

令和 2 年 4 月 30 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07204

研究課題名(和文) 転移性大腸がんに対するベバシズマブ併用療法選択のためのバイオマーカーの探索的研究

研究課題名(英文) Exploration of biomarkers for the choice of chemotherapy in colorectal cancer patients

研究代表者

藤田 至彦 (FUJITA, Yoshihiko)

近畿大学・医学部・講師

研究者番号：80192730

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：CGHアレイ解析により、8q24.1-q24.2に遺伝子コピー数増加を有する進行性大腸がん患者では、FOLFIRI療法+bevacizumab治療群の方がFOLFOX療法+bevacizumab治療群よりも有意に長いIPFSやOSを示した。また、大腸がん細胞株を用いた検証により、8q24.1-q24.2領域のコピー数が多い大腸がん細胞株は、イリノテカンのプロドラッグであるSN38に高い感受性を示すこと、この染色体領域に含まれる遺伝子であるMYCやFAM84Bが両者の感受性の違いを左右していることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで大腸がん患者へのベバシズマブの併用療法としてFOLFOX療法またはFOLFIRI療法のどちらを選択するか決まった指針がなかった。今回の結果から、がん部DNAにおける8q24.1-q24.2染色体領域に遺伝子増幅がある患者は全体の約40%を占め、そのような患者ならばFOLFOX療法よりFOLFIRI療法を採用するのが良いことが示された。また、この染色体上におけるMYC、FAM84B遺伝子が薬剤感受性に関与することから、効果予測バイオマーカーの特定のみならず大腸がん患者の分子標的治療への道が拓けた。これらのことは臨床的にはたいへん意義深いことである。

研究成果の概要(英文)：Among patients of metastatic colorectal cancer (mCRC) with copy number gain (CNG) at chromosome 8q24.1-q24.2 (~40% of the patients), response rate and prognosis factors (OS and PFS) were better for those treated with irinotecan(iri)-based than those with oxaliplatin(ox)-based combination chemotherapy. Chromosome 8q24.1-q24.2 may contain genes that could potentially serve as predictive markers for selecting either iri- or ox-based chemotherapy in combination with bevacizumab for treatment of mCRC patients. Myc-knocked down Colo320 cells (with a CNG at 8q24.1-24.2) reduced sensitivity to SN38, but Myc-overexpressed DLD1 cells (without CNG at 8q24.1-24.2) did not, suggesting that Myc is not indispensable factor for iri sensitivity. Fam84B-overexpressed DLD1 cells increase sensitivity to SN38, suggesting that this gene that resides in the 8q24.1-24.2 region could be a critical factor to choose ox- or iri-based chemotherapy in combination with bevacizumab for treatment of mCRC patients.

研究分野：分子腫瘍学

キーワード：進行性大腸がん irinotecan oxaliplatin bevacizumab CGH アレイ法 遺伝子コピー数増加

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

#### 1. 研究開始当初の背景

(1) bevacizumab 併用療法は、切除不能進行・再発大腸がん(mCRC)に対する標準治療の1つとして位置づけられており、プラットフォームとなる FOLFOX 療法、FOLFIRI 療法はそれぞれ oxaliplatin、irinotecan をベースとした化学療法である。いずれも bevacizumab との併用レジメンとして広く推奨されているが、mCRC の治療法として個々の患者に対してどちらの併用療法を選択するかという明確な基準はない。

(2) 比較ゲノムハイブリダイゼーションアレイ(aCGH)法は検体の DNA から全ゲノムにおけるコピー数のプロファイルを得ることができ、コピー数の増減が起こる染色体領域およびその中に含まれる遺伝子が薬剤感受性や予後の予測バイオマーカー候補となる可能性をもつ。

#### 2. 研究の目的

今回、西日本がん研究機構ランダム化比較第 III 相試験の付随研究として、154 名の mCRC のホルマリン固定パラフィン包埋検体から抽出した DNA より、aCGH 法をもちいて、各患者の腫瘍部位の全ゲノムにおけるコピー数のプロファイルを得た。これをもとに、mCRC の予後や薬剤の効果を推定できる染色体領域の特定を行ったが、本研究の目的はこれを分子生物学的手法で検証し、予後や効果予測バイオマーカーとなりうる遺伝子の特定を行うことである。さらに、候補として得られた遺伝子が治療標的分子となるか検討を行う。

#### 3. 研究の方法

(1) mCRC 患者の余剰 DNA サンプルを用い、PCR 法に基づくコピー数計測より aCGH の妥当性を検討した。

(2) 患者と類似のコピー数増加領域をもつ大腸がん細胞株を用い、薬剤感受性の変化を追跡した。

(3) aCGH の結果より薬剤感受性変化に影響の大きいと思われるコピー数増加領域を特定した。さらに、その染色体領域に含まれる遺伝子を選定し、それらの強制発現株またはノックダウン株の作成および *in vivo* における薬剤感受性変化の評価を行った。

#### 4. 研究成果

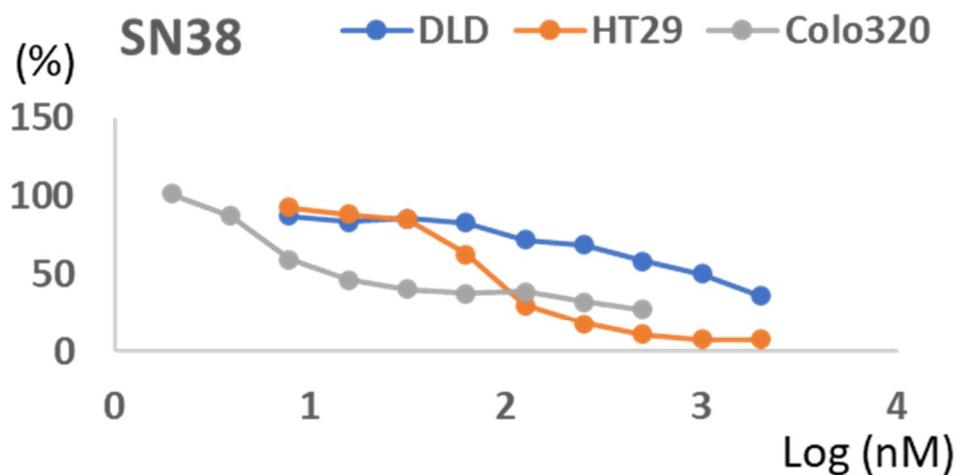
(1) 154名のmCRCの検体を用いたaCGH解析ののち、カプランマイヤー解析を行ったところ、1.2倍以上のコピー数増加 (copy number gain: CNG)がみられる領域のうち、8番長腕24.1-24.2 (8q24.1-q24.2)が候補領域として挙げられた。すなわち、FOLFOX併用群(n=75)ではこの領域にCNGのある患者(n=32)のほうがCNGのない患者(n=43)よりも有意に全生存期間(OS)が短く(p=0.026)、反対にFOLFIRI併用群(n=79)ではこの領域にCNGのある患者(n=30)がCNGのない患者(n=49)よりも有意にOSが長かった(P=0.037)。したがってこの領域にCNGのある患者(n=62、全体の約40%)と比較すると、FOLFIRI併用群がFOLFOX併用群よりもきわめて良好な予後を示した(OS:中央値48カ月vs 27カ月、p=0.004、無増悪生存期間(PFS):14.5カ月vs 10.4カ月、p=0.037)。このことから、8q24.1-q24.2領域はoxaliplatinに対して抵抗性を高める因子(遺伝子)ならびにirinotecanに対して感受性を高める因子を同時に含むことを示唆した。8q24.1-q24.2領域でCNGを検出したすべての症例(DNA, 62例)について、PCR法でより正確な遺伝子増加倍率を算出したところ、これらの症例についてCGH法により検出された8q24.1-q24.2領域におけるCNGの妥当性が示された。

(2) 8q24.1-q24.2領域に大きくCNGがみられる大腸がん由来のCoLo320、CNGのないIDLD1、両者の

中間的なHT29細胞株を比較したところ、irinotecanのプロドラッグであるSN38に対する感受性はColo320 (IC50 0.013  $\mu$ M)>HT29 (0.1  $\mu$ M)>DLD1 (1.01  $\mu$ M)であった (Fig.1)。このことから8q24.1-q24.2領域におけるコピー数増加とirinotecan感受性の相関性が示された。

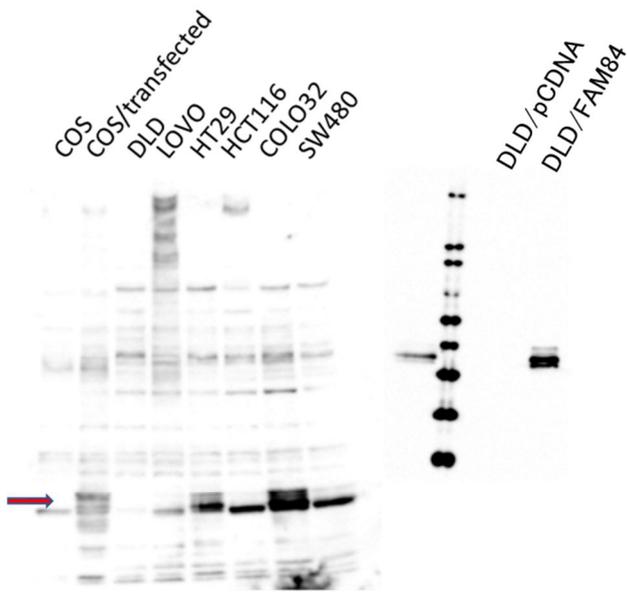
(3) 8q24.1-q24.2領域に含まれる遺伝子のうち、MYCをノックダウンしたColo320はSN38のIC50を0.013から0.2  $\mu$ Mへと変化させ、感受性が大きく減少したが、DLD1細胞にMYCを強制発現させても感受性にほとんど変化がなかった。逆にFAM84Bを強制発現させるとDLD1細胞でSN38のIC50が1から0.19  $\mu$ Mへと変化し、感受性が5倍ほど高くなった。また、これらの遺伝子のうちoxaliplatin感受性を変化させるものは見つからなかった (Fig.2)。

これらのことから MYCはイリノテカンの感受性を高める何らかの働きは有するが、それ単独では感受性を高めるファクターにはならないこと、FAM84Bはイリノテカンの感受性を高める何らかの機能を持っていると考えられた。以上より、この8q24.1-q24.2染色体領域に含まれる遺伝子であるMYCやFAM84BがFOLFFOX療法、FOLFIRI併用療法における両者の感受性の違いを左右していることがわかったので、今後これらの分子を標的とした個別医療につなげていけると考えられる。



IC50 ( $\mu$ M)	SN38	L-OHP
DLD	1.01	17.8
HT29	0.1	1.8
Colo320	0.0128	1.4

Fig.1 Growth inhibition curves analyzed with MTT assay for 3 cell lines using increasing concentration of SN38 (irinotecan prodrug).



IC50 (uM)	SN38	L-OHP
DLD/pcDNA	0.996	13.1
DLD/FAM	0.191	10.1

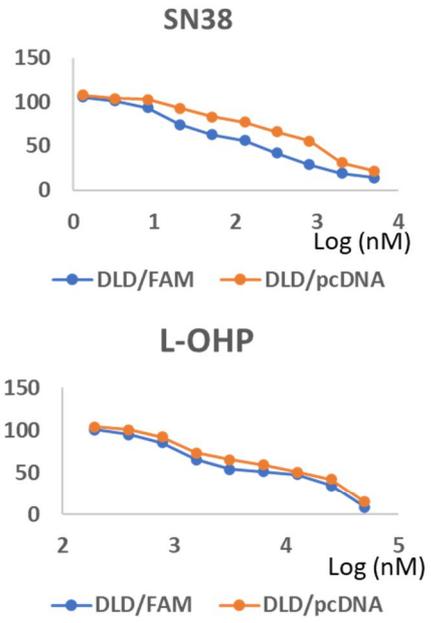


Fig.2 Growth inhibition curves for DLD1 transected with FAM84B expression vector with increasing concentration of SN38 and L-OHP

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fujita Yoshihiko, Taguri Masataka, Yamazaki Kentaro, Tsurutani Junji, Sakai Kazuko, Tsushima Takahiro, Nagase Michitaka, Tamagawa Hiroshi, Ueda Shinya, Tamura Takao, et al.	4. 巻 24
2. 論文標題 aCGH Analysis of Predictive Biomarkers for Response to Bevacizumab plus Oxaliplatin or Irinotecan Based Chemotherapy in Patients with Metastatic Colorectal Cancer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Oncologist	6. 最初と最後の頁 327 ~ 337
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1634/theoncologist.2018-0119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Hayashi Hidetoshi, Kurata Takayasu, Takiguchi Yuichi, Arai Makoto, Takeda Koji, Akiyoshi Kohei, Matsumoto Koji, Onoe Takuma, Mukai Hirofumi, Matsubara Nobuaki, Minami Hironobu, Toyoda Masanori, Onozawa Yusuke, Ono Akira, Fujita Yoshihiko, Sakai Kazuko, et al.	4. 巻 37
2. 論文標題 Randomized Phase II Trial Comparing Site-Specific Treatment Based on Gene Expression Profiling With Carboplatin and Paclitaxel for Patients With Cancer of Unknown Primary Site	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Clinical Oncology	6. 最初と最後の頁 570 ~ 579
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1200/JCO.18.00771	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka H, Tsurutani J, Chiba Y, Fujita Y, Terashima M, Yoshida T, Sakai K, Otake Y, Koyama A, Nishio K, Nakagawa K	4. 巻 17
2. 論文標題 Selection of opioids for cancer-related pain using a biomarker: a randomized, multi-institutional, open-label trial (RELIEF study).	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 BMC Cancer	6. 最初と最後の頁 1 - 6
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12885-017-3664-z.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Matsuoka H, Makimura C, Koyama A, Fujita Y, Tsurutani J, Sakai K, Sakamoto R, Nishio K, Nakagawa K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Prospective replication study implicates the catechol-O-methyltransferase Val158Met polymorphism as a biomarker for the response to morphine in patients with cancer.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Biomed Rep	6. 最初と最後の頁 380-384
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3892/br.2017.963.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Matsuoka H, Yoshiuchi K, Koyama A, Makimura C, Fujita Y, Tsurutani J, Sakai K, Sakamoto R, Nishio K, Nakagawa K.	4. 巻 24
2. 論文標題 Expectation of a Decrease in Pain Affects the Prognosis of Pain in Cancer Patients: a Prospective Cohort Study of Response to Morphine.	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Int J Behav Med	6. 最初と最後の頁 535-541
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) Int J Behav Med	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Haratani K, Hayashi H, Takahama T, Nakamura Y, Tomida S, Yoshida T, Chiba Y, Sawada T, Sakai K, Fujita Y, Togashi Y, Tanizaki J, Kawakami H, Ito A, Nishio K, Nakagawa K.	4. 巻 7
2. 論文標題 Clinical and immune profiling for cancer of unknown primary site.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 J Immunother Cancer	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s40425-019-0720-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計4件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 藤田 至彦、坂井 和子、山崎 健太郎、西尾 和人
2. 発表標題 大腸がん治療法選択のためのバイオマーカーの探索的研究
3. 学会等名 日本がん分子標的治療学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yoshihiko Fujita
2. 発表標題 Target molecules for treatment of cancer of unknown primary site
3. 学会等名 第22回日本がん分子標的治療学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Yoshihiko Fujita, Kazuko Sakai, Marco De Velasco, Takayasu Kurata, Hidetoshi Hayashi, Kazuhiko Nakagawa, Kazuto Nishio
2. 発表標題 Novel target molecules for treatment of cancer of unknown primary
3. 学会等名 米国癌学会年会 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 藤田 至彦
2. 発表標題 Exploration of biomarkers for the choice of chemotherapy in colorectal cancer patients
3. 学会等名 日本臨床腫瘍学会学術集会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考