

平成30年6月18日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K08963

研究課題名(和文) 大腸癌血管新生阻害薬の効果予測を可能にするバイオマーカーの網羅的探索

研究課題名(英文) Comprehensive analyses of biomarkers predicting therapeutic effect of an anti-angiogenetic agent against advanced colorectal cancer

研究代表者

小島 寛 (Kojima, Hiroshi)

筑波大学・医学医療系・教授

研究者番号：10225435

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：進行大腸癌に対して抗VEGF抗体薬 bevacizumab(Bmab)を投与する際の、治療効果予測バイオマーカー(BM)を探索した。まず、Bmab投与前後のVEGF血中濃度を測定したところ、治療後のBmab非結合VEGFは治療抵抗群で有意に高かった。一方、治療前のサイトカイン・ケモカイン全48項目を網羅的に解析したところ、IL-10、VEGFの血中濃度は治療抵抗群で有意に高く、これらサイトカインが高い症例は生命予後も不良であった。また、ヒト血管内皮細胞培養系でVEGF刺激によって発現が亢進・抑制するmiRNAを研究期間内に選別したので、今後これらが治療効果予測BMとして有用か否か検討する。

研究成果の概要(英文)：This study was designed to identify biomarkers (BMs) predicting therapeutic effect of an anti-VEGF antibody, bevacizumab against advanced colorectal cancer. Pre- and post-treatment (Tx) serum concentrations of VEGF, pre-Tx cytokine/chemokine profile, and miRNA released after stimulation of human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) with VEGF were assayed to select candidate BMs.

Serum concentration of post-Tx Bmab-unconjugated VEGF was significantly higher in non-responders. Comprehensive analysis of pre-Tx cytokines/chemokines revealed that serum concentrations of IL-10 and VEGF were elevated in non-responsive patients. Moreover, patients with higher concentrations of these cytokines showed significantly worse prognosis. These data collectively suggest that IL-10 and VEGF can be predictive BMs. We are currently under investigation by using blood samples obtained from patients to clarify the usefulness of the selected miRNAs through in vitro stimulation of HUVEC with VEGF.

研究分野：腫瘍内科学

キーワード：大腸癌 bevacizumab サイトカイン 血管新生因子 miRNA 治療効果予測 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

抗 VEGF 抗体である bevacizumab (以下 Bmab と略) は、再発・転移大腸癌の治療に広く用いられその臨床的有用性は確立しているが、今日に至るまで Bmab の効果を治療開始前あるいは治療開始後早期に予測し得る信頼するに足るバイオマーカーは開発されていない。

2. 研究の目的

本研究においては、Bmab 投与前または投与開始後早期に、Bmab+化学療法の治療効果を予測することが出来る臨床応用可能な簡便なバイオマーカーを探索することを目的とした。

3. 研究の方法

以下の3つの観点から Bmab+化学療法効果予測のバイオマーカーを探索した。

1) Bmab 治療後の Bmab 非結合 free VEGF の測定

Bmab 投与前後の患者血清に protein A/G を添加することによって免疫沈降を行い、免疫沈降後の血清を Bmab 非結合 free VEGF 測定用の検体とした。血中 total および free VEGF の血中濃度を ELISA 法にて測定し、free VEGF 血中濃度が Bmab+化学療法の有効性を予測するバイオマーカーになり得るか否かを解析した。

2) 治療開始前のサイトカイン、血管新生因子の網羅的解析

Bmab+化学療法導入前の血中サイトカイン、血管新生因子、全 48 項目を Bio-Plex マルチプレックスシステム(BioRad)を用いて網羅的に解析し、responder と non-responder で有意差を示すサイトカイン、血管新生因子を抽出した。responder は Bmab+化学療法によって PR 以上の治療効果が得られるか、SD が 6 ヶ月以上継続可能な症例と定義し、それ以外の症例は non-responder とした。

3) VEGF シグナルによって発現が亢進または減弱する血管内皮細胞特異的 micro RNA (miRNA) の網羅的解析

VEGF によって細胞が刺激されることによって放出される miRNA を選択するために、ヒト血管内皮細胞(HUVEC)を VEGF 非存在下で培養し、培養系に VEGF を添加する前後の培養上清中の miRNA を、GeneChip® miRNA Array (東レ)を用いて網羅的に解析し、VEGF シグナルが作動することによって発現が亢進または減弱する血管内皮細胞特異的 miRNA を選別した。これら miRNA の治療開始前血中濃度を患者検体で測定し、responder と non-responder を鑑別するバイオマーカーに

なり得るか否かを検証する。

4. 研究成果

1) Bmab 治療後の Bmab 非結合 free VEGF の測定

VEGF 血中濃度が Bmab 効果予測のバイオマーカーになるか否かを明らかにするために、治療 (Bmab+化学療法) 開始前後の VEGF-A 血中濃度を ELISA によって測定した。「化学療法後に Bmab 非結合 free VEGF-A 血中濃度が高い症例では、十分な治療効果が得られない」という仮説を検証するために、total VEGF および free VEGF を測定した。26 症例 (responder 15 例、non-responder 11 例) について検討を行った結果を以下に示す。

全症例を対象として治療開始と前後の VEGF-A 血中濃度の推移を観察したところ、治療開始後 1M, 2M において、total VEGF の血中濃度は低下しなかったものの、free VEGF 血中濃度は治療導入によって有意に低下した。次に治療開始前後の total および free VEGF-A 血中濃度を responder と non-responder に分けて解析した。治療開始前の血中 VEGF-A 濃度は responder と non-responder で有意差がなかったが、responder では治療開始後 1M, 2M の VEGF-A 血中濃度は total, free とともに non-responder よりも有意に低下していることが明らかになった (図 1)。

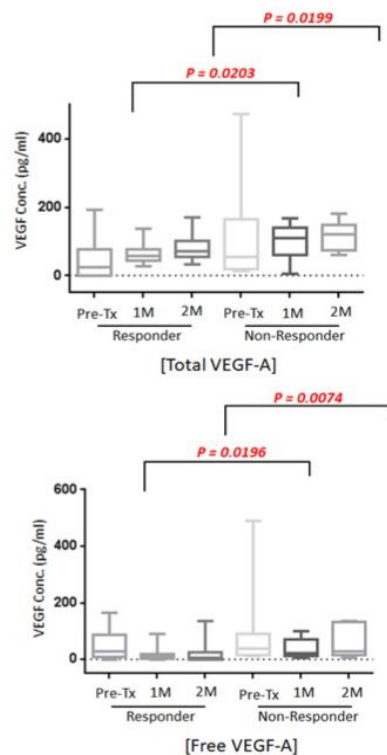


図1. 治療前後の total および free VEGF 血中濃度

2) 治療開始前のサイトカイン、血管新生因子の網羅的解析

治療開始前の血中サイトカイン、血管新生因子、全 48 項目を網羅的に解析し、responder と non-responder で有意差を示すサイトカイン、血管新生因子を選別した。図 2 に示したごとく、IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, VEGF の血中濃度は responder (19 例) と non-responder (13 例) で有意差を示し、これらが Bmab+化学療法反応性予測のバイオマーカーになる可能性が示唆された。実際、これらのサイトカイン、血管新生因子のうち、IL-10 または VEGF の血中濃度が高い症例では、Bmab を含んだ一次治療の継続可能期間(副作用に伴う脱落を除く)が短い傾向が認められ、Bmab+化学療法に対する治療反応性を反映しているものと考えられる。

一方、この患者集団(全 32 例)において生命予後(overall survival)を規定するサイトカイン、血管新生因子を解析したところ、IL-6, IL-10, VEGF が選別された(図 3)。このことより、IL-10, VEGF の血中濃度が高い症例では Bmab を含む化学療法に対する治療反応性が不良であるのみならず、overall survival も有意に短く、Bmab を含む化学療法への反応性が、その後の生命予後も規定する可能性が示唆された。

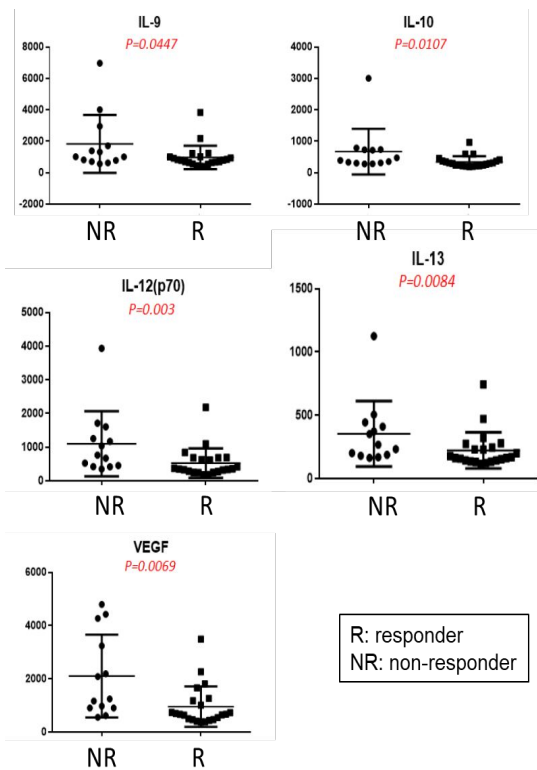


図 2. responder, non-responder で有意差を認めたサイトカイン

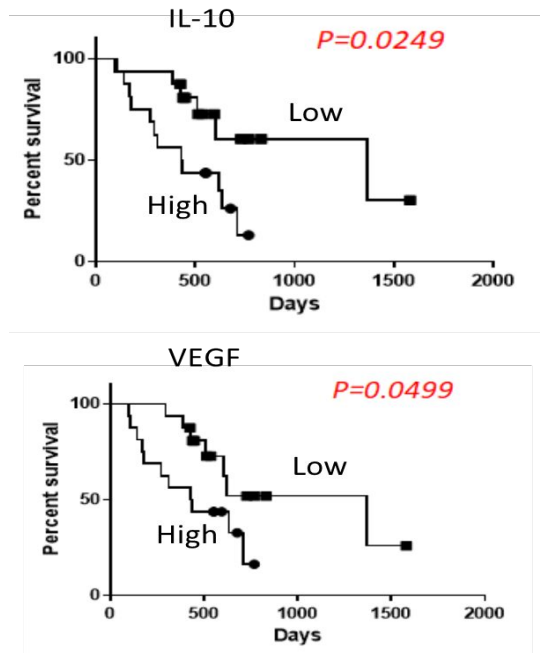


図 3. IL-10, VEGF 血中濃度の overall survival への影響

3) VEGF シグナルによって発現が亢進する血管内皮細胞特異的 micro RNA (miRNA) の網羅的解析

VEGF によって細胞が刺激されることによって放出される miRNA を選別するために、ヒト血管内皮細胞 (HUVEC) を VEGF 非存在下で培養し、培養系に VEGF を添加する前後の培養上清中の miRNA を、GeneChip® miRNA Array (東レ) を用いて網羅的に解析した。その結果、図 4 に示したごとく、VEGF 刺激によって発現が上昇または低下する miRNA を選別することが出来た。発現が 4 倍以上変化した miRNA を下表に示す。大腸癌の患者血内において、これらの候補 miRNA 濃度が上昇または低下しているということは、生体内で血管内皮細胞が VEGF 刺激を受けていることを意味すると解釈できるので、これらの miRNA 血中濃度は Bmab 反応性のバイオマーカーになることが期待される。今後、この仮説に基づき患者検体での検証を進める予定である。

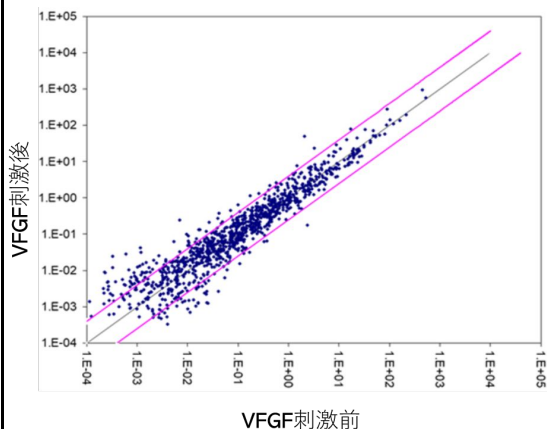


図 4. VEGF 刺激による HUVEC 培養上清中 miRNA の変動

VEGF 刺激を行ったことで発現が上昇した miRNA

【4 倍以上 10 倍未満】

Gene Name			
hsa-miR-4660	hsa-miR-3620	hsa-miR-499b-5p	hsa-miR-19a-5p
hsa-miR-3622a-5p	hsa-miR-4445-3p	hsa-miR-4716-3p	hsa-miR-4712-5p
hsa-miR-151b	hsa-miR-4717-5p	hsa-miR-4737	hsa-miR-499b-3p
hsa-miR-4774-5p	hsa-miR-4537	hsa-miR-4759	hsa-miR-208a

【10 倍以上】

Gene Name			
hsa-miR-4678	hsa-miR-4633-3p	hsa-miR-4667-3p	hsa-miR-3675-5p
hsa-miR-4645-5p	hsa-miR-3936	hsa-miR-4704-5p	hsa-miR-200b-3p

VEGF 刺激を行ったことで発現が上昇した miRNA

【4 倍以上 10 倍未満】

Gene Name			
hsa-miR-590-3p	hsa-miR-211-5p	hsa-miR-4706	hsa-miR-4662b
hsa-miR-206			

【10 倍以上】

Gene Name			
hsa-miR-23b-3p	hsa-miR-604	hsa-miR-335-3p	hsa-let-7e-3p

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

1. Inada K, Okoshi Y, Cho-Isoda Y, Ishiguro S, Suzuki H, Oki A, Tamaki Y, Shimazui T, Saito H, Hori M, Iijima T, Kojima H. Endogenous reference RNAs for microRNA quantitation in formalin-fixed, paraffin-embedded lymph node tissue. Scientific Reports 2018; 8:5918 (DOI:10.1038/s41598-018-24338-7).

〔学会発表〕(計 1 件)

1. 稲田勝重, 大越靖, 張愉紀子, 飯嶋達生, 堀光雄, 小島寛. リンパ節組織を用いる microRNA 解析に適した内在性遺伝子の選出. 第 76 回日本癌学会学術集会, 2017.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

小島 寛 (KOJIMA, Hiroshi)  
筑波大学・医学医療系・教授  
研究者番号: 10225435

(2) 研究分担者

大越 靖 (OKOSHI, Yasushi)  
筑波大学医学・医療系・准教授  
研究者番号: 10400673