

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 29 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23591972

研究課題名(和文) 切除不能大腸癌に対する抗癌剤感受性予測遺伝子による個別化医療の実践

研究課題名(英文) Potential responders to anticancer therapy for colorectal cancer by predictor genes

研究代表者

緑川 泰 (Midorikawa, Yutaka)

日本大学・医学部・助教

研究者番号：10292905

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：FOLFOX治療を受けた切除不能大腸がん患者83名をトレーニングセットとテストセットに分け、各がん組織からRNAを抽出したのち発現プロファイルを解析した。ランダムフォレストによる解析ではトレーニングセットを感度81.4%、特異度85.1%でFOLFOXの奏効率を予測し得た。さらにoutlierを除外することにより感度91.5%、特異度95.6%まで予測精度をあげることが可能であり、この予測モデルを用いてテストセット29例のFOLFOX感受性を予測したところ、69.2%の精度であった。遺伝子プロファイリングを用いた機械学習アルゴリズムによる薬剤感受性予測は個別化医療に有用と考えられた。

研究成果の概要(英文)：To establish the procedures to identify responders to FOLFOX therapy, 83 colorectal cancer (CRC) patients including 42 responders and 41 non-responders were divided into training (54 patients) and test (29 patients) sets. Using Random Forests (RF) algorithm in the training set, predictor genes for FOLFOX therapy were identified, which were applied to test samples. In the training set, 22 of 27 responders (81.4%) and 23 of 27 non-responders (85.1%) were correctly classified. To improve the prediction model, we removed the outliers determined by RF, and the model could correctly classify 21 of 23 responders (91.3%) and 22 of 23 non-responders (95.6%) in the training set, and 80.0% sensitivity and 92.8% specificity, with an accuracy of 69.2% in 29 independent test samples. RF on gene-expression data for CRC patients was effectively able to stratify responders to FOLFOX therapy, and use of pharmacogenomics in anticancer therapy is the first step in planning personalised therapy.

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：大腸がん マイクロアレイ 薬剤感受性 遺伝子プロファイル 機械学習法 個別化医療

### 1. 研究開始当初の背景

薬剤投与時に見られる応答性や副作用の個体差はゲノム多型や発現遺伝子の影響を受けると考えられる。特に抗癌剤投与では無効例に対して長期間に渡り投与を行い QOL を著しく低下させる可能性があり、投与前にその有効性を予測することが重要である。発現解析により患者の層別化を行うには薬剤投与の条件を患者間で整え、かつ解析可能な数を揃えることが困難であるが、当科ではすでに切除不能大腸癌に対する FOLFOX 治療開始前の凍結検体を 100 例以上保存しており、これらを利用して遺伝子発現解析により抗癌剤感受性を高確率で予測することによる個別化医療の実践を目的とする。

### 2. 研究の目的

マイクロアレイ技術の普及により各癌腫の切除検体のプロファイリングが広く行われ、数千から数万の遺伝子発現レベルの変化より predictor gene を選択し、遺伝子レベルでの診断が試みられている。当研究室でも肝細胞癌及び大腸癌に対して包括的遺伝子解析を行い、その情報処理に対して bioinformatics の技術の集積により、臨床に即してマイクロアレイデータを解析して報告している。すなわち肝細胞癌における発現遺伝子群の染色体上のバイアス (*Cancer Res*, 2004)、肝癌進展に寄与する染色体変化 (*Hepatology*, 2009)、肝癌及び大腸癌におけるゲノム変化 (*Oncogene*, 2006; *Genes Chromosome Cancer* 2010) 及び包括的エピゲノム解析 (*Clin Cancer Res*, 2010; *Cancer Sci* 2010) など単なる発現解析だけに止まらない肝癌及び大腸癌における発癌や

進展の責任遺伝子の同定、遺伝子発現と染色体やエピジェネシスを関連させた解析を行ってきた。これらの包括的遺伝子解析技術に加えてバイオインフォマティクスによる解析の経験が蓄積されており、薬剤感受性遺伝子やゲノム多型を特定する Pharmacogenomics による抗癌剤感受性スクリーニング法の確立を目指している。

### 3. 研究の方法

本研究では 83 例の切除不能大腸癌患者より得られた大腸癌サンプル(大腸癌原発 56 例、肝転移 23 例、肺転移 1 例、腹膜播種 3 例)より RNA を抽出し、Affymetrix 社の GeneChip、U133 アレイを用いて行った。

患者はすべて化学療法を術前または生検前に施行せず、術後に FOLFOX6 を計 4 回施行後に CT にて治療効果の判定を行った。

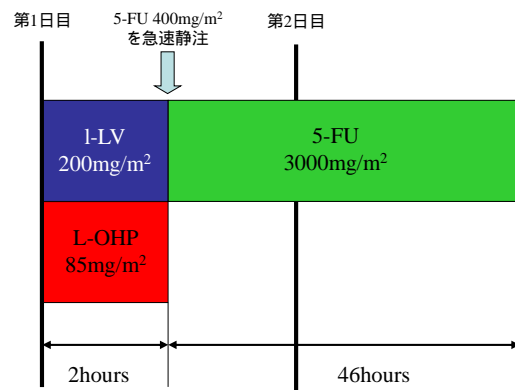


図1 FOLFOX6 プロトコール

	responder (n=42)	non-responder (n=41)	total (n=83)	p-value
age (yrs)	64.0 ± 10.2	61.8 ± 12.3	62.9 ± 11.3	N.S.*
gender (male/female)	27/15	27/14	54/29	N.S.**
CEA (ng/ml)	299.0 ± 772.9	339.9 ± 756.6	319.2 ± 760.5	N.S.***
CA19-9 (U/ml)	418.6 ± 941.6	536.4 ± 1085.2	476.8 ± 1010.6	N.S.***
differentiation grade (well/mod/poor)	32/9/1	30/7/4	62/16/5	N.S.**
primary lesion (rt/l)	18/24	18/23	36/47	N.S.**
metastatic lesion (liver/lung/bone/peritoneum)	32/7/0/3	32/3/2/4	64/10/2/7	N.S.**

\*. t-test; \*\*. Fisher's test; \*\*\*. Wilcoxon's test. N.S., not significant

上記の 83 例より無作為に 54 例 (27responder, 27non-responder) をトレーニングセット、29 例 (15responder, 14non-responder) をテ

ストセットとし、前者より FOLFOX 治療の効果予測セットを構築し後者の 29 例によってセットの妥当性について検証した。さらに予測セットの精度を上げるために outlier サンプルを以下の計算式より決定し、トレーニングセットから除外して再度効果予測セットを作り、29 例のテストセットによる検証は outlier サンプルを除いたセットを用いて行った。

$$outlier(i) = \frac{n}{\sum_{cl(k)=cl(i)} prox^2(i,k)}$$

outlier は上記の計算式により決定し、8 例が outlier と判定され、トレーニングセットより除外された。n はサンプルサイズを示す。

#### 4. 研究成果

54 例のトレーニングセットをランダムフォレストにより治療効果を予測した結果、responder27 例中 22 例を効果あり、non-responder27 例中 23 例を効果なしと判定した（感度 81.4%、特異度 85.1%、図 2）。

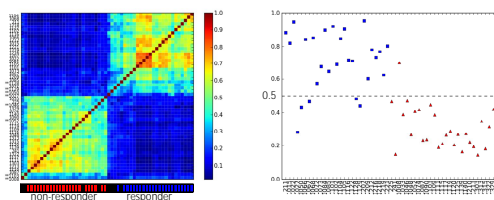


図 2 治療効果予測セットによるトレーニングセットの効果予測

左は予測遺伝子による proximity matrix を、右は out-of-bag cross validation を示す（青: responder、赤: non-responder）。さらに、outlier の計算式により responder, non-responder よりそれぞれ 4 例ずつが outlier と判定され、残りの 46 例についてラ

ンダムフォレストにより再度効果判定を行った（図 3）。

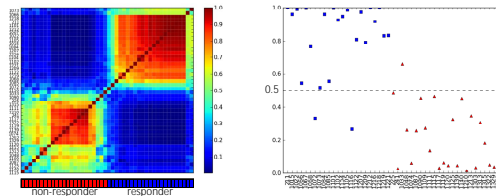


図 3 outlier 除外後の効果予測

outlier 除外後のサンプルについては感度が 91.3%、特異度が 95.6%と改善し、*SMURF2*, *MBTD1*, *AP3M2*, *RNF141*, *NPEPPS*, *BPTF*, *FAM73A*, *APPBP2*, *AMZ2P1*, *SRGAP1*, *NMT1*, *CSPP1*, *EIF1*, *CEP290* の 14 遺伝子が効果予測セットとして選別された。

この治療効果予測セットにより 29 例のテストサンプルについて効果判定を行った。responder15 例中 12 例が治療効果あり、non-responder14 例中 13 例が治療効果なしと判定された（感度 80.0%、特異度 92.8%）。

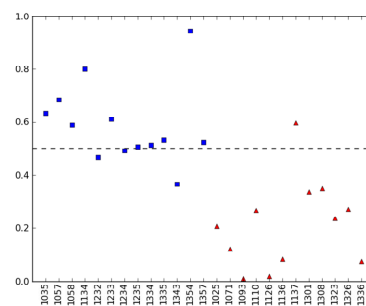


図 4 テストサンプルの効果判定結果

以上の治療効果判定方法について、臨床上の意義を確認する目的でトレーニングセットにおいて治療効果ありと判定（Group 1, n = 26）治療効果なしと判定（Group 2, n = 28）テストセットにおいて治療効果ありと判定（Group 3, n = 13）治療効果なしと判定（Group 4, n = 16）した群をそれぞれのサン

プルセットで治療開始後の全生存を比較した。

トレーニングセットでは Group 1, 2 の全生存の中央値はそれぞれ 35.1 ヶ月および 12.5 ヶ月で有意に治療効果ありと判定された患者群の予後が良好であった ( $P = 0.0052$ )。この結果は効果予測判定に従って化学療法を行った場合には有意に予後が延長する一方で、効果なしと判定された群では異なるプロトコルの抗癌剤治療を行うべきであるという事実を示唆するものである。

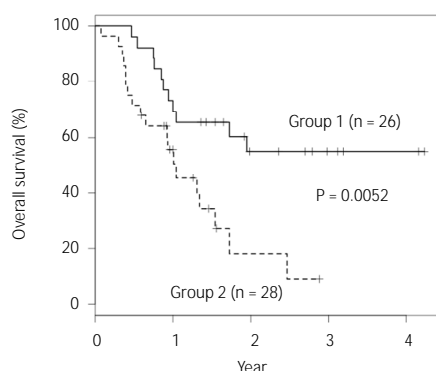


図 5 トレーニングセットにおける全生存

また、テストセットサンプルにおいても Group 3, 4 の 2 年生存率はそれぞれ 69.8%、38.6%と有意に治療効果ありと判定された群の予後が良好であり ( $P = 0.032$ )、トレーニングセットと同様の結果であった。

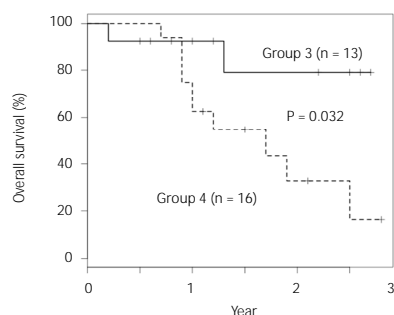


図 6 テストセットにおける全生存

以上、治療開始前の腫瘍の遺伝子発現レベルより機械学習アルゴリズムを用いることにより治療効果の予測を判定することが可能であり、個別化医療が可能であることが示された。

#### 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 14 件)

Ishizawa T, Masuda K, Urano Y, Kawaguchi Y, Satou S, Kaneko J, Hasegawa K, Shibahara J, Fukayama M, Tsuji S, Midorikawa Y, Aburatani H, Kokudo N. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green-fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma Short running head: ICG-fluorescence imaging of HCC. **Ann Surg Oncol**. 2014; 21: 440-8. 査読有

Mochizuki S, Nakayama H, Higaki T, Okubo T, Midorikawa Y, Moriguchi M, Aramaki O, Yamazaki S, Sugitani M, Takayama T. Repeat liver resection for hepatocellular carcinoma complicating primary biliary cirrhosis. **Int Surg**. 2013; 98: 424-7. 査読有

Kurabe N, Hayasaka T, Ogawa M, Masaki N, Yoshimi Ide Y, Waki M, Nakamura T, Kurachi K, Kahyo T, Shinmura K, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Setou M, Sugimura H. Accumulated phosphatidylcholine (16:0/16:1) in human colorectal cancer; possible involvement of LPCAT4. **Cancer Sci**. 2013; 104: 1295-302. 査読有

Yoshida N, Midorikawa Y, Kajiwarra T, Yoshida N, Nakayama H, Sugitani M, Takayama T. Hepatocellular carcinoma with sarcomatoid change without

anticancer therapies. **Case Rep**

**Gastroenterol.** 2013; 7: 169-74. 査読有

Yamazaki S, Takayama T, Okada S, Iwama A, Midorikawa Y, Moriguchi M, Nakayama H, Higaki T, Sugitani M. Good Candidates for a Third Liver Resection of Colorectal Metastasis. **World J Surg.** 2013; 37: 84 査読有

Midorikawa Y, Takayama T, Shimada K, Nakayama H, Higaki T, Moriguchi M, Nara S, Tsuji S, Tanaka M. Marginal survival benefit in the treatment of early hepatocellular carcinoma. **J Hepatol.** 2013; 58: 306-11. 査読有

Yamato I, Takayama T, Midorikawa Y, Higaki T, Nakayama H, Moriguchi M, Nakajima Y, Matsuoka S, Ogawa M, Moriyama M. Postoperative outcomes of patients with hepatocellular carcinoma negative for all virus-related markers.

**Surg Today.** 2013; 43: 865-70. 査読有

Yamazaki S, Takayama T, Moriguchi M, Mitsuka Y, Okada S, Midorikawa Y, Nakayama H, Higaki T. Criteria for prophylactic drainage tube removal in liver resection: the "3 x 3 rule". **Br J surg.** 2012; 99: 1584-90. 査読有

Okamoto K, Ishiguro T, Midorikawa Y, Ohata H, Izumiya M, Tsuchiya N, Sato A, Sakai H, Nakagama H. miR-493 induction during carcinogenesis blocks metastatic settlement of colon cancer cells in liver.

**EMBO J.** 2012; 31: 1752-63. 査読有

Midorikawa Y, Tsuji S, Takayama T, Aburatani H. Genomic approach towards personalized anti-cancer drug therapy.

**Pharmacogenomics.** 2012; 13: 191-9. 査読有

Tsuji S, Midorikawa Y, Takahashi T, Yagi K, Takayama T, Yoshida K, Sugiyama

Y, Aburatani H. Potential responders to FOLFOX therapy for colorectal cancer by Random Forests analysis. **Br J Cancer.** 2012; 106: 126-32. 査読有

Midorikawa Y, Takayama T. Caudate lobectomy (segmentectomy 1) (with video). **J Hepatobiliary Pancreat Sci.** 2012; 19: 48-53. 査読有

Tsuchiya N, Izumiya M, Ogata-Kawata H, Okamoto K, Fujiwara Y, Nakai M, Okabe A, Schetter AJ, Bowman ED, Midorikawa Y, Sugiyama Y, Aburatani H, Harris CC, Nakagama H.

Post-transcriptional regulation of p21 in the determination of p53-dependent cellular fate by the tumor-suppressor miR-22. **Cancer Res.** 2011; 71: 4628-39. 査読有

Nagae G, Isagawa T, Shiraki N, Fujita T, Yamamoto S, Tsutsumi S, Nonaka A, Yoshiba S, Matsusaka K, Midorikawa Y, Ishikawa S, Soejima H, Fukayama M, Suemori H, Nakatsuji N, Kume S, Aburatani H. Tissue-specific demethylation in CpG-poor promoters during cellular differentiation. **Hum Mol Genet.** 2011; 20: 2710-21. 査読有

[学会発表](計5件)

Genome-wide analysis of stepwise hepatocarcinogenesis using next generation sequencer.

Midorikawa Y, Yamamoto S, Ueda H, Sonoda K, Tsuji S, Tatsuno K, Shibata T, Covington K, Morgan M, Wheeler D, Takayama T, Aburatani H..

AASLD The Liver Meeting (Washington DC; 2013.11.2.)

New epigenetic biomarker for colorectal cancer.

Takane K, Midorikawa Y, Yagi K, Sakai A,

Aburatani H, Takayama T, Kaneda A.  
104th, American Association for Cancer  
Research (Washington DC; 2013.4.9.)

Genome-wide analysis of stepwise  
hepatocarcinogenesis using next  
generation sequencer

Midorikawa Y, Takayama T, Yamamoto S,  
Ueda H, Sonoda K, Takane K, Tsuji S,  
Nagae G, Tatsuno K, Morgan M, Wheeler  
D, Aburatani H.

104th, American Association for Cancer  
Research (Washington DC; 2013.4.9.)

Integrative analysis of genome-wide  
methylation and expression profiles for  
metastatic colorectal cancer.

Midorikawa Y, Tsuji S, Nagae G, Tadatoshi  
Takayama T, Sugiyama Y, Aburatani H

103rd, American Association for Cancer  
Research (Chicago; 2012.4.3.)

Identification of potential responders to  
chemotherapy against colorectal cancer by  
predictor genes and activated pathways  
using Random Forests analysis.

Midorikawa Y, Tsuji S, Takahashi T, Yagi  
K, Takayama T, Yoshida K, Sugiyama Y,  
Aburatani H.

102nd, American Association for Cancer  
Research (Orland; 2011.4.4.)

〔図書〕(計 4 件)

1) 緑川 泰、高山忠利：アルゴリズムに沿  
った良方針 肝癌治療の要点と盲点 文光  
堂 東京：78-85, 2013.

2) 緑川 泰、高山忠利：肝尾状葉切除 肝胆  
膵脾手術アトラス 金原出版 東京：711-4,  
2013.

3) 緑川 泰、山本尚吾、高山忠利、油谷浩幸：  
メタボ肝癌の病態. メタボ肝癌、アークメデ  
ィア 東京：81-8, 2013.

4) 緑川 泰、高山忠利、田中正俊：ガイド  
ラインと集学的治療 肝癌診療 Q&A 中外

医学社 東京：125-8, 2013.

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等  
なし

6. 研究組織  
(1)研究代表者  
緑川 泰 (MIDORIKAWA Yutaka)  
日本大学・消化器外科・助教  
研究者番号：10292905

(2)研究分担者  
なし

(3)連携研究者  
なし