

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21591733

研究課題名（和文） 遺伝子発現解析による Stage II 大腸癌再発ハイリスク例の選別法の確立

研究課題名（英文） Prediction of high-risk stage II colorectal cancer by gene expression profile

研究代表者

石原 聡一郎（ISHIHARA SOICHIRO）

帝京大学・医学部・講師

研究者番号：00376443

研究成果の概要（和文）：Stage II 大腸癌の外科治療後の再発の有無を大腸癌組織の遺伝子発現により予測することを目的とした。Stage II 大腸癌80例をトレーニングセットとして、再発した症例と再発しなかった症例間で発現の差のあった遺伝子群をマイクロアレイおよび RT-PCR にて解析し、最終的に8遺伝子による予測式を作成した。独立した24例のテストセットで再発の有無の予測を行った結果、予測精度は63%であった。

研究成果の概要（英文）：Based on the gene expression of stage II colorectal cancer, we aimed to build a predictive model for recurrence after surgery. Using 80 samples as a training set, we examined gene expression by microarray and RT-PCR. We finally selected 8 genes whose expression differed significantly between patients who developed recurrence and who did not. We used these 8 genes for predictive model. The accuracy rate of prediction was 63% among 24 samples as a test set.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	1,800,000	540,000	2,340,000
平成22年度	1,500,000	450,000	1,950,000
平成23年度	200,000	60,000	260,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：大腸癌、ハイリスク、術後補助化学療法、DNAマイクロアレイ、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

本邦では、大腸癌が死因の上位をしめ、大腸癌に対する最適な手術療法および術後の補助療法を確立することが重要な課題となっている。現在、切除可能な進行大腸癌に対する主たる治療法は手術療法である。術後は、補助化学療法が行われるが、最近の分子標的薬を含めた新規抗癌剤の導入により、様々な regimen の大腸癌の術後補助化学療法で行わ

れ、大規模な臨床試験により有意な生存率の向上が報告されている。しかし、大腸癌の術後補助化学療法の適応症例に関しては、一般的に stage III 症例におよび stage II の術後再発のハイリスク例に対して行われるとされているが、stage II の術後再発のハイリスク例の選別法は現在のところ確立されていない。我々はこれまでに結腸癌に対する化学療法の効果を予測するマーカーの同定

を、分子生物学的な解析により行い、実際の臨床に応用できる可能性を示してきた (Watanabe, New Engl J Med 344, 2001, Watanabe, Cancer Res 66(20), 2006, Watanabe, Clin Cancer Res 13, 2007)。これまでの検討では、第18番染色体の長腕の Loss of heterozygosity (LOH) ならびに Microsatellite instability (MSI) が術後補助化学療法の効果を予測できる可能性が示された。しかし、この研究では、stage II 症例および stage III 症例を一緒に解析したものであり、stage II 症例単独の検討ではない。現在、新規抗癌剤が使用可能となり、術後補助化学療法にその効果も示されているが、これらの薬剤は高価なものも多く、実際の臨床の場では、如何に術後補助化学療法が本当に必要な症例を選別するかが、経済的、患者 QOL の観点からも重要である。そこで、stage II 大腸癌症例に対して、より効率的に術後補助化学療法を行うために、臨床的に実用可能な再発のハイリスク例を、手術後に選別することが重要である。

stage II 大腸癌の術後再発例の選別に関しては、これまでに免疫染色を用いた検討などが報告されているが、再発の予測率は低く、実際に臨床的に応用できる選別マーカーは現在まで同定されていない。我々はこれまでに、DNAマイクロアレイを用いた直腸癌に対する放射線療法の照射効果予測を行い、放射線単独療法の効果予測を行った世界最初の報告を行っている (Cancer Res 66(7), 2006)。また、同様な手法を用いて、潰瘍性大腸炎における癌化例の予測、Microsatellite instability を呈する大腸癌の遺伝子発現に関する検討結果を報告してきた。本研究は、同様な手法を用いて術後補助化学療法の適応となるべく stage II 大腸癌の再発ハイリスク症例の選別を行おうとするものである。遺伝子発現により再発の有無を予測できると、臨床的に応用可能なキットの作成も可能となるため、臨床的意義が高いと考えられる。さらに、再発を規定する遺伝子群の選別を行うことは、今後新たな抗癌剤の開発に直結する可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、Stage II 大腸癌手術症例において、手術時採取された大腸癌組織における約 54,000 の遺伝子および transcript の発現を DNA マイクロアレイによる網羅的解析、ならびに Low Density Array (LDA) を用いた半定量的 RT-PCR による検証を行うことにより、臨床的応用の可能な遺伝子による術後補助化学療法の適応となるべく stage II 大腸癌の再発ハイリスク症例の選別の予測式を作成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) stage II 大腸癌手術標本の採取

本研究参加のインフォームドコンセントが得られた stage II 大腸癌手術症例を対象とする。これらの症例の手術切除標本から癌組織および正常組織を採取する。組織の採取部位は、腫瘍の場合は正常組織が可能な限り混在しない部位から、正常組織は腫瘍からできる限り離れた部位から採取する。採取された組織は、直ちに凍結して保存する。また、既に本試験の同意が得られ、手術切除標本から癌組織および正常組織が同様の方法で採取されている stage II 大腸癌手術症例も対象とする。

(2) 遺伝子発現解析

採取された stage II 大腸癌手術症例の癌組織を用い、GeneChip 解析を行う。具体的には、凍結標本より Sepazol を用い total RNA を抽出し、T7-oligo(dT)24 primer を用い cDNA へ逆転写後、biotin 標識 cRNA を合成し、Affymetrix 社の GeneChip にハイブリダイズして大腸癌発生及び転移や薬剤感受性に関連が考えられる約 54,000 種類の遺伝子発現解析を行う。

(3) 再発の有無の判定

これまでに既に手術標本が採取されている stage II 大腸癌手術症例に関しては、既存の術後経過に最新の情報を追加し、再発の有無を確定する。新たに採取された標本の症例に関しては、随時経過観察を行い、再発の有無について評価を行う。経過観察においては、大腸癌治療ガイドラインの術後フォローアップのプロトコールに従って、採血、画像診断 (CT, 超音波エコー検査など) により再発の評価を行う。

(4) 再発の予測式の作成

再発例、非再発例の間で DNA マイクロアレイの発現解析結果が有意に異なる遺伝子群を同定する。これらの遺伝子を用いて、再発の予測式を作成する。予測式を作成する際には、GeneSpring (silicon genetics 社) を用い、leave-one-out 法の一種である k-nearest neighbor (KNN法) にて行う。

(5) Low Density Array (LDA) による遺伝子発現解析の検証

再発の予測式を作成する為に用いた再発と強く相関する遺伝子群を搭載する Low Density Array (LDA) を作成する。LDA を用い、Real time PCR 法にて、選別された遺伝子群の個々の遺伝子の発現を解析し、DNA マイクロアレイ解析結果と比較する。PT-PCR 法にて確認された発現量と相関を示す遺伝子セットを抽出する。抽出された遺伝子セットを用いて、PT-PCR 法により確定した発現量に基づき、KNN法および SVM 法にて予測を行う。この際、予測に用いる遺伝子数を最小で、有効な予測結果が得られ

るように最終的に予測に用いる遺伝子群を確定する。

(6) テストサンプルにおける予測式の検証

RT-PCR法の発現解析により作成された再発予測式を用いて、予測式作成のため用いられたサンプル(ラーニングサンプル)以外のサンプル(テストサンプル)で、再発の有無が予測できるか検討し、validation testを行う。

(7) 予測式を作成するために選別された遺伝子に関する検討

予測式を作成するのに選別された遺伝子群につき、各症例の再発形式(肝転移、肺転移、リンパ節再発、腹膜再発など)と相関があるか検討を行う。

4. 研究成果

(1) 外科的切除が行われたstage II症例のうち、遺伝子研究に対してインフォームドコンセントが得られている104症例を対象とした。

(2) 対象症例の凍結標本よりbiotin標識cRNAを合成し、Affymetrix社のGeneChipにハイブリダイズして大腸癌発生及び転移や薬剤感受性に関連が考えられる約54,000種類の遺伝子発現解析を行った。

(3) 80症例をトレーニングセットとして、再発の認められた症例と認められなかった症例の間で有意に発現の差のあった16遺伝子を抽出した。

(4) 抽出された16遺伝子を用いて、stage II症例の再発の予測式を作成した。予測式を作成する際にはKNN法にて行った。この結果、予測精度64%で再発の有無の予想が可能であった。

(5) 予測に用いた16遺伝子の発現解析をQuantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)により解析し、GeneChip解析結果を検証した。RT-PCRで検証された予測に用いる8遺伝子を確定した。

(6) 確定された8遺伝子のRT-PCRによる発現により、独立した24例をテストセットとして、予測式の検証を行った。この結果、予測の精度は63%であった。臨床現場での応用を考えると、今後、予測精度をさらに高める必要があると考えられた。

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8件)

1) Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S,

Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H. RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. *Int J Oncol.* 38(1):201-207, 2011 (査読有り)

2) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H. Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. *Clin Colorectal Cancer* 10(2):134-141, 2011 (査読有り)

3) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Shibuya H, Ikeuchi H. Gene expression of vascular endothelial growth factor a, thymidylate synthase, and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in prediction of response to bevacizumab treatment in colorectal cancer patients. *Dis Colon Rectum* 54(8):1026-35, 2011 (査読有り)

4) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Iinuma H, Ikeuchi H, Eshima K. Differential gene expression signatures between colorectal cancers with and without KRAS mutations: Crosstalk between the KRAS pathway and other signaling pathways. *Eur J Cancer* 47(13):1946-1954, 2011 (査読有り)

5) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Konishi T, Yano H, Iinuma H, Hayama T, Nozawa K, Ishihara S, Matsuda K. Prognostic Significance of 18q Loss of Heterozygosity in Microsatellite-Stable Colorectal Cancer. *J Clin Oncol.* 28(7):e119, 2010 (査読有り)

6) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Kanazawa T, Konishi T, Tanaka T, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Eshima K, Muto T, Nagawa H. Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes. *Eur J Cancer.* 46(11):2119-26, 2010 (査読有り)

7) Ishihara S, Watanabe T, Kiyomatsu T, Yasuda K, Nagawa H. Prognostic significance of response to preoperative radiotherapy, lymph node

metastasis, and CEA level in patients undergoing total mesorectal excision of rectal cancer. Int J Colorectal Dis. 25(12):1417-1425, 2010 (査読有り)

- 8) Watanabe T, Kobunai T, Tanaka T, Ishihara S, Matsuda K, Nagawa H. Gene expression signature and the prediction of lymph node metastasis in colorectal cancer by DNA microarray. Dis Colon Rectum. 52(12):1941-8, 2009 (査読有り)

〔学会発表〕 (計0件)

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石原 聡一郎 (ISHIHARA SOICHIRO)
帝京大学・医学部・講師
研究者番号：00376443

(2) 研究分担者

渡邊 聡明 (WATANABE TOSHIAKI)
帝京大学・医学部・教授
研究者番号：80210920

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：