

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25860409

研究課題名(和文)新規薬物療法の開発を含めた進行再発大腸癌の治療戦略構築

研究課題名(英文) Novel treatment strategy for colorectal cancer based on genetic/ epigenetic information

研究代表者

榎田 祐三 (Umeda, Yuzo)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：10573735

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、精緻な個別化医療実現のため遺伝子変異情報を大腸癌治療戦略に応用させることを提唱してきた。新たなepigenetic変異として、悪性度の高いBRAF変異癌より17遺伝子座のメチル化を検討したところ、予後不良のNon-MSI+BRAFではO6-メチルグアニンDNAメチルトランスフェラーゼ(MGMT)のメチル化を認めず、予後良好のMSI+BRAFでは高頻度にメチル化を認めた。KRAS変異・野生型を含めた臨床病期 I / 期の大腸癌臨床検体で検討したところ、MGMTメチル化群で明らかな再発率の低下を認めた。MGMTは、大腸癌における新たなPrognostic Biomarkerとなり得る。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that genetic information has an essential role as a prognostic/predictive marker in treatment strategy for colorectal cancer (CRC). The aim of the research was to discover novel epigenetic biomarkers. BRAF V600E was initially focused on because microsatellite stable (MSS) CRC with BRAF V600E mutation(mt) fails to extremely poor outcome. We analyzed 17-gene methylation panel that consists of different methylation loci in BRAF V600E with MSS and microsatellite instability (MSI). This analysis identified demethylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT). BRAF V600E-mt with MSS didn't show MGMT methylation, while that with MSI showed partial or extensive methylation of MGMT promoter. And this could be observed in KRAS-mt and wild type CRC. In utilization to the patient cohort of stage II/III CRC (n=223), MGMT hyper methylation associated with improved relapse-free survival. In conclusion, MGMT methylation status could be a promising biomarker of CRC.

研究分野：消化器外科

キーワード：大腸癌 大腸癌肝転移 遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は我々が以前から提唱しているように genetic 情報に基づいた腫瘍悪性度の分類が可能であり、その治療戦略の更なる発展の鍵を握るのはそれら genetic 情報の治療への応用である。そして、更に詳細な個別化医療の実現のためには genetic だけでなく epigenetic 変異情報を踏まえた新規治療戦略を構築する必要がある。

2. 研究の目的

本研究では、Genetic/Epigenetic 変異情報による Predictive/Prognostic Biomarker の確立、およびそれらを用いた進行再発大腸癌に対する革新的新規治療戦略の構築を目指す。

3. 研究の方法

既に確立された genetic/epigenetic 解析システムを基に、大腸癌原発巣・肝転移巣を対象に解析を行い、retrospective に新規 Epigenetic Prognostic Biomarker 候補群による予後・再発・薬剤感受性解析を行い、Biomarker としての評価を試みる。

4. 研究成果

大腸癌の予後を規定する遠隔転移、特に肝転移は化学療法の進歩により、奏効率の上昇とともに切除機会の増加を認め、大腸癌治療成績向上の牽引役となっている。大腸癌は、我々が以前から提唱しているように genetic 情報に基づいた腫瘍悪性度の分類が可能であり、その治療戦略の更なる発展の鍵を握るのはそれら genetic 情報の治療への応用である。そして、更に詳細な個別化医療の実現のためには genetic だけでなく epigenetic 変異情報を踏まえた新規治療戦略を構築する必要がある。

本研究では、Genetic/Epigenetic 変異情報による Predictive/Prognostic Biomarker の確立、およびそれらを用いた進行再発大腸癌に対する革新的新規治療戦略の構築を目指した。

BRAF 変異大腸癌は MSI (マイクロサテライト不安定性)の有無により、その生物学的特徴が異なることが推測される (Non-MSI+BRAF 変異癌は予後不良)。我々は、まず BRAF 変異癌を選定し、17 遺伝子座におけるメチル化頻度の検討を行い、BRAF 変異大腸癌を MSI の有無に分けた場合に異なるメチル化を示した領域が、その生物学的特徴を規定すると考え、その抽出を試みた。その結果、MLH1 と O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter 領域のメチル化で 2 群間に有意差があることを確認した。すなわち、予後不良の Non-MSI+BRAF 変異癌には MGMT のメチル化を全く認めず、反対に予後良好である MSI+BRAF 変異癌に高頻度の MGMT メチル化を認めた。更に MGMT メチル化は KRAS 変異癌にやや多く認められるが、Wild-type 癌にも 30-40% 認める変化であり、このことは MGMT メチル化

status により、KRAS 変異癌や Wild-type 癌をさらに個別化できる可能性を持つ。すなわち、MGMT メチル化は、大腸癌・大腸癌肝転移における新たな Epigenetic Prognostic Biomarker としての可能性が示唆された。

そして MGMT メチル化・MGMT 不活性化がなぜ予後を改善するのかを大腸癌細胞株を用いて検証した。MGMT は脳腫瘍分野での臨床応用が検討されている MGMT 拮抗薬である O6-Benzylguanine (O6-BG) と siRNA にて knockdown を行った。その結果、MGMT 不活性化によって p21 の発現上昇と、それに伴う細胞周期停止による腫瘍増殖抑制効果が新たに発見された。この腫瘍増殖抑制効果の正否を確認するために、223 例の Stage II/III 大腸癌の術後再発の検討を行ったところ、MGMT メチル化大腸癌群の明らかな再発率の低下が認められ、MGMT 阻害剤の臨床応用の可能性が示された。

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 31 件)

Yoshida K, Nagasaka T, Umeda Y, et al (3/13). Expansion of epigenetic alterations in EFEMP1 promoter predicts malignant formation in pancreatobiliary intraductal papillary mucinous neoplasms. *J Cancer Res Clin Oncol*. DOI 10.1007/s00432-016-2164-x, 2016 査読有

Sugihara M, Sadamori H, Umeda Y, et al (7/16). Anti-high mobility group box 1 monoclonal antibody improves ischemia/reperfusion injury and mode of liver regeneration after partial hepatectomy. *American Journal of Surg*. 2016;211(1):179-88. doi: 10.1016/j.amjsurg.2015.06.025 査読有

Uchida D, Takaki A, Umeda Y, et al (19/26). Oxidative stress balance is dysregulated and represents an additional target for treating cholangiocarcinoma. *Free Radic Res*. 2016 Jul;50(7):732-43. doi: 10.3109/10715762.2016.1172071 査読有

Toda K, Nagasaka T, Umeda Y, et al (3/16). Genetic and epigenetic alterations of netrin-1 receptors in gastric cancer with chromosomal instability. *Clinical Epigenetics*. doi:10.1186/s13148-015-0096-y, 2015 査読あり

Shigeyasu K, Nagasaka T, Umeda Y, et al (3/11). Clinical Significance of MLH1 Methylation and CpG Island Methylator Phenotype as Prognostic Markers in Patients with Gastric Cancer. *PLoS One*. 2015 Jun 29;10(6):e0130409. doi: 10.1371/journal.pone.0130409. 査読有

Utsumi M, Umeda Y, Yagi T, et al (2/10). Correlation of computed tomography imaging features and pathological features of 41 patients

with pancreatic neuroendocrine tumors. *Hepato-gastroenterology*.2015

Mar-Apr;62(138):441-6. 査読有

Koike K, Takaki A, **Umeda Y**, et al (8/17). Enhancement of Programmed Death Ligand 2 on Hepatitis C Virus Infected Hepatocytes by Calcineurin Inhibitors. *Transplantation*. 2015 Jul;99(7):1447-54. doi: 10.1097/TP.0000000000000572. 査読有

Mori Y, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (4/8). The rare BRAF VK600-601E mutation as a possible indicator of poor prognosis in rectal carcinoma – a report of a case. *BMC Med Genet*. 2015 Jan 31;16:1. doi: 10.1186/s12881-015-0144-7. 査読有

Utsumi M, Takaki A, **Umeda Y**, et al (3/15). Frequency of regulatory T-cell and hepatitis C viral antigen-specific immune response in recurrent hepatitis C after liver transplantation. *Transpl Immunol*. 2014;31(1):33-41. doi: 10.1016/j.trim.2014.05.006. 査読有

Matsumoto K, **Umeda Y**, et al (3/11). Serial changes of serum growth factor levels and liver regeneration after partial hepatectomy in healthy humans. *Int J Mol Sci*. 2013 Oct 17;14(10):20877-89. doi: 10.3390/ijms141020877. 査読有

[学会発表](計 98 件)

Mori Y, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (4/9). MGMT inactivation arrest tumor growth and serves as a promising predictive biomarker for treatment response in colorectal cancer. Digestive Disease Week 2016, San Diego. '16 年 5 月 24 日

Fuji T, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (3/11). Detection of circulating Ago2-miRNAs predict tumor response to anti-tumor therapies. The European Cancer Congress: ESMO 2015, Vienna, Austria, '15 年 9 月 28 日

Kawai T, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (4/14). Non-invasive detection of methylated CpGs from sputum can predict patients with lung cancer. The European Cancer Congress: ESMO 2015, Vienna, Austria, '15 年 9 月 28 日

Taniguchi F, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (4/12). Systemic genetic analysis of familial adenomatous polyposis and lynch syndrome. The European Cancer Congress: ESMO 2015, Vienna, Austria, '15 年 9 月 27 日

Fuji T, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (2/11). Inherent Single Nucleotide Variants in the TBX21 Gene As Novel Prognostic Markers in Patients with Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. Digestive Disease Week 2015, Washington DC. '15 年 5 月 16 日

Taniguchi F, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (4/11). Systemic genomic characterization of normal mucosa, adenomatous polyps, and cancer in patients with familial adenomatous polyposis. Digestive Disease Week 2015, Washington DC.

'15 年 5 月 19 日

Nagasaka T, **Umeda Y**, et al (3/17). Clinical role of promoter hypermethylation in the MGMT gene during colorectal tumorigenesis. 第 8 回国際消化器癌発生会議、福岡、'14 年 11 月 13 日

Mori Y, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (3/12). Hypermethylation of O6-methylguanine DNA methyltransferase (MGMT) promoter as a prognostic biomarker for stage II, III and IV colorectal cancers. The European Cancer Congress: ESMO 2014, Madrid, '14 年 9 月 26 日

Kubota N, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (3/9). Micro-RNA-89 expression as a promising prognostic biomarker for advanced colorectal cancer. The European Cancer Congress: ESMO 2014, Madrid, '14 年 9 月 26 日

Yokomichi N, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (12/15). Cytokeratin 19, a novel prognostic biomarker for hepatocellular carcinoma, is regulated by DNA methylation. The European Cancer Congress: ESMO 2014, Madrid, '14 年 9 月 26 日

Yoshida K, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al (3/13). Extensive methylation of epidermal growth factor-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1(EFMP1) promoter could predict malignant formation in intraductal papillary mucinous neoplasms (IPMN). The European Cancer Congress: ESMO 2014, Madrid, '14 年 9 月 26 日

Umeda Y, **Nagasaka T**, **Fujiwara T**, et al (1/8). Somatic mutation profiling in the RAS-RAF signal cascade: Promising predictive markers for extra-hepatic spreading in colorectal liver metastasis. The 52nd Annual Meeting of JSCO. Yokohama, '14 年 8 月 28 日

Umeda Y, **Yagi T**, et al (1/8). Risk analysis for small-for-size syndrome and acute renal injury after living donor liver transplantation. 14th congress of the middle-east society for organ transplantation. Istanbul, '14 年 9 月 10 日

Umeda Y, **Nagasaka T**, et al (1/11). Treatment strategy for colorectal liver metastasis based on genetic profiles. 21st United European Gastroenterology Week, Berlin, '13 年 10 月 12 日

Umeda Y, **Yagi T**, et al (1/9). Treatment strategy on the basis of risk analysis for small-for-size syndrome and acute renal injury after living donor liver transplantation. 第 114 回日本外科学会定期学術集会、京都、'14 年 4 月 3 日

Utsumi M, **Umeda Y**, et al (4/11). Frequency of regulatory T-cell and HCV antigen specific immune response in recurrent hepatitis C after liver transplantation. 21st United European Gastroenterology Week, Berlin, '13 年 10 月 12 日

Yoshida K, **Nagasaka T**, **Umeda Y**, et al

(3/16). Accumulation of epigenetic alteration could predict malignant formation in intraductal papillary mucinous neoplasm. Digestive Disease Week 2013, Orlando, '13年5月18日

Nagasaka T, Umeda Y, et al (4/17). MGMT methylation as a novel biomarker for the identification of stage III colorectal cancers at high risk of disease recurrence following curative surgery. Digestive Disease Week 2013, Orlando, '13年5月18日

Yokomichi N, Nagasaka T, Umeda Y, et al (4/16). Cytokeratin 19 staining is a novel, predictive biomarker for extra-hepatic metastasis in hepatocellular carcinoma. Digestive Disease Week 2013, Orlando, '13年5月18日

〔図書〕(計1件)

Sadamori H, Umeda Y, Yagi T, Fujiwara T, et al (2/4). The modulation of portal venous hemodynamics in living donor liver transplantation. NOVA science publishers, INC, 2013年269(217-230)

〔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

榎田 祐三 (UMEDA, Yuzo)
岡山大学 大学病院 消化器外科 助教
研究者番号：10573735

(2) 研究分担者

(3) 連携研究者

藤原 俊義 (FUJIWARA Toshiyoshi)
岡山大学 医歯薬学総合研究科 消化器外科 教授
研究者番号：00304303
八木 孝仁 (YAGI Takahito)

岡山大学 大学病院 肝胆膵外科 教授

研究者番号：00304353

永坂 岳司 (NAGASAKA Takeshi)

岡山大学 大学病院 消化器外科 講師

研究者番号：30452569