

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 26 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26460958

研究課題名(和文) 進行大腸癌におけるレゴラフェニブ治療に対する階層的分子マーカーの探索

研究課題名(英文) Significance of CIMP as a biomarker for chemotherapy in colorectal cancer

研究代表者

下平 秀樹 (Shimodaira, Hideki)

東北大学・加齢医学研究所・准教授

研究者番号：70373214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：切除不能進行再発大腸癌の薬物療法における効果予測バイオマーカーの探索では、まず分子生物学的に分類し、そのサブグループ内でのマーカー探索、すなわち階層的バイオマーカー探索を試みた。

125例の進行再発大腸癌に対して、CIMP解析および5つのEGFR関連遺伝子の変異解析を行った。CIMP陽性例では有意にFOLFOX-FOLFIRI順次療法がFOLFIRI-FOLFOX順次療法よりもPFSが短かった。また、2次治療以降の抗EGFR抗体薬に関してはCIMP陽性例のほうがCIMP陰性例よりもPFSが短い傾向があった。3次治療以降でのレゴラフェニブは症例数が十分得られなかった。

研究成果の概要(英文)：The CpG island methylator phenotype (CIMP) with multiple promoter methylated loci has been observed in a subset of human colorectal cancer (CRC) cases. CIMP status, which is closely associated with specific clinicopathological and molecular characteristics, is considered a potential predictive biomarker for efficacy of cancer treatment. The progression-free survival of patients with CIMP-positive tumors receiving sequential therapy with FOLFOX as the first-line treatment followed by irinotecan-based therapy as the second-line treatment was inferior to that of such patients receiving the reverse sequence. Furthermore, CIMP-positive tumors showed higher mutation frequencies for the five EGFR-related genes than the CIMP-negative tumors did. Among the KRAS wild-type tumors, CIMP-positive tumors were associated with a worse clinical outcome than CIMP-negative tumors following anti-EGFR antibody therapy.

研究分野：腫瘍学

キーワード：CpG アイランド メチル化 がん薬物療法 バイオマーカー

1. 研究開始当初の背景

大腸癌の網羅的発現解析やゲノム解析から、いくつかのサブグループに分ける試みはこれまでに数多く報告されている。また、それらの分類は、マイクロサテライト不安定性や CpG アイランド高メチル化表現型など発癌機構に基づく表現型に関連することが多いため、これらの表現型の重要性が知られている。さらに、EGFR シグナル伝達系の活性化状態も発癌機構および治療に対する感受性において重要である。また、新規の分子標的治療薬は効果予測のためのバイオマーカーの必要性が高いが、十分なマーカーが確立していない薬剤も多い。まずは、大腸癌をいくつかの指標で大きく分類したうえで、比較的特徴の近い腫瘍の中で、効果を予測するマーカーを検索するという戦略は期待が持てる。本研究では、主として CpG アイランド高メチル化表現型と EGFR シグナル伝達系の状態と薬物療法の治療効果を検討した。

2. 研究の目的

進行大腸癌の遅いラインでの標準治療であるマルチキナーゼ阻害薬のレゴラフェニブ内服療法に対してはバイオマーカーが様々探索されているが、有用なものは見つからない。切除不能進行再発大腸癌における薬物療法において効果予測バイオマーカーを探索する上では、まず癌を分子生物学的背景に基づいて分類を行い、そのサブグループ内でのマーカー探索を行うこと、すなわち階層的バイオマーカー探索が必要であろうという仮説のもとに、レゴラフェニブに注目して、バイオマーカー探索を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

125 例の進行大腸癌患者の手術標本 (ホルマリン固定パラフィン包埋標本) を収集し、マクロで腫瘍部分を選択的に収集し、DNA を抽出した。サブグループとして、エピジェネティックな変化による分類、CIMP 陽性例、陰性例を採用し、それぞれのグループにおけるがん薬物療法の有効性を解析することとした。125 例の進行再発大腸癌に対して、手術標本 (ホルマリン固定パラフィン包埋標本) を収集し、マクロで腫瘍部分を選択的に採取後、DNA を抽出した。Weisenberger らの報告した 5 つの部位 (CACNA1G, IGF2, NEUROG, RUNX3, SOCS1) を指標としたメチル化特異的 PCR 法による CIMP 解析を行った。また、大腸癌における発がん及び分子標的薬である抗 EGFR 抗体薬の感受性に関与する 5 つの EGFR 関連遺伝子 (KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS 及び AKT1) に関して Sanger 法による遺伝子変異解析を行った。

4. 研究成果

125 例のメチル化表現型は、CIMP 陽性例が 21.6% であり、CIMP 陽性例は右半結腸原発が 51.9% と CIMP 陰性の 28.9% に比し明らかに高

率であった。また、CIMP 陽性例では BRAF 変異が 18.5% と CIMP 陰性例の 0% に比し明らかに高率であった。これは、これまでの多くの既報告と一致する結果であり、メチル化表現型の実験精度が一定の水準に達していることをサポートする結果であった。EGFR 関連 5 遺伝子全体の変異率は CIMP 陽性例で 74%、CIMP 陰性例で 48% と、CIMP 陽性例では EGFR 関連遺伝子の変異率が高い傾向を認めた (表 1)。

表 1

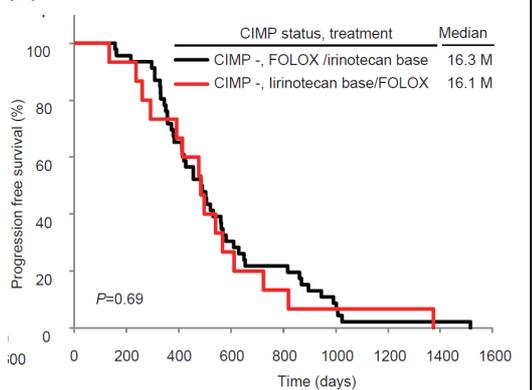
Table 3 Mutation frequencies of the KRAS, BRAF, PIK3CA, NRAS, and AKT1 genes in CIMP+ and CIMP- tumors

Gene	Status	Total (%)	CIMP+ (%)	CIMP- (%)	P value*
KRAS	Mutant	52 (41.6)	12 (44.4)	40 (40.8)	0.73
	Wild type	73 (58.4)	15 (55.6)	58 (59.2)	
BRAF	Mutant	5 (4.0)	5 (18.5)	0 (0.0)	<0.001
	Wild type	120 (96.0)	22 (81.5)	98 (100)	
PIK3CA	Mutant	16 (12.8)	4 (14.8)	12 (12.2)	0.72
	Wild type	109 (87.2)	23 (85.2)	86 (87.8)	
NRAS	Mutant	2 (1.6)	0 (0.0)	2 (2.0)	0.45
	Wild type	123 (98.4)	27 (100)	96 (98.0)	
AKT1	Mutant	2 (1.6)	1 (3.7)	1 (1.0)	0.33
	Wild type	123 (98.4)	26 (96.3)	97 (99.0)	
All five genes	Any mutant	69 (55.6)	20 (74.1)	49 (50.0)	0.026
	All wild type	56 (44.8)	7 (25.9)	49 (50.0)	

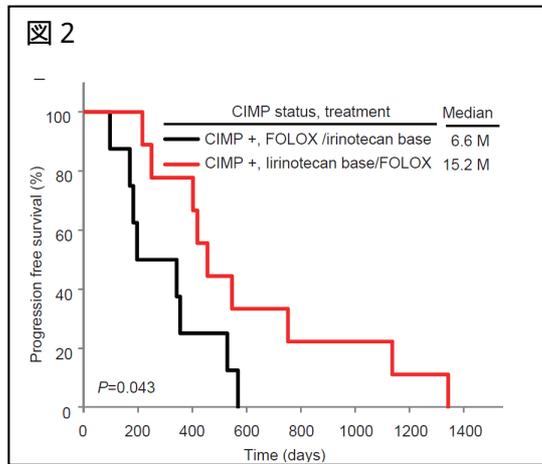
CIMP CpG island methylator phenotype
* χ^2 test

この 125 例に対しては、標準的な化学療法がおこなわれており、オキサリプラチン及びイリノテカンを含む 1 次 2 次治療を行った患者がそれぞれ 109 例、78 例であり、2 次治療以降で抗 EGFR 抗体薬を使用した患者が 57 例であった。CIMP 陰性例においては、1 次治療にオキサリプラチンを含む FOLFOX 療法、2 次治療にイリノテカンを含む治療 (主として FOLFIRI) に移行した場合すなわち FOLFOX-FOLFIRI 順次療法とその逆の順序の FOLFIRI-FOLFOX 順次療法では無増悪生存期間に有意な差を認めなかった (中央値 16.3 カ月対 16.1 カ月) (図 1)。

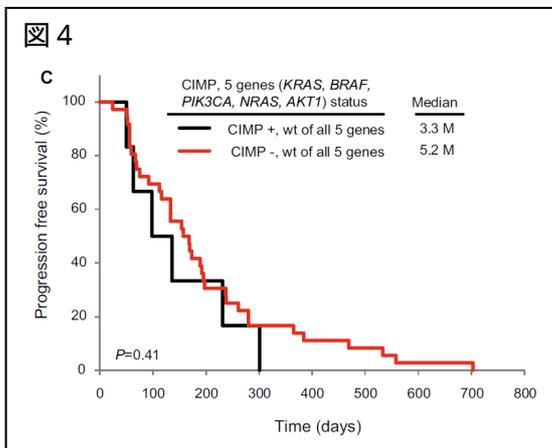
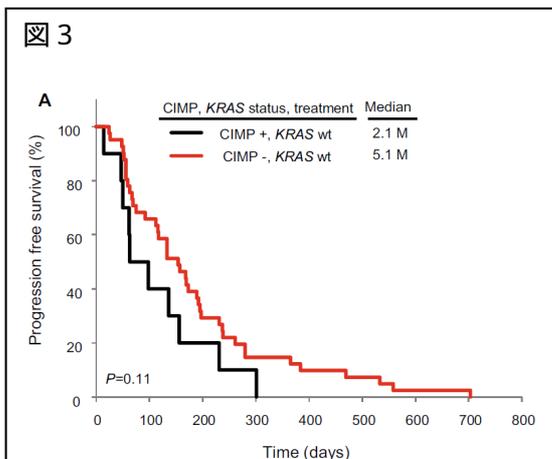
図 1



しかし、CIMP 陽性例においては有意に FOLFOX-FOLFIRI 順次療法が FOLFIRI-FOLFOX 順次療法よりも無増悪生存期間が短かった (中央値 6.6 カ月対 15.2 カ月) (図 2)。



したがって、何らかの機序で CIMP が薬剤の感受性の変化に参与することが示唆された。また、2次治療以降の抗 EGFR 抗体薬に関しては統計学的有意差がつかなかったが、KRAS 野生型の群においては CIMP 陽性例のほうが CIMP 陰性例よりも無増悪生存期間が短い傾向があった(図 3)。しかし EGFR 関連 5 遺伝子のどれかに変異がある群と、全て野生型の群においては、CIMP による抗 EGFR 抗体薬による無増悪生存期間の差は著しくなくなり(図 4) CIMP 陽性例には EGFR 関連遺伝子の変異が多いことが、治療効果に影響を及ぼしている可能性が示唆された。



本来の目的の 3 次治療以降でのレゴラフェニブに関しては、3 次治療前に治療を脱落するが多かったこと、レゴラフェニブの有害事象により中止症例が多発したこと、3 次治療以降の選択肢としてトリフルリジン・チピラチルが加わったことなどから、症例数が十分得られなかった。

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 14 件)

1. Zhang X, Shimodaira H, Soeda H, Komine K, Takahashi H, Takahashi M, Inoue M, Takahashi S, Kato S, Ishioka C. CpG island methylator phenotype is associated with EGFR related gene mutation and the efficacy of irinotecan- and oxaliplatin-based chemotherapy in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. *Int J Clin Oncol*. 21, 1091-1101 (2016). (査読あり)
2. Takahashi M, Chiba N, Shimodaira H, Yoshino Y, Mori T, Sumii M, Nomizu T, Ishioka C. OLA1 gene sequencing in patients with BRCA1/2 mutation-negative suspected hereditary breast and ovarian cancer. *Breast Cancer*, 24, 336-340 (2016). (査読あり)
3. Sugiyama S, Ishizuka M, Takahashi M, Komine K, Imai H, Saijo K, Takahashi M, Shirota H, Takahashi S, Shimodaira H, Ishioka C. Successful sequential treatment of a patient with advanced gastrointestinal stromal tumor using four different molecularly targeted drugs. *International Cancer Conference Journal*, 5, 163-7 (2016) (査読あり)
4. Imai H, Komine K, Takahashi S, Saijo K, Okada Y, Kobayashi A, Okita A, Chikamatsu S, Kasahara Y, Takahashi M, Oishi T, Shirota H, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and Safety Assessment of Paclitaxel in Patients with Docetaxel-Resistant Esophageal Squamous Cell Carcinoma. *Chemotherapy*;61(5):262-8 (2016). (査読あり)

5. Kobayashi A, Takahashi M, Imai H, Akiyama S, Sugiyama S, Komine K, Saijo K, Takahashi M, Takahashi S, Shiota H, Sato N, Fujishima F, Shuin T, Shimodaira H, Ishioka C. Attainment of a Long-term Favorable Outcome by Sunitinib Treatment for Pancreatic Neuroendocrine Tumor and Renal Cell Carcinoma Associated with von Hippel-Lindau Disease. *Intern Med.*;55(6):629-34 (2016). (査読あり)
 6. Imai H, Shiota H, Okita A, Komine K, Saijo K, Takahashi M, Takahashi S, Takahashi M, Shimodaira H, Ishioka C. Efficacy and Safety of Carboplatin and Etoposide Combination Chemotherapy for Extrapulmonary Neuroendocrine Carcinoma: A Retrospective Case Series. *Chemotherapy*;61(3):111-6 (2016). (査読あり)
 7. Ouchi K, Takahashi S, Yamada Y, Tsuji S, Tatsuno K, Takahashi H, Takahashi N, Takahashi M, Shimodaira H, Aburatani H, Ishioka C. DNA methylation status as a biomarker of anti-epidermal growth factor receptor treatment for metastatic colorectal cancer. *Cancer Sci. Dec*;106(12):1722-9 (2015). (査読あり)
 8. Komine K, Shimodaira H, Takao M, Soeda H, Zhang X, Takahashi M, Ishioka C. Functional Complementation Assay for 47 MUTYH Variants in a MutY-Disrupted Escherichia coli strain. *Hum Mutat.* 7, 704-11 (2015) (査読あり)
 9. Inoue M, Takahashi S, Soeda H, Shimodaira H, Watanabe M, Miura K, Sasaki I, Kato S, Ishioka C. Gene-expression profiles correlate with the efficacy of anti-EGFR therapy and chemotherapy for colorectal cancer. *Int J Clin Oncol.* 20(6), 1147-55 (2015). (査読あり)
 10. Soeda H, Shimodaira H, Watanabe M, Kato S, Ishioka C. KRAS mutation in Japanese patients with metastatic colorectal cancer does not preclude benefit from oxaliplatin- or, irinotecan-based treatment. *Molecular and Clinical Oncology*, 2(3):356-362 (2014). (査読あり)
 11. Soeda H, Shimodaira H, Gamoh M, Ando H, Isobe H, Suto T, Takahashi S, Kakudo Y, Amagai K, Mori T, Watanabe M, Yamaguchi T, Kato S, Ishioka C. Phase II trial of cetuximab plus irinotecan for oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy-refractory patients with advanced and/or metastatic colorectal cancer: evaluation of efficacy and safety based on KRAS mutation status (T-CORE0801). *Oncology*; 87(1):7-20 (2014) (査読あり)
 12. Shiono M, Takahashi S, Kakudo Y, Takahashi M, Shimodaira H, Kato S, Ishioka C. Upper arm central venous port implantation: a 6-year single institutional retrospective analysis and pictorial essay of procedures for insertion. *PLoS One.*; 9(3) (2014) (査読あり)
 13. Imai H, Kato S, Sakamoto Y, Kakudo Y, Shimodaira H, Ishioka C. High throughput RNAi screening identifies ID1 as a synthetic sick/lethal gene interacting with the common TP53 mutation R175H. *Oncology reports*, 31(3):1043-50 (2014). (査読あり)
 14. Saijo K, Imamura J, Narita K, Oda A, Shimodaira H, Katoh T, Ishioka C. Biochemical, biological, and structural properties of romidepsin (FK228) and its analogs as novel HDAC/PI3K dual inhibitors. *Cancer Sci.* 106(2), 208-15 (2015). (査読あり)
- [学会発表](計 5件)
1. 小峰啓吾、西條憲、伊藤祝栄、今井源、城田英和、高橋昌宏、高橋信、高橋雅信、下平秀樹、石岡千加史、切除不能進行再発大腸癌に対する regorafenib と TAS102 の治療効果に関する後方視的検討、第 53 回日本癌治療学会学術総会、京都、2015 年 10 月 29 日
 2. Shimodaira H, Zhang X, Soeda H, Komine K, Inoue M, Takahashi H, Takahashi M, Takahashi S, Kato S, Ishioka C. CpG Island methylator phenotype is associated with the efficacy of chemotherapy for

colorectal cancer. European Society for Medical Oncology, 2014年9月26日～30日, Madrid, Spain.

3. 高橋秀和, 高橋雅信, 下平秀樹, 高橋信, 石岡千加史: BRAF 変異陽性大腸癌において癌抑制 miRNA として機能する miRNA-X の同定. 第 73 回日本癌学会学術総会(横浜) 2014年9月25日.
4. 大石隆之, 高橋雅信, 吉野優樹, 李仁, 塩野雅俊, 高橋昌宏, 城田英和, 下平秀樹, 加藤俊介, 石岡千加史: 進行再発大腸癌 14 例に対するレゴラフェニブの有効性と安全性に関する後方視的検討. 第 52 回日本癌治療学会学術集会(横浜) 2014年8月30日.
5. 張曉飛, 下平秀樹, 添田大司, 小峰啓吾, 井上正広, 高橋秀和, 高橋雅信, 高橋信, 加藤俊介, 石岡千加史, CpG アイランドメチル化表現型とイリノテカン, オキサリプラチンベースの化学療法の治療成績および EGFR 関連遺伝子変異との相関 第 12 回 日本臨床腫瘍学会 2014年7月17日～19日, 福岡

〔図書〕(計 6 件)

1. 下平秀樹 がん薬物療法時の腎障害診療ガイドライン p26-27 CQ8, p36 - 37 CQ13, ライフサイエンス出版, 2016
2. 下平秀樹 次世代のがん治療薬・診断のための研究開発 悪性黒色腫における免疫チェックポイントを標的とした治療戦略(CTLA-4 抗体薬) p148-152 技術情報協会, 2016
3. 下平秀樹 日本臨床 家族性腫瘍 p346-350 MLH1, MSH2, MSH6, PMS2 日本臨牀社, 2015
4. 下平秀樹 新臨床腫瘍学 改訂第 4 版 p698-703 遺伝性腫瘍と遺伝カウンセリング 南江堂, 2015
5. 下平秀樹 日本臨床 がん薬物療法の支持療法, p582-586 大腸癌ベバシズマブ + FOLFOX 療法, 日本臨牀社, 2015
6. 下平秀樹 実験医学 がんの微小環境と標的治療 p162-167 大腸癌の血管新生阻害療法 羊土社, 2015

〔産業財産権〕

なし

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〕
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者
下平 秀樹(SHIMODAIRA, HIDEKI)
東北大学・加齢医学研究所・准教授
研究者番号: 70373214

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

(4) 研究協力者
張 曉飛(XIAFEI ZHANG)先生
東北大学大学院生

添田 大司(HIROSHI SOEDA)先生
東北大学大学院生