

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 26 日現在

機関番号：20101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25860546

研究課題名(和文) 網羅的遺伝子発現解析に基づく食道癌化学放射線療法の感受性予測法の開発

研究課題名(英文) Development of the method for predicting sensitivity to chemoradiotherapy for esophageal cancer using comprehensive gene expression profiling analysis

研究代表者

大沼 啓之(Ohnuma, Hiroyuki)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60582997

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)：Docetaxel+nedaplatin+5-FU併用化学放射線療法を施行した食道癌症例の感受性群と非感受性群の治療前腫瘍組織のmiRNA発現解析を行ったところ、感受性群においてhsa-miR-625-3pおよびhsa-miR-4731-3pが有意に発現亢進していることを確認した。同遺伝子を食道癌細胞株に導入しCRT耐性獲得の機序を検討している。

研究成果の概要(英文)：We performed comprehensive miRNA expression profiling analysis in pretherapeutic biopsies of responders and nonresponders in chemoradiotherapy using docetaxel, nedaplatin and 5-FU of esophageal cancer, and the miRNA profiling revealed the expression of hsa-miR-625-3p and hsa-miR-4731-3p was significantly higher in the responder group. As validation analysis, we are examining the mechanism for acquiring CRT resistance using esophageal cancer cell lines transfected with the candidate miRNAs.

研究分野：医歯薬学

キーワード：食道癌 化学放射線療法 感受性予測 miRNA

1. 研究開始当初の背景

切除可能進行食道癌に対しては、(術前化学療法+)手術が標準治療とされているが、高齢患者の多い食道癌では耐術不能例や手術拒否例も少なくなく、そのような症例に対する化学放射線療法(chemoradiation therapy: 以下CRT)は食道温存が可能で良好なQOLを確保できる有力な治療オプションである。また、根治切除が困難なT4/M1LYM症例に対してはCRTが標準治療とされる。しかし、CRTの化学療法レジメンとして5-FU/CDDPが汎用されているものの、満足しうる成績が得られているとはいえない。当教室ではこれまで、忍容性向上を目的とした5-FU+nedaplatin・放射線併用療法の第Ⅰ相試験を行い、良好なcomplianceと治療成績を報告したが、同法の成績もFPレジメンを明らかに凌駕するものではなく、更なる成績向上を目指し、同療法に放射線増感効果を有するdocetaxelを上乗せした5-FU+nedaplatin+docetaxel・放射線併用療法の第Ⅰ相試験を実施したところ(UMIN00005446)、優れた抗腫瘍効果、安全性と良好な無増悪生存、全生存期間が得られた(投稿中)。

CRTと手術という、全く方法論やリスクの異なる治療法の選択が迫られる食道癌において、症例ごと治療を最適化する個別化医療の必要性が増していると同時に、そのような選択を可能にするマーカーの開発が望まれる。CRTの完全奏効割合は病期Ⅰで約60%、T4M1LYM症例では15-30%と高いとは言えない。CRTで汎用されるプラチナ製剤はシスプラチンの腎毒性、消化器毒性などの毒性が問題となるため、治療効率を向上させ、副作用のリスクを回避するために効果予測因子の確立は重要である。治療前にCRTの反応性が予測できれば、低感受性例に対しては手術を第一選択、高感受性例ではCRTを行うといった治療の最適化が可能となる。これまで治療反応性にかかわる因子として多くの候補遺伝子、蛋白が報告されてきたが、CRTの効果予測マーカーとして臨床応用されたものは未だない。

近年、DNAチップ/マイクロアレイ解析が遺伝子発現、ゲノム多型および構造変化を網羅的に測定する有力な手段として登場し、乳癌におけるMammaPrint®など一部は臨床応用に至っている。これまで放射線感受性及び非感受性の腫瘍において発現の異なる遺伝子群をパターン認識法のひとつであるクラスタリングの手法で推定する方法(Hanna et al. Cancer Res. 61:2376, 2001)や、検体を薬剤有効群と無効群の2群に分け、U-検定などの統計的検定手法により二群間で有意に発現に差のある遺伝子群を選択する方法(Kihara et al. Cancer Res. 61:6474, 2001)が報告されており、食道癌領域においても応用が期待される。

miRNAはnon-coding RNAの一種で、種々の癌の発生、進展や薬剤耐性などの過程に関与することが明らかとなっており、乳癌、卵巣癌

などの癌腫では、tamoxifen、プラチナ製剤やタキサン製剤耐性に関与するmiRNAが同定されている。一方で食道癌においては悪性度に関与するmiRNA (Hiyoshi Y, et al. Clin Cancer Res 15: 1915-22, 2009. Lu Z, et al. Oncogene 27: 4373-9, 2008. Mori Y, et al. Mol Med Rep 2: 235-9, 2009)や、予後予測因子とされるmiRNAの報告がなされている(Luthra R, et al. Oncogene 27:6667-78, 2008)が、CRTの治療効果予測因子として確立したものはない。近年、ホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)から高収量のRNAを得る方法が確立し、さらに超高感度のDNAチップの登場により、FFPEから高精度にmiRNAの網羅的発現解析を行うことが可能となった。当教室のような所謂食道癌症例のhigh volume centerでは過去にCRTを行った多数例のFFPEを保管しており、retrospectiveな網羅的解析が実施可能となった。さらに日常臨床で容易に採取可能な腫瘍生検検体を用いることから、今後前向きなCRT治療反応性の検証にも有意義であると考えられる。

2. 研究の目的

CRTを施行する進行食道癌症例を対象として、治療前の生検検体の癌組織の遺伝子およびmiRNA発現解析をマイクロアレイで行い、CRTへの感受性に関連する因子を抽出する。抽出した因子の中から少数の候補を絞り込み、実地臨床でも活用可能な感受性予測システムを構築することを目的とする。更に、作成された効果予測システムを使用し、前向きな検討で妥当性を評価する。

3. 研究の方法

1) 食道癌対象患者から化学療法開始前4週間以内にベースラインの病変の評価(RECIST v1.1および食道癌取り扱い規約に準ずる)および原発巣の治療前生検組織採取(原発巣3個、非癌部2個、原則各5mm角)を行う。CRT後に病変が遺残、または再発を来し、サルベージ手術を行った症例に対してはその原発巣または転移巣の新鮮材料も採取する。生検・手術材料はただちに十分量の10%中性ホルマリン緩衝液に浸漬、24-48時間固定後にパラフィン包埋し保存する。既に当教室で過去にCRTを行い、同様の方法で作成、保存したFFPE検体のうち、CRT治療効果および予後が評価可能、かつ事前に組織使用の同意が文書で得られている症例についてはretrospectiveな解析対象とする。プロトコル治療を完遂できなかった症例については解析対象から除外する。すべての患者に対し、インフォームドコンセントを取るとともに、内部の倫理審査委員会の同意を得る。CRT前生検やCTについては不必要な患者負担を避けるため、原則として通常癌診療にてルーティンに行われる治療前内視鏡観察・生検診断および画像検査の一環として行う。

2) CRTのプロトコールは、本邦で標準的に行われているJCOG9906レジメン(5-FU 400mg/m² d1-5&8-12, CDDP 40mg/m² d1&8, 放射線照射 2Gy/day d1-5&8-12&15-19, 以上を4週毎2サイクル)および当教室にて臨床試験施行したDocetaxel+Nedaplatin+5-FUレジメン(5-FU 400mg/m² d1-5&8-12, CDGP 50mg/m² d1&8, DOC 20mg/m² d1&8, 放射線照射 2Gy/day d1-5&8-12&15-19, 以上を5週毎2サイクル)にて行う。原則CRT後に2コースの追加化学療法を施行する(FPレジメン: 5-FU 800mg/m² d1-5, CDDP 80mg/m² d1, 以上を4週毎2サイクル。DNFレジメン: 5-FU 400mg/m² d1-5&8-12, CDGP 50mg/m² d1&8, DOC 20mg/m² d1&8, 以上を4週毎2サイクル)。

3) CRT終了以降の画像所見を用いたRECIST v1.1判定基準により効果判定を行い、全症例を奏効群(RECISTにて最良総合効果CR)と非奏効群(RECISTにて最良総合効果CR以外)の2群に分類する。奏効群のうち、CRT後6ヶ月間無再発であった症例を感受性群、奏効群のうちCRT後6ヶ月以内に再発した症例および非奏効群をあわせて非感受性群とする。

4) 前記3)より得られた治療前材料から遺伝子数1700種類の遺伝子を搭載したmiRNA検出用オリゴDNAプローブを用いて遺伝子発現解析を行う。RNAの調整を行う前日に、FFPEから検体を7-8μm厚に薄切、温浴後、スライドガラスに添付しパラフィンスライドを作成し、-70℃で保存する。RNA抽出時には腫瘍成分をマイクロダイセクターLM100(OLYMPUS)にて正確に採取する。次いでParadise Reagent System (Arcturus)を用い、癌部組織からトータルRNAの抽出を行う。全量RNAを用い、two-cycle target labeling and control reagents kit (Affymetrix)を用いてcRNAを合成する。3D-Gene human miRNA Oligo chip (TORAY)のハイブリダイゼーション、洗浄などの手技はTORAY社のプロトコールに従う。Quantile normalization法を用いて、マイクロアレイデータのノーマライズを行う。ノーマライズ計算には統計処理ソフトウェアR

2.8.1およびBioConductorパッケージを用いる。得られた遺伝子発現量をlog₂値に変換するとともに、コントロール用プローブセットを除去。3D-Gene human miRNA Oligo chipの1700プローブセットの発現強度に対して、治療奏効群と非奏効群の2群における幾何平均値の倍差であるfold-change (FC)を求めるとともに、Wilcoxon順位和検定を用いて遺伝子発現量の差に対する統計的検定を行う。その後、FCが2群間で10倍以上となり、かつWilcoxon順位和検定でp<0.001となるプローブセットのみを抽出する。

5) 選択された遺伝子を用い、Rソフトウェアにより階層的クラスタリングを行う。距離法にはピアソンの相関係数を用い、クラスタリングには完全連結法を用いる。クラスタリングに先立ち、遺伝子発現データは各プローブセットに対してz変換により標準化を行なう。

6) マイクロアレイで抽出されたmiRNAセットの発現の確認を行う。All or none で発現変動している遺伝子についてはTaqMan MicroRNA Assays(Applied Biosystems)およびサーマルサイクラーを用いてRT-PCRによる定性的解析を行う。発現量の変動の大きい遺伝子についてはdetection systemとしてABI PRISM 7500 システム(Applied Biosystems)を用いたReal time-PCRによる定量的解析を行う。既存のプライマーセットが存在する遺伝子については別途プライマーを購入するが、存在しない場合ではPrimer Express ソフトウェア(Applied Biosystems)によるプライマー設計を行い、別途サプライヤーに作成を依頼、購入する。

7) invitroでの基礎検討として、食道癌細胞株 TE-8 および TE-10 に、抽出された miRNA の precursor および inhibitor を導入し、遊走能、浸潤能および増殖能をそれぞれ wound healing assay, invasion assay および WST-1 assay にて検証する。

8) 作成された診断アルゴリズムを使用し、遺伝子セット選別に用いなかった新規症例を対象に、作成した予測プログラムを用いて感受性を予測し、その精度の確認を前向きに行う。治療前原発巣の生検検体で前述の方法と同様にマイクロアレイ・クラスター解析を行い、感受性群または非感受性群に分類した後に CRT を行い、その効果(前述の効果判定基準を用いる)からアルゴリズムの正答率を算出する。

4. 研究成果

1) CRT 感受性予測候補遺伝子の抽出:
2006年以降当科で施行したCRTのレジメンは5-FU+CDDP(12例)、5-FU+Nedaplatin(26例)またはDocetaxel+Nedaplatin+5-FU(DNF)(31例)であった。組織検体がfreshであること、症例数が最も多く今後の比較可能性が担保できる可能性が高いことなどから、まずDNF-R 施行症例の解析を行うこととしたが、CRTにより極めて高い奏効率(82.1%)と無増悪生存(中央値 41.2ヶ月)が得られたことから非感受性群の集積に時間を要した。そのため、非感受性群が3例に達した時点で各群3症例を対象として preliminary な網羅的 miRNA 解析を行った。非感受性群の1症例において十分な収量のRNAが得られなかったため、最終的には感受性群3例、非感受性群2例での解析となった。前述の方法の通りハイブリダイゼーション、ノーマライゼーションおよび発現差検定を行った結果、hsa-miR-625-3pおよびhsa-miR-4731-3pが感受性群において10倍以上の発現差をもって有意に発現亢進していた。

2) 今後の展望:

CRT 感受性群の症例、検体集積は十分になされており(30例以上)、非感受性群が集積され次第追加解析を行い、hsa-miR-625-3p、

hsa-miR-4731-3p の発現差が維持されているかを確認する。また他の新たな候補遺伝子が抽出されるかを検討する予定である。

hsa-miR-625-3p は食道癌で過剰発現していること、その down-regulation がターゲットである Sox2 の発現亢進を介して食道癌の浸潤、転移を亢進されることが示されており (Hiyoshi Y, et al. FEBS Lett. 588 : 915-21, 2014.)、現在この miRNA に注目し、この発現程度が CRT の感受性に相関するのかを、食道癌細胞株 TE-8 および TE-10 に同 miRNA の precursor および inhibitor を導入し、抗癌剤、放射線に対する感受性を検討している。更に今後食道癌組織内の miR-625 の発現測定と前向きな予後追跡を予定している。

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0件)

〔学会発表〕(計1件)

Yasushi Sato, Hiroyuki Ohnuma, et al. A phase I/II study of definitive chemoradiotherapy with docetaxel, nedaplatin and 5-FU for advanced esophageal cancer. 2015 Gastrointestinal Cancers Symposium of the American Society of Clinical Oncology. 2015年1月15日 Moscone West Building (San Francisco, U.S.A)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究代表者

大沼 啓之 (Hiroyuki Ohnuma)

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：60582997