

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 5 月 27 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21590802

研究課題名（和文） 血漿DNAの経時的エピジェネティクス解析による大腸癌治療効果予測マーカーの開発

研究課題名（英文） Development of predictive marker of drug therapy for colorectal cancer by epigenetic analysis of circulating DNA

研究代表者

下平 秀樹（SHIMODAIRA HIDEKI）

東北大学・病院・講師

研究者番号：70373214

研究成果の概要（和文）：43例のイリノテカン、オキサリプラチン不応進行大腸癌患者に対し、*KRAS*、*BRAF*および*PIK3CA*遺伝子変異を解析し、抗EGFR抗体薬を含む3次治療に対する治療効果と各遺伝子変異との関連性を解析したところ、*KRAS*遺伝子野生型の集団よりも*KRAS*、*BRAF*および*PIK3CA*遺伝子のいずれにも変異がない集団の方が、治療成績が良好であった。したがって、これらのすべてを解析した方が、治療効果予測が改善する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Forty three chemotherapy-refractory Japanese patients with mCRC were treated with cetuximab monotherapy or cetuximab plus irinotecan. *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* mutational status of tumors were assessed. The wild-type subgroup without any mutations in the *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* had a better RR (37.0%) and PFS (6.4 months) than did the wild-type *KRAS* subgroup. Our data indicated that *KRAS* status is predictive of cetuximab response in the Japanese population. The additional analysis of *BRAF* and *PIK3CA* genes in wild-type *KRAS* patients could improve the selection of the patients who are most likely to benefit from anti-EGFR antibody therapy.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	900,000	270,000	1,170,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：消化器内科学

キーワード：下部消化管学

1. 研究開始当初の背景

(1) 大腸癌における薬物療法の耐性化には何らかの遺伝子変異が入るために生じるジェネティックな変化の他にエピジェネティッ

クな変化に起因する可能性が考えられる。

(2) 薬物療法を受けている進行大腸癌患者の血漿DNAにおけるCpG部位メチル化の経時的解析と手術標本の遺伝子解析およびエピ

ジェネティック解析を平行して行い、それらと比較検討し治療効果との相関性を検討することにより、薬物療法の感受性を規定する新規のマーカーが発見できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 術後進行大腸癌患者に対し、手術標本の遺伝子変異、メチル化解析と血漿 DNA のメチル化経時的解析を行いそのパターンと化学療法の効果を比較し感受性を規定する因子を解析する。

(2) これまで報告された網羅的メチル化解析により発癌あるいは薬剤感受性に関与するあるいはその可能性があると考えられた機知のメチル化部位の中で構造遺伝子のプロモーター部位、マイクロ RNA のプロモーター部位を含め 30 部位を抽出し、標準的薬学療法施行中の大腸癌症例における血漿 DNA でメチル化が変化するものを見つけ出す。そのメチル化変化と化学療法の効果の相関性を解析する。上記の目的で研究を計画したが、以下のように方針を変更した。

3. 研究の方法

(1) オキサリプラチンとイリノテカンを含む 2 レジメン以上の治療が行われた症例を対象として、ホルマリン固定パラフィン包埋組織より DNA を抽出し、ダイレクトシーケンス法にて遺伝子解析を行った。

(2) 血漿 DNA の収量は微量であり、遺伝子解析およびエピジェネティック解析は困難であったため、手術標本の詳細な遺伝子解析およびエピジェネティック解析に焦点を絞る方針に転換せざるを得なかった。

4. 研究成果

(1) EGFR 関連遺伝子の変異頻度
43 症例中 16 例 (37.2%) に 3 遺伝子中少なくとも

も 1 遺伝子に変異を認めた。*KRAS* 変異は 12 例 (27.9%)、*BRAF* 変異は 2 例 (4.7%)、*PIK3CA* 変異は 2 例 (4.7%)、*NRAS* 変異および *AKT1* 変異は 0 例であり、*KRAS* と *PIK3CA* 両遺伝子の変異、*BRAF* と *PIK3CA* 両遺伝子の変異は認められなかった。海外の報告と比較し *KRAS*、*BRAF* および *PIK3CA* 変異ともにやや少ない頻度であったが、遺伝子変異の種類は従来の報告とほぼ同じであった (Table 1)。

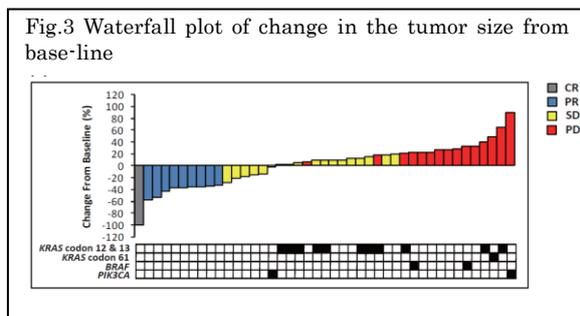
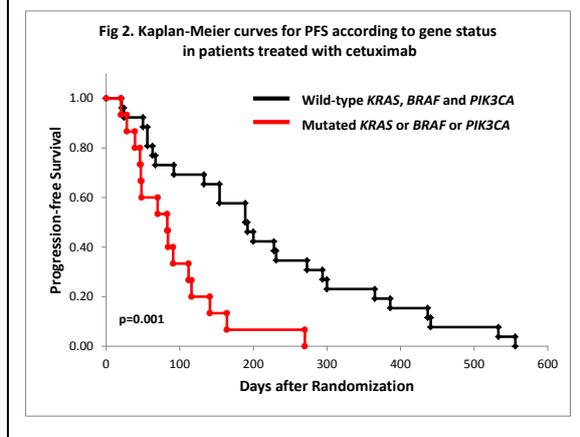
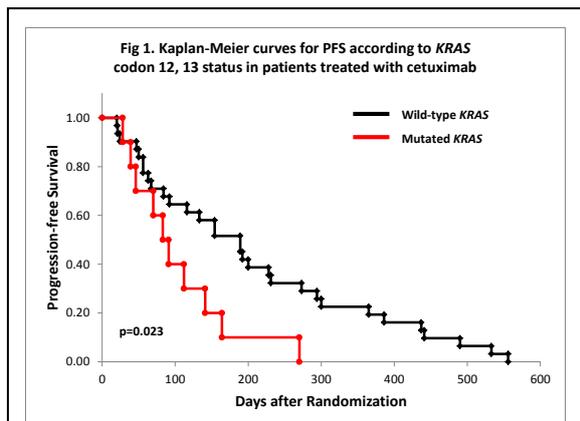
Table 1. *KRAS*, *BRAF* and *PIK3CA* Mutation Frequencies (n=43)

Gene	Codon	Nucleotide substitution	Amino acid substitution	Number
<i>KRAS</i>	12	GGT→GAT	G12D	6 (14)
		GGT→GCT	G12A	1 (2.3)
		GGT→GTT	G12V	1 (2.3)
	13	GGC→GAC	G13D	3 (7)
<i>BRAF</i>	61	CAA→CAC	Q61H	1 (2.3)
	600	GTG→GAG	V600E	2 (4.7)
<i>PIK3CA</i>	542	GAA→AAA	E542K	1 (2.3)
	545	GAG→GGG	E545G	1 (2.3)

(2) 抗 EGFR 抗体薬を含む 3 次治療による治療効果と EGFR 関連遺伝子変異の関係

セツキシマブを投与した 43 症例の奏効率は 25.6%、無増悪生存期間中央値は 4.7 ヶ月であった。*KRAS* 遺伝子コドン 12、13 の変異の有無によりセツキシマブの抗腫瘍効果を比較すると、奏効率は野生型で 34.4%、変異型で 0%、無増悪生存期間中央値 (mPFS) は野生型で 5.1 ヶ月、変異型で 3.0 ヶ月であった。また、コドン 61 を含む *KRAS* 遺伝子、*BRAF* 遺伝子、*PIK3CA* 遺伝子の 3 遺伝子の変異の有無によりセツキシマブの抗腫瘍効果を比較すると、奏効率は野生型で 40.7%、変異型で 0%、mPFS は野生型で 6.4 ヶ月、変異型で 2.7 ヶ月と *KRAS* 遺伝子単独で分けるよりも格差が広がった (Fig. 1, 2)。また、セツキシマブによる治療にも関わらず、増大した腫瘍には明らかに 3 遺伝子のいずれかの変異を持つことが示された (Fig. 3)。セツキシマブの治療効果予測因子として *KRAS*、*BRAF*、*PIK3CA* 遺

伝子変異解析の有用性が示唆される結果であった。



(3) 抗 EGFR 抗体薬を含む 3 次治療による治療効果と $Fc\gamma$ 受容体遺伝子多型の関係

$Fc\gamma RIIa$ 、 $Fc\gamma RIIIa$ 遺伝子の遺伝子多型とセツキシマブの治療効果については、 $Fc\gamma RIIa$ では、差を認めなかった。 $Fc\gamma RIIIa$ では $KRAS$ 、 $BRAF$ 、 $PIK3CA$ 3 遺伝子全てが野生

型の症例に限り V/V あるいは V/F 群と F/F 群を比較すると、奏効率が 55.6% 対 33.3%、mPFS が 7.6 ヶ月対 6.3 ヶ月であり、有意な差は認めなかったが、V/V あるいは V/F 群でやや治療効果がよい傾向にあった。今後、さらなる検討が必要である。

(4) $KRAS$ 遺伝子変異と 1 次治療の治療成績との関連性

イリノテカン、オキサリプラチン、ベバシズマブの一次治療における治療成績では、 $KRAS$ 遺伝子野生型の症例で奏効率、無増悪生存期間がよい傾向を認めた。

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 4 件)

1. Soeda, H., Shimodaira, H., Watanabe, M., Suzuki, T., Gamoh, M., Mori, T., Komine, K., Iwama, N., Kato, S., Ishioka, C., Clinical usefulness of $KRAS$, $BRAF$ and $PIK3CA$ mutations as predictive markers of cetuximab efficacy in irinotecan- and oxaliplatin-refractory Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Clin Oncol* (査読あり) (2012), *in press*.

2. 添田大司, 下平秀樹, 石岡千加史 分子標的治療薬におけるバイオマーカーの役割 大腸癌における抗EGFR抗体薬のバイオマーカー 癌と化学療法 (査読なし) 38巻 7号 Page1079-1083 (2011)

3. 下平秀樹, 小峰啓吾, 添田大司, 石岡千加史: 進行再発大腸癌における抗EGFR抗体薬の適応 宿主ADCC活性と抗EGFR抗体. 癌と化学療法 (査読なし) 37:795-798 (2010)

4. 下平秀樹, 添田大司, 小峰啓吾, 石岡千加史 分子標的薬とシグナル伝達 大腸癌における抗EGFR抗体薬と分子マーカーとしてのEGFRを介したシグナル伝達因子癌と化学療法 (査読なし) 36巻7号 Page1063-1066 (2009)

[学会発表] (計9件)

1. 添田大司, 下平秀樹, 渡辺みか, 森隆弘, 角道祐一, 高橋信, 秋山聖子, 小峰啓吾, 加藤俊介, 石岡千加史: 大腸癌におけるEGFR シグナル伝達経路の変異とオキサリプラチン、イリノテカンの治療成績、第108回日本内科学会学術講演会 (東京で予定されていた学術講演会は、震災のため開催されず平成23年2月20日誌上発表)
2. 添田大司, 下平秀樹, 小峰啓吾, 加藤俊介, 森隆弘, 角道祐一, 大堀久詔, 高橋信, 秋山聖子, 鈴木貴夫, 蒲生真紀夫, 渡辺みか, 岩間憲行, 鈴木博義, 石岡千加史: 大腸癌における抗EGFR抗体薬のバイオマーカー EGFR シグナル伝達因子検索の意義. 第48回日本癌治療学会学術集会 (京都) 2010年10月29日. シンポジウム
3. Shimodaira, H., Soeda, H., Takahashi, M., Ishioka, C.: Genetic alterations in colorectal cancer associated with the efficacy of anti-EGFR antibody or cancer predisposition. The 14th Korea-Japan Cancer Research Workshop (金沢), December 19, 2009.
4. Shimodaira, H., Soeda, H., Takahashi, M., Ishioka, C.: Status of EGFR related signal transduction for predicting response to anti-EGFR therapy in advanced colorectal cancer. The 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer

Association (横浜), October 1, 2009.

[図書] (計1件)

1. 下平秀樹, 石岡千加史: 分子標的治療薬 その他の開発中の小分子物質 Apoptosis促進剤、mTOR阻害剤、サリドマイド、レナリドマイド、その他 西條長宏, 西尾和人 編 がん化学療法・分子標的治療update, 中外医学社, p.184-188, 2009年

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

ホームページ等

http://www.co.idac.tohoku.ac.jp/staff/s_himohira.html

日刊薬業 2009年10月5日に第68回日本癌学会総会での発表について報道

6. 研究組織

(1) 研究代表者

下平 秀樹 (SHIMODAIRA HIDEKI)

東北大学・病院・講師

研究者番号: 7037214

(2) 研究分担者

高橋 雅信 (TAKAHASHI MASANOBU)

東北大学・病院・助教

研究者番号: 00447161

(H21)