

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 8 日現在

機関番号：13701
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2014～2016
課題番号：26461973
研究課題名（和文）胃癌術後補助化学療法臨床試験における個別化療法を目指したバイオマーカーの策定

研究課題名（英文）Development of biomarkers for precision medicine in early gastric cancer

研究代表者
吉田 和弘（YOSHIDA, KAZUHIRO）

岐阜大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：50230727
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,700,000円

研究成果の概要（和文）：当研究は、胃癌術後の化学療法を検討したSAMIT試験の検体を用いて予後因子や効果予測因子を検索することを目的とした。大島らは検体よりRNAを抽出し、mRNA発現パターン解析および定量PCRによる解析を行った。円谷らは臨床データのクリーニングおよび統計処理を行った。吉田らは細胞株を用いた基礎的検討から、NucleotidaseによるF-deoxyuridine monophosphateの解毒が5FU耐性のメカニズムであることを解明した。

研究成果の概要（英文）：The purpose of this study is to clarify the prognostic and predictive factor for gastric cancer using the samples of the patients enrolled in the SAMIT trial, which investigating the efficacy of the postoperative chemotherapy for gastric cancer. Ohshima et al. extracted RNA from the samples and performed the pattern analysis of mRNA expression and the quantitative RT-PCR for 101 genes. Yoshida et al. analyzed the mechanism of the resistance to 5FU using gastric cancer cell lines, and found that the reduction of F-deoxyuridine monophosphate by nucleotidase was one of the mechanism for the resistance to 5FU in gastric cancer.

研究分野：胃癌

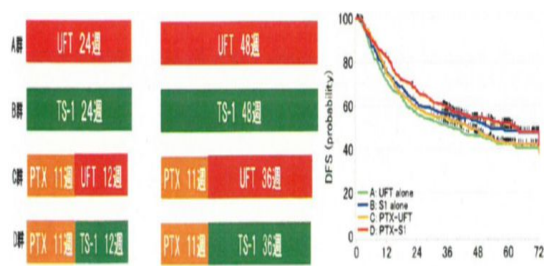
キーワード：胃癌 5FU タキサン 予後因子 効果予測因子

1. 研究開始当初の背景

(1) 根治切除が可能な進行胃癌に対する我が国における標準治療は、2 郡リンパ節郭清を伴う胃切除・全摘術などの手術療法と、術後補助化学療法とされている。

(2) 胃癌の術後補助化学療法の効果を検討した臨床試験は 2 つある。1 つは UFT の効果を見た NSAS-GC 試験で 50%の死亡抑制が報告された。もう 1 つは ACTS-GC 試験で Stage II/III の胃癌に対して TS-1 の効果を検討し 30%の死亡抑制が報告された。

(3) 胃癌術後補助化学療法として UFT が良いのか TS-1 が良いのか、またさらに作用機序のことなるタキサン(パクリタキセル)を追加した方がよいのかを検討した臨床試験が SAMIT 試験であり、この試験に TS-1 の優位性が示され、パクリタキセルの上乗せはないものとされた。



(4) SAMIT 試験は、各群の生存曲線が交差することなく、優れたデザインのもとで行われたことが確認され、この試験に参加した患者の検体から、予後因子や効果予測因子(バイオマーカー)の策定が可能と考えられた。

2. 研究の目的

SAMIT 試験に参加した患者の検体を用いて、バイオマーカーを策定することである。本試験は、UFT と TS-1 の効果を比較した唯一の試験であり、また、タキサンの効果を見た試験もこれまでにないことから、これらの薬剤の効果予測因子を検討することにおいて、SAMIT 試験は極めて有用性が高いと考えられる。具体的には、

(1) 胃癌における遺伝子群発現を検討することにより、サブタイプや予後因子を策定す

る(文献 1)

(2) TS-1 および UFT の治療効果予測因子の策定(文献 2)

(3) 術後補助化学療法におけるタキサンの治療効果予測因子の策定(文献 2)を目的とする。

3. 研究の方法

(1)手術症例の切除標本の収集と RNA の抽出
SAMIT 参加施設より、遺伝子発現解析用として 1 検体あたり原発巣切除標本のホルマリン固定パラフィン包埋ブロックの薄切標本プレパラート (10 μ m 厚) 5 枚、および H.E. (haematoxylin and eosin) 染色および免疫染色用の薄切標本を収集した。H.E. 染色にて癌部をマーキングし、薄切標本プレパラート (10 μ m 厚) 3 枚より癌部をマニュアルダイセクションし、NucleoSpin® total RNA FFPE を用いて、Total RNA を抽出した。Total RNA は micro-spectrophotometer (Nano100)を用いて吸光度比 A260nm/A280nm を測定して品質を管理し、microchip electrophoresis system (Agilent 2100 Bioanalyzer)を用いて RNA の断片化を評価した。

(2)抽出した RNA による遺伝子発現の解析
抽出した RNA の一部は Singapore National Cancer Center (シンガポール)に送付。Singapore National Cancer Center の細胞分子研究所にて組織型や胃癌の pathway に関連する mRNA 発現パターン解析を行う予定である。

次に Total RNA をもちいて RT 反応にて cDNA を作成してバンク化した。cDNA の評価としては、吸光度比 A260nm/A280nm を測定して品質を管理し、内部標準として用いる β -アクトンおよび 18S mRNA の発現量を計測すると同時にゲノムの混入の有無を評価した。

以上の品質管理を通過した症例について、

101 の遺伝子発現を定量 PCR 法で計測し、各症例の臨床データとの関係を解析している。

(3) 遺伝子発現の解析

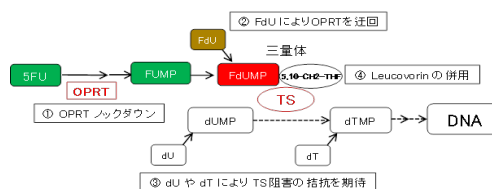
mRNA 発現量で規定されるマーカーサブグループごとの予後の比較は、エンドポイントの形に応じて適切な解析を行った。生存期間に関する time-to-event の解析は Kaplan-Meier 法や log rank 検定などを行った。必要に応じ、logistic 回帰や Cox 回帰などのモデルを用いた方法も用いた。予測因子の検討は Cox 回帰を用いて、治療とマーカー間の交互作用項を推定することによって行った。マーカーサブグループ間の予後の差が治療群別に異なる場合（治療とマーカーとの間に有意な交互作用が存在する場合）、これらのマーカーは治療効果予測因子の候補となる。これらは探索的な解析であるため、検定の有意水準は 5%を基本とし、多重性の調整は特に行わなかった。

Nonostring 遺伝子発現に関する解析に関してであるが、約 190 遺伝子の mRNA 発現量解析においては、クラスタ解析によって確立された G1・G2 の 2 タイプに分類した。また、2 群間で生存期間に関する解析と同様の解析を行い、治療と両タイプの交互作用項を推定することにより予測因子を推定した。また、各遺伝子 mRNA 発現量についても探索的に解析を行った。なお、これらの解析は探索的なものとは言え、遺伝子発現解析研究の分野における多重性の問題はより重大であるため、false discovery rate (FDR)を算出するなど、解析の目的に応じ、適切な false positive を調整する方法を用いた。結果に関して validation を行うなどして、総合的に妥当性を判断した。

臨床データのクリーニングおよび統計処理は円谷らが行った。

(4)細胞株を用いた基礎的検討

胃癌細胞株 MKN45 および、その 5FU 耐性株 MKN45/F2R において、以下の条件のもとに、ウェスタンブロットにて TS の上部バンドを測定し、Fluoro-deoxyuridine monophosphate (FdUMP)の濃度の増減を予測した。また、MTT assay にて、薬剤抵抗性の変化を検討した



4. 研究成果

(1) RNA の抽出および解析

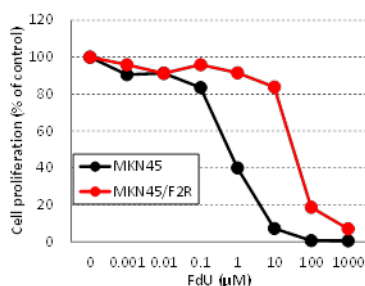
566 症例収集し、全てで Total RNA の抽出が可能であった。

566 例の Total RNA の品質管理を施行した結果、ゲノムの混入や抽出量が微量であるため、信頼性のある cDNA を作成できなかった症例が 27 例認められ、539 例 (95%) の症例で定量 PCR による遺伝子発現の測定を行った。現在までに、101 遺伝子中、52 遺伝子の測定が終了している。全遺伝子の測定は 9 月に終了する見込みである。

(2)細胞株による検討

OPRT の低下による 5FU 耐性と、OPRT 低下とは別の 5FU 耐性

通常 5FU は OPRT という酵素により活性化し、いくつかの反応を経て活性体 FdUMP となる。5FU 耐性株 MKN45/F2R は OPRT の発現が低下しており、これが 5FU 耐性と関連していたが、MKN45/F2R は OPRT を経ない Fluoro-deoxyuridine (FdU) に対しても耐性を呈したため、OPRT 低下とは別の耐性機序が存在することが示唆された。

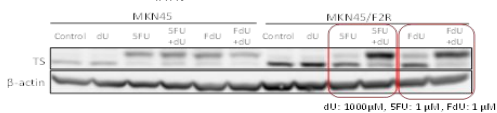


5FU 耐性株における FdUMP の低下と、dU および dT による拮抗

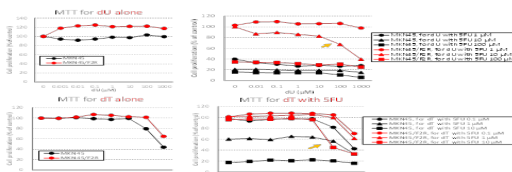
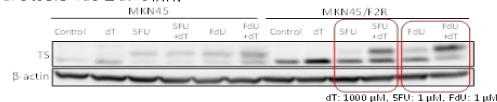
5FU 処理後に生じる Fluoro-deoxyuridine

monophosphate (FdUMP) が 5FU 耐性株 MKN45/F2R において低下しており、これは deoxyuridine (dU) や Thymidine (dT) の併用で上昇した。この結果は 5FU 耐性株が FdUMP を解毒する機序を有しており、dU、dT がこの機序を阻害すると考えられた。

・ 5FU および FdU と dU の併用

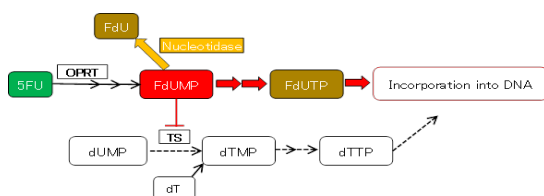


・ 5FU および FdU と dT の併用



Nucleotidase による FdUMP の解毒と 5FU の作用機序

5FU の耐性機序として FdUMP の直接解毒が示唆され、Nucleotidase の関与が考えられる。また 5FU は dT で拮抗されないことから、5FU はいままで考えられていたような単なる TS 阻害薬ではないと考えられた。これらの結果より、以下の図のような作用機序、耐性機序が考えられた。



<引用文献>

1. Tan IB, et al. Intrinsic subtypes of gastric cancer, based on gene expression pattern, predict survival and respond differently to chemotherapy. *Gastroenterology*. 2011; 141: 476-85,
2. Fumoto S, et al. Selection of a novel drug-response predictor in esophageal cancer: a novel screening method using microarray and identification of IFITM1 as a potent marker gene of CDDP response. *Int J Oncol*. 2008; 32: 413-23.

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 4 件)

Fuse N, Bando H, Chin K, Ito S, Yoshikawa T, Tsuburaya A, Terashima M, Kawashima Y, Fukunaga T, Gotoh M, Emi Y, Yoshida K, Oki E, Takahashi S, Kuriki H, Sato K, Sasako M. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin after D2 gastrectomy in Japanese patients with gastric cancer: a phase II study. *Gastric Cancer* 20(2):332-340, 2017.DOI: 10.1007/s10120-016-0606-4 査読有

Oki E, Murata A, Yoshida K, Maeda K, Ikejiri K, Munemoto Y, Sasaki K, Matsuda C, Kotake M, Suenaga T, Matsuda M, Emi Y, Kakeji Y, Baba H, Hamada C, Saji S, Maehara Y. A Randomized Phase III Trial Comparing S-1 Versus UFT as Adjuvant Chemotherapy for Stage II/III Rectal Cancer. (JFMC35-C1: ACTS-RC) *Annals of Oncology* 27:1266-1272, 2016.doi:10.1093/annonc/mdw162 査読有

Yawata K, Osada S, Tanahashi T, Matsui S, Sasaki Y, Tanaka Y, Okumura N, Matsuhashi N, Takahashi T, Yamaguchi K, Yoshida K. The Significant Role of Cyclin D1 in the Synergistic Growth-inhibitory Effect of Combined Therapy of Vandetanib with 5-Fluorouracil for Gastric Cancer. *Anticancer Research* 36: 5215-5226, 2016.DOI:10.21873/anticancer.11092 査読有

Tsuburaya A, Yoshida K, Kobayashi M, Yoshino S, Takahashi M, Takiguchi N, Tanabe K, Takahashi N, Imamura H, Tatsumoto N, Hara H, Nishikawa K, Fukushima R, Nozaki I, Kojima H, Miyashita Y, Oba K, Buyse M, Morita M, Sakamoto J. Sequential paclitaxel followed by tegafur and uracil (UFT) or S-1 versus UFT or S-1 monotherapy

as adjuvant chemotherapy for T4a/b gastric cancer (SAMIT): a phase 3 factorial randomised controlled trial : Lancet Oncology , 15:886-893, 2014.
DOI:http://dx.doi.org/10.1016/s1470-2045(14)70025-7 査読有

〔学会発表〕(計 10 件)

発表者名: Ryutaro Mori, Toshiyuki Tanahashi, Kazuya Yamaguchi, Kazuhiro Yoshida

発表課題: 5FU-resistance caused by reduced FdUMP, and its reversal using deoxyuridine
学会等名: 第 89 回日本胃癌学会総会
発表年月日: 2017/3/8-2017/3/10
発表場所: 広島国際会議場(広島県・広島市)

発表者名: 森龍太郎、棚橋利行、山口和也、二村学、吉田和弘
発表課題: FdUMP の解毒による 5FU 耐性と deoxyuridine による耐性解除
学会等名: 第 54 回日本癌治療学会学術集会
発表年月日: 2016/10/20-2016/10/22
発表場所: パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

発表者名: 森龍太郎、棚橋利行、山口和也、二村学、吉田和弘
発表課題: FdUMP の解毒による 5FU 耐性
学会等名: 第 27 回日本消化器癌発生学会総会
発表年月日: 2016/9/15-2016/9/16
発表場所: 城山観光ホテル(鹿児島県・鹿児島市)

発表者名: 森龍太郎、棚橋利行、奥村直樹、山口和也、吉田和弘
発表課題: 5FU 耐性胃癌細胞株に対する dUMP の耐性減弱作用
学会等名: 第 71 回日本消化器外科学会総会
発表年月日: 2016/7/14-2016/7/16

発表場所: あわぎんホール、アステイ徳島(徳島県・徳島市)

発表者名: 森龍太郎、土屋博、前田健一、棚橋利行、奥村直樹、吉田和弘
発表課題: 5FU 耐性胃癌細胞株に対する dUMP の耐性減弱作用
学会等名: 第 116 回日本外科学会定期学術集会
発表年月日: 2016/4/14-2016/4/16
発表場所: 大阪国際会議場・リーガロイヤルホテル大阪(大阪府・大阪市)

発表者名: 森龍太郎、棚橋利行、奥村直樹、山口和也、吉田和弘
発表課題: 5FU 耐性胃癌細胞株に認められた FdUMP の解毒による 5FU 耐性 .
学会等名: 第 49 回制癌剤適応研究会
発表年月日: 平成 28 年 3 月 25 日
発表場所: 会津東山温泉 御宿東鳳(福島県・会津若松市)

発表者名: Mori R, Tanahashi T, Okumura N, Yamaguchi K, Futamura M, Yoshida K.
発表課題: Deoxyuridine monophosphate reverses resistance to 5FU in 5FU-resistant gastric cancer.
学会等名: ESMO Asia 2015
発表年月日: 2015.12.19
発表場所: Suntec Convention and Exhibition Centre, Singapore

発表者名: 森龍太郎、棚橋利行、奥村直樹、山口和也、二村学、吉田和弘
発表課題: 5FU 耐性胃癌細胞株に対する dUMP の耐性減弱作用 .
学会等名: 第 26 回日本消化器癌発生学会総会
発表年月日: 平成 27 年 11 月 20 日
発表場所: 米子全日空ホテル(鳥取県・米子)

市)

発表者名：森龍太郎、棚橋利行、奥村直樹、
山口和也、二村学、吉田和弘
発表課題：【ワークショップ 82】5FU 耐性
胃癌細胞株に対する dUMP の耐性減弱作用。
学会等名：第 53 回日本癌治療学会学術集会
発表年月日：平成 27 年 10 月 30 日
発表場所：国立京都国際会館・グランドプリ
ンスホテル京都（京都府・京都市）

発表者名：森龍太郎、棚橋利行、奥村直樹、
山口和也、二村学、吉田和弘
発表課題：5FU 耐性胃癌細胞株に対する
dUMP の耐性減弱作用。
学会等名：第 24 回日本癌病態治療研究会
発表年月日：平成 27 年 6 月 25 日
発表場所：日光千姫物語（栃木県・日光市）

〔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

(1)研究代表者
吉田 和弘 (YOSHIDA, KAZUHIRO)
岐阜大学医学系研究科・教授
研究者番号：50230727

(2)研究分担者
円谷 彰 (TSUBURAYA, AKIRA)
横浜市立大学・附属市民総合医療センター・
准教授
研究者番号：00236936

大島 貴 (OSHIMA, TAKASHI)
横浜市立大学医学部・准教授
研究者番号：10448665

(4)研究協力者
坂本 純一 (SAKAMOTO, JUNICHI)

田中 司朗 (TANAKA, SHIRO)

宮城 洋平 (MIYAGI, YOHEI)

パトリック・タン (Patrick TAN)