

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23659656

研究課題名（和文）

miR-gene pathway を応用した胃癌白金製剤感受性因子の同定と臨床応用

研究課題名（英文）

The identification of miR-gene pathway regulating the sensitivity of platinum agents for gastric cancer and its clinical application

研究代表者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究部・教授

研究者番号：20240905

研究成果の概要（和文）：白金製剤である cisplatin (CDDP) は切除不能再発胃癌に対して、S-1 との併用が標準治療として行われているが、S-1 単剤投与群と比較して有害事象が多く見られる点が問題である。現在、有害事象も少なく特に高齢者に対しては有用である Oxaliplatin (L-OHP) を含むレジメンも期待される。DNA repair pathways が白金製剤の感受性、耐性に関与することが報告され、塩基修復に関与する遺伝子の発現が、白金製剤の耐性に関与し、その発現が白金製剤の感受性予測因子になりうるかを検討した。

研究成果の概要（英文）：A platinum agent, cisplatin (CDDP) plus S-1 is the standard regimen for unresectable or recurrent gastric cancer. However, grade 3/4 adverse events are frequently observed in patients received with CDDP based regimen. Oxaliplatin (L-OHP) is a third-generation platinum compound and the non-inferiority of L-OHP-based regimens to CDDP-based regimen was demonstrated in large phase III study for esophagogastric cancer. Furthermore, L-OHP is associated with less toxicity and better tolerability, especially in older patients and significant survival benefit over CDDP. In the current study, we examined the expression of the novel genes regulating the sensitivity for platinum agents in clinical samples and whether these genes expression is associated with the sensitivity to CDDP using by clinical samples.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	2,800,000	840,000	3,640,000

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：塩基修復遺伝子、白金製剤耐性、microRNA、胃癌

1. 研究開始当初の背景

本邦において切除不能・進行再発胃癌に対して S-1+cisplatin (CDDP) 療法が標準治療として位置づけられている。また、oxaliplatin (L-OHP) の非劣性が証明され、より毒性が低く外来治療が可能なレジメンが検討されている。CDDP と L-OHP は互いに非交叉耐性を示すことが明らかではあるが、これら白金製剤

の感受性を規定する分子生物学的マーカーは存在せず、その同定は急務である。

2. 研究の目的

本研究ではわれわれが大腸癌で報告した白金製剤感受性遺伝子を胃癌に応用し、さらに microRNA array を用いて、これらの遺伝子の制御機構を、microRNA を頂点とした

pathway を解明し、感受性マーカーとしての応用や、創薬へ応用することを目的とする

3. 研究の方法

- (1) 白金製剤感受性因子の臨床検体におけるその発現と感受性との相関の検討
- (2) これらの遺伝子を制御する microRNA の *in silico* での同定

4. 研究成果

- (1) 塩基修復遺伝子 DNA polymerase beta (POLB) と CDDP 耐性への関与

以前、われわれは大腸癌において POLB 遺伝子が白金製剤感受性に関与することを報告したが、胃癌臨床検体の癌部および非癌部の POLB mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法で測定した。その結果、大腸癌組織では癌部が有意に非癌部と比較し、高発現であったが、胃癌ではその発現に有意差は認めなかった。また、胃癌細胞株の POLB mRNA の発現を定量的 RT-PCR 法で測定したところ、大腸癌細胞株と比較し、その発現は全体的に低下していた。以上より、日常臨床において大腸癌では CDDP の投与は行われませんが、胃癌においては key drug になることが示唆された。

次いで、初診時に切除不能進行胃癌と診断された治療前の内視鏡的生検サンプルおよび、根治術後の再発例の切除標本サンプルを対象に、免疫組織学的に POLB 蛋白の発現を検討した。POLB 高発現症例は 34 例中 12 例 (35.3%) に認められた。治療前内視鏡的生検サンプルでは POLB 蛋白は陰性であった症例は、同時多発性肝転移を伴う切除不能進行胃癌と診断され、S-1+CDDP 療法を施行し、肝転移は消失し、根治手術が施行された。一方で根治術後切除標本サンプルでは POLB 蛋白が強陽性であった症例は根治手術後の異時性多発肝転移の診断となり、S-1+CDDP 療法が施行されるも、治療開始後 2 か月で急速な腫瘍の増大を認め、癌死された。

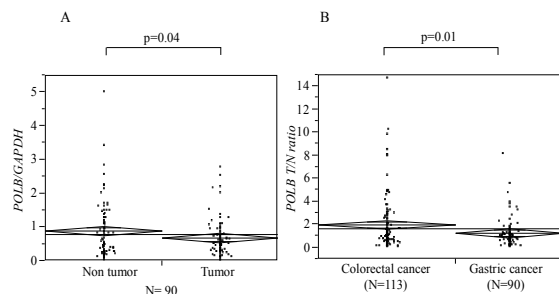
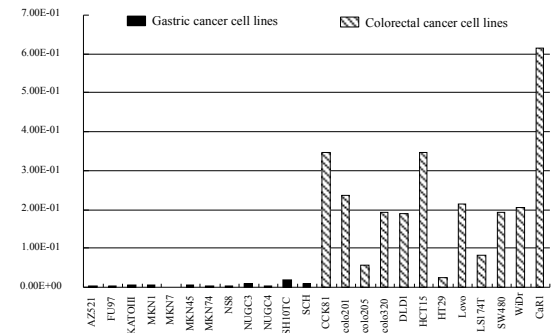
POLB 蛋白の発現と CDDP 感受性の検討

今回対象とした 35 症例のうち、5 症例が根治術後再発症例、29 例が切除不能進行胃癌症例であった。POLB 蛋白陽性症例では CDDP 奏功例は全例に認められず、化学療法後に根治切除が施行される症例も認められなかった。

本研究では胃癌細胞株は一定して、大腸癌細胞株より POLB mRNA の発現は低下しており、この結果より胃癌では CDDP 感受性が高いことが予測された。しかしながら、POLB 高発現症例では CDDP 耐性を示した。日常臨床では performance status の低下した症例や高齢者には化学療法を行う上で、化学療法による効果と有害事象はいずれも考慮する必要がある。L-OHP ベースのレジメンは prehydration が不要であり、外来での化学療法が可能である。現在進行中の L-OHP レジメンの第 III 相

試験の結果が待たれるが、治療前に CDDP の感受性を予測することは日常臨床において非常に有用である。また、切除不能進行胃癌であれば内視鏡的生検サンプル、根治術後再発症例では切除標本が利用できるため、これらのサンプルを用いて、CDDP の感受性予測をすることは効果、有害事象の何れの点においても重要であると思われる。

現在、POLB 遺伝子の制御機構として microRNA に注目し、研究を推進している。TargetScanHuman (6.2 June 2012) により POLB 遺伝子を標的とする microRNA の候補として microRNA-499 が *in silico* で挙げられる。microRNA-499 は非小細胞肺癌にて、血清中のその存在は予後を規定する因子として近年、報告され注目を浴びている (Hu et al. J Clin Oncol)。われわれは血清中 microRNA-499 が CDDP の感受性因子になり得るかを現在、検討している。



- (2) excision repair cross-complementing group 1 (ERCC1)

切除不能大腸癌に対する irinotecan による一次治療を受けていない症例の二次治療として、IRIS 療法と FOLFIRI 療法を比較する FIRIS 試験が行われた。その結果、IRIS 療法が FOLFIRI 療法に非劣性であることが証明された。また、サブセット解析の結果、L-OHP による前治療歴がある集団では、IRIS 療法の方が有意に良い効果を示すことが明らかになった。

この臨床試験の結果から、L-OHP の感受性が低い細胞は DPD 発現が高く、DPD 阻害剤を含む DIF 製剤である S-1 が効くのではないかと仮説を立て、NCI 抗癌剤スクリーニングデータベースを用いて、L-OHP 感受性デー

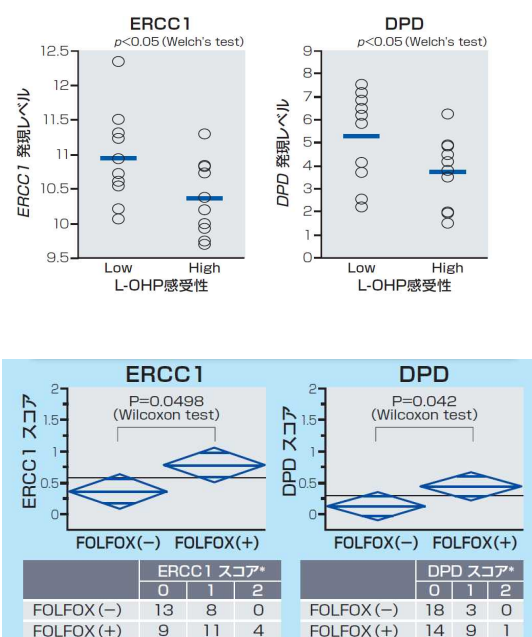
タ (全 60 株) から、L-OHP 高感受性の 10 株と低感受性の 10 株を抽出し、L-OHP の効果を規定する因子である ERCC1 発現と DPD 発現の関連性を検討した結果、両者には正の相関を認めた。

さらに、L-OHP 高感受性群では、ERCC1 の mRNA の発現が低く、逆に低感受性群では、ERCC1 の mRNA の発現が有意に高いことが示された。よって、一次治療でオ L-OHP ベースの治療に抵抗性を示した細胞は、ERCC1 の mRNA の発現レベルが高い、つまり、DPD 発現が高い細胞であることが示唆された。

実際の臨床検体を用いて、L-OHP を含まない一次治療を受け、肝転移を切除した 21 症例と、L-OHP を含む一次治療を受け、肝転移を切除した 24 症例で ERCC1、DPD 遺伝子の mRNA の発現を測定した。その結果、ERCC1 遺伝子の発現と DPD 遺伝子の発現は、一次治療で L-OHP を用いた症例で有意に高いことが明らかとなり、細胞株での結果が実際の臨床検体でも同様であることが示された。FOLFOX 療法を受けた症例では ERCC1 mRNA と DPD mRNA の発現は L-OHP を投与されない症例と比較し、1.8 倍と 6.5 倍であった。

今回の解析では、L-OHP および 5-FU を含む化学療法後に残存する癌細胞では、それらに対する耐性に関与する ERCC1 や DPD が亢進していることを臨床検体により検証した。したがって、残存病変には DIF 製剤が有効となる可能性が示唆され、L-OHP ベースの 1 次化学療法後の ERCC1 および DPD の高値は、2 次化学療法の感受性に関連する可能性がある。

この結果は、実臨床において胃癌でも適応することができる。現在、胃癌において細胞株、臨床検体を用いて、同様の検討を行っており、これらの遺伝子を制御する microRNA を検索中である。



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 189 件)

- 「Phase II trial of alternating mFOLFOX6 and FOLFIRI regimens in the first-line treatment for unresectable or metastatic colorectal cancer (KSCC0701).」
Oki E, Emi Y, Akagi Y, Tokunaga S, Sadanaga N, Tanaka T, Ogata Y, Saeki H, Kakeji Y, Baba H, Nishimaki T, Natsugoe S, Shirouzu K, Maehara Y; Kyushu Study Group of Clinical Cancer. *Oncology* 84:233-9, 2013 査読有
Doi: 10.1159 /000346690.
- 「Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma.」
Tanaka Y, Kamohara H, Kinoshita K, Kurashige J, Ishimoto T, Iwatsuki M, Watanabe M, Baba H.
Cancer 119:1159 -67, 2013 査読有
Doi: 10.1002/cncr.27895.
- 「Upregulation of ERCC1 and DPD expressions after oxaliplatin-based first-line chemotherapy for metastatic colorectal cancer.」Baba H, Watanabe M, Okabe H, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Baba Y, Iwatsuki M, Chikamoto A, Beppu T.
Br J Cancer 107:1950-5, 2012 (Epub 2012 Nov 20.) 査読有
Doi: 10.1038/bjc.2012.502.
- 「Recent advances in diagnosis and treatment for malignancies of the gastrointestinal tract.」
Watanabe M, Baba H, Ishioka C, Nishimura Y, Muto M.
Digestion 85:95-98, 2012 査読有
Doi: 10.1159/000334677.
- 「PN2 expression predicts response to docetaxel in oesophageal squamous cell carcinoma.」
Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M, Kinoshita K, Saito S, Nagai Y, Ishimoto T, Baba Y, Mimori K, Baba H.
Br J Cancer 107:1233-8, 2012 査読有
Doi: 10.1038/bjc.2012.396.
- 「MicroRNA-200 regulates cell proliferation, invasion and migration by directly targeting ZEB2 in gastric carcinoma.」
Kurashige J, Kamohara H, Watanabe M, Hiyoshi Y, Iwatsuki M, Tanaka Y,

Kinoshita K, Saito S, Baba Y, Baba H.
Ann Surg Oncol 119: 656-64, 2012 査読
有 Doi: 10.1245/s10434-012-2217-6.

[学会発表] (計 677 件)

- (1) 「治癒切除不能進行・再発胃癌に対する
新たな治療戦略」
井田 智、馬場秀夫.
第 28 回日本消化器癌発生学会 2012 年
11 月 15 日 徳島県 ルネッサンスリゾ
ートナルト
- (2) 「胃癌における HER2 陽性微量癌細胞を
標的とした個別化治療への応用」
岩槻政晃、渡邊雅之、石本崇胤、岩上志
朗、馬場祥史、馬場秀夫.
第 67 回日本消化器外科学会 2012 年 7
月 18 日 富山県 富山県民会館
- (3) 「高齢者胃癌患者における Glasgow
Prognostic Score (GPS) の検討」
平島浩太郎、渡邊雅之、蔵重淳二、木下
浩一、齋藤誠哉、井田 智、石本崇胤、
長井洋平、岩槻政晃、岩上志朗、馬場祥
史、宮本裕士、別府 透、馬場秀夫.
第 112 回日本外科学会定期学術集会
2012 年 4 月 14 日 千葉県 幕張メッセ
国際会議場
- (4) 「食道扁平上皮癌におい microRNA-223
は癌抑制遺伝子ユビキチンリガーゼ複
合体基質ユニット FBXW7 の発現を制御す
る。」
蔵重淳二、渡邊雅之、田中洋平、木下浩
一、齋藤誠哉、岩槻政晃、馬場祥史、蒲
原英伸、馬場秀夫.
第 112 回日本外科学会定期学術集会
2012 年 4 月 13 日 千葉県 幕張メッセ
国際会議場
- (5) 「Overexpression of microRNA-223
regulates the ubiquitin ligase FBXW7
in esophageal squamous cell
carcinoma.」
Kurashige J, Watanabe M, Iwatsuki M,
Baba Y, Baba H.
AACR Annual Meeting 2012 2012 年 4
月 2 日 USA McCormick Place West
- (6) 「Changes in expression levels of
excision repair cross-complementing
group 1 (ERCC1) and dihydropyrimidine
dehydrogenase (DPD) during
first-line oxaliplatin-based
treatment of advanced metastatic
colorectal cancer (mCRC).」
Baba H, Watanabe M, Okabe H, Miyamoto
Y, Sakamoto Y, Baba Y, Iwatsuki M,
Chikamoto A, Beppu T.
ASCO GI 2012 California 2012 年 1 月
19 日 USA The Moscone West Building
- (7) 「胃癌における microRNA-200 b による
浸潤転移機構の制御」
蔵重淳二、渡邊雅之、蒲原英伸、日吉幸
晴、木下浩一、齋藤誠哉、田中洋平、岩
槻政晃、馬場祥史.
第 70 回日本癌学会学術総会 2011 年 10
月 3 日～5 日愛知県 名古屋国際会議場
- (8) 「胃癌における新規白金製剤耐性因子
PLOB 遺伝子の発現の検討」
岩槻政晃、渡邊雅之、蔵重淳二、木下浩
一、石本崇胤、岩上志朗、馬場祥史、馬
場秀夫.
第 43 回胃病態機能研究会 2011 年 7 月
30 日 大阪府 シェラトン都ホテル大
阪
- (9) 「SPEM (spasmyolytic polypeptide-
expressing metaplasia) を介した胃癌発
生における CD44 の役割」
石本崇胤、渡邊雅之、井田 智、長井洋
平、岩上志朗、坂本快郎、岩槻政晃、馬
場祥史、宮本裕士、和田剛幸、永野 修、
佐谷秀行、馬場秀夫.
第 43 回胃病態機能研究会 2011 年 7 月
30 日 大阪府 シェラトン都ホテル大
阪
- (10) 「胃癌化学療法における新規白金製剤
耐性因子の同定」
岩槻政晃、渡邊雅之、岩上志朗、馬場祥
史、林 尚子、三森功士、森 正樹、馬
場秀夫.
第 66 回日本消化器外科学会総会 2011
年 7 月 4 日 愛知県 名古屋国際会議場
- (11) 「胃癌における microRNA-200 b による
浸潤転移機構の制御」
蔵重淳二、渡邊雅之、田中洋平、木下浩
一、齋藤誠哉、日吉幸晴、岩槻政晃、馬
場祥史、馬場秀夫.
第 20 回日本がん転移学会学術集会・総
会 2011 年 7 月 1 日 静岡県 アクトシ
ティ浜松 コンgressセンター
- (12) 「胃癌における microRNA-200b による癌
浸潤転移の制御機構」
蔵重淳二、渡邊雅之、木下浩一、齋藤
誠哉、佐藤伸隆、辛島龍一、平島浩太郎、
日吉幸晴、岩槻政晃、蒲原英伸、林 尚
子、馬場秀夫.
第 111 回日本外科学会定期学術集会
2011 年 5 月 26 日～28 日 震災の為紙上
開催

6. 研究組織

(1) 研究代表者

馬場 秀夫 (BABA HIDEO)

熊本大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号: 20240905

(2)研究分担者

渡邊 雅之 (WATANABE MASAYUKI)

熊本大学・大学院生命科学研究部・准教授

研究者番号：80254639

平島 浩太郎 (HIRASHIMA KOTARO)

熊本大学・医学部附属病院・非常勤診療医師

研究者番号：10594468