

令和 2 年 5 月 8 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15263

研究課題名(和文)大腸癌の治療感受性を予測する新規バイオマーカーの探索

研究課題名(英文) Search for novel biomarkers to predict treatment sensitivity in colorectal cancer

研究代表者

大内 康太 (Ouchi, Kota)

東北大学・大学病院・助教

研究者番号：50781291

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：HMCC群における正常大腸粘膜と腫瘍組織との間でメチル化状態が変化している355の遺伝子に関連するCpG領域を抽出した。抽出されたCpG領域について、139例のデータセットでHMCC群とLMCC群とを比較すると、HMCC群のみで特異的にメチル化されている領域を含む遺伝子が62個抽出された。これらの遺伝子のいずれかに生じた、メチル化状態の変化による遺伝子発現異常が抗EGFR抗体薬の治療感受性の差を生じているものと考えられた。139例のデータセットを用いて、62個の遺伝子についてHMCC群とLMCC群とで有意に発現状態に差のある遺伝子を探索したが、両群で有意差を示す遺伝子は同定されなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大腸癌のおよそ20%程度に高頻度にメチル化を認める症例群が含まれ、高メチル化大腸癌と低メチル化大腸癌とでは疫学的、分子生物学的特徴が異なることが広く知られている。しかし、現状でメチル化状態によって大腸癌の予後や薬剤感受性が異なることを説明可能な分子生物学的機序は明らかになっていない。本研究ではHMCCの腫瘍組織と正常大腸粘膜の比較、さらにHMCCとLMCCとの比較を行うことで、高メチル化大腸癌で特異的にメチル化されている領域を明らかにした。今後、スプライシングバリエーションを加味した解析を追加することで、メチル化によって大腸癌の予後や薬剤感受性が変化する機序が明らかとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：CpG sites associated with 355 genes with altered methylation status between normal colonic mucosa and tumor tissue in the HMCC group were extracted. When comparing the HMCC and LMCC groups for the extracted CpG sites in a dataset of 139 cases, 62 genes containing regions that were specifically methylated only in the HMCC group were extracted. Alterations in gene expression due to changes in methylation status in some of these genes may be responsible for the difference in the sensitivity of anti-EGFR antibodies. Using a data set of 139 cases, we have looked for genes with significantly different expression statuses in 62 genes between the HMCC and LMCC groups, but did not identify any genes that were significantly different between the two groups.

研究分野：臨床腫瘍学分野

キーワード：DNAメチル化 大腸癌 抗EGFR抗体薬 バイオマーカー

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

大腸癌は、近年死亡者数の増加が著しい癌の一つであり、2012年の時点で死亡者数は男性で第3位、女性で第1位に位置する癌である。2012年の大腸癌の死亡者数は約47,000人であり、今後さらに増加すると予測されている。現在の進行再発大腸癌の治療において、RAS遺伝子変異の有無が抗EGFR抗体薬による治療選択をする際のバイオマーカーとして広く用いられているもの(Douillard JY. et al. N Engl J Med 369(11): 1023-34)。RAS遺伝子野生型の症例において、抗EGFR抗体薬の治療による奏効率の上乗せは30%程度であり、十分とは言えないのが現状である。さらには、RAS遺伝子野生型症例であっても抗EGFR抗体薬に治療抵抗性を示す症例が認められており、より精度高く抗EGFR抗体薬の治療効果を予測できる診断薬の開発が求められている。

我々は進行再発大腸癌のKRAS遺伝子エクソン2野生型の症例について網羅的なメチル化解析を行い、これらの症例を高メチル化群(全体の約1/3の症例)、低メチル化群(全体の約2/3の症例)の2群に分類することで、抗EGFR抗体薬の治療感受性が異なることを明らかにした(Ouchi K. et al. Cancer Sci. 2015 106: 1722-1729)。具体的には高メチル化群と比較して低メチル化群では抗EGFR抗体薬の治療効果が有意に良好であった。また、RAS遺伝子野生型大腸癌(KRAS遺伝子およびNRAS遺伝子に変異を認めない)においても、同様の結果を得た。特に重要なことは、高メチル化群の治療成績は、抗EGFR抗体薬に抵抗性であるRAS遺伝子変異型群と同等の治療成績であったことである。すなわち、このメチル化状態による分類によって、従来抗EGFR抗体薬感受性と診断されていた症例の中から、真の治療感受性群、あるいは治療抵抗性群を抽出することが可能であると考えられた。本成果は「大腸癌に対する薬物療法の感受性を予測する方法」として特許出願中である(特願2014-212503号)。本分類は、抗EGFR抗体薬の治療効果を予測可能な新規バイオマーカーとしての有力な候補であると考えられるが、網羅的なメチル化解析には煩雑な作業工程が必要となり、費用がかかり過ぎることも課題として考えられた。

DNAのメチル化は、遺伝子発現の制御機構として重要であり、特にプロモーター領域のメチル化は、標的遺伝子の転写・発現を抑制する。従って、メチル化状態の異なる2群間では、発現状態に差のある遺伝子群が存在し、これまでの研究で示された抗EGFR抗体薬の治療感受性の差に寄与している可能性がある。すなわち、両群で発現状況の異なる遺伝子群は、抗EGFR抗体薬の治療感受性を予測する新規バイオマーカーの有力な候補であると推定される。

### 2. 研究の目的

網羅的DNAメチル化状態と網羅的遺伝子発現状態を統合解析することで、抗EGFR抗体薬の治療感受性と関連する遺伝子群を明らかにすることである。

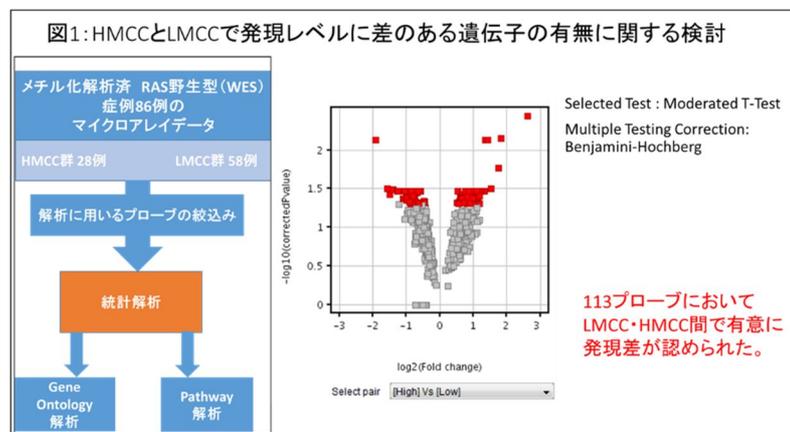
抗EGFR抗体薬の治療感受性を予測し得る遺伝子群が抽出された場合、過去の臨床検体(FFPEサンプル)を用いた検証的な後ろ向き観察研究を行い、新規バイオマーカーとしての有用性を検討する。

### 3. 研究の方法

これまでの研究で、RAS野生型で抗EGFR抗体薬による治療歴を有する進行再発大腸癌の手術検体86サンプル(A群)について、網羅的DNAメチル化解析及び網羅的遺伝子発現データの取得が完了している。このA群を、メチル化状態及び抗EGFR抗体薬の治療成績が異なる2群(高メチル化群(n=28)と低メチル化群(n=58))に分け、網羅的遺伝子発現解析を行う。高メチル化群と低メチル化群の2群間で遺伝子発現状態に差のある遺伝子群を抽出することで、抗EGFR抗体薬の治療感受性と関連する遺伝子群を探索する。抽出された遺伝子群について、網羅的DNAメチル化解析データから各遺伝子のメチル化レベルを算出し、メチル化レベルと遺伝子発現量との関連性を検討する。

### 4. 研究成果

これまでの研究で取得した、RAS野生型で抗EGFR抗体薬による治療歴を有する進行再発大腸癌の手術検体86サンプルの網羅的遺伝子発現データを用いて、高メチル化群と低メチル化群の2群間で有意に遺伝子発現状態が異なる遺伝子を抽出した結果、113の遺伝子が候補として抽出された(図1)。それらの遺伝子についてPathway解析を行ったところ、Wnt pathwayに関わる遺伝子群が含まれており、新規バイオマーカーの候補となり得ると考えられた。一方で、プロモ-



ーター遺伝子群が含まれており、新規バイオマーカーの候補となり得ると考えられた。一方で、プロモ-

ター領域のメチル化によって遺伝子発現状態が変化している遺伝子群を抽出するため、上記 86 サンプルの網羅的 DNA メチル化解析データ及び網羅的遺伝子発現データを用いて、プロモーター領域のメチル化状態と遺伝子発現レベルが相関する遺伝子を探索したが、有意な相関を示す遺伝子は抽出されなかった。従って、抽出された 113 の遺伝子発現状態が、高メチル化群と低メチル化群とで異なる理由がプロモーター領域のメチル化状態の差であることが検証されなかったため、さらなる検討が必要であると考えられた。

上記解析において、DNA メチル化状態と遺伝子発現状態が有意に相関する遺伝子群を抽出できなかった要因としては、DNA メチル化の解析対象を、遺伝子プロモーター領域のみに絞ったためであると考えられた。従って、CpG island だけでなく、CpG shore および shelf も含め、上記解析対象の内 HMCC 群 10 例における正常大腸粘膜と腫瘍組織との間でメチル化状態が変化している領域を抽出した。その結果、355 の遺伝子に関連する CpG 領域が、正常大腸粘膜ではメチル化されておらず、腫瘍組織では高度にメチル化されていることが明らかとなった(図 2)。

なお、LMCC 群 10 例においても同様の解析を行ったが、こちらでは特異的にメチル化レベルが変化している領域は乏しかった(図 3)。

HMCC 群における解析で抽出された CpG 領域について、本研究で取得した 100 サンプルと、別途施行された大腸癌の網羅的遺伝子発現解析で取得されたデータとを合わせた、合計 139 例の検証データセットで HMCC 群と LMCC 群とを比較すると、HMCC 群のみで特異的にメチル化されている領域を含む遺伝子が 62 個抽出された(下表)。これらの遺伝子のいずれかに生じた、メチル化状態の変化による遺伝子発現異常が抗 EGFR 抗体薬の治療感受性の差を生じているものと考えられた。

本考察をふまえ、実際に 139 例の検証データセットを用いて、62 個の遺伝子について HMCC 群と LMCC 群とで有意に発現状態に差のある遺伝子を Wilcoxon/Kruska-Wallis の検定を用いて探索したが、両群で有意差を示す遺伝子は同定されなかった。

大腸癌のおよそ 20%程度に高頻度にメチル化を認める症例群が含まれ、高メチル化大腸癌と低メチル化大腸癌とでは疫学的、分子生物学的特徴が異なることが広く知られている。しかし、現状でメチル化状態によって大腸癌の予後や薬剤感受性が異なることを説明可能な分子生物学的機序は明らかになっていない。本研究では HMCC の腫瘍組織と正常大腸粘膜の比較、さらに HMCC と LMCC との比較を行うことで、高メチル化大腸癌で特異的にメチル化されている領域を明らかにした。今後、スプライシングバリエーションを加味した解析を追加することで、メチル化によって大腸癌の予後や薬剤感受性が変化する機序が明らかとなる可能性がある。

図2: HMCCで特異的にメチル化状態が変化した領域

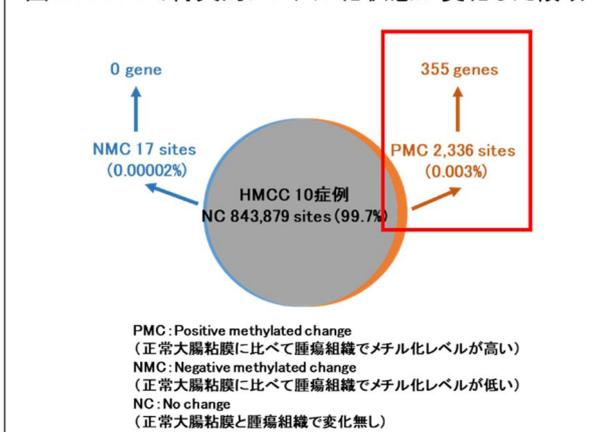
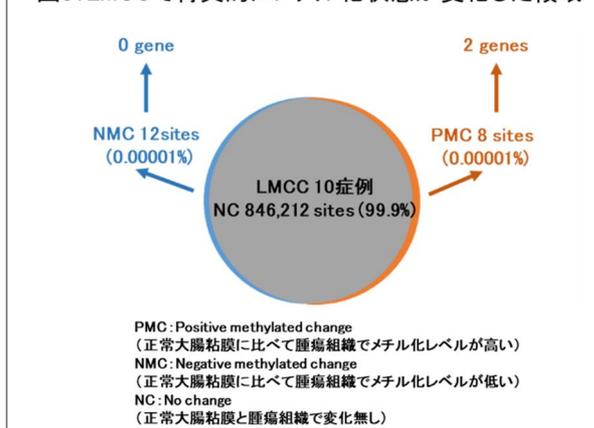


図3: LMCCで特異的にメチル化状態が変化した領域



SLC30A2	DKK1	GBX2	LOC728392	PPP1R3C	SIX1	WT1
ALX1	DMRT3	GFRA3	LPHN2	PTH1R	SMO	ZNF385B
ATRNL1	DNAH14	GLB1L3	LYPD1	RAPGEF4	SOX5	
BVES	EBF3	GLI3	MAP1B	RASGRF1	ST6GAL2	
CADM2	EMX2OS	GSX2	MAP6	RFX4	TLX1	
CBS	FLT3	IGF2	NELL2	RGMA	TOX2	
CPE	FOXB1	IGF2BP1	PLXNA4	RGS20	TRANK1	
CPNE8	FOXL2	ISL2	PODN	RIPPLY2	UCP1	
CRABP1	GABRB2	KCNK13	POMC	SCARF2	VGLL2	
CXCL12	GATA3	LHX9	POU4F1	SHISA3	WASF3	

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究協力者	沖田 啓  (Okita Akira)	東北大学・加齢医学研究所臨床腫瘍学分野・助教  (11301)	
研究協力者	大槻 泰史  (Otsuki Yasuhumi)	東北大学・加齢医学研究所臨床腫瘍学分野・大学院生  (11301)	