

令和元年5月11日現在

機関番号：21601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K10545

研究課題名(和文) 直腸癌の術前治療感受性を予測する遺伝子およびマイクロRNAバイオマーカーの開発

研究課題名(英文) Development of predictive biomarkers for preoperative therapy responses in patients with rectal cancer

研究代表者

大木 進司 (Ohki, Shinji)

福島県立医科大学・医学部・准教授

研究者番号：20381361

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)：進行直腸癌症例に対し、術前放射線化学療法(CRT)および直腸の根治的切除が広く行われており、局所制御に寄与している。CRTへの感受性は、各症例により、抵抗例から病理学的完全奏功まで非常に多彩であり、術前CRT前に治療の感受性や抵抗性を予測することが個別的な直腸癌診療において重要である。本研究では多数の術前CRT前生検サンプルのマイクロアレイ解析データを集積し直腸癌術前CRT抵抗性予測バイオマーカーの確立を目指すものである。3つのマイクロアレイデータをdiscovery setとし、独自の遺伝子セットを抽出した。さらに4つの独立したマイクロアレイデータによりその意義の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

個々の直腸癌患者に最適な治療を選択することで、直腸癌の再発率の低下やQOLの改善に寄与すると言える。直腸癌の手術前に放射線化学療法が広く行われているが、その感受性は患者によりさまざまである。本研究では術前放射線化学療法への抵抗性を事前に予測するためのバイオマーカーの作成を意図しており、本研究で得られた知見が、今後の直腸癌の個別的治療につながる一助となることを期待するものである。

研究成果の概要(英文)：Neoadjuvant chemoradiotherapy (CRT) followed by surgical mesorectal excision is widely used to reduce local recurrence rates in patients with locally advanced rectal cancer. However, tumor response to CRT varies substantially among patients, ranging from resistance to complete pathological regression. This study aimed to develop transcriptional assays for predicting neoadjuvant CRT responses using pre-therapeutic biopsy specimens based on high-throughput gene expression technologies. Three microarray datasets were utilized as discovery cohorts to screen for genes that can be predictive of poor response to CRT. We identified a gene set that can pre-therapeutically discriminate non-responders from responders. We attempted to evaluate the predictive performance of our gene set as well as multi-gene or single-gene expression-based signatures previously reported using four independent validation cohorts.

研究分野：消化管癌

キーワード：直腸癌 術前治療 バイオマーカー

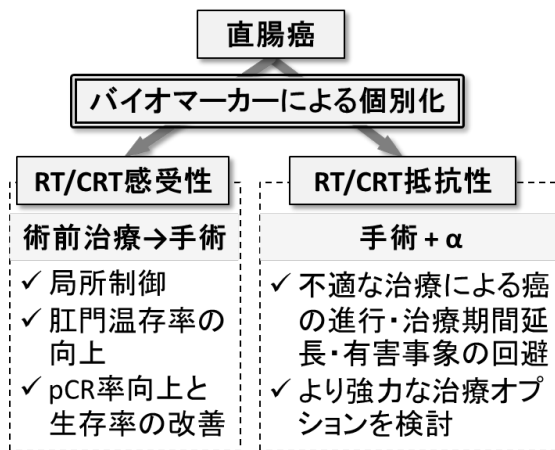
1. 研究開始当初の背景

大腸癌（結腸直腸癌）は罹患・死亡数とも最も上位の癌腫のひとつであるが、近年、診療の進歩が著しい。内視鏡治療や低侵襲な腹腔鏡手術は高度化し標準的となった。切除不能・再発例に対しては多数の新規薬剤が導入され生存期間の延長に貢献している。抗 EGFR 抗体薬の適否を判断する RAS 遺伝子・BRAF 遺伝子変異やイリノテカンの副作用に関連する UGT1A1 遺伝子多型検査なども保険適応となり、分子マーカーによる個別化医療が一部の領域では現実のものとなった。一方で、直腸癌の治療成績は結腸癌に比べ不良である。直腸癌では局所再発の制御が重大な問題である一方で、肛門温存や患者 QOL が根治性とトレードオフとなる場合がある。そのため直腸癌の診療は、きめ細かい臨床的マネジメントに加えて、治療方針の個別化が最も期待される領域のひとつと言える。

局所再発の切除は高侵襲・高難度であり合併症が重篤になりやすく、切除困難なら疼痛、出血など患者 QOL は著しく低下する。そのため局所制御と生存率の改善を目指し術前放射線治療 (RT) あるいは術前放射線化学療法 (CRT) が行われてきた。複数の無作為化比較試験により、術前 RT/CRT は全生存率の向上には寄与しないが、局所再発率を低下させることが示された。そのため欧米では術前 CRT が標準治療に位置づけられる。本邦では欧米と術式の差異（リンパ節郭清範囲）から術前治療の有用性は未確立とされ、術前治療導入は施設により差があるのが現状である。しかし病理学的完全奏効 (pCR) 症例の予後が極めて良好であること、また腫瘍縮小に伴い肛門温存率が向上することから、症例を適切に選別することで局所再発率のさらなる低下と生存率向上の可能性、および患者満足度や QOL にも寄与すると考えられ、術前 CRT が極めて有力な治療オプションであることは疑いがない。問題となるのは術前治療の無効症例である。術前治療に抵抗性であれば、手術までの時間が長期化することでむしろ病勢の進行の恐れがあるだけでなく、治療の有害事象という不利益のみを被るからである。したがって、個々の症例に対し術前 CRT の適否を決める指標が求められている。

上述の背景から、直腸癌の術前治療効果を予測するバイオマーカーは国内外で広く研究されてきた。術前治療前の内視鏡による生検標本を用いて、P53、P21、VEGF、CD44、CD133

など分子・遺伝子マーカーを RNA (qRT-PCR) やタンパクレベル (免疫染色: IHC) で評価するという報告が多く認められる。しかし報告間で結果の不一致が目立ち、再現性に乏しいとされる (Meng et al. *BioSci Trend* 2014)。他方、近年ではマイクロアレイを用いて、網羅的な方法によるマーカー検索が盛んに行われてきた (Ghadimi. *J Clin Oncol* 2005, Kim. *Dis Colon Rectum* 2007, Rimkus. *Clin Gastroenterol Hepatol* 2008)。これらはいずれも高い感度と特異度で術前 CRT の応答例・不応例を鑑別できると報告している。その後、これら 3 報の遺伝子発現マーカーの検証が試みられたが、否定的な結果であり臨床応用には適さないと結論付けられている (Kate. *Clin Cancer Res* 2011)。最近でもマイクロアレイによる遺伝子発現マーカーの有用性が示されている (Palma. *PLoS One* 2014, Watanabe. *Dis Colon Rectum* 2014)。しかしながら、我々独自の検証ではこれらの結果も別のコホートでは再現性を確認できない。以上より、直腸癌の術前治療効果予測の必要性に比して、臨床的に有用なバイオマーカーの確立には至っていないのが現状である。



2. 研究の目的

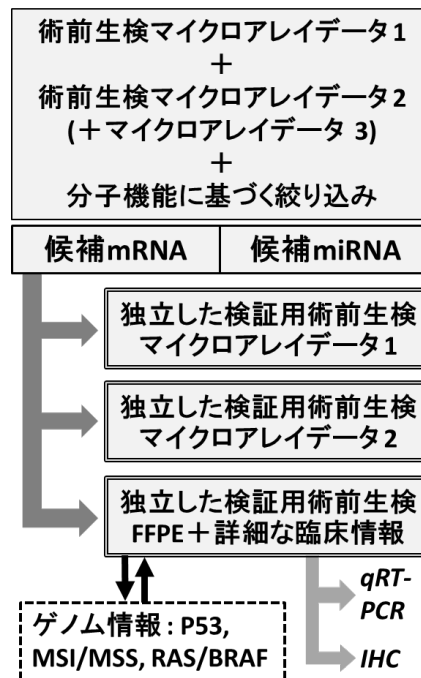
上述の背景を踏まえて、本研究は直腸癌の術前治療の感受性・抵抗性を予測する、再現性の高い個別化バイオマーカーの作成と検証を目的としている。

例えば上述の P53、P21 のように分子機能からのバイオマーカー候補選択には限界があり、バイオマーカー探索には術前治療前生検検体を用いた網羅的手法が合理的と言える。一方で、マイクロアレイなどの網羅的手法を用いた既報の論文が再現性の乏しさを指摘される理由として、生検検体は極端に微小であること、非腫瘍細胞・壊死・炎症組織を種々の割合で混在し得るためのノイズ、十分なサンプル数も確保しにくい点があげられる。またマイクロアレイのプロープは数万を超えるため、多数の疑陽性 (False discovery) が不可避である。

したがって、本研究の目的は、放射線感受性・抵抗性を予測するバイオマーカーの候補遺伝子 (またはマイクロ RNA) を検索することだけでなく、異なる施設の独立したコホートで、十分なサンプル数で、また異なるプラットフォームでもその再現性を確認することである。

### 3. 研究の方法

研究の流れの概要を右図に示す。術前治療前生検検体のマイクロアレイデータ解析（複数の公開データセット）・文献検索による候補遺伝子・マイクロRNA（miRNA）の抽出と絞り込みを行い、独立したデータセットを用いた再現性の検証を行う。候補遺伝子がコードするタンパクについて免疫染色を行い、単一～複数のタンパクレベルでの分子マーカーとしての意義を検証する。同時にパラフィン包埋切片からRNA抽出を行い、特に候補となるmiRNAについてqRT-PCRを用いた検討を行う。種々の統計学的方法により有用性の検証を行い、バイオマーカーとしての確立を目指す。さらにMSI、P53、RAS、BRAFなど各症例のゲノム異常のデータによる層別化解析を行いより有用な個別化を試みる。



### 4. 研究成果

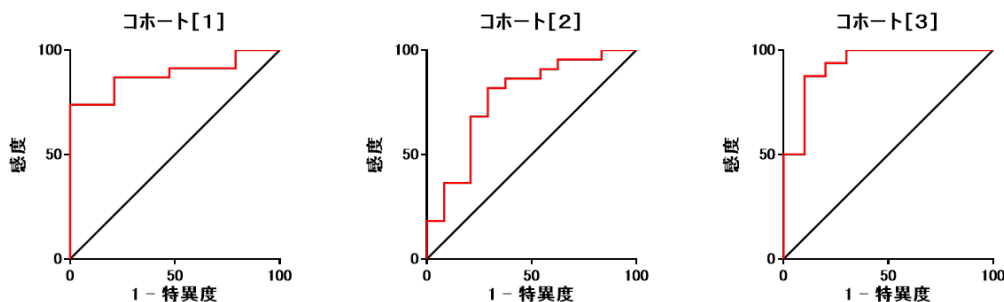
#### 大規模なマイクロアレイデータの取得

上述の背景、目的に沿って、可及的多数の術前治療前生検検体サンプルの公開マイクロアレイデータを集積した（Gene Expression Omnibusより収集）。結果として、総計300例を超える、おそらく当該研究分野では過去最大と思われるサンプル数の確保が可能であった。大半のマイクロアレイコホートではAffymetrix、Agilent、Illuminaなど各社の一般的に使用される市販のプラットフォームを用いており、コホートごとに正規化処理がされている。

各コホートに付随する臨床情報を用いて、CRTによる病理学的効果に基づき各症例をResponder、Non-responderに分類した。CRTはいずれも5FUをkey drugとしているが、経口・経静脈的な投与方法、オキサリプラチンを付加された症例も含まれていた。

#### 独自の遺伝子セット抽出

3つのマイクロアレイコホート（コホート[1][2]および[3]）合計114例、うちResponder: 53例、Non-responder: 61例）を候補遺伝子抽出用のセット（Discovery set）とした。これら3つのコホート全てで共通して、かつ有意に発現変動する4つの遺伝子セットを抽出した（gene set A）。このGene set Aを用いたNon-responder症例の検出において、コホート[1]では感度78.3、特異度79.0、AUC0.88、コホート[2]では感度77.3、特異度70.8、AUC0.77、コホート[3]では感度87.5、特異度90.0、AUC0.93と、Discovery setにおいての成績は当然ながら良好である（下図）。



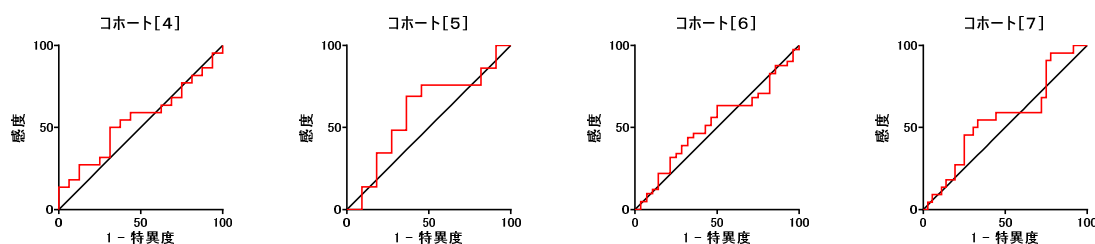
#### 既存の文献から遺伝子ないし遺伝子セットの抽出

後述の独立コホートによる検証（Validation）を試みるにあたり、上述した独自の候補遺伝子（Gene set A）に加え、既報告において遺伝子発現に基づくCRT感受性・抵抗性を予測し得るとされる遺伝子または遺伝子セットを抽出した。単一遺伝子発現によるものとしては、CD44（Hur. *Ann Surg* 2014）、NPTX2（Karagkounis. *J Surg Res* 2015）、XRCC3（Agostini. *Cancer Biol Ther* 2015）などがあり、遺伝子セットとしては、LRR1Q3/FRMD3/SAMD5/TMC7（Watanabe. *Dis Colon Rectum* 2014）、GNG4/MYC/POLA1/RRM1（Palma. *PLoS ONE* 2014）、AKR1C3/CXCL11/CXC

L10/ID01/CXCL9/MMP12/HLA-DRA (Agostini. *Oncotarget* 2015), TP53(p53)/MKI67(Ki67)/CDKN1A(p21)/PROM1(CD133) (Hur. *Dis Colon Rectum* 2016), などが報告されている。

### 独立したデータセットによる検証

本研究において作成した Gene set A および上述の既報告の遺伝子または遺伝子セットについて、その CRT 感受性・抵抗性予測性能を、独立した CRT 前の生検サンプルデータセットで検証を試みた。検証用に 3 つのコホートを準備し、Validation set とした。コホート [ 4 ] コホート [ 5 ] コホート [ 6 ] それぞれ Affymetrix、Illumina および Agilent のプラットフォームで解析されており、総計 147 サンプルで、うち Responder : 55 例、Non-responder : 92 例を含んでいる。さらに RT 感受性・抵抗性予測性能への応用の可能性を検討するため、コホート [ 7 ] として、RT 前の生検サンプルデータセット、合計 58 サンプル、(うち Responder : 36 例、Non-responder : 22 例) を用いた。



上図のように Validation set において、Gene set A の CRT ないし RT 抵抗性予測性能は不良であり、いずれも AUC 0.52 ~ 0.59 である。また既存の遺伝子、遺伝子セットも Validation set においての AUC は軒並み 0.5 ~ 0.6 と低く、十分な再現性が得られたとは言い難い。

### 本研究の限界

比較的大規模のデータを用いたが、結果としては再現性が高く臨床応用への可能性を強く支持するような遺伝子・遺伝子セットの同定には至っていない。術前治療前の生検検体を用いるという点で、RNA の質、量などテクニカルな問題があることなどが十分に解決できていない点と考えている。

当初は遺伝子発現 (mRNA) に加えて、パラフィン切片等の既存サンプルへの応用が比較的容易な、マイクロ RNA (miRNA) 発現を対象にすることを重要視していた。しかし利用できる公開データリソースが極めて限定的であることから、結果としては本研究では遺伝子のみを対象とすることとした。また、RAS や BRAF、MSI データの取得が難しいことや単一コホートの症例数が少ないことから、本研究の範囲内では、これらゲノム異常を用いた層別化解析の実施は困難であった。

## 5 . 主な発表論文等

[ 雑誌論文 ] (計 9 件)

Kikuchi D, Saito M, Saito K, Watanabe Y, Matsumoto Y, Kanke Y, Onozawa H, Hayase S, Sakamoto W, Ishigame T, Momma T, Ohki S, Takenoshita S. Upregulated solute carrier family 37 member 1 in colorectal cancer is associated with poor patient outcome and metastasis. *Oncol Lett.* 15(2): 2065-2072, 2018.

Matsumoto Y, Saito M, Saito K, Kanke Y, Watanabe Y, Onozawa H, Hayase S, Sakamoto W, Ishigame T, Momma T, Kumamoto K, Ohki S, Takenoshita S. Enhanced expression of KIF4A in colorectal cancer is associated with lymph node metastasis. *Oncol Lett.* 15(2): 2188-2194, 2018.

Noda M, Okayama H, Kofunato Y, Chida S, Saito K, Tada T, Ashizawa M, Nakajima T, Aoto K, Kikuchi T, Sakamoto W, Endo H, Fujita S, Saito M, Momma T, Ohki S, Kono K. Prognostic role of FUT8 expression in relation to p53 status in stage II and III colorectal cancer. *PLoS One.* 13(7): e0200315, 2018.

Noda M, Okayama H, Tachibana K, Sakamoto W, Saito K, Thar Min AK, Ashizawa M, Nakajima T, Aoto K, Momma T, Katakura K, Ohki S, Kono K. Glycosyltransferase Gene Expression Identifies a Poor Prognostic Colorectal Cancer Subtype Associated with Mismatch Repair Deficiency and Incomplete Glycan Synthesis. Clin Cancer Res. 24(18): 4468-4481, 2018.

Hayase S, Kumamoto K, Saito K, Kofunato Y, Sato Y, Okayama H, Miyamoto K, Ohki S, Takenoshita S. L-type amino acid transporter 1 expression is upregulated and associated with cellular proliferation in colorectal cancer. Oncol Lett. 14(6): 7410-7416, 2017.

Momma T, Okayama H, Saitou M, Sugeno H, Yoshimoto N, Takebayashi Y, Ohki S, Takenoshita S. Expression of circadian clock genes in human colorectal adenoma and carcinoma. Oncol Lett. 14(5):5319-5325, 2017.

Onozawa H, Saito M, Saito K, Kanke Y, Watanabe Y, Hayase S, Sakamoto W, Ishigame T, Momma T, Ohki S, Takenoshita S. Annexin A1 is involved in resistance to 5-FU in colon cancer cells. Oncology Rep. 37(1):235-240, 2017.

Tachibana K, Saito M, Imai J, Ito E, Yanagisawa, Honma R, Saito K, Ando J, Momma T, Ohki S, Ohtake T, Watanabe S, Waguri S and Takenoshita S. Clinicopathological examination on DPEP1 expression in colorectal cancer. Biomed Rep. 6(4):423-428, 2017.

大木進司, 加瀬晃志, 千田峻, 早瀬傑, 藤田正太郎, 門馬智之, 高和正, 河野浩二, 大竹徹, 竹之 誠一. 80 歳以上の高齢者大腸癌におけるリスク評価と予後の解析. 癌と化学療法. 43(12):1532-1534, 2016.

〔学会発表〕(計 10 件)

大木進司, 岡山洋和, 芦澤舞, 菊池智宏, 坂本涉, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 門馬智之, 佐瀬善一郎, 河野浩二. ハイリスク stage 大腸癌における inflammatory-based marker の意義と個別化治療戦略. 第 14 回日本消化管学会総会学術集会; 2018/2/9-10; 東京

齋藤元伸, 小野澤寿志, 作山美郷, 芦澤舞, 菊池智宏, 岡山洋和, 遠藤久仁, 藤田正太郎, 坂本涉, 佐瀬善一郎, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二. 胃癌・大腸癌における ANXA1 遺伝子の役割. 第 118 回日本外科学会定期学術集会; 2018/4/5-7; 東京

Okayama H, Ashizawa M, Kikuchi T, Sakamoto W, Fujita S, Endo H, Saito M, Momma T, Ohki S, Kono K. Targeting the tumor microenvironment in dMMR/MSI-H colorectal cancer. 第 73 回日本消化器外科学会総会; 2018/7/11-13; 鹿児島

岡山洋和, 野田勝, 立花和之進, 坂本涉, 芦澤舞, 中島隆宏, 青砥慶太, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二. 糖鎖酵素遺伝子によるステージ III 大腸癌の予後バイオマーカー. 第 56 回日本癌治療学会学術集会; 2018/10/18-20; 横浜

菊池智宏, 三村耕作, 岡山洋和, 坂本涉, 遠藤久仁, 藤田正太郎, 齋藤元伸, 門馬智之, 大木進司, 河野浩二. 大腸癌新鮮標本における腫瘍随伴マクロファージの解析. 第 56 回日本癌治療学会学術集会; 2018/10/18-20; 横浜

大木進司, 氏家大輔, 門馬智之, 芦澤舞, 岡山洋和, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 坂本涉, 菊池智宏, 齋藤元伸, 河野浩二. 免疫チェックポイント阻害療法時代のリンチ症候群スクリーニングの位置づけ. 第 73 回日本大腸肛門病学会学術集会; 2018/11/9-10; 東京

門馬智之, 片方雅紀, 佐藤孝洋, 菊池智宏, 岡山洋和, 坂本涉, 藤田正太郎, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 佐瀬善一郎, 大木進司, 河野浩二. 家族性大腸腺腫症に対する術式の検討. 第 73 回日本大腸肛門病学会学術集会; 2018/11/9-10; 東京

大木進司, 岡山洋和, 藤田正太郎, 坂本涉, 遠藤久仁, 齋藤元伸, 門馬智之, 円谷彰, 丸橋繁, 河野浩二. 術前放射線治療を施行した進行下部直腸癌に対する側方リンパ節郭清の意義. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017/7/20-22; 金沢

岡山洋和,野田勝,芦澤舞,中島隆宏,青砥慶太,千田峻,小船戸康英,大木進司,丸橋繁,河野浩二. 大腸癌における 1-6 フコース転移酵素と p53. 第 72 回日本消化器外科学会総会; 2017/7/20-22; 金沢

大木進司,岡山洋和,千田峻,芦澤舞,菊池智宏,坂本渉,藤田正太郎,遠藤久仁,齋藤元伸,門馬智之,佐瀬善一郎,丸橋繁,河野浩二. ハイリスク stage 大腸癌の治療戦略における inflammatory-based marker の意義. 第 79 回日本臨床外科学会総会; 2017/11/23-25; 東京

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：岡山 洋和

ローマ字氏名：OKAYAMA Hirokazu

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：消化管外科学講座

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 20583397

研究分担者氏名：門馬 智之

ローマ字氏名：MOMMA Tomoyuki

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：消化管外科学講座

職名：准教授

研究者番号 (8 桁): 20622335

研究分担者氏名：齋藤 元伸

ローマ字氏名：SAITO Motonobu

所属研究機関名：福島県立医科大学

部局名：消化管外科学講座

職名：講師

研究者番号 (8 桁): 90611749

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。