

平成 26 年 5 月 22 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659620

研究課題名(和文) 遺伝子発現による大腸癌に対する分子標的薬の効果予測および効果規定遺伝子の検討

研究課題名(英文) Prediction of Response to Molecular-targeting agents in colorectal cancer By Gene expression Analysis

研究代表者

渡邊 聡明 (WATANABE, TOSHIAKI)

東京大学・医学部附属病院・教授

研究者番号：80210920

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円、(間接経費) 840,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌組織の遺伝子発現により、分子標的薬治療の効果予測を行った。bevacizumab療法を行った41症例の大腸癌組織の遺伝子発現をマイクロアレイにて測定し、RT-PCRによる検証を経て、最終的に3遺伝子および2遺伝子による予測式を作成した。その結果、73.2%(3遺伝子)および75.6%(2遺伝子)の精度で効果予測が可能であった。さらに同予測に用いた遺伝子については公開データベース上の薬力学データによる評価を行った。本予測式によりテーラーメイド治療を視野にいれたbevacizumab療法の効果予測を行える可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Based on the gene expression of colorectal cancers, we aimed to build a predictive model for response to chemotherapy based on molecular target agent (bevacizumab). Using 41 samples, we examined gene expression by microarray, then validated them by RT-PCR method. We finally selected 3- and 2-gene sets and made 2-gene and 3-gene predictive models. The accuracy rate of prediction was 73.2%(3-gene model) and 75.6%(2-gene model). We also examined the correlations of these genes with individual drug responses on tumor cell lines deposited on public database.

研究分野：医学歯学

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 DNAマイクロアレイ 化学療法 遺伝子発現

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌の罹患者数は増加傾向にあり、女性の臓器別の死亡原因の第一位は、子宮癌などの婦人科疾患や乳癌ではなく、大腸癌である男性では第三位となっている。こうした中、大腸癌の治療では近年大きな変化がみられた。1990年代のはじめまで、大腸癌に対しては化学療法はあまり効果が期待できないといった状況であったが、その後 oxaliplatin や irinotecan といった新たな薬剤が導入され、切除不能大腸癌に対する治療成績が向上した。さらにその後、分子標的薬が登場して、当初は一年以下であった切除不能大腸癌の生存期間(中央値)が二年、そして三年近くまで延長されるようになった。大腸癌ガイドラインによる治療指針をみても、2005年版と比べて、2014年版で示されている治療内容(アルゴリズムで記載)では大きく異なり、2014年版では治療の選択肢が多くなっている。この様に治療の選択肢が増えた事は、より個別化医療を進める上で利点となる可能性がある一方、問題点でもある。すなわち、多くの選択肢の中からどの療法をどの患者に選ぶべきなのか、これを決定するのが難しい課題となっている。この際、重要となるのは薬剤の効果予測である。どの薬剤が誰に効果があるのか、を明らかにできればより効果的に個別化医療を実践することができる。

一方、bevacizumab は分子標的薬の中でも、大腸癌治療の first line の治療で最も多く使用されている薬剤である。従って、bevacizumab を使用する前に、その効果を予測することが临床上重要なポイントとなる。しかし、大腸癌に対する bevacizumab の効果予測に関しては、これまで報告は少なく、これまでに報告された検討では、主に bevacizumab の標的となる VEGF に注目して、VEGF のシグナル伝達系に關与している因子による効果予測の可能性が検討されている。これらの因子には、plasma VEGF, circulating endothelial cells, gene polymorphism of VEGF and IL-8T-251A, intercellular adhesion molecule (ICAM), KRAS や BRAF 遺伝子などが含まれる。しかし、何れの研究でも、臨床応用を可能にするような精度の高い予測は不可能であり、実臨床で応用される段階には至っていない。

一方、近年マイクロアレイによる遺伝子発現を用いた放射線の効果予測や薬剤の効果予測が報告されている。これまでに我々もマイクロアレイによる遺伝子発現で直腸癌の放射線照射効果の予測を行っている。また、マイクロアレイによる様々な薬剤の効果予測も報告されている。しかし、大腸癌の遺伝子発現による bevacizumab の効果予測に関しては十分に検討は行われていない。

## 2. 研究の目的

本研究では、VEGF のシグナル伝達系に關

与している因子のみに限定することなく、DNA マイクロアレイを用いて5万以上におよぶ遺伝子およびその転写産物を網羅的に解析して、さらにその発現を real-time RT-PCR で検証して bevacizumab の効果の予測を行う。

## 3. 研究の方法

### (1) 大腸癌手術切除組織

本研究参加のインフォームドコンセントが得られ bevacizumab 療法が施行された大腸癌再発症例あるいは切除不能大腸癌症例 41 例を対象とした。再発症例は、原発巣に対する手術を施行後、経過観察中に再発が診断された症例で、血液検査、内視鏡検査、各種画像診断を用いて臨床的に再発と診断された症例とした。また、切除不能大腸癌症例は、大腸癌に同時性の遠隔転移を有する症例で、転移巣の外科的な切除が明らかに困難と判断された症例である。これらの症例の手術時切除標本あるいは内視鏡検査時に採取された大腸癌生検標本を用いて遺伝子発現解析を行った。

### (2) 遺伝子発現解析

採取された大腸癌症例の癌組織を用い、GeneChip 解析を行った。具体的には、凍結標本より RNeasy mini kit(QIAGEN 社)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 (Human Genome U133 plus2.0 chip) にハイブリダイズし薬剤への感受性に關連が考えられる約 54000 種類の遺伝子発現解析を行った。プローブレベルデータは Microarray suite 5 アルゴリズムによる数値化を経て、PerChip/PerGene グローバルノーマライズを行った。

### (3) 化学療法の効果判定

RECIST ガイドライン(ver1.1)に則り最良総合効果を決定して、CR および PR を有効例(Responder)、SD,PD を治療無効例(Non-responder)とした。

### (4) 効果予測式の作成

有効例、無効例間で 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して、これらの遺伝子を用いて、効果予測式を作成した。予測式を作成する際には、GeneSpring (Agilent Technology 社)を用い、Support Vector Machine (SVM) による分類器を作成し、3-fold cross validation を 1000 回施行して予測精度を検証した。

### (5) Real time RT-PCR 法による遺伝子発現解析の検証

効果予測式を作成することができた治療効果と強く相関する遺伝子群を Real time RT-PCR 法にて解析し DNA マイクロアレイ解析結果と比較した。RT-PCR 法での遺伝子発現量は Beta-actin を内部標準遺伝子とする相対発現量として求めた。Real time RT-PCR 法にて効果との有意な關連が確認できた遺伝子

セットを予測遺伝子として採用し、同遺伝子セットを用い、Real time PCR 法にて確定した発現量に基づき SVM 法による予測を行った。(6) 公開データベースによる遺伝子の評価予測に用いた遺伝子と抗癌剤感受性間の関連を NCI/NIH データベース上の抗がん剤スクリーニングパネルデータを用いて評価した。

#### 4. 研究成果

(1) bevacizumab 療法の治療有効例 (responder) は 17 症例、治療無効例 (non-responder) は 23 症例であった。

(2) 41 症例について大腸癌組織での GeneChip による遺伝子発現解析を実施し、responder と non-responder 間で発現レベルに有意な差を認めた 4 遺伝子および 3 non-coding RNA を認識する 11 プローブ [Affymetrix Probe ID; 201169\_s\_at, 205572\_at, 210495\_x\_at, 211719\_x\_at, 212464\_s\_at, 216442\_x\_at, 228915\_at, 229280\_s\_at, 238022\_at, 238320\_at, 243555\_at] を抽出した。

(3) 抽出された 11 プローブを用い SVM により効果予測式を作成した。3-fold cross validation での予測精度は 85.4% であった。このとき、Sensitivity, Specificity, Positive predictive value (PPV), Negative predictive value (NPV) はそれぞれ 87.0%, 83.3%, 83.3%, および 87.0% であった。

(4) 次に予測に用いた 11 プローブの遺伝子発現解析を TaqMan real time RT-PCR により解析し、GeneChip 解析結果を検証し、効果予測に必要な遺伝子数を検索した。その結果、予測に用いる 3 遺伝子 [fibronectin 1 (FN1), angiopoietin 2 (ANGPT2), colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE)], および 2 遺伝子 [FN1, CRNDE] を確定した。FN1, CRNDE および ANGPT2 の Non-Responder / Responder 発現比は、それぞれ 0.30 (t-test; p=0.001), 2.82 (p=0.003) および 0.46 (p=0.004) であった。

(5) 3 遺伝子セットおよび 2 遺伝子セットの発現レベルにより、SVM による効果予測の分類器を作成した。3-fold cross validation での予測精度は 3 遺伝子セットにおいて 73.2% であった。このとき、Sensitivity, Specificity, PPV, および NPV はそれぞれ 61.1%, 82.6%, 73.3% および 73.3% であった。また、2 遺伝子セットにおける予測精度は 75.2% であり、Sensitivity, Specificity, PPV および NPV はそれぞれ 66.7%, 82.6%, 80.0% および 73.1% であった。

(6) 効果予測に用いた遺伝子の発現と *in vitro* 細胞株の抗癌剤感受性関連を公開データベースにより検証したところ、FN1 高発現細胞は 5-FU 単剤への感受性低下を示し、本臨床解析結果とは整合しなかったが、CRNDE 高発現株は一部の分子標的薬への抵抗性を示すことが判った。

#### 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7件)

- 1) Watanabe T, Kobunai T, Akiyoshi T, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K. Prediction of response to preoperative chemoradiotherapy in rectal cancer by using reverse transcriptase polymerase chain reaction analysis of four genes. *Dis Colon Rectum*. 57(1):23-31. 2014 (査読有り)
- 2) Kitayama J, Ishigami H, Yamaguchi H, Yamashita H, Emoto S, Kaisaki S, Watanabe T. Salvage Gastrectomy After Intravenous and Intraperitoneal Paclitaxel (PTX) Administration with Oral S-1 for Peritoneal Dissemination of Advanced Gastric Cancer with Malignant Ascites. *Annals of Surgical* 21(2):539-46. 2013 (査読有り)
- 3) Yamaguchi H, Kitayama J, Ishigami H, Emoto S, Yamashita H, Watanabe T. A phase 2 trial of intravenous and intraperitoneal paclitaxel combined with S-1 for treatment of gastric cancer with macroscopic peritoneal metastasis. *Cancer* 15;119(18):3354-8. 2013 (査読有り)
- 4) Watanabe T, Yoshino T, Uetake H, Yamazaki K, Ishiguro M, Kurokawa T, Saijo N, Ohashi Y, Sugihara K. KRAS Mutational Status in Japanese Patients with Colorectal Cancer: Results from a Nationwide, Multicenter, Cross-sectional Study. *Japanese Journal of Clinical Oncology* 43(7):706-12. 2013 (査読有り)
- 5) Akiyoshi T, Kobunai T, Watanabe T. Recent approaches to identifying biomarkers for high-risk stage II colon cancer. *Surg Today*. 42(11):1037-45. 2012 (査読有り)
- 6) Akiyoshi T, Kobunai T, Watanabe T. Predicting the response to preoperative radiation or chemoradiation by a microarray analysis of the gene expression profiles in rectal cancer. *Surg Today*. 42(8):713-9. 2012 (査読有り)
- 7) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Yamada H, Hayama T, Inoue E, Tamura J, Iinuma H, Akiyoshi T, Muto T. Chromosomal instability (CIN) phenotype, CIN high or CIN low, predicts survival for

colorectal cancer. J Clin Oncol.  
20;30(18):2256-64. 2012 (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

渡邊聡明 (WATANABE TOSHIAKI)

東京大学・医学部・教授

研究者番号：8021092

研究者番号：

##### (2) 研究分担者

( )

研究者番号：

##### (3) 連携研究者

( )

研究者番号：