

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 5 月 16 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04307

研究課題名(和文) 高DNAメチル化型大腸癌の抗EGFR抗体薬耐性克服に関する研究

研究課題名(英文) Study on anti-EGFR antibody-resistant conquest of high DNA methylation type colorectal cancer

研究代表者

石岡 千加史 (Ishioka, Chikashi)

東北大学・加齢医学研究所・教授

研究者番号：60241577

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究の目的は、高DNAメチル化型大腸癌の抗EGFR抗体薬治療耐性の分子機構を明らかにすること、及びこの治療耐性を克服するための方策を探索することにある。網羅的遺伝子発現解析の結果、我々は、特定のサブグループが切除不能進行再発大腸癌の1次治療の治療効果や2次治療以降の抗EGFR抗体薬の治療感受性と相関することを明らかにした。網羅的miRNA発現解析の結果、我々はmiR-193a-3pがBRAF変異腫瘍と強く相関すること同定し、miR-193a-3pの低発現が抗EGFR抗体薬の治療抵抗性と関連することを明らかにした。今後、さらに研究を発展させる予定である。

研究成果の概要(英文)：The purposes of this study are to clarify a molecular mechanism determining anti-EGFR antibody treatment-resistant of high DNA methylation type colorectal cancer and to search for a method overcoming the resistance. As a result of comprehensive gene expression analysis, we determined that a specific subgroup correlated with effects of standard 1st-line treatment and of 3rd-line anti-EGFR antibody of the unresectable advanced or recurrent colorectal cancer and the second treatment. And as a result of comprehensive miRNA expression analysis, we identified that miR-193a-3p strongly correlated with BRAF mutation tumor, and that lower expression of miR-193a-3p associated with refractory of the anti-EGFR antibody. We are going to develop the study more in future.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：大腸癌 高DNAメチル化型大腸癌 抗EGFR抗体薬 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

大腸癌は世界的に頻度が高く、罹患率、死亡率ともに増加傾向にある。2000年以降、切除能進行再発大腸癌(以下、進行大腸癌)に対する薬物療法は投与法の改良や分子標的治療薬等の新薬開発により生存期間は徐々に延長した。しかし、効果や副作用の点で未だ十分な成績が得られず、真に有効な患者を予測するための効果予測バイオマーカーの開発と治療抵抗群に対する新しい治療法の開発が必要である。研究代表者はこれまで大腸癌のバイオマーカーと新規抗がん剤の創薬シーズに関する探索研究を行ってきた。進行大腸癌の標準分子標的治療薬として抗EGFR抗体薬(セツキシマブとパニツムマブ)があるが、その治療耐性を規定するジェネティックファクターとしてRAS遺伝子が治療無効予測因子として日常診療に導入されている。また、研究代表者らを含む内外の研究でEGFR経路上のRAS以外の遺伝子(BRAF、PIK3CAおよびAKTなど)変異が抗EGFR抗体薬の治療耐性因子であることが明らかにされている(Soeda et.al. Int J Clin Oncol 2013; Soeda et.al. Oncology 2014)。しかし、真の有効群の絞り込みが未だ不十分で新たなバイオマーカーの開発が必要である。

平成26年度、研究代表者らは患者由来進行大腸癌FFPE組織の網羅的メチローム解析、全エキソーム解析および網羅的遺伝子発現解析によるバイオマーカーの探索・開発研究の過程で、抗EGFR抗体薬の治療歴がある進行大腸癌では腫瘍由来DNAのゲノムワイドな高DNAメチル化状態(従来CpG island methylator phenotype,以下CIMP)を包括するより広いゲノムワイドな高DNAメチル化状態を特徴づける群)が多変量解析でRAS遺伝子変異とは独立した新規の抗EGFR抗体薬の治療耐性予測因子であることを世界に先駆けて明らかにし、さらにこの治療感受性に関してRAS野生型群を2群に層別化(約35%の高DNAメチル化群と約65%の低DNAメチル化群)することを可能にした(Ouchi K et al. Cancer Sci 2015, 新規バイオマーカーとして特許出願)。

そこで研究代表者は、高DNAメチル化状態による治療耐性のエピジェネティックな分子機構を明らかにすること、ならびにこの治療耐性を克服するための方策を探索すること、は新規治療法開発のシーズとして重要であると考えに至った。

2. 研究の目的

本研究の目的は、高DNAメチル化型大腸癌の抗EGFR抗体薬治療耐性の分子機構を明らかにし、この治療耐性を克服するための方策を探索することにある。計画している具体的な研究項目は、この治療耐性の分子機構の解明と治療モデル探索のため、

(1) 大腸癌組織の網羅的分子解析データの

統合解析による分子機構の探索研究

(2) 大腸癌培養細胞株を用いた分子機構の検証と耐性克服法の探索研究、を行う。

3. 研究の方法

平成27年度から平成29年度の3年間に、高DNAメチル化型大腸癌における抗EGFR抗体薬の耐性機序の解明と耐性解除の方策を検討する。具体的には、

(1) 網羅的分子解析データの統合解析による治療耐性の分子機構の探索研究

(2) 大腸癌細胞株を用いた治療耐性の分子機構の検証と抗EGFR抗体薬耐性克服の治療モデルの探索研究

を実施して、高DNAメチル化型大腸癌の抗EGFR抗体薬治療耐性の分子機構を明らかにし、この治療耐性を克服するための方策を探索する。

(1) 網羅的分子解析データの統合解析による治療耐性の分子機構の探索(高橋信、大内、沖田)

次世代がん研究シーズ戦略的育成プログラム(P-DIRECT)研究「大腸がん治療反応性を予測するバイオマーカーの探索(研究代表者・石岡)」で集めた患者由来大腸癌組織の全エキソーム解析、網羅的メチローム解析、網羅的遺伝子発現解析および網羅的miRNA解析データを統合解析して、特定の遺伝子構造異常、遺伝子発現異常、およびシグナル伝達経路異常(既知の治療耐性因子であるRASやBRAF遺伝子変異を含む)と治療耐性との関連を探索する。具体的には、

高DNAメチル化型大腸癌に特異的な遺伝子変異を探索する。

高DNAメチル化型大腸癌に特異的な遺伝子発現プロファイルを探索する。

高DNAメチル化型大腸癌に特異的なmiRNA発現プロファイルを探索する。

高DNAメチル化型大腸癌に特異的な遺伝子変異と関連する遺伝子発現プロファイルを探索する。

高DNAメチル化型大腸癌に特異的な遺伝子発現プロファイルと関連するmiRNA発現プロファイルを探索する。

これら網羅的分子解析データの統合解析から得られた結果から、高DNAメチル化型大腸癌細胞における抗EGFR抗体薬耐性の分子機構のモデルについて検討を開始する。

(2) 大腸癌細胞株を用いた治療耐性の分子機構の検証と耐性克服法の探索研究(高橋雅信、小林)

各種大腸癌細胞株(5種類)を用いて、高DNAメチル化型大腸癌細胞(HCT-116, SW48, RKO)が抗EGFR抗体薬に対して治療耐性になる分子機構を上記(1)でえられるモデルを参考にしつつ*in vitro*で検証する(proof of concept)。具体的には、

遺伝子発現修飾(特定遺伝子の強制発現、

siRNA による特定遺伝子のノックダウン) による抗 EGFR 抗体薬の感受性変化の観察を開始する。

miRNA 発現修飾 (特定 miRNA の強制発現、miRNA のノックダウン) による抗 EGFR 抗体薬の感受性変化の観察を開始する。

また、既知の治療耐性因子である RAS 遺伝子変異による治療耐性との類似性と相違性を比較 検討する。具体的には、

抗 EGFR 抗体薬耐性の高 DNA メチル化型大腸癌 (SW48, RKO)、RAS 変異型大腸癌は (HCT-116, SW480)、高 DNA メチル化型かつ KRAS 変異型大腸癌 (HCT-116) および抗 EGFR 抗体薬感受性の低 DNA メチル化型かつ RAS 野生型大腸癌 (COLO320) の抗 EGFR 抗体薬 投与後の遺伝子発現や RAS/MAPK, PI3K/AKT などの主要な細胞増殖シグナル伝達経路の活性化状態を解析する。なお、抗 EGFR 抗体薬としてセツキシマブを使用する。

4. 研究成果

(1)大腸癌組織の網羅的分子解析データの統合解析による分子機構の探索研究 (高橋信、大内、沖田)

P-DIRECT 研究で集めた患者由来大腸癌組織薬 300 例の全エクソーム解析、網羅的メチローム解析、網羅的遺伝子発現解析および網羅的 miRNA 解析データを統合解析して、特定の遺伝子構造異常、遺伝子発現異常、およびシグナル伝達経路異常 (既知の治療耐性因子である RAS や BRAF 遺伝子変異を含む) と治療耐性との関連を探索した。

その結果、 遺伝子発現プロファイルによる特定のサブグループが切除不能進行再発大腸癌の 1 次治療の治療効果や 2 次治療以降の抗 EGFR 抗体薬の治療感受性と強く相関することを明らかにした (Okita A et al. Oncotarget 2018)。具体的にこの研究では、東北大学病院腫瘍内科および国立がんセンター中央病院消化内科で治療を行った進行再発大腸癌 193 例を対象として、網羅的遺伝子発現解析 (トランスクリプトーム) に基づいて Consensus molecular subtypes of colorectal cancer* (CMS) による分類を行い、薬物療法の効果と CMS の関連性を後方視的に解析することにより、CMS の治療効果予

* Consensus molecular subtypes of colorectal cancer (CMS): 大腸癌の大規模なコホートを用いて網羅的遺伝子発現レベルに基づいて作られた分類法で、現在最も頑健な大腸癌の分類法の 1 つである。CMS は CMS1 ~ CMS4 の 4 つのサブタイプに分類され、それぞれが特徴的な分子生物学的背景を有している。Guinney J et al. Nat Med 2015; 21: 1350-1356

測バイオマーカーとしての意義を検討した。手術により切除された原発巣のホルマリン固定パラフィン包埋組織から核酸を抽出し、DNA マイクロアレイを用いて取得した遺伝子発現データに基づいて各症例を CMS1 ~ CMS4 へ分類した。また、分子生物学的背景の確認

のため、全エクソームシーケンス (エクソーム) やダイレクトシーケンスによる RAS 遺伝子および BRAF 遺伝子の変異解析と網羅的 DNA メチル化解析 (メチローム) を施行した。分類の結果、CMS1 ~ CMS4 における各サブタイプの分子生物学的特徴や臨床の特徴は過去の報告に一致していた。治療効果との関連について解析を行ったところ、CMS4 に対しては、細胞傷害性薬剤であるイリノテカンを用いたレジメンが、同じく殺細胞性抗がん薬であるオキサリプラチンを用いたレジメンよりも有効であった (図 1)。

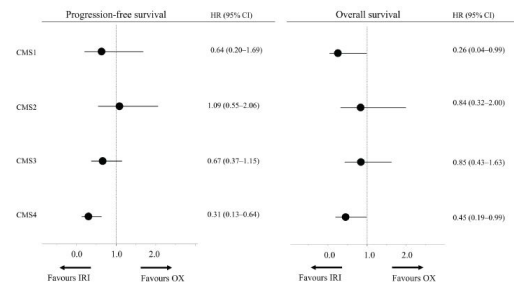


図 1. CMS サブタイプ別のイリノテカン (IRI) とオキサリプラチン (OX) に対する治療効果をハザード比 (HR) で比較 (左: 無増悪生存期間と右: 全生存期間)

また、CMS1 は抗 EGFR 抗体薬に抵抗性を示し、CMS2 は抗 EGFR 抗体薬への感受性が特に高かった (図 2)。

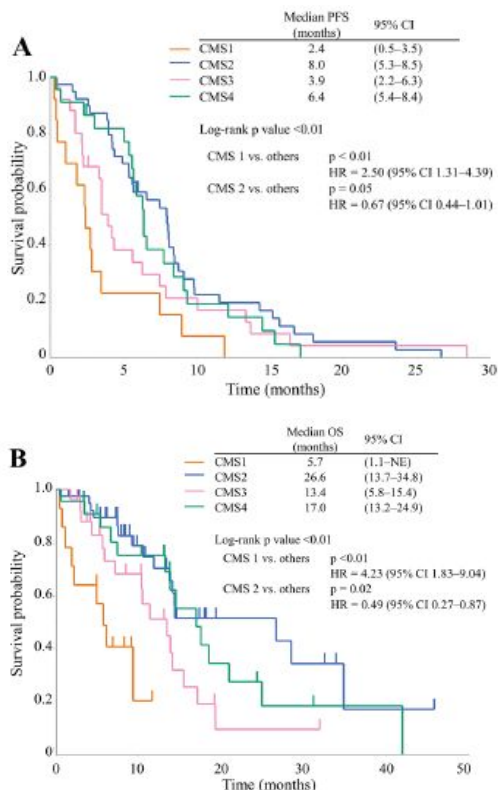


図 2. CMS サブタイプ別の抗 EGFR 抗体薬治療後の Kaplan-Meier 生存曲線。A. 無増悪生存期間、B. 全生存期間。

本研究の成果は、進行再発大腸癌に対する薬物療法の効果と CMS の関連について幅広く解析を行った初めての研究であり、CMS が治療効果予測バイオマーカーとして有用である

ことが示唆された。

また、大腸癌細胞株を用いた治療耐性の分子機構の検証実験を行った(高橋雅信)。その結果、miRNAの網羅的解析により、治療抵抗性で予後不良と強く関連する *BRAF* 変異腫瘍と強く相関する miR-193a-3p を同定し、miR-193a-3pの低発現が抗EGFR抗体薬の治療抵抗性(短い無増悪生存期間)と関連することを明らかにした(Takahashi H, et al. BMC Cancer 2017)。具体的には、この研究の目的は、*BRAF*変異型大腸癌に特異的なmiRNAの発現異常を同定し、そのmiRNAが*BRAF*変異型大腸癌の発癌・進展に促進的、または抑制的に作用するメカニズムを明らかにすること、ならびに大腸癌の腫瘍内のmiRNAの発現量と、抗癌剤感受性との関連を明らかにすることである。手術療法またはがん薬物療法、もしくはその両方の治療を受けた大腸癌314例を対象とした。この314例からスクリーニングセット(*BRAF*変異型大腸癌15例、野生型*RAS*遺伝子かつ野生型*BRAF*遺伝子を持つ大腸癌15例)と検証セット(*BRAF*変異型大腸癌4例、野生型*RAS*遺伝子かつ野生型*BRAF*遺伝子を持つ大腸癌30例)を抽出した。スクリーニングセットを用いてmiRNAマイクロアレイによる網羅的miRNA発現解析を行い、野生型*KRAS*遺伝子かつ野生型*BRAF*遺伝子を持つ大腸癌群と比較し、*BRAF*変異型大腸癌群で発現量が変化しているmiRNAを同定した。次に検証セットを用いてリアルタイムRT-PCR法によりmiRNA発現量を定量し、スクリーニングセットによる網羅的miRNA発現解析の結果の再現性を検証した。さらに、大腸癌細胞株に*BRAF*変異型大腸癌群で発現低下が見られたmiR-193a-3pを過剰発現させて細胞増殖能、浸潤能に与える変化をそれぞれMTTアッセイ、浸潤アッセイにより評価した。変異型*BRAF*(p.V600E)発現プラスミドを作成し、大腸癌細胞株に変異型(V600E)*BRAF*を過剰発現した際のmiR-193a-3pの発現量の変化をリアルタイムRT-PCR法で測定した。さらにがん薬物療法を受けた大腸癌99例において、miR-193a-3pの発現量と初回化学療法開始後の全生存期間、抗EGFR抗体薬開始後の全生存期間、初回化学療法あるいは抗EGFR抗体薬の無増悪生存期間、奏効率、腫瘍制御率の間に関連があるかどうかを解析した。その結果、スクリーニングセットを用いたmiRNAマイクロアレイによる網羅的miRNA発現解析により、野生型*KRAS*遺伝子かつ野生型*BRAF*遺伝子を持つ大腸癌群と比較して*BRAF*変異型大腸癌群で高発現のmiRNAを9種類、低発現のmiRNAを13種類同定した。これらの22種類のmiRNAのうち、*BRAF*変異型大腸癌群で高発現の上位3種類(miR-31, miR-135b, miR-7)と低発現の下位2種類(miR-193a-3p, miR-148b)について、検証セットを用いてリアルタイムRT-PCR法で再現性を検証したところ、miR-31, miR-135b, miR-193a-3pの3種類がスクリーニングセットと同様に*BRAF*

変異型大腸癌群で有意に発現が変化していることが確認された(図3)。

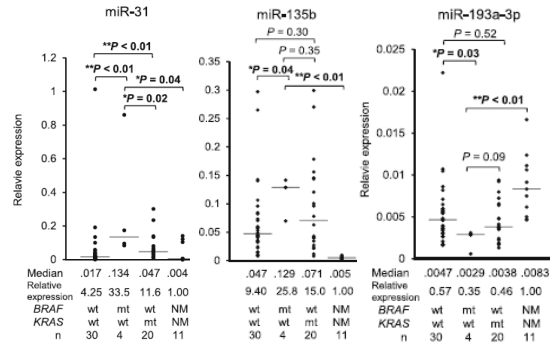
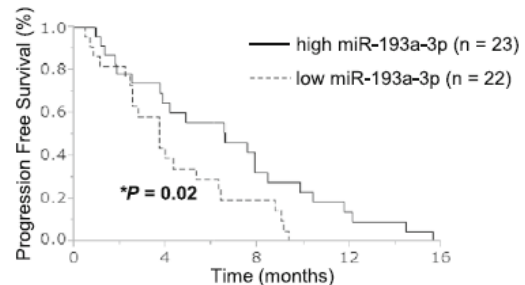


図3. *BRAF*変異を有する大腸癌において有意に発現上昇(miR-31, miR-135b)または低下(miR-193a-3p)するmiRNA。

これら3種類のmiRNAのうちmiR-193a-3pが大腸癌細胞株の細胞増殖能や浸潤能を阻害する作用を有することが明らかになり、発癌過程で抑制的miRNAとして機能する可能性が示唆された。さらに*KRAS*遺伝子と*BRAF*遺伝子が共に野生型の大腸癌細胞株に変異型(V600E)*BRAF*を過剰発現させたところ、miR-193a-3pの発現低下が誘導されたことから、miR-193a-3pは*BRAF*あるいはさらにその下流のMEK-ERK-MAPK経路関連因子によって直接的または間接的に負の制御を受けている可能性が示唆された。最後に、進行再発大腸癌症例においてmiR-193a-3pの低発現群はその高発現群と比較して、抗EGFR抗体薬に



対する無増悪生存期間が短いことを明らかにした(図4)。

図4. miR-193a-3pの発現レベルによる抗EGFR抗体薬治療後のKaplan-Meier生存曲線。

このことからmiR-193a-3pが抗EGFR抗体薬治療の感受性に関与している可能性が示唆された。miR-193a-3pが大腸癌の発生・進展に関わる機序を解明することにより、*BRAF*変異型大腸癌に特異的な新規標的分子が同定される可能性があり、*BRAF*変異型大腸癌の診断法や治療法のさらなる発展につながることを期待される。

(2)大腸癌細胞株を用いた治療耐性の分子機構の検証と耐性克服法の探索研究(高橋雅信、小林)

大腸癌細胞株を用いた治療耐性の分子機構の検証するために、各種大腸癌細胞株を用いて、高DNAメチル化型大腸癌細胞(HCT-116, SW48, RKO)が抗EGFR抗体薬に対

して治療耐性になる分子機構種々検討したが、現時点では直接的な分子機構は不明である。今後、既知の治療耐性因子である RAS 変異や PIK3CA 変異による治療耐性との類似性と相違性を比較検討する予定である。また、抗 EGFR 抗体薬耐性克服の治療モデルを探索する目的で、エピジェネティック修飾薬剤であるロミデプシン誘導体による高 DNA メチル化型大腸癌細胞の抗 EGFR 抗体薬耐性の解除を検討したが、耐性解除は確認できなかった。現在、siRNA ライブラリースクリーニングによる HDAC 阻害薬感受性修飾遺伝子を探索中である。

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3件)

Okita A, Takahashi S, Ouchi K, Inoue M, Watanabe M, Endo M, Honda H, Yamada Y, Ishioka C. Consensus molecular subtypes classification of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapeutic efficacy against metastatic colorectal cancer. *Oncotarget* 9:18698-18711, 2018. 査読有り

Takahashi, H., Takahashi, M., Ohnuma, S., Unno, M., Yoshino, Y., Ouchi, K., Takahashi, S., Yamada, Y., Shimodaira, H., Ishioka, C. microRNA-193a-3p is specifically down-regulated and acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer. *BMC Cancer* 17: 723. 2017, Nov 07 査読有り

Zhang, X., Shimodaira, H., Soeda, H., Komine, K., Takahashi, H., Ouchi, K., Inoue, M., Takahashi, M., Takahashi, S., Ishioka, C. CpG island methylator phenotype is associated with the efficacy of sequential oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy and EGFR-related gene mutation in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* 21: 1091-1101 2016. 査読有り

[学会発表](計6件)

Okita, A., Takahashi, S., Ouchi, K., Inoue, M., Yamada, Y., Ishioka, C.: The consensus molecular subtypes of colorectal cancer as a predictive factor for chemotherapies against metastatic colorectal cancer. 2018 Gastrointestinal Cancers Symposium, Jan 20, 2018. San Francisco, USA.

沖田啓, 高橋信, 大内康太, 山田康秀, 高橋雅信, 石岡千加史: Consensus

Molecular Subtypes (CMS) は抗 EGFR 抗体薬の治療効果予測因子となる. 第 76 回日本癌学会学術総会. 横浜. 2017 年 9 月 29 日. ポスター

石岡千加史, 西條憲, 高橋信, 大内康太, 今井源, 高橋雅信: 進行大腸癌の新しい分子標的薬とバイオマーカーの開発. 第 76 回日本癌学会学術総会 横浜. 2017 年 9 月 28 日. シンポジウム

沖田啓, 高橋信, 大内康太, 山田英晴, 笠原佑記, 近松園子, 高橋秀和, 高橋雅信, 下平秀樹, 石岡千加史: Consensus molecular subtypes (CMS) に基づく、進行・再発大腸癌に対する最適な化学療法の見直し. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 神戸. 2017 年 7 月 29 日. 一般口演

石岡千加史, 高橋信, 大内康太, 高橋雅信, 永江玄太: 大腸がんに対する抗 EGFR 抗体薬の効果を予測する新規バイオマーカー・DNA メチル化状態診断キットの開発. ジャパン・キャンサーリサーチ・プロジェクト 平成 28 年度企業向け成果発表会 (招待講演) 2017 年 03 月 03 日 アキバホール (東京都・秋葉原)

Takahashi, H., Takahashi, M., Takahashi, S., H., S., Ishioka, C. microRNA-193a-3p acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer. AACR 2016 Apr 16, 2016. New Orleans, USA

[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]

特記事項無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

石岡 千加史 (ISHIOAK, Chikashi)
東北大学・加齢医学研究所・教授
研究者番号: 60241577

(2) 研究分担者

高橋 雅信 (TAKAHASHI, Masanobu)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号: 00447161

高橋 信 (TAKAHASHI, Shin)

東北大学・病院・講師
研究者番号: 20431570

(3) 連携研究者

なし

(4)研究協力者

大内 康太 (OUCHI, Kota)

沖田 啓 (OKITA, Akira)

小林輝大 (KOBAYASHI Akihiro)