

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 20 日現在

機関番号：32409

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592527

研究課題名(和文) 網羅的マイクロRNA解析を利用した卵巣癌に対する新規TC療法の効果予測因子の探索

研究課題名(英文) Biomarker discovery using miRNA expression array in patients with ovarian cancer treated with dose-dense Paclitaxel combined with intraperitoneal chemotherapy of Carboplatin

研究代表者

長谷川 幸清 (Hasegawa, Kosei)

埼玉医科大学・医学部・准教授

研究者番号：30534193

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：卵巣癌に対するPaclitaxel/Carboplatinの新規投与法(dose-dense Paclitaxel 静脈投与 / Carboplatin腹腔内投与、以下ddTCip療法)第II相試験の臨床検体および臨床情報を利用してバイオマーカーの探索を行った。マイクロRNAマイクロアレイ解析を行い、クラスタリング解析の結果、PR以上の奏効率が得られた症例ではmiR-100, miR-126, miR-145などのマイクロRNAの有意な発現低下が認められた。またプラチナ耐性ではmiR-142-3p, miR-28-5p, などの発現亢進が認められ、新規バイオマーカー候補と考えられた。

研究成果の概要(英文)：We investigated the biomarker of ovarian cancer using the samples and clinical information of a phase II study of dose-dense Paclitaxel combined with intraperitoneal chemotherapy of Carboplatin (ddTCip). We performed miRNA array, and analyzed miRNA expression and its relationship with clinical information. We found decreased levels of miR-100, miR-126, and miR-145 expression in patients with PR or CR, which suggests potential predictive marker for ddTCip therapy. In addition, we observed increased levels of miR-142-3p and miR-28-5p expression in platinum resistant ovarian cancer patients. Confirmation and validation is warranted in on-going phase III trial of ddTCip therapy (iPocc trial).

研究分野：婦人科腫瘍学

キーワード：卵巣癌 マイクロRNA 遺伝子発現 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

卵巣がんはもっとも死亡率の高い婦人科がんであり、なかでも腹膜播種を伴う進行期ではプラチナ製剤、タキサン製剤の誕生により生存率の改善はある程度確認できたものの、多くの場合2年以内に再発しやがては化学療法耐性となるため予後はきわめて不良である。そのため新しい治療法の開発や、臨床上有用なバイオマーカーの発見、さらには新規治療標的の同定は急務である。進行期卵巣がんにおける初回手術後の残存腫瘍が1 cm以上のsuboptimalな症例の場合、Paclitaxel(180 mg/m²)ならびにCarboplatin (AUC=5~6)を3週毎にivで投与するTC療法が標準的に行われている。しかしながら標準TC療法の奏効率は70%程度であり、より奏効率の高い治療法開発が必要とされている。これに対して藤原らはCarboplatinの投与経路を腹腔内投与に変更し、奏効率の向上が得られることを報告している。また最近、TC療法を改善したものとして、Paclitaxelを80mg/m²で毎週投与(dose dense)する臨床試験(JGOG3016)が婦人科悪性腫瘍化学療法研究機構によって行われ、標準的TC療法に比べ高い抗腫瘍効果が認められている。一方、この試験ではPaclitaxelのdose-dense投与による血液毒性などの副作用の頻度が高いことが報告され、患者個人の遺伝的背景や癌の個性(遺伝子発現/メチル化パターン等)に合わせたテーラーメイド医療の確立が急務である。これらの結果を踏まえ、私たちのグループは岩手医科大学産婦人科、自治医科大学産婦人科、鳥取大学がんセンターと共同で、dose-dense Paclitaxel/Carboplatin腹腔内投与併用療法(以下ddTCip療法)という新たな投与方法によるTC療法の臨床研究(DOFMET Protocol #4/UMIN000001713)を立ち上げた。この研究では、臨床研究と並行し、新規TC療法の有用性・安全性をゲノム薬理学的解析によって検証するため、末梢血リンパ球DNA、腫瘍部・非腫瘍部の迅速凍結組織の保管ならびに初回投与時のPK採血を行っている。

一方、これまでの卵巣癌研究の多くはタンパク質をコードするprotein-coding geneについて焦点が絞られていた。しかし、それ以外のnon-coding geneから転写される、いわゆるnon-coding RNAにも生物学的な機能を持った一群が存在することが近年急速に明らかになっている。non-coding RNAの中でもマイクロRNAと呼ばれる~22塩基からなるsmall RNAはprotein-coding geneの発現制御をおこない、細胞増殖やアポトーシスに深く関わっていると考えられている。これまでの研究では特にマイクロRNAは悪性転化や発生、幹細胞のホメオスタシスなどにおいて重要な役割

を果たしていることがわかってきている。またmRNAと比較してその生物学的安定性からバイオマーカーとしての応用も期待されている。研究代表者である長谷川はペンシルバニア大学の卵巣がんセンター在籍時に、網羅的なマイクロRNA解析により広範なマイクロRNAが卵巣がんにおいて発現低下していることを、また*Let-7 family*のひとつである*Let-7i*の発現低下が卵巣がんのプラチナ耐性に深く関わっており、予後とも相関することを報告した。このようにある種のマイクロRNAは卵巣がんの予後や治療法に対するマーカーや治療標的となる可能性が明らかになってきた。

2. 研究の目的

進行期卵巣がんに対するより良い治療法の開発、治療有効な患者の選別のため、網羅的マイクロRNA解析を利用し、TC療法の新規投与方法(ddTCip療法)の有用性および安全性に関するバイオマーカーを明らかにし、新規分子標的候補を網羅的マイクロRNA解析、網羅的遺伝子発現解析ならびに分子腫瘍学・バイオインフォマティクスの手法を用いて同定し、その生物学的機能について検討する。

3. 研究の方法

ddTCip療法第II相試験のうち、埼玉医大コホートの検体および臨床データを利用した。マイナス80の超低温槽に保管されている卵巣癌の手術組織材料よりNucleSpin miRNAをもちいてマイクロRNA分画を含んだtotalRNAの抽出を行い、続いてAgilent 2100バイオアナライザで泳動、品質チェックを行った。RNA Integrity Number 7以上のサンプル24例のみの解析を行った。腫瘍における約1000種のマイクロRNA発現量をAgilent社のマイクロRNAマイクロアレイを用いて解析した。解析にはアレイ画像情報を発現解析用ソフトGeneSpring GXを用いて標準化を行った。また同様に可能な検体に関してはAgilent社の発現アレイも施行した。マイクロRNAの標的遺伝子の予測にはTargetScanを利用した。

網羅的マイクロRNA発現解析の結果と新規TC投与方法との奏効率や副作用をはじめ、プラチナ耐性やPFS, OSについて特徴的なマイクロRNAの発現群との相関性を解析し、種々の臨床因子との比較を行った。また既存の正常卵巣や境界悪性卵巣腫瘍、良性卵巣腫瘍との比較も行った。発現アレイとの統合解析も行い、臨床的に有用なバイオマーカーの探索を行った。

4. 研究成果

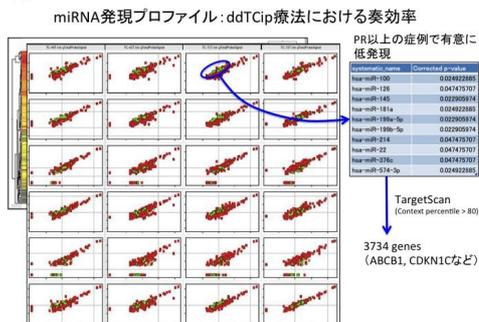
(1) マイクロRNAの発現と臨床病理学的因子との関連
まず、マイクロRNAアレイを臨床病理学的因

子と比較したが、組織型(serous vs その他)、臨床進行期(stage III vs stage IV)、残存腫瘍径(5cm未満 vs 5cm以上)いずれにも関連するような特異的なマイクロRNAの過剰発現あるいは発現低下は認めなかった。これは、今回の ddTCip 療法の登録例のほとんどが進行卵巣癌で組織型のほとんどが high grade serous である事が大きいと考えられた。

(2) マイクロRNA発現プロファイルと ddTCip 療法の奏効率の関連

ddTCip 施行後 2 ヶ月の時点での奏効率とマイクロRNAの発現を比較した。部分奏効(PR)および完全奏効(CR)以上の症例で発現低下を認めるマイクロRNA群が同定できた(図1)。MiR-100, miR-126, miR-145, miR-181a, miR-199a-5p, miR-199b-5p, miR-214, miR-22, miR-376c, miR-574-3p の10のマイクロRNAがPR以上奏効した症例で有意に発現低下している事が明らかになった。これらのマイクロRNAのターゲット遺伝子を TargetScan を用いて予測すると、*ABCB1*や*CDKN1C*などの抗がん剤の耐性や細胞周期に関連するものが多く認められ、その生物学的な作用からも妥当と考えられた。

図1



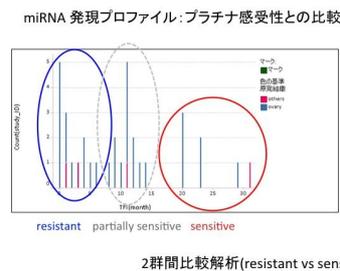
(3) マイクロRNAの発現およびプラチナ感受性との関連

卵巣癌は初回治療後の再発時期により、初回化学療法終了後6ヶ月以内の場合はプラチナ抵抗性(platinum resistant)、それ以後の場合はプラチナ感受性(platinum sensitive)と定義されるが、最近では6ヶ月から12ヶ月の間の再発をプラチナ部分感受性とし、12ヶ月以上がプラチナ感受性とされることも多い。図2に本症例の分布を示す。

プラチナ抵抗性および感受性の2群に分けて、マイクロRNAアレイでのクラスタリング解析を行ったところ、プラチナ抵抗性で有意に発現亢進が認められたマイクロRNA群が明らかになった(図3)。MiR-142-3p, miR-28-5p, miR-96-5p, miR-148a-3p, miR-130b-3p, miR-7-5p, miR-135-5p, miR-301a-3p, miR-10a-5p, miR-195-5p がプ

ラチナ耐性群で有意な発現亢進を認め、化学療法への抵抗性や腫瘍が潜在的にもつ悪性度と関連する可能性が示唆された。

図2



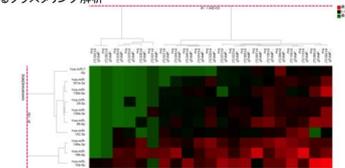
2群間比較解析(resistant vs sensitive)

図3

miRNA array analysis
resistant vs sensitiveで比較し、統計的に有意にresistant群で発現が亢進していたmiRNA (上位10候補)

miRNA name	FDR	log2(intensity)	rank_fc	rank_rp	rank_sam	rank_wald
hsa-miR-142-3p	1	4.31646052	1	1	2	3
hsa-miR-28-5p	0	4.17632893	2	2	2	5
hsa-miR-96-5p	0	3.95897696	3	4	4	16
hsa-miR-148a-3p	0	3.86588802	3	6	4	1
hsa-miR-130b-3p	0	3.802807936	20	6	40	20
hsa-miR-7-5p	0	3.78780661	4	9	12	50
hsa-miR-135-5p	0.000142867	3.69142867	11	16	27	28
hsa-miR-301a-3p	0.000125	3.25636414	12	11	29	29
hsa-miR-10a-5p	0.000101911	3.24830334	47	12	3	8
hsa-miR-195-5p	0.0001	3.115544719	14	14	18	2

これらのmiRNAによるクラスタリング解析



発現亢進が認められた10マイクロRNAのターゲットとして予想される遺伝子は4000以上も存在する。ただし、それらのうち実験的に制御関係が認められた遺伝子で且つ制御方向(マイクロRNA発現亢進に対してmRNA発現低下)が正しいと思われる遺伝子群を抽出すると数は絞られてくる。マイクロRNAと発現アレイの統合解析を図4に示す。

図4



ddTCip 療法第 II 相試験の埼玉医大コホートの症例を用いて、マイクロRNAをよび発現アレイを行って、ddTCip 療法のバイオマーカー探索を行った。その結果、早期の奏効率と関連するマイクロRNAやプラチナ抵抗性に有意に発現亢進を認めるマイクロRNA群の同定

が可能であった。つまり、ddTCipによって恩恵を強く受ける群の抽出が事前に予測できる可能性が示唆されたが、長期予後との比較ができていない。今後はパズウェイ解析も行い、より統合的に奏効群を事前に予測し、プラチナ抵抗性との関連性も検討し、さらに現在進行中のddTCipの第III試験(iPocc試験)の臨床検体を用いて予後を含めたvalidationが望まれる。

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15件)

- Ikeda Y, Hasegawa K, Kurosaki A, Miyara A, Hanaoka T, Shintani D, Imai Y, Nishikawa T, Oda K, Fujiwara K. **The Risk of Ovarian Malignancy Algorithm (ROMA) as a Predictive Marker of Peritoneal Dissemination in Epithelial Ovarian Cancer Patients.** *Oncol Res Treat.* 38:276-281, 2015
- Uehara Y, Oda K, Ikeda Y, Koso T, Tsuji S, Yamamoto S, Asada K, Sone K, Kurikawa R, Makii C, Hagiwara O, Tanikawa M, Maeda D, Hasegawa K, Nakagawa S, Wada-Hiraie O, Kawana K, Fukayama M, Fujiwara K, Yano T, Osuga Y, Fujii T, Aburatani H. **Integrated Copy Number and Expression Analysis Identifies Profiles of Whole-Arm Chromosomal Alterations and Subgroups with Favorable Outcome in Ovarian Clear Cell Carcinomas.** *PLoS One.* 10(6):e0128066, 2015
- Ikeda Y, Yasuda M, Kato, T, Yano Y, Kurosaki A, Hasegawa K. Synchronous mucinous metaplasia and neoplasia of the female genital tract with external urethral meatus neoplasm: A case report. *Gynecol Oncol Reports.* 27-30, 2015
- Matsuo K, Yoshino K, Hasegawa K, Murakami R, Ikeda Y, Adachi S, Hiramatsu K, Yokoyama T, Nishimura M, Sheridan TB, Enomoto T, Fujiwara K, Matsumura N, Konishi I, Fotopoulou C, Roman LD, Sood AK. **Survival outcome of stage I ovarian clear cell carcinoma with lympho-vascular space invasion.** *Gynecol Oncol.* 136(2):198-204, 2015
- Sasaki Y, Miwa K, Yamashita K, Sunakawa Y, Shimada K, Ishida H, Hasegawa K, Fujiwara K, Kodaira M, Fujiwara Y, Namiki M, Matsuda M, Takeuchi Y, Katsumata N. **A phase I study of farletuzumab, a humanized anti-folate receptor monoclonal antibody, in patients with solid tumors.** *Invest New Drugs.* 33(2):332-40, 2015
- Hasegawa K, Nagao S, Yasuda M, Millan D, Viswanathan AN, Glasspool RM, Devouassoux-Shisheboran M, Covens A, Lorusso D, Kurzeder C, Kim JW, Gladieff L, Bryce J, Friedlander M, Fujiwara K. **Gynecologic Cancer InterGroup (GCIG) Consensus Review for Clear Cell Carcinoma of the Uterine Corpus and Cervix.** *Int J Gynecol Cancer.* 24(9 Suppl 3):S90-S95, 2014
- Nagao S, Nishikawa T, Hanaoka T, Kurosaki A, Iwasa N, Hasegawa K, Fujiwara K. **Feasibility Study of Combination Chemotherapy with Paclitaxel, Doxorubicin and Cisplatin without Prophylactic Granulocyte Colony-stimulating Factor Injection for Intermediate-to-high risk or Recurrent Endometrial Cancer.** *Jpn J Clin Oncol.* 44(11):1040-4, 2014
- Li C, Wang J, Hu J, Feng Y, Hasegawa K, Peng X, Duan X, Zhao A, Mikitsh J, Muzykantov V, Chacko AM, Pryma D, Dunn S, Coukos G. **Development, Optimization, and Validation of Novel anti-TEM1/CD248 Affinity Agent for Optical Imaging in Cancer.** *Oncotarget.* 5(16):6994-7012, 2014
- Takeshima N, Matoda M, Abe M, Hirashima Y, Kai K, Nasu K, Takano M, Furuya K, Sato S, Itamochi H, Tsubamoto H, Hasegawa K, Terao K, Otsuki T, Kuritani K, Ito K. **Efficacy and safety of triple therapy with aprepitant, palonosetron, and dexamethasone for preventing nausea and vomiting induced by cisplatin-based chemotherapy for gynecological cancer: KCOG-G1003 phase II trial.** *Support Care Cancer.* 22(11):2891-8, 2014
- Matsuo K, Yoshino K, Hiramatsu K, Banzai C, Hasegawa K, Yasuda M, Nishimura M, Sheridan TB, Ikeda Y, Shiki Y, Mabuchi S, Enomoto T, Kimura T, Fujiwara K, Roman LD, Sood AK. **Effect of Lymphovascular Space Invasion on Survival of Stage I Epithelial Ovarian Cancer.** *Obstet Gynecol.* 123(5):957-965, 2014
- Matsuo K, Sheridan TB, Mabuchi S, Yoshino K, Hasegawa K, Studeman KD, Im DD, Rosenshein NB, Roman LD, Sood AK. **Estrogen Receptor Expression and Increased Risk of Lymphovascular**

- Space Invasion in High-grade Serous Ovarian Carcinoma.** *Gynecol Oncol.* 133(3):473-9, 2014
10. Li C, Chacko AM, Hu J, Hasegawa K, Swails J, Grasso L, El-Deiry WS, Nicolaidis N, Muzykantov VR, Divgi CR, Coukos G. **Antibody-Based Tumor Vascular Theranostics Targeting the Human Endosialin/TEM1 *In Vivo*.** *Cancer Biol Ther.* 15(4):443-51, 2014
11. Fujiwara K, Yoshida H, Hasegawa K. **Update on nonserous ovarian cancer trials.** *Ann Oncol.*;24 Suppl 10:x46-x47, 2013
12. Fujiwara K, Nagao S, Aotani E, Hasegawa K. **Principle and evolving role of intraperitoneal chemotherapy in ovarian cancer.** *Expert Opin Pharmacother.* 14(13):1797-806., 2013
13. Fujiwara K, Kurosaki A, Hasegawa K. **Clinical trials of neoadjuvant chemotherapy for ovarian cancer: what do we gain after an EORTC trial and after two additional ongoing trials are completed?** *Curr Oncol Rep.* 15(3):197-200, 2013

〔学会発表〕(計 3件)

1. Maintenance therapy in gynecological cancers. 56th Meeting of the Japan Society of Gynecologic Oncology 2014/7/18
2. Cancer immunotherapy and tumor immunology Kitakanto Gynecological Chemotherapy Seminar 2014/4/2
3. Soluble folate receptor as a biomarker for ovarian cancer 72th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association 2013/10/03

〔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：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等
<http://www.saitama-med.ac.jp/kokusai/fujinshuyo/research/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

長谷川 幸清 (HASEGAWA KOSEI)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：30534193

(2)研究分担者

江口 英孝 (EGUCHI HIDETAKA)
埼玉医科大学・医学部・准教授
研究者番号：0026023

和田 智 (WADA SATOSHI)
埼玉医科大学・医学部・助教
研究者番号：80438837

(3)連携研究者

なし ()

研究者番号：