

博士論文

直腸癌に対する化学放射線療法における
CPT-11 の効果と FDG-PET による効果・予後の予測

奥野貴之

直腸癌に対する化学放射線療法における
CPT-11 の効果と FDG-PET による効果・予後の予測

東京大学大学院医学系研究科 医学博士課程 外科学専攻

指導教員 石原聡一郎教授

奥野貴之

目次

目次	3
略語一覧	5
要旨	7
序文	8
第1章 大腸癌細胞における SN-38 の X 線増感効果	
1-1 背景と目的	11
1-2 実験方法	15
1-3 実験結果	25
1-4 考察	46
1-5 小括	51
第2章 直腸癌に対する術前化学放射線療法における FDG-PET/CT volumetry による効果・予後予測能	
2-1 背景と目的	52
2-2 対象と方法	54
2-3 結果	60
2-4 考察	80
2-5 小括	84

結論	85
謝辭	86
引用文献	87

略語一覽

5-FU: 5-fluorouracil

AUC: area under curve

bFGF: basic fibroblast growth factor

CRM: circumferential resection margin

CRT: chemoradiotherapy

CT: computed tomography

DFS: disease free survival

EMT: epithelial-mesenchymal transition

FDG: fludeoxyglucose

GLUT: glucose transporter

HIF: hypoxia-inducible factor

LV: leucovorin

MFI: mean fluorescence intensity

MRI: magnetic resonance imaging

MTV: metabolic tumor volume

OS: overall survival

pCR: pathological complete response

PE: phycoerythrin

PET: positron emission tomography

PI: propidium iodide

RFS: relapse free survival

ROC: receiver-operating characteristics

RT: radiotherapy

SUV: standardized uptake value

SUVmax: maximum standardized uptake value

TLG: total lesion glycolysis

TME: total mesorectal excision

VEGF: vascular endothelial growth factor

VOI: volume of interest

要旨

本研究では、直腸癌に対する術前化学放射線療法における CPT-11 の効果と、FDG-PET による効果と予後の予測能の探索をテーマとした。大腸癌細胞をもちいて、CPT-11 の活性代謝物である SN-38 による X 線増感作用について研究し、また直腸癌患者に対する術前化学放射線療法前後の FDG-PET/CT 検査のデータをもちいて、FDG-PET/CT volumetry による化学放射線療法の効果と予後の予測能について解析した。その結果、CPT-11 は X 線増感剤として化学放射線療法に併用する薬剤として候補たり得ること、および術前化学放射線療法後の FDG-PET/CT volumetry が直腸癌患者の予後予測に有用な可能性があることを見出した。

序文

直腸癌と診断される新規患者数は世界中で年間 45 万人、死亡者数は年間 25 万人にのぼる。その集学的治療は進歩しているにもかかわらず、依然として高い死亡率を呈する悪性疾患である [1, 2]。そのうち、特に下部進行直腸癌に対しては、術前化学放射線療法 (Chemoradiotherapy: CRT) と全直腸間膜切除 (Total mesorectal excision: TME) の概念に沿った外科的手術 [3-5] を中心とした集学的治療を行うことが欧米をはじめとする諸国における標準治療であり、本邦においても術前 CRT を行う施設が増加しつつある。そして術前 CRT については、予後の改善や骨盤機能の温存を目的とした研究が日々進められている。

術前 CRT の奏功した症例、特に病理組織学的完全奏効 (Pathological complete response: pCR) を認めた症例では、CRT の効果の乏しい症例に比べて無病生存 (Disease free survival: DFS) 率や全生存 (Overall survival: OS) 率などの予後が良好であることが報告されている [6-9]。これまで、放射線療法 (Radiotherapy: RT) は術後よりも術前に行うほうが予後が良好であること [10-13]、RT に 5-fluorouracil (5-FU) ベースの化学療法を併用した術前 CRT を行うほうが良好な局所制御を得られること [14, 15]、が複数の臨床試験により証明されており、現在の National Comprehensive Cancer Network のガイドラインでは、下部直腸癌に対して 5-FU ベースの化学療法を用いた術前 CRT と TME 手術を行うことが標準治療とされている [16]。しかし 5-FU を用いた術前 CRT による pCR 率は 15%程度にとどまっており [17]、その奏効率の改善は直腸癌に対する CRT の研究における重要な課題である。近年、欧米では 5-FU に大腸癌のキードラッグ

クである Oxaliplatin を加えたレジメンによる術前 CRT の第 III 相試験がいくつか報告されているが、pCR 率や予後の明らかな改善は認めていない [18-20]。一方で、大腸癌のもう一つのキードラッグである CPT-11 を併用したレジメンによる術前 CRT については未だ十分なエビデンスがない。本邦におけるいくつかの第 I、II 相試験では pCR 率が 23-35%と良好な結果を認めているが [21-23]、これまで第 III 相試験の報告はない。また基礎研究から CPT-11 による X 線増感作用を解明した報告もないために、エビデンスの構築が求められている。

骨盤機能温存の面からは、術前 CRT により pCR となった症例に対して、TME 手術を行うことが過大侵襲となる可能性が指摘されている。術前 CRT の効果は症例ごとに大きく異なり、pCR の症例を 15%程度で認める一方で、CRT の効果があまり認められない症例も半数程度存在する [17]。近年、pCR の症例に対して TME 手術を行わずに経過観察を行う”Watch and Wait”という概念が提唱されており、pCR を術前に診断することができれば骨盤機能温存に大いに寄与すると考えられる [24-26]。また CRT 前にその効果が乏しいことを予測できれば、CRT のレジメンを変更する、CRT 後に地固め化学療法を追加する、CRT を行わずに外科的手術を行う、などの治療を行うことで予後の改善が期待できる [27, 28]。さらに手術前に無再発生存 (Relapse free survival: RFS) や OS などの予後を予測することができれば、化学療法の追加や術後サーベイランスの検討をするのに有用である [29]。このように直腸癌術前に CRT の効果や予後を予測できれば、症例ごとにより適切な個別化治療を行うことが可能となる。しかし現在のところ術前 CRT の効果は手術検体により評価されており、術前に正

確に pCR や予後を予測することは困難である。そこで本研究では、術前に CRT の効果や予後を予測し得るマーカーとして、癌細胞における糖代謝を standardized uptake value (SUV) として測定し、腫瘍の局在や悪性度を反映する fludeoxyglucose (FDG) –positron emission tomography (PET) /computed tomography (CT) 検査に注目した。

以上から、第 1 章では大腸癌細胞を用いて CPT-11 の活性代謝物である SN-38 の X 線増感作用について解析することとし、第 2 章では実臨床のデータを用いて直腸癌に対する術前 CRT における FDG-PET/CT 検査の効果・予後の予測能について明らかにすることとした。

第 1 章

大腸癌細胞における SN-38 の X 線増感効果

1-1 背景と目的

CPT-11 は体内に投与されると肝臓で SN-38 へと代謝され、細胞核において DNA の複製・転写に重要な酵素である topoisomerase I を阻害することで DNA の修復を阻害する、大腸癌の治療に広く用いられている抗がん剤の一つである。さらに近年は、直腸癌に対する術前 CRT のレジメンとしてもその効果が期待されている。当科においても、下部進行直腸癌 22 例に対して UFT/Leucovorin (LV) と CPT-11 を併用した化学療法レジメンによる術前 CRT の第 I、II 相臨床試験を行い、pCR 率が 22.7% と高い抗腫瘍効果を認め、5 年 RFS 率も 80.4% と比較的良好であった [23]。しかしこれまで、CPT-11 や SN-38 の X 線増感剤としての効果について詳細な解析を行った基礎研究はないため、今回、大腸癌細胞を用いた研究を行うこととした。

直腸癌などの固形癌への X 線療法に対する治療抵抗性の原因の一つに、腫瘍内部の低酸素環境が知られている [30]。癌細胞の増殖速度は正常細胞に比べて著しく速く、癌細胞に酸素や栄養を供給するための血管新生の誘導が不可欠であるが、腫瘍が一定以上に増大すると新生血管の形成が相対的に不十分となり、腫瘍内部は低酸素状態に陥ることが知られている [31, 32]。そのため、多くの固形腫瘍の中心部では酸素分圧が 10 mmHg 以下であり、正常組織と比較して明らかに低酸素状態となる [33]。このような低酸素環境下の細胞では Hypoxia-

inducible factor (HIF)-1 α というタンパク質が発現する。HIF-1 α は、正常酸素分圧下ではユビキチン化され速やかに分解されるが、低酸素環境下では HIF-1 β と 2 量体を形成して核内に移行し、遺伝子の Hypoxia-response element に結合することで転写因子として機能して 100 以上の下流のタンパク質の発現を調整する。具体的には、Vascular endothelial growth factor (VEGF) や Basic fibroblast growth factor (bFGF) の発現による新生血管の増生 [34, 35]、Bcl-2 ファミリーによるアポトーシスの調整 [36]、p21 や Cyclin D1 を介した細胞周期の停止 [37, 38]、嫌気性代謝の亢進 [39]、オートファージの誘導 [40] により、低酸素環境や虚血などの厳しい環境下でも細胞が生存しやすいように性質を変化させる。さらに Epithelial-mesenchymal transition (EMT) を介した浸潤能や転移能の獲得 [41, 42]、Bid や Bax などのアポトーシス誘導タンパク質の抑制による化学療法抵抗性の獲得 [43] により、癌細胞の悪性度を増すように働きかけることが報告されている (図 1)。

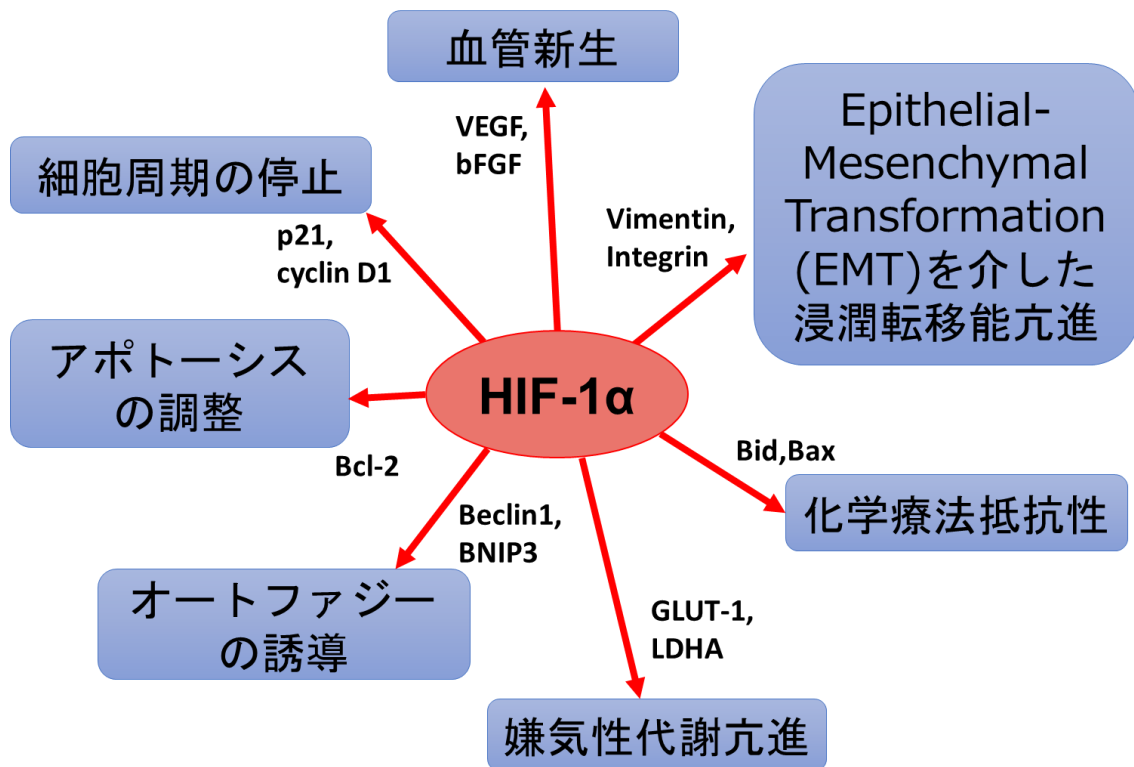


図 1 Hypoxia-inducible factor (HIF) -1α の作用。

臨床検体においても、HIF-1 α の高発現は化学療法への抵抗性や遠隔転移、不良な予後とも関連していることが、様々な癌種で報告されている [44,45]。そのため、治療薬として HIF-1 α を抑制する薬剤についての開発研究が盛んに行われているが、臨床応用まで至っているものはほとんどない [46]。一方で、当科においては以前に、CPT-11 の活性代謝物である SN-38 が低酸素環境中の大腸癌細胞において発現した HIF-1 α を特異的に抑制し、低酸素環境中でも抗腫瘍効果を発揮する、という知見を得ている [47]。

さらに近年では、X 線照射と HIF-1 α の発現についても研究が進みつつある。Moeller らは乳癌細胞や前立腺癌細胞の腫瘍において、X 線照射による free radical の発生とともに HIF-1 α が発現することを報告した。さらに HIF-1 α の下流に存在する VEGF の発現による血管新生や、細胞周期の変化、嫌気性代謝の亢進がおきることも報告している [48,49]。また頭頸部扁平上皮癌細胞や子宮内膜癌細胞においては、X 線照射により Phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin 経路が活性化され HIF-1 α が合成されたことが報告されている [50,51]。しかしこれまで、大腸癌細胞における X 線照射と HIF-1 α の発現について検討した報告はない。

このような背景から、本研究では以下の仮説をたてた。① 大腸癌細胞においても X 線照射により HIF-1 α が発現する、② SN-38 は X 線照射により発現した HIF-1 α の発現を抑制する、③ SN-38 が X 線増感剤として作用する。今回の研究ではこれらを明らかにすることを目的とした。

1-2 実験方法

細胞株と試薬

ヒト大腸癌細胞株である HT29、SW480 を Japanese Cancer Research Bank より購入した。HT29 は 44 歳女性の白色人種女性の大腸癌 (腺癌) 由来の細胞株で、KRAS (codon12, 13) 野生型、マイクロサテライト安定性 (BAT25, BAT26)、BRAF (v600E) 変異型、TP53 (codon273 (R→H)) 変異型であることを Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction にて確認した。SW480 は 50 歳の白色人種男性の大腸癌 (腺癌) 由来の細胞で、KRAS (codon12, 13) 変異型、マイクロサテライト安定性 (BAT25, BAT26)、BRAF (v600E) 野生型、TP53 (codon273 (R→H), codon309 (P→S)) 変異型であることを確認した。いずれも既報告の細胞の性質と一致していた [52]。細胞は 5% 胎児ウシ血清添加 RPMI1640 培養液 (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) に抗菌剤/抗真菌剤 (100 U/ ml penicillin G, 100 µg/ ml streptomycin sulfate, 250 ng/ ml amphotericin B ; Life Technologies, Grand Island, NY, USA) を加えた培地で、37 °C、20% 酸素、5% 二酸化炭素、75% 窒素濃度のインキュベーター内で培養した。

SN-38 は Toronto Research Chemicals (North York, Ontario, Canada) より購入した。5-FU、Oxaliplatin、CoCl₂、RPMI-1640 培養液は Sigma Aldrich (St Louis, MO, USA) より購入した。5% 胎児ウシ血清と抗菌剤/抗真菌剤は Life Technologies (Grand Island, NY, USA) より購入した。Tetraacetoxymethyl ester (calcein-AM) は同仁化学研究所 (熊本、日本) より購入した。フローサイトメトリーに用いる試薬として、抗 HIF-1α phycoerythrin (PE) 標識抗体 (カタログ番号: IC1935P) は R&D

systems (Minneapolis, MN, USA) より購入した。FITC 標識 Annexin V アポトーシスキットと FITC 標識 BrdU 細胞周期キットは BD Pharmingen (San Diego, CA, USA) より購入した。ウェスタンブロッティングの 1 次抗体として、抗 HIF-1 α 抗体 (ab2185)、抗 GAPDH 抗体 (ab9485)、抗 VEGF 抗体 (ab46154) は Abcam (Cambridge, MA, USA) より購入し、抗 β アクチン抗体 (カタログ番号 : PM053) は MBL (名古屋、日本) より購入した。2 次抗体の抗ウサギ IgG-Alkaline phosphatase 抗体は Invitrogen Corp. (Carlsbad, CA, USA) より購入した。

X 線照射と抗がん剤投与

MBR-1505R2 X-ray generator (日立メディコ、東京、日本) を用いて細胞に X 線照射を行った。培養した細胞に毎分 0.4 Gy の照射線量 (計 0, 1, 2, 4, 8 Gy) の X 線照射を行った直後に、各濃度の SN-38 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μ M)、5-FU (0, 1.25, 5, 20 μ M)、Oxaliplatin (0, 1.25, 5, 20 μ M) を投与し 48 時間培養した。また HIF-1 α のポジティブコントロールとしては、細胞を 150 μ M の CoCl₂ の下で 24 時間培養した [53]。

フローサイトメトリーによる検討

HIF-1 α の発現はフローサイトメトリーを用いて解析した。これまで細胞内蛋白質である HIF-1 α をフローサイトメトリーにて解析した報告は検索した限りではなく、我々が以前行った方法に若干の修正を加えて解析した [54]。具体的には、10 cm ディッシュを用いて細胞を培養、治療した後、細胞を PBS 5 ml で洗

浄し、EDTA/トリプシン 1 ml を滴下し 5 分間インキュベートしてディッシュ底に接着している細胞を剥離した。培養液 5 ml を用いて細胞を回収し、遠心して上清を除いた後、細胞を 4% パラフォルムアルデヒド 1 ml を用いて固定・溶解した。再度遠心し PBS にて洗浄した後、0.1% Tween 液 1 ml に溶解して細胞壁を透過させた。再び遠心、洗浄した後、冷暗所において抗 HIF-1 α PE 標識抗体 5 μ l を用いて細胞内の HIF-1 α を標識し、洗浄後、ランニングバッファーに細胞を溶解して Navios Flow Cytometer (Beckman Coulter, Brea, CA, USA) を用いて 10000 個の細胞中の HIF-1 α PE の蛍光標識を測定した (図 2)。解析は FlowJo software (Tree Star, Ashland, OR, USA) を用いて行い、mean fluorescence intensity (MFI) として表記した。

Navios Flow Cytometer



細胞10000個の蛍光標識を測定

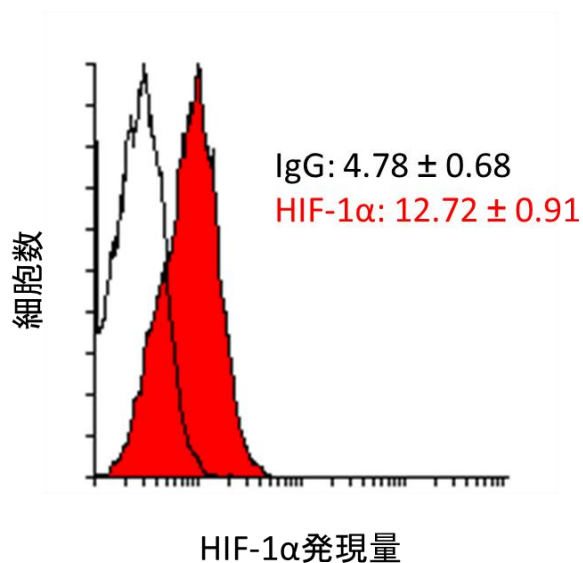


図2 Navios Flow cytometer による Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α 発現量の測定。HT29 細胞 10000 個に対して IgG-phycoerythrin (PE) (ネガティブコントロール：白い領域) と HIF-1 α PE (赤い領域) による蛍光標識を行い、フローサイトメトリーにより測定した。グラフの横軸は PE 発現量を示す。赤い領域は白い領域より右方に移行しており、通常の HT29 細胞中に存在する HIF-1 α が検出されている。

アポトーシスの測定

アポトーシスの評価は Annexin V および Propidium Iodide (PI) の 2 重染色を用いたフローサイトメトリーと、トリパンブルーによる染色にて解析した。X 線照射 (0 or 4 Gy) 直後に SN-38 (0 or 1 μ M) 投与下で 48 時間培養した細胞を回収し、PBS で洗浄した後、FITC 標識 Annexin V/PI (Annexin V, FITC Apoptosis Detection Kit, BD, San Jose, CA, USA) を用いて染色した。フローサイトメトリーを用いて測定し、Annexin V 陰性/PI 陰性の分画を生細胞、Annexin V 陽性の分画をアポトーシス細胞集団と判定した (図 3)。

また、48 時間の培養後、回収した細胞を PBS で洗浄し、トリパンブルーにて染色し死細胞 (アポトーシス細胞 + ネクローシス細胞) の割合を測定した。

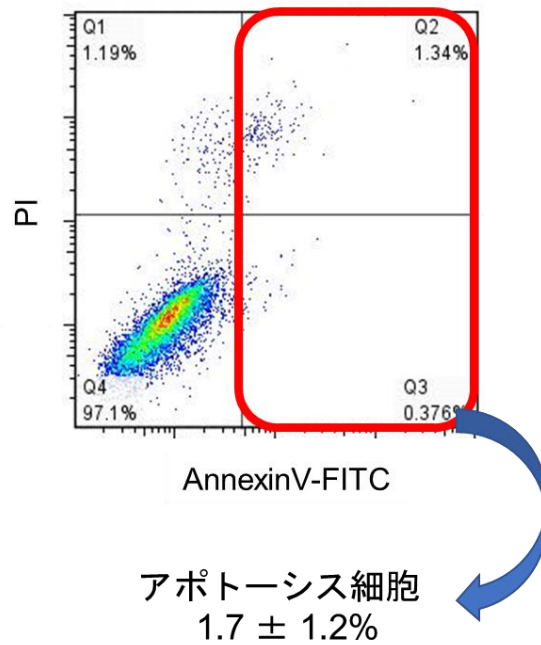
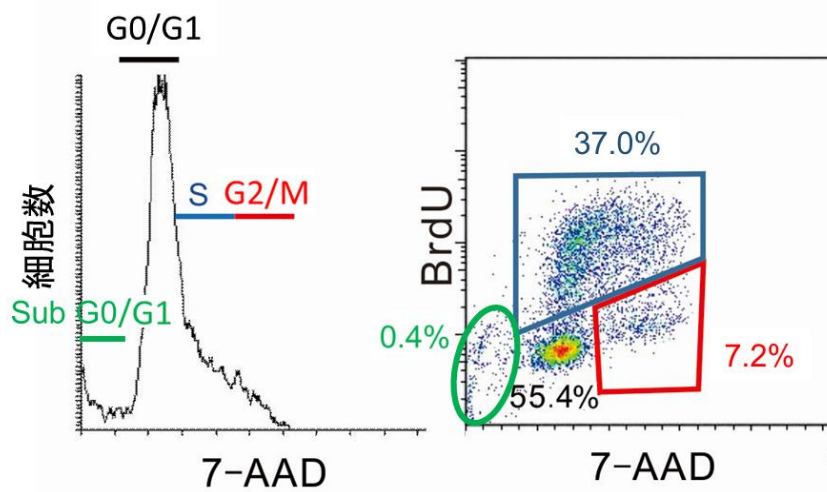


図3 Annexin V/Propidium Iodide (PI) の2重染色によるアポトーシスの評価。フローサイトメトリーを用いて解析した。Annexin V陰性/PI陰性細胞を生細胞、Annexin V陽性/PI陰性細胞を早期アポトーシス細胞、Annexin V陽性/PI陽性細胞を後期アポトーシス細胞、Annexin V陰性/PI陽性細胞をネクローシス細胞と判定し、赤枠部のAnnexin V陽性細胞をアポトーシス細胞としてその割合を計測した。

細胞周期の測定

細胞周期の解析は FITC 標識 BrdU 細胞周期キット (FITC BrdU Flow Kit, BD, San Diego, CA, USA) を用いてフローサイトメトリーにて行った。X 線照射 (0 or 4 Gy) 後に SN-38 (0 or 1 μ M) 投与下で 48 時間培養した細胞に対して、BrdU 投与下で 1 時間培養して S 期の細胞の DNA を標識した後、細胞膜の固定・溶解を行い、DNase にて DNA を分解し、BrdU を FITC 標識抗 BrdU 抗体で、DNA を 7-AAD にてそれぞれ標識した。フローサイトメトリーを用いて DNA 量を解析し、sub-G1 期、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の割合を計測した (図 4)。



Sub G0/G1;	0.4 ± 0.1%
G0/G1 ;	55.4 ± 2.1%
S;	37.0 ± 2.0%
G2/M;	7.2 ± 0.2%

図 4 FITC 標識 BrdU 細胞周期キットを用いた細胞周期の評価。
 S 期の細胞において DNA が複製される際に BrdU を取り込ませ、FITC 標識抗 BrdU 抗体で標識し、それ以外の細胞の核内 DNA を 7-AAD にて標識した。フローサイトメトリーの解析により、Sub-G0/G1 期、G0/G1 期、S 期、G2/M 期の細胞の割合を計測した。

ウェスタンブロッティングによる検討

HIF-1 α 、VEGF の発現はウェスタンブロッティングを用いて解析した。10 cm ディッシュの細胞を Bolt LDS Sample buffer と Bolt Sample Reducing Agent (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて溶解・回収した。4°C、15,300 g にて 10 分間遠心した後に、上清を回収し、これを検体として使用した。検体は -80°C にて冷凍保存した。検体のタンパク濃度は Qubit Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific) を用いて測定した。検体ごとに 40 μ g のタンパク質を 70°C、10 分で熱変性させた後に、Bolt 4-12% Bis-Tris Plus gels (Thermo Fisher Scientific) に 200 V の定電圧で電気泳動し、Mini Blot Module (Thermo Fisher Scientific) を用いて 20 V、90 分間で PVDF 膜に転写した。その PVDF 膜を iBind Western System (Thermo Fisher Scientific) の中で 1 次抗体、2 次抗体と温置し、膜上のタンパク質と抗体反応させた。シグナルバンドは Novex AP Rabbit Chemiluminescent Detection Kit (Thermo Fisher Scientific) 2.5 ml と 5 分間反応させ、Quantity One 1 次元ゲル解析ソフトウェア (BIORAD, Hercules, CA, USA) を用いて検出し、ImageJ ソフトウェア (National Institute of Health, Bethesda, MD, USA) を用いて解析した。

細胞増殖アッセイ

96 ウェルプレートに 5×10^3 個の細胞を分注し、X 線照射 (0 or 4 Gy) 直後に各種濃度の SN-38 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μ M) 投与し培養した。48 時間後に各ウェルに 1 μ M ずつ calcein-AM を注入し、37°C 30 分で暗所保存した後に、Tera

scan VP (Minerva Tech, Tokyo, Japan) を用いて蛍光度を測定し、細胞数を測定した。

統計学的解析

すべての実験は3回行い、平均 \pm 標準偏差で表記した。統計学的有意差の検討には Student *t* 検定を用いた。p 値が 0.05 以下を統計学的に有意とした。

1-3 実験結果

大腸癌細胞における X 線照射による HIF-1 α の発現

まず、ヒト大腸癌細胞 (HT29, SW480) に X 線照射 (0-8 Gy) を行い、HIF-1 α の発現量をフローサイトメトリーで測定した。HT29 細胞に 4 Gy の X 線照射を行い 48 時間培養した結果を図 5 に示す。HT29、SW480 細胞のいずれにおいても X 線照射により線量依存性に HIF-1 α の発現が認められ、4 Gy と 8 Gy の X 線照射による発現量はほとんど同等であった。4 Gy の X 線照射により HT29 細胞ではコントロールの 3.5 倍、SW480 細胞では 5 倍の HIF-1 α の発現が認められた (図 6)。

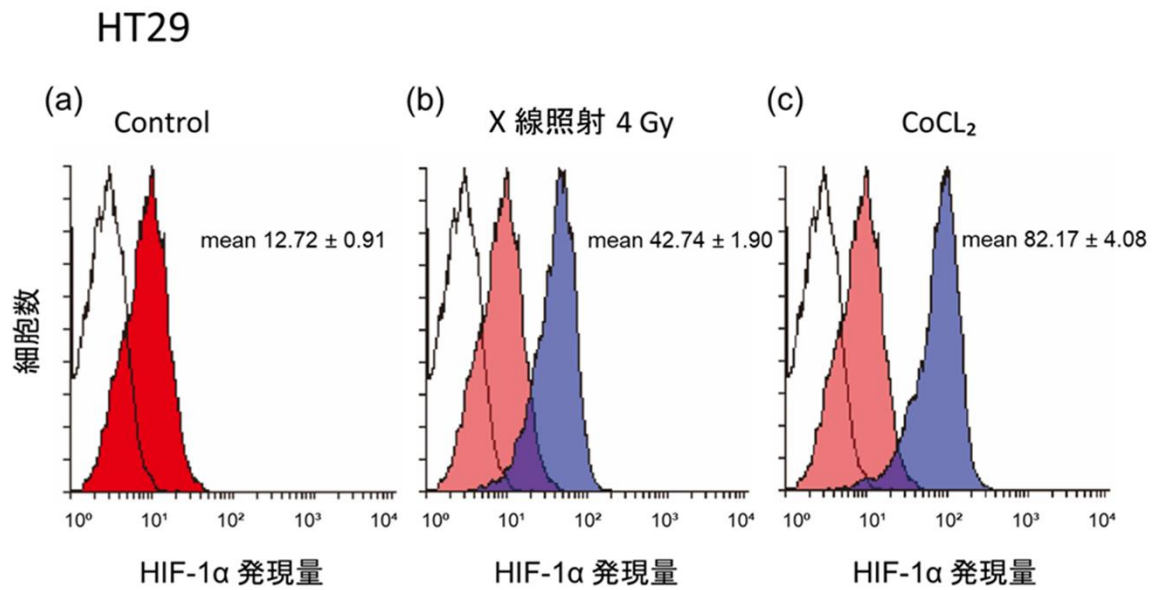


図 5 HT29 細胞に対する X 線照射による Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α 発現量。

- (a) 通常の HT29 細胞における HIF-1 α 発現量 (コントロール：赤い領域、平均値 12.72) と IgG 発現量 (ネガティブコントロール：白い領域、平均値 4.78)。
- (b) 4 Gy の X 線照射を施行し 48 時間培養した HT29 細胞における HIF-1 α 発現量 (青い領域、平均値 42.74) は、コントロールにくらべて有意に増加していた。
- (c) 150 μ M の CoCl₂下で 24 時間培養した HT29 細胞における HIF-1 α の発現量 (ポジティブコントロール：青い領域、平均値 82.17)。

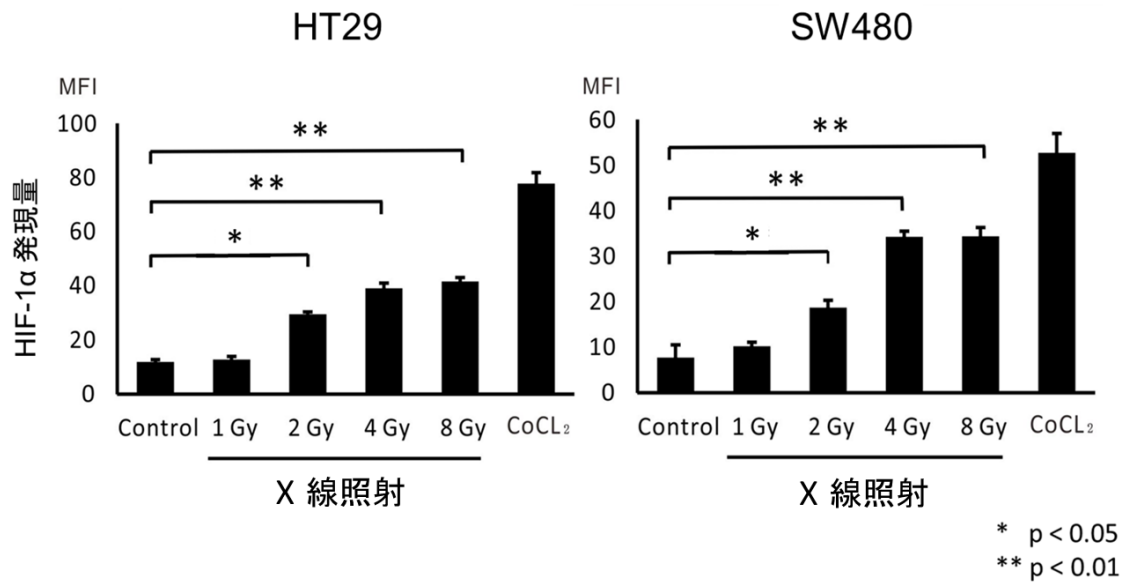
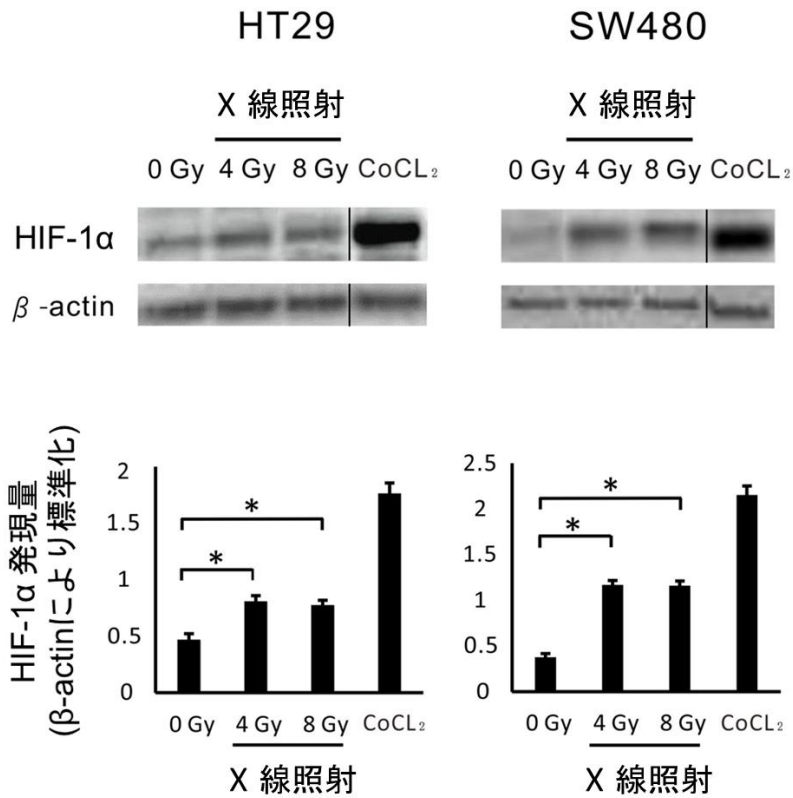


図6 大腸癌細胞におけるX線照射後のHypoxia-inducible factor (HIF)-1 α 発現量。HT29細胞、SW480細胞に対してX線照射し48時間後のHIF-1 α 発現量をフローサイトメトリーにより解析した。横軸がX線照射線量、縦軸がHIF-1 α 発現量を示す。両細胞において、2-8 GyのX線照射により、線量依存性にHIF-1 α 発現量の増加を認めた。4 Gyと8 GyのX線照射による発現量は同等であった。

同様の検討をウェスタンブロッティングでも行った。4 Gy と 8 Gy の X 線照射を施行し 48 時間後の両細胞において HIF-1 α の発現を認めた。HIF-1 α の発現量は HT29 細胞でコントロールの 2 倍、SW480 細胞で 3 倍であった (図 7)。



* p < 0.05

図7 大腸癌細胞におけるX線照射後のHypoxia-inducible factor (HIF)-1 α 発現量。HT29細胞、SW480細胞に対してX線照射し48時間後のHIF-1 α 発現量をウェスタンブロッティングにより解析した。両細胞に対する4、8 GyのX線照射によりHIF-1 α の発現を認めた。下図はImageJソフトウェアによる解析の結果である。

X線照射後の時間経過による HIF-1 α 発現量の推移

X線照射後の時間経過による HIF-1 α 発現量の推移をフローサイトメトリーにより測定した。HT29 細胞に 4 Gy の X線照射を行い、12 時間経過した時点から細胞内の HIF-1 α 発現量の有意な増加を認め、24-48 時間が HIF-1 α 発現量のピークであった。X線照射後 72 時間以降は HIF-1 α の発現量はおおよそ X線照射前のレベルに戻った (図 8)。SW480 における HIF-1 α 発現量の推移もおおよそ同等であった。

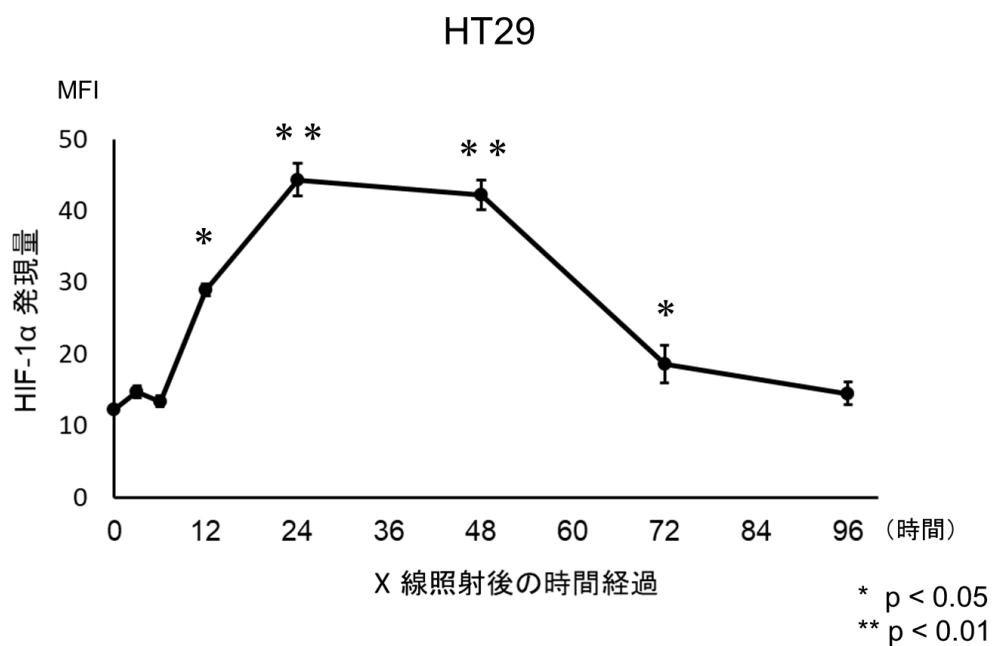
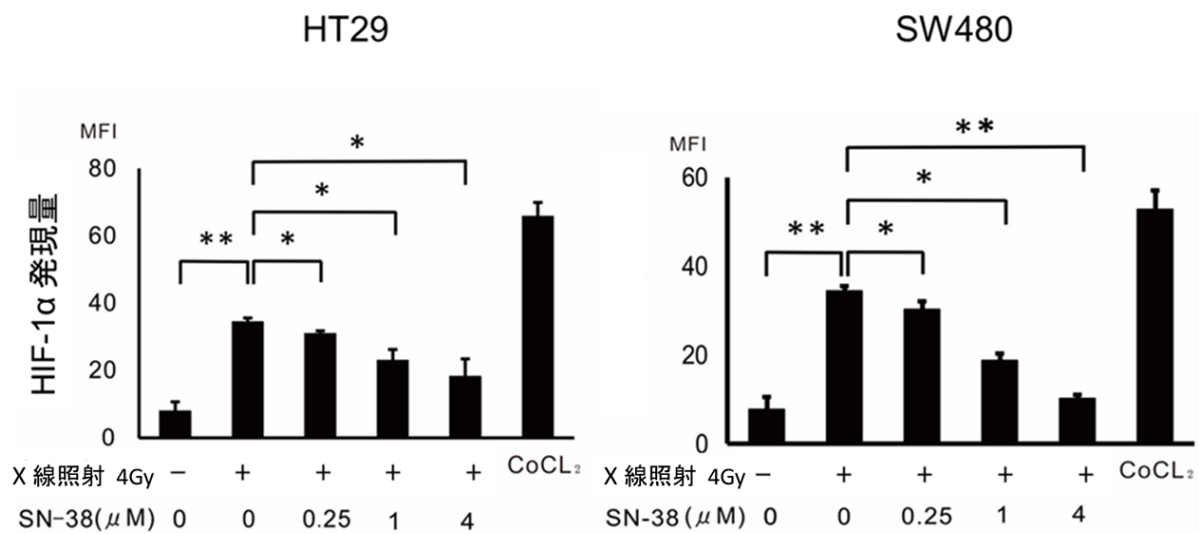


図 8 X線照射後の Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α 発現量の推移。
HT29 細胞に対して 4 Gy の X線照射を施行し、経過した時間ごとの HIF-1 α 発現量を、フローサイトメトリーを用いて解析した。照射後 12 時間から HIF-1 α 発現の増加を認め、24 時間から 48 時間が発現量のピークであり、72 時間以降はおおよそ同との発現量と同じレベルに戻った。

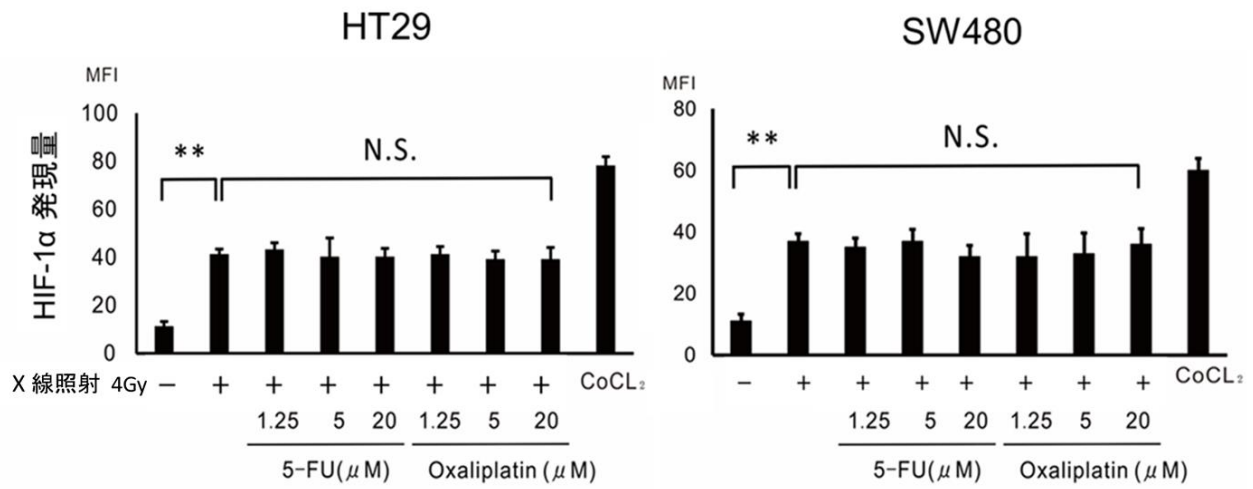
X線照射により発現した HIF-1 α の SN-38 による抑制

次いで、X線照射によって発現した HIF-1 α が SN-38 により抑制されるか解析した。HT29 細胞に 4 Gy の X線照射を行い、直後から細胞を SN-38 (0.25-4 μ M) 投与下で 48 時間培養し、HIF-1 α の発現量をフローサイトメトリーで測定した。結果として、SN-38 は容量依存性に、X線照射による HIF-1 α の発現を抑制した。SW480 細胞に対する検討でも同様の結果であった (図 9)。また、5-FU (1.25-20 μ M) と Oxaliplatin (1.25-20 μ M) についても同様の検討を行ったが、これらの薬剤では X線照射により発現した HIF-1 α は抑制されなかった (図 10)。



* p < 0.05
 ** p < 0.01

図9 X線照射により発現した Hypoxia-inducible factor (HIF) -1α の SN-38 による抑制。HT29 細胞、SW480 細胞における HIF-1α 発現量をフローサイトメトリーにより解析した。両細胞に 4 Gy の X 線照射を行い、直後に 0.25-4 μM の SN-38 を投与して 48 時間培養した後に、HIF-1α 発現量を測定した。SN-38 は濃度依存性に、X 線照射後に発現する HIF-1α を抑制した。



** p < 0.01

図 10 5-fluorouracil (5-FU) や Oxaliplatin の投与による X 線照射後の Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α 発現量の変化。

HT29 細胞、SW480 細胞に 4 Gy の X 線照射を施行した直後に 5-FU、Oxaliplatin を投与し、48 時間培養した細胞の HIF-1 α 発現量をフローサイトメトリーで解析した。5-FU や Oxaliplatin は、X 線照射により発現する HIF-1 α を抑制しなかった。

同様の検討をウェスタンブロッティングでも行った。X線照射を施行し48時間後には HIF-1 α に加えて、HIF-1 α の下流に存在し血管新生に重要な分子である VEGF も発現することが明らかとなった。そして SN-38 (0.25-4 μ M) は X線照射による HIF-1 α と VEGF の発現を抑制した (図 11)。

HT29

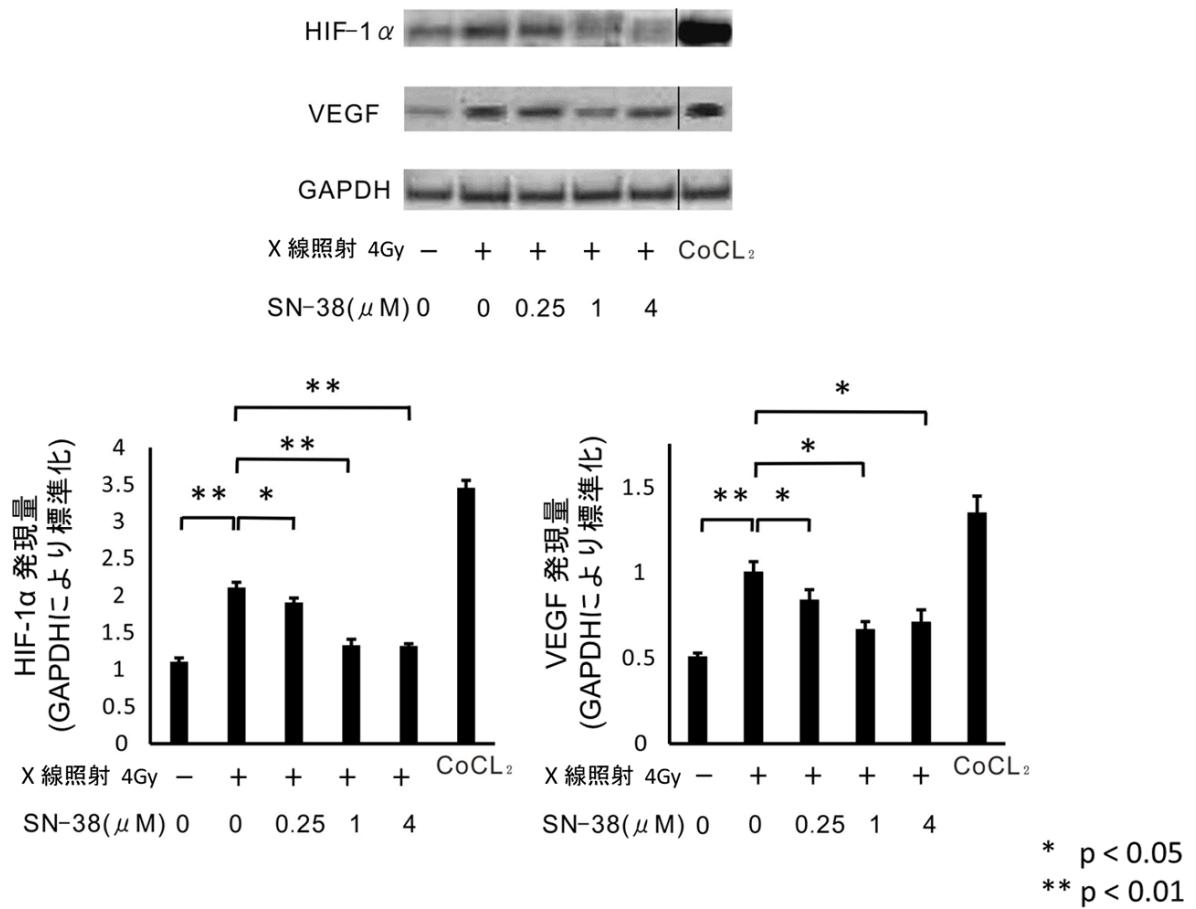


図 11 X線照射による Hypoxia-inducible factor (HIF) -1 α と Vascular endothelial growth factor (VEGF) の発現と、SN-38 によるその抑制。
HT29 細胞に対して 4 Gy の X線照射を行い、48 時間後の HIF-1 α と VEGF の発現をウェスタンブロッティングにより解析した。X線照射により HIF-1 α に加えて VEGF も発現した。さらに X線照射直後に 0.25-4 μ M の SN-38 を投与すると、HIF-1 α と VEGF の発現はともに抑制された。

SN-38 による X 線増感作用

X 線照射なし、または 4 Gy の X 線照射後の HT29 細胞を、各濃度の SN-38 (0, 0.125, 0.25, 0.5, 1, 2, 4 μ M) 投与下で 48 時間培養し、calcein-AM を用いた細胞増殖アッセイにより細胞数を測定して、SN-38 による X 線照射の効果の増強を解析した。結果として図 12 に示すように、0.25-2 μ M の SN-38 の投与は X 線照射による細胞増殖抑制効果を増強した。特に 1 μ M の SN-38 の投与により X 線照射の効果の増強を最も強く認め、コントロールと X 線照射の治療群間には細胞数に差を認めなかったが (コントロール vs. X 線照射 : 246 vs. 232)、両群に 1 μ M の SN-38 を加えると、SN-38 単独治療群にくらべて X 線照射と SN-38 の併用群では有意に細胞数が低下していた (SN-38 の投与 vs. X 線照射と SN-38 投与 : 136 vs. 86) (図 13)。以上から、SN-38 は X 線照射による細胞増殖抑制を増強する、つまり X 線増感剤として作用すると結論した。

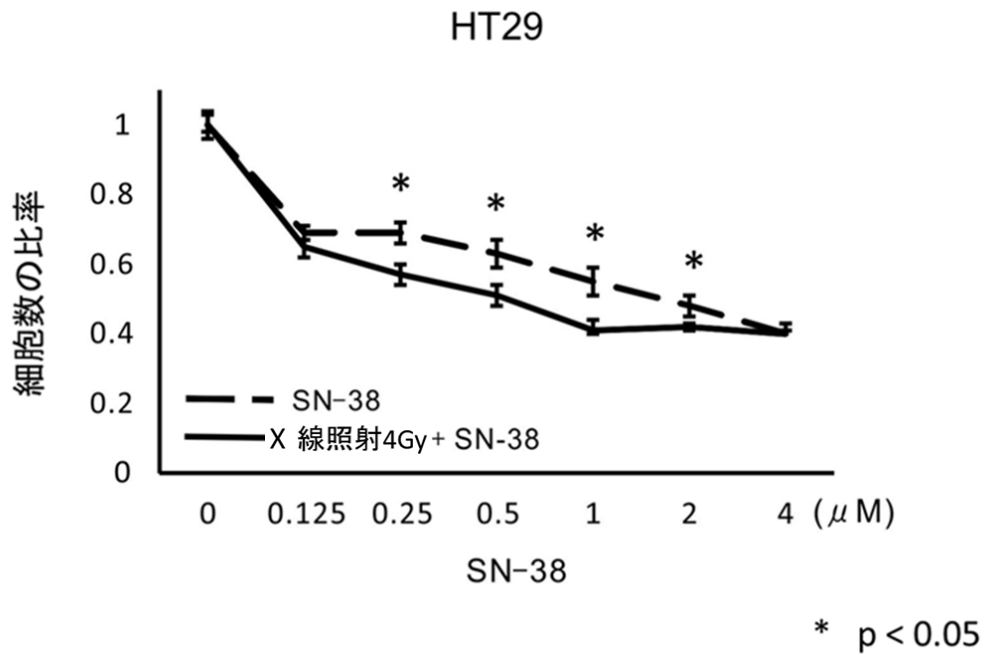


図 12 X 線照射と SN-38 の併用による細胞増殖抑制効果の増強。
 X 線照射なし (点線)、もしくは 4 Gy を照射 (実線) した HT29 細胞に、0-4 μM の SN-38 を投与し 48 時間培養した後の細胞数をカルセインアッセイにより評価した。SN-38 の投与を行っていない (0 μM) 両群の細胞数を 1 として、縦軸をその比率とした。0.25-2 μM の SN-38 の投与により、X 線照射群では X 線照射なしの群に比べて有意に細胞数が低下しており、SN-38 により X 線照射の細胞増殖抑制効果が増強されることが示された。

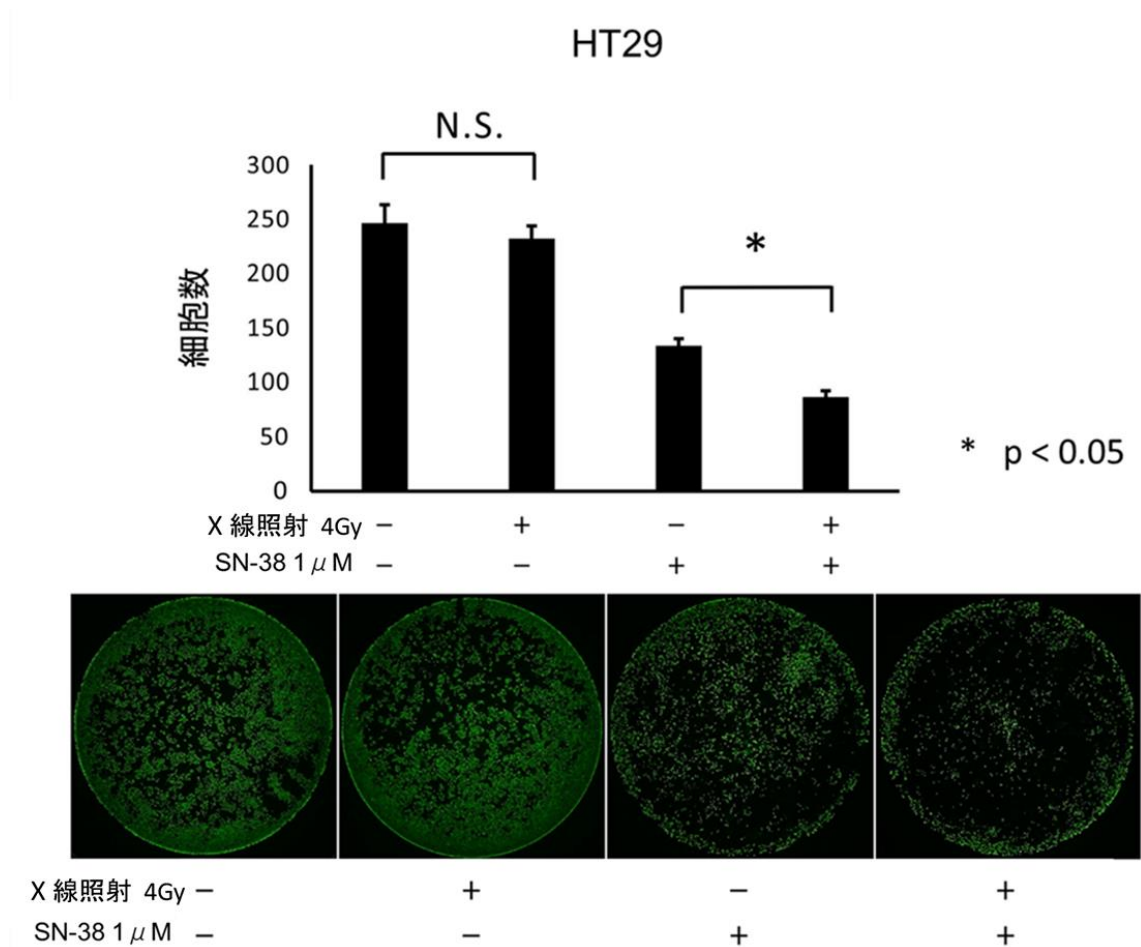


図 13 X線照射と SN-38 の併用による細胞増殖抑制効果の増強。
 HT29 細胞に対して無治療 (コントロール)、4 Gy の X 線照射、1 μM の SN-38 投与、X 線照射 (4 Gy) と SN-38 (1 μM) の併用を行い 48 時間培養した後の細胞数をカルセインアッセイにより評価した。コントロール群と X 線照射を行った群の細胞数に差は認めないが、両群に 1 μM の SN-38 を投与すると X 線照射を行った群で有意に細胞数が低下し、SN-38 による X 線照射の細胞増殖抑制効果の増強を認めた。下図は各治療群におけるカルセインアッセイの結果である。

SN-38 による X 線増感作用の機序 - アポトーシスに与える影響

SN-38 の X 線増感剤としての作用機序について、まずアポトーシスについて検討した。HT29 細胞に対してコントロール、4 Gy の X 線照射、1 μ M の SN-38 投与、X 線照射 (4 Gy) と SN-38 (1 μ M) の併用を行った 4 群について、それぞれのアポトーシス細胞 (Annexin V 陽性細胞) の割合を比較した。コントロールと X 線照射の群間には差を認めず (コントロール vs. X 線照射 : 1.7% vs. 1.1%)、さらに X 線照射に SN-38 を併用してもアポトーシス細胞の増加を認めなかった (X 線照射 vs. X 線照射と SN-38 の併用 : 1.1% vs. 2.9%) (図 14)。

また 4 群の治療を行った HT29 細胞をトリパンブルーにて染色し、死細胞の割合を測定したところ、X 線照射に SN-38 を併用しても死細胞数の増加は認めなかった (図 15)。

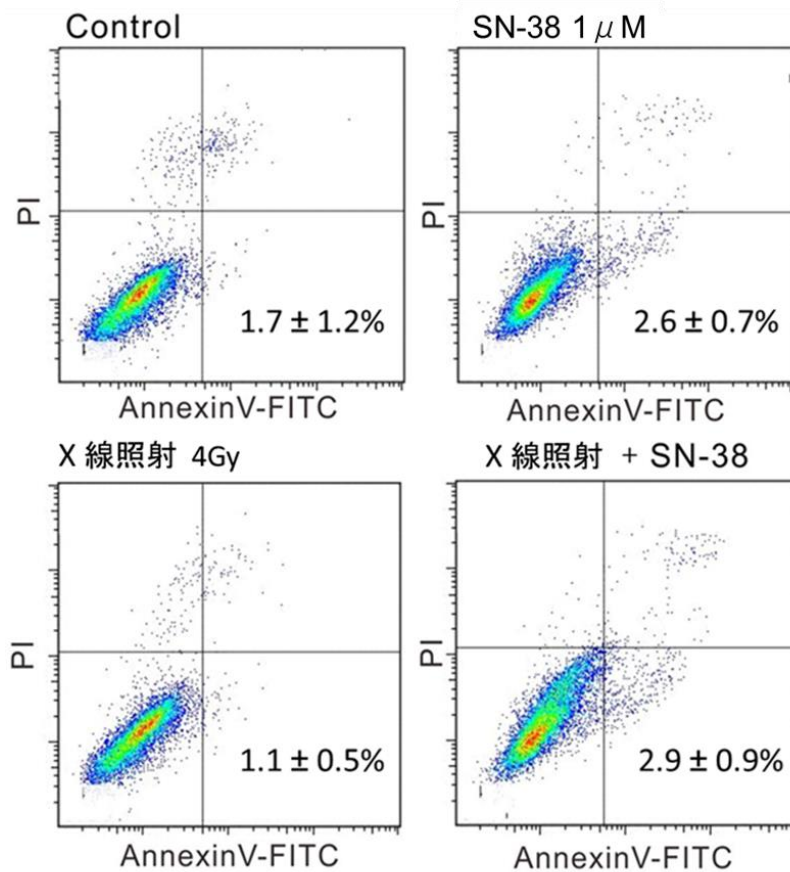


図 14 各治療群におけるアポトーシス細胞の割合。

HT29 細胞に対して無治療 (コントロール)、4 Gy の X 線照射、1 μM の SN-38 投与、X 線照射 (4 Gy) と SN-38 (1 μM) の併用を行い 48 時間培養し、アポトーシス細胞の割合を Annexin V/Propidium Iodide の 2 重染色によりフローサイトメトリーを用いて解析した。AnnexinV 陽性のアポトーシス細胞の割合は 4 群間で有意差を認めなかった。

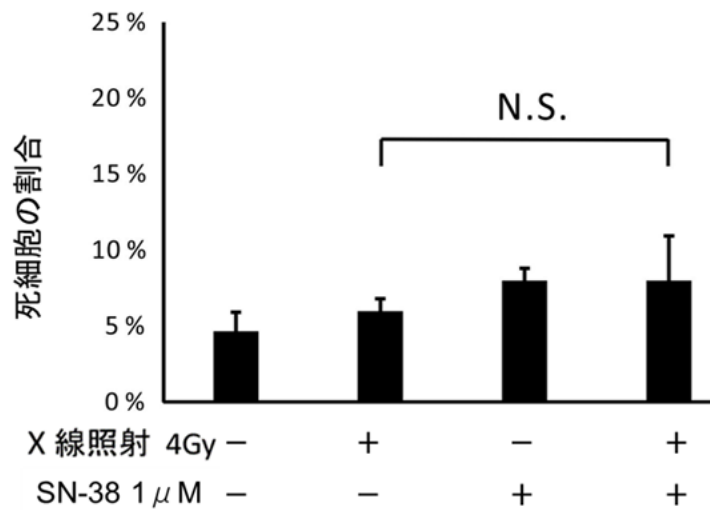


図 15 各治療群における死細胞の割合。

HT29 細胞に対して無治療 (コントロール)、4 Gy の X 線照射、1 μM の SN-38 投与、X 線照射 (4 Gy) と SN-38 (1 μM) の併用を行い 48 時間培養し、死細胞の割合をトリパンプルー染色により解析した。X 線照射に SN-38 の投与を併用しても、死細胞の割合は増加を認めなかった。

SN-38 による X 線増感作用の機序 – 細胞周期への影響

次いで細胞周期に与える影響を検討した (図 16)。HT29 細胞に対して 4 Gy の X 線照射を施行すると G0/G1 期 (コントロール vs. X 線照射 : 55.4% vs. 61.3%) と G2/M 期 (コントロール vs. X 線照射 : 7.2% vs. 12.3%) の細胞の増加を認めた。また 1 μ M の SN-38 投与下で 48 時間培養すると S 期と G2/M 期 (コントロール vs. SN-38 : 44.2% vs. 66.5%) における細胞の割合が増加した。そして X 線照射に SN-38 を併用すると S 期と G2/M 期 (コントロール vs. X 線照射と SN-38 の併用 : 44.2% vs. 71.4%) の細胞のさらなる増加を認め、その結果、細胞増殖期である G1 期の細胞の割合が減少した (コントロール vs. X 線照射と SN-38 の併用 : 55.4% vs. 24.3%) (表 1)。このことが、X 線照射と SN-38 の併用による細胞増殖抑制効果の増強の機序であると考えられた。

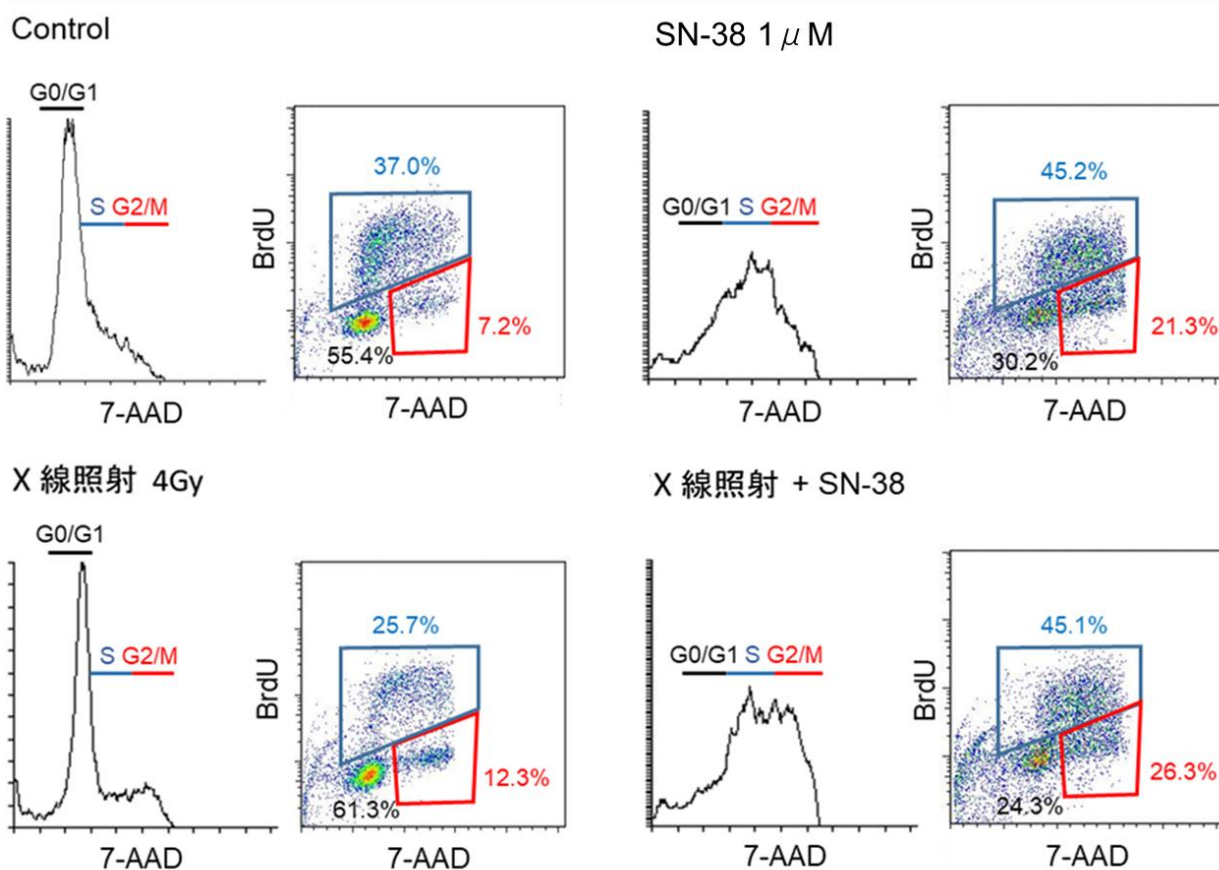


図 16 各治療群における細胞周期。

HT29 細胞に対して無治療 (コントロール)、4 Gy の X 線照射、1 μ M の SN-38 投与、X 線照射 (4 Gy) と SN-38 (1 μ M) の併用を行い 48 時間培養し、各群の細胞周期について FITC 標識 BrdU 細胞周期キットを用いてフローサイトメトリーにより解析した。X 線照射により G2/M 期 (赤線部)、SN-38 の投与により S 期 (青線部) と G2/M 期の細胞の割合の増加を認めた。そして X 線照射と SN-38 を併用することで S 期と G2/M 期の細胞の割合がより増加し、細胞の成長期である G0/G1 期 (黒線部) の細胞の減少を認めた。

表 1 各治療群における細胞周期

	Sub-G0/G1 期	G0/G1 期	S 期	G2/M 期
コントロール	0.4 ± 0.1	55.4 ± 2.1	37.0 ± 2.0	7.2 ± 0.2
X線照射 4 Gy	0.7 ± 0.2	61.3 ± 3.4	25.7 ± 2.1	12.3 ± 0.5
SN-38 1 μM	3.3 ± 1.0	30.2 ± 3.3	45.2 ± 2.9	21.3 ± 1.8
X線照射 + SN-38	4.1 ± 0.8	24.3 ± 1.8	45.1 ± 2.2	26.3 ± 2.2

1-4 考察

本研究では、まず、ヒト大腸癌細胞 (HT29, SW480) においても、X線照射により HIF-1 α が発現することを明らかにした。フローサイトメトリーとウェスタンブロッティングの両検討において、2-8 Gy の X線照射が、線量依存性に細胞内の HIF-1 α を発現させることを示した。さらに HIF-1 α 発現のタイミングについては、X線照射後 12 時間より発現量の増加を認め、24-48 時間で発現量はピークとなり、72 時間以降で発現量は照射前のレベルに戻ることを確認した。Moeller らも乳癌細胞 (4T1 細胞) において、X線照射から 48 時間後が HIF-1 α 発現量のピークとなることを報告している [48]。また、X線量については、頭頸部扁平上皮癌細胞や子宮内膜癌細胞に対しては 2-10 Gy の X線照射 [50, 51]、肺腺癌細胞に対しては 3-9 Gy の X線照射により HIF-1 α が発現したことが報告されている [55]。これらの報告は今回の実験結果と一致しており、大腸癌細胞においても X線照射により HIF-1 α が発現することが明らかとなった。

X線照射により発現した HIF-1 α は、血管新生やアポトーシス、細胞周期、糖代謝に影響することが乳癌細胞や肺小細胞癌細胞において報告されている [49, 56]。今回、大腸癌細胞においても、X線照射は HIF-1 α に加えて血管新生に重要な VEGF も発現させたことから、X線照射により発現する HIF-1 α は、低酸素環境下における作用と同じく細胞の生存や治療抵抗性に寄与するものと考えられた。さらに近年では HIF-1 α の発現が、細胞の X線抵抗性に与える影響について研究が行われている。Miguel らは HIF-1 α の活性化に伴う嫌気性代謝中のペントースリン酸経路の活性が、細胞内の Reactive oxygen species を除去し、X線抵抗性を高めることを報告した

[57]。以上から、X線照射により細胞内で発現した HIF-1 α は X線照射などの治療への抵抗性を高め、その HIF-1 α を抑制することで X線照射などの治療効果の改善に寄与すると考えられた。

そこで次に、CPT-11の活性代謝物である SN-38 が、X線照射により発現した HIF-1 α を抑制するか解析した。フローサイトメトリーによる解析では、X線照射により発現した HIF-1 α は、直後に SN-38 の投与を行うことで、容量依存性に抑制されることが明らかとなった。一方で、大腸癌治療におけるその他のキードラッグである 5-FU や Oxaliplatin を投与しても、X線照射により発現した HIF-1 α は抑制されなかった。当科では以前に、低酸素環境中で発現した HIF-1 α に対しても SN-38 が特異的に発現を抑制し、抗腫瘍効果を示したことを報告している [47]。また神経膠腫細胞においては、SN-38 が HIF-1 α mRNA の翻訳を阻害し、その下流のタンパク質である VEGF や Glucose transporter (GLUT) -1、Matrix metalloproteinase-2 の発現を抑制することが報告されている [58, 59]。今回の研究でもウェスタンブロッティングを用いて、SN-38 が X線照射により発現した HIF-1 α に加えて、その下流に存在する VEGF も抑制することを明らかにした。これらの結果から、SN-38 の投与は X線照射後の HIF-1 α のみならず、その下流のタンパク質の発現による効果も抑制すると考えられた。

最後に、SN-38 と X線照射の併用が細胞増殖に与える影響を HT29 細胞で検討した。今回の研究では、0.25-2 μ M の SN-38 を投与することで X線照射による細胞増殖抑制が増強される、つまり SN-38 が X線増感剤として作用することを明らかにした。そのなかでも 4 Gy の X線照射直後に 1 μ M の SN-38 を投与することで SN-38 による X線増感作用が最も強く認められた。これまで大腸癌細胞を用いた研究では

0.05-4 μM の濃度の SN-38 が抗腫瘍効果を示すことが報告されており [47, 60]、またこれらの濃度は実臨床において抗腫瘍効果を期待して CPT-11 を静脈内投与した際の血中濃度とおおむね一致している [61-63]。今回の研究では、同濃度の SN-38 を投与することで X 線増感作用も期待されることが明らかとなった。さらに SN-38 による X 線増感作用の機序について、無治療 (コントロール)、X 線照射 (4 Gy)、SN-38 (1 μM) の投与、X 線照射と SN-38 の投与を行い 48 時間培養した各群で、アポトーシスと細胞周期の変化をフローサイトメトリーにより測定した。まずアポトーシスについて解析したが、X 線照射に SN-38 を併用してもアポトーシス細胞の割合は増加しなかった。トリパンブルーによる染色でも、各群における死細胞の割合を測定したが、死細胞の増加は認められなかった。次いで細胞周期について解析した。X 線照射 48 時間後には G2/M 期 (コントロール vs. X 線照射 : 7.2% vs. 12.3%) の細胞が増加したが、これは G2/M 期の細胞周期停止が誘導されたことによると推測された。同様に SN-38 の投与は S 期と G2/M 期の細胞周期停止を誘導した (コントロール vs. SN-38 : 44.2% vs. 66.5%)。そして、X 線照射と SN-38 を併用することで、S 期と G2/M 期の細胞周期停止はさらに強く誘導され (コントロール vs. X 線照射と SN-38 併用 : 44.2% vs. 71.4%)、成長期である G1 期の細胞の割合が減少した (コントロール vs. X 線照射と SN-38 併用 : 55.4% vs. 24.3%)。以上から、大腸癌細胞において、SN-38 は S 期と G2/M 期の細胞周期停止を誘導することで、X 線増感剤として作用すると結論した。

近年、大腸癌細胞 (HCT116, SW480) において、Ubiquitin-conjugating enzyme E2 inhibitor が低酸素環境下で発現した HIF-1 α を抑制し X 線増感剤として作用すること、さらに RNA シークエンスにより、HIF-1 α を介し下流のタンパク質へ至る経路

が阻害されることが報告された [64]。また他癌種の細胞では、X線照射により発現した HIF-1 α を RNA 干渉やその他の薬剤により抑制したところ、今回の結果と同じく、G2/M 期の細胞周期停止が認められたことが報告されている [49, 55]。今回の研究では HIF-1 α の knock down などの手技を行っておらず、SN-38 が HIF-1 α を介さない経路で X 線増感剤として作用した可能性は否定できない。しかし、上記の報告からも、SN-38 が HIF-1 α を介する経路を抑制し、X 線増感剤として作用した可能性が高いと考えられた。

これまで大腸癌細胞に対する X 線増感剤について幾つか報告がなされているが、それらの薬剤が臨床に応用できるかは不明である [64-68]。一方で、SN-38 は大腸癌の治療に用いられる CPT-11 の活性代謝物であるため、CRT に併用する薬剤としても臨床応用に十分な期待がもてる。当科において、下部進行直腸癌 22 例に対して UFT/LV と CPT-11 を併用した術前 CRT の第 I、II 相臨床試験を行ったところ、pCR 率は 22.7% (5 例) と高い抗腫瘍効果を認め、5 年 RFS 率も 80.4% と良好であった。また有害事象は白血球減少を 50.0% (11 例)、下痢を 45.5% (10 例)、肛門痛を 31.8% (7 例)、好中球減少を 27.3% (6 例) に認めたものの、抗腫瘍効果を期待して CPT-11 を静脈内投与した場合の頻度と大きな差はなく、実臨床においては許容範囲内であると考えられた [23]。さらに術前 CRT においては、直腸癌は CRT 後にすぐに縮小することはあまりなく、癌細胞は細胞周期停止から線維化を経て、週単位の時間をかけて徐々に縮小し CRT の効果を示すことが知られている [69]。今回の研究は、SN-38 が細胞周期停止を介して X 線増感作用を示すことを明らかにした、はじめての基礎研究であり、当科の臨床試験において CPT-11 を併用した術前 CRT が高い抗腫瘍効果を示した事実を裏付ける結果であった。以上から、CPT-11 は術前 CRT に併

用する薬剤として候補たり得ると考えられた。

1-5 小括

SN-38 は X 線照射により発現した HIF-1 α を抑制し、大腸癌細胞において X 線増感剤として作用した。その機序は S 期と G2/M 期の細胞周期停止であることが示唆された。

第 2 章

直腸癌に対する術前化学放射線療法における

FDG-PET/CT volumetry による効果・予後予測能

2-1 背景と目的

直腸癌に対しては術前 CRT と外科的手術を中心とした集学的治療を行うが、CRT の効果は pCR から病理組織学的に効果が全く認められない場合まで、症例により大きく異なる。そこで、症例ごとにより適切な治療を行うことを目的として、手術前に CRT の効果や予後を予測するマーカーの探索が盛んである。これまで、従来の術前検査である直腸診や内視鏡検査、CT 検査では、pCR や予後を正確に予測することは困難であることが報告されている [70-73]。また magnetic resonance imaging (MRI) 検査による、直腸癌に対する術前 CRT の効果や腫瘍の悪性所見、予後についての診断能は近年盛んに研究されているが、pCR を正確に診断することは未だに困難である [74-78]。

そこで今回、細胞の代謝を SUV として反映して、癌細胞の遺残や悪性度など腫瘍の生物学的特性を反映し得る FDG-PET/CT 検査に着目した。これまで直腸癌に対する術前 CRT における報告では、CRT 前の FDG-PET/CT 検査における maximum standardized uptake value (SUVmax) は CRT の効果や予後と相関を認めないことが報告されている [79, 80]。一方で、CRT 中もしくは CRT 後の SUVmax は pCR と相関するという報告は多く認められる [81-83]。しかし SUVmax による予後の予測能については明らかでない。

このように、これまで FDG-PET/CT 検査による研究では、腫瘍内において最高の SUV の集積を示す単一のピクセルである SUVmax についての解析がなされてきた。しかし近年、頭頸部扁平上皮癌や非小細胞肺癌などの他癌種においては、腫瘍体積全体の SUV の総和を示す FDG-PET/CT volumetry が FDG-PET/CT 検査による RT の効果の診断能を向上させたことが報告されている [84, 85]。さらに直腸癌に対する術前 CRT における FDG-PET/CT volumetry についても、CRT の効果や予後の予測能について幾つか報告されているが、その予測能については未だ明らかになっていない [86-92]。そこで本研究では、一点のみの集積を示す SUVmax よりも FDG-PET/CT volumetry のほうが、より CRT の効果や予後を反映する可能性があると考え、それらの予測能について解析することとした。

以上から、直腸癌に対する術前 CRT 前後の FDG-PET/CT 検査において、① SUVmax に FDG-PET/CT volumetry を加えることで CRT の効果の予測能がより向上する、② FDG-PET/CT volumetry は予後を予測しうる、という仮説をたてて、FDG-PET/CT volumetry による CRT の効果や予後の予測能を検証することを目的とした。

2-2 対象と方法

症例

2005年1月から2015年12月まで、東京大学医学部附属病院大腸肛門外科にて進行下部直腸癌と診断され、術前CRTの後に根治的切除を施行された症例を対象とした。術前CRTの適応は、原発巣が腹膜反転部以下の直腸Rbにかかり、深達度がcT3以上である症例で、リンパ節転移の有無は問わない。治療前に遠隔転移を有した症例や、組織型が扁平上皮癌であった症例は研究対象から除外した。CRT前のFDG-PET/CT検査はCRT開始より4週前からCRT開始まで、CRT後のFDG-PET/CT検査はCRT終了から2-9週以内に施行された。CRTレジメンは、1.8 Gy/回の放射線照射を28回施行し合計50.4 Gy照射され、5-FUベースの化学療法を併用した。全症例に対して術前CRT終了後、5-15週の間に根治的な外科的手術が施行されている。またFDG-PET/CT検査は当院放射線科において、同一のPET-CTスキャナーを用いて行った症例のみを対象とした。

腫瘍の病期はTNM分類を用いて表記し [93]、術前CRTの組織学的効果判定は本邦の大腸癌取扱い規約第8版に基づきなされた (以下に効果判定基準を記載する)。

Grade 0 (無効) : 癌細胞に治療による変性、壊死などを認めない。

Grade 1 (軽度の効果)

Grade 1a (ごく軽度の効果) : 癌の約1/3未満で癌細胞の変性、壊死がある。

Grade 1b (軽度の効果) : 癌の1/3以上2/3未満で癌細胞の変性、壊死、融解がある。

Grade 2 (かなりの効果) : 癌の2/3以上で著明な変性、壊死、融解、消失がある。

Grade 3 (著効) : 癌全体がすべて壊死に陥っているか、または融解、消失した場合。

肉芽腫様組織あるいは線維化巣で置き換えられている。

術後サーベイランスも大腸癌治療ガイドラインに基づき、3 か月ごとの診察と腫瘍マーカーの測定、6 か月ごとの直腸診と CT 検査、12 か月ごとの内視鏡検査を行った [94]。

FDG-PET/CT 検査

FDG-PET/CT 検査は PET/CT スキャナー (Aquiduo、東芝メディカルシステム、小田原、日本) を用いて行った。2005 年から 2009 年までの間で、当院における以前の PET/CT スキャナーにより PET/CT 画像を得た症例は、スキャナーの相違により出力に差異がある可能性があるため除外した。全症例で、FDG-PET/CT 検査の 5 時間以上前から糖の摂取を禁止した。トレーサーとして 296 メガベクレルの ^{18}F -FDG を経静脈的に注射し、50 分後より PET/CT スキャナーを用いて撮影を開始した。2.5 分ごとに 1 スライスを撮影し、3 次元収集法で画像収集した。スライス厚は 4.3 mm であった。減弱補正は低線量 CT により行い、PET/CT 画像中の各ボクセルの集積値は、患者の体重 (グラム)、注射された放射線活性体量 (ベクレル/mL)、交差した校正因子 (ベクレル/分) により標準化し、比重を 1 g/mL とし、SUV として算出した。

PET/CT 画像の解析は 1 名の核医学放射線科医と 1 名の外科医により盲検的に行った。PET/CT 画像の横断面ごとに腫瘍の境界線を作成し、専用の画像解析ソフト (PMOD version 3.401、PMOD Technologies Ltd、Zurich、Switzerland) により、境界線内において設定した閾値 (SUV = 2、2.5、3、SUVmax の 50%) と同じかそれ以上の集積をしめす全ボクセルを合計し、volume of interest (VOI) を算出した (図 17) [95]。VOI における PET/CT 画像の各値は以下の通りに定義した。

- SUVmax : VOI における SUV の最高値
- Metabolic tumor volume (MTV) : VOI における全ボクセルの SUV の総和
- Total lesion glycolysis (TLG) : MTV に VOI における SUV の平均値をかけた積
- Δ (%) : $((\text{CRT 前の値} - \text{CRT 後の値}) / \text{CRT 前の値}) \times 100$

MTV は腫瘍体積の値で、TLG は腫瘍体積にさらに SUV など定量的な値をかけた積であるため、TLG のほうがより腫瘍の活性を反映しやすいと考えられている (図 18)。

核医学放射線科医と外科医の間で、算出された PET/CT の値 (SUVmax, MTV, TLG) にはわずかな差異を認めた。しかしその平均値より高い群、低い群の 2 群に分け、2 名の間での相関を解析したところ、すべての症例で群間の一致を認めた。

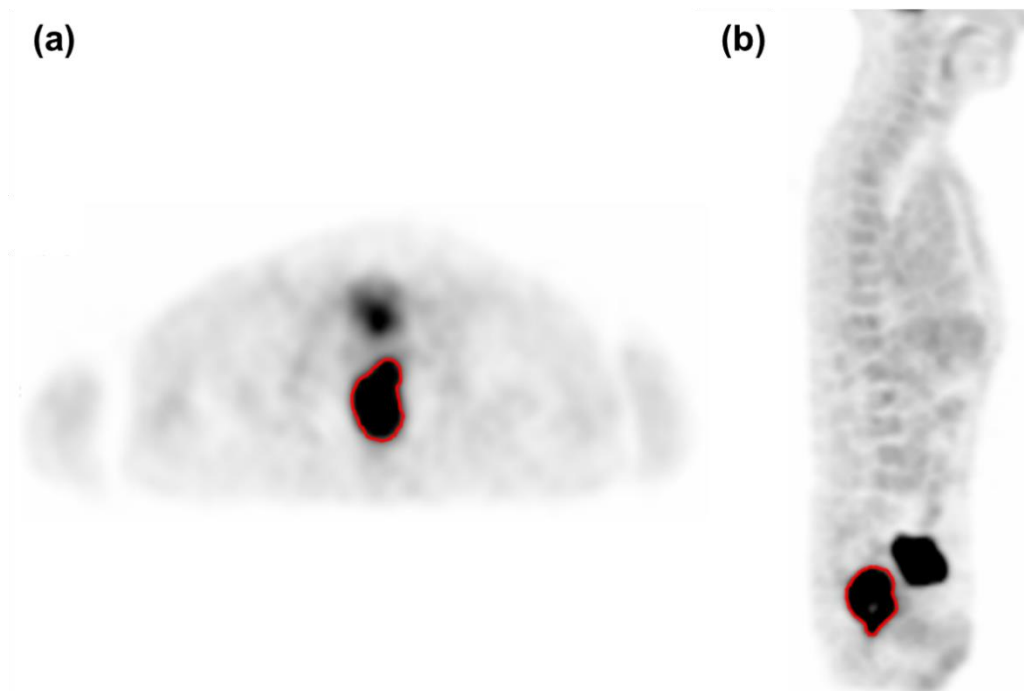


図 17 Volume of interest (VOI) を算出するための腫瘍境界線の作成 (文献 95 より引用)。

- (a) 腫瘍に対する画像のすべての横断面において、核医学放射線科医と外科医がそれぞれ腫瘍の境界線をトレースする (赤線)。
- (b) 画像解析ソフトが、境界線内で閾値 (standardized uptake value = 2.5) と同じかそれ以上の全ボクセルを解析し、腫瘍体積における VOI を算出する。

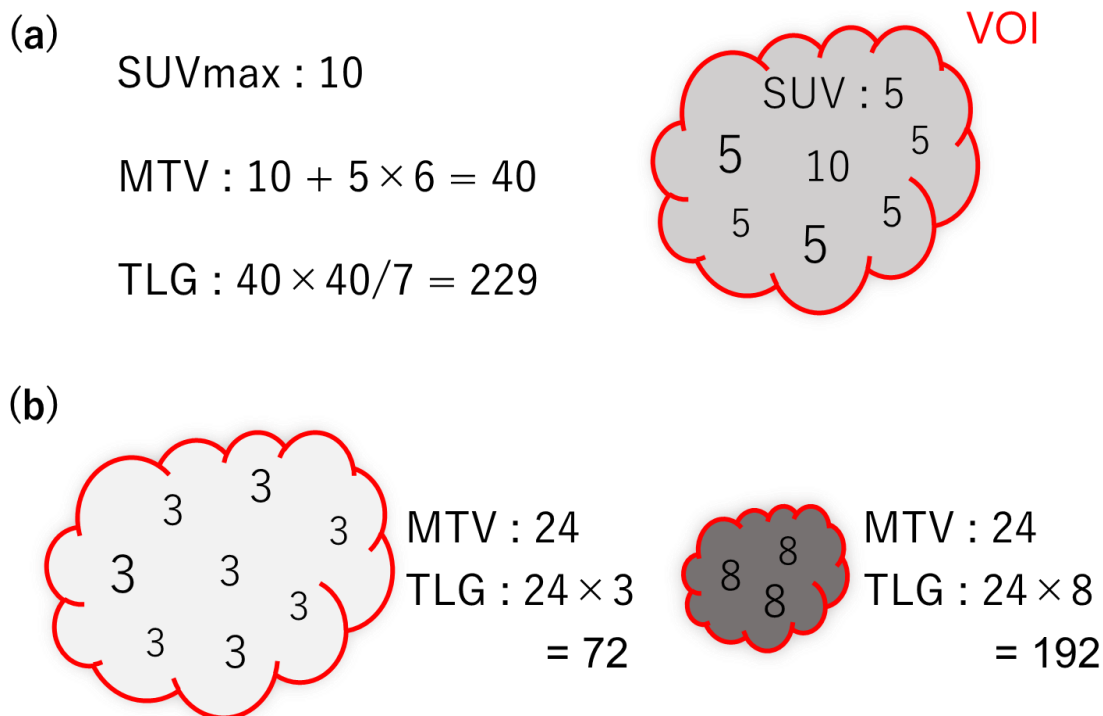


図 18 Volume of interest (VOI) における positron emission tomography (PET) /computed tomography (CT) の各値。

- (a) VOI (赤線内) において、maximum standardized uptake value (SUVmax) は単ボクセルの最高値である 10、Metabolic tumor volume (MTV) は VOI の全ボクセルの合計で 40、Total lesion glycolysis (TLG) は MTV にさらに VOI の standardized uptake value (SUV) の平均値をかけた 229 となる。
- (b) 左右の VOI における MTV はともに 24 であるが、TLG は右のような SUV の高い腫瘍でより高値となる。TLG は腫瘍の活性をより反映しやすいと考えられる。

統計学的解析

PET/CT の値 (SUVmax, MTV, TLG) と各臨床病理学的因子の間の相関は Student t 検定にて解析した。PET/CT のタイミングや VOI の閾値による pCR の診断能については Student t 検定と ANOVA 分散分析を用いて解析した。PET/CT の値と局所無再発生存期間、遠隔転移無再発生存期間、RFS、OS など予後との相関は Kaplan-Meier 曲線と Log-rank 検定を用いて解析した。多変量解析は Cox 比例ハザードモデルを用いて行い、単変量解析において p 値が 0.05 以下であった因子に対して行った。すべての解析は JMP 11 PRO ソフトウェア (SAS Institute、Cary、NC) を用いて行い、 p 値が 0.05 以下を統計学的に有意とした。

倫理

本研究は東京大学倫理委員会に審査番号 11109 「直腸癌術前化学放射線療法における FDG-PET の治療効果、予後予測因子としての有用性についての後ろ向き観察研究」として承認され、1975 年のヘルシンキ宣言の倫理基準に則って研究を行った。

2-3 結果

患者背景

本研究の適応を満たした症例は 91 例であった。pCR (ypT0N0) は 14 例 (15%) で認められ、54 例 (59.3%) では ypN0 と診断された。また外科的剥離断端 (Circumferential resection margin : CRM) 陽性は 4 例に認められた。CRT 後の TLG は、CRM 陰性群 (57.2 ± 97.3) に比べて CRM 陽性群 (144.0 ± 36.4) のほうが高値であったが、統計学的な有意差は認めなかった ($p = 0.13$)。

CRT 前の FDG-PET/CT 検査は 79 例、CRT 後の FDG-PET/CT 検査は 84 例で施行され、72 例で CRT 前後ともに施行された。CRT 前の SUVmax の平均値は 14.2、CRT 後の SUVmax の平均値は 4.8、 Δ SUVmax の平均値は 65.2%であった。MTV の CRT 前、後、 Δ の平均値は 62.0 mL、15.3 mL、75.3%であり、TLG の CRT 前、後、 Δ の平均値は 385.6、57.9、83.7%であった (表 2)。なお、図 19 に CRT 後の SUVmax、MTV、TLG の分布図を示した。

また CRT 後の FDG-PET/CT 検査は CRT 終了から 36 日目 (中央値、14-63 日) に施行され、外科的手術は CRT 終了から 62 日目 (中央値、35-105 日) に施行された。

表 2 患者背景 (文献 95 より改変して引用)

	症例数 (n = 91)
年齢 (歳) 中央値 (範囲)	63 (33–85)
性別 男性/女性	65 / 26
<u>臨床病期</u>	
cT3 / cT4	82 / 9
cN0 / cN1 / cN2	41 / 25 / 25
<u>病理組織学的病期</u>	
ypT0 / ypT1 / ypT2 / ypT3 / ypT4	14 / 4 / 13 / 55 / 5
ypN0 / ypN1 / ypN2	54 / 19 / 18
<u>術前 CRT に対する組織学的効果</u>	
pCR	14 (15%)
Grade 0 / 1a / 1b / 2 / 3	0 / 11 / 26 / 40 / 14
<u>病理組織学的所見</u>	
分化型腺癌 / その他の組織型	83 / 8
リンパ管侵襲 なし / あり	82 / 9
静脈侵襲 なし / あり	58 / 33
<u>外科的手術</u>	
低位前方切除術 / 括約筋間直腸切除術 / 腹会陰式直腸切断術 / ハルトマン手術 / 骨盤内臓全摘	45 / 27 / 16 / 2 / 1
<u>外科的剥離断端</u>	
陰性 / 陽性	87 / 4
<u>CRT の化学療法レジメン</u>	
UFT/LV / UFT/LV+CPT-11 / S-1+oxaliplatin	82 / 8 / 1
<u>PET/CT の値</u>	<u>平均値 ± 標準偏差</u>
CRT 前の SUVmax	14.2 ± 6.4
CRT 後の SUVmax	4.8 ± 2.8
ΔSUVmax (%)	65.2 ± 20.1
CRT 前の MTV (ml)	62.0 ± 46.2
CRT 後の MTV (ml)	15.3 ± 14.9
ΔMTV (%)	75.3 ± 23.4
CRT 前の TLG	385.6 ± 316.8
CRT 後の TLG	57.9 ± 55.2
ΔTLG (%)	83.3 ± 16.2

略語 : CRT, chemoradiotherapy; pCR, pathological complete response; LV, leucovorin; PET, positron emission tomography; CT, computed tomography; SUVmax, maximum standardized uptake value; MTV, metabolic tumor volume; TLG: total lesion glycolysis

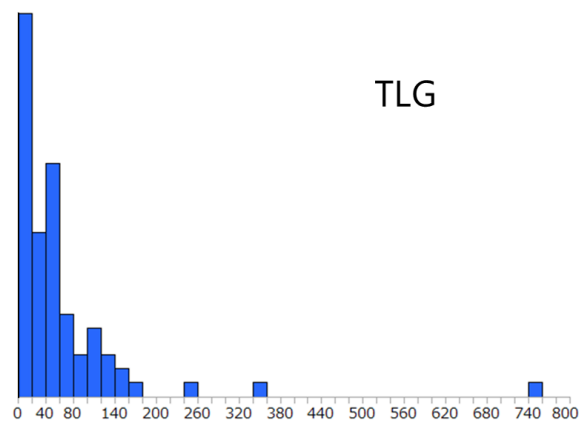
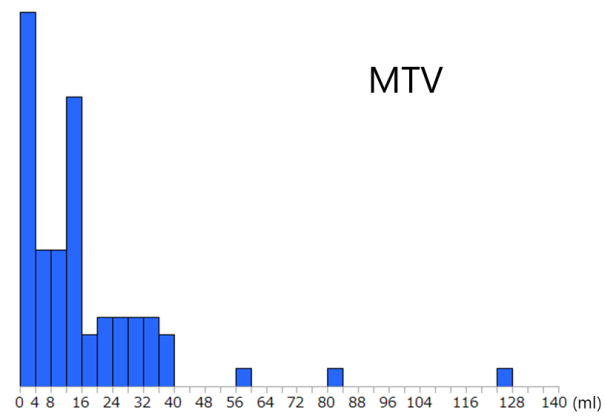
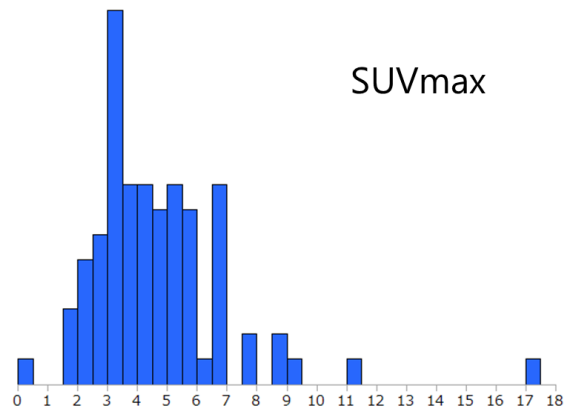


図 19 Chemoradiotherapy (CRT) 後の maximum standardized uptake value (SUVmax)、Metabolic tumor volume (MTV)、Total lesion glycolysis (TLG) の分布図。
 CRT 後の SUVmax の平均値は 4.8、CRT 後の MTV の平均値は 15.3 ml、CRT 後の TLG の平均値は 57.9 であった。

pCR、ypT、ypN の診断能

pCR とは、CRT 後の SUVmax (pCR vs. non-pCR : 3.1 vs. 4.7) と Δ SUVmax (pCR vs. non-pCR : 77.4% vs. 63.1%) が相関していたが、CRT 前の SUVmax は相関を認めなかった。一方で、FDG-PET/CT volumetry (MTV, TLG) は CRT 前後のいずれの値も pCR との相関を認めなかった (表 3)。

さらに Receiver-operating characteristics (ROC) 曲線により CRT 後の SUVmax による pCR 予測能について解析したところ、Area under curve (AUC) は 0.68 であり、カットオフ値は SUVmax = 4.0、感度は 78.6%、特異度は 60.0%であった (図 20)。

表 3 PET/CT の値による pCR の診断能 (文献 95 より引用)

		pCR vs. 非 pCR	p 値
SUVmax	CRT 前	13.8 vs. 14.1	0.91
	CRT 後	3.1 vs. 4.7	0.04
	Δ (%)	77.4 vs. 63.1	0.04
MTV (mL)	CRT 前	55.4 vs. 66.9	0.43
	CRT 後	10.5 vs. 17.4	0.22
	Δ (%)	80.1 vs. 75.0	0.49
TLG	CRT 前	335.1 vs. 395.9	0.59
	CRT 後	33.4 vs. 66.2	0.27
	Δ (%)	89.4 vs. 82.6	0.31

p 値 : Student *t* 検定

略語 : PET, positron emission tomography; CT, computed tomography;
 pCR, pathological complete response; SUVmax, maximum standardized
 uptake value; MTV, metabolic tumor volume; TLG, total lesion glycolysis;
 CRT, chemoradiotherapy

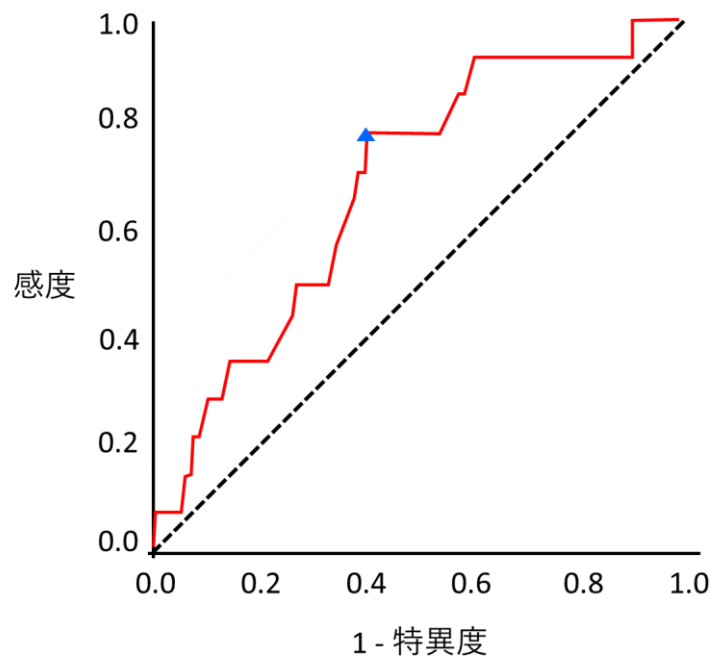


図 20 Chemoradiotherapy 後の maximum standardized uptake value (SUVmax) による pathological complete response (pCR) 予測の Receiver-operating characteristics (ROC) 曲線。
 SUV = 4.0 のカットオフ値 (▲) で、area under curve は 0.68、感度は 78.6%、特異度は 60.0%であった。

今回のコホートでは、CRT 終了から CRT 後の FDG-PET/CT 検査まで、また CRT 後の FDG-PET/CT 検査から外科的手術までの期間は症例により異なるため、我々はこれらの期間と CRT 後の TLG による pCR の診断能との関連についても解析した。結果として、いずれの期間においても、CRT 後の TLG は pCR と相関しなかった (表 4)。

表 4 CRT 後の FDG-PET/CT 検査のタイミングと TLG による pCR の診断能

	pCR	非 pCR	p 値
<u>CRT 終了から FDG-PET/CT までの期間</u>			
< 4 週 (n=10)	20.6 ± 18.6	53.4 ± 19.5	0.35
4-6 週 (n=55)	18.5 ± 7.7	59.3 ± 9.9	0.18
> 6 週 (n=19)	50.5 ± 22.3	94.9 ± 51.7	0.62
p 値	0.36	0.51	
<u>FDG-PET/CT から手術までの期間</u>			
< 4 週 (n=46)	43.7 ± 45.8	76.1 ± 20.9	0.52
4-6 週 (n=28)	18.7 ± 17.1	54.7 ± 13.7	0.21
> 6 週 (n=10)	7.4 ± 0	49.3 ± 17.3	0.47
p 値	0.44	0.67	

p 値 : Student *t* 検定、ANOVA 分散分析

略語 : CRT, chemoradiotherapy; FDG, fludeoxyglucose; PET, positron emission tomography; CT, computed tomography; TLG, total lesion glycolysis; pCR, pathological complete response

また今回の結果においては、 $SUV = 2.5$ という閾値により算出した FDG-PET/CT volumetry を用いたが、 $SUV = 2, 3, SUV_{max}$ の 50% の閾値により算出した FDG-PET/CT volumetry についても解析を行った。これらについても、いずれの閾値を用いても pCR との相関は認めなかった (表 5)。

以上から、pCR とは FDG-PET/CT volumetry よりも SUV_{max} のほうがより強く相関すると結論した。そこで次に、FDG-PET/CT volumetry は SUV_{max} に比べて、pCR 以外のどのような臨床病理学的因子と相関するのか解析することとした。

表 5 VOI の閾値ごとの TLG と pCR の相関

	pCR vs. 非 pCR	p 値
CRT 前の TLG の閾値		
SUV = 2.0	375.7 vs. 429.7	0.67
SUV = 2.5	335.1 vs. 395.9	0.59
SUV = 3.0	303.8 vs. 353.1	0.65
SUVmax の 50%	267.6 vs. 322.2	0.58
CRT 後の TLG の閾値		
SUV = 2.0	51.4 vs. 76.4	0.31
SUV = 2.5	33.4 vs. 66.2	0.27
SUV = 3.0	18.7 vs. 47.6	0.29
SUVmax の 50%	50.5 vs. 56.6	0.59

p 値 : Student *t* 検定

略語 : VOI, volume of interest; TLG, total lesion glycolysis;
 pCR, pathological complete response; CRT, chemoradiotherapy;
 SUV, standardized uptake value; SUVmax, maximum
 standardized uptake value

次いで、PET/CT の各値と ypT、ypN との相関について解析した。ypT とは CRT 後の SUVmax (T0-2 vs. T3-4 : 3.4 vs. 4.9) と Δ SUVmax (T0-2 vs. T3-4 : 74.0% vs. 60.9%)、CRT 後の MTV (T0-2 vs. T3-4 : 10.2 vs. 19.1)、CRT 後の TLG (T0-2 vs. T3-4 : 31.1 vs. 74.4) が相関していた。一方で、ypN については CRT 後の SUVmax は有意な相関を認めず、CRT 後の MTV (N0 vs. N1-2 : 11.3 vs. 20.8) と CRT 後の TLG (N0 vs. N1-2 : 37.9 vs. 81.6) が相関していた。また CRT 前の PET/CT の値は pCR、ypT、ypN のいずれとも相関を認めなかった (表 6)。

以上から、直腸癌に対する術前 CRT 後の FDG-PET/CT 検査において、SUVmax は pCR を、FDG-PET/CT volumetry は ypN を予測し得ると考えられた。

表 6 PET/CT の値と ypT、ypN の相関 (文献 95 より引用)

		ypT 因子 T0-2 vs. T3-4	p 値	ypN 因子 N0 vs. N1-2	p 値
SUVmax	CRT 前	13.8 vs. 14.0	0.87	13.8 vs. 13.9	0.96
	CRT 後	3.4 vs. 4.9	0.01	3.9 vs. 4.9	0.07
	Δ (%)	74.0 vs. 60.9	0.01	67.5 vs. 63.4	0.40
MTV (mL)	CRT 前	54.1 vs. 71.2	0.09	57.2 vs. 71.6	0.13
	CRT 後	10.2 vs. 19.1	0.04	11.3 vs. 20.8	0.02
	Δ (%)	80.4 vs. 73.8	0.31	78.2 vs. 74.0	0.49
TLG	CRT 前	308 vs. 468	0.12	311 vs. 444	0.07
	CRT 後	31.1 vs. 74.4	0.03	37.9 vs. 81.6	0.04
	Δ (%)	87.6 vs. 81.8	0.25	84.5 vs. 82.9	0.73

p 値 : Student *t* 検定

略語 : PET, positron emission tomography; CT, computed tomography; SUVmax, maximum standardized uptake value; CRT, chemoradiotherapy; MTV, metabolic tumor volume; TLG, total lesion glycolysis

次いで予後についての解析を行った。今回の解析では MTV と TLG とは非常に近似した結果を示したため、2 変数の相関を解析したところ、非常に強い相関関係を示すことが明らかとなった ($R = 0.970$ 、 $p < 0.001$ 、図 21)。予後については多変量解析を行うため、この 2 変数の多重共線性をさけるために、以後の解析では TLG を FDG-PET/CT volumetry の値として用いることとした。

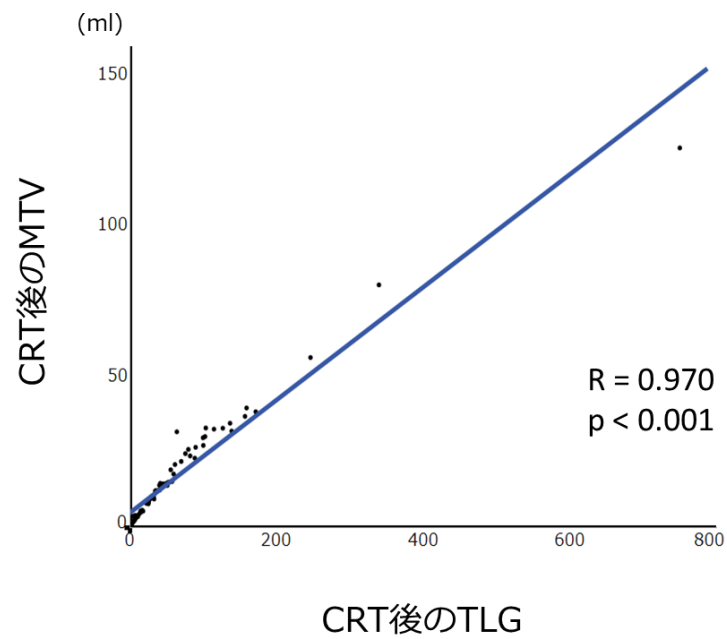


図 21 Metabolic tumor volume (MTV) と Total lesion glycolysis (TLG) の相関性 (文献 95 より改変して引用)。
MTV と TLG は統計学的に強く相関していた ($R = 0.970, p < 0.001$)。

予後との相関

PET/CT の値 (SUVmax, TLG) をそれぞれの平均値より高い群、低い群の 2 群にわけ、局所無再発生存、遠隔転移無再発生存、RFS、OS について単変量解析を行った。CRT 前の値はいずれも予後との相関を認めなかった。また CRT 後の SUVmax が高い群は局所無再発生存期間 ($p = 0.008$)、遠隔転移無再発生存率 ($p < 0.001$)、RFS ($p < 0.001$) がいずれも不良であったが、OS との相関は認めなかった。一方で、CRT 後の TLG の高い群では OS を含むいずれの予後とも不良な相関を認めた (局所無再発生存期間 : $p = 0.002$ 、遠隔転移無再発生存期間 : $p < 0.001$ 、RFS : $p < 0.001$ 、OS : $p = 0.02$) (表 7)。CRT 後の PET/CT の値 (SUVmax, TLG) と、予後 (RFS, OS) との生存曲線を図 22 に示す。

表 7 SUVmax、TLG と予後との単変量解析 (文献 95 より引用)

		局所無再発生存		遠隔転移無再発生存		RFS		OS	
		5年生存率 (%)	p 値	5年生存率 (%)	p 値	5年生存率 (%)	p 値	5年生存率 (%)	p 値
<u>SUVmax</u>									
CRT 前	高い (n = 35)	100	0.55	81.1	0.82	78.3	0.95	100	0.10
	低い (n = 44)	83.7		83.1		73.4		89.8	
CRT 後	高い (n = 32)	73.3	0.008	65.4	< 0.001	54.1	< 0.001	81.4	0.70
	低い (n = 52)	100		100		95.6		95.1	
Δ (%)	低い (n = 28)	80.2	0.02	72.3	0.04	54.1	0.002	87.3	0.06
	高い (n = 44)	100		91.5		91.5		100	
<u>TLG</u>									
CRT 前	高い (n = 35)	84.6	0.78	75.7	0.30	67.3	0.48	93.3	0.83
	低い (n = 44)	94.3		88.8		83.4		96.7	
CRT 後	高い (n = 32)	72.8	0.002	60.1	< 0.001	34.7	< 0.001	57.9	0.02
	低い (n = 52)	100		95.7		93.8		97.8	
Δ (%)	低い (n = 28)	74.9	0.10	74.4	0.07	48.9	0.004	94.1	0.66
	高い (n = 44)	94.7		88.4		88.4		94.7	

p 値 : Log-rank 検定

略語 : SUVmax, maximum standardized uptake value; TLG, total lesion glycolysis; RFS, relapse free survival; OS, overall survival; CRT, chemoradiotherapy

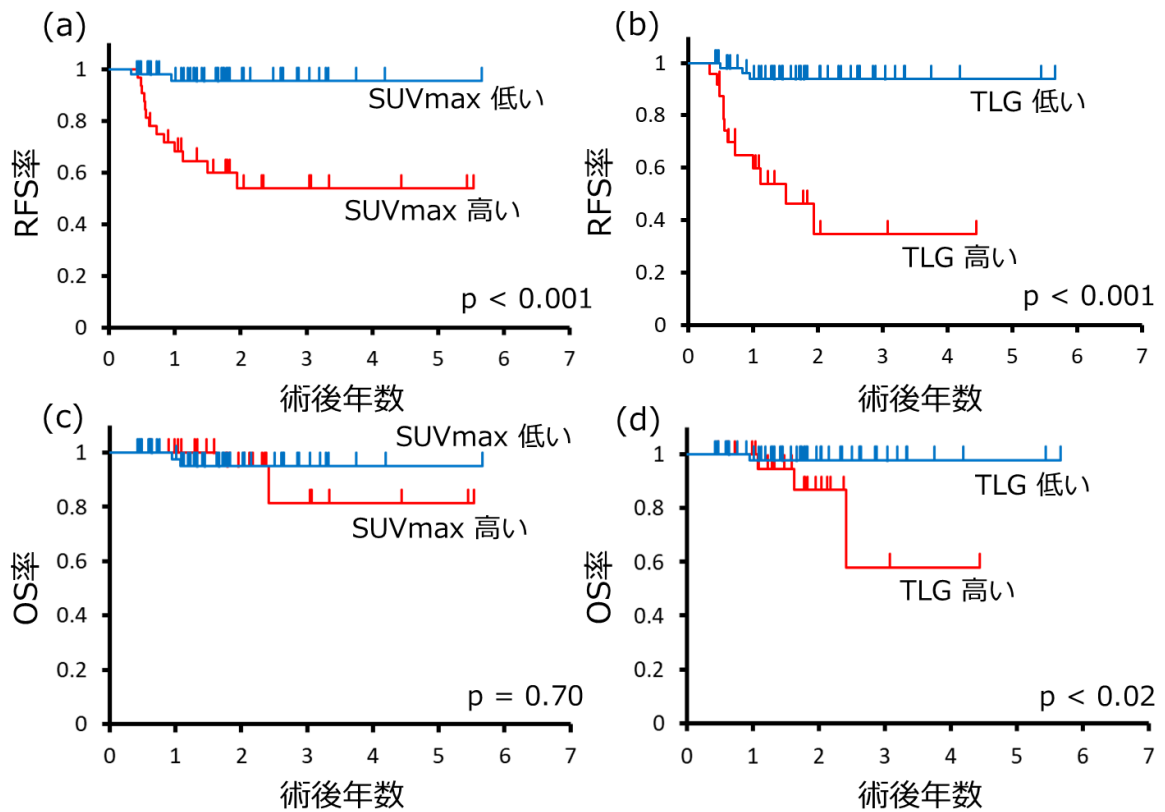


図 22 Chemoradiotherapy (CRT) 後の maximum standardized uptake value (SUVmax)、Total lesion glycolysis (TLG) と予後との Kaplan-Meier 曲線 (文献 95 より改変して引用)。

- (a) CRT 後の SUVmax (平均値より高い群、低い群) による relapse free survival (RFS) の Kaplan-Meier 曲線
- (b) CRT 後の Total lesion glycolysis (TLG) (平均値より高い群、低い群) による RFS の Kaplan-Meier 曲線
- (c) CRT 後の SUVmax による overall survival (OS) の Kaplan-Meier 曲線
- (d) CRT 後の TLG による OS の Kaplan-Meier 曲線

今回のコホートでは、術後のサーベイランス期間の中央値が 30.1 か月と比較的に短いために (10.1-107.4 か月)、この期間内に死亡した症例は 4 例であり、多変量解析を行うにはイベント数が少ないと考えられた。そのため、RFS に対してのみ多変量解析を行った。単変量解析の結果では、ypT (T0-2 vs. T3-4、 $p = 0.004$)、ypN (N0 vs. N1-2、 $p = 0.02$)、リンパ管侵襲 (ly (-) vs. ly (+)、 $p = 0.006$)、静脈侵襲 (v (-) vs. v (+)、 $p < 0.001$)、病理組織学的効果判定 (grade 2-3 vs. grade 0-1、 $p = 0.008$)、組織型 (分化型腺癌 vs. その他、 $p < 0.001$)、CRT 後の SUVmax (低い群 vs. 高い群、 $p < 0.001$)、CRT 後の TLG (低い群 vs. 高い群、 $p < 0.001$) が RFS を予測する因子として認められた。これらの因子に対して多変量解析を行うと、CRT 後の TLG 高値のみが不良な RFS を予測する独立因子として認められた (ハザード比 : 4.718、 $p = 0.04$) (表 8)。また、それぞれの閾値 (SUV = 2、2.5、3、SUVmax の 50%) を用いて TLG と RFS、OS との相関を解析したが、SUV = 2.5 の閾値を用いた場合が最も強く予後と相関していた (表 9)。

表 8 RFS についての多変量解析 (文献 95 より引用)

	RFS				
	単変量解析		多変量解析		
	5 年再発率 (%)	p 値	ハザード比	95% CI	p 値
年齢	< 60 歳	76.6	0.81		
	≥ 60 歳	77.2			
性別	男性	70.9	0.06		
	女性	90.7			
ypT 因子	T0-2	96.3	0.004	3.406	0.511–67.77
	T3, 4	65.3			
ypN 因子	N0	87.9	0.02	1.682	0.406–8.669
	N1, 2	63.7			
リンパ管侵襲	なし	80.9	0.006	2.647	0.757–10.72
	あり	41.7			
静脈侵襲	なし	90.2	< 0.001	1.748	0.525–6.588
	あり	54.3			
組織学的効果	Grade 2-3	88.0	0.008	1.411	0.333–5.258
	Grade 0-1	55.1			
組織型	分化型腺癌	81.0	< 0.001	3.001	0.754–10.38
	その他	33.3			
CRT 後の SUVmax	低い (n = 52)	95.6	< 0.001	4.306	0.781–34.58
	高い (n = 32)	54.1			
CRT 後の TLG	低い (n = 52)	93.8	< 0.001	4.718	1.049–28.82
	高い (n = 32)	34.7			

p 値 : Log-rank 検定、Cox 比例ハザードモデル

略語 : RFS, relapse free survival; CRT, chemoradiotherapy; SUVmax, maximum standardized uptake value; TLG, total lesion glycolysis

表 9 VOI の閾値ごとの TLG と予後との相関

	RFS		OS	
	ハザード比 (95% CI)	p 値	ハザード比 (95% CI)	p 値
CRT 前の TLG の閾値				
SUV = 2.0	1.883 (0.589-6.023)	0.28	1.694 (0.067-42.81)	0.71
SUV = 2.5	1.504 (0.469-4.822)	0.48	1.345 (0.053-34.01)	0.83
SUV = 3.0	1.695 (0.529-5.426)	0.36	1.519 (0.060-38.39)	0.77
SUVmax の 50%	1.371 (0.445-5.080)	0.59	1.936(0.076-49.21)	0.64
CRT 後の TLG の閾値				
SUV = 2.0	7.435 (2.640-23.88)	<0.001	1.979 (0.259-12.07)	0.47
SUV = 2.5	12.62 (3.985-55.62)	<0.001	8.695 (1.083-178.5)	0.02
SUV = 3.0	7.515 (2.567-27.14)	<0.001	3.362 (0.553-25.68)	0.19
SUVmax の 50%	7.686 (2.435-33.78)	<0.001	6.055 (0.895-118.4)	0.07

p 値 : Log-rank 検定

略語 : VOI, volume of interest; TLG, total lesion glycolysis; RFS, relapse free survival; OS, overall survival; CRT, chemoradiotherapy; SUV, standardized uptake value; SUVmax, maximum standardized uptake value

2-4 考察

これまで直腸癌に対する術前 CRT における FDG-PET/CT volumetry についての報告は7つある [86-92]。CRT 前の FDG-PET/CT volumetry の評価は7つすべてで行われており、CRT 後の FDG-PET/CT volumetry については5つで解析されている。そのうち3つの報告では CRT 後の FDG-PET/CT volumetry による術前 CRT の病理組織学的効果の予測能が解析されているが、予測できたとする報告とできなかったとする報告があり、結論はでていない [87, 88, 90]。今回の研究では、CRT 前の PET/CT の値は術前 CRT による病理組織学的効果とは相関を認めず、既報告と一致する結果であった [87-89]。一方で、CRT 後の MTV や TLG も pCR との相関を認めなかったが、CRT 後の SUVmax と pCR は有意な相関を認めた ($p = 0.04$)。しかしながら、今回のコホートにおける、CRT 後の SUVmax による pCR 予測の AUC は 0.68 と低く、感度と特異度も 78.6% と 60.0% にしか至らなかった。以上から、FDG-PET/CT 検査において、SUVmax に FDG-PET/CT volumetry を加えても pCR の予測能は向上せず、実臨床において FDG-PET/CT 検査は直腸癌に対する術前 CRT による pCR の診断に有用ではないと結論した。

次に、FDG-PET/CT volumetry と予後との相関について解析した。これまで直腸癌に対する術前 CRT 前後の FDG-PET/CT volumetry の予後予測能について検討した報告にならい、今回の研究においても SUVmax、MTV、TLG のそれぞれの平均値をカットオフ値として用いた [89, 90]。CRT 前の FDG-PET/CT volumetry と予後との相関を解析している4つの報告のうち、3つでは CRT 前

の FDG-PET/CT volumetry と RFS、OS の相関を解析している [86, 89, 90]。そのうち 2 つの報告では CRT 後の FDG-PET/CT volumetry と予後との相関についても解析している。1 つの報告では CRT 後の MTV、TLG が RFS、OS を予測しうることを報告し [86]、もう 1 つの報告では癌特異的生存率と相関が認められなかったと報告している [90]。今回の研究では、CRT 前の PET/CT の値はいずれも予後との相関を認めなかったが、CRT 後の値は RFS、OS と強い相関を認めた。特に CRT 後の TLG 高値は、多変量解析により不良な RFS を予測する独立因子として認められ、5 年再発率が 65%、5 年死亡率が 42% と極めて不良な予後と相関していた。一方で、CRT 後の TLG が低い群の 5 年再発率は 6%、5 年死亡率は 2% と極めて予後良好であった。これらの結果から CRT 後の TLG は術前 CRT を施行した直腸癌患者において、予後を予測するための有望なマーカーであると結論した。本研究の結果と同様に、Kim らも CRT 後の TLG 高値が術前 CRT を施行した直腸癌患者の予後を予測する独立因子であることを報告している [86]。このような結果から、直腸癌患者の予後の予測には術前 CRT 後の FDG-PET/CT volumetry が有用であると考えられた。

今回、FDG-PET/CT volumetry を算出するにあたって、VOI を計算するために用いる PET/CT 画像の境界線の閾値を $SUV = 2.5$ とした。これまでの直腸癌における FDG-PET/CT volumetry の報告においては、絶対値として 2.0-3.0 の SUV や [86-88]、 SUV_{max} の 50% といった相対値が用いられている [89-92]。今回の研究では、 $SUV = 2$ 、2.5、3 という絶対値と SUV_{max} の 50% という相対値によりそれぞれ解析を行い、 $SUV = 2.5$ という閾値が CT 画像における腫瘍の視覚的な境界線とも、また予後とも最も良く相関することを示した。なお今回のコホ

ートにおいては、SUV = 2、2.5、3.0 という閾値は、CRT 後の SUVmax における 47.6%、59.5%、71.4% と一致していた。

今回の研究では、CRT 後の TLG が高い群では、5 年の局所再発率は 27%、遠隔転移再発率は 40% と高率に再発をきたしやすいことが明らかとなった。これまでいくつかの基礎研究において、FDG-PET の集積は、HIF-1 α の下流に存在する Glut-1 の発現、新生血管の増生、細胞増殖能の亢進など、癌の悪性度と相関すると報告されている [96-98]。また大腸癌において、SUVmax の高値は GLUT-1、Ki-67、p53 変異の活性亢進と相関することも報告されている [99]。さらに TLG などの FDG-PET/CT volumetry は、SUVmax が VOI において FDG-PET の集積が最も高い単ピクセルの値を示すのに対して、腫瘍全体の体積と活性を示すと考えられているため、SUVmax よりも腫瘍の悪性度を反映しやすいことが報告されている [100, 101]。そのため、今回の研究でも、CRT 後の TLG の高い腫瘍は高い悪性度を示し、局所再発、遠隔再発ともに高率に認められたのだと考えられた。これまで術前 CRT を施行した直腸癌においては、術前 CRT の効果の乏しい症例や ypN stage の高い症例が予後不良因子であることが報告されてきたが [6, 9, 102]、これらは手術後の病理組織検体により診断され、術前に予後を予測することは困難であった。CRT 後の FDG-PET/CT volumetry により、手術前に症例ごとの予後を予測できれば、CRT から手術までの間に地固め化学療法を追加する、また術後補助化学療法や術後サーベイランスを検討することで、直腸癌患者の予後の改善に寄与すると考えられた。

本研究にはいくつかの limitation がある。1 つは後方視的研究であるため、FDG-PET/CT 検査の撮影のタイミングが症例により異なることが、結果に与え

る影響を否定しきれないことである。CRT 後の FDG-PET/CT 検査の適切なタイミングについては我々の施設でも解析を行っているが [103]、今後は FDG-PET/CT 検査の撮影のタイミングを決めて、前方視的な研究を行うことが望ましい。次に、 $SUV = 2.5$ という PET/CT 画像の閾値と、 SUV_{max} や TLG のカットオフ値にその平均値を用いたことである。これについては施設ごとに用いられている PET/CT スキャナーにより FDG-PET の集積値に差があるため、今後はより標準的な閾値やカットオフ値を解析していくことが必要である。最後に、本研究を含めて、これまで直腸癌に対する術前 CRT 後の FDG-PET/CT volumetry による予後予測能について解析した報告はわずかであるため、今後は多施設において、症例数の多い研究を行うことが必要と考えられる。

2-5 小括

直腸癌に対する術前 CRT 後の FDG-PET/CT 検査で、FDG-PET/CT volumetry が高値の症例では RFS や OS が不良であり、CRT 後の TLG は独立した予後予測因子である。

結論

本研究では、直腸癌に対する術前 CRT における CPT-11 の効果と、FDG-PET/CT volumetry による CRT の効果と予後の予測能の検索を目的として、基礎研究と後方視的観察研究を行い、以下の結果を得た。

1. CPT-11 の活性代謝物である SN-38 は X 線照射により発現した HIF-1 α を抑制し、大腸癌細胞において X 線増感剤として作用した。その機序は S 期と G2/M 期の細胞周期停止であることが示唆された。
2. 直腸癌患者において、術前 CRT 後の FDG-PET/CT volumetry の高値は、不良な RFS や OS を予測する独立した因子であった。

以上より、CPT-11 は直腸癌に対する術前 CRT に併用する薬剤として候補たり得る、また FDG-PET/CT volumetry は直腸癌患者の予後の予測に有用な可能性があると考えられた。

謝辞

本研究を進めるにあたり、東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学・血管外科学 石原聡一郎教授、故渡邊聡明前教授には研究全般にわたり御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝致します。東京大学大学院 医学系研究科 外科学専攻 臓器病態外科学講座 腫瘍外科学 川合一茂講師には、具体的な実験方法、データの解釈、研究の進め方、論文の作成など、研究全般にわたり詳細かつ多大なる御指導・御鞭撻を賜り、深く感謝致します。東京大学医学部附属病院 放射線科 百瀬敏光先生、高橋美和子先生、古山桂太郎先生にはデータの解析につき御指導を頂き、深く感謝致します。

また、実際の実験に際しましては、多くの先生方に多大なる御協力を頂きました。ここに深甚なる謝意を表します。

引用文献

- [1] L.A. Torre, F. Bray, R.L. Siegel, J. Ferlay, J. Lortet-Tieulent, A. Jemal. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 65: 87-108. 2015.
- [2] R.L. Siegel, K.D. Miller, S.A. Fedewa, D.J. Ahnen, R.G. Meester, A. Barzi, A. Jemal. Colorectal cancer statistics, 2017. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2017.
- [3] R.J. Heald, E.M. Husband, R.D. Ryall. The mesorectum in rectal cancer surgery--the clue to pelvic recurrence? *The British journal of surgery*. 69: 613-616. 1982.
- [4] R.J. Heald. The 'Holy Plane' of rectal surgery. *Journal of the Royal Society of Medicine*. 81: 503-508. 1988.
- [5] W.E. Enker, H.T. Thaler, M.L. Cranor, T. Polyak. Total mesorectal excision in the operative treatment of carcinoma of the rectum. *Journal of the American College of Surgeons*. 181: 335-346. 1995.
- [6] C. Rodel, P. Martus, T. Papadopoulos, L. Fuzesi, M. Klimpfinger, R. Fietkau, T. Liersch, W. Hohenberger, R. Raab, R. Sauer, C. Wittekind. Prognostic significance of tumor regression after preoperative chemoradiotherapy for rectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23: 8688-8696. 2005.
- [7] M. Maas, P.J. Nelemans, V. Valentini, P. Das, C. Rodel, L.J. Kuo, F.A. Calvo, J. Garcia-Aguilar, R. Glynne-Jones, K. Haustermans, M. Mohiuddin, S. Pucciarelli, W. Small, Jr., J. Suarez, G. Theodoropoulos, S. Biondo, R.G. Beets-Tan, G.L. Beets. Long-term outcome in patients with a pathological complete response after chemoradiation for rectal cancer: a pooled analysis of individual patient data. *The Lancet. Oncology*. 11: 835-844. 2010.

- [8] L.F. de Campos-Lobato, L. Stocchi, A. da Luz Moreira, D. Geisler, D.W. Dietz, I.C. Lavery, V.W. Fazio, M.F. Kalady. Pathologic complete response after neoadjuvant treatment for rectal cancer decreases distant recurrence and could eradicate local recurrence. *Ann Surg Oncol*. 18: 1590-1598. 2011.
- [9] V. Valentini, C. Coco, A. Picciocchi, A.G. Morganti, L. Trodella, A. Ciabattini, F. Cellini, B. Barbaro, S. Cogliandolo, G. Nuzzo, G.B. Doglietto, F. Ambesi-Impiombato, M. Cosimelli. Does downstaging predict improved outcome after preoperative chemoradiation for extraperitoneal locally advanced rectal cancer? A long-term analysis of 165 patients. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 53: 664-674. 2002.
- [10] B. Cedermark, M. Dahlberg, B. Glimelius, L. Pahlman, L.E. Rutqvist, N. Wilking. Improved survival with preoperative radiotherapy in resectable rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 336: 980-987. 1997.
- [11] J. Folkesson, H. Birgisson, L. Pahlman, B. Cedermark, B. Glimelius, U. Gunnarsson. Swedish Rectal Cancer Trial: long lasting benefits from radiotherapy on survival and local recurrence rate. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23: 5644-5650. 2005.
- [12] E. Kapiteijn, C.A. Marijnen, I.D. Nagtegaal, H. Putter, W.H. Steup, T. Wiggers, H.J. Rutten, L. Pahlman, B. Glimelius, J.H. van Krieken, J.W. Leer, C.J. van de Velde. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 345: 638-646. 2001.
- [13] W. van Gijn, C.A. Marijnen, I.D. Nagtegaal, E.M. Kranenbarg, H. Putter, T. Wiggers, H.J. Rutten, L. Pahlman, B. Glimelius, C.J. van de Velde. Preoperative radiotherapy combined with total mesorectal excision for resectable rectal cancer: 12-

year follow-up of the multicentre, randomised controlled TME trial. *The Lancet*.

Oncology. 12: 575-582. 2011.

[14] J.P. Gerard, T. Conroy, F. Bonnetain, O. Bouche, O. Chapet, M.T. Closon-Dejardin, M. Untereiner, B. Leduc, E. Francois, J. Maurel, J.F. Seitz, B. Buecher, R. Mackiewicz, M. Ducreux, L. Bedenne. Preoperative radiotherapy with or without concurrent fluorouracil and leucovorin in T3-4 rectal cancers: results of FFCD 9203. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 24: 4620-4625. 2006.

[15] J.F. Bosset, L. Collette, G. Calais, L. Mineur, P. Maingon, L. Radosevic-Jelic, A. Daban, E. Bardet, A. Beny, J.C. Ollier. Chemotherapy with preoperative radiotherapy in rectal cancer. *The New England journal of medicine*. 355: 1114-1123. 2006.

[16] A.B. Benson, 3rd, A.P. Venook, T. Bekaii-Saab, E. Chan, Y.J. Chen, H.S. Cooper, P.F. Engstrom, P.C. Enzinger, M.J. Fenton, C.S. Fuchs, J.L. Grem, A. Grothey, H.S. Hochster, S. Hunt, A. Kamel, N. Kirilcuk, L.A. Leong, E. Lin, W.A. Messersmith, M.F. Mulcahy, J.D. Murphy, S. Nurkin, E. Rohren, D.P. Ryan, L. Saltz, S. Sharma, D. Shibata, J.M. Skibber, C.T. Sofocleous, E.M. Stoffel, E. Stotsky-Himelfarb, C.G. Willett, K.M. Gregory, D. Freedman-Cass. Rectal Cancer, Version 2.2015. *Journal of the National Comprehensive Cancer Network : JNCCN*. 13: 719-728; quiz 728. 2015.

[17] S.Y. Ngan, B. Burmeister, R.J. Fisher, M. Solomon, D. Goldstein, D. Joseph, S.P. Ackland, D. Schache, B. McClure, S.A. McLachlan, J. McKendrick, T. Leong, C. Hartoepanu, J. Zalberg, J. Mackay. Randomized trial of short-course radiotherapy versus long-course chemoradiation comparing rates of local recurrence in patients with T3 rectal cancer: Trans-Tasman Radiation Oncology Group trial 01.04. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 30:

3827-3833. 2012.

[18] C. Aschele, L. Cionini, S. Lonardi, C. Pinto, S. Cordio, G. Rosati, S. Artale, A. Tagliagambe, G. Ambrosini, P. Rosetti, A. Bonetti, M.E. Negru, M.C. Tronconi, G. Luppi, G. Silvano, D.C. Corsi, A.M. Bochicchio, G. Chiaulon, M. Gallo, L. Boni. Primary tumor response to preoperative chemoradiation with or without oxaliplatin in locally advanced rectal cancer: pathologic results of the STAR-01 randomized phase III trial. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29: 2773-2780. 2011.

[19] J.P. Gerard, D. Azria, S. Gourgou-Bourgade, I. Martel-Lafay, C. Hennequin, P.L. Etienne, V. Vendrely, E. Francois, G. de La Roche, O. Bouche, X. Mirabel, B. Denis, L. Mineur, J.F. Berdah, M.A. Mahe, Y. Becouarn, O. Dupuis, G. Lledo, J.F. Seitz, L. Bedenne, B. Juzyna, T. Conroy. Clinical outcome of the ACCORD 12/0405 PRODIGE 2 randomized trial in rectal cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 30: 4558-4565. 2012.

[20] C. Rodel, U. Graeven, R. Fietkau, W. Hohenberger, T. Hothorn, D. Arnold, R.D. Hofheinz, M. Ghadimi, H.A. Wolff, M. Lang-Welzenbach, H.R. Raab, C. Wittekind, P. Strobel, L. Staib, M. Wilhelm, G.G. Grabenbauer, H. Hoffmanns, F. Lindemann, A. Schlenska-Lange, G. Folprecht, R. Sauer, T. Liersch. Oxaliplatin added to fluorouracil-based preoperative chemoradiotherapy and postoperative chemotherapy of locally advanced rectal cancer (the German CAO/ARO/AIO-04 study): final results of the multicentre, open-label, randomised, phase 3 trial. *The Lancet. Oncology*. 16: 979-989. 2015.

[21] T. Sato, H. Ozawa, K. Hatate, W. Onosato, M. Naito, T. Nakamura, A. Ihara, W. Koizumi, K. Hayakawa, I. Okayasu, K. Yamashita, M. Watanabe. A Phase II trial of

neoadjuvant preoperative chemoradiotherapy with S-1 plus irinotecan and radiation in patients with locally advanced rectal cancer: clinical feasibility and response rate.

International journal of radiation oncology, biology, physics. 79: 677-683. 2011.

[22] T. Sato, K. Hayakawa, N. Tomita, M. Noda, N. Kamikonya, T. Watanabe, D. Kato, Y. Sakai, M. Hiraoka, M. Shimada, H. Ikushima, H. Baba, N. Oya, M. Oya, K. Nemoto-Murofushi, M. Takeuchi, M. Watanabe. A multicenter phase I study of preoperative chemoradiotherapy with S-1 and irinotecan for locally advanced lower rectal cancer (SAMRAI-1). *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology.* 120: 222-227. 2016.

[23] K. Kawai, E. Sunami, K. Hata, T. Tanaka, T. Nishikawa, K. Otani, K. Sasaki, H. Nozawa. Phase I/II Study of Preoperative Chemoradiotherapy With TEGAFIRI for Locally Advanced Rectal Cancer. *Clinical colorectal cancer.* 2018.

[24] A. Habr-Gama, R.O. Perez. Non-operative management of rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation. *The British journal of surgery.* 96: 125-127. 2009.

[25] A. Habr-Gama, J. Gama-Rodrigues, G.P. Sao Juliao, I. Proscurshim, C. Sabbagh, P.B. Lynn, R.O. Perez. Local recurrence after complete clinical response and watch and wait in rectal cancer after neoadjuvant chemoradiation: impact of salvage therapy on local disease control. *International journal of radiation oncology, biology, physics.* 88: 822-828. 2014.

[26] M.J.M. van der Valk, D.E. Hilling, E. Bastiaannet, E. Meershoek-Klein Kranenbarg, G.L. Beets, N.L. Figueiredo, A. Habr-Gama, R.O. Perez, A.G. Renehan, C.J.H. van de Velde. Long-term outcomes of clinical complete responders after neoadjuvant treatment for rectal cancer in the International Watch & Wait Database (IWWD): an international multicentre registry study. *Lancet (London, England).* 391:

2537-2545. 2018.

[27] A.M. Maffione, F. Galeotti, C. Capirci, P.M. Colletti, D. Rubello. When and why to use FDG PET/CT in locally advanced rectal cancer: two scenarios. *Clinical nuclear medicine*. 39: 528-530. 2014.

[28] S.Y. Kim, J. Joo, T.W. Kim, Y.S. Hong, J.E. Kim, I.G. Hwang, B.G. Kim, K.W. Lee, J.W. Kim, H.S. Oh, J.B. Ahn, D.Y. Zang, D.Y. Kim, J.H. Oh, J.Y. Baek. A Randomized Phase 2 Trial of Consolidation Chemotherapy After Preoperative Chemoradiation Therapy Versus Chemoradiation Therapy Alone for Locally Advanced Rectal Cancer: KCSG CO 14-03. *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 101: 889-899. 2018.

[29] Y.S. Hong, B.H. Nam, K.P. Kim, J.E. Kim, S.J. Park, Y.S. Park, J.O. Park, S.Y. Kim, T.Y. Kim, J.H. Kim, J.B. Ahn, S.B. Lim, C.S. Yu, J.C. Kim, S.H. Yun, J.H. Kim, J.H. Park, H.C. Park, K.H. Jung, T.W. Kim. Oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin versus fluorouracil and leucovorin as adjuvant chemotherapy for locally advanced rectal cancer after preoperative chemoradiotherapy (ADORE): an open-label, multicentre, phase 2, randomised controlled trial. *The Lancet. Oncology*. 15: 1245-1253. 2014.

[30] P. Vaupel, O. Thews, M. Hoekel. Treatment resistance of solid tumors: role of hypoxia and anemia. *Medical oncology (Northwood, London, England)*. 18: 243-259. 2001.

[31] J.M. Brown, W.R. Wilson. Exploiting tumour hypoxia in cancer treatment. *Nat Rev Cancer*. 4: 437-447. 2004.

[32] N. Ferrara. VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat Rev Cancer*. 2: 795-803. 2002.

[33] M. Hockel, C. Knoop, K. Schlenger, B. Vorndran, E. Baussmann, M. Mitze, P.G.

- Knapstein, P. Vaupel. Intratumoral pO₂ predicts survival in advanced cancer of the uterine cervix. *Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology*. 26: 45-50. 1993.
- [34] Y. Dor, E. Keshet. Ischemia-driven angiogenesis. *Trends in cardiovascular medicine*. 7: 289-294. 1997.
- [35] P.H. Maxwell, G.U. Dachs, J.M. Gleadle, L.G. Nicholls, A.L. Harris, I.J. Stratford, O. Hankinson, C.W. Pugh, P.J. Ratcliffe. Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 94: 8104-8109. 1997.
- [36] P. Carmeliet, Y. Dor, J.M. Herbert, D. Fukumura, K. Brusselmans, M. Dewerchin, M. Neeman, F. Bono, R. Abramovitch, P. Maxwell, C.J. Koch, P. Ratcliffe, L. Moons, R.K. Jain, D. Collen, E. Keshert. Role of HIF-1 α in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*. 394: 485-490. 1998.
- [37] M. Koshiji, Y. Kageyama, E.A. Pete, I. Horikawa, J.C. Barrett, L.E. Huang. HIF-1 α induces cell cycle arrest by functionally counteracting Myc. *Embo j*. 23: 1949-1956. 2004.
- [38] S. Hammer, K.K. To, Y.G. Yoo, M. Koshiji, L.E. Huang. Hypoxic suppression of the cell cycle gene CDC25A in tumor cells. *Cell Cycle*. 6: 1919-1926. 2007.
- [39] N.C. Denko. Hypoxia, HIF1 and glucose metabolism in the solid tumour. *Nat Rev Cancer*. 8: 705-713. 2008.
- [40] G. Bellot, R. Garcia-Medina, P. Gounon, J. Chiche, D. Roux, J. Pouyssegur, N.M. Mazure. Hypoxia-induced autophagy is mediated through hypoxia-inducible factor induction of BNIP3 and BNIP3L via their BH3 domains. *Mol Cell Biol*. 29: 2570-2581.

2009.

[41] K. Hongo, N.H. Tsuno, K. Kawai, K. Sasaki, M. Kaneko, M. Hiyoshi, K. Muro, N. Tada, T. Nirei, E. Sunami, K. Takahashi, H. Nagawa, J. Kitayama, T. Watanabe.

Hypoxia enhances colon cancer migration and invasion through promotion of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of surgical research*. 182: 75-84. 2013.

[42] D.M. Gilkes, G.L. Semenza, D. Wirtz. Hypoxia and the extracellular matrix: drivers of tumour metastasis. *Nat Rev Cancer*. 14: 430-439. 2014.

[43] J.T. Erler, C.J. Cawthorne, K.J. Williams, M. Koritzinsky, B.G. Wouters, C. Wilson, C. Miller, C. Demonacos, I.J. Stratford, C. Dive. Hypoxia-mediated down-regulation of Bid and Bax in tumors occurs via hypoxia-inducible factor 1-dependent and -independent mechanisms and contributes to drug resistance. *Mol Cell Biol*. 24: 2875-2889. 2004.

[44] H. Zhong, A.M. De Marzo, E. Laughner, M. Lim, D.A. Hilton, D. Zagzag, P. Buechler, W.B. Isaacs, G.L. Semenza, J.W. Simons. Overexpression of hypoxia-inducible factor 1alpha in common human cancers and their metastases. *Cancer Res*. 59: 5830-5835. 1999.

[45] D. Cao, M. Hou, Y.S. Guan, M. Jiang, Y. Yang, H.F. Gou. Expression of HIF-1alpha and VEGF in colorectal cancer: association with clinical outcomes and prognostic implications. *BMC cancer*. 9: 432. 2009.

[46] G.L. Semenza. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*. 3: 721-732. 2003.

[47] K. Muro, N.H. Tsuno, K. Kawai, K. Sasaki, K. Hongo, M. Kaneko, M. Hiyoshi, N. Tada, T. Nirei, E. Sunami, K. Takahashi, J. Kitayama. SN-38 overcomes chemoresistance of colorectal cancer cells induced by hypoxia, through HIF1alpha.

Anticancer Res. 32: 865-872. 2012.

[48] B.J. Moeller, Y. Cao, C.Y. Li, M.W. Dewhirst. Radiation activates HIF-1 to regulate vascular radiosensitivity in tumors: role of reoxygenation, free radicals, and stress granules. *Cancer Cell*. 5: 429-441. 2004.

[49] B.J. Moeller, M.R. Dreher, Z.N. Rabbani, T. Schroeder, Y. Cao, C.Y. Li, M.W. Dewhirst. Pleiotropic effects of HIF-1 blockade on tumor radiosensitivity. *Cancer Cell*. 8: 99-110. 2005.

[50] A. Miyasaka, K. Oda, Y. Ikeda, K. Sone, T. Fukuda, K. Inaba, C. Makii, A. Enomoto, N. Hosoya, M. Tanikawa, Y. Uehara, T. Arimoto, H. Kuramoto, O. Wada-Hiraie, K. Miyagawa, T. Yano, K. Kawana, Y. Osuga, T. Fujii. PI3K/mTOR pathway inhibition overcomes radioresistance via suppression of the HIF1-alpha/VEGF pathway in endometrial cancer. *Gynecologic oncology*. 138: 174-180. 2015.

[51] H. Lu, K. Liang, Y. Lu, Z. Fan. The anti-EGFR antibody cetuximab sensitizes human head and neck squamous cell carcinoma cells to radiation in part through inhibiting radiation-induced upregulation of HIF-1alpha. *Cancer Lett*. 322: 78-85. 2012.

[52] D. Ahmed, P.W. Eide, I.A. Eilertsen, S.A. Danielsen, M. Eknaes, M. Hektoen, G.E. Lind, R.A. Lothe. Epigenetic and genetic features of 24 colon cancer cell lines. *Oncogenesis*. 2: e71. 2013.

[53] S. Srinivasan, J.F. Dunn. Stabilization of hypoxia-inducible factor-1alpha in buffer containing cobalt chloride for Western blot analysis. *Analytical biochemistry*. 416: 120-122. 2011.

[54] K. Kawai, N.H. Tsuno, J. Kitayama, Y. Okaji, K. Yazawa, M. Asakage, N. Hori, T. Watanabe, K. Takahashi, H. Nagawa. Epigallocatechin gallate, the main component of tea polyphenol, binds to CD4 and interferes with gp120 binding. *The Journal of allergy*

and clinical immunology. 112: 951-957. 2003.

[55] K.G. Lai, Y.H. Lin, C.T. Ho, C.Y. Chen, C.Y. Peng, T.Z. Liu, J.F. Chiou. Paclitaxel pretreatment overcomes hypoxia inducible factor-1alpha-induced radioresistance acquisition of human hepatoma and lung adenocarcinoma cells. Life sciences. 136: 7-12. 2015.

[56] H. Harada, S. Kizaka-Kondoh, G. Li, S. Itasaka, K. Shibuya, M. Inoue, M. Hiraoka. Significance of HIF-1-active cells in angiogenesis and radioresistance. Oncogene. 26: 7508-7516. 2007.

[57] M.A. Pena-Rico, M.N. Calvo-Vidal, R. Villalonga-Planells, F. Martinez-Soler, P. Gimenez-Bonafe, A. Navarro-Sabate, A. Tortosa, R. Bartrons, A. Manzano. TP53 induced glycolysis and apoptosis regulator (TIGAR) knockdown results in radiosensitization of glioma cells. Radiotherapy and oncology : journal of the European Society for Therapeutic Radiology and Oncology. 101: 132-139. 2011.

[58] P. Sapra, H. Zhao, M. Mehlig, J. Malaby, P. Kraft, C. Longley, L.M. Greenberger, I.D. Horak. Novel delivery of SN38 markedly inhibits tumor growth in xenografts, including a camptothecin-11-refractory model. Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research. 14: 1888-1896. 2008.

[59] H. Kamiyama, S. Takano, K. Tsuboi, A. Matsumura. Anti-angiogenic effects of SN38 (active metabolite of irinotecan): inhibition of hypoxia-inducible factor 1 alpha (HIF-1alpha)/vascular endothelial growth factor (VEGF) expression of glioma and growth of endothelial cells. J Cancer Res Clin Oncol. 131: 205-213. 2005.

[60] K. Sasai, G.Z. Guo, K. Shibuya, N. Oya, T. Shibata, Y. Nagata, M. Hiraoka. Effects of SN-38 (an active metabolite of CPT-11) on responses of human and rodent cells to irradiation. International journal of radiation oncology, biology, physics. 42: 785-788.

1998.

[61] N. Kaneda, H. Nagata, T. Furuta, T. Yokokura. Metabolism and pharmacokinetics of the camptothecin analogue CPT-11 in the mouse. *Cancer Res.* 50: 1715-1720. 1990.

[62] Y. Sasaki, Y. Yoshida, K. Sudoh, H. Hakusui, H. Fujii, T. Ohtsu, H. Wakita, T. Igarashi, K. Itoh. Pharmacological correlation between total drug concentration and lactones of CPT-11 and SN-38 in patients treated with CPT-11. *Japanese journal of cancer research : Gann.* 86: 111-116. 1995.

[63] N. Masuda, M. Fukuoka, S. Kudoh, K. Matsui, Y. Kusunoki, M. Takada, K. Nakagawa, T. Hirashima, H. Tsukada, T. Yana, et al. Phase I and pharmacologic study of irinotecan and etoposide with recombinant human granulocyte colony-stimulating factor support for advanced lung cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 12: 1833-1841. 1994.

[64] N. Gombodorj, T. Yokobori, S. Yoshiyama, R. Kawabata-Iwakawa, S. Rokudai, I. Horikoshi, M. Nishiyama, T. Nakano. Inhibition of Ubiquitin-conjugating Enzyme E2 May Activate the Degradation of Hypoxia-inducible Factors and, thus, Overcome Cellular Resistance to Radiation in Colorectal Cancer. *Anticancer Res.* 37: 2425-2436. 2017.

[65] E.H. Kim, H. Lee, Y.K. Jeong, W.G. Jung. Mechanisms of SU5416, an inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor, as a radiosensitizer for colon cancer cells. *Oncol Rep.* 36: 763-770. 2016.

[66] A. Saberi, D. Shahbazi-Gahrouei, M. Abbasian, M. Fesharaki, A. Baharlouei, Z. Arab-Bafrani. Gold nanoparticles in combination with megavoltage radiation energy increased radiosensitization and apoptosis in colon cancer HT-29 cells. *International journal of radiation biology.* 1-9. 2016.

- [67] M. Vijay, G. Sivagami, K. Thayalan, N. Nalini. Radiosensitizing potential of rutin against human colon adenocarcinoma HT-29 cells. *Bratislavske lekarske listy*. 117: 171-178. 2016.
- [68] X. Tian, M. Nguyen, H.P. Foote, J.M. Caster, K.C. Roche, C.G. Peters, P. Wu, L. Jayaraman, E.G. Garmey, J.E. Tepper, S. Eliasof, A.Z. Wang. CRLX101, a Nanoparticle-Drug Conjugate Containing Camptothecin, Improves Rectal Cancer Chemoradiotherapy by Inhibiting DNA Repair and HIF1alpha. *Cancer Res*. 77: 112-122. 2017.
- [69] AJM Rombouts, N Hugen, MAG Elferink, ID Nagtegaal, JHW de Wilt. Treatment Interval between Neoadjuvant Chemoradiotherapy and Surgery in Rectal Cancer Patients: A Population-Based Study. *Ann Surg Oncol*. 23: 3593-3601. 2016.
- [70] B. Rau, M. Hunerbein, C. Barth, P. Wust, W. Haensch, H. Riess, R. Felix, P.M. Schlag. Accuracy of endorectal ultrasound after preoperative radiochemotherapy in locally advanced rectal cancer. *Surgical endoscopy*. 13: 980-984. 1999.
- [71] D.A. Schneider, T.J. Akhurst, S.Y. Ngan, S.K. Warriar, M. Michael, A.C. Lynch, L. Te Marvelde, A.G. Heriot. Relative Value of Restaging MRI, CT, and FDG-PET Scan After Preoperative Chemoradiation for Rectal Cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 59: 179-186. 2016.
- [72] S.C. Nahas, C.S. Rizkallah Nahas, C.F. Sparapan Marques, U. Ribeiro, Jr., G.C. Cotti, A.R. Imperiale, F.C. Capareli, A.T. Chih Chen, P.M. Hoff, I. Cecconello. Pathologic Complete Response in Rectal Cancer: Can We Detect It? Lessons Learned From a Proposed Randomized Trial of Watch-and-Wait Treatment of Rectal Cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 59: 255-263. 2016.
- [73] K. Kawai, S. Ishihara, H. Nozawa, K. Hata, T. Kiyomatsu, T. Morikawa, M.

Fukayama, T. Watanabe. Prediction of Pathological Complete Response Using Endoscopic Findings and Outcomes of Patients Who Underwent Watchful Waiting After Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *Diseases of the colon and rectum*. 60: 368-375. 2017.

[74] U.B. Patel, F. Taylor, L. Blomqvist, C. George, H. Evans, P. Tekkis, P. Quirke, D. Sebag-Montefiore, B. Moran, R. Heald, A. Guthrie, N. Bees, I. Swift, K. Pennert, G. Brown. Magnetic resonance imaging-detected tumor response for locally advanced rectal cancer predicts survival outcomes: MERCURY experience. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 29: 3753-3760. 2011.

[75] U.B. Patel, G. Brown, H. Rutten, N. West, D. Sebag-Montefiore, R. Glynne-Jones, E. Rullier, M. Peeters, E. Van Cutsem, S. Ricci, C. Van de Velde, P. Kjell, P. Quirke. Comparison of magnetic resonance imaging and histopathological response to chemoradiotherapy in locally advanced rectal cancer. *Annals of surgical oncology*. 19: 2842-2852. 2012.

[76] S.K. Yu, D. Tait, I. Chau, G. Brown. MRI predictive factors for tumor response in rectal cancer following neoadjuvant chemoradiation therapy--implications for induction chemotherapy? *International journal of radiation oncology, biology, physics*. 87: 505-511. 2013.

[77] M. Chand, R.I. Swift, P.P. Tekkis, I. Chau, G. Brown. Extramural venous invasion is a potential imaging predictive biomarker of neoadjuvant treatment in rectal cancer. *British journal of cancer*. 110: 19-25. 2014.

[78] F. Sclafani, G. Brown, D. Cunningham, A. Wotherspoon, L.S.T. Mendes, S. Balyasnikova, J. Evans, C. Peckitt, R. Begum, D. Tait, J. Taberner, B. Glimelius, S.

- Rosello, J. Thomas, J. Oates, I. Chau. Comparison between MRI and pathology in the assessment of tumour regression grade in rectal cancer. *British journal of cancer*. 117: 1478-1485. 2017.
- [79] C. Capirci, L. Rampin, P.A. Erba, F. Galeotti, G. Crepaldi, E. Banti, M. Gava, S. Fanti, G. Mariani, P.C. Muzzio, D. Rubello. Sequential FDG-PET/CT reliably predicts response of locally advanced rectal cancer to neo-adjuvant chemo-radiation therapy. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 34: 1583-1593. 2007.
- [80] A.A. Martoni, F. Di Fabio, C. Pinto, P. Castellucci, S. Pini, C. Ceccarelli, D. Cuicchi, B. Iacopino, P. Di Tullio, S. Giaquinta, L. Tardio, R. Lombardi, S. Fanti, B. Cola. Prospective study on the FDG-PET/CT predictive and prognostic values in patients treated with neoadjuvant chemoradiation therapy and radical surgery for locally advanced rectal cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 22: 650-656. 2011.
- [81] C. Zhang, J. Tong, X. Sun, J. Liu, Y. Wang, G. Huang. 18F-FDG-PET evaluation of treatment response to neo-adjuvant therapy in patients with locally advanced rectal cancer: a meta-analysis. *International journal of cancer*. 131: 2604-2611. 2012.
- [82] A.M. Maffione, M.C. Marzola, C. Capirci, P.M. Colletti, D. Rubello. Value of (18)F-FDG PET for Predicting Response to Neoadjuvant Therapy in Rectal Cancer: Systematic Review and Meta-Analysis. *AJR. American journal of roentgenology*. 204: 1261-1268. 2015.
- [83] M.J. Murcia Durendez, L. Frutos Esteban, J. Lujan, M.D. Frutos, G. Valero, J.L. Navarro Fernandez, L. Mohamed Salem, G. Ruiz Merino, M.A. Claver Valderas. The value of 18F-FDG PET/CT for assessing the response to neoadjuvant therapy in locally advanced rectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*.

40: 91-97. 2013.

[84] G.C. Park, J.S. Kim, J.L. Roh, S.H. Choi, S.Y. Nam, S.Y. Kim. Prognostic value of metabolic tumor volume measured by 18F-FDG PET/CT in advanced-stage squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*. 24: 208-214. 2013.

[85] W. Huang, M. Fan, B. Liu, Z. Fu, T. Zhou, Z. Zhang, H. Gong, B. Li. Value of metabolic tumor volume on repeated 18F-FDG PET/CT for early prediction of survival in locally advanced non-small cell lung cancer treated with concurrent chemoradiotherapy. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine*. 55: 1584-1590. 2014.

[86] S.J. Kim, S. Chang. Volumetric parameters changes of sequential 18F-FDG PET/CT for early prediction of recurrence and death in patients with locally advanced rectal cancer treated with preoperative chemoradiotherapy. *Clinical nuclear medicine*. 40: 930-935. 2015.

[87] W. Sun, J. Xu, W. Hu, Z. Zhang, W. Shen. The role of sequential 18(F) -FDG PET/CT in predicting tumour response after preoperative chemoradiation for rectal cancer. *Colorectal disease : the official journal of the Association of Coloproctology of Great Britain and Ireland*. 15: e231-238. 2013.

[88] S.K. Chennupati, A. Quon, A. Kamaya, R.K. Pai, T. La, T.E. Krakow, E. Graves, A.C. Koong, D.T. Chang. Positron emission tomography for predicting pathologic response after neoadjuvant chemoradiotherapy for locally advanced rectal cancer. *American journal of clinical oncology*. 35: 334-339. 2012.

[89] S.J. Lee, J.G. Kim, S.W. Lee, Y.S. Chae, B.W. Kang, Y.J. Lee, J.S. Park, G.S. Choi. Clinical implications of initial FDG-PET/CT in locally advanced rectal cancer treated

with neoadjuvant chemoradiotherapy. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 71: 1201-1207. 2013.

[90] J.I. Bang, S. Ha, S.B. Kang, K.W. Lee, H.S. Lee, J.S. Kim, H.K. Oh, H.Y. Lee, S.E. Kim. Prediction of neoadjuvant radiation chemotherapy response and survival using pretreatment [(18)F]FDG PET/CT scans in locally advanced rectal cancer. *European journal of nuclear medicine and molecular imaging*. 43: 422-431. 2016.

[91] J.A. Ruby, T. Leibold, T.J. Akhurst, J. Shia, L.B. Saltz, M. Mazumdar, E.R. Riedel, S.M. Larson, J.G. Guillem. FDG-PET assessment of rectal cancer response to neoadjuvant chemoradiotherapy is not associated with long-term prognosis: a prospective evaluation. *Diseases of the colon and rectum*. 55: 378-386. 2012.

[92] D.A. Dos Anjos, R.O. Perez, A. Habr-Gama, G.P. Sao Juliao, B.B. Vailati, L.M. Fernandez, J.B. de Sousa, C.A. Buchpiguel. Semiquantitative volumetry by sequential PET/CT may improve prediction of complete response to neoadjuvant chemoradiation in patients with distal rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 59: 805-812. 2016.

[93] J.D. Brierley, *TNM classification of malignant tumours*, 8th Edition, John Wiley & Sons 2017.

[94] 大腸癌研究会編. 大腸癌取扱い規約 第8版 金原出版. 2013.

[95] T. Okuno, K. Kawai, K. Koyama, M. Takahashi, S. Ishihara, T. Momose, T. Morikawa, M. Fukayama, T. Watanabe. Value of FDG-PET/CT volumetry after chemoradiotherapy in rectal cancer. *Dis Colon Rectum*. 61: 320-327. 2018.

https://journals.lww.com/dcrjournal/Fulltext/2018/03000/Value_of_FDG_PET_CT_Volumetry_After.13.aspx

[96] U. Haberkorn, L.G. Strauss, C. Reisser, D. Haag, A. Dimitrakopoulou, S. Ziegler, F. Oberdorfer, V. Rudat, G. van Kaick. Glucose uptake, perfusion, and cell proliferation

in head and neck tumors: relation of positron emission tomography to flow cytometry. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 32: 1548-1555. 1991.

[97] H. Minn, A.C. Clavo, R. Grenman, R.L. Wahl. In vitro comparison of cell proliferation kinetics and uptake of tritiated fluorodeoxyglucose and L-methionine in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 36: 252-258. 1995.

[98] R. Bos, J.J. van Der Hoeven, E. van Der Wall, P. van Der Groep, P.J. van Diest, E.F. Comans, U. Joshi, G.L. Semenza, O.S. Hoekstra, A.A. Lammertsma, C.F. Molthoff. Biologic correlates of (18)fluorodeoxyglucose uptake in human breast cancer measured by positron emission tomography. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 20: 379-387. 2002.

[99] C.C. Riedl, T. Akhurst, S. Larson, S.F. Stanziale, S. Tuorto, A. Bhargava, H. Hricak, D. Klimstra, Y. Fong. 18F-FDG PET scanning correlates with tissue markers of poor prognosis and predicts mortality for patients after liver resection for colorectal metastases. *Journal of nuclear medicine : official publication, Society of Nuclear Medicine.* 48: 771-775. 2007.

[100] M.K. Chung, H.S. Jeong, Y.I. Son, Y.K. So, G.Y. Park, J.Y. Choi, S.H. Hyun, H.J. Kim, Y.H. Ko, C.H. Baek. Metabolic tumor volumes by [18F]-fluorodeoxyglucose PET/CT correlate with occult metastasis in oral squamous cell carcinoma of the tongue. *Annals of surgical oncology.* 16: 3111-3117. 2009.

[101] S.M. Larson, Y. Erdi, T. Akhurst, M. Mazumdar, H.A. Macapinlac, R.D. Finn, C. Casilla, M. Fazzari, N. Srivastava, H.W.D. Yeung, J.L. Humm, J. Guillem, R. Downey, M. Karpeh, A.E. Cohen, R. Ginsberg. Tumor Treatment Response Based on Visual and

Quantitative Changes in Global Tumor Glycolysis Using PET-FDG Imaging: The Visual Response Score and the Change in Total Lesion Glycolysis. *Clinical Positron Imaging*. 2: 159-171. 1999.

[102] S. Pucciarelli, P. Toppan, M.L. Friso, V. Russo, L. Pasetto, E. Urso, F. Marino, A. Ambrosi, M. Lise. Complete pathologic response following preoperative chemoradiation therapy for middle to lower rectal cancer is not a prognostic factor for a better outcome. *Diseases of the colon and rectum*. 47: 1798-1807. 2004.

[103] K. Kawai, H. Nozawa, K. Hata, T. Tanaka, T. Nishikawa, K. Oba, T. Watanabe. Optimal Interval for (18)F-FDG-PET After Chemoradiotherapy for Rectal Cancer. *Clinical colorectal cancer*. 17: e163-e170. 2018.