

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 2 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24591972

研究課題名(和文) 直腸癌に対する化学放射線療法の最適化～エピジェネティックスの導入による新展開～

研究課題名(英文) Optimization of chemoradiotherapy for rectal cancer and contribution of epigenetics in exploration of novel biomarker

研究代表者

井上 靖浩 (Inoue, Yasuhiro)

三重大学・医学部附属病院・講師

研究者番号：20324535

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：直腸癌患者のcirculating miRNAが術前化学放射線の新たな効果予測マーカーとなりえるか検証した。術前化学放射線療法が施行された患者血清を用いて、miRNA arrayによる網羅的解析が施行され、5つの病理組織学的効果予測マーカー候補を同定した。大腸癌の診断マーカーとなることを証明したmiR-21や文献的候補を含む7つのmiRNAにつき、より多くの症例で検証した。miR-29aのみ、病理組織学的効果に有意に関連したが、独立した効果予測マーカーにはなり得なかった。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study was to investigate the potential of circulating miRNAs as novel biomarker for pathologic response to preoperative chemoradiotherapy(CRT) in rectal cancer patients. Five candidate serum miRNAs were detected by using miRNA arrays. From the literature, serum miR-21 and 29a were also selected as candidates miRNAs for the CRT response. We examined the correlation between the expressions of candidate serum miRNAs with clinical parameters including pathological response to preoperative CRT for rectal cancer. Serum miRNA-29a was only significantly associated with good pathological effects, but not independent predictive factors.

研究分野：消化器外科(腫瘍学)

キーワード：直腸癌 化学放射線療法 micro RNA

1. 研究開始当初の背景

直腸癌の治療成績は術前化学放射線療法 (preoperative chemoradiotherapy: pre-CRT) による原発巣縮小と全直腸間膜切除 (Total mesorectal excision; TME) によるリンパ節郭清により、自然肛門温存率向上と局所再発率低下を達成することができたが、術前化学放射線療法 + 直腸間膜全切除術をとる直腸癌切除後の肝、肺を含む遠隔転移率は 10-20% と依然高率である。さらなる生存率改善には以前回避できていない遠隔転移再発の制御が急務である。そのための研究の一つとして、直腸癌に対する放射線照射が遠隔転移再発誘導に関与する腫瘍内血管新生因子 VEGF 産生能を増強させることを確認したことから (Inoue Y, et al. Oncol Rep 2007)、VEGF 経路を中心に直腸癌化学放射線療法前後のサンプル解析を開始した。その結果、化学放射線療法を施行前の生検組織から癌の放射線照射による腫瘍縮小率や遠隔転移を規定する因子の同定を行い、術前の腫瘍内 VEGF 遺伝子発現が化学放射線照射による腫瘍縮小率を有意に規定しており、さらに術後の再発を有意に規定することを証明した (Toiyama Y, Inoue Y, et al. Clinical Oncology 2010)。一方、治療前サンプルだけでなく、化学放射線療法後の遺残癌細胞における molecular profile 解析にも化学放射線療法抵抗性メカニズムのヒントが隠されていると考え、治療後のサンプルをマイクロダイセクションした上での解析に力を注いできた (Inoue Y, et al. Oncol Rep 2009)。1つのアプローチが大腸癌幹細胞マーカーであり、OCT4, SOX2 と CD133 は化学放射線療法後の遠隔転移再発マーカーとなりうることを報告した (Saigusa S, Inoue Y, et al. Ann Surg Oncol 2009, Saigusa S, Inoue Y, et al. Oncol rep 2010)。また上皮性癌細胞の転移機序の一つとして注目されている上皮間葉移行 (Epithelial-Mesenchymal Transition: EMT) においても、化学放射線療法後の再発メカニズムの一つである可能性を報告している。 (Kawamoto A, Inoue Y, et al. Oncol rep 2011)

2. 研究の目的

直腸癌治療における pre-CRT は、局所制御の向上を図る上で重要なモダリティであり、現在海外では標準的治療として推奨されている。食道癌、頭頸部癌さらに肛門管癌などの扁平上皮癌などは根治的な化学放射線療法が施行されているにもかかわらず、直腸癌に対するそれは圧倒的に Pathological Complete Response (pCR) 率が低く、高価な多剤抗癌剤の併用をもってしても、20-30% と報告されており、根治には化学放射線治療後の手術が必須である。このため、直腸癌に対

する化学放射線効果を改善するために、Hypoxia 関連、DNA 修復など、これまでも様々な放射線抵抗性因子の研究がなされているが、依然抜きでるものがなく、臨床応用に至っていない。

一方、近年ゲノムワイドな Epigenetic Profile が徐々に明らかにされ、癌の発生早期から発育進展に至るまでその特性に大きく影響を及ぼしている。代表的な Epigenetic 変化として知られる DNA methylation は癌の病態に直接反映することが明らかにされつつあるが、放射線抵抗性に関与する癌および正常組織の DNA methylation に関しては検討がなく、その Profile を検証することは直腸癌の放射線治療における個別化治療戦略の一助につながると考えられる。そこで、直腸癌放射線抵抗性に関わる DNA methylation の一つである CpG island methylation とそれにより不活化される遺伝子発現 (mRNA, microRNA) を網羅的に検索し、放射線抵抗性マーカーとしての意義ならびに不活化された遺伝子の回復による放射線治療への応用を検討することを本研究の目的とした。

3. 研究の方法

まず、Onco-miRNA である miRNA21 および miRNA31 に着目し、大腸癌におけるバイオマーカーの意義を多面的に検討した。

- 1) 大腸癌細胞株の miRNA 分泌能を測定確認した。
- 2) 大腸癌組織、正常大腸粘膜、大腸癌患者血清および健常者血清の少数サンプルを使用し、組織及び血清における miRNA21、miRNA31 を測定した。
- 3) 大腸癌患者血清 (n=186)、術後血清 (n=60)、健常者血清 (n=53) を用い miRNA を測定した。

次に、直腸癌に対する術前化学放射線療法と血清 miRNA の関与について、上記結果を参考に、効果予測マーカーの観点で検討した。

術前 CRT の治療効果 Grade Ia (n=3) と pCR (n=3) の治療前血清から Qiagen miRNeasy Kit にて RNA を抽出。TORAY 3D-gene を用いて網羅的に血清 miRNAs 発現を検証した。さらに文献的候補の miRNA とあわせて、治療前血清から CRT 効果予測が可能か検証した。

4. 研究成果

大腸癌における miR-21 の意義について

Fig1 大腸癌細胞株における miR-21, miR-31 分泌能の検証

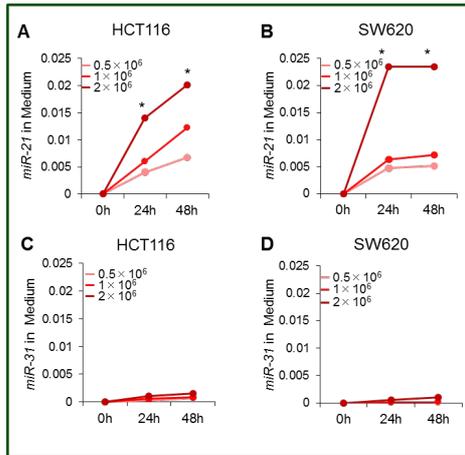
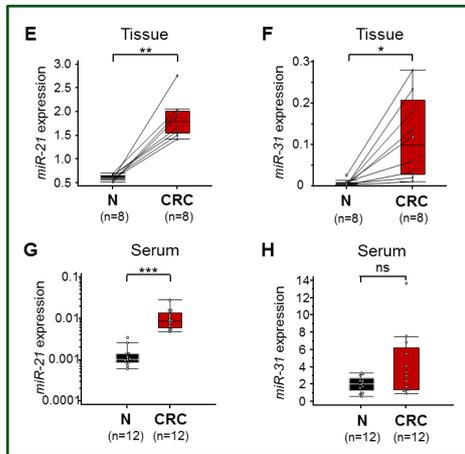
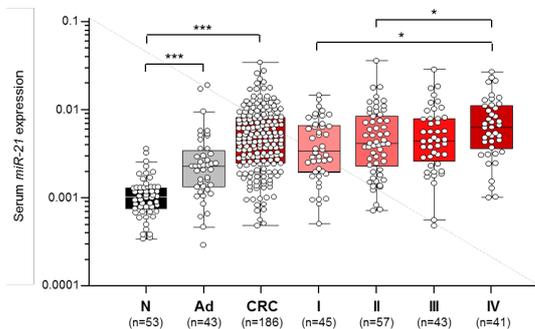


Fig2 少数サンプルを用いた miR-21, miR-31 の組織ならびに血清での発現検討



Screening: miR-21 は大腸癌分泌型 microRNA であり、大腸癌組織、大腸癌患者血清で有意に発現が高かった。

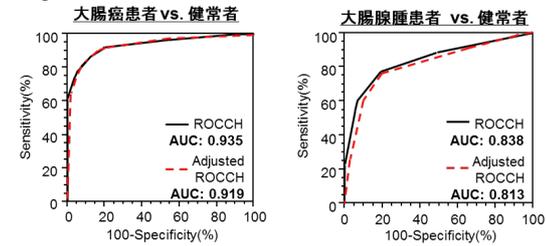
Fig3 健常者、腺腫患者ならびに癌患者における血清 miR-21



血清 miR-21 発現は健常者に比べ大腸腺腫患者、大腸癌患者で有意に高く、stage IV 大腸

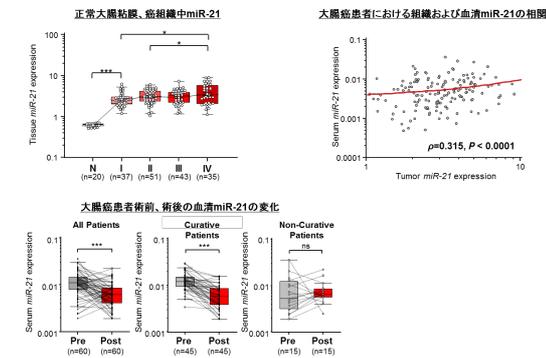
癌で最も高かった。

Fig4 ROC



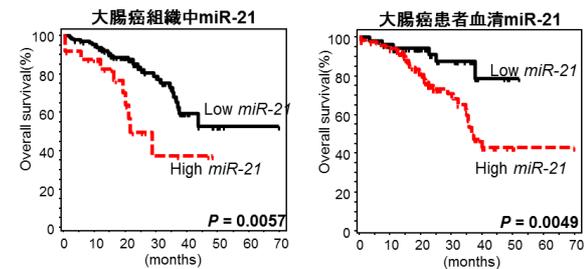
ROC 解析では miR-21 は、極めて高率に大腸癌患者、大腸腺腫患者を同定できた。

Fig5



- ・miR-21 発現は正常大腸粘膜に比べ癌組織で有意に高く、stage の進行とともに発現は有意に上昇した。
- ・癌組織中 miR-21 発現と血清 miR-21 発現は有意に正の相関を示した。
- ・術後 1 週間目の血清 miR-21 は根治手術患者で有意に発現が低下した。

Fig6 miR-21 と予後



Variables	Univariate			Multivariate		
	HR	95%CI	P-value	HR	95%CI	P-value
Age (>67 vs. ≤67)	0.72	0.43-1.37	0.37	1.23	0.57-2.67	0.59
Gender (female vs. male)	1.02	0.56-1.86	0.92	2.07	0.88-4.96	0.11
Pathological T (T3/4 vs. T1/2)	8.97	2.19-36.7	0.0024	2.38	0.3-29.77	0.31
Pathology (poor diff. vs. diff.)	2.26	1.05-4.84	0.036	2.39	0.57-9.92	0.23
Lymph node metastasis (yes vs. no)	17.1	6.18-47.8	< 0.0001	6.83	1.69-28.36	0.008
Distant metastasis (yes vs. no)	35.6	14.4-86.6	< 0.0001	21.7	5.92-79.99	< 0.0001
CEA (>5 vs. ≤5)	4.84	2.15-10.89	0.0001	1.03	0.33-3.22	0.94
miR-21 in tissue (>3.7 vs. ≤3.7)	2.66	1.29-5.45	0.014	0.59	0.21-1.63	0.31
miR-21 in serum (>0.0031 vs. ≤0.0031)	3.25	1.36-7.73	0.0026	4.12	1.1-15.4	0.03

血清 miR-21 は大腸癌患者における独立予後規定因子であった。

小括

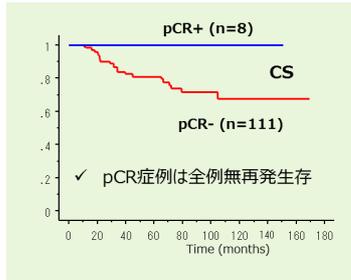
大腸腫瘍由来の血清 miRNA-21 は期待できる大腸癌診断マーカーであり、組織中 miRNA-21、

血清 CEA および TNM 分類より優れた予後マーカーにもなりうる。

血清 miRNA を用いた新たな直腸癌 pre-CRT 治療効果予測マーカーの探索

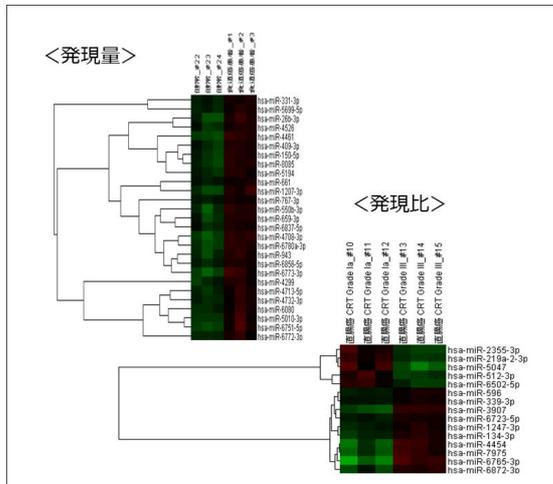
2001.1 から 2014.12 に当科で手術が施行された直腸癌 400 例中、術前 CRT を行った T2-4 直腸癌 119 例。その中で pCR は 8 例(6.7%)であった。

Fig1 pCR と予後



観察期間中央値 47.1 ヶ月にて pCR 例は全例無再発生存。

Fig2 アレイ解析



Grade Ia群 vs Grade III群					
Ratio	Log2Ratio	UP	DOWN	p-value	Name
0.48	-1.07		*	0.008	hsa-miR-512-3p
1.48	0.56			0.002	hsa-miR-596
0.50	-1.00			0.002	hsa-miR-219a-2-3p
1.35	0.44			0.001	hsa-miR-339-3p
0.44	-1.17		*	0.007	hsa-miR-2355-3p
2.63	1.40	*		0.000	hsa-miR-3907
2.88	1.52	*		0.005	hsa-miR-4454
0.30	-1.71	*		0.010	hsa-miR-5047
1.55	0.63			0.007	hsa-miR-1247-3p
0.50	-1.01		*	0.007	hsa-miR-6502-5p
1.45	0.53			0.001	hsa-miR-6723-5p
1.79	0.84			0.002	hsa-miR-134-3p
4.64	2.21	**		0.001	hsa-miR-6765-3p
2.04	1.03	*		0.009	hsa-miR-6872-3p
2.63	1.40	*		0.005	hsa-miR-7975

発現量 (Log2 global normalization-5) と変動比 (Log2(各サンプル発現量 / 全サンプル発現量平均値)) を使用してクラスター解析を実施した。

pCR に関与する 9 つ(up 5, down 4)の miRNA 候補を選択した。

Fig3 CRT 著効群 vs. 非著効群

	>G2	G0-1	p-value
Patients, n	43	76	
Age(mean)	61.5	62.3	ns
Gender(M/F)	29/14	14/20	ns
Tumor distance (cm,mean)	3.8	4	ns
Tumor size > 30mm (%)	17(43.6)	46(61.3)	0.0707
Clinical UICC stage			
I/II/III/IV	6/8/29/0	5/7/61/3	ns
cT4(%)	10(23.3)	11(14.5)	ns
cN+(%)	28(65.1)	63(82.9)	0.0281
Lateral pelvic LN+ (%)	8(18.6)	14(32.6)	ns
Histology			
tub1/tub2/mucinous/poorly	15/22/3/3	21/50/2/3	ns
CEA>6 ng/dl (%)	12(30.8)	39(51.3)	0.0259
Interval between CRT and surgery (days), mean	48.0	39.4	ns
L-CRT (%)	27(62.8)	34(44.7)	0.0584
Surgical procedure			ns
LAR	12	24	
CAA	21	46	
APR	3	5	
Hartmann's procedure	2	0	
Local excision	3	0	
Others	2	1	
Intersphincter resection (%)	21(48.8)	27(35.5)	ns

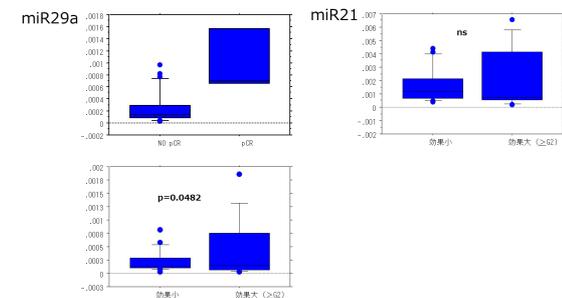
病理組織学的著効(≥Grade2)を 43 例(36.1%)に認めた。

病理組織学的著効群は、非著効群と比較して、cN(+) あるいは CEA>6ng/dl が有意に少なかった。また、腫瘍径が小さく、L-CRT の導入が多い傾向もみられた。

続いて、pCR 例で有意に高発現する miR3907, miR4454, miR6765-3p, miR6872-3p, miR7975 および miR-21 と miR-29a の 7 候補において 術前 CRT の病理組織学的著効群を同定できるか、治療前血清が得られた 30 例で検証した。

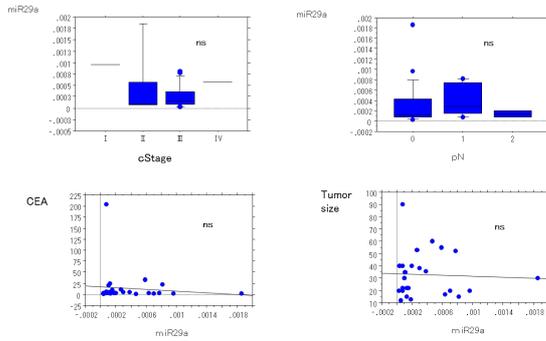
末梢血に反映された miRNA は miR-29a および miR-21 であった。

Fig4



miR-29a は pCR 例で有意に高値であり、G2 以上の病理組織学的著効群でも有意な高発現を認めた。

Fig5 miR-29a と臨床病理学的因子



血清 miR-29a と直腸癌進行度に関連はみられなかった。

血清 miR-29a と腫瘍サイズ、血清 CEA に相関はみられなかった。

Fig6 病理組織学的著効関連因子

単変量・多変量解析

Variables	univariate			multivariate		
	OR	95%CI	p-value	OR	95%CI	p-value
Tumor size						
<=30mm	2.05	0.94-4.50	0.0726	-	-	-
cN(-)	2.60	1.09-6.17	0.0308	2.45	0.97-6.17	0.0478
CEA <6ng/dl	2.51	1.10-5.68	0.0278	2.44	1.06-5.61	0.0357
CRT schedule						
L-CRT	2.08	0.99-4.48	0.0602	-	-	-
miR29a >cut-off*	2.43	1.01-5.85	0.0482	3.61	0.65-32.5	0.1262

* miR29a の cut-off 値は ROC 曲線により決定 (AUC 0.62544)

病理組織学的著効群に關与する独立因子は治療前 CEA 低値と cN(-)であった。

血清 miR29a は独立した病理効果予測因子にはならなかった。

結論

大腸腫瘍由来の血清 miRNA-21 は期待できる大腸癌診断マーカーであった。しかしながら直腸癌 pre-CRT の効果予測マーカーにはなり得なかった。

血清 miR-29a は、直腸癌 pre-CRT の効果予測に関連したが、強い予測マーカーにはならなかった。

今後も、新たな治療効果予測マーカーを探索し、より有効な直腸癌集学的治療の確立へつなげたい。

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 1 件)

1. 井上靖浩, 問山裕二, 毛利靖彦, 楠 正人: 血中マイクロ RNA による大腸癌の早期診断と予後判定 .G.I Research vol.23 no.1 p17-24, 2015 査読なし

〔学会発表〕(計 5 件)

1. 井上靖浩, 今岡裕基, 浦谷 亮, 沖 哲, 廣純一郎, 三枝 晋, 問山裕二, 小林美奈子, 荒木俊光, 田中光司, 毛利靖彦, 楠 正人: 当科における直腸癌集学的治療戦略と新たな治療効果予測マーカーの探索 第 115 回日本外科学会定期学術集会 シンポジウム 22 局所進行直腸癌に対する集学的治療戦略、国際会議場(名古屋)、2015.4.16

2. 問山裕二, 北嶋貴仁, 今岡裕基, 近藤哲, 井出正造, 川村幹雄, 川本 文, 奥川喜永, 廣 純一郎, 三枝 晋, 小林美奈子, 大井正貴, 田中光司, 井上靖浩, 毛利靖彦, 楠 正人: 早期大腸癌診断に向けての大腸腺腫血清 micro RNAs 発現の検討 第 69 回日本大腸肛門病学会学術集会、シンポジウム 3 大腸癌治療におけるバイオマーカー 横浜ベイホテル東急(横浜) 2014.11.7

3. 井上靖浩, 川村幹雄, 川本 文, 奥川喜永, 廣 純一郎, 問山裕二, 小林美奈子, 荒木俊光, 田中光司, 毛利靖彦, 楠 正人: 直腸癌術前化学放射線療法における Short Course と Long Course の適応と課題 第 68 回日本大腸肛門病学会学術集会、ワークショップ 4 直腸癌に対する集学的治療選択、京王プラザホテル(東京)、2013.11.7

4. 問山裕二, 井上靖浩, 川本 文, 奥川喜永, 三枝 晋, 廣 純一郎, 田中光司, 内田恵一, 毛利靖彦, 楠 正人: 大腸癌診断及び予後マーカーとしての血清 microRNA-21 第 79 回大腸癌研究会、梅田スカイビル(大阪)、2013.7.5

5. 井上靖浩, 奥川喜永, 廣 純一郎, 三枝 晋, 問山裕二, 小林美奈子, 荒木俊光, 田中光司, 毛利靖彦, 楠 正人: 局所進行直腸癌に対する術前化学放射線療法の課題 第 67 回日本消化器外科学会総会、富山国際会議場(富山)、2012.7.19

〔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：
出願年月日：
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

井上靖浩 (Inoue Yasuhiro)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：20324535

(2) 研究分担者

田中光司 (Tanaka Koji)
三重大学・医学部附属病院・講師
研究者番号：10345986

奥川喜永 (Okugawa Yoshinaga)
三重大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30555545

楠 正人 (Kusunoki Masato)
三重大学・医学(系)研究科・教授
研究者番号：50192026