

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 4 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25670588

研究課題名(和文)大腸癌肝転移における抗癌剤感受性関連遺伝子の網羅的ゲノム・エピゲノム解析

研究課題名(英文)Changes in expression levels of ERCC1, DPD, and VEGFA mRNA after first-line chemotherapy of metastatic colorectal cancer

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：大腸癌肝転移のパラフィン包埋切片からDNAの抽出を行い、抗癌剤感受性関連遺伝子、癌関連遺伝子の発現レベル(RNA、protein)をRT-PCR、免疫染色により評価した。術前にL-OHPを含む治療を受けた症例では、受けていない症例よりも有意にERCC1、DPDレベルが高かった。また、bevacizumab投与症例では、VEGFA発現レベルが有意に高値であった。これらの結果は、大腸癌肝転移に対する2nd line以降のレジメンを選択する際の分子メカニズム的根拠になりうる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Our previous study showed that administering oxaliplatin as first-line chemotherapy increased expression levels of ERCC1 and DPD in liver CRC metastases. Second, whether the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab alters tumoral VEGFA levels is unknown. We conducted this study to validate our previous findings on ERCC1 and DPD, and clarify the response of tumoral VEGFA expression to bevacizumab administration. ERCC1 mRNA expression was significantly higher in the chemotherapy group than in the non-chemotherapy group, and were significantly correlated. VEGFA expression level was higher in patients receiving bevacizumab than in those who did not. This study confirmed that first-line oxaliplatin-based chemotherapy increases ERCC1 and DPD expression levels, potentially enhancing chemosensitivity to subsequent therapy. We also found that bevacizumab induces VEGFA expression in tumor cells, suggesting a biologic rationale for extending bevacizumab treatment beyond first progression.

研究分野：消化器外科学

キーワード：ERCC1 DPD VEGFA 大腸癌 化学療法 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

① 研究の学術的背景

日本における癌死亡率は、現在、第1位が肺癌、第2位が胃癌、第3位が大腸癌(結腸癌、直腸癌)で、消化器全体として見ると、2007年には消化器癌が癌死亡の62%を占めていた。しかも2015年の癌罹患数は、男女ともに大腸癌が最も多くなることが予測されており、大腸癌への対策が医療経済的にも重要視されている。イリノテカン(CPT-11)やオキサリプラチン(L-OHP)など新規抗癌剤と、ここ数年の分子標的治療薬の導入により、大腸癌化学療法は格段の進歩を遂げている。そんななかでわが国において、進行・再発大腸癌に対する二次治療として、FOLFIRI療法とCPT-11+TS-1併用療法(IRIS療法)のランダム化第II/III相比較試験(FIRIS試験)が行われた。5-FU系薬剤またはL-OHPとの併用療法の一次治療に不応・不耐となった進行・再発大腸癌患者を対象に、主要評価項目をPFSとし、標準治療であるFOLFIRI療法に対するIRIS療法の非劣性を検証するデザインである。426例が登録され、PFS中央値はFOLFIRI群(213例)5.1カ月、IRIS群(213例)5.8カ月であり、非劣性が証明(ハザード比1.077, 95% CI 0.879-1.319, $p=0.039$)された。以上から、IRIS療法は、進行・再発大腸癌に対する二次治療として、新たな治療選択肢となり得ることが示された。そして、そのサブセット解析において、前治療としてオキサリプラチン(L-OHP)を含む治療を受けたグループではIRISがFOLFIRIに比べて全生存期間を有意に延長するという興味深い結果が示された。しかし、その分子生物学的メカニズムは全く明らかにされていない。

切除不能大腸癌は、化学療法が格段に進歩した現在でもなお予後は不良であり、基礎研究及び臨床研究により、分子標的療法に代表される革新的な治療法の開発が模索されている。L-OHPを含む治療を受けた症例に対するIRISの有効性を示す分子生物学的メカニズムの解明は、本治療における対象患者選別のマーカーの同定に繋がることが期待され、その分子異常自体が分子標的治療のターゲットになることも考えられる。ヘテロな集団である大腸癌でL-OHP感受性の高い細胞はL-OHPを含む前治療で死滅し、感受性の低い細胞が残って2次治療の対象となるという我々の独創的な仮説を検証した研究は皆無であり、この研究による成果はtranslational researchとして臨床に直結する意義深いものになると考えられる。

2. 研究の目的

L-OHPを含む治療を受けた症例に対するIRISの有効性を示す分子生物学的メカニズムを解明するために、実際の臨床検体を用いて、その基礎的知見を検証すること。

大腸癌肝転移切除標本を用いて、L-OHPを用いた化学療法後の肝切除群と、化学療法なしでの肝切除群における抗癌剤感受性関連遺伝子、癌関連遺伝子の発現レベル及びメチル化レベルの差を網羅的に解析する。

3. 研究の方法

- ① 肝切除前の無治療群とL-OHPを含む治療が施行された群の肝転移巣における抗癌剤感受性関連遺伝子、癌関連遺伝子の発現レベル(RNA、protein)やメチル化異常をRT-PCR、免疫染色、Pyrosequencingなどを用いて比較・検討する。
- ② Danenberg Tumor Profile(DTP)法により、抗癌剤感受性関連遺伝子、癌関連遺伝子(ERCC1、DPD、Topo1、TS、TP、VEGF、EGFR)のmRNA発現量を評価する。DTP法とは、ホルマリン固定パラフィン包埋病理標本からRNAを抽出し、real-time RT-PCR法によりmRNAを定量する測定システムのことである。
- ③ ERCC1およびDPD抗体などを用いた免疫組織化学により、それぞれのタンパク発現量を評価する。薄切標本は、3~5ミクロン厚3枚(HE染色用1枚、免疫組織化学要2枚)を使用する。
- ④ Pyrosequencing technologyを用いて、LINE-1のメチル化レベルを解析し、両群において差があるかを検討する。LINE-1は、ゲノム全体のメチル化レベルの指標となるといわれているマーカーであり、大腸癌において5-FU感受性に関係するという報告がなされている

4. 研究成果

肝切除前の無治療群(170例)とL-OHPを含む治療が施行された群(166例)の肝転移巣におけるERCC1およびDPD mRNA量をDanenberg Tumor Profile(DTP)法により比較したところ、術前化学療法群においてERCC1、DPDの発現レベルが有意に高値であった(図1)。

また、ERCC1とDPDの発現レベルは互いに相関していた(図2)。

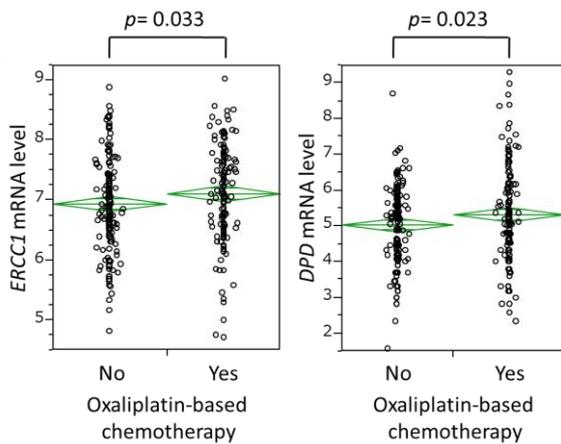


図1

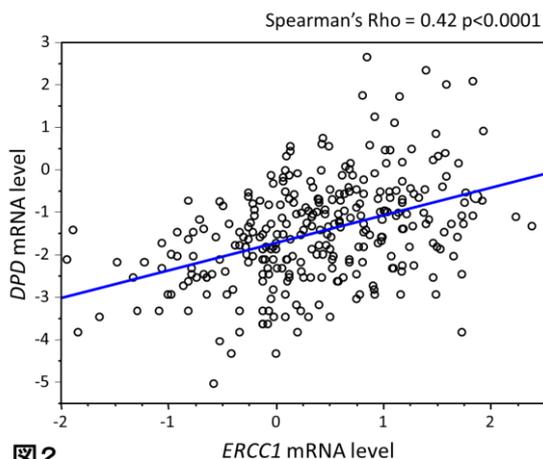


図2

TOP1 に関しては、両群間で発現レベルに差を認めなかった。

免疫染色によるタンパクレベルでの発現レベルの評価を行ったが(図3)、DPD に関しては mRNA と同様の関係が得られたが ($p=0.027$)、ERCC1 に関しては術前化学療法との関係は示されなかった ($p=0.44$)。

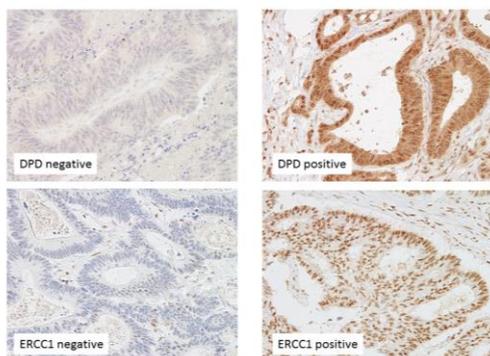


図3

ヘテロな集団である大腸癌で L-OHP 感受性の高い細胞は L-OHP を含む前治療で死滅し、感受性の低い細胞が残って 2 次治療の対象となるという我々の仮説を分子学的に証明する根拠になると考えている。

また、術前に bevacizumab が投与されていた症例では、投与されていない症例より有意に VEGFA 発現レベルが高いという興味深い結果が得られた(図4)。

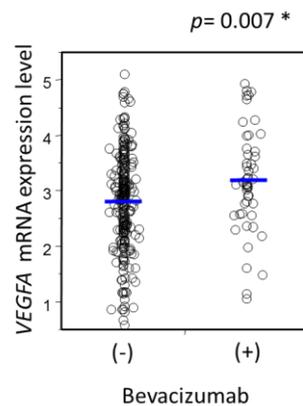


図4

VEGFA 発現レベルは bevacizumab の治療効果予測マーカーとして注目を集めている。本研究の結果は bevacizumab Beyond PD (BBP、bevacizumab 投与後の増悪例における bevacizumab 継続投与の効果)の分子学的根拠になるものであると考えられる。

これらの結果は、大腸癌肝転移に対する 2nd line 以降のレジメンを選択する際の分子メカニズム的根拠になりうる可能性がある。

また、術前化学療法症例において、LINE-1 メチル化レベルが有意に高いという結果も得られた(図5)。そのメカニズムに関しては今後の検討課題である。

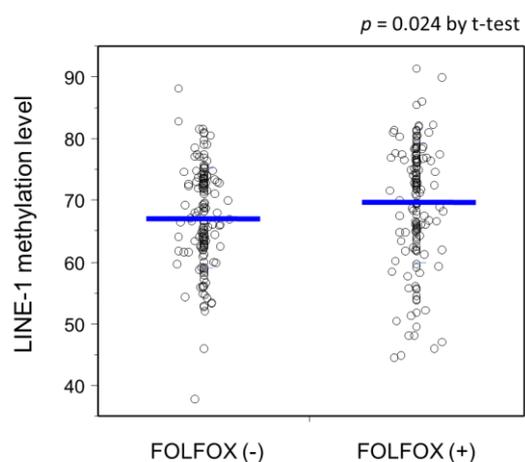


図5

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 19 件)

1. Eto K, Watanabe M, Iwatsuki M, Sugihara H, Murata A, Ozaki N, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Ikeshima S, Kuramoto M, Shimada S, Baba H: Granulocyte-colony-stimulating factor producing esophageal squamous cell carcinoma: a report of 3 cases. *Int Canc Conf J* 2(3):149-53, 2013. 査読有り
2. Ohuchi M, Watanabe M, Iwagami S, Baba Y, Nagai Y, Ishimoto T, Iwatsuki M, Yoshida N, Baba H: Gastric volvulus after laparoscopic fundoplication: a rare complication after Heller-Dor operation for achalasia. *Esophagus* 10(3):153-6, 2013. 査読有り
3. Kitano Y, Watanabe M, Iwatsuki M, Iwagami S, Kobayashi H, Ishimoto T, Ozaki N, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: Pleural dissemination of gastric gastrointestinal stromal tumor (GIST): a rare type of recurrence found 11 years after curative resection. *Int Canc Conf J* 2(4):243-6, 2013. 査読有り
4. Tokunaga R, Hayashi H, Masuda T, Mima K, Chikamoto A, Tanaka H, Horino K, Ishiko T, Takamori H, Beppu T, Baba H: Tumor Compression-Induced Portal Obstruction and Selective Transarterial Chemoembolization Increase Functional Liver Volume in the Unobstructed Area, Facilitating Successful Resection of a Large HCC. *Int Surg* 98(4):388-91, 2013. 査読有り
5. Saito S, Okabe H, Watanabe M, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Tanaka Y, Kurashige J, Miyamoto Y, Baba H: CD44v6 expression is related to mesenchymal phenotype and poor prognosis in patients with colorectal cancer. *Oncol Rep* 29(4):1570-8, 2013. 査読有り
6. Murata A, Baba Y, Watanabe M, Shigaki H, Miyake K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Iwagami S, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Noshio K, Baba H: Methylation levels of LINE-1 in primary lesion and matched metastatic lesions of colorectal cancer. *Br J Cancer* 109(2):408-15, 2013. 査読有り
7. Miyamoto Y, Watanabe M, Sakamoto Y, Shigaki H, Murata A, Sugihara H, Eto K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Yoshida N, Baba H: Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer. *Surg Today* 44(12):2287-92, 2014. 査読有り
8. Eto K, Iwatsuki M, Watanabe M, Ida S, Ishimoto T, Iwagami S, Baba Y, Sakamoto Y, Miyamoto Y, Yoshida N, Baba H: The microRNA-21/PTEN pathway regulates the sensitivity of HER2-positive gastric cancer cells to trastuzumab. *Ann Surg Oncol* 21(1):343-50, 2014. 査読有り
9. Izumi D, Watanabe M, Nagai Y, Harada K, Imamura Y, Iwagami S, Miyamoto Y, Iwatsuki M, Baba Y, Baba H: T-tube drainage and intercostals muscle flap reinforcement for the management of intrathoracic esophago-gastric anastomotic leakage with pyothorax: a case report. *Fukuoka Igaku Zasshi* 105(1):11-5, 2014. 査読有り
10. Miyamoto Y, Ishii T, Tashiro J, Satoh T, Watanabe M, Baba H, Yamaguchi S: Effects of obesity on the outcome of laparoscopic surgery for colorectal cancer. *Surg Today* 44(7):1293-9, 2014. 査読有り
11. Matsubara N, Miyata H, Gotoh M, Tomita N, Baba H, Kimura W, Nakagoe T, Simada M, Kitagawa Y, Sugihara K, Mori M: Mortality after common rectal surgery in Japan: a study on low anterior resection from a newly established nationwide large-scale clinical database. *Dis Colon Rectum* 57(9):1075-81, 2014. 査読有り
12. Baba Y, Murata A, Watanabe M, Baba H: Clinical implications of the LINE-1 methylation levels in patients with gastrointestinal cancer. *Surg Today* 44(10):1807-16, 2014. 査読有り
13. Ishikawa S, Hayashi H, Kinoshita K, Abe M, Kuroki H, Tokunaga R, Tomiyasu S, Tanaka H, Sugita H, Arita T, Yagi Y, Watanabe M, Hirota M, Baba H: Statins inhibit tumor progression via an enhancer of zeste homolog 2-mediated epigenetic alteration in colorectal cancer. *Int J Cancer* 135(11):2528-36, 2014. 査読有り
14. Beppu T, Miyamoto Y, Sakamoto Y, Imai K, Nitta H, Hayashi H, Chikamoto A, Watanabe M, Ishiko T, Baba H: Chemotherapy and targeted therapy for patients with initially unresectable colorectal liver metastases, focusing on conversion hepatectomy and long-term survival. *Ann Surg Oncol* 21 (Suppl 3):S405-13,

2014. 査読有り
15. Miyamoto Y, Watanabe M, Sakamoto Y, Shigaki H, Murata A, Sugihara H, Eto K, Ishimoto T, Iwatsuki M, Baba Y, Iwagami S, Yoshida N, Baba H: Evaluation of the necessity of primary tumor resection for synchronous metastatic colorectal cancer. *Surg Today* 44(12):2287-92, 2014. 査読有り
 16. Miyamoto Y, Sakamoto Y, Yoshida N, Baba H: Efficacy of S-1 in colorectal cancer. *Expert Opin Pharmacother* 15(12):1761-70, 2014. 査読有り
 17. Miyamoto Y, Watanabe M, Ishimoto T, Baba Y, Iwagami S, Sakamoto Y, Yoshida N, Masuguchi S, Ihn H, Baba H: Fascia lata onlay patch for repairing infected incisional hernias. *Surg Today* 45(1):121-4, 2015. 査読有り
 18. Baba H: Introduction of Surgical Case Reports: the second official journal of the Japanese Surgical Society. *Surg Case Rep* 1(1):2, 2015.
 19. Yamao T, Hayashi H, Higashi T, Takeyama H, Kaida T, Nitta H, Hashimoto D, Chikamoto A, Beppu T, Baba H: Colon cancer metastasis mimicking intraductal papillary neoplasm of the extra-hepatic bile duct. *Int J Surg Case Rep* 10:91-3, 2015. 査読有り

〔学会発表〕(計5件)

1. 坂本快郎、大腸癌肝転移症例に対する化学療法と至適手術タイミング、第21回日本消化器関連学会週間 JDDW2013、2013年10月12日、東京、グランドプリンスホテル新高輪
2. 村田飛鳥、大腸癌原発巣と転移巣におけるLINE-1メチル化レベルの比較KRAS, BRAF, PIK3CA変異とMSIの検討、第68回日本大腸肛門病学会学術集会、2013年11月15日、東京、京王プラザホテル新宿
3. 林洋光、進化する大腸癌肝転移治療体系における腹腔鏡下肝切除術の位置づけ、第7回肝臓内視鏡外科研究会、2013年11月20日、名古屋、名古屋国際会議場
4. 坂本快郎、大腸癌肝転移・術前化学療法施行例における再発予測因子とNomogram評価、第69回日本消化器外科学会総会、2014年7月16日、福島、郡山市民文化センター
5. 原田和人、大腸癌におけるERCC1 isoformの発現レベル、第73回日本癌学会学術集会、2014年9月27日、横浜、パシフィコ横浜

〔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

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部・教授
研究者番号：20240905

(2) 研究分担者

馬場 祥史 (BABA, yoshifumi)
熊本大学・大学院生命科学研究部・講師
研究者番号：20599708