

平成 24 年 5 月 13 日現在

機関番号	11301
研究種目	基盤研究(B)
研究期間	2008～2010
課題番号	20390163
研究課題名(和文)	大腸癌の再発・予後予測のための分子マーカーの探索研究
研究課題名(英文)	Screening molecular markers for prediction of recurrence and prognosis of 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

研究成果の概要(和文)：進行大腸癌の術後の予後を予測し、切除不能進行再発大腸癌の抗がん剤感受性を予測する遺伝子セットを抽出するために、進行大腸癌の腫瘍組織から RNA を抽出し網羅的遺伝子発現を行った。進行大腸癌の遺伝子発現プロファイルは *unsupervised* 解析による 3 つの大きなクラスターに分類されることを発見した。この 3 つのクラスターは大腸癌の標準化学療法に対する感受性が異なることは判明した。現在、*supervised* 解析で各抗がん剤(投与方法)に相関する遺伝子セットの統計学的方法での抽出を試みている。

研究成果の概要(英文)：To identify gene sets for prediction of prognosis or for prediction of efficacy of anticancer drugs in metastatic colorectal cancer (mCRC), mRNA were extracted from tumor tissues of mCRC and were analyzed for oligonucleotide microarray. We found that mCRC were clustered into 3 large clusters. Further, these clusters were correlated with KRAS status and efficacy of chemotherapy with or without anti-EGFR antibody. We are now extracting gene sets for prediction of efficacy of specific anticancer drug or regimen.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	5,400,000	1,620,000	7,020,000
2009 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
2010 年度	4,100,000	1,230,000	5,330,000
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：境界医学・病態検査学

キーワード：腫瘍検査学、大腸癌、抗がん剤感受性予測、予後予測、分子マーカー

## 1. 研究開始当初の背景

大腸癌(結腸・直腸癌)はわが国における

癌の死者数の第 3 位(2004 年約 40,000 人)であり、2015 年にはさらに増加(約 66,000)

人)すると予測される。早期癌は内視鏡的治療や腸管切除術でほぼ治癒するが、臨床病期(進行度)がII期III期の進行大腸癌場合は所属リンパ節郭清を3群まで行なっても一定の割合で再発するため術後補助化学療法と、さらに切除不能例や再発例に対する化学療法の治療成績向上が重要である。1990年代後半から大腸癌の切除不能進行・再発症例に対する化学療法の進歩により生存期間が著しく延長し、最近では、進行大腸癌(II期III期)の術後補助化学療法—特にオキサリプラチンを含むFOLFOXレジメン(Andre, NEJM 350: 2343-51, 2004)やカペシタビン(Twelves et al. NEJM 352: 2696-704, 2005)の半年間の投与などが手術単独群と比較して再発率を僅かながら(しかし有意に)低下させ3-5年生存率を改善することが臨床第3相試験(無作為比較試験)で明らかにされている。しかし、術後補助化学療法により真に恩恵を受ける(予後が改善する)患者は全体の約30%程度(あるいはそれ以下)と考え、再発・予後予測を可能にする分子マーカーの開発が必要である。

## 2. 研究の目的

第1に腫瘍の分子解析により進行大腸癌(II期III期)の術後に予後を予測する分子マーカーを開発することである。第2に、切除不能進行・再発大腸癌に対する化学療法(特にイリノテカンを含むレジメン)に対する抗がん剤感受性予測について分子マーカーを探索することである。申請研究期間3年以内に以下の点を明らかにする。

研究1: DNAマイクロアレイ解析により、新たにかんがの再発・予後を予測する発現プロファイルを同定し、進行大腸癌(II期III期)予後を予測しうるかについて後向き研究を行なう。

研究2: 上記研究2をより簡便に測定・評価しうるアッセイ型を開発する。

研究3: 大腸癌のp53変異を機能的に分類した場合、予後予測性、術後補助化学療法感受性予測に有用であるか否かについて国際共同研究(Iacopettaら、TP53-CRC Collaborative Study Group)の後向き研究を進展させる。

研究4: 「T-CORE 0702 切除不能結腸・直腸癌に対するFOLFIRI+bevacizumab併用療法とIRIS+bevacizumab併用療法の安全性確認試験」(学内倫理委員会承認、UMIN公開2007年7月)の抱き合わせ研究として、イリノテカン(+Bevacizumab)を含む化学療法の奏効率、無増悪生存に関する感受性を予測する発現プロファイルをDNAマイクロアレイ解析で抽出する。

## 3. 研究の方法

(1)研究1: TP53-CRC Collaborative Study Groupのデータ管理者Dr. Antonio Russo(University of Palermo)から、大腸癌3,583例のTP53遺伝子変異解析結果を入手する(連結可能匿名化情報、Russo A et al. J Clin Oncol 23:7518-28, 2005)。石岡は「p53機能データベース情報」(Kato S, et al. Proc Natl Acad Sci U S A, 100: 8424-8429, 2003)により、各症例のp53変異を機能的に変異なし、変異あり(機能保持)、変異あり(機能障害)に分類しDr. Russoに送り返し、Dr. Russoが予後予測性(再発・生存に関して)、Dukes C(Sage III)症例については更に術後補助化学療法感受性予測性について統計学的解析を行なう(後向き研究)。Dr. Barry Iacopetta(西オーストラリア大学)が、3,583症例についてTP53変異の分子マーカーの意義を検討した先行研究(Russo A et al. J Clin Oncol 23:7518-28, 2005)の結果と、「p53機能データベース情報」を導入した本研究結果とを比較し、機能情報の有用性を再検討する。TP53-CRC Collaborative Study Groupの大腸癌3,583例において「p53機能データベース情報」予後予測性、術後補助化学療法感受性予測性についても追加解析する。この解析で、TP53変異機能による予後予測性、術後補助化学療法感受性予測性の向上が見られない可能性も予測されるが、その場合は症例数をさらに追加する。

(2)研究2: 「p53ステータス発現プロファイル」(33遺伝子セット)によって、進行大腸癌(II期III期)予後を予測しうるかについて後向き研究を行なう。外科の協力を得て収集した術後5年以上経過した進行大腸癌(II期III期)の術後40症例の原発巣凍結組織について、マイクロダイセクションによる癌細胞採取・RNA抽出を行ない、cRNAに増幅後Cy3, Cy5でラベルしAgilent社の41Kオリゴヌクレオチド・マイクロアレイ解析を行なう。さらに14~20症例の原発巣凍結組織で既に予後調査が終了(~5年)したものを収集する。「p53ステータス発現プロファイル」(33遺伝子セット)によって、進行大腸癌(II期III期)予後を予測しうるかについて後向き研究を行なう。追加収集した14~20症例の進行大腸癌(II期III期)の原発巣凍結組織について、マイクロダイセクションによる癌細胞採取・RNA抽出を行ない、cRNAに増幅後Cy3, Cy5でラベルしAgilent社の41Kオリゴヌクレオチド・マイクロアレイ解析を行なう。前年度にマイクロアレイ解析したデータを併せて、予後予測性に関する有用性を検証する。

(3)研究3: 「p53ステータス発現プロファイル」を代表する33遺伝子発現の測定方法は、現時点では転写産物(mRNA)を対象としてマイクロアレイ法を使用している。より簡便で

実用的な方法を開発するために、定量的 multiplex RT-PCR を開発する(高橋)ほか、より簡便な先行技術の導入を試みる国内企業(ファルコ・バイオシステムズ:横山・福井)との共同開発を計画中である(この場合の研究分担は別途協議予定)。さらに 33 遺伝子のうち、予後予測に実用性を考慮して最小限必要な遺伝子指数を決定する(事前検討で 15-20 遺伝子を想定)。また、転写産物に代わってタンパク質レベルでの発現解析が可能かを 33 遺伝子のうち利用可能な抗体を購入して免疫組織染色を試みる。「p53 ステータス発現プロファイル」を代表する 33 遺伝子発現を、定量的 multiplex RT-PCR により測定し、マイクロアレイデータと比較しその妥当性を検討する(高橋)。タンパク質レベルでの発現解析が可能かを 33 遺伝子のうち利用可能な抗体を購入して免疫組織染色を試みる。有用な抗体マーカーセットは、大腸癌組織マイクロアレイ(Barry Iacopetta との共同研究で彼が保有する 1020 症例からなる組織マイクロアレイ)により、予後予測性についての検討に入る。一部、企業との共同研究により、簡便で実用的な測定法の検査としての開発を進展させる。有用な抗体マーカーセットが得られない場合は、研究計画を変更、CEA やミスマッチ修復遺伝子の免疫組織染色など既知の他の大腸がん関連遺伝子発現を追加し、再解析する。免疫染色評価法の進展研究として大腸癌組織マイクロアレイによる解析結果を評価する。定量的 multiplex RT-PCR による解析の成果発表を行う。

(4)研究4:申請者らが平成19年7月から施設登録開始(症例登録は平成19年11月から)した「T-CORE 0702 切除不能結腸・直腸癌に対する FOLFIRI+bevacizumab 併用療法と IRIS+bevacizumab 併用療法の安全性確認試験」(2007年6月倫理委員会承認,7月公開)の抱き合わせ研究(随伴研究)として、参加可能な症例(15-20 症例を想定)の生検腫瘍凍結組織について、マイクロダイセクションによる癌細胞採取・RNA 抽出を行ない、cRNA に増幅後 Cy3, Cy5 でラベルし Agilent 社の 41K オリゴヌクレオチド・マイクロアレイ解析を行なう。「切除不能進行・再発大腸癌に対する CPT-11(イリノテカン)+ S-1 併用療法と FOLFIRI 療法の比較臨床第 II 相試験」(倫理委員会申請予定)の抱き合わせ研究を継続し、イリノテカンを含む化学療法の奏効率、無増悪生存に関する感受性を予測する遺伝子発現プロファイルを DNA マイクロアレイ解析で抽出する。この過程で期待される遺伝子セットがえられない場合は、他の臨床研究に対する随伴試験として追加計画し、症例数を増やすなど検討を加える。

#### 4. 研究成果

(1)研究1: TP53-CRC Collaborative Study Group の症例に「p53 機能データベース情報」により、各症例の p53 変異を機能的に変異なし、変異あり(機能保持)、変異あり(機能障害)に分類し予後予測性(再発・生存に関して)後向き研究し、機能情報の有用性を再検討した。その結果、「p53 機能データベース情報」の追加は p53 変異の予後予測性を改善しないことが判明した(未発表)。

(2)研究2:「p53 ステータス発現プロファイル」(33 遺伝子セット)によって、進行大腸癌(II 期 III 期)予後を予測しうるかについて後向き研究を行なった。その結果、「p53 ステータス発現プロファイル」(33 遺伝子セット)では、進行大腸癌(II 期 III 期)予後を予測出来ないことが明らかになった。

(3)研究3:「p53 ステータス発現プロファイル」を代表する 33 遺伝子発現の測定方法として、より簡便で実用的な方法を開発するために、定量的 multiplex RT-PCR を開発する国内企業(ファルコ・バイオシステムズ:横山・福井)との共同開発を開始した(現在も実施中)。

(4)研究4:生検腫瘍凍結組織によるマイクロアレイを行う研究計画を途中で変更した。すなわち、より普及性の高いホルマリン固定パラフィン包埋組織(FFPE)について、マイクロダイセクションによる癌細胞採取・RNA 抽出を行ない、cRNA に増幅後 Cy3, Cy5 でラベルし Agilent 社の 41K オリゴヌクレオチド・マイクロアレイ解析を行った。DNA マイクロアレイ解析により、進行大腸癌が unsupervised analysis で大きく 3 つのクラスターに層別化されることを発見した。このクラスターは明らかに無増悪生存や全生存に差があり、この中から新たにがんの再発・予後を予測する発現プロファイルを同定し、進行大腸癌予後を予測しうるか後向き研究を行った。また、T-CORE 0702 切除不能結腸・直腸癌に対する FOLFIRI+bevacizumab 併用療法と IRIS+bevacizumab 併用療法の安全性確認試験」の抱き合わせ研究として、イリノテカンを含む化学療法の奏効率、無増悪生存に関する感受性を予測する遺伝子セットを抽出した。さらに、KRAS 遺伝子ステータスと関連するクラスターや抗 EGFR 抗体薬の感受性を予測しうるクラスターが明らかになり、現在、遺伝子セットを統計学的腫瘍により抽出を試みている。

#### 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 49 件)以下の主要論文は全て査読有り

1. Sato A, Kudo C, Yamakoshi H,

- Uehara Y, Ohori H, Ishioka C, Iwabuchi Y, Shibata H. Curcumin analog GO-Y030 is a novel inhibitor of IKK $\beta$  that suppresses NF- $\kappa$ B signaling and induces apoptosis. *Cancer Sci.* 102:1045-51, 2011.
2. Sakamoto Y, Kato S, Takahashi M, Okada Y, Yasuda K, Watanabe G, Imai H, Sato A, Ishioka C. Contribution of autophagic cell death to p53-dependent cell death in human glioblastoma cell line SF126. *Cancer Sci.* 102:799-807, 2011.
3. Ransburgh, D. J., Chiba, N., Ishioka C, Toland, A. E., Parvin, J. D. Identification of breast tumor mutations in BRCA1 that abolish its function in homologous DNA recombination. *Cancer Res* 70: 988-95, 2010.
4. Watanabe, G., Kato, S., Nakata, H., Ishida, T., Ohuchi, N., Ishioka C. alphaB-crystallin: A novel p53-target gene required for p53-dependent apoptosis. *Cancer Sci* 100: 2368-2375, 2009.
5. Shibata, H., Yamakoshi, H., Sato, A., Ohori, H., Kakudo, Y., Kudo, C., Takahashi, Y., Watanabe, M., Takano, H., Ishioka C, Noda, T., Iwabuchi, Y. Newly synthesized curcumin analog has improved potential to prevent colorectal carcinogenesis in vivo. *Cancer Sci* 100: 956-60, 2009.
6. Naruse, H., Ikawa, N., Yamaguchi, K., Nakamura, Y., Arai, M., Ishioka C, Sugano, K., Tamura, K., Tomita, N., Matsubara, N., Yoshida, T., Moriya, Y., Furukawa, Y. Determination of splice-site mutations in Lynch syndrome (hereditary non-polyposis colorectal cancer) patients using functional splicing assay. *Fam Cancer* 8: 509-517, 2009.
7. Yoshioka T, Kato S, Gamoh M, Chiba N, Suzuki T, Sakayori N, Kato S, Shibata H, Shimodaira H, Otsuka K, Kakudo Y, Takahashi S, Ishioka C. Phase I/II study of sequential therapy with irinotecan and S-1 for metastatic colorectal cancer. *Br J Cancer.* 101:1972-7, 2009.
8. Ariga H, Nemoto K, Miyazaki S, Yoshioka T, Ogawa Y, Sakayauchi T, Jingu K, Miyata G, Onodera K, Ichikawa H, Kamei T, Kato S, Ishioka C, Satomi S, Yamada S. Prospective comparison of surgery alone and chemoradiotherapy with selective surgery in resectable squamous cell carcinoma of the esophagus. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 75:348-56, 2009.
9. Sakayauchi T, Nemoto K, Ishioka C, Onishi H, Yamamoto M, Kazumoto T, Makino M, Yonekura R, Itami J, Sasaki S, Suzuki G, Hayabuchi N, Tamamura H, Onimaru R, Tamamoto T, Yamada S. Comparison of cisplatin and 5-fluorouracil chemotherapy protocols combined with concurrent radiotherapy for esophageal cancer. *Jpn J Radiol.* 27:131-7, 2009.
10. Ishida T, Kiba T, Takeda M, Matsuyama K, Teramukai S, Ishiwata R, Masuda N, Takatsuka Y, Noguchi S, Ishioka C, Fukushima M, Ohuchi N. Phase II study of capecitabine and trastuzumab combination chemotherapy in patients with HER2 overexpressing metastatic breast cancers resistant to both anthracyclines and taxanes. *Cancer Chemother Pharmacol.* 64:361-9, 2009.
11. Wei, L., Lan, L., Hong, Z., Yasui, A., Ishioka C, Chiba, N. Rapid

Recruitment of BRCA1 to DNA Double-Strand Breaks Is Dependent on Its Association with Ku80. Mol Cell Biol 28: 7380-93, 2008.

12. Takahashi, S., Moriya, T., Ishida, T., Shibata, H., Sasano, H., Ohuchi, N., Ishioka, C. Prediction of breast cancer prognosis by gene expression profile of TP53 status. Cancer Sci 99: 324-32 (2008)

13. Berglind, H., Pawitan, Y., Kato, S., Ishioka, C., Soussi, T. Analysis of p53 mutation status in human cancer cell lines: a paradigm for cell line cross-contamination. Cancer Biol Ther 7: 699-708, 2008.

〔学会発表〕 (計 110 件)

1. Kato, S., Andoh, H., Gamoh, M., Yamaguchi, T., Murakawa, Y., Sasaki, Y., Takahashi, S., Shimodaira, H., Yoshioka, T., Ishioka, C. : A randomized pilot study comparing safety and efficacy of irinotecan plus S-1 (IRIS) plus bevacizumab (BV) and modified (m) FOLFIRI plus BV in patients (pts) with metastatic colorectal cancer (mCRC): First report of T-CORE0702. 2011 Gastrointestinal Cancers Symposium , January 22, 2011. (Florida・Orland world Center Marriott. General Poster Session C)

2. Shimodaira, H. , Soeda, H. , Gamoh, M., Andoh, H., Yamaguchi, T., Watanabe, M., Isobe, H., Sudo, T., Kato, S., Ishioka, C. : Phase II trial of cetuximab plus irinotecan for FOLFOX and FOLFIRI-refractory patients with EGFR-positive advanced and/or metastatic colorectal cancer: Evaluation of the efficacy and safety based on KRAS mutation status (T-CORE0801) . 2011 Gastrointestinal

Cancers Symposium , January 22, 2011. (Florida・Orland world Center Marriott. General Poster Session C)

3. Yasuda, K., Kato, S., Sakamoto, Y., Watanabe, G., Kakudo, Y., Ishioka, C. : Cytoplasmically localized wild-type p53 and S121F super p53 still retains apoptosis inducible abilities . 2009 AACR Annual Meeting , April 19, 2009. (Denver Colorado USA. Poster)

4. Ishioka, C. : 大腸癌薬物療法の進歩、日本の標準と国際標準の違いと将来. 中日胃腸腫瘍総合治療学術シンポジウム, November 6, 2008. (北京・中日友好病院臨床研究所講学庁. 招聘講演)

〔図書〕 (計 26 件)

1 秋田弘俊, 石岡千加史, 田村和夫, 中川和彦, 原田実根, 南博信: 入門腫瘍内科学 (編集委員), 秋田弘俊, 石岡千加史, 田村和夫, 中川和彦, 原田実根, 南博信 編 入門腫瘍内科学(直腸, 結腸癌), 篠原出版社, 148-154, 2009 年

2. 石岡千加史: がん分子標的治療薬開発における Proof of concept 日本がん分子標的治療学会, 曾根三郎, 鶴尾隆 編 がん分子標的治療研究実践マニュアル, 金芳堂, pp.47-52, 2009 年

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2)研究分担者

高橋 雅信 (MASANOBU TAKAHASHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：00447161

高橋 信 (SHIN TAKAHASHI)

東北大学・病院・助教

研究者番号：20431570

(3)連携研究者 なし