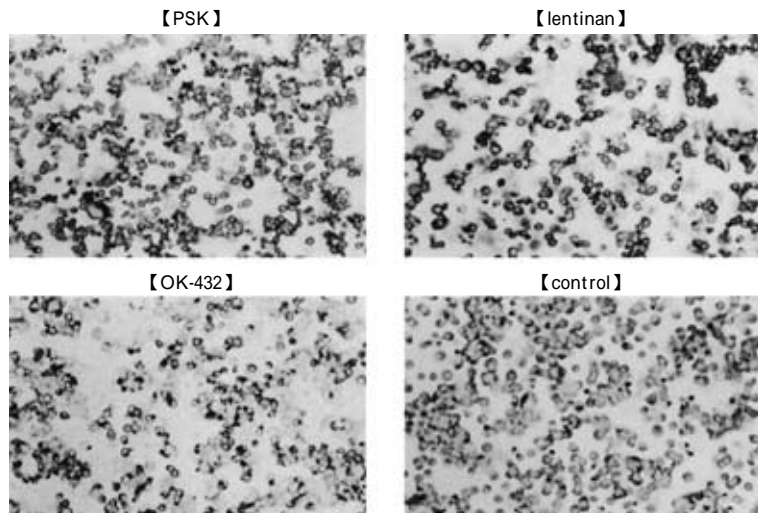
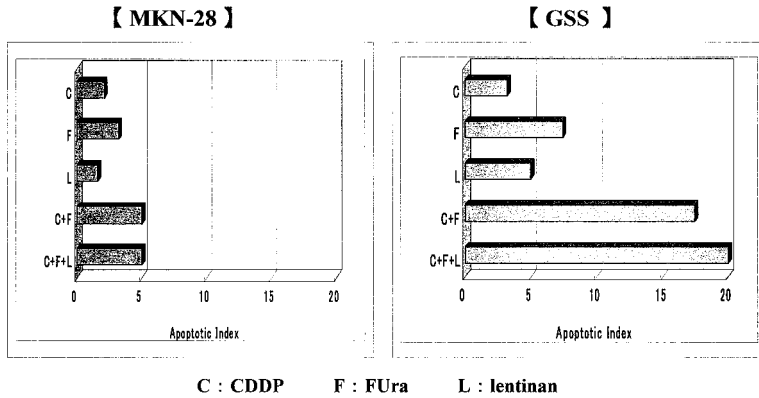


Fig. 2 Induction of apoptosis of gastric cancer cells by chemotherapeutic agents and/or immunopotentiator



PARPは48時間後で product の増加が認められた (Fig. 3).

3) 胃癌, 大腸癌組織の薬剤感受性

胃癌6症例の薬剤感受性試験では, SDI 法にて FUra に感受性を示したのが6例中1例のみであったのに対し, CD-DST 法では6例中3例で腫瘍の増殖抑制が観察された. しかも, この3例はいずれも SDI 法では FUra に対して感受性が認められなかった. 大腸癌19症例の場合には, SDI 法で FUra に感受性を示さなかったのが11例, 感受性が陽性と判定されたのが8例であった. 一方, CD-DST 法の場合には, 19例中7例, 36.8%に FUra と CDDP の併用による増殖抑制効果が認められた. そして, この7例のうち, SDI 法では FUra に対する感受性が認められなかったのが4例, 感受性が陽性と判定されたのが3例であった (Table 1).

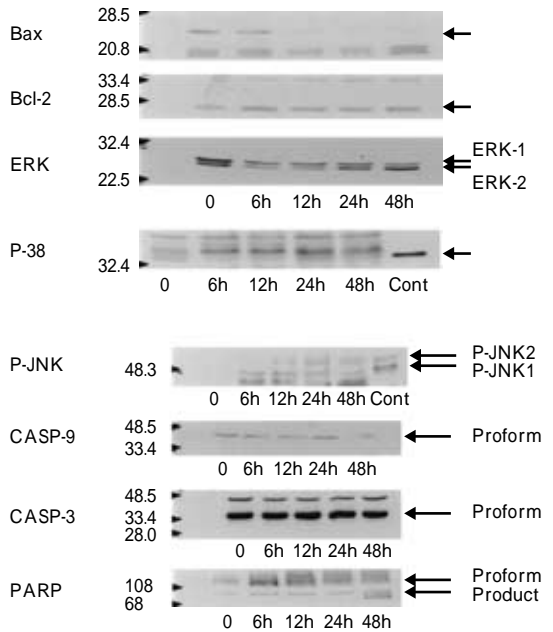
4) 免疫化学療法の治療効果

進行・再発胃癌9症例に対して実施した低用量 CDDP・FUra+LNT 療法の直接効果は partial response (PR): 2例, minor response (MR) 1例, NC : 5例, progressive disease (PD): 1例であった. ただし, NC 例では不変の状態が3~9か月間と比較的長い間継続し, また副作用は Grade 1の嘔気がみられた程度で, 休薬や減量の理由となるような重篤なものはなかった. Quality of life (QOL) も良好であり, 長期間の投与が可能であった (Table 2).

4. 考 察

消化器癌に対して免疫化学療法が試みられた当初は, tumor dormancy ではなく強力化学療法による to-

Fig. 3 Western immunoblots analysis of gastric cancer cell line (MKN-45) exposed to low-dose CDDP・FUra



tal cell killing をめざし, それによって低下した担癌生体の免疫能を免疫療法で回復させることが基本理念であった. しかし, 骨髄抑制や消化器症状などの副作用が強く, 高度に抑制された骨髄からは免疫療法に应答できるだけの免疫担当細胞も動員されないことから, 期待されたほどの治療効果は得られなかった. そこで,

Table 1 Sensitivity of cancer to chemotherapeutic agents

| SDI test | | | CD-DST test | |
|----------|-------|--------------|------------------|------------------|
| FUra | CDDP | No. of cases | sensitivity(+) | sensitivity(-) |
| (-) | (-) | 3 | 1 | 2 |
| | (+) | 2 | 2 | 0 |
| (+) | (-) | 0 | 0 | 0 |
| | (+) | 1 | 0 | 1 |

| SDI test | | | CD-DST test | |
|----------|-------|--------------|------------------|------------------|
| FUra | CDDP | No. of cases | sensitivity(+) | sensitivity(-) |
| (-) | (-) | 5 | 1 | 4 |
| | (+) | 6 | 3 | 3 |
| (+) | (-) | 0 | 0 | 0 |
| | (+) | 8 | 3 | 5 |

Table 2 Patients characteristics and clinical effect of immunochemotherapy against advanced gastric cancer

| Case | Age | Sex | Histology | Target lesion | Response | Duration | Side effect |
|------|-----|-----|-----------|----------------------|----------|----------|-------------|
| 1 | 41 | F | por1 | liver metastases | PR | 10M | (-) |
| 2 | 66 | F | tub2 | paraaortic ly. meta. | MR | 5M | nausea |
| 3 | 52 | F | por2 | abdominal tumor | NC | 5M | (-) |
| 4 | 36 | F | por1 | regional ly. meta. | PR | 6M | (-) |
| 5 | 70 | M | tub2 | regional ly. meta. | NC | 3M | (-) |
| 6 | 56 | M | por1 | liver metastases | NC | 6M | (-) |
| 7 | 50 | F | sig | abdominal tumor | NC | 8M | (-) |
| 8 | 69 | F | sig | stomach tumor | NC | 9M | (-) |
| 9 | 63 | M | por2 | abdominal tumor | PD | | (-) |

ly. meta. : lymph node metastases

良好な QOL を保ちながら優れた治療効果，延命効果が得られる化学療法の開発・工夫が進み，biochemical modulation の概念が導入されて化学療法の歴史に大きな変革をもたらした¹⁾。とりわけ，FUra をエフェクター，CDDP をモデュレーターとし，いずれも低用量を投与する化学療法が消化器癌の領域では注目を集め，臨床的にも優れた治療効果が報告された²⁾。一方，化学療法剤の低用量投与は腫瘍縮小効果は少ないものの免疫機構を賦活する作用があり，免疫療法は低用量化学療法との併用によってより優れた治療効果を発揮

することが示された³⁾。さらに，化学療法剤や非特異的免疫賦活剤には癌細胞のアポトーシス誘導作用のあることが明らかにされてからは^{4,5)}，臨床的にも tumor dormancy の観点に立脚した治療が脚光を浴びるようになってきた。

多くの化学療法剤は癌遺伝子 bcl-2 や癌抑制遺伝子 p53 を介して癌細胞のアポトーシスを誘導することが明らかにされている^{4,5)}。そして，アポトーシスシグナル伝達機構の最初の標的分子は化学療法剤の種類によって様々であるが，最終的なアポトーシス実行過程

はカスパーゼファミリープロテアーゼを介した同一のメカニズムで起こることも示されている⁷⁾。しかし、今回の検討からは低用量 CDDP+FUra によって DNA 損傷が生じた後、Bcl-2ファミリーあるいは MAP キナーゼスーパーファミリーの少なくとも2つの異なった経路を介してカスパーゼが活性化される可能性が推察されたものの、詳細なシグナル伝達機構の解明までには至らなかった。

ところで、従来より用いられてきた薬剤感受性試験である SDI 法は各薬剤単独での効果を調べる場合がほとんどであった⁸⁾。一方、著者らは SDI 法と同時に CD-DST 法⁹⁾も行い、CDDP あるいは FUra 単独では細胞傷害作用をきたさない濃度で両者を併用した場合の感受性を観察した。その結果、SDI 法で FUra に対する感受性が陰性と判定されても、それがただちに低用量 CDDP+FUra 療法の適応から除外する根拠にはならないことが明らかとなった。さらに、CD-DST 法にて低用量 CDDP+FUra 療法に感受性がみられたのは、胃癌で50.0%、大腸癌で36.8%であったが、この陽性率と全国アンケート調査²⁾で報告された低用量 FUra・CDDP 療法の奏効率(胃癌で34.3%、大腸癌で35.3%)とが比較的近似していることは興味深い。また、免疫療法剤についても、LNT 併用でアポトーシス誘導の増強効果が認められた癌細胞とそうでないものがあったことは特筆に値し、実地臨床で免疫療法を併用する場合にも何らかの感受性試験を工夫、考案して responder を決定する方法を選択することが肝要と考えられる。

実際の臨床成績に関しても、まだ症例数は少ないものの、低用量化学療法に免疫療法を併用することで比較的良好な治療効果が得られ、しかも特記すべき副作用はみられていない。そして、QOL も損なわれないことから、結果的に長期間の投与が可能となる。ただし、本療法を長期間継続した後しばらくの間休薬すると、腫瘍が急速に発育、増大する症例をしばしば経験することから、このピットフォールを解明することが逆に

有効な tumor dormancy の状態を維持、継続するための治療戦略開発の糸口になる可能性もある。

いずれにしても、消化器癌に対する非特異的免疫賦活剤、化学療法剤を併用しての tumor dormancy therapy は姑息的な戦略ではなく、QOL やコンプライアンスを考慮に入れた積極的な治療法といえる。効率的に癌細胞をアポトーシスに導き、生体内から駆逐することで十分な治療効果をあげ、かつ副作用を可能な限り少なくするという理想的なプロトコールの確立までにはまだ多くの課題が残されているが、これらを逐次克服することで次世代に継承できる優れた消化器癌治療法になるものと期待される。

文 献

- 1) 太田和雄: Biochemical modulation. 医のあゆみ 141: 572-575, 1987
- 2) 佐治重豊, 相羽恵介, 荒木 浩ほか: 低用量 CDDP・5-FU 療法の現況について. 癌と化療 24: 1892-1900, 1997
- 3) 細川真澄男: 化学療法における抗腫瘍免疫修飾. 癌治療と宿主 12: 151-157, 2000
- 4) 清宮啓之, 鶴尾 隆: 癌化学療法の新しい展開. 2. 抗癌剤とアポトーシス. BIO Clinica 12: 686-690, 1997
- 5) 佐治重豊, 山田 誠, 杉山保幸ほか: 腫瘍・宿主要因を考慮した BRM 製剤感受性試験の開発. 外科治療 72: 1123-1124, 1995
- 6) Lowe SW, Ruley HE, Jacks T et al: p53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell 74: 957-967, 1993
- 7) Hetts SW: To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA 279: 300-307, 1998
- 8) 近藤達平, 市橋秀仁, 今村達雄ほか: 制癌剤適応判定について. 癌の臨 10: 17-21, 1964
- 9) 小林昶運, 谷坂圭造, 近藤直人ほか: 新しい in vitro 抗癌剤感受性試験 collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test(CD-DST)法の確立とその臨床有用性の検討. 癌と化療 22: 1933-1939, 1995

Tumor Dormancy Therapy Against Gastroenterological Cancer by Immunochemotherapy

Yasuyuki Sugiyama, Shigetoyo Saji, Kunihiko Yasuda, Shigeru Mori,
Atsushi Matsuo and Atushi Watanabe
Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine

We conducted experimental and clinical studies to establish tumor dormancy therapy against gastroenterological cancer by immunochemotherapy. Immunopotentiators, such as OK-432, protein-bound polysaccharide (PSK) and lentinan, induced apoptosis in gastric cancer cell lines in vitro. Fluorouracil (FUra) in combination with cisplatin (CDDP) also induced apoptosis in cancer cells, even though dosages did not alter the cancer growth curve. In some cases, lentinan augmented the induction of apoptosis caused by such chemotherapeutic agents. Ten of 25 gastroenterological cancer patients were diagnosed as sensitive to low-dose CDDP-FUra by collagen gel droplet embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) testing. Nine patients with measurable advanced gastric cancer lesions in the peritoneal cavity underwent low-dose chemotherapy in combination with immunotherapy using lentinan, with the following clinical therapeutic effects; partial response in 2, minor response in 1, no change in 5, and disease progression in 1. Little toxicity was observed throughout treatment. In conclusion, low-dose chemotherapy combined with immunotherapy efficiently induces cancer cell apoptosis, suggesting this tumor dormancy therapy is a promising strategy in treating gastroenterological cancer.

Key words : tumor dormancy therapy, apoptosis of cancer cells, immunochemotherapy against gastroenterological cancer

[Jpn J Gastroenterol Surg 34 : 397-402, 2001]

Reprint requests : Yasuyuki Sugiyama Second Department of Surgery, Gifu University School of Medicine
40 Tsukasa-Machi, Gifu-City, 500 8705 JAPAN
