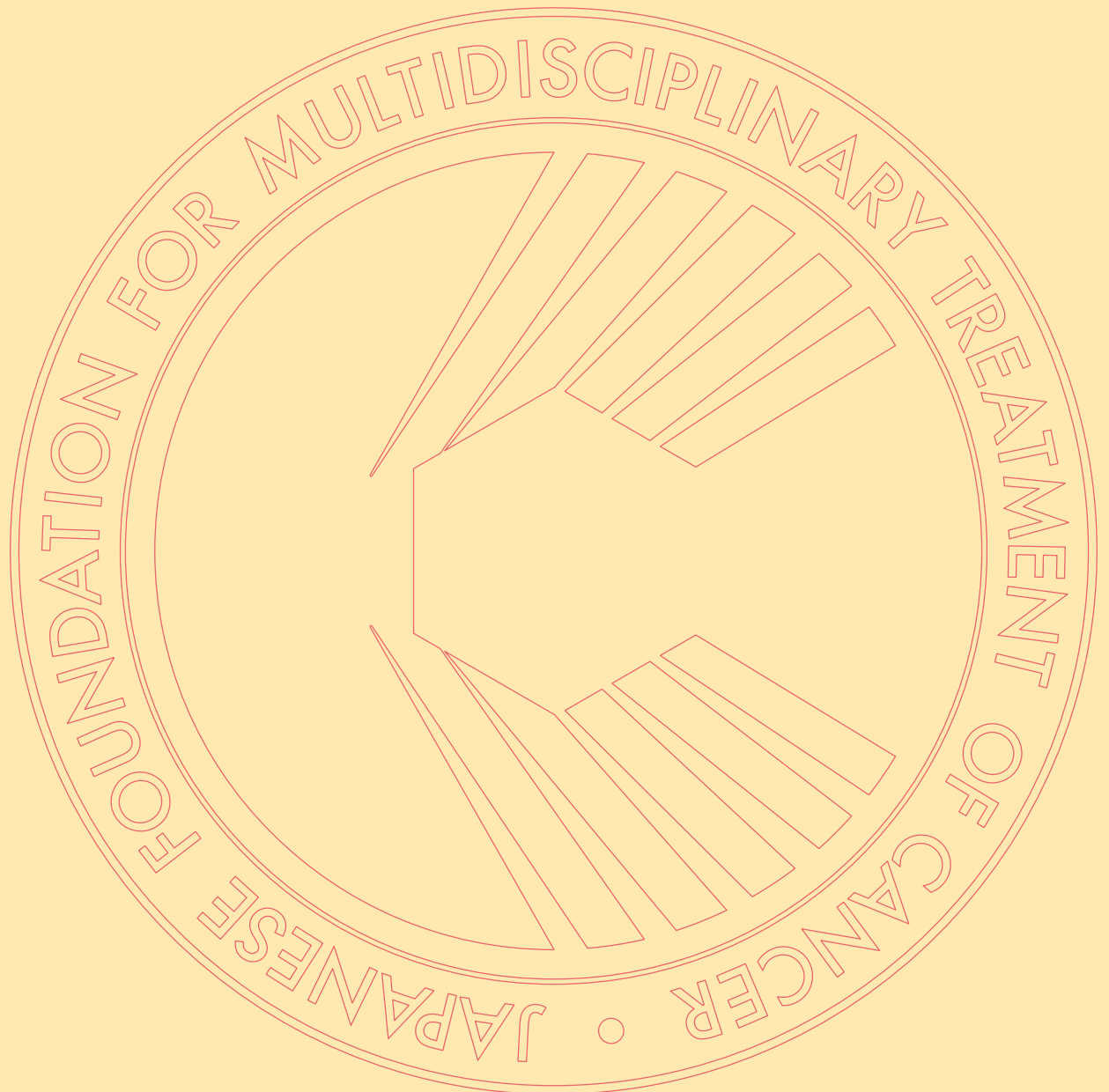


Advances in Cancer Treatment

# がん治療のあゆみ

2019/第39回一般研究助成



39



# 巻 頭 言

会長 山 岸 久 一

公益財団法人がん集学的治療研究財団（以下財団）の元祖は、一般財団法人として1980年（昭和55年）に井口 潔 九州大学名誉教授を理事長として設立され、2013年（平成25年）に佐治重豊 岐阜大学名誉教授が理事長の時に公益財団法人となり今日に至っております。公益財団法人として求められている事は、①公益性（利を得ない事）と②透明性の維持であります。

昨年の6月の前任の前原喜彦理事長の後を受けて、松本 晃理事長（以下松本理事長）が就任致しました。その後の令和2年2月に、同財団の会長として山岸久一 京都府立医科大学名誉教授が就任致しました。がん治療のあゆみ第39回一般研究助成号を発刊する直前に、松本理事長が病氣療養される事態が生じ、急遽会長が理事長代行として巻頭言を記すことになりました。

本財団設立当初から、研究助成事業を開始し、今年で40年になりますが、研究事業503件に対しまして総額6億5,640万円の助成をしてまいりました。対象課題は、臨床応用が可能となり得る「がんの集学的治療」に関する研究を広く一般公募して、一般研究選考委員会（選考委員長 掛地吉弘 神戸大学大学院医学研究科 教授）で厳正に評価し、公平性・透明性を保つ目的で選考委員会議事録には選考経緯や理由等の記録を保存して頂いております。

選考委員会の先生方には、公募一題一題につき十分な議論の上評価していただきましたことに対して厚く敬意を表すとともに感謝致しております。

本日お届けしました「がん治療のあゆみ第39巻」は、平成30年度受賞者の研究成果報告であります。応募件数51件の中から厳選された6題の研究成果であり、対象臓器は肺、乳腺、大腸、膵、胆道などに対する診断システム、個別化医療、スクリーニング法、治療効果予想など多彩であり、興味深い結果が得られていますので、ご高覧頂き、ご批判賜れば、幸甚に存じます。

結びに、令和元年度の一般研究助成金授与式には、財団理事・役員、選考過程でご尽力頂きました選考委員の先生方にもご臨席賜りましたことに心より感謝申し上げます。また、ご祝辞を賜りました公益財団法人がん研究会有明病院病院長の佐野 武先生には、心よりお礼申し上げます。優れた研究を推進する受賞者の方々、関係された多くの方々に厚く感謝申し上げます。

今後とも当財団へのご支援・ご指導を賜ります様、何卒宜しくお願い申し上げます。

令和2年3月31日



# 選 考 経 過 報 告

一般研究選考委員会

選考委員長 掛 地 吉 弘

選考経過をご報告申し上げます。

対象課題として、臨床応用が可能となりうる「癌の集学的治療」に関する研究を募集し、51件の応募を頂きました。応募締め切りは8月31日で、全ての応募書類のコピーを事務局より全ての選考委員に送付し、事前評価をしていただきました。その事前評価では、絶対評価のほかに評価が偏らないよう評価配分を定めた相対評価で採点をお願いしております。その選考結果を事務局で集計し、去る2018年10月4日に第43回一般研究選考委員会を開催しました。選考委員が上位から一題ずつ議論を充分に行って、厳正に評価を行いました。この選考委員会議事録は、公平性及び透明性を考慮し、経緯や理由を記録し、保存しております。

その結果、6件の応募課題を助成対象候補として理事会に上申し、承認いただきました。

そして、1年後の2019年12月13日に第39回一般研究発表会を開催し、研究成果報告として本冊子にまとめました。

助成金を受領される先生方をお願いします。

研究論文を発表される際には「がん集学的治療研究財団助成金」の補助を得た旨を明記して頂くようお願いいたします。先生方の業績に加わるとともに、財団からの助成金が癌の治療研究に役立ち、社会に貢献しているものと推察しております。本財団は公益法人ですので、acknowledgementを付した論文を刊行いただくことは、重要な意味を持っております。

最後になりましたが、ご多忙の中、選考のため多大の労を賜った選考委員の皆様には厚くお礼申し上げますとともに、ここに立派な成果をあげられた6名の研究者の皆様に対して、心からの感謝を捧げ、今後ますますのご研究の進展を希望します。

# がん治療のあゆみ 目次

巻頭言 .....	会長 山 岸 久 一
選考経過報告 .....	一般研究選考委員会・選考委員長 掛 地 吉 弘
●浸潤性膵管癌切除症例に対する門注療法および TS-1 を用いた術後補助療法の第Ⅱ相試験（多施設共同臨床試験）	北 郷 実 ..... 1 慶應義塾大学医学部 外科学教室（一般・消化器）
●光を用いた肺がん征圧への挑戦：DLL3 をターゲットとした光励起治療・診断システムの開発	佐 藤 和 秀 ..... 7 名古屋大学高等研究院・ 名古屋大学大学院医学系研究科 呼吸器内科
●原発巣・転移巣・血液中遊離 DNA の網羅的遺伝子解析による大腸癌肝転移に対する革新的な個別化治療の開発	杉 町 圭 史 ..... 14 九州がんセンター 肝胆膵外科
●癌分泌蛋白を含む微小環境と補体因子が及ぼす膵胆道癌進展機構の解明と治療開発	高 野 重 紹 ..... 20 千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科
●トリプルネガティブ乳癌から BRCAness 乳癌を簡易的にスクリーニングする方法の探索と開発	田 辺 真 彦 ..... 27 東京大学医学部附属病院 乳腺内分泌外科
●切除不能大腸癌肝転移に対する人工知能を用いた CT テクスチャ解析による治療効果予測	宮 本 裕 士 ..... 33 熊本大学病院 消化器外科



# 浸潤性膵管癌切除症例に対する門注療法および TS-1 を用いた術後補助療法の第Ⅱ相試験 (多施設共同臨床試験)

北郷 実\*, 北川 雄光\*

**要旨** 膵癌は極めて予後不良な疾患で、治療成績向上のため様々な集学的治療が試みられている。本研究の目的は周術期療法である門注療法 (PI4W) に引き続き、TS-1 を投与する術後補助療法の有用性を検証することである。本研究は多施設共同の前向き臨床試験として2014年2月に第1例目が登録された。2017年5月に目標の50例目が2次登録されて現在追跡期間となっている。本研究の主要評価項目は無再発生存期間 (RFS) と PI4W+TS-1 投与における高度有害事象発生頻度、副次的評価項目は全生存期間 (OS)、PI4W+TS-1 投与の有害事象発生頻度とその完遂率である。高度有害事象は認められず、PI4W の完遂率は94%、TS-1 は90%に導入され32%で完遂 (減量完遂36%) した。追跡途中解析結果として RFS は中央値18.7ヶ月、5年生存率31.6%、OS は中央値47.7ヶ月、5年生存率38.6%であった。

## はじめに

本邦の膵癌による死亡数は年々増加し、2017年には34,196人が死亡し、肺、大腸、胃に次いで癌死の第4位を占めている。膵癌は消化器癌の中で最も予後が悪く、根治が期待できる外科的切除でも単独治療ではまだ不十分である。そのため様々な集学的治療が積極的に試みられ、2004年にESPAC-1試験では5-FU/LVが膵癌切除後患者の全生存期間 (以下OS) を有意に改善することが示され、膵癌の術後補助療法の有用性が報告された<sup>1)</sup>。2007年にはCONKO-001試験でGemcitabine (以下GEM) が有意に無病生存期間 (以下DFS) 及びOSを改善することが報告された<sup>2)</sup>。本邦からもJSAP-02試験でGEMがDFSを有意に延長することが示され<sup>3)</sup>、GEMは術後補助療法として膵癌診療ガイドライン (2009年版) でグレードBに推奨され標準治療として認められた。その後本邦でGEMに対するTS-1のOSにおける非劣性を検証する第Ⅲ相試験 (JASPAC01) が行われ、TS-1がGEMに対しOSと無再発生存期間 (以下RFS) で有意に延長を認めたため<sup>4)</sup>、膵癌診療ガイドライン (2013年版) よりTS-1の単独療法がグレードAに推奨され本邦の標準治療となった。

一方、当教室では1986年より術後の周術期療法として5-FU (250mg/body) を2週間門脈内に投与する門注療法 (PI2W) を行い、PI2Wが手術単独群より肝転移を有意に抑制することを報告したがその成績はまだ満足できるものではなかった<sup>5)</sup>。2001年より投与期間を4週間に延長した門注療法 (以下PI4W) を開始したところ、術後肝転移率の減少と生存率の改善を認め、サブグループ解析でPI4Wに補助療法を付加することでさらに予後の改善を示した<sup>6)</sup>。当教室ではこの結果を踏まえ、周術期療法としてPI4Wによる導入療法に引き続き、維持療法としてGEMを投与する術後補助療法の有用性を検証する多施設共同臨床試験 (TOSPAC-01) を行い良好な成績を報告した<sup>7)</sup>。

今回、PI4Wに現在標準治療とされるTS-1を投与する術後補助療法の有用性について検証することを目的として、多施設共同で前向きの臨床第Ⅱ相試験を開始した。

\*慶應義塾大学医学部 外科学教室 (一般・消化器)



## 対象と方法

対象は、本研究について倫理委員会の承認をえられた参加施設で臨床試験に参加の同意がえられ、選択基準（表1）に合致することを確認して術前に1次登録を行い、術後3週以内に2次登録の選択基準（表1）に合致し2次登録された膵癌症例とする（図1）。

表1 適格基準及び除外基準

### 一次登録時選択基準

- 1) 病理組織学的に浸潤性膵管癌であることが確認されている、または疑われる症例。
- 2) 膵管癌に対する前治療を受けたことがない。
- 3) 年齢は20才以上、85才以下である。
- 4) ECOG Performance Status（附1）が0～1。
- 5) 主要臓器の機能が十分に保持されている。  
白血球数：4000/mm<sup>3</sup>以上  
好中球数：2000/mm<sup>3</sup>以上  
血小板数：10万/mm<sup>3</sup>以上  
血色素量：9 g/dl以上  
AST及びALT：正常値上限の5倍以下  
血清クレアチニン：正常範囲内
- 6) 除外基準に抵触しないこと。
- 7) 患者本人から文書による同意が得られている。

### 二次登録時選択基準

- 1) 肉眼的治癒切除が行われた浸潤性膵管癌の症例で、以下の条件を満たしたもの。
- 2) 病理組織学的に浸潤性膵管癌であることが確認されている（術前内視鏡検査等または術中迅速診断）。
- 3) 手術時の肉眼的根治度が、R0またはR1であること。
- 4) 術中門注用カテーテルが、門脈内に留置されていること。
- 5) 膵管癌に対する膵切除術以外の前治療を受けたことがない。
- 6) 除外基準に抵触しないこと。

### 除外基準

- 1) 臨床症状のある肺線維症または間質性肺炎を有する。
- 2) 利尿剤などの治療に反応しない胸水を有する。
- 3) 遠隔転移を切除した（郭清範囲内のリンパ節転移はここでいう遠隔転移には含めない）。
- 4) 活動性の重複癌を有する。
- 5) 明らかな感染症を有する。
- 6) 重篤な術後合併症（腹膜炎、大量出血など）があった。
- 7) 消化管の活動性潰瘍を有する。
- 8) 3カ月以内に心筋梗塞の既往がある。
- 9) 重症の精神障害がある。
- 10) 妊婦・授乳中及び妊娠の可能性又は意思がある症例、又は育児を希望する症例。
- 11) その他医師が本試験を安全に実施するのに不相当と判断した症例。

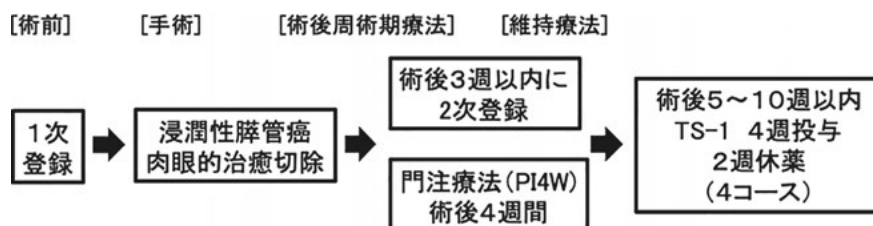


図1 臨床試験

導入療法のPI4Wは経門脈投与ルート（図2）と全身投与ルートからなる。投与方法は5-FU（250mg/body）とヘパリン（2000IU/body）を生食500mlに溶解し、門脈内に留置したカテーテルから28日間持続投与する。マイトマイシンC（MMC）（4mg/body iv, Day6, Day13, Day20, Day27）とシスプラチン（CDDP）（10mg/body div, Day7, Day14, Day21, Day28）は全身投与する。引き続き外来で維持療法としてTS-1（体表面積（BSA）により80mg（BSA < 1.25m<sup>2</sup>）/100mg（1.25m<sup>2</sup> ≤ BSA < 1.50m<sup>2</sup>）/120mg（1.50m<sup>2</sup> ≤ BSA）（分2）4週間投与2週間休薬を1コースとして4コース）を術後5週～10週以内に開始する（図3）。

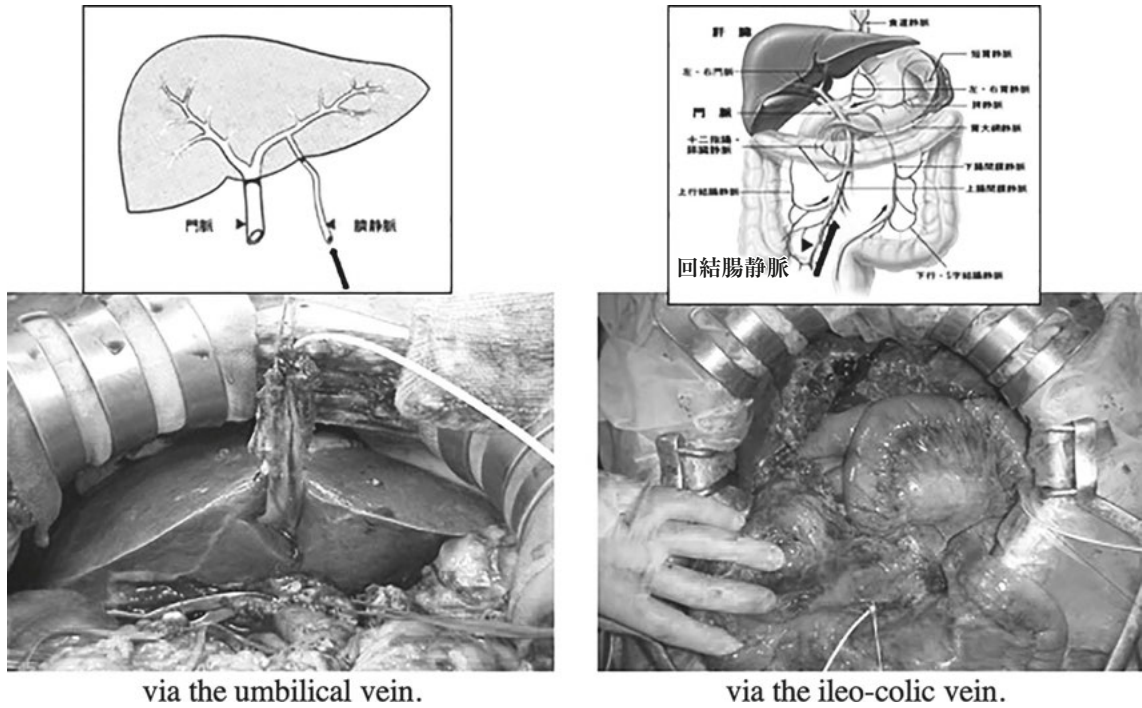


図2 門注カテーテル挿入法

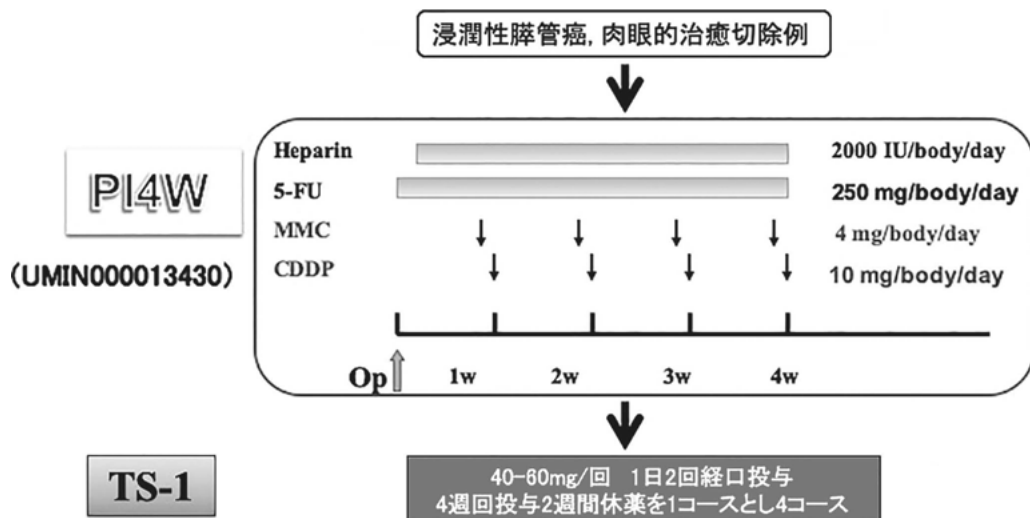


図3 PI4W+TS-1 プロトコール

主要評価項目はRFSとPI4W+TS-1施行における高度有害事象発生頻度、副次的評価項目はOS、PI4W+TS-1施行における有害事象発生頻度とその完遂率とした。予定症例数は50例、登録期間は3年、追跡期間は最終登録日より3年間とした。

## 結 果

2014年2月に第1例目の登録が行われ、2017年3月までに当施設を含めた5施設より1次登録が64例、そのうち50例が2次登録に進み、目標症例数に到達して集積終了となった。50例の患者背景は、年齢中央値69歳、性別は男性34例、女性16例。術式は膵頭十二指腸切除が25例(50%)、膵体尾部切除23例(46%)、膵全摘が2例(4%)であった。38例(76%)にR0切除が行われた(表2)。切除標本の病理組織学的所見はT1/T2/T3がそれぞれ5例(10%) / 0例 / 45例(90%)、リンパ節転移は39例(78%)に認め、UICCによるStage分類はStageIA/IB/IIA/IIBがそれぞれ4例(8%) / 0例 / 7例(14%) / 39例(78%)であった(表3)。

表2 患者背景 (N=50)

年齢	69 歳 (49-84)
性別 男 / 女	34 : 16
術式	
PD (PpPD, SSPpD)	25 (50%)
DP	23 (46%)
TP	2 (4%)
癌遺残	
R0 / R1	38 (76%) / 12

表3 病理所見 (膵癌取扱規約 第7版)

T因子	
T1	5 (10%)
T2	0
T3	45 (90%)
T4	0
N因子	
N0	11 (22%)
N1	39 (78%)
Stage (UICC7th)	
IA	4 (8%)
IIA	7 (14%)
IIB	39 (78%)
IB, III, IV	0
分化度	
well	9 (18%)
mod	38 (78%)
por	3 (6%)

PI4Wは47例(94%)で完遂し、3例(6%)が好中球減少(Grade4)や患者の希望などにて中断した。TS-1は45例に導入され、減量18例(36%)を含む34例(68%)で完遂した。

31例(62%)に再発を認め初回再発部位として12例(24%)に肝臓への転移を認めた。追跡途中の解析でRFSは中央値18.7ヶ月、5年生存率31.6%(図4)、OSは中央値47.7ヶ月、5年生存率38.6%であった(図5)。

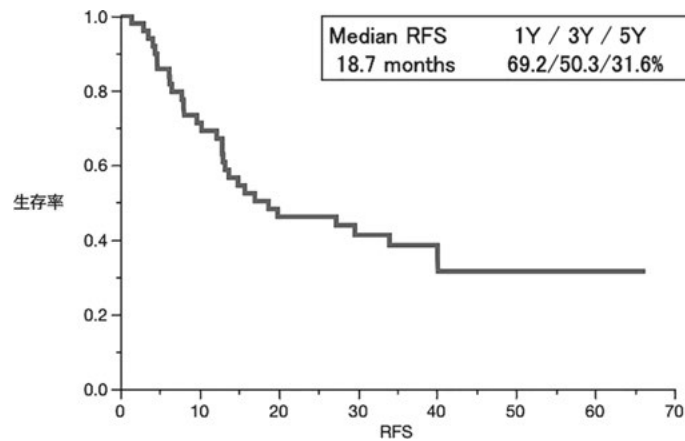


図4 無再発生存期間

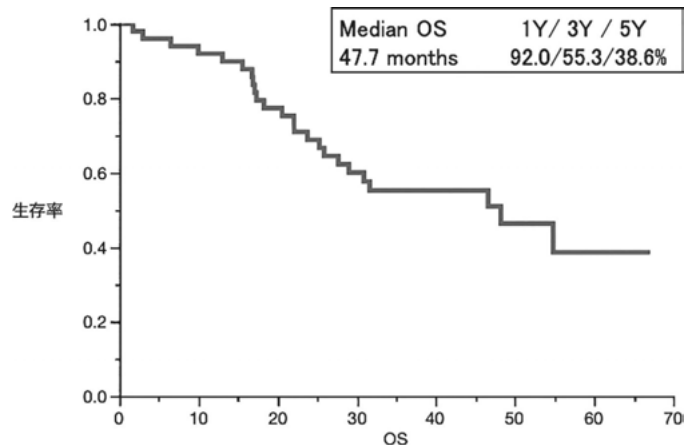


図5 全生存期間

## 考 按

今回、周術期療法である門注療法（PI4W）と維持療法としてTS-1を投与する膵癌術後補助療法を多施設共同臨床試験として安全に施行することが可能であった。特に高度侵襲を伴う膵切除術直後にもかかわらずPI4Wは94%で完遂することができた。中断した理由もGrade4の好中球減少と患者からの中断希望で重篤な有害事象を認めなかった。また、TS-1は45例（90%）に導入されたが5例（10%）に導入されず、その理由は1例が早期再発、4例が患者の希望であった。TS-1は減量を含め34例（68%）で完遂し、これは既報（JASPAC-01）と同程度であった<sup>4)</sup>。

まだ追跡期間中であるが、これまで31例（62%）に再発を認め、初回再発部位として肝転移と局所再発がそれぞれ12例（24%）、癌性腹膜炎7例（14%）、肺転移5例（10%）であった。肝転移の1例は早期に再発したためTS-1の導入が行われなかった。RFSは中央値が18.7ヶ月、5年生存率は31.6%で以前のPI4W+GEMによる術後補助療法（TOSPAC-01<sup>7)</sup>のRFS（中央値15ヶ月、5年生存率31.9%）とほぼ同等であった。また、これまでのところ原病死が20例、他病死が3例で、OSの中央値は47.7ヶ月、5年生存率は38.6%でTOSPAC-01<sup>7)</sup>のOS中央値32ヶ月、5年生存率34%より良好であった。2020年3月の追跡終了時点で最終解析を予定している。

## おわりに

本試験はTOSPAC-01試験同様、PI4Wが膵切除術直後でも安全に施行することを再確認した。追跡途

中であるが、RFS に関しては GEM を維持療法とした TOSPAC-01 と同等で OS では良好な結果であった。

最後に、本研究にご支援いただきました公益財団法人がん集学的治療研究財団の皆様に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Neoptolemos JP, Stocken DD, Friess H, et al: A Randomized Trial of Chemoradiotherapy and Chemotherapy after Resection of Pancreatic Cancer. *N Engl J Med* **350**(12) : 1200-10, 2004.
- 2) Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, et al: Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* **310** : 1473-81, 2013.
- 3) Ueno H, Kosuge T, Matsuyama Y, et al: A randomised phase III trial comparing gemcitabine with surgery-only in patients with resected pancreatic cancer: Japanese Study Group of Adjuvant Therapy for Pancreatic Cancer. *Br J Cancer* **101** : 908-15, 2009.
- 4) Uesaka K, Boku N, Fukutomi A, et al: Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial (JASPAC 01). *Lancet* **388** : 248-57, 2016.
- 5) Takahashi S, Aiura K, Saitoh J, et al: Treatment strategy for pancreatic head cancer: pylorus-preserving pancreatoduodenectomy, intraoperative radiotherapy and portal catheterization. *Digestion 60 Suppl 1* : 130-4, 1999.
- 6) Aiura K, Takahashi S, Matsui J, et al: Beneficial effects of 5-Fluorouracil and heparin-based portal infusion chemotherapy combined with mitomycin C and cisplatin after curative resection of pancreatic cancer. *Pancreatology* **10** : 250-8, 2010.
- 7) Kitago M, Aiura K, Takigawa Y, et al: Multicenter phase II study of portal infusion chemotherapy followed by gemcitabine for resected pancreatic cancer (TOSPAC-01) (2nd report). *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences 24 Suppl 1* : 121, 2017.

# 光を用いた肺がん征圧への挑戦：DLL3 をターゲットとした 光励起治療・診断システムの開発

磯部 好孝\*, 滝 俊一\*, 高橋 一臣\*,  
安井 裕智\*, 西永 侑子\*, 佐藤 和秀\*, \*\*, \*\*\*

**要旨** 小細胞肺癌 (SCLC) は予後不良の疾病であり治療の選択肢は限られている。Delta like protein 3 (DLL3) は、SCLC に特異的に発現していることが近年に明らかになり治療標的として注目されている。今回我々はすでに開発された抗 DLL3 モノクローナル抗体である Rovalpituzumab を用い、小細胞肺癌を標的とした近赤外光線免疫療法 (near infrared photoimmunotherapy: NIR-PIT) の開発をおこなった。Rovalpituzumab に光感受物質である IR700 を結合し Rovalpituzumab-IR700 (Rova-IR700) を作成した。DLL3 を過剰発現する SCLC 細胞と DLL3 を発現しない対照細胞を共培養し rova-IR700 を添加後、波長 700nm 付近の近赤外光に曝露した。DLL3 過剰発現細胞は、照射後すみやかな細胞死が誘導されたが、対照細胞には影響を及ぼさなかった。ヌードマウスに DLL3 過剰発現の小細胞肺癌株を用い皮下異種移植片を作成し、Rova-IR700 を静注した。近赤外光を照射したところ、対照群に対し PIT 群では有意な腫瘍の増大抑制効果が見られた。以上から、DLL3 を標的とした NIR-PIT は小細胞肺癌に対する新規治療となり得ると考えられた。

## 背 景

小細胞肺癌は肺癌の約 15% を占める高悪性度の腫瘍である。進展型で発見されることが多く、限られた治療手段しかなく予後が悪い。2018 年に進展型小細胞肺癌の一次治療において、抗 PD-L1 抗体アテゾリズマブを化学療法に上乘せすることで、既存治療より良好な全生存期間となることが示された<sup>1)</sup>。一次治療で既存治療を上回る結果が示されたのは実に 20 年以上ぶりであり、未だ小細胞肺癌に対する新規治療への要望は多い。

Notch signaling pathway のリガンドである Delta-like protein 3 (DLL3) は近年見出された、小細胞肺癌に特異的な治療標的である。近年 DLL3 を標的とした抗体薬物複合体、Rovalpituzumab-tesirine (Rova-T) が作成され、臨床試験が行われてきた<sup>2) 3)</sup>。Rova-T は DLL3 を標的とする初めての薬剤で期待されていたが、2つの第3相試験において否定的な結果が示され、2019年8月に開発が終了となった。しかしながら DLL3 の小細胞肺癌に特異的に発現するという特性は不変であり、今なお有望な治療標的である。

近赤外光線免疫療法は 2011 年に米国 NIH の小林らによって報告された新機序の癌治療法である<sup>4)</sup>。標的細胞が発現する抗原に対する特異的抗体に IR700 という光感受物質を結合させ、抗体-光感受物質が細胞表面に結合しているときに波長 700nm 付近の近赤外光を照射すると、細胞にネクロシスが誘導される<sup>5)</sup>。抗体と光照射によって二重に対象を選択しており、極めて選択性の高い治療法である。現在、EGFR を標的とした局所再発頭頸部扁平上皮癌に対する国際第3相試験が実施されており (LUZERA-301, NCT03769506)、数年以内の臨床導出が期待されている。

今回我々は抗 DLL3 モノクローナル抗体である Rovalpituzumab と NIR-PIT を用い、前臨床の小細胞肺癌に対する新機序治療法確立を目的に研究を行った。

\*名古屋大学大学院医学系研究科 呼吸器内科

\*\*名古屋大学高等研究院 S-YLC

\*\*\*同 最先端イメージング分析センター/医工連携ユニット

## 対象と方法

### 1. 試薬

水溶性シリカ-フタロシアニン誘導体 IRDye 700DX NHS エステルを、LI-COR Biosciences (Lincoln, NE, USA) から購入した。抗 DLL3 モノクローナル抗体の Rovalpituzumab は Creative Biolabs (NY, USA) から入手した。他のすべての化学物質は試薬級を使用した。

### 2. 細胞株

SBC3 および SBC5 (日本人患者由来のヒト SCLC 細胞株) は、日本研究バイオリソースコレクション (JCRB) から入手した。3T3 (マウス線維芽細胞), H69 (ヒト SCLC) および H82 (ヒト SCLC) は、American Type Culture Collection (ATCC) から入手した。Cdk4/hTERT 不死化正常ヒト気管支上皮細胞系 HBEC3 は、Hamon Center コレクション (テキサス大学サウスウエスタンメディカルセンター) から入手した。DLL3, GFP, およびルシフェラーゼを発現する SBC5 および 3T3 細胞株は、RediFect Red-FLuc レンチウイルス粒子 (PerkinElmer) および DLL3-GFP レンチウイルス粒子 (OriGene) を遺伝子導入することによって確立した。RFP 安定発現 Balb/3T3 細胞を、RFP (EF1a)-プロレンチウイルス粒子 (AMSBIO) によるトランスフェクションにより確立した。DLL3, GFP, ルシフェラーゼ, または RFP の安定した高発現は 10 回以上の継代を通して確認された。DLL3, GFP, ルシフェラーゼ発現 SBC5/3T3 を SBC5-DLL3-luc-GFP/3T3-DLL3-luc-GFP, RFP 発現 3T3 を 3T3-RFP と略す。H69/CDDP (「薬物」は細胞がその薬物に対して耐性を有することを意味する), H69/VP は近畿大学ゲノム生物学部西尾和人教授から, SBC3/CDDP, SBC3/ETP, SBC3/SN38 は、岡山大学呼吸器科木浦克之教授からのご厚意により提供された。

### 3. 細胞培養

細胞は全て、10% ウシ胎児血清およびペニシリン (100IU/ml)-ストレプトマイシン (100mg/ml) (Thermo Fisher Scientific) を添加した RPMI1640 (Thermo Fisher Scientific) で培養した。

### 4. Rovalpituzumab-IR700 (Rova-IR700) の合成

Rovalpituzumab (1 mg, 6.8nmol) を、0.1mol/L の  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (pH8.6) 中の IR700 NHS エステル (LI-COR Biosciences) (66.8mg, 34.2nmol, 5mmol/L, DMSO) と共にインキュベートした。室温で 1 時間インキュベートしたのち混合物を Sephadex G50 カラム (PD-10; GE Healthcare) で精製した。タンパク質濃度は、Coomassie Plus タンパク質アッセイキット (Thermo Fisher Scientific) と分光光度計 (Novaspec Plus; GE Healthcare) を用いて 595nm での吸収を測定することにより決定した。分光光度計を用いて 689nm での吸収により IR700 の濃度を測定して、mAb に結合した IR700 の数を確認した。平均 3 つの IR700 分子が 1 つの抗体に結合するように合成を制御した。合成の品質管理として SDS-PAGE を行った。蛍光バンドは、Odyssey Imager (LI-COR Biosciences) を用いて 700nm の蛍光チャンネルで測定した。DLL3 への特異的結合を確認するために、フローサイトメトリー (Gallios, Beckman Coulter) を SBC3, 3T3 および HBEC3 を用いて行った。20 万個の細胞を 12 ウェルプレートに播種し、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$  の rova-IR700 と共に 37 $^{\circ}\text{C}$  で 12 時間インキュベートした。2 回洗浄した後、培地を PBS に交換した。細胞をピペティングでウェルから剥離し、フローサイトメーター (Gallios, Beckman Coulter) によって 1 万個の細胞について IR700 の蛍光を評価した。HBEC3 は評価前に CD16 抗体 (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; CD16/32 モノクローナル抗体 (93), Thermo Fisher Scientific) と共に 6 時間インキュベートして、細胞と Rovalpituzumab の Fc 領域の非特異的結合を阻害した。Block Study は SBC3 を用いて実施した。20 万個の

SBC3に10 $\mu$ g/mLとなるよう Rovalpituzumab を添加し12時間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、Rova-IR700を添加し6時間インキュベートし、洗浄の後フローサイトメーターで評価した。

## 5. 蛍光顕微鏡

Rova-IR700のDLL3に対する特異性、およびこれを用いたNIR-PITの観察を行った(A1RsiおよびTiE-A1R; Nikon Instech)。1万個の細胞をガラスボトムディッシュに播種し、6時間インキュベートした。次に、Rova-IR700を10 $\mu$ g/mLで培地に添加し、37 $^{\circ}$ Cで12時間インキュベートした。次いで細胞をPBSで2回洗浄した後、培地をPBSに交換した。ヨウ化プロピジウム(PI, 1:2,000; Thermo Fisher Scientific)およびSytox Blue(1:500; Thermo Fisher Scientific)を用いて死細胞を検出した。観察の30分前に死細胞染色を培地に添加した。次いで細胞を近赤外光(4J/cm<sup>2</sup>)に曝露し、その後顕微鏡画像を撮像した。

## 6. *in vitro* NIR-PIT

20万個の細胞を12ウェルプレートに播種し、10 $\mu$ g/mLのrova-IR700と共に37 $^{\circ}$ Cで12時間インキュベートした。PBSで2回洗浄した後、培地をPBSに交換した。細胞を、670-710nmの波長で発光するNIR発光ダイオード(L690-66-60, ウシオ エピテックス)で照射した。実際の電力密度(mW/cm<sup>2</sup>)は光パワーメータ(PM100, Thorlabs)を用いて測定した。

## 7. *In vitro* NIR-PITの定量的評価

rova-IR700を用いたNIR-PITの*in vitro*細胞傷害性を、ルシフェラーゼ活性およびフローサイトメトリーとPI染色で定量的に評価した。ルシフェラーゼ活性のために、150 $\mu$ g/mLのD-ルシフェリン含有培地(GoldBio)200 $\mu$ lをNIR-PITの24時間後にPBSで洗浄した細胞に投与し、発光をプレートリーダーで分析した。(Powerscan 4, BioTek)。NIR-PITの後、異なる時点(1, 3, 6および24時間)でルシフェラーゼ活性を評価し、この結果からルシフェラーゼ活性はNIR-PITの24時間後に評価することとした。フローサイトメトリーアッセイでは、光照射の1時間後にピペッティングで細胞を剥離し、PIを添加後(2 $\mu$ g/mL)、室温で30分間インキュベートした。PI蛍光をFACS Calibur (Becton Dickinson)を用い1万個の細胞について評価した。

## 8. 動物と腫瘍モデル

全ての*in vivo*実験は、名古屋大学の動物管理使用委員会の規則に従って行われた。8-12週齢の雌のホモ接合性胸腺欠損ヌードマウスを中部科学資材から購入した。処置中、マウスをイソフルランで麻酔した。600万個のSBC5-DLL3-luc-GFP細胞をマウスの右または両方の背部に皮下注射した。腫瘍体積を評価するために、最大径とそれに直行する幅がノギスで体表から測定した。キャリパー測定に基づく腫瘍体積は、以下の式によって計算された。腫瘍体積=最大径x幅<sup>2</sup>x0.5。細胞移植の13日後に腫瘍体積が約200mm<sup>3</sup>程度に至ったマウスを選択した。選択したマウスにD-ルシフェリン(15mg/ml, 200 $\mu$ L)を腹腔内注射し、IVISイメージングシステム(PerkinElmer)を用いてルシフェラーゼ活性が定量評価可能であったマウスを最終的に実験に組み入れた。動物愛護の観点から腫瘍の最大径が15mmを超えた場合、二酸化炭素でマウスの安楽死処置を行った。

## 9. 生体蛍光イメージング

治療前後のIR700蛍光画像は、蛍光画像装置(Peal Imager, LI-COR Biosciences)を用いて取得した。



## 10. *In vivo* における局所の DLL3 標的 NIR-PIT

異種移植片を背部に1個に持ったマウスを無作為に以下の4群に割り付けた。1) 対照群 2) 近赤外光照射単独群 3) Rova-IR 投与単独群 4) NIR-PIT 群。いずれの群も7匹以上のマウスが組み入れられた。Rova-IR700を投与する群にはDay-1(腫瘍細胞の皮下注射から13日後)にRova-IR700 50 $\mu$ gを尾静注した。近赤外光を照射する群にはDay 0に100J/cm<sup>2</sup>, Day 1に50J/cm<sup>2</sup>の近赤外光を照射した。

## 11. 統計

別段の指定がない限り、データは最小4回の実験からの平均値 $\pm$ SEMとして表す。統計プログラム(GraphPad Prism, GraphPad Software)を用いて統計分析を行った。二群比較のために、Mann-Whitney 検定またはt検定を使用した。複数のグループを比較するために、Tukey 検定を用いた一元配置分散分析またはDunn 検定を用いたKruskal-Wallis 検定を用いた。累積生存確率を、Kaplan-Meier 生存曲線分析を用いて各群において推定し、結果をlog-rank 検定およびWilcoxon 検定で比較した。P < 0.05は統計的に有意な差と考えた。

## 結 果

### 1. IR700 と抗 DLL3 抗体の結合

SDS-PAGEでRova-IR700は抗体のバンドに一致してIR700の蛍光を認めたが、Rovalpituzumab単独では検出可能な蛍光シグナルを示さなかった(図1A)。DLL3およびRova-IR700を用いたWestern Blottingでは、Rova-IR700がDLL3に結合することを確認した(図1B)。フローサイトメトリーアッセイにおいて、SBC3上のDLL3シグナルは、過剰なRovalpituzumabの添加によりブロックされた(図1C)。3T3およびHBEC3ではシグナルがほとんど観察されなかった。これらの結果は、RovalpituzumabとIR700が結合し、Rova-IR700がDLL3に特異的に認識することが確認された。

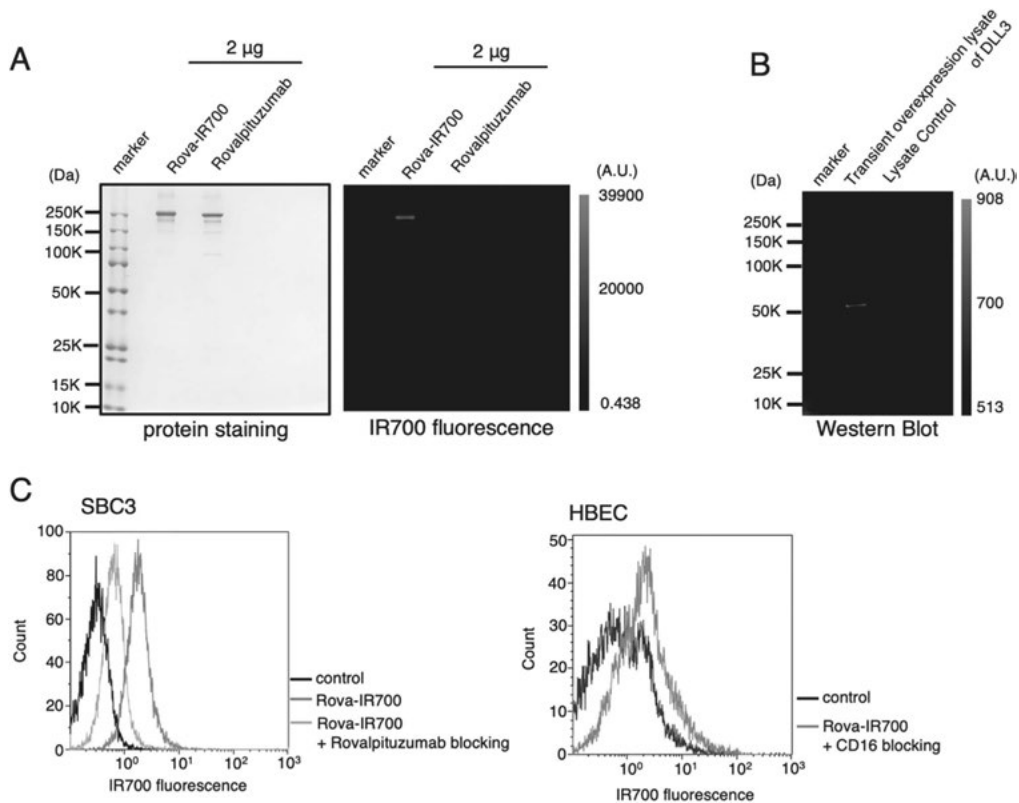


図1 IR700 と抗 DLL3 抗体の結合

2. DLL3 発現細胞株における rova-IR700 を用いた *in vitro* NIR-PIT

SBC5-DLL3-luc-GFP および 3T3-DLL3-luc-GFP の蛍光顕微鏡観察を NIR-PIT の前後に行った。近赤外光 (4 J/cm<sup>2</sup>) への曝露後、細胞の膨張と破裂、および死細胞染色が観察された。これらの変化は、露光後 30 分以内に観察され、NIR-PIT 後の necrotic な細胞死の誘導を示唆している (図 2A)。DLL3 を発現していない非標的細胞の 3T3-RFP に有意な変化は観察されなかった (図 2B)。

次に、*in vitro* NIR-PIT の効果を定量化するために、フローサイトメトリーとルシフェラーゼ活性を評価した。PI で評価した細胞死率は光の J 数に依存的に増加した。NIR-light 単独または Rova-IR700 単独では有意な細胞傷害性は観察されなかった (図 2C)。ルシフェラーゼ活性は、NIR-PIT 群において発光量の有意な減少を示した (図 2D)。以上から DLL3 を標的とした NIR-PIT が *in vitro* で光用量依存的に細胞死を誘導することが確認された。

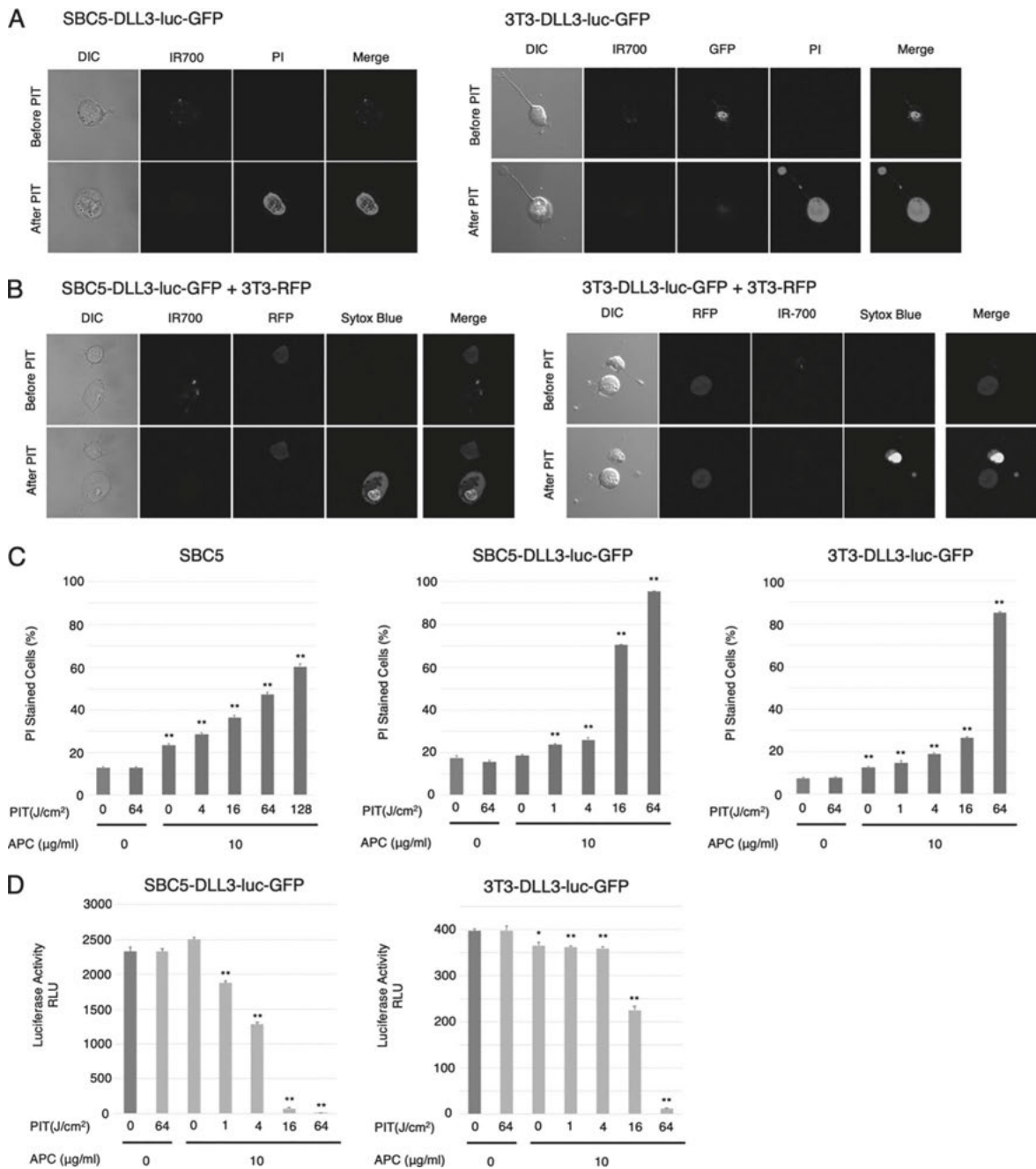


図 2 DLL3 発現細胞株における rova-IR700 を用いた *in vitro* NIR-PIT

### 3.3. 担癌マウスモデルにおける DLL3 を標的とした *In vivo* NIR-PIT

背部に1個の異種移植瘤を持つマウスにおいて、IR700の蛍光は、近赤外光照射後に減少した。対照群、近赤外光単独群、およびRova-IR700単独群の腫瘍発光は、腫瘍増殖のため漸増を示した。対照的に、NIR-PIT群のルシフェラーゼ活性はDay 2まで徐々に減少した(図3A)。腫瘍体積はDay 3とDay 7において対照群に対しNIR-PIT群で有意な縮小を認めた(PIT group vs. control group at day 17: \*,  $P=0.0212 < 0.05$ ; PIT group vs control group at day 21: \*,  $P=0.0084 < 0.01$ ; PIT group vs light only group at day 21: \*,  $P=0.0123 < 0.05$ ; PIT group vs. light only group at day 24: \*,  $P=0.0136 < 0.01$ , Kruskal-Wallis test with posttest)(図3B)。

IVIS spectrum CTで発光定量を行い、初回NIR-light照射前の発光との比を比較した。腫瘍の発光は初回NIR-light照射1日後と2日後に有意な発光の低下を認めた(各群5匹)(PIT group vs. light only group at (b): \*,  $P=0.0007 < 0.01$ ; PIT group vs control group at (c): \*,  $P=0.0385 < 0.01$ , Kruskal-Wallis test with posttest)(図3C)。各群のマウスの生存を観察したところ、NIR-PIT群で有意な生存の延長を認めた(\* $p=0.023 < 0.05$ , Log-rank test)(図3D)。

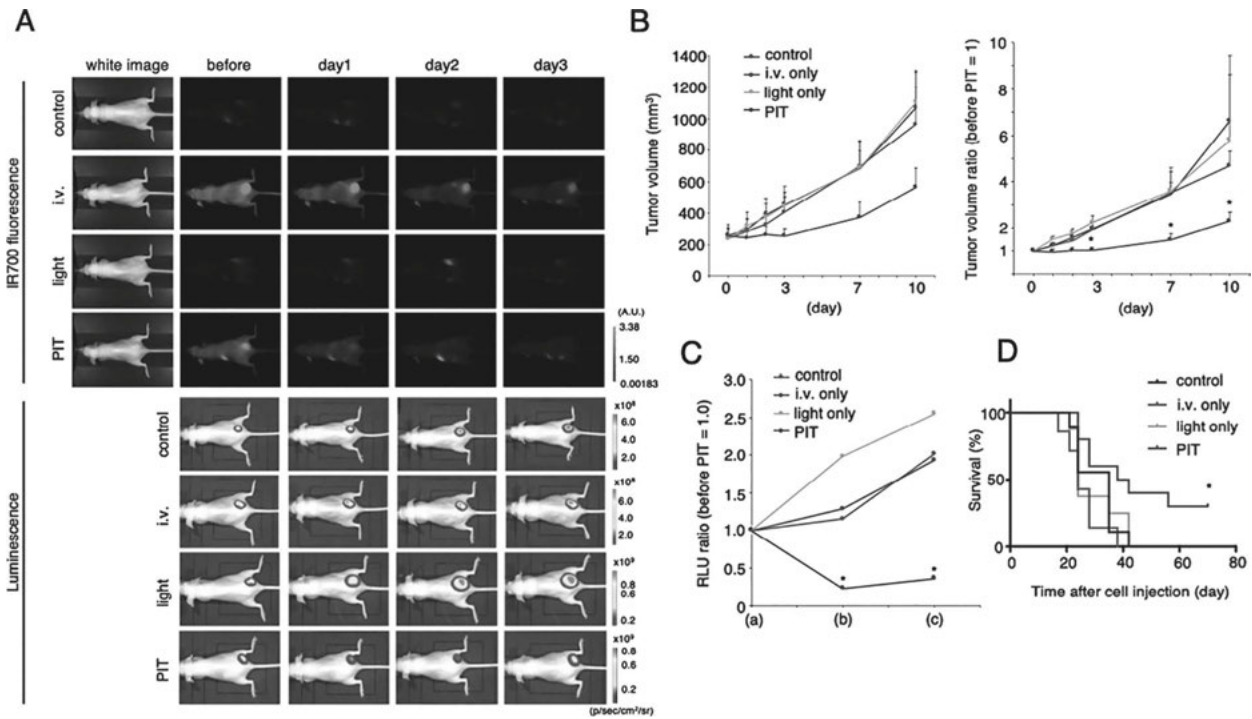


図3 担癌マウスモデルにおける DLL3 を標的とした *In vivo* NIR-PIT

## 考 察

抗 DLL3 抗体と NIR-PIT を用い、小細胞肺癌に対する新機序の治療法を前臨床で検討した。

抗 DLL3 抗体である Rovalpituzumab と IR700 は適切に合成され、Rova-IR700 が作成された。Rova-IR700 と近赤外光を用いた NIR-PIT は *in vitro* において DLL3 を発現した標的細胞のみを障害し、非標的細胞は障害しなかった。*In vivo* の実験では皮下異種移植片をもつマウスモデルにおいて、NIR-PIT 群は対照群に対し有意な腫瘍増大抑制効果を示した。

非小細胞肺癌に対する分子標的治療はこの 20 年で劇的に進歩し、様々な選択肢があるのに対し、小細胞肺癌では抗 PD-L1 抗体のみであり、新規治療法に対する要望は強い。

本研究で実施した NIR-PIT は既存のいずれの治療法とも異なる機序で癌細胞を障害し、選択性も高いため副作用が軽微であること、既存のいかなる治療とも併用しうることが期待される。胸腔内に適切に近

赤外光を照射するデバイスが現時点ではないことや、進展型小細胞肺癌に対する治療戦略は今後も検討が必要である。

## 結 語

DLL3を標的としたNIR-PITは小細胞肺癌に対する新たな治療になりえる。人に応用するためには光源の開発を中心にさらなる検討が必要である。本研究は、*EBioMedicine*. 2020 (52) 102632に掲載された<sup>6)</sup>。

## 謝 辞

本研究をご支援いただきました「公益財団法人がん集学的治療研究財団」の皆様方に深謝申し上げます。

## 文 献

- 1) Horn L, Mansfield AS, Szczesna A, et al: First-Line Atezolizumab plus Chemotherapy in Extensive-Stage Small-Cell Lung Cancer. *N Engl J Med* **379**(23) : 2220-9, 2018. doi:10.1056/NEJMoal809064
- 2) Saunders LR, Bankovich AJ, Anderson WC, et al: A DLL3-targeted antibody-drug conjugate eradicates high-grade pulmonary neuroendocrine tumor-initiating cells in vivo. *Sci Transl Med* **7** (302) : 302ra136-302ra136, 2015. doi:10.1126/scitranslmed.aac9459
- 3) Rudin CM, Pietanza MC, Bauer TM, et al: Rovalpituzumab tesirine, a DLL3-targeted antibody-drug conjugate, in recurrent small-cell lung cancer: a first-in-human, first-in-class, open-label, phase 1 study. *Lancet Oncol* **18**(1) : 42-51, 2017. doi:10.1016/S1470-2045(16)30565-4
- 4) Mitsunaga M, Ogawa M, Kosaka N, Rosenblum LT, Choyke PL, Kobayashi H. Cancer cell-selective in vivo near infrared photoimmunotherapy targeting specific membrane molecules. *Nat Med* **17** (12) : 1685-91, 2011. doi:10.1038/nm.2554
- 5) Sato K, Ando K, Okuyama S, et al: Photoinduced Ligand Release from a Silicon Phthalocyanine Dye Conjugated with Monoclonal Antibodies: A Mechanism of Cancer Cell Cytotoxicity after Near-Infrared Photoimmunotherapy. *ACS Cent Sci* : acscentsci.8b00565, 2018. doi:10.1021/acscentsci.8b00565
- 6) Isobe Y, Sato K\*, Nishinaga Y, Takahashi K, Taki S, Yasui H, Shimizu M, Endo R, Koike C, Kuramoto N, Yukawa H, Nakamura S, Fukui T, Kawaguchi K, Yoshikawa C, TF, Baba Y, Hasegawa Y, Near Infrared Photoimmunotherapy Targeting DLL3 For Small Cell Lung Cancer. *EBioMedicine*. 2020 (52) 102632

# 原発巣・転移巣・血液中遊離 DNA の網羅的遺伝子解析による 大腸癌肝転移に対する革新的な個別化治療の開発

杉町 圭史\*

**要旨** 局所進行大腸癌に対して化学療法後に conversion surgery を行った症例においてその治療成績と治療前後の組織および血漿中の網羅的遺伝子変異解析の有用性を検討した。局所進行大腸癌に対して術前化学療法後に切除を行なった 10 例を対象に、治療前後の原発巣、転移巣、化学療法後血漿の癌関連 47 遺伝子変異を次世代シーケンサーで網羅的に解析した。平均 3.8 コースの化学療法により腫瘍縮小が得られ、全例で組織学的局所 R0 切除が行われた。治療前に見られた 1-14 個の non-synonymous 変異は治療後切除組織では 1-2 個しか見られず、腫瘍の不均一性または術前治療によるサブクローンの変化を反映していると考えられた。治療前後で変化なく見られたクローナルなファウンダー遺伝子変異は転移巣組織でも検出され、それらは血漿中循環腫瘍 DNA でも同様に検出された。治療中の遺伝子変異の経時的な解析は治療薬選択や手術時期の決定に有用であり、ファウンダー変異の検出は生検組織から血漿中 DNA に代用できうと考えられた。

## はじめに

近年生活習慣の欧米化に伴い本邦における大腸癌の発症が急増している。治療の進歩により疾患の予後は改善してきたが、進行大腸癌の予後はいまだ不良である。肝転移は大腸癌罹患者の約 11%に見られその制御は大腸癌患者の予後を左右するが、肝切除によって摘出することができれば約 40%で根治が得られるため術前化学療法と肝切除によって肝転移を制御することで大腸癌患者の予後を大幅に改善することが期待できる。進行・再発大腸癌に対する薬物治療では分子標的治療薬の開発と臨床応用が進み、特に抗 EGFR 抗体薬などの新規分子標的薬を使用することにより治療成績の向上と個別化治療が前進した。しかし、大腸癌細胞の KRAS 遺伝子に変異がある場合は EGFR 軸内で無軌道な増殖シグナル伝達カスケードが保持されるため抗 EGFR 薬の効果ないことがわかっている。また EGFR 下流シグナル軸の中で、KRAS 以外の NRAS や BRAF 遺伝子変異が抗 EGFR 薬の治療効果に影響を及ぼしている可能性があり KRAS 遺伝子変異検索のみでは有効な個別化治療が行われていない可能性がある<sup>1)</sup>。さらに大腸癌の腫瘍多様性が問題となり、KRAS 遺伝子変異に代表される不均一性 (heterogeneity) は個体間のみならず、同一個体同一腫瘍内にも遺伝学的に heterogeneity があるため、従来の単一の変異検索のみでは正確な分子治療標的が同定されていない可能性がある<sup>2)</sup>。

今回、我々はこれらの課題を克服するために、進行大腸癌で術前化学療法後に切除を行った症例において、網羅的遺伝子変異パネルを用いた研究を計画した。本研究の目的は、術前治療選択のための包括的遺伝子異常診断の正確性・妥当性を明らかにすることにより、進行大腸癌の至適な術前化学療法併用根治手術の best practice を構築し、治癒切除率を向上させることである。

## 対 象

局所進行大腸癌で周囲臓器や周囲組織に直接浸潤し、UICC の TNM 分類で T4a または T4b と診断された症例を集積した。全例でオキサリプラチンを含む多剤併用全身化学療法を施行した後に大腸原発巣の

\* 国立病院機構九州がんセンター 肝胆膵外科

切除を行った症例を集積した。研究への参加について文書による同意が得られた 10 症例を最終的に集積した (表 1)。

表 1 術前化学療法後に原発巣切除を行なった局所進行 (T4a/4b) 大腸癌 10 例

No	年齢	性別	原発巣部位	局所浸潤臓器	遠隔転移臓器
1	54	男	左側	膀胱	-
2	68	男	右側	後腹膜	腹膜
3	62	女	左側	仙骨	-
4	64	女	左側	後腹膜	肺
5	81	男	左側	膀胱	肝
6	66	男	左側	前立腺	-
7	73	女	左側	子宮	-
8	61	男	左側	仙骨, 膀胱	-
9	70	男	左側	前立腺	-
10	71	男	左側	前立腺	-

治療前に大腸原発巣の 3-5 箇所より内視鏡的生検で検体を採取し DNA を抽出した。術前化学療法後の外科的切除を行い、大腸現発巣より検体を採取した。2 症例は肝臓と脾臓に遠隔転移があり、それぞれ転移巣切除を行なった際に検体を採取した。2 症例では原発巣切除前に 10ml の全血液を採取し、遠心分離後の血漿を採取した。

### 方 法

47 の癌関連遺伝子のライブラリーを検出する ClearSeq Cancer Panel (Agilent Technologies 社) を使用した (図 1)。ゲノム DNA を制限酵素で処理し、インデックスプライマーの存在下で HaloPlex プロブライブラリー (Agilent Technologies) とハイブリダイゼーションした。HaloPlex プロブをビオチン化し、ストレプトアビジンでコートした磁化ビーズで DNA を集め、DNA を環状化した。次に標的 DNA プロブを PCR で増幅した。標的遺伝子の DNA ライブラリーを次世代シーケンサー HiSeq 2500 (Illumina 社) でシーケンスした。シーケンス深度 100 以上, 変異アリル頻度 0.001 以上, Fisher's

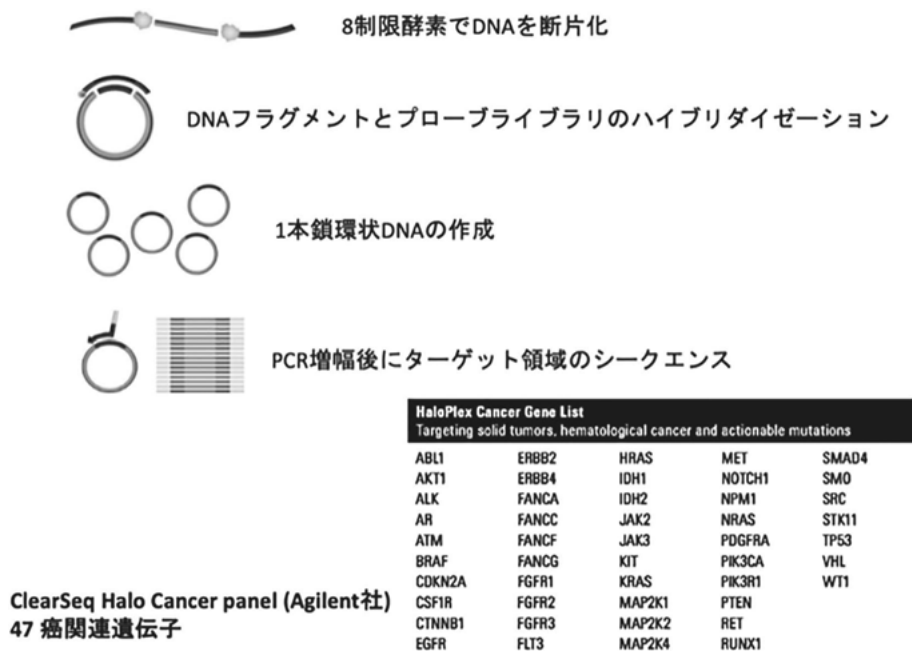


図 1 本研究で行なった網羅的遺伝子変異検索の方法と 47 癌関連遺伝子

exact test P 値 0.05 未満のパラメーターを用いて遺伝子変異を定義した。次世代シーケンサーで検出した変異遺伝子は the Integrative Genomics Viewer (IGV) (<http://software.broadinstitute.org/software/igv/>) を用いて可視化して変異を確認した<sup>3)</sup>。

## 結 果

### 1. 臨床病理学的解析

全例オキサリプラチンベースの術前化学療法が導入された。全例で RECIST 分類上 partial response と評価される臨床的な腫瘍の縮小が得られた。平均 3.8 (1-6) コースの化学療法後に手術が施行され、全例で組織学的に癌の遺残がない局所 R0 切除が得られた。組織学的効果判定は切除標本の線維化と壊死の程度で評価した。5 例 (50%) では 66% 以上の腫瘍退縮 (grade 2), 3 例 (30%) では 34-66% の腫瘍退縮 (grade 1b), 2 例 (20%) では 33% 以下の腫瘍退縮が見られた。

### 2. 次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子変異の検索

Agilent 社 HaloPlex ClearSeq Cancer パネルを用いて、次世代シーケンサー解析により 47 個の癌関連ゲノム変異を包括的に解析した。治療前生検標本で見られた 1-14 個の non-synonymous 変異は化学療法後原発巣切除組織では 1-2 個しか見られなかった (表 2)。TP53 遺伝子変異は 9 例 (90%), KRAS または NRAS 遺伝子の変異は 5 例 (50%) に見られた。これらの TP53, RAS のファウンダー遺伝子変異は化学療法前後に一貫して見られた。1 症例では、化学療法前に見られた KRAS と PTEN の変異が化学療法後には検出されなかった。これらの結果は腫瘍の不均一性または術前治療によるサブクローンの変化を反映していると考えられた。

表 2 化学療法前後での遺伝子変異の変化

No	化学療法前原発巣 遺伝子名 (VAF)	変異遺伝子数	化学療法後 遺伝子名 (VAF)	変異遺伝子数
1	TP53(0.249), FGFR3(0.028), NOTCH1(0.056), ERBB2(0.062)	4	TP53(0.550)	1
2	TP53(0.174), ERBB2(0.117), ERBB4(0.060), FGFR3(0.019), EGFR(0.117), RUNX1(0.138), FANCA(0.083)	7	TP53(0.013)	1
3	KRAS(0.200), PTEN(fs)	2	no mutation	0
4	KRAS(0.337), TP53(0.113)	2	KRAS(0.319), TP53(0.526)	2
5	KRAS(0.421), TP53(del), FGFR3(0.079), MAP2K4(0.078)	4	KRAS(0.780), TP53(del)	2
6	TP53(0.202)	1	TP53(0.412)	1
7	TP53(0.052), FGFR3(0.024)	2	TP53(0.052)	1

8	KRAS(0.387), TP53(0.047), RET(0.040), SMAD4(0.033), STK11(0.027), ALK(0.022), RUNX1(0.026), PIK3CA(0.165), FGFR3(0.028), MET(0.113), CDKN2A(0.053), FANCG(0.028), ABL1(0.048), NOTCH1(0.056)	12	TP53(0.096), MET(0.352)	2
9	NRAS(0.219), TP53(0.030), MAP2K4(0.256)	3	NRAS(0.200), TP53(0.021)	2
10	TP53(0.280), PIK3R1(0.038)	2	TP53(0.395)	1

### 3. 転移巣、血漿中の遺伝子変異の解析

肝転移と脾転移を切除した2症例では、化学療法前後の原発巣で変化なく見られた KRAS, TP53 のクローナル変異は転移巣組織でも検出された。術前化学療法によって腫瘍の遺伝子変異は修飾される可能性があることから経時的な遺伝子変異解析が必要とされるため、今回2症例で血漿中の循環腫瘍 DNA (ctDNA) を解析した (図2)。治療前の原発巣の生検から KRAS と TP53 の遺伝子変異が確認された。4 コースの全身化学療法の後と同じドライバー遺伝子変異が ctDNA で検出され、それらは原発巣切除標本でも同様に検出された (表3)、これらの結果は、複数回の経時的遺伝子変異解析やモニタリングに血漿を代用することが可能であり非侵襲的であるため有望であることを示した。

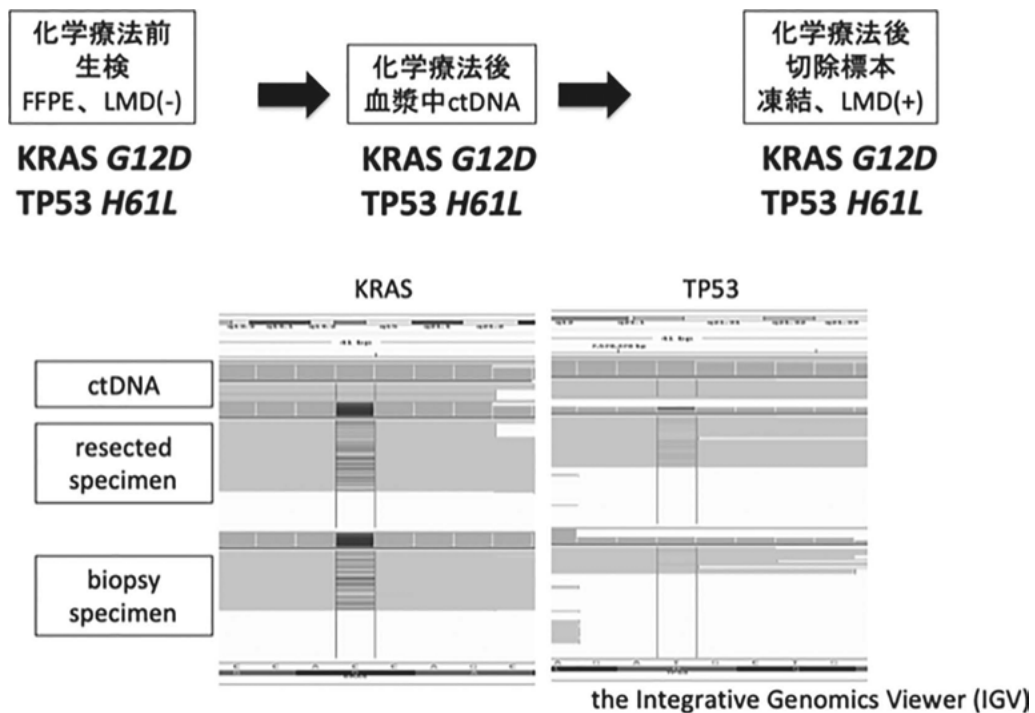


図2 化学療法の前後における大腸原発巣および血漿の経時的な遺伝子変異の検出



表 3. 血液中循環腫瘍 DNA の変異解析

症例番号	原発部位	化学療法前 原発巣	血漿中 ctDNA	化学療法後 原発巣
4	直腸	KRAS	KRAS	KRAS
		TP53	TP53	TP53
6	直腸	TP53	TP53	TP53

## 考 按

本研究の結果が示すように全ての症例において術前化学療法により腫瘍は著明に縮小し最終的に遺残なく根治切除を行うことができおり、局所進行大腸癌に対して術前化学療法を行い、ダウンスレージングを得てから切除をする治療戦略は有効であることが示された。術前化学療法を行うに際しては、術前治療中の腫瘍の再増殖や副作用によって根治切除の機会を失う可能性を避けるために、最適なレジメンと治療期間により最大限の抗腫瘍効果を得る必要がある。もし経時的に遺伝子変異を追跡することができれば、治療反応性や腫瘍量さらには治療抵抗性クローンの出現を予想できる可能性があり、最適な術前治療の構築に貢献できる可能性がある。

本研究の結果は術前治療によって遺伝子変異数が減少することを示した。KRAS や TP53 の重要なファウンダー変異は治療期間を通じて検出されたが、そのほかのパッセンジャー変異には殺細胞性抗腫瘍薬と分子標的薬による治療の後に検出されなくなったものがあつた。これらの結果は術前治療による強い抗腫瘍効果により消失するサブクローンがあることを示している。治療前に見られた遺伝子変異が治療後に検出されなかった症例では原発巣切除には組織学的に広範囲の線維化と壊死がみられており、強いサブクローン選択圧力や絶対的な腫瘍細胞量の減少が遺伝子変異フェノタイプの変化を引き起こしていると考えられた<sup>4)</sup>。今回示したような経時的な遺伝子変異解析は化学療法中のダイナミックなゲノム進化を捉えることができ、将来的に遺伝子プロファイルに基づいた分子標的治療に貢献できる可能性がある。

循環腫瘍 DNA (ctDNA) の供給元は主に壊死した癌細胞と考えられており、ctDNA は腫瘍の早期診断、腫瘍量評価や治療効果判定に有用と報告されてきた<sup>5)</sup>。我々の研究結果は大腸の原発腫瘍巣で見られているファウンダー遺伝子は血漿中でも検出されることを示した。この結果は ctDNA は腫瘍組織の代わりにリキッドバイオプシーして代用されうることを示している。血漿を利用することの最大の利点は繰り返して何回も非侵襲的に経時的に解析できることである。さらに血漿中の変異解析は、腫瘍内部あるいは複数腫瘍間（原発巣と転移巣など）の遺伝子変異の不均一性を超えて個体全体の変異を検出できる可能性がある。今回の研究では一時点での ctDNA 解析のみしか行うことができなかったが、今後は経時的な ctDNA の解析を行うことで新たな知見が得られることが期待される。

本研究は比較的少数の症例解析であり、臨床学的意義を解析するには今後多数症例での解析が必要になる。しかし、術前化学療法と手術を通した大腸癌の治療経過中の経時的な遺伝子変異解析は今までになされたことがなく、本研究によって術前化学療法中にダイナミックなサブクローナルな変化が起こっていることを示すことができた。

## 結 べ り に

本研究では大腸癌において化学療法と手術の治療中の網羅的遺伝子変異を経時的に解析した。我々は術前化学療法によってダイナミックな遺伝子変異プロファイルの変化が起こっていることを初めて明らかにした。経時的遺伝子変異解析は進行大腸癌の治療薬選択や手術時期の決定に有用であり、クローナルなファウンダー変異の検出は生検などの組織のみならず血漿中 ctDNA で代用できうることを示された。

## 文 献

- 1) Misale S, Yaeger R, Hobor S, et al: Emergence of KRAS mutations and acquired resistance to anti-EGFR therapy in colorectal cancer. *Nature* **486** : 532-6, 2012.
- 2) Uchi R, Takahashi Y, Niida A, et al: Integrated Multiregional Analysis Proposing a New Model of Colorectal Cancer Evolution. *PLoS Genet* **12** : e1005778, 2016.
- 3) Robinson JT, Thorvaldsdottir H, Winckler W, et al. Integrative genomics viewer. *Nat Biotechnol* **29** : 24-6, 2011.
- 4) Sugimachi K, Sakimura S, Kuramitsu S, et al. Serial mutational tracking in surgically resected locally advanced colorectal cancer with neoadjuvant chemotherapy. *Br J Cancer* **119** : 419-23, 2018.
- 5) Ueda M, Iguchi T, Masuda T, et al. Somatic mutations in plasma cell-free DNA are diagnostic markers for esophageal squamous cell carcinoma recurrence. *Oncotarget* **7** : 62280-91, 2016.

# 癌分泌蛋白を含む微小環境と補体因子が及ぼす 膵胆道癌進展機構の解明と治療開発

高野 重紹\*

**要旨** 本研究は2つの網羅的蛋白解析の実験系から同定された、補体カスケード因子を中心に、間質等の癌周囲微小環境因子との関連、およびがん免疫機構に作用する complement system が寄与する癌進展機構に焦点を置き、補体関連因子の癌早期診断 biomarker への応用や分子機構の解明、さらには新規治療法への可能性について検討した。

TMT labelling と SILAC+click chemistry といった proteomics の手法を用いて同定された C4b-binding protein  $\alpha$ -chain (C4BPA) と Complement factor B (CFB) の2つの補体関連蛋白について、新規血清膵癌 biomarker としての有用性の検討と、その膵癌組織内発現での臨床病理学的検討と予後解析を行った。今後の展望として、補体活性の癌進展機構に関わる新たな mechanism の解明と早期診断 biomarker としての臨床応用の可能性について探究し、膵胆道癌で宿主免疫応答の活性化を促す分子による抗腫瘍効果高める機序を見出し、これらの分子を target とした新規治療戦略を構築していく。

## はじめに

現在の癌治療では、手術療法を始め、新規化学・放射線療法、免疫療法が行われ、新たな治療法開発に向けた臨床試験が世界中で展開されている。特に、膵胆道癌領域では手術療法を中心とした集学的治療法が行われ、近年予後改善に寄与しているが<sup>1)</sup>、他癌種と比較し未だ治療法が確立されていないのが現状である。最新の研究ではいくつかの重要な知見が得られており、その中でも今後の研究の展開の「柱」として、①早期診断に結びつく新規 biomarker の同定と測定法の確立、②癌周囲微小環境を取り巻く豊富な間質成分を制御する stromal depletion approach、③癌免疫編集機構 (cancer immunoediting) の理解と cancer immunotherapy への応用が挙げられ、これらを臨床に結び付けて行くことが肝要である。

近年、がん治療として注目を集めている免疫療法の応用に関しては、様々な癌種で抗腫瘍効果が示され臨床応用が行われているが、膵胆道癌で思うような結果が得られていない。その理由として、豊富な間質を有する癌であること、癌周囲に癌を攻撃する免疫担当細胞および癌特異的抗原提示が少ない、いわゆる“cold tumor”であることが挙げられる<sup>2)</sup>。これらの背景となる癌と間質の相互作用により形成される癌周囲微小環境内で重要な役割を担う分泌蛋白の同定や、それらが及ぼす癌進展機序の解明は、今後の新規治療法開発への鍵と考える。腫瘍に対する癌周囲間質微小環境から癌進展を促進する因子の調整や、宿主免疫応答の活性化を促すことによる抗腫瘍効果増強による治療戦略が試みられ、がん集学的治療のパラダイムシフトが起こっている<sup>3)</sup>。近年、感染や炎症で惹起され、血液等疾患で研究が進んでいた Complement system が、癌進展機構に関わるという最新の topic が報告され、特に補体カスケードが癌に作用する免疫応答の1つであるとして、これらの詳細な mechanism の解明が新たな治療戦略の糸口として展開されることが期待されている<sup>4)</sup>。

本研究では、同定された2つの補体関連因子を中心に、機能解析や新規血清 biomarker についての検討を行うことで、癌進展機構に関わる新たな mechanism の解明のみならず、早期診断 biomarker としての臨床応用の可能性について探究した。特に、従来の新規 biomarker 探索は腫瘍組織と正常組織および

\* 千葉大学大学院医学研究院 臓器制御外科

liquid biopsy として血中の major protein 存在下での protein profiling の差異の比較が主であったが、その最大の limitation は早期微小癌では分泌される蛋白絶対量が僅かであるため、血中で捉えることが困難なことであった。そこで、cancer immunoediting 理論をふまえ、preliminary data から考案された仮説に基づき、前癌病変や極早期癌に対する host-immune response で上昇する蛋白として捉えることで、早期診断マーカーへの応用を目指した。

対象・方法

I) 新規血清膵癌 biomarker として同定された C4BPA の特異的 ELISA 測定系樹立

これまで Tandem Mass Tags (TMT) labeling, LC-MS/MS を用い、膵癌術前・術後血清中の糖鎖 protein profiling を網羅的に比較解析したところ、膵癌特異的血清蛋白として C4b-binding protein  $\alpha$ -chain (C4BPA) を同定した (図 1: *Br J Cancer* 2016 改変)<sup>5)</sup>。特に、早期膵癌に対し、既存の膵癌腫瘍マーカーである CA19-9 より AUC 値が高値であった (図 2: *Br J Cancer* 2016 改変)。さらに、他癌腫との比較をすると、膵癌では有意に上昇していた (図 3: *Br J Cancer* 2016 改変)。しかしながら、新規血清 biomarker としての臨床応用を鑑みると、現在の conventional sandwich ELISA による C4BPA 値測定での limitation として挙げられる狭い diagnostic window (健常人と膵癌患者の C4BPA 値の差が少ない) を克服する必要がある。そこで、今回、さらなる高い感度・特異度を目指し、独自の ELISA 系の樹立を目指した。

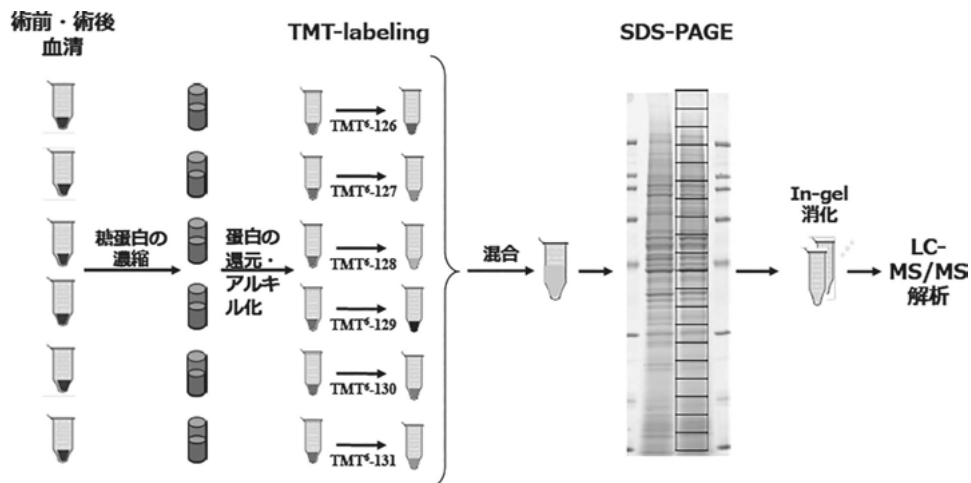


図 1 Tandem Mass Tags™ labelling と LC-MS/MS による新規血清膵癌 biomarker の探索

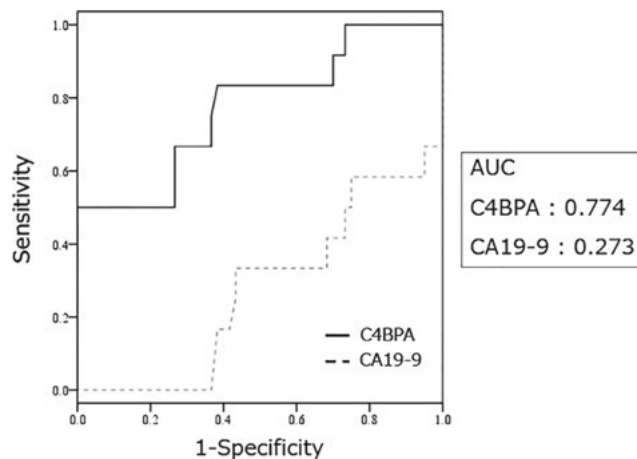


図 2 膵癌 stage I, II での ROC 曲線による術前 C4BPA と CA19-9 との診断能の比較

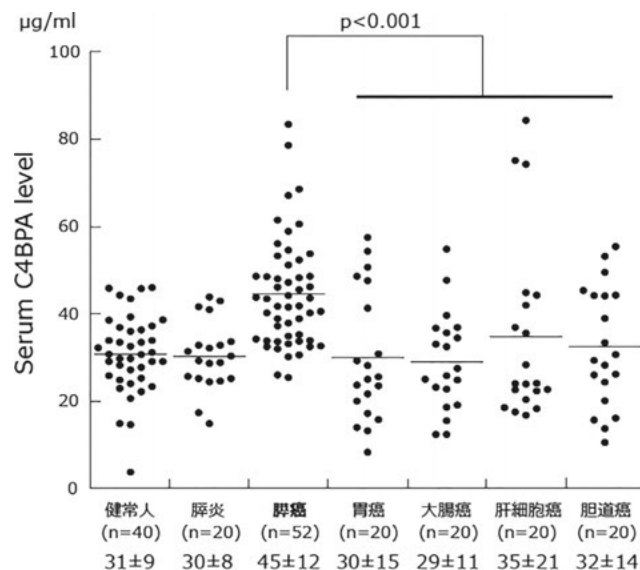


図3 健常人，膵炎，膵癌および他癌腫での血清中 C4BPA 値の比較

## II) 膵癌組織内での間質 C4BPA 発現の臨床病理学的意義の解明

次に，膵癌組織内での C4BPA 発現の局在を免疫染色にて確認した。さらに，C4BPA 発現と臨床病理学的意義および予後について解析した。

## III) 膵癌組織内での C4BPA と CD40 発現

Complement system の 1 因子の C4 に結合する C4BPA は興味深いことに，膵癌において tumor suppressive に働く anti-tumor T cell の活性化を促す，macrophage や B cell の細胞膜上に発現する CD40 に direct binding することが知られている<sup>6)</sup>。また最近，注目される agonistic CD40 抗体治療は T cell immunity を活性化させる膵癌の有望な immuno-modulating therapy の 1 つであり<sup>7)</sup>，Gem+nab-PTX との combination therapy の臨床応用が期待されている<sup>8)</sup>。この C4BPA と CD40 との関連に着目すると，早期癌の血清中で C4BPA 値が上昇する理由の仮説として，発癌早期から腫瘍細胞（異物）に対する host immune response の一環として complement system が働き，癌周囲に C4BPA が集積することから，systemic CD40 activation に傾くという結果を捉えている可能性がある。これらの仮説を念頭に置き，膵癌の initiation における補体活性と C4BPA 発現の機序を解明する。

## IV) SILAC-click chemistry を用いた膵前癌細胞と膵癌細胞培養上清の網羅的分泌蛋白解析による候補蛋白の同定

Stable Isotopic Labeling by Amino Acids in Cell Culture (SILAC)<sup>9)</sup> は生体内での代謝を利用し安定同位体標識を細胞中に取り込ませ，発現する全てのタンパク質を標識することで，細胞中で発現している蛋白だけでなく，分泌蛋白も同時に標識するため，本研究の目的の 1 つである網羅的な分泌蛋白同定・解析を遂行する上で最適な方法と考える。癌進展 (cancer initiation/progression) 中に分泌される蛋白を捉える目的で今回，遺伝子改変膵癌モデルマウスの膵臓から得られたマウス前癌病変 PanIN と膵癌 (PDAC) 細胞株を用い，安定同位体標識アミノ酸を添加した培地で細胞培養を行い，両細胞に対し Light・Heavy での標識を行い，click chemistry の手法<sup>10)</sup> をこの実験系に組み込み施行した。click chemistry によるラベルされた蛋白の吊り上げは，結合が強固なため major protein を取り除く際の微量蛋白の loss を最小限に抑え，感度・特異度ともに優れた同定結果を得ることができる。同定には得られた蛋白を同一量で混合，LTQ-Orbitrap で測定，解析は proteome discoverer で行った。

成績・考按

I) 新規膵癌 biomarker, C4BPA の特異的 ELISA 測定系樹立

まず, sandwich ELISA に使用する affinity の高い抗体 2 種類を選別し, 新規 ELISA 系に組み込み測定すると, 膵癌患者の中央値±標準偏差値が  $45 \pm 12 \mu\text{g/ml}$  から  $81 \pm 48 \mu\text{g/ml}$  と, 従来法より約 1.8 倍の測定感度を達成した (図 4)。この ELISA 系により新たな cohort として 266 例の膵疾患 (内 165 例膵癌) 血清中 C4BPA 値を測定したところ, 健常人・膵炎と比較し膵癌で有意に上昇したことが再確認できた ( $p < 0.0001$ )。次に, promising な膵癌特異的血清 biomarker として, 炎症や癌で増加するフコシル化糖鎖に着目し, C4BPA 蛋白のフコシル化 specific site に反応する L-フコース特異的レクチン (LCA-lectin) を detect antibody に使用した Hybrid LCA lectin ELISA 測定系を構築することで, より特異度の高い測定系の構築を目指した。血清 C4BPA のフコシル化蛋白を LCA-レクチンを用いた系を確立し, preliminary data としてフコシル化 C4BPA 値を測定すると, 術前 ( $n=10$ ), 術後 ( $n=10$ ) を比較すると, 全ての症例で術後に低下し, 健常人と術前膵癌との値を比較しても, 高い特異度を示した。今後は症例数を増やし, validation の測定を行なう予定である。

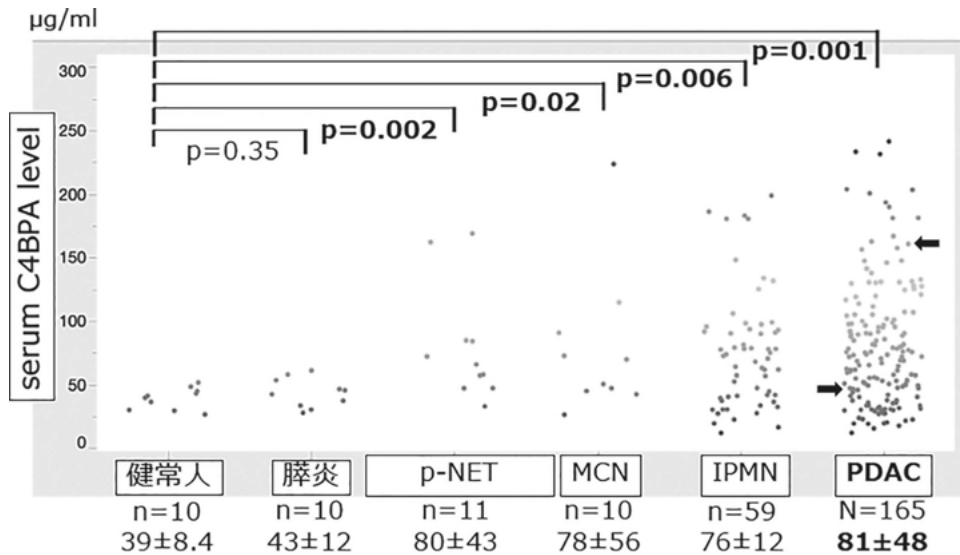


図 4 新規 ELISA 測定系による膵関連疾患の血清中 C4BPA 値の比較

II) 膵癌組織中の C4BPA 発現の局在と臨床病理学的関連の検討

膵癌切除組織での C4BPA の局在を免疫染色にて確認すると, 非常に興味深いことに C4BPA は膵癌細胞の周囲を取り囲むように, 主に間質で強い発現を認めた (図 5: 免疫組織学的染色による膵癌患者組織中の C4BPA 発現)。今回, 172 例の膵癌根治切除組織の間質 C4BPA 発現の多寡を強弱の 2 群に分けると, C4BPA 高発現群で低発現群に比べ, 有意に予後良好であるという結果を得た (図 6)。これらの臨床データと前述の仮説から想起すると, C4BPA の早期膵癌での上昇は前癌病変や早期癌に対する抗腫瘍宿主免疫応答として見られる Cancer immunoediting theory の Elimination/Equilibrium phase の段階で認められる可能性があると考えられた。

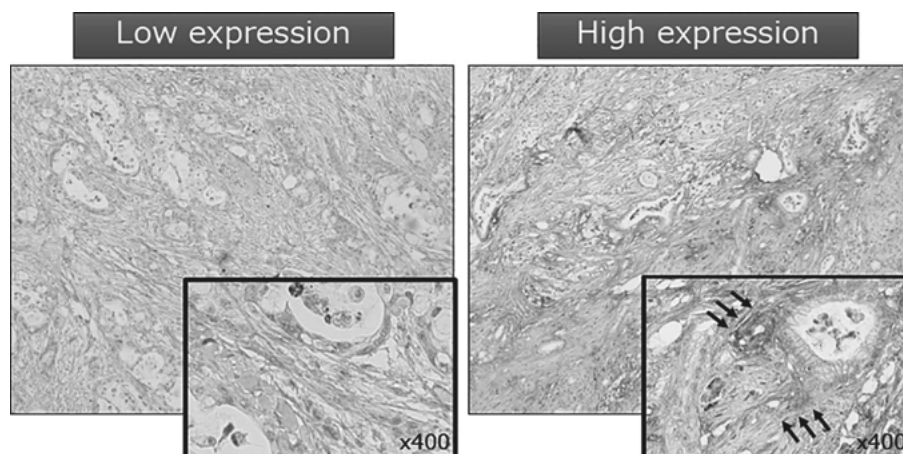


図5 膵癌組織における間質内 C4BPA 発現 (Low/High expression)

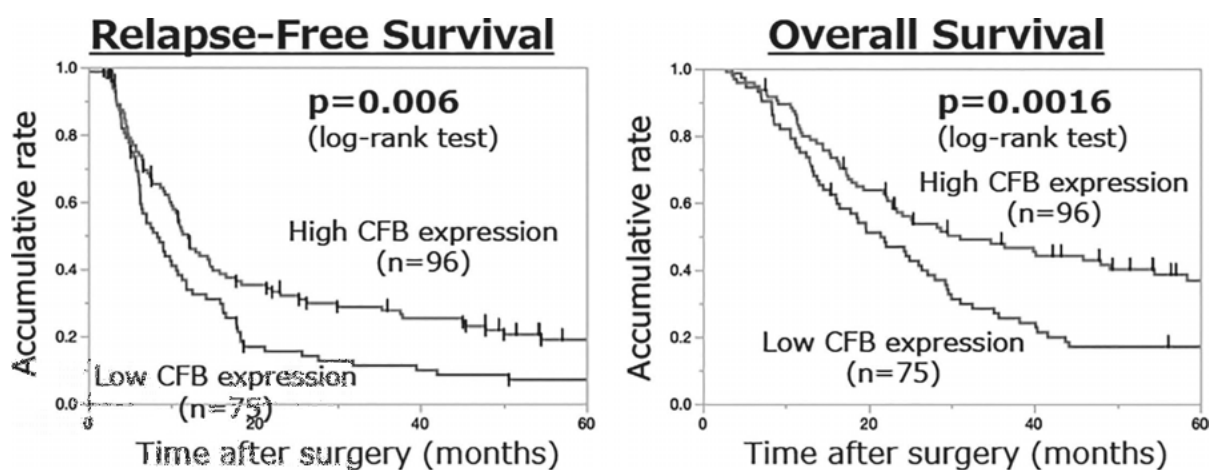


図6 間質内 C4BPA 発現の多寡と術後全生存期間の Kaplan-Meier 解析

### Ⅲ) 膵癌組織内での C4BPA と CD40 発現

補体関連因子である C4BPA と抗腫瘍免疫を担う CD40 との関連について、膵癌組織内での局在を調べるため、蛍光免疫染色を行うと、癌周囲間質に共発現していることが確認できた。今後は、tumor immuno-promotive な免疫担当細胞や tumor immuno-suppressive な免疫担当細胞との関連についても検討する。

### Ⅳ) SILAC-click chemistry を用いた膵前癌細胞と膵癌細胞培養上清の網羅的分泌蛋白解析による候補蛋白の同定

Genetic Engineering Mouse Model の膵臓から単離された膵臓細胞の前癌病変細胞である PanIN 細胞と膵癌細胞 PDAC 細胞の比較を SILAC+click chemistry で行い、LC-MS/MS により同定したところ (図 7), total 413 個の secreted protein/peptide が同定された。その中、SPARC, Tenascin, Fibronectin 等の既知の間質構成成分が含まれ、heavy と light を交換した裏返しの実験も validation のために行い、PanIN 細胞と比較し PDAC 細胞で 2 倍以上増加した再現性のある分泌蛋白が 13 蛋白抽出された (図 8)。その中、興味深いことに炎症や感染で activation される、**complement system** の因子である **Complement Factor B (CFB)** が約 9.3 倍、PDAC 細胞で発現が上昇する secreted protein として同定され、他にも興味深い protein が同定された。

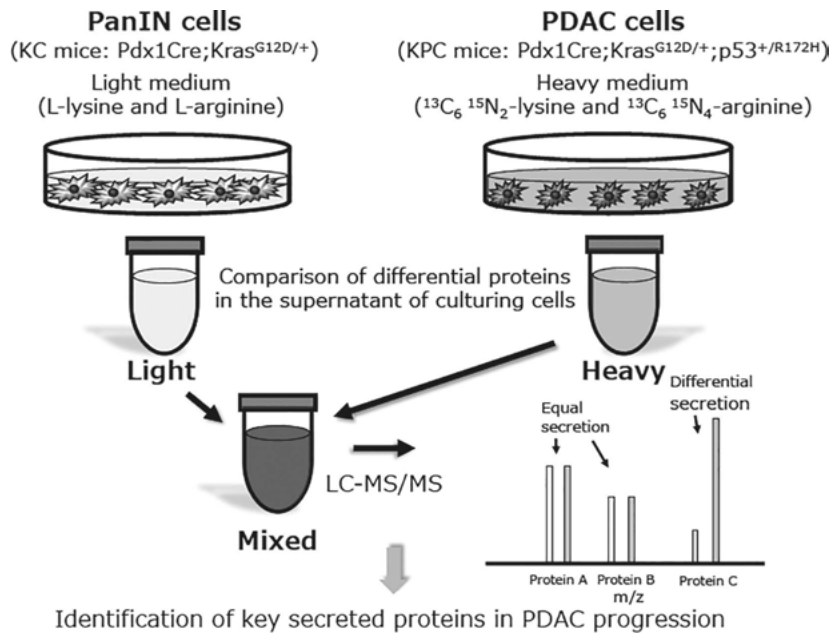


図7 SILAC と click chemistry を用いた網羅的膵癌進展関連分泌蛋白同定の流れ

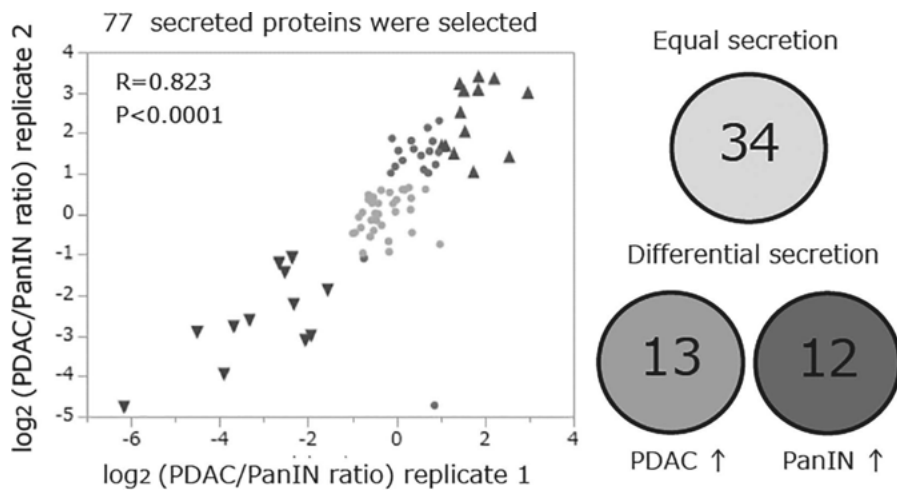


図8 PanIN, PDAC cell で増減する分泌蛋白の同定

おわりに

Glycoproteomics の手技と Secretome 解析を用いて、様々な膵癌関連蛋白の中から complement factor に着目し、膵癌関連因子として C4BPA と CFB の2種類の molecule について検討した。今後は、C4BPA については tumor suppressive に働く因子として、T-cell や B-cell 等の免疫担当細胞のみならず、腫瘍細胞に発現する CD40 receptor に及ぼす影響について解析する予定である。CFB に関しては tumor promotive に働く因子として、元来の補体活性化 cascade の1つである alternative pathway を経由した反応と、膵癌細胞内での発現抑制実験による詳細な機能解析を行い、CFB の cancer progression への関わりを検討する予定である。今後、膵癌進展機序に及ぼす更なる molecular mechanism の解明が期待される。

最後に、本研究に対し研究助成をご支援頂いたがん集学的治療研究財団の関係各位に、この場をお借りして深く御礼を申し上げます。



## 文 献

- 1) Okura R, Takano S, Yokota T, et al: Conversion surgery with gemcitabine plus nab-paclitaxel for locally advanced unresectable pancreatic cancer: A case report. *Mol Clin Oncol* **9** : 389-93, 2018.
- 2) Rech AJ, Dada H, Kotzin JJ, et al: Radiotherapy and CD40 Activation Separately Augment Immunity to Checkpoint Blockade in Cancer. *Cancer Res* **78** : 4282-91, 2018.
- 3) Jiang H, Hegde S, Knolhoff BL, et al: Targeting focal adhesion kinase renders pancreatic cancers responsive to checkpoint immunotherapy. *Nat Med* **22** : 851-60, 2016.
- 4) Reis ES, Mastellos DC, Ricklin D, et al: Complement system in cancer. *Nat Rev Immunol* **18** : 5-18, 2018.
- 5) Sogawa K, Takano S, Iida F, et al: Identification of a novel serum biomarker for pancreatic cancer, C4b-binding protein  $\alpha$ -chain (C4BPA) by quantitative proteomic analysis using tandem mass tags. *Br J Cancer* **115** : 949-56, 2016.
- 6) Brodeur SR1, Angelini F, Bacharier LB, et al: C4b-binding protein (C4BP) activates B cells through the CD40 receptor. *Immunity* **18** : 837-48, 2003.
- 7) Beatty GL, Chiorean EG, Fishman MP, et al: CD40 agonists alter tumor stroma and show efficacy against pancreatic carcinoma in mice and humans. *Science* **331** : 1612-6, 2011.
- 8) Vonderheide RH: The Immune Revolution: A Case for Priming, Not Checkpoint. *Cancer Cell* **33** : 563-9, 2018.
- 9) Ong SE, Blagoev B, Kratchmarova I, et al: Stable isotope labeling by amino acids in cell culture, SILAC, as a simple and accurate approach to expression proteomics. *Mol Cell Proteomics* **1** : 376-86, 2002.
- 10) Eichelbaum K, Winter M, Berriel Diaz M, et al: Selective enrichment of newly synthesized proteins for quantitative secretome analysis. *Nat Biotechnol* **30** : 984-90, 2012.

# トリプルネガティブ乳癌から BRCAness 乳癌を簡易的にスクリーニングする方法の探索と開発

田辺 真彦\*, 森園 亜里紗\*

**要旨** BRCA1/2 遺伝子に生殖細胞系列変異を有する患者の乳癌と似た特徴を有する BRCAness 乳癌は、相同組み換え修復不全状態にあり、トリプルネガティブ乳癌に多い。本研究では、病理形態学的特徴から BRCAness 乳癌を推測する方法を探索した。トリプルネガティブ乳癌 52 例のうち 38 例 (73%) が BRCAness 乳癌であり、非 BRCAness 乳癌との比較では、若年発症 (60 歳以下)・Ki67 高値 (>20%)・アンドロゲン受容体発現陰性という特徴があった。病理形態学的には、核分裂像高度・核グレード高度・低腺管形成・圧排性増殖・合法体性増殖を呈した。臨床病理 5 因子による original criteria を定め BRCAness 乳癌の ROC 解析を行うと、AUC 0.903 (感度 78.9%・特異度 85.7%) であった。年齢と特徴的な病理所見に着目し BRCAness 乳癌をスクリーニングできる可能性が示唆された。

## はじめに

乳癌の多くは非遺伝性であるが、全体の 10-20% に家族歴を認め、全体の 7-10% が遺伝性であり、その主たるものが遺伝性乳癌卵巣癌症候群 (Hereditary Breast and Ovarian Cancer syndrome; HBOC) である。HBOC では、癌抑制遺伝子 *BRCA1* または *BRCA2* の片側アレルの生殖細胞系列変異を基盤として、もう片側アレルに Loss of heterozygosity (LOH) などの体細胞変異 (second hit) が生じると、*BRCA1* または *BRCA2* タンパク質が機能不全に陥り、DNA 二本鎖切断の相同組換え修復不全 homologous recombination deficiency (HRD) を呈する。生まれつきの変異がなかった方のアレルに生じる second hit の分子機構として、LOH のほか、*BRCA1/2* 遺伝子の体細胞変異やプロモーター領域のメチル化を主とするエピゲノム変化が *BRCA1/2* の機能喪失の要因となることが知られている。

*BRCA1/2* 遺伝子の生殖細胞系列変異の有無にかかわらず、体細胞変異やエピゲノム変化などにより *BRCA1/2* が機能不全を呈する状態は、総じて「BRCAness」と称される。BRCAness を呈する乳癌は、トリプルネガティブ乳癌 (エストロゲン受容体/ER 陰性、プロゲステロン受容体/PgR 陰性、HER2 陰性) に多いことが報告されている<sup>1)</sup>。トリプルネガティブ乳癌は、乳癌の中でも特に悪性度が高いにも関わらず、その有効な治療方法は数少ない。BRCAness の本質は HRD であり、PARP (Poly ADP-ribose polymerase) 阻害剤や白金製剤の有効性が報告されている<sup>2)</sup>。このため、生殖細胞系列変異のみならず、乳癌組織における *BRCA1/2* の体細胞変異やエピゲノム変化を含む BRCAness を検出することは、より効果的な治療方法を選択する上で重要である。また、BRCAness 乳癌の可能性を病理形態学的特徴から予測することは、生殖細胞系列変異を検索すべき症例の一次スクリーニングにもなり得る。

乳癌の BRCAness を評価する方法として、*BRCA1/2* に生殖細胞系列変異を有する患者の乳癌組織に特異的な DNA 増幅/欠失のパターンを体細胞レベルで解析する array-CGH 法が確立された<sup>3)</sup>。さらにこの手法を簡易化し、乳癌組織から抽出した DNA を検体として、標的となる遺伝子座の増幅/欠失の有無を検出する Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification assay (MLPA) 法が開発された<sup>4)</sup>。

本研究では、① BRCAness-MLPA 法と *BRCA1* プロモーターメチル化解析法によりトリプルネガティ

\* 東京大学医学部附属病院 乳腺内分泌外科

ブ乳癌中の BRCAness 乳癌を同定し, ② BRCAness 乳癌の病理組織学的特徴を検討し, ③乳癌の病理組織学的特徴から BRCAness 乳癌を簡易的にスクリーニングすることが可能かどうかを検証した。

## 対 象

当院にて 2008 年から 2015 年に施行された乳癌手術 (術前化学療法未施行) のうちトリプルネガティブ乳癌症例 (52 例) を対象とした。

## 方 法

1. トリプルネガティブ乳癌 52 症例のパラフィン包埋切片の腫瘍部から DNA を抽出した。
2. *BRCA1* の生殖細胞系列変異を有する乳癌に特徴的なコピー数異常 (体細胞レベル) を検出可能な解析試薬 P376-3 (MLPA 法・ファルコバイオシステムズ)<sup>5)</sup> を用いて BRCAness の有無を評価した。本手法により検出された BRCAness は, BRCAness<sup>MLPA</sup> と定義した。
3. DNA をバイサルファイト処理し, メチル化特異的 PCR を行い *BRCA1* 遺伝子プロモーターのメチル化を評価した。各プライマーは以下の通りとした<sup>6)</sup>。

The methylated primers:

(forward) 5'-TCGTGGTAACGGAAAAGCGC-3'

(reverse) 5'-AAATCTCAACGAACCTCACGCCG-3'.

The unmethylated primers:

(forward) 5'-TTGGTTTTTGTGGTAATGGAAAAGTGT-3'

(reverse) 5'-CAAAAAATCTCAACAAACTCACACCA-3'.

本手法により検出された BRCAness は, BRCAness<sup>PM</sup> (PM: Promoter Methylation) と定義した。

4. 表 1 で提示した抗体を用いて免疫染色を行った。BRCA1, p53, アンドロゲン受容体 (AR) については核の染色を評価し, 10% 未満の染色を陰性とした。また, CK5/6 または EGFR において, 1% 以上の細胞膜の染色を認めた場合, Basal-like type と判定した。

表 1 免疫染色で用いた抗体

Antibody against	Clone	Source	Dilution
Ki67	MIB-1	Dako	1:100
BRCA1	MS110	Merck	1:50
p53	DO7	Leica Biosystems	1:50
CK5/6	D5/16 B4	Dako	1:100
EGFR	3C6	Roche	Prediluted
AR	SP107	Cell marque	Prediluted

5. 乳癌組織の HE 染色にて, *BRCA1* の生殖細胞系列変異を有する乳癌の特徴であることが報告されている病理形態学的項目を評価した。項目は, (a)核分裂像高度, (b)核グレード高度, (c)低腺管形成, (d)腫瘍細胞の柵状配列, (e)腫瘍組織の圧排性増殖, (f)腫瘍辺縁の境界明瞭性, (g)合胞体性増殖, (h)壊死, (i)リンパ球浸潤の 9 項目である (図 1)<sup>6) 7)</sup>。
6. 1~5 で得られた情報に加え, 乳癌罹患年齢, 腫瘍径や病期などの臨床病理学的因子を統合し, BRCAness 乳癌を予測し得る臨床病理学的特徴を探索した。

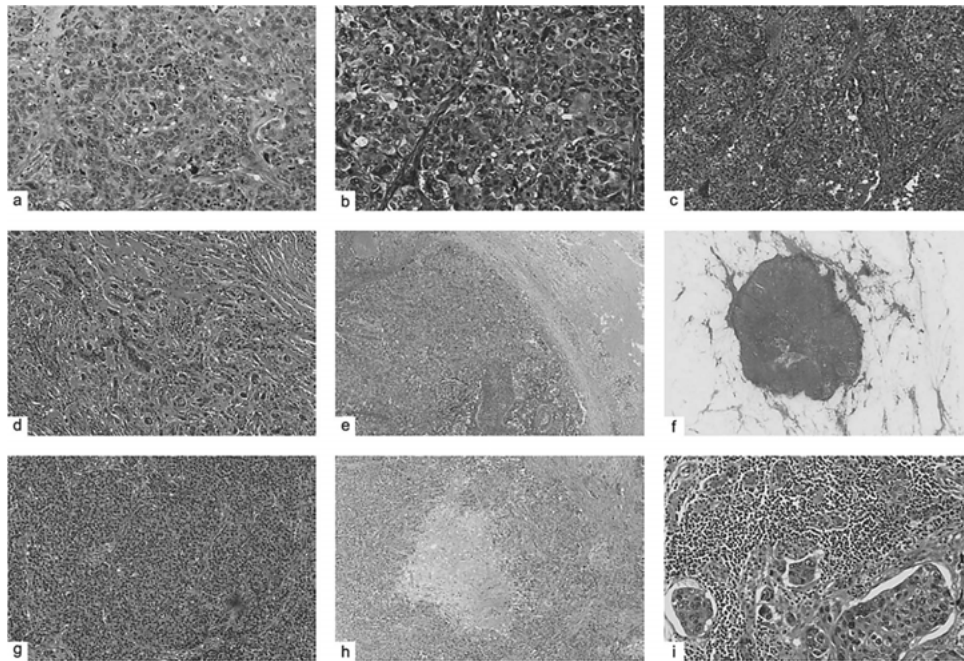


図1 病理形態学的特徴 (Hematoxylin-eosin 染色)

(a)核分裂像高度, (b)核グレード高度, (c)低腺管形成, (d)腫瘍細胞の柵状配列, (e)腫瘍組織の圧排性増殖, (f)腫瘍辺縁の境界明瞭性, (g)合体性増殖, (h)壊死, (i)リンパ球浸潤

### 結 果

トリプルネガティブ 52 例のうち 38 例 (73%) が、当研究の定義における BRCAness 乳癌であり、BRCAness<sup>MLPA</sup>: 36 例 (69%), BRCAness<sup>PM</sup>: 14 例 (27%) であった (図 2)。表 2 にメチル化 BRCAness<sup>PM</sup> 群, BRCAness<sup>MLPA</sup> 群, BRCAness (BRCAness<sup>PM</sup> and/or BRCAness<sup>MLPA</sup>) 群における臨床病理学的特徴をまとめた。BRCAness<sup>PM</sup> 群は non BRCAness<sup>PM</sup> 群に比し有意に BRCA1 発現が陰性であった。BRCAness<sup>MLPA</sup> 群と BRCAness 群については若年 (60 歳以下), Ki67 高値 (>20%), AR 陰性という特徴を認めた。形態学的特徴 9 項目については、各項目 1 点、計 9 点満点で、5 点をカットオフとする既報の判定法<sup>6)</sup>で BRCAness<sup>PM</sup> 群, BRCAness<sup>MLPA</sup> 群, BRCAness 群において、いずれも有意な差を認めた (p=0.003, p=0.003, p=0.005)。また、BRCAness<sup>MLPA</sup> 群と BRCAness 群については 5 点ではなく 3 点をカットオフにすることが、non BRCAness<sup>MLPA</sup> 群や non BRCAness 群を判別するのにより有用であった (p<0.001, p<0.001)。

BRCAness in Triple Negative Breast Cancers (n=52)

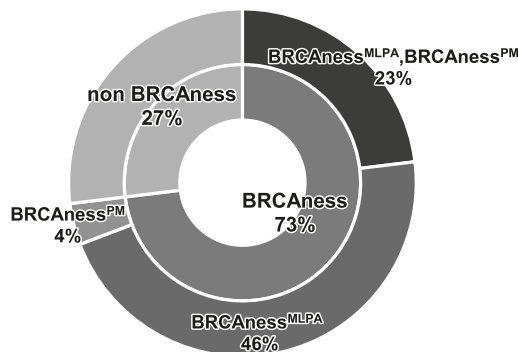


図2 トリプルネガティブ乳癌における BRCAness の頻度

BRCAness<sup>MLPA</sup> かつ BRCAness<sup>PM</sup>: 12 例 (23%), BRCAness<sup>MLPA</sup> のみ: 24 例 (46%), BRCAness<sup>PM</sup> のみ: 2 例 (4%)

表2 BRCAness の臨床病理形態学的特徴 ( $\chi^2$ 検定)

	N=52			N=52			N=52		
	BRCAness <sup>PM</sup>	non BRCAness <sup>PM</sup>	p-value	BRCAness <sup>MLPA</sup>	non BRCAness <sup>MLPA</sup>	p-value	BRCAness	non BRCAness	p-value
	n=14 n(%)	n=38 n(%)		n=36 n(%)	n=16 n(%)		n=38 n(%)	n=14 n(%)	
Clinicopathological features									
Age $\leq$ 60	8 (57.1)	19 (50.0)	0.648	24 (66.7)	3 (18.8)	0.001 *	24 (63.2)	3 (21.4)	0.008 *
tumor size $>$ 2 (cm)	7 (50.0)	21 (55.3)	0.736	20 (55.6)	8 (50.0)	0.711	20 (52.6)	8 (57.1)	0.770
Nodal node metastasis (positive)	3 (21.4)	11 (28.9)	0.588	9 (25.0)	5 (31.3)	0.639	10 (26.3)	4 (28.6)	0.870
pathological stage ( II or III)	7 (50.0)	22 (57.9)	0.611	21 (58.3)	8 (50.0)	0.577	21 (55.3)	8 (57.1)	0.904
ly (positive)	5 (35.7)	15 (39.5)	0.805	14 (38.9)	6 (37.5)	0.924	14 (36.8)	6 (42.9)	0.693
v (positive)	7 (50.0)	18 (47.4)	0.866	17 (47.2)	8 (50.0)	0.853	19 (50.0)	6 (42.9)	0.648
Ki67 $>$ 20(%)	11 (78.6)	26 (68.4)	0.474	30 (83.3)	7 (43.8)	0.004 *	30 (78.9)	7 (50.0)	0.041 *
BRCA1 negative expression	11 (78.6)	16 (42.1)	0.020 *	19 (52.8)	8 (50.0)	0.853	21 (55.3)	6 (42.9)	0.430
Androgen Receptor negative expression	11 (78.6)	24 (63.2)	0.293	31 (86.1)	4 (25.0)	$<$ 0.001 *	31 (81.6)	4 (28.6)	$<$ 0.001 *
p53 positive expression	6 (42.9)	19 (50.0)	0.648	17 (47.2)	8 (50.0)	0.853	18 (47.4)	7 (50.0)	0.870
Basal-like type	11 (78.6)	34 (89.5)	0.307	30 (83.3)	15 (93.8)	0.310	32 (84.2)	13 (92.9)	0.420
Morphological features									
a. Very high mitotic index	6 (42.9)	5 (13.2)	0.020 *	11 (30.6)	0 (0.0)	0.013 *	11 (28.9)	0 (0.0)	0.023 *
b. Malignant nuclear grade	12 (85.7)	29 (76.3)	0.462	32 (88.9)	9 (56.3)	0.008 *	33 (86.8)	8 (57.1)	0.020 *
c. Little or no tubule formation	11 (78.6)	23 (60.5)	0.225	27 (75.0)	7 (43.8)	0.029 *	28 (73.7)	6 (42.9)	0.038 *
d. Trabecular growth pattern	3 (21.4)	6 (15.8)	0.634	6 (16.7)	3 (18.8)	0.855	6 (15.8)	3 (21.4)	0.634
e. Pushing the margin	6 (42.9)	5 (13.2)	0.020 *	11 (30.6)	0 (0.0)	0.013 *	11 (28.9)	0 (0.0)	0.023 *
f. Circumscribed growth pattern	10 (71.4)	13 (34.2)	0.017 *	18 (50.0)	5 (31.3)	0.209	19 (50.0)	4 (28.6)	0.168
g. Syncytial growth pattern	10 (71.4)	15 (39.5)	0.041 *	22 (61.1)	3 (18.8)	0.005 *	23 (60.5)	2 (14.3)	0.003 *
h. Necrosis	6 (42.9)	8 (21.1)	0.116	13 (36.1)	1 (6.3)	0.025 *	13 (34.2)	1 (7.1)	0.051
i. Moderate or intense lymphocytic infiltration	6 (42.9)	12 (31.6)	0.448	15 (41.7)	3 (18.8)	0.109	16 (42.1)	2 (14.3)	0.061
Morphological score $\geq$ 5/9scores	10 (71.4)	10 (26.3)	0.003 *	18 (50.0)	1 (6.3)	0.003 *	19 (50.0)	1 (7.1)	0.005 *
Morphological score $\geq$ 3/9scores	12 (85.7)	20 (52.6)	0.030 *	28 (77.8)	4 (25.0)	$<$ 0.001 *	29 (76.3)	3 (21.4)	$<$ 0.001

\*statistically significant ( $p < 0.05$ )

項目ごとに病理形態学的特徴を検討すると、BRCAness<sup>PM</sup> 群は「核分裂像高度、圧排性増殖、腫瘍辺縁の境界明瞭性、合法体性増殖」という項目が有意に多く同定された。また、BRCAness<sup>MLPA</sup> 群や BRCAness 群については「核分裂像高度、核グレード高度、低腺管形成、圧排性増殖、合法体性増殖」という特徴が認められた。

さらに BRCAness 乳癌についてロジスティック回帰分析を行った結果を表3に占めす。単項目ロジス

表3 BRCAness について単変量・多変量解析 (ロジスティック回帰分析)

	Univariate analysis			Multivariate analysis		
	OR	CI	p-value	OR	CI	p-value
Clinicopathological features						
Age( $\leq$ 60/ $>$ 60)	6.286	1.494-26.443	0.012 *	10.515	1.069-103.423	0.044 *
Tumor size ( $>$ 2cm/ $\leq$ 2cm)	0.833	0.242-2.866	0.772	NA	NA	NA
Nodal status (N+/N-)	0.893	0.228-3.500	0.871	NA	NA	NA
Stage ( I /II or III)	1.079	0.313-3.717	0.904	NA	NA	NA
ly (+/-)	0.778	0.224-2.706	0.693	NA	NA	NA
v (+/-)	1.333	0.388-4.584	0.648	NA	NA	NA
Ki67 ( $>$ 20%/ $\leq$ 20%)	3.750	1.016-13.843	0.047 *	0.224	0.013-3.925	0.306
BRCA1 (-/+)	1.647	0.478-5.673	0.430	NA	NA	NA
AR (-/+)	11.071	2.675-45.817	0.001 *	18.735	1.479-237.384	0.024 *
p53 (+/-)	0.900	0.264-3.067	0.866	NA	NA	NA
Basal-like/non Basal-like	0.410	0.045-3.751	0.430	NA	NA	NA
Morphological features						
Very high mitotic index	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Malignant nuclear grade	4.950	1.201-20.397	0.027 *	5.632	0.347-91.475	0.224
Little or no tubule formation	3.733	1.037-13.445	0.044 *	2.084	0.294-14.781	0.463
Trabecular growth pattern	0.688	0.147-3.226	0.635	NA	NA	NA
Pushing the margin	NA	NA	NA	NA	NA	NA
Circumscribed growth pattern	2.500	0.666-9.382	0.175	NA	NA	NA
Syncytial growth pattern	9.200	1.799-47.057	0.008 *	2.436	0.269-222.039	0.428
Necrosis	6.760	0.794-57.544	0.080	NA	NA	NA
Lymphocytic infiltration	4.364	0.855-22.262	0.076	NA	NA	NA

A logistic regression analysis was performed for univariate and multivariate analysis

CI, confidence interval : NA, not assessment

\*statistically significant ( $p < 0.05$ )

ティック回帰分析で有意だった項目について多項目ロジスティック回帰分析を行い、Odds 比が2以上であった「核グレード高度、低腺管形成、合法体性増殖」という形態学的特徴については各1点、Odds 比が10以上であった若年発症（60歳以下）、AR陰性については各2点とし、5項目（0-7点）による独自のcriteriaを構築した（表4）。そのBRCAness乳癌の予測criteriaに則りROC解析を行うと、BRCAness乳癌についてArea Under the Curve: AUC 0.903（カットオフ値4点、感度78.9%、特異度85.7%）を得た（図3）。また、BRCAness<sup>MLPA</sup>乳癌については表4のcriteriaにてAUC 0.943（カットオフ値3点、感度97.2%、特異度75.0%）とさらに良好な結果が得られた。

表4 BRCAness 乳癌の予測 criteria

	score
Age ≤ 60	2
AR negative	2
High nuclear grade	1
Little or no tubule formation	1
Syncytial growth pattern	1

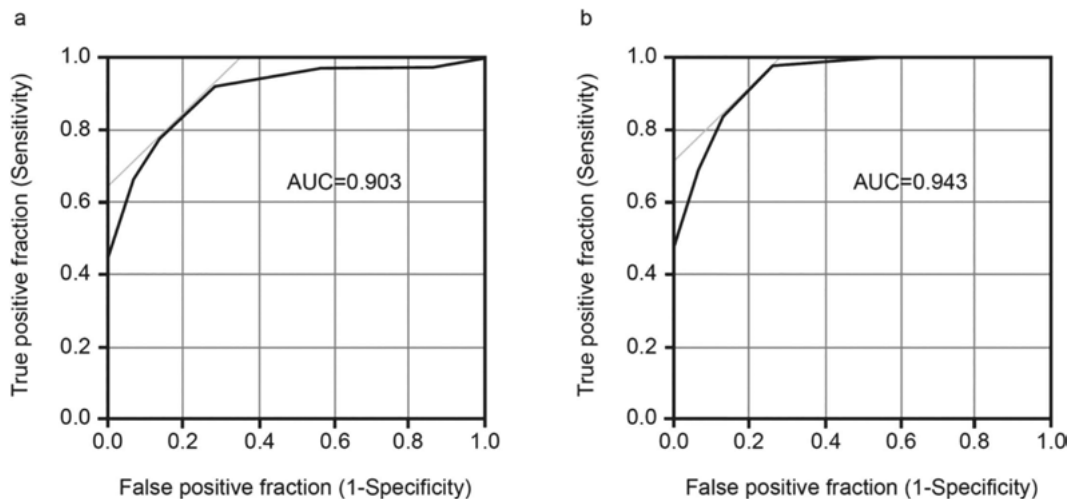


図3 BRCAness 乳癌(a)とBRCAness<sup>MLPA</sup> 乳癌(b)のROC解析

### 考 按

BRCA1/2の生殖細胞系列変異を調べる遺伝学的検査では、家族歴や既往歴からHBOCの可能性が高いと予測される場合に検査を実施しても、実際に病的バリエントが検出される症例は検査全体の1/3程度である。一方、遺伝性腫瘍の一つであるリンチ症候群では、DNAミスマッチ修復に関わる4因子（MLH1, MSH2, MSH6, PMS2）の免疫染色により、その可能性を絞り込んでから遺伝学的検査を実施することが可能である。乳癌におけるBRCA1/2タンパク質の免疫染色では、BRCA1/2発現の陰性/陽性がBRCA1/2病的バリエントの有/無と必ずしも合致しないため、免疫染色のみでHBOC症例を絞り込むことはできない。今回我々は、免疫染色のみに頼ることなく病理の基本となる形態学を重視し、BRCAness乳癌を予測する方法を探索し、有用である可能性を示した。トリプルネガティブ乳癌においてBRCAness（体細胞レベル）は、生殖細胞系列のBRCA1/2病的バリエントの有無よりも治療に直結する情報であり、HBOCではなくてもPARP阻害剤などが奏効する症例を適切に選択するための根拠となり得る。がんゲノム医療時代となり、保険診療でがんゲノムパネル検査を実施できるようになったが、得られた情報は治療に直結しない場合も多い。トリプルネガティブ乳癌において病理形態学と免疫染色を駆使してBRCAnessを予測することは簡易かつ安価なコンパニオン診断となる可能性を有している。

## おわりに

本研究によってBRCAness乳癌の病理学的特徴が明らかとなり、BRCAness乳癌を簡易的にスクリーニングできる可能性が示唆された。

本研究の意義をご理解頂き、ご支援を賜りました公益財団法人がん集学治療研究財団の皆様にご心より御礼申し上げます。

## 文 献

- 1) Lips E H, Mulder L, Oonk A. et al: Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. *Br. J. Cancer* **108** : 2172-7, 2013.
- 2) Loibl S, Weber K. E., Timms K. M. et al: Survival analysis of carboplatin added to an anthracycline/taxane-based neoadjuvant chemotherapy and HRD score as predictor of response-final results from GeparSixto. *Ann. Oncol* **29** : 2341-7, 2018.
- 3) Jooisse S A, van Beers E. H., Tielen I. H. et al: Prediction of BRCA1-association in hereditary non-BRCA1/2 breast carcinomas with array-CGH. *Breast Cancer Res. Treat* **116** : 479-89, 2009.
- 4) Lips E H, Mulder L, Hannemann J. et al: Indicators of homologous recombination deficiency in breast cancer and association with response to neoadjuvant chemotherapy. *Ann. Oncol* **22** : 870-6, 2011.
- 5) Lips E H, Laddach N., Savola S. P. et al: Quantitative copy number analysis by Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) of BRCA1-associated breast cancer regions identifies BRCAness. *Breast Cancer Research* **13** : R107, 2011.
- 6) Southey M C, Ramus S. J., Dowty J. G. et al: Morphological predictors of BRCA1 germline mutations in young women with breast cancer. *Br. J. Cancer* **104** : 903-9, 2011.
- 7) Lakhani S R, Van De Vijver, M. J., Jacquemier J. et al: The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J. Clin. Oncol* **20** : 2310-8, 2002.

# 切除不能大腸癌肝転移に対する人工知能を用いた CT テクスチャ解析による治療効果予測

宮本 裕士\*, 馬場 秀夫\*

**要旨** 本研究では人工知能 (Machine learning) を用いた切除不能大腸癌肝転移巣に対する CT テクスチャ解析により, 全身化学療法の治療効果の予測を試みた。1 次化学療法を施行した肝転移を伴う切除不能大腸癌症例 64 例を対象とした。治療前の CT を用いて, 肝転移巣の立体画像から 92 種類のパラメーターを抽出し, 化学療法の治療効果 (奏効/非奏効) 予測に関して, 単変量解析を施行した。各パラメーターの予測能は AUC=0.56 以下であった。これらを Machine learning を用いて網羅的に解析を行ったところ, 化学療法の治療効果予測能は AUC=0.77 まで改善された。大腸癌肝転移に対する Machine learning を用いた CT テクスチャ解析が実行可能なことを確認した。現在, 症例を追加しつつ解析を継続中である。

## はじめに

切除不能大腸癌は近年の新規薬剤ならびにバイオマーカーの登場により, その治療成績は確実に向上し, 臨床試験においても 30 か月を超える生存期間が報告されている<sup>1) 2)</sup>。反面, 多くの化学療法薬剤やバイオマーカーの登場により, その治療選択は複雑化しており, 今後のさらなる治療成績改善のため, 有効な治療選択手法が求められている。最も患者の予後に影響する治療は 1 次治療であり, 1 次治療が適切に選択されれば, 切除不能な肝転移が切除可能となる症例も多く経験される。治療前に各レジメンの治療効果予測が可能となれば, その病変に対する適切な治療法の選択が可能となり, さらに治療成績が改善することが期待される。

CT テクスチャ解析とは画像における病変の性質を数値化し, 定量的に特徴づけ, 臨床的データとの関連性を解析する方法であり, 悪性疾患に対する CT テクスチャ解析を用いた予後予測の報告がなされ始めている<sup>3) 4)</sup>。また, 人工知能 (Machine learning) は複雑なデータであっても, そのデータから有用な規則, ルールなどを抽出しアルゴリズムを発展・学習する手法である。

本研究の目的は, 人工知能 (Machine learning) を用いた CT テクスチャ解析により, 切除不能大腸癌肝転移巣に対する 1 次化学療法の治療効果を予測することである。

## 対 象

当科で初回治療として全身化学療法を施行した切除不能大腸癌肝転移症例 64 例を対象とした。組織学的に腺癌と証明され, Performance status 0-1, 20 才以上 80 才以下, 標的病変ありの症例を選択基準とした。治療開始 1 か月以内に CT 撮影のない症例, 大腸癌以外の活動性の悪性疾患に罹患している症例は除外した。

## 方 法

### CT テクスチャ解析

治療前 1 か月以内の CT を用いて, 各症例で最大の肝転移巣に対し, 画像ソフト 1 (3D slicer<sup>®</sup>) を用

\*熊本大学病院 消化器外科



いて肝転移巣の立体的な抽出を行った (図 1)。3D 画像における画像ピクセルの濃淡, その均一性・方向性などの 92 種類の因子におけるパラメーターを画像ソフト 2 (Pyradiomics<sup>®</sup>) を用いて数値化した。化学療法の効果判定は 2-3 か月ごとに行い, 一般的に広く使用されている RECIST 評価を用いた (Best overall response)。各症例を化学療法の奏効例 (CR, PR), 非奏効例 (SD, PD) に分けて, 92 種のパラメーターごとに奏効, 非奏効例の比較を Welch t テストで行った。

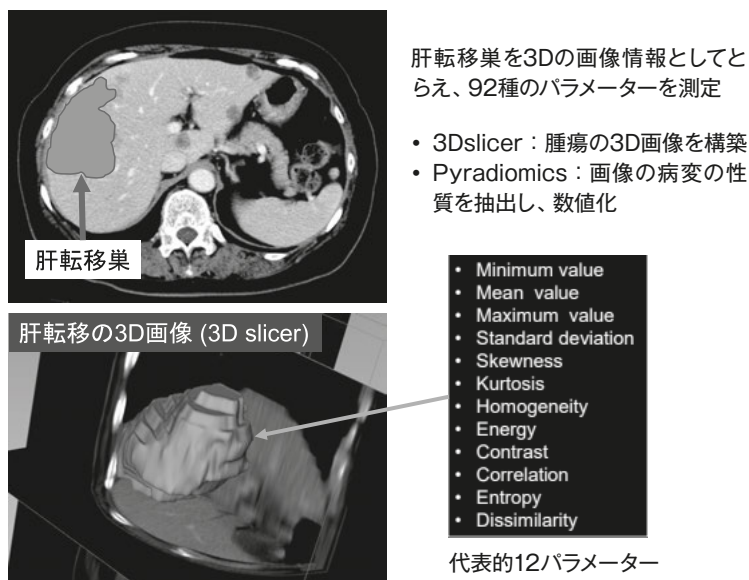


図 1 CT テクスチャ解析

### 人工知能 (Machine learning) 解析

機械学習の方法としては eXtreme gradient boost (Gradient Boost と Random Forests を組み合わせた手法) を用いて解析した。予測モデルの評価には, 各パラメーターの単変量解析との奏効度の比較について AUC を用いて行った。

## 結 果

患者背景 (表 1) は年齢中央値 63.5 才 (35-80), 男性:女性 =36 例:28 例, 原発部位 右側:左側 =14

表 1 患者背景 (N=64)

Variables		N	(%)	Variables continued	N	(%)
Age, year (range)		63.5	(35-80)	Primary tumor resection	yes	23 (36)
Gender	male	36	(56)		no	41 (64)
	female	28	(44)	Liver resection	yes	19 (30)
Performance status	PS 0	35	(55)		no	45 (70)
	PS 1	29	(45)	Biologics	bevacizumab	49 (77)
	PS 2	0	(0)		anti-EGFR	15 (23)
BMI, kg/m <sup>2</sup> (range)		22.7	(16.9-33.2)	Cytotoxic agents	oxaliplatin	52 (80)
Timing of metastases	synchronous	56	(88)		irinotecan	9 (14)
	metachronous	8	(13)		triplet	2 (3)
Primary tumor location	right sided	14	(22)		others	2 (3)
	left sided	50	(78)	Best overall response	CR	0
Pretreatment CEA, ng/ml (range)		50	(2-6701)		PR	39 (61)
KRAS status	KRAS wild	44	(69)		SD	21 (33)
	KRAS mutant	17	(27)		PD	4 (6)
	unkonwn	3	(5)			

PS: performance status; BMI: Body Mass Index; CEA: carcinoembryonic antigen; EGFR: epidermal growth factor receptor

例 (22%) : 50 例 (78%), KRAS wild-type : KRAS mutant = 44 例 (71%) : 17 例, 治療前 CEA 50.0ng/mL であった。化学療法の内容として, 殺細胞性抗がん剤はオキサリプラチンベースが全体の 80% を占めていた。分子標的薬は bevacizumab : 抗 EGFR 抗体薬 = 49 例 (77%) : 15 例に使用されていた。奏効例は 39 例 (61%), 非奏効例は 25 例 (39%) でその内訳は CR : PR : SD : PD = 0 : 39 : 21 : 4 であった。

肝転移巣の立体画像から 92 種類のパラメーターを抽出し, 化学療法の治療効果 (奏効/非奏効) に関して, まずは単変量解析を施行した。図 2 に代表的 12 の CT テクスチャパラメーターを提示しているが, 単変量解析では治療効果予測能は高くなく, AUC はすべて 0.58 以下であった (表 2)。

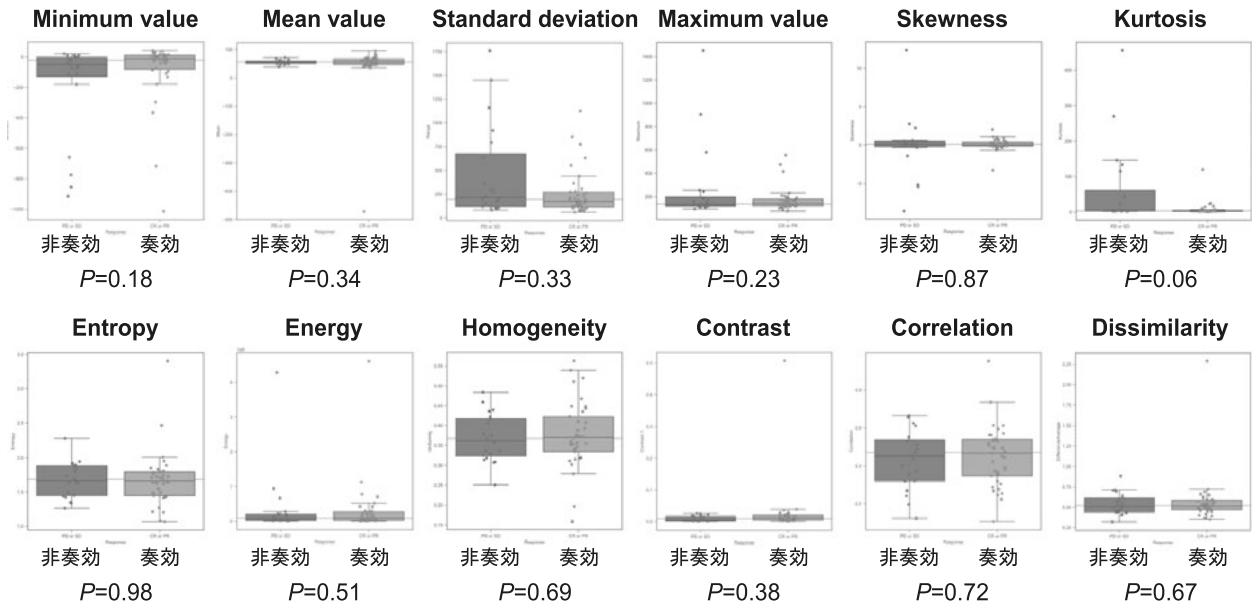


図 2 代表的 CT テクスチャパラメーターと奏効度

表 2 代表的な 12 の CT テクスチャパラメーターの単変量解析

CT texture parameters	response	no response	p value	AUC
Minimum value	-192.35	-84.30	0.18	<b>0.58</b>
Mean value	55.36	43.90	0.34	<b>0.45</b>
Standard deviation	14.94	27.12	0.33	<b>0.43</b>
Maxvalue	269.70	172.62	0.23	<b>0.46</b>
Skewness (h)	-0.05	0.10	0.87	<b>0.35</b>
Kurtosis (h)	61.52	8.46	0.06	<b>0.56</b>
Entropy (h)	1.68	1.68	0.98	<b>0.40</b>
Energy (h)	0.17	0.18	0.51	<b>0.49</b>
Homogeneity	0.37	0.38	0.69	<b>0.49</b>
Contrast	0.73	1.57	0.38	<b>0.44</b>
Correlation	0.43	0.45	0.72	<b>0.47</b>
Dissimilarity	0.54	0.57	0.67	<b>0.46</b>

これらを Machine learning を用いて解析を行ったところ, 化学療法の治療効果予測能は AUC=0.77 まで改善された (図 3)。

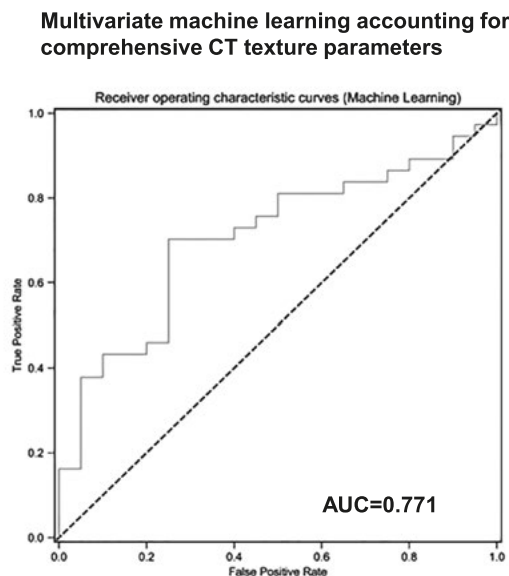


図3 Machine learning による解析

## 考 察

本研究の結果から、人工知能 (Machine learning) を用いることで、CT テクスチャ解析単独よりも化学療法の治療効果予測能が向上することが明らかとなった。

CT テクスチャ解析は、画像の空間パターンを数値化し画像分類を行う手法である。近年になって、CT や MRI への応用が進んでおり、癌に対する予後予測に利用されるようになってきている。実際大腸癌肝転移症例に対する予後予測として CT テクスチャ解析の有用性が明らかになっている<sup>3) 4)</sup>。人工知能 (Machine learning) は複雑なデータであっても、そのデータから有用な規則、ルールなどを抽出しアルゴリズムを発展・学習する手法である。この2つを組み合わせた研究として、頭頸部癌のリンパ節転移診断<sup>5)</sup>、副腎腫瘍の悪性度診断<sup>5)</sup>が報告されている。また我々も大腸癌原発巣について、Machine learning を用いた CT テクスチャ解析を行い、KRAS 遺伝子変異を予測する研究を報告している<sup>6)</sup>。しかしながら、この2つを組み合わせた解析で、治療効果予測を行った研究は Pubmed, clinicalgov を含め、本研究が唯一である。

これまでに切除不能大腸癌に対する治療効果予測 (奏効度) を評価項目としたバイオマーカー研究は表 2 のように画像情報やゲノム情報などを用いて多数報告が行われている。先ほど示した本研究の結果からは、その予測能は AUC=0.77 であり、マーカー測定時期が治療前 (pretreatment) のみである研究の中では、他の研究と比較しても良好な予測能を有していた。さらに、CT は大腸癌治療前に必ず施行する一般的な検査法であり、それ以外の特別な検査を要しないため、患者や医療経済に与える負担が少なく、他の研究より臨床応用しやすいと考えられた。

以上の結果から、CT テクスチャ解析を Machine learning を用いて行うことは実行可能で、治療効果予測に十分な有効性と将来性があることが示唆された。現在、熊本大学の症例を 200 例強追加して解析中であり、多数例で解析することで、人工知能の学習効果が高まり、予測能もさらに改善することが期待される。

Limitation として、今回の解析は単施設での解析であるため、別の独立した Cohort で確認する必要がある。我々は九州消化器癌化学療法研究会 (KSCC) でこれまでに行われた大腸癌 1 次化学療法の臨床試験の中で、肝転移を伴う症例を使用し、validation cohort としての解析を計画中である。最終的には、現在も大きな Unmet Medical Needs として残っている 1 次治療の分子標的薬の選択 (Bevacizumab vs

表3 切除不能大腸癌に対する化学療法のバイオマーカー

方法	N	マーカー	検体	測定時期	AUC	Year
CT + AI	64	CT texture (machine learning)	CT image	pretreatment	0.77	Current
MRI	68	MRI 3D-ADC	MRI image	pretreatment	0.77	2019 <sup>1)</sup>
US	37	Dynamic contrast-enhanced US	US image	pretreatment	N.S.	2018 <sup>2)</sup>
Gene mutation	181	Clinical score + PTEN/PI3KCA mutation	FFPE	pretreatment	0.69	2019 <sup>3)</sup>
Gene expression	193	MEIS2 gene expression	FFPE	pretreatment	0.75	2019 <sup>4)</sup>
Mir RNA expression	88	Six microRNA expression profile	Frozen tissue	pretreatment	0.78	2018 <sup>5)</sup>
Mir RNA expression	62	miR-RNA (miR-19a) expression	Blood	pretreatment	0.68	2013 <sup>6)</sup>
Tumor marker	106	CEA, CA 19-9	Blood	pretreatment	0.66	2012 <sup>7)</sup>
ctDNA level	337	Methylated ctDNA decrease	Blood	after one cycle	0.77	2017 <sup>8)</sup>
Monocytes	60	CD14+ monocytes level (flowcytometry)	Blood	after two cycles	0.87	2016 <sup>9)</sup>
MRI	11	MRI-ADC (kurtosis)	MRI image	pre and post chemo	0.79	2018 <sup>10)</sup>
PET-CT	31	relative change of FDG activity	PET-CT image	pre and post chemo	0.77	2013 <sup>11)</sup>

1) Fouladi DF, et al. *Eur Radiol.* 2019, 2) Amadori M, et al. *Eur Radiol.* 2018 28(7):2969-2978, 3) Garcia-Albeniz X, et al. *Oncologist.* 2019, 4) Wang X, et al. *J Cell Physiol.* 2019, 5) Neerincx M, et al. *PLoS One.* 2018 13(8):e0201809, 6) Chen Q, et al. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(12):7421-6, 7) Bystrom P, et al. *Acta Oncol.* 2012 51(7):849-59, 8) Herbst A, et al. *Int J Cancer.* 2017 40(9):2134-2144, 9) Schauer D, et al. *Oncology.* 2016 5(6):e1160185, 10) Lavdas I, et al. *Clin Radiol.* 2018 73(9):832.e9-832, 11) Burger IA, et al. *Ann Nucl Med.* 2013 27(2):177-83.

Cetuximab/Panitumumab) のために、各分子標的薬別に本解析を行い、治療開始前にどの分子標的薬を使用した治療法が有用であるか予測できる手法として発展させたい。また、Primary endpointとしては生存成績がよりインパクトが強いと考えられるため、奏効度のみならず生存成績に関しても解析を進めたい。

## おわりに

人工知能 (Machine learning) を用いた CT テクスチャ解析は、切除不能大腸癌肝転移巣に対する全身化学療法の治療効果の予測に有用な方法であった。

## 文 献

- 1) Loupakis F, Cremolini C, Masi G, Lonardi S, Zagonel V, Salvatore L, Cortesi E, Tomasello G, Ronzoni M, Spadi R, Zaniboni A, Tonini G, Buonadonna A, Amoroso D and Chiara S: Initial Therapy with FOLFOXIRI and Bevacizumab for Metastatic Colorectal Cancer. *N Engl J Med* **371** : 1609-18, 2014.
- 2) Yamada Y, Denda T, Gamoh M, Iwanaga I, Yuki S, Shimodaira H, Nakamura M, Yamaguchi T, Ohori H, Kobayashi K, Tsuda M, Kobayashi Y, Miyamoto Y, Kotake M, Shimada K, Sato A, Morita S, Takahashi S, Komatsu Y and Ishioka C: S-1 and irinotecan plus bevacizumab versus mFOLFOX6 or CapeOX plus bevacizumab as first-line treatment in patients with metastatic colorectal cancer (TRICOLOR): A randomized, open-label, phase III, noninferiority trial. *Ann Oncol* **29** : 624-31, 2018.
- 3) Ahn SJ, Kim JH, Park SJ and Han JK: Prediction of the therapeutic response after FOLFOX and FOLFIRI treatment for patients with liver metastasis from colorectal cancer using computerized CT texture analysis. *Eur J Radiol* **85** : 1867-74, 2016.
- 4) Beckers RCJ, Trebeschi S, Maas M, Schnerr RS, Sijmons JML, Beets GL, Houwers JB, Beets-Tan RGH and Lambregts DMJ: CT texture analysis in colorectal liver metastases and the surrounding liver parenchyma and its potential as an imaging biomarker of disease aggressiveness, response and survival. *Eur J Radiol* **102** : 15-21, 2018.

- 5) Forghani R, Chatterjee A, Reinhold C, Pérez-Lara A, Romero-Sanchez G, Ueno Y, Bayat M, Alexander JWM, Kadi L, Chankowsky J, Seuntjens J and Forghani B: Head and neck squamous cell carcinoma: prediction of cervical lymph node metastasis by dual-energy CT texture analysis with machine learning. *Eur Radiol*, 2019.
- 6) Taguchi N, Oda S, Yokota Y, Yamamura S, Imuta M, Tsuchigame T, Nagayama Y, Kidoh M, Nakaura T, Shiraishi S, Funama Y, Shinriki S, Miyamoto Y, Baba H and Yamashita Y: CT texture analysis for the prediction of KRAS mutation status in colorectal cancer via a machine learning approach. *Eur J Radiol* **118** : 38-43, 2019.

## 研究経過報告書執筆要項

- (1) 下記の基準で論文（日本文）を作成して下さい。

要 旨	400字 × 1枚
本 文	400字 × 10枚
写真・図表	10枚以内（写真はモノクロ）
引用文献	10位

- (2) 原稿はパソコンをご使用の上、専門用語以外は当用漢字、現代かなづかい（平がな）を用い、平易明瞭に句読点は正確にお書き下さい。1枚に40字×40行とし、行間をできるだけあけてプリントアウトして下さい。また、CD-ROM、DVD-ROM等にデータを保存したものを、使用機種、ソフト名を明記の上、一緒にお送り下さい。
- (3) 薬品の商品名（欧文）は大文字、学名、一般名は小文字で記載下さい。
- (4) 数字は算用数字を用い、度量衡単位はCGS単位でm, cm, mm, cm<sup>2</sup>, ml, l, dl, kg, g, mgなどとして下さい。
- (5) 写真は手札型以上の大きさで鮮明であること、文字や矢印を記号する場合はトレーシングペーパーをかけた上に明記して下さい。
- (6) 原稿は原則として返却いたしません。写真、図などで返却を要するものにはその旨明記して下さい。
- (7) 文献は本文中に引用されたもののみをあげて下さい。本文中の引用個所には肩番号を付して下さい。
- (8) 文献の書き方は次のように統一して下さい。

引用文献、著者名は3人まで記し、それ以上は「他」「et al」として下さい。

外国文献の記載形式はIndex Medicus 所載に準じて下さい。

雑誌の場合→引用番号) 著者名：論文題名、雑誌名、巻数、頁数（西暦年号）

単行本の場合→引用番号) 著者名：論文題名、書名（編者名）、版、頁、発行所名、発行地、（西暦年号）

- 例 1) 田口鐵男, 古江 尚, 塚越 茂, 他: 胃癌の化学療法. 癌と化学療法 7(12): 109-14, 1980.
- 2) 幕内雅敏, 長谷川博, 山崎 晋: 肝細胞癌の早期診断法. ウイルス肝炎から肝細胞癌へ(服部 信編), 第2版, 309-28, 癌と化学療法社, 東京, 1982.
- 3) Umezawa H, Aoyagi T, Suda H, et al: Bestatin, an inhibitor of aminopeptidase B, produced by Actinomycetes. *J. Antibiotics* 29: 97-9, 1976.

- (9) 文頭は、「はじめに」ではじまり、「おわりに」で結ぶ。
- (10) 論文は要旨－はじめに－（対象－方法－成績）－考按－おわりに－文献－表－図の説明－図の順に原稿を構成して下さい。図および表には文中に出る順番に番号を付して下さい。
- (11) 項目は次のような記号を用います。

I. …… 1. …… 1) …… a

- (12) 原稿には表紙を付し、表題、著者名、所属、機関名、原稿枚数、図表点数を明記して下さい。

## 一般研究助成者一覧(発刊年度)

- 1981 浅野長一郎 (九州大学理学部)  
(1卷) 天木 一太 (日本大学医学部)  
加藤 哲郎 (秋田大学医学部)  
関口 守正 (東京大学医科学研究所)  
寺尾 榮夫 (東京都立駒込病院)  
野本亀久雄 (九州大学医学部)  
母里 知之 (東海大学医学部)  
吉田 修 (京都大学医学部)
- 1982 浅野長一郎 (九州大学理学部)  
(2卷) 海老名卓三郎 (東北大学医学部)  
小山 博記 (大阪府立成人病センター)  
友田 豊 (名古屋大学医学部)  
新島 端夫 (東京大学医学部)  
藤本 孟男 (愛知医科大学)  
松澤 大樹 (東北大学抗酸菌病研究所)  
三好 勇夫 (高知医科大学)
- 1983 池田 恵一 (九州大学医学部)  
(3卷) 木村 郁郎 (岡山大学医学部)  
菅原 克彦 (山梨医科大学)  
橘 武彦 (東北大学抗酸菌病研究所)  
西平 哲郎 (東北大学医学部)  
藤原 大美 (大阪大学医学部)  
三橋 重信 (久留米大学医学部)  
山本三毅夫 (九州大学生体防御医学研究所)
- 1984 大西 克尚 (九州大学医学部)  
(4卷) 折田 薫三 (岡山大学医学部)  
小磯 謙吉 (筑波大学臨床医学系)  
関根 暉彬 (国立がんセンター研究所)  
塚田 裕 (北海道大学医学部)  
原 泰寛 (国立病院九州がんセンター)  
前山 巖 (鳥取大学医学部)  
山田 一正 (名古屋大学医学部)
- 1985 犬山 征夫 (慶應義塾大学医学部)  
(5卷) 小玉 正智 (滋賀医科大学)
- 東 市郎 (北海道大学免疫科学研究所)  
太田 和雄 (愛知県がんセンター)  
須賀 昭二 (国立名古屋病院)  
高見沢裕吉 (千葉大学医学部)  
西 満正 (鹿児島大学医学部)  
棟久 龍夫 (長崎大学医学部)  
森 武貞 (大阪大学医学部)  
涌井 昭 (東北大学抗酸菌病研究所)  
井村 裕夫 (京都大学医学部)  
古賀 成昌 (鳥取大学医学部)  
志田 圭三 (群馬大学医学部)  
中西 昌美 (北海道大学医学部)  
馬場 恒男 (九州大学生体防御医学研究所)  
細川真澄男 (北海道大学医学部)  
松田 忠義 (東京都立駒込病院)
- 石引 久弥 (慶應義塾大学医学部)  
桑野 信彦 (大分医科大学)  
高久 史磨 (東京大学医学部)  
螺良 英郎 (徳島大学医学部)  
野村 雍夫 (国立病院九州がんセンター)  
前田 浩 (熊本大学医学部)  
谷内 昭 (札幌医科大学)
- 小野寺時夫 (東京都立駒込病院)  
藏本 淳 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
杉町 圭蔵 (九州大学医学部)  
高月 清 (熊本大学医学部)  
鶴尾 隆 (癌研・癌化学療法センター)  
福西 亮 (愛媛大学医学部)  
水落 次男 (東京大学医科学研究所)
- 北村 幸彦 (大阪大学医学部附属癌研究施設)  
小林 利次 (産業医科大学)

- 1985 佐々木琢磨 (国立がんセンター)  
(5卷) 田中 正夫 (国立名古屋病院血液病センター)  
中村 徹 (福井医科大学)  
原 耕平 (長崎大学医学部)  
藤田 昌英 (大阪大学微生物病研究所)  
松谷 雅生 (東京都立駒込病院)  
吉田 孝人 (浜松医科大学)
- 1986 内野 治人 (京都大学医学部)  
(6卷) 岡部 哲郎 (東京大学医学部)  
狩野 恭一 (東京大学医科学研究所)  
久保田哲朗 (慶應義塾大学医学部)  
坂井 保信 (東京都立駒込病院)  
曾根 三郎 (徳島大学医学部)  
田中 敬正 (関西医科大学)  
橋本 省三 (慶應義塾大学医学部)  
浜岡 利之 (大阪大学医学部附属癌研究施設)
- 1987 市橋 秀仁 (藤田学園保健衛生大学医学部)  
(7卷) 奥村 康 (順天堂大学医学部)  
勝沼 信彦 (徳島大学酵素科学研究センター)  
金沢 浩二 (新潟大学医学部)  
佐藤 周子 (愛知県がんセンター)  
高本 滋 (東京都立駒込病院)  
中村 仁信 (大阪大学微生物病研究所)  
松本 圭史 (大阪大学医学部)  
山口 豊 (千葉大学医学部肺癌研究施設)
- 1988 秋山 伸一 (鹿児島大学医学部附属腫瘍研究施設)  
(8卷) 阿部 達生 (京都府立医科大学)  
上田 政和 (慶應義塾大学医学部)  
小川 恭弘 (高知医科大学)  
神奈木玲児 (京都大学医学部)  
今 充 (弘前大学医学部)  
笹月 健彦 (九州大学生体防御医学研究所)  
徳永 徹 (国立予防衛生研究所)  
馬場 正三 (浜松医科大学)
- 1989 阿曾 佳郎 (東京大学医学部)  
(9卷) 今井 浩三 (札幌医科大学)
- 仙道富士郎 (山形大学医学部)  
鳥巢 要道 (九州大学医学部)  
新本 稔 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
原田 実根 (金沢大学医学部)  
穂積 本男 (埼玉県立がんセンター研究所)  
御厨 修一 (国立病院医療センター)
- 大野 竜三 (名古屋大学医学部)  
片野 建之 (癌研・癌化学療法センター)  
木村 元喜 (九州大学生体防御医学研究所)  
熊本 悦明 (札幌医科大学)  
珠玖 洋 (長崎大学医学部)  
田中 信男 (東京大学応用微生物研究所)  
西田 輝夫 (近畿大学医学部)  
羽生富士夫 (東京女子医科大学消化器病センター)  
前田 迪郎 (鳥取大学医学部)  
大森 弘之 (岡山大学医学部)  
小黒 昌夫 (千葉県がんセンター)  
加藤 四郎 (大阪大学微生物病研究所)  
坂本 純一 (愛知県がんセンター)  
鈴木 磨郎 (東北大学抗酸菌病研究所)  
峠 哲哉 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
正岡 徹 (大阪府立成人病センター)  
宮崎 保 (北海道大学医学部)  
吉田 奎介 (新潟大学医学部)  
浅野 茂隆 (東京大学医科学研究所)  
今岡 真義 (大阪府立成人病センター)  
江藤 澄哉 (産業医科大学)  
鎌田 七男 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
小山 研二 (秋田大学医学部)  
斎藤 正男 (東京大学医学部)  
谷川 允彦 (福井医科大学)  
富永 健 (東京都立駒込病院)  
平野 正美 (藤田学園保健衛生大学医学部)  
石川 哮 (熊本大学医学部)  
岩永 剛 (大阪府立成人病センター)



- 1989 上田 龍三 (愛知県がんセンター研究所) 太田 康幸 (愛媛大学医学部)  
(9卷) 岡田 秀親 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所) 小川 道雄 (大阪大学医学部)  
掛川 暉夫 (久留米大学医学部) 加藤 知行 (愛知県がんセンター)  
金子 明博 (国立がんセンター病院) 斉藤 博 (埼玉医科大学総合医療センター)  
澤木 修二 (横浜市立大学医学部) 高上 洋一 (徳島大学医学部)  
中村 治 (東京都立駒込病院) 藤本 重義 (高知医科大学)  
町田喜久雄 (埼玉医科大学総合医療センター) 松野 正紀 (東北大学医学部)
- 1990 荒井 保明 (愛知県がんセンター) 宮本 幸男 (群馬大学医学部)  
(10卷) 入野 昭三 (香川医科大学) 遠藤 光夫 (東京医科歯科大学医学部附属病院)  
小倉 剛 (徳島大学医学部) 菅 典道 (京都大学医学部附属病院)  
木谷 照夫 (大阪大学微生物病研究所) 池田 昌弘 (順天堂大学医学部)  
島津 久明 (鹿児島大学医学部) 田中 隆一 (新潟大学脳研究所)  
土橋 一慶 (帝京大学医学部) 中島 泉 (名古屋大学医学部)  
新津洋司郎 (札幌医科大学) 西村 泰治 (九州大学生体防御医学研究所)  
垣生 園子 (東海大学医学部) 原 信之 (国立病院九州がんセンター)  
藤本 孟男 (愛知医科大学) 前原 喜彦 (九州大学医学部)  
水谷 修紀 (国立小児医療研究センター)
- 1991 秋吉 毅 (九州大学生体防御医学研究所) 安藤 俊夫 (愛知県がんセンター研究所)  
(11卷) 小川 秋實 (信州大学医学部) 小熊 信夫 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
小越 章平 (高知医科大学) 加藤 洋 (癌研・癌研究所)  
木村幸三郎 (東京医科大学) 河野 公俊 (大分医科大学)  
佐治 重豊 (岐阜大学医学部) 鈴木 徹 (山口大学医学部)  
田中 良明 (東京都立駒込病院) 平井 久丸 (東京大学医学部)  
藤永 蕙 (札幌医科大学附属がん研究所) 真崎 規江 (大阪府立成人病センター)  
麦島 秀雄 (日本大学医学部) 山内 晶司 (名古屋大学医学部)  
山口 俊晴 (京都府立医科大学) 由良 二郎 (名古屋市立大学医学部)
- 1992 赤沢 修吾 (埼玉県立がんセンター) 秋根 康之 (国立がんセンター中央病院)  
(12卷) 貝原 信明 (鳥取大学医学部) 兼松 隆之 (長崎大学医学部)  
河村 栄二 (北里研究所病院) 菊池 潔 (財慶がんセンター)  
木本 安彦 (大阪大学微生物病研究所附属病院) 葛巻 暹 (北海道大学医学部附属癌研究施設)  
琴浦 良彦 (京都大学医学部) 斎藤 貴生 (大分医科大学)  
澤武 紀雄 (金沢大学がん研究所) 設楽 信行 (東京都立駒込病院)  
柴田 昭 (新潟大学医学部) 土井 修 (大阪府立成人病センター)  
奈良 信雄 (東京医科歯科大学医学部) 西村 孝司 (東海大学医学部)  
山下 純宏 (金沢大学医学部) 吉開 泰信 (名古屋大学医学部病態制御研究施設)
- 1993 阿部 力哉 (福島県立医科大学) 大榎 泰亮 (岡山大学医学部)

- 1993 片山 憲特 (聖マリアンナ医科大学)  
(13卷) 栗原 稔 (昭和大学附属豊洲病院)  
藪田 精昭 (京都府立医科大学)  
武市 紀年 (北海道大学医学部附属癌研究施設)  
土田 嘉昭 (東京大学医学部)  
富田 幹夫 (埼玉県立がんセンター研究所)  
濱田 洋文 (癌研・癌化学療法センター)  
平岡 真寛 (京都大学医学部)  
吉田 松年 (名古屋大学医学部病態制御研究施設)
- 1994 相羽 恵介 (癌研・癌化学療法センター)  
(14卷) 今村 正之 (京都大学医学部)  
折笠 精一 (東北大学医学部)  
小柳 知彦 (北海道大学医学部)  
清木 元治 (金沢大学がん研究所)  
直江 知樹 (名古屋大学医学部附属病院)  
浜口 道成 (名古屋大学医学部)  
藤本 修一 (千葉県がんセンター)  
山崎 俊樹 (島根医科大学)
- 1995 岡本 尚 (名古屋市立大学医学部分子医学研究所)  
(15卷) 佐藤忠比古 (国立郡山病院)  
嶋田 紘 (横浜市立大学医学部)  
田中 公夫 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
花井 彩 (大阪府立成人病センター)  
磨伊 正義 (金沢大学がん研究所)  
森 茂郎 (東京大学医科学研究所)  
和氣 徳夫 (九州大学生体防御医学研究所)
- 1996 有井 滋樹 (京都大学医学研究科)  
(16卷) 伊東 恭悟 (久留米大学医学部)  
小澤 敬也 (自治医科大学血液医学研究部門)  
佐藤 靖史 (東北大学加齢医学研究所)  
杉本 芳一 (癌研・癌化学療法センター)  
多羅尾和郎 (神奈川県立がんセンター)  
三角 順一 (大分医科大学医学部)  
山脇 成人 (広島大学医学部)
- 1997 西條 長宏 (国立がんセンター研究所)  
(17卷) 瀬戸 加大 (愛知県がんセンター研究所)
- 北島 政樹 (慶應義塾大学医学部)  
小池 克郎 (癌研・癌研究所)  
高見 博 (帝京大学医学部)  
谷村 弘 (和歌山県立医科大学)  
戸井 雅和 (東京都立駒込病院)  
中村 恭一 (東京医科歯科大学医学部)  
平岡 諦 (大阪府立成人病センター)  
堀 勝義 (東北大学加齢医学研究所)
- 池田 恢 (国立がんセンター中央病院)  
岡田 全司 (九州大学生体防御医学研究所)  
菊地 浩吉 (札幌医科大学医学部)  
杉本 徹 (宮崎医科大学)  
田中 憲一 (新潟大学医学部)  
新田 泰三 (順天堂大学医学部)  
松崎 靖司 (筑波大学臨床医学系)  
柳澤 昭夫 (癌研・癌研究所)  
吉田 操 (東京都立駒込病院)  
後藤 重則 (帝京大学生物工学研究センター)  
佐藤 宏 (帝京大学医学部)  
田崎 寛 (慶應義塾大学医学部)  
中村 剛 (長崎大学医療技術短期大学部)  
藤田 潤 (京都大学大学院医学研究科)  
間野 博行 (自治医科大学医学部)  
柳川 堯 (九州大学大学院数理学研究科)
- 石川 治 (大阪府立成人病センター)  
大川 治夫 (筑波大学臨床医学系)  
酒井 正彦 (関西電力病院)  
執印 太郎 (高知医科大学)  
谷 憲三朗 (東京大学医科学研究所)  
松村 保広 (国立がんセンター中央病院)  
宮崎 澄雄 (佐賀医科大学医学部)  
吉村 昭彦 (久留米大学生命科学研究所)  
神保 孝一 (札幌医科大学)  
田中 雅夫 (九州大学医学部)

- 1997 丹後 俊郎 (国立公衆衛生院疫学部)  
(17卷) 中川原 章 (千葉県がんセンター)  
堀井 明 (東北大学大学院医学系研究科)
- 1998 小山 博史 (国立がんセンター中央病院)  
(18卷) 高後 裕 (旭川医科大学)  
巽 典之 (大阪市立大学医学部)  
名川 弘一 (東京大学医学部)  
萩原 正敏 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)  
不破 信和 (愛知県がんセンター)  
村井 勝 (慶應義塾大学医学部)  
矢守 隆夫 (癌研・癌化学療法センター)
- 1999 井上 俊彦 (大阪大学大学院)  
(19卷) 大瀧 慈 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
河上 裕 (慶應義塾大学医学部先端医学研究所)  
高山 哲治 (札幌医科大学)  
土田 正則 (新潟大学医学部)  
万代 昌紀 (京都大学医学部)  
森脇 久隆 (岐阜大学医学部)  
渡邊 武 (九州大学生体防御医学研究所)
- 2000 井上 正樹 (金沢大学医学部)  
(20卷) 河野 文夫 (国立熊本病院)  
久保 敦司 (慶應義塾大学医学部)  
佐藤 博 (金沢大学がん研究所)  
中野 修治 (九州大学大学院)  
福本 学 (東北大学加齢医学研究所)  
山口 佳之 (広島大学原爆放射能医学研究所)  
吉田 知之 (東京医科大学)
- 2001 秋山 太 (癌研・癌研究所)  
(21卷) 片野 光男 (九州大学大学院)  
澤津橋基広 (佐賀医科大学)  
田原 秀晃 (東京大学医科学研究所)  
辻 晃仁 (高知県立中央病院)  
野島 博 (大阪大学微生物病研究所)  
村垣 善浩 (東京女子医科大学脳神経センター)  
若杉 尋 (国立がんセンター研究所)
- 2002 秋田 弘俊 (北海道大学大学院)
- 手島 昭樹 (大阪大学医学部)  
野田 哲生 (癌研・癌研究所)  
松山 裕 (東京大学大学院医学系研究科)  
烏野 隆博 (大阪府立成人病センター)  
佐藤 昇志 (札幌医科大学医学部)  
中島 秀彰 (国立病院九州がんセンター)  
登 勉 (三重大学医学部)  
畠 清彦 (自治医科大学)  
前谷 俊三 (天理よろず相談所医学研究所)  
安元 公正 (産業医科大学医学部)
- 大上 研二 (東海大学医学部)  
加賀谷有行 (広島大学医学部)  
真貝 洋一 (京都大学ウイルス研究所)  
田中 淳司 (北海道大学医学部)  
野田 政樹 (東京医科歯科大学難治疾患研究所)  
向田 直史 (金沢大学がん研究所)  
吉貴 達寛 (滋賀医科大学)
- 奥野 清隆 (近畿大学医学部)  
神奈木真理 (東京医科歯科大学医歯学総合研究科)  
小西 文雄 (自治医科大学大宮医療センター)  
田中 紘一 (京都大学大学院)  
樋野 興夫 (癌研・癌研究所)  
松村 明 (筑波大学臨床医学系)  
吉川 秀樹 (大阪大学大学院)
- 東 俊文 (慶應義塾大学医学部)  
小林 国彦 (埼玉県立がんセンター)  
高橋 宗春 (東京大学医学部附属病院)  
玉木 長良 (北海道大学大学院)  
中島 格 (久留米大学医学部)  
松崎 彰信 (九州大学医療技術短期大学部)  
山本 博幸 (札幌医科大学)
- 遠藤 善裕 (滋賀医科大学)

- 2002 鎌野 俊紀 (順天堂大学医学部)  
(22卷) 黄 政龍 (香川医科大学)  
高橋 豊 (金沢大学がん研究所)  
平塚 正弘 (大阪府立成人病センター)
- 2003 上本 伸二 (三重大学医学部)  
(23卷) 神田 善伸 (東京大学医学部)  
河野 浩二 (山梨大学医学部)  
檜原 啓之 (大阪府立成人病センター)  
堀口 裕 (慶應義塾大学医学部)
- 2004 魚住 公治 (鹿児島大学病院)  
(24卷) 清宮 啓之 (癌研・癌化学療法センター)  
田中 文啓 (京都大学医学部)  
古谷 和久 (愛知県がんセンター)  
森 正樹 (九州大学生体防御医学研究所)
- 2005 熊谷 昌明 (国立成育医療センター)  
(25卷) 國土 典宏 (東京大学医学部附属病院)  
並木 幹夫 (金沢大学医学部附属病院)  
長谷川好規 (名古屋大学医学部附属病院)  
林 慎一 (東北大学医学部)
- 2006 泉本 修一 (大阪大学大学院)  
(26卷) 太田 三徳 (近畿中央胸部疾患センター)  
小林 浩 (奈良県立医科大学)  
澤田 明久 (大阪府立母子保健総合医療センター)  
福岡 和也 (兵庫医科大学)
- 2007 磯本 一 (長崎大学医学部・歯学部附属病院)  
(27卷) 馬屋原健司 (癌研・有明病院)  
篠浦 伸禎 (東京都立駒込病院)  
高見 昭良 (金沢大学医学部附属病院)
- 2008 掛地 吉弘 (九州大学大学院)  
(28卷) 新地 洋之 (鹿児島大学大学院)  
松村 保広 (国立がんセンター東病院)  
吉崎 智一 (金沢大学大学院)
- 2009 出水みいる (九州大学病院)  
(29卷) 塚田 敬義 (岐阜大学大学院)  
長谷川 潔 (東京大学大学院)  
本田 五郎 (東京都立駒込病院)
- 小泉和三郎 (北里大学東病院)  
高橋 慶一 (東京都立駒込病院)  
戸田 正博 (慶應義塾大学医学部)
- 小野寺雅史 (筑波大学臨床医学系)  
弦間 昭彦 (日本医科大学)  
杉山 徹 (岩手医科大学医学部)  
平井 康夫 (癌研・癌研究所)
- 河野 嘉文 (鹿児島大学大学院医歯学総合研究科)  
高山 浩一 (九州大学病院)  
中島 淳 (慶應義塾大学医学部)  
星 宣次 (山形県立中央病院)  
山本 昇 (国立がんセンター中央病院)
- 甲能 直幸 (杏林大学医学部)  
土屋 弘行 (金沢大学大学院)  
萩原 弘一 (埼玉医科大学)  
羽生 大記 (大阪市立大学大学院)  
日野 雅之 (大阪市立大学大学院)
- 井上 啓史 (高知大学医学部)  
大東 弘明 (大阪府立成人病センター)  
佐治 重衡 (東京都立駒込病院)  
竹内 聡 (神戸医療センター)  
藤井 正人 (東京医療センター)
- 上野 清伸 (大阪府立成人病センター)  
椎名秀一朗 (東京大学医学部附属病院)  
新地 洋之 (鹿児島大学医学部・歯学部附属病院)  
細野 亜古 (国立がんセンター中央病院)  
粕谷 英樹 (名古屋大学医学部)  
竹島 信宏 (癌研・有明病院)  
元雄 良治 (金沢医科大学)  
渡邊 昌彦 (北里大学医学部)  
高野 晋吾 (筑波大学大学院)  
中森 正二 (大阪医療センター)  
服部 豊 (慶應義塾大学薬学部)  
宮田 博志 (大阪大学大学院)

- 2010 東 治人 (大阪医科大学) 石川 剛 (京都府立医科大学)  
(30卷) 庄 雅之 (奈良県立医科大学) 楯 真一 (千葉大学大学院)  
谷 眞至 (和歌山県立医科大学) 津田 浩史 (慶應義塾大学医学部)  
藤原 義之 (大阪大学大学院) 山口 和也 (岐阜大学医学部)
- 2011 江口 英利 (大阪大学大学院医学系研究科) 菊地 栄次 (慶應義塾大学医学部)  
(31卷) 堤 莊一 (群馬大学大学院医学系研究科) 藤谷 和正 (国立病院機構大阪医療センター)  
本告 正明 (大阪府立成人病センター) 宮田 康好 (長崎大学病院)  
宮田 義浩 (広島大学原爆放射線医科学研究所) 元井 冬彦 (東北大学病院)  
山下 継史 (北里大学医学部)
- 2012 浦本 秀隆 (産業医科大学) 葛西 和博 (岩手医科大学医学部)  
(32卷) 小西 毅 (がん研究会有明病院) 佐藤 康史 (札幌医科大学)  
澤木 正孝 (愛知県がんセンター中央病院) 高橋 秀典 (大阪府立成人病センター)  
谷岡 真樹 (兵庫県立がんセンター) 本間 尚子 (東京都健康長寿医療センター研究所)  
松木 絵里 (慶應義塾大学病院) 村上 英樹 (金沢大学整形外科)
- 2013 井上 啓史 (高知大学教育研究部) 沖 英次 (九州大学病院)  
(33卷) 河合 憲康 (名古屋市立大学大学院医学研究科) 北郷 実 (慶應義塾大学医学部)  
黒川 幸典 (大阪大学大学院医学系研究科) 笹田 哲朗 (久留米大学医学部)  
島崎 猛夫 (金沢医科大学総合医学研究所) 種村 匡弘 (呉医療センター・中国がんセンター)  
野尻 俊輔 (名古屋市立大学病院) 丸橋 繁 (大阪府立成人病センター)
- 2014 木下 学 (大阪府立成人病センター) 小坂 威雄 (慶應義塾大学医学部)  
(34卷) 小西 毅 (がん研究会有明病院) 末原 義之 (順天堂大学医学部)  
高橋 信 (東北大学加齢医学研究所) 谷内 恵介 (高知大学医学部附属病院)  
富田 直人 (横浜市立大学大学院医学研究科) 中前 博久 (大阪市立大学大学院医学研究科)  
南谷 泰仁 (東京大学医学部附属病院) 長谷川大一郎 (兵庫県立こども病院)
- 2015 石山 博條 (北里大学医学部) 板野 理 (慶應義塾大学医学部)  
(35卷) 里井 壯平 (関西医科大学) 白石 治 (近畿大学医学部)  
高張 大亮 (がん研究会有明病院) 内藤 立暁 (静岡県立静岡がんセンター)  
西田 純幸 (大阪大学医学部附属病院) 林 洋光 (熊本大学大学院生命科学研究部)  
水島 恒和 (大阪大学大学院医学系研究科)
- 2016 伊佐山浩通 (東京大学大学院医学系研究科) 小沼 貴晶 (東京大学医科学研究所附属病院)  
(36卷) 佐伯 浩司 (九州大学大学院) 杉村啓二郎 (大阪府立成人病センター)  
瀧口 修司 (大阪大学医学系研究科) 藤阪 保仁 (大阪医科大学附属病院)  
前田 亮 (藤田保健衛生大学) 若槻 尊 (がん研究会有明病院)
- 2017 秋田 裕史 (大阪国際がんセンター) 泉 浩二 (金沢大学大学院医薬保健学総合研究科)  
(37卷) 神田 光郎 (名古屋大学医学部附属病院) 野見 武男 (奈良県立医科大学)  
馬場 祥史 (熊本大学大学院生命科学研究部)

2018 池上 徹 (九州大学病院)  
(38卷) 立石 健祐 (横浜市立大学大学院医学研究科)  
畠 達夫 (東北大学大学院医学系研究科)

後藤太一郎 (山梨県立中央病院)  
谷口 浩二 (慶応義塾大学医学部)  
増田 隆明 (九州大学病院別府病院)

がん治療のあゆみ 第39巻

令和2年3月25日 印刷  
令和2年3月31日 発行

非 売 品

発行人 公益財団法人  
がん集学的治療研究財団  
松 本 晃

お問い合わせは下記にお願いいたします。  
〒136-0071 東京都江東区亀戸1-28-6  
タニビル3F  
電話 (03)5627-7593

印刷所 (株)糸川印刷

本書の内容の一部あるいは全部を無断で、複写機器等いかなる方法によっても複写・複製することは、法律で認められた場合を除き、著者および出版者の権利の侵害になりますので、予め小社の許諾を求めて下さい。