

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：32643

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390383

研究課題名（和文） 遺伝子発現に基づく直腸癌化学放射線療法照射効果予測キットによる個別化治療の確立

研究課題名（英文） Prediction of Response to Preoperative Chemoradiotherapy in Rectal Cancer By Gene expression Analysis

研究代表者

渡邊 聡明 (WATANABE TOSHIAKI)

帝京大学・医学部・教授

研究者番号：80210920

研究成果の概要（和文）：直腸癌組織の遺伝子発現により、術前化学放射線療法の効果予測を行った。46例をトレーニングセットとして、マイクロアレイによる遺伝子発現をRT-PCRにより検証して、最終的に4遺伝子による予測式を作成した。この予測式により89.1%の精度で効果予測が可能であった。次に、独立した16例をテストセットとして、予測式の検証を行った結果、81.3%の精度で照射効果が予測可能であった。

研究成果の概要（英文）：Based on the gene expression of rectal cancer, we aimed to build a predictive model for response to chemoradiotherapy. Using 46 samples as a training set, we examined gene expression by microarray and RT-PCR. We finally selected 4 genes that were used for predictive model. The accuracy rate of prediction was 89.1% among a training set. In an independent test set of 16 samples, we validated the accuracy of a predictive model and the accuracy rate of the predictive model was 81.3%.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
平成21年度	6,600,000	1,980,000	8,580,000
平成22年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
平成23年度	2,500,000	750,000	3,250,000
年度			
年度			
総計	12,500,000	3,750,000	16,250,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：直腸癌、DNAマイクロアレイ、照射効果、遺伝子発現、化学放射線療法

1. 研究開始当初の背景

現在、進行直腸癌に対する主たる治療法は手術療法である。直腸癌の手術単独治療による術後の局所再発率は11-28%で、結腸癌（3%）より高い傾向にある。この局所再発を来す主な原因として側方リンパ節へのリンパ節転移が考えられており、本邦では、局所再発率を低下させる目的で、側方リンパ節の郭清が行われている。しかし、側方リンパ節

郭清を行った場合には、術中に骨盤内の自律神経および自律神経叢を損傷するために、高率に術後の排尿障害、性功能障害（射精機能、勃起機能）が認められる。そこで、我々はこれまでに術前放射線治療を併用することで、局所再発率を高めることなく、側方リンパ節郭清を省略することができることを示してきた (Watanabe, Surgery. 132, 2002)。すなわち、側方リンパ節郭清と術前放射線療法は

同等の効果があり、術前放射線療法により側方リンパ節郭清を省略することにより、側方郭清により生ずる術後の排尿障害、性機能障害を回避しQOLを向上できることを示してきた。ところが、放射線療法の問題点としては、照射効果が症例により異なる点があり、照射効果が大きい症例は全体の33-40%程度と報告されている。また、最近放射線療法に5-FU系抗癌剤を併用投与する化学放射線療法が放射線単独療法よりも効果が高いことが報告されているが、それでも照射効果が大きい症例は全体の40%-60%程度とされている。そこで、抗癌剤を併用した術前化学放射線療法をより効率的に行うために、臨床的に実用可能な数遺伝子の遺伝子発現解析により照射効果の大きい症例を、実際に照射を行う前に選別すること重要と考えられている。

直腸癌に対する術前放射線療法の感受性予測に関しては、すでにこれまでも積極的に検討されてきている。しかし、これらの報告は主に免疫染色を用いた検討で、照射効果の予測率は低く、実際に臨床的に応用できる選別マーカーは現在まで同定されていない。また、DNAマイクロアレイを用いた照射効果予測に関する報告は未だに極めて少なく、現在まで世界で四編の論文が発表されているのみである。そのうちの一編は我々が行った放射線単独療法の効果予測を行ったものであり、これは放射線単独療法の効果予測としては世界最初の報告である(Cancer Res 66(7), 2006)。我々はこの検討で、82.4%から88.6%の精度で放射線単独療法の効果を予測できることを明らかにした。しかし、これは放射線単独療法の予測を行ったものであり、本研究は、より効果が高いとされる抗癌剤を併用した化学放射線療法での効果予測を行うものである。また、我々の報告を含めて、現在まで発表されているこれらの検討では、DNAマイクロアレイのみによる遺伝子発現の解析により予測を行っているため、定量性に問題がある点が指摘されている。さらに、予測を行うために必要な遺伝子数が多く(33個—90遺伝子)実際の臨床現場で実用化するには時間的、経済的観点から困難といわざるを得ない。そこで、本研究ではその遺伝子発現の定量性を検証するために、半定量的RT-PCR法を用いて遺伝子発現を検証し、さらに予測を行うために最も必要な遺伝子を数個まで絞り込もうとする研究である。これまでに悪性リンパ腫や乳癌などで、マイクロアレイ、半定量的RT-PCR法により数個の遺伝子発現により抗癌剤効果を予測した検討はあるが、直腸癌に対して化学放射線療法の効果予測をマイクロアレイ、および半定量的RT-PCR法により、数遺伝子での予測を行う報告は皆無であり、本研究で効果予測が可能となれば世界最初の報告となる。

また数遺伝子で予測を行うため、臨床応用の可能性が高く、予測キット作成の開発にも直結し、さらに今後直腸癌の化学放射線療法の有効性を高めるための新たな併用薬の開発に直結するものである。

本研究で、術前化学放射線療法の効果予測が可能となれば、効果が期待できない症例に対しては、他の modality を考慮するなど、直腸癌症例全体により有効な治療を行い、術後局所再発率の低下、排尿・性機能の温存、さらには術後の予後の向上が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、直腸癌生検組織における約54,000の遺伝子および transcript の発現をDNAマイクロアレイによる網羅的解析、ならびに Low Density Array (LDA)を用いた半定量的RT-PCRによる検証を行うことにより、臨床的応用の可能な数遺伝子による直腸癌に対する術前化学放射線療法の効果を照射前に判定できる予測式を作成することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 直腸癌生検組織標本の採取

本研究参加のインフォームドコンセントが得られた術前放射線化学療法が施行される直腸癌症例を対象とする。これらの症例の放射線照射前の内視鏡検査時に腫瘍から生検組織を採取する。生検組織の採取部位は、腫瘍のできるだけ広い範囲から採取し、特定の部位に偏った採取を行わないように留意する。採取された組織は、直ちに凍結して保存する。術前照射は対向4門照射で1.8Gyを28回、合計50.4Gyの照射を行う。照射は週5回行い(月曜日から金曜日)、2日(土曜日、日曜日)は照射を行わない。照射を行う週5日間に、5-Fluorouracilとleucovorinの投与を行う。

(2) 遺伝子発現解析

内視鏡検査時に得られた直腸癌生検標本、あるいは既に採取してある既存の組織(これまでの200例以上の(化学)放射線照射症例の癌組織を用い、GeneChip解析を行う。具体的には、凍結標本よりSepazolを用いtotal RNAを抽出し、T7-oligo(dT)24 primerを用いcDNAへ逆転写後、biotin標識cRNAを合成し、Affymetrix社のGeneChipにハイブリダイズして大腸癌発生及び転移や薬剤感受性に関連が考えられる約54,000種類の遺伝子発現解析を行う。

(3) 化学放射線療法の効果判定

放射線照射後手術施行された切除標本の組織学的検討を行い、照射効果を判定する。この際、固定標本の切片で免疫組織学的染色を行い、微少な癌細胞を確認して高い精度で照射の組織学的効果判定を行う。効果判定は、

大腸癌取り扱い規約の放射線照射の組織学的効果判定基準により、Grade0(無効)、Grade1(1a, 1b)(軽度の効果)、Grade2(かなりの効果)、Grade3(著効)に分類し、Grade0(無効)あるいはGrade1(1a, 1b)(軽度の効果)の症例を Nonresponder、Grade2(かなりの効果)あるいはGrade3(著効)の症例を Responder とする。

(4) 照射効果の予測式の作成

各症例におけるDNAマイクロアレイの遺伝子発現解析結果と照射の組織学的効果の判定結果を解析する。Responder 症例および Nonresponder 症例の間で有意に発現の異なる遺伝子群を同定する。これらの遺伝子を用いて、照射効果の予測式を作成する。予測式を作成する際には、GeneSpring (silicon genetics 社)を用い、leave-one-out 法の一つである support vector machine (SVM法)にて行う。

(5) Low Density Array (LDA)による遺伝子発現解析の検証

照射効果予測式を作成することができた組織学的照射効果と強く相関する遺伝子群を Real time PCR 法にて、選別された遺伝子群の個々の遺伝子の発現を解析し、DNAマイクロアレイ解析結果と比較する。Real time PCR 法にて確認された発現量と相関を示す遺伝子セットを抽出する。抽出された遺伝子セットを用いて、Real time PCR 法により確定した発現量に基づき、SVM法にて予測を行う。この際、予測に用いる遺伝子数を最小で、有効な予測結果が得られるように最終的に予測に用いる遺伝子群を確定する。

(6) テストサンプルにおける予測式の検証

RT-PCR法の発現解析により作成された照射効果予測式を用いて、予測式作成のため用いられたサンプル(ラーニングサンプル)以外のサンプル(テストサンプル)で、照射効果が予測できるか検討し、予測式の validation を行う。

4. 研究成果

(1) 化学放射線療法後に手術施行した直腸癌64症例の切除標本の病理学的検討により32症例は、大腸癌研究会取り扱い規約で grade 2 以上の照射効果が認められ(responder)、30例は grade 1 であった(nonresponder)。

(2) 46例をトレーニングセットとして、化学放射線療法前に採取された大腸癌組織の凍結標本より biotin 標識 cRNA を合成し、Affymetrix 社の GeneChip にハイブリダイズして約 54,000 種類の遺伝子発現解析を行った結果、responder と nonresponder の間で、発現の差のあった24遺伝子を抽出した。

(3) 抽出された24遺伝子を用いて、SVMにより、照射効果の予測式を作成した。

(4) 次に予測に用いた24遺伝子の発現解析を Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR)により解析し、GeneChip 解析結果を検証した。この結果、予測に用いる16遺伝子を確定した。

(5) 確定された16遺伝子の RT-PCR による発現により、予測遺伝子数を16から1遺伝子まで変化させ、あらゆる組み合わせで検討した結果、効果予測の精度は、LRR1Q3, FRMD3, SAND5 と TMC7 の4遺伝子で予測を行った際に、89.1%と最も高率であった。

(6) 次に、独立した16例をテストセットとして、予測式の検証を行った結果、81.3%の精度で予測可能であった。この4遺伝子による RT-PCR 解析により術前化学放射線療法施行前に、その効果を予測できる可能性が考えられた。

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9件)

- 1) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Ikeuchi H, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Inuma H, Kanazawa T, Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H. Predicting ulcerative colitis-associated colorectal cancer using reverse-transcription polymerase chain reaction analysis. Clin Colorectal Cancer 10(2):134-141, 2011 (査読有り)
- 2) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Inuma H, Shibuya H, Ikeuchi H. Gene expression of vascular endothelial growth factor a, thymidylate synthase, and tissue inhibitor of metalloproteinase 3 in prediction of response to bevacizumab treatment in colorectal cancer patients. Dis Colon Rectum 54(8):1026-35,2011 (査読有り)
- 3) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Inuma H, Ikeuchi H, Eshima K. Differential gene expression signatures between colorectal cancers with and without KRAS mutations: Crosstalk between the KRAS pathway and other signaling pathways. Eur J Cancer 47(13):1946-1954,2011 (査読有り)
- 4) Watanabe T, Kobunai T, Ikeuchi H, Yamamoto Y, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Inuma H, Kanazawa T,

- Tanaka T, Yokoyama T, Konishi T, Eshima K, Ajioka Y, Hibi T, Watanabe M, Muto T, Nagawa H. RUNX3 copy number predicts the development of UC-associated colorectal cancer. Int J Oncol. 38(1):201-207, 2011 (査読有り)
- 5) Watanabe T, Kobunai T, Yamamoto Y, Kanazawa T, Konishi T, Tanaka T, Matsuda K, Ishihara S, Nozawa K, Eshima K, Muto T, Nagawa H. Prediction of liver metastasis after colorectal cancer using reverse transcription-polymerase chain reaction analysis of 10 genes. Eur J Cancer. 46(11):2119-26, 2010 (査読有り)
- 6) Ishihara S, Watanabe T, Kiyomatsu T, Yasuda K, Nagawa H. Prognostic significance of response to preoperative radiotherapy, lymph node metastasis, and CEA level in patients undergoing total mesorectal excision of rectal cancer. Int J Colorectal Dis. 25(12):1417-1425, 2010 (査読有り)
- 7) Watanabe T, Kobunai T, Tanaka T, Ishihara S, Matsuda K, Nagawa H. Gene expression signature and the prediction of lymph node metastasis in colorectal cancer by DNA microarray. Dis Colon Rectum. 52(12):1941-8, 2009 (査読有り)
- 8) Nishikawa T, Watanabe T, Sunami E, Tsuno NH, Kitayama J, Nagawa H. Prognostic value of peritoneal cytology and the combination of peritoneal cytology and peritoneal dissemination in colorectal cancer. Dis Colon Rectum. 52(12):2016-21, 2009 (査読有り)
- 9) Tanaka T, Watanabe T, Kitayama J, Kazama Y, Tanaka J, Kanazawa T, Kazama S, Nagawa H. Chromosome 18q deletion as a novel molecular predictor for colorectal cancer with simultaneous hepatic metastasis. Diagn Mol Pathol. 18(4):219-25, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他] なし
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 聡明 (WATANABE TOSHIAKI)
 帝京大学・医学部・教授
 研究者番号：80210920

(2) 研究分担者

なし ()

研究者番号：

(3) 連携研究者

なし ()

研究者番号：