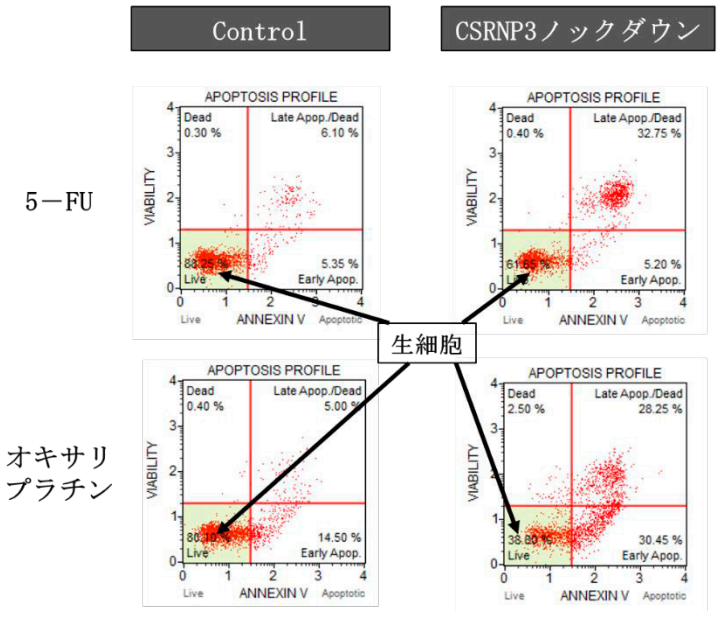
60　胃癌周術期化学療法効果予測バイオマーカーの探索	神田　光郎

【目的】再発率の高い Stage Ⅲ胃癌を対象に、S-1＋オキサリプラチン併用療法（SOX 療法）による術前補助化学療法を加えた周術期化学療法の優越性を検証する試験ランダム化比較第Ⅲ相試験 JCOG1509 が実施中である。術前補助化学療法の効果が全ての対象症例において均一であるとは考えにくく、治療効果が事前に予測できれば、個々の患者に応じた最適な治療法選択が可能となる。将来の JCOG1509 附随研究（術前 SOX 療法の効果予測因子を同定するためのバイオマーカー研究）に向けて、pilot 研究として、名古屋大学医学部附属病院で術前化学療法を施行した進行胃癌を対象に①JCOG1509 附随研究で解析対象とするバイオマーカー候補分子の同定のためのマルチオミクス解析を行う、②術前生検検体からの癌パネル解析が実施可能かを確認する、③化学療法耐性への関与が示唆される新規バイオマーカー候補について基礎実験を行う、ことを目的とした。

【方法】化学療法著効例と抵抗例（各 4 例）を対象に、組織検体を用いた RNA-sequencing、血漿検体を用いたプロテオーム解析と microRNA array を実施し、候補バイオマーカーを抽出した。患者固有の胃癌ゲノムの状態を評価するための検体としては治療前癌組織が理想的である。FFPE 検体の作製工程や長期保存による DNA 損傷や検体量不足ががんパネル解析実施において不利な要素となりうるため、がんパネル解析が試料量の少ない治療前生検 FFPE 試料においてどの程度の精度で実施可能であるか、術前化学療法により本来得られるべきゲノム情報がどの程度の影響を受けるかといった点について検討した。SOX 療法と同様の FU 系薬剤とプラチナ系薬剤の併用化学療法耐性への関与が示唆される新規バイオマーカー候補について基礎実験を行った。

【結果】組織検体を用いた RNA-sequencing により、化学療法抵抗例の胃癌原発巣組織中で特異的に高発現する 16 分子を同定した。そのうち、cysteine and serine rich nuclear protein 3（CSRNP3）を有望な胃癌化学療法感受性の調整因子かつバイオマーカーと考え、詳細に調査した。組織中 CSRNP3 発現度は進行胃癌の切除後再発や化学療法奏効度と相関していた。また特異的 CSRNP3 ノックダウン胃癌細胞株を樹立し、CSRNP3 阻害によって化学療法抵抗性胃癌細胞株の 5-FU とオキサリプラチンに対する感受性が増加することを明らかにした。血漿検体を用いたプロテオーム解析と microRNA array により、化学療法に抵抗した胃癌症例の血液中に特徴的な発現を示すタンパクと microRNA 群を同定した。内視鏡下生検検体から、がんパネル解析に必要な量および質のゲノム DNA が調製可能であることと、パネル解析に必要なシーケンスデータ取得が可能であることが確認された。

化学療法感受性調節分子 CSRNP3 ノックダウンによる生細胞率減少



60. 胃癌周術期化学療法効果予測バイオマーカーの探索

神田　光郎

名古屋大学 大学院医学系研究科 消化器外科学

Key words：胃癌，周術期化学療法，バイオマーカー，機能解析，薬剤耐性

緒　言

術後補助化学療法が確立された現在でも、Stage Ⅲ胃癌ではしばしば再発が見られ、さらなる治療開発の余地がある［1, 2］。その中でも重要な試みが、日本臨床腫瘍研究グループ（JCOG）によるランダム化比較第Ⅲ相試験 JCOG1509 である。これは臨床病期Ⅲ胃癌（Stage Ⅲと術前診断される胃癌）を対象に、手術及び術後補助化学療法を比較対照として、これに S-1＋オキサリプラチン併用療法（SOX 療法）による術前補助化学療法を上乗せした周術期化学療法の優越性を検証する試験である。切除可能な Stage Ⅲ胃癌に対して術前に化学療法を行う意義を検証する臨床試験であり、胃癌診療ガイドラインの大幅な改訂につながる可能性がある。

一方で、このような術前補助化学療法の効果が全ての対象患者に均一に得られるとは考えにくい。治療効果が事前に予測できれば個々の患者に応じた最適な治療法の選択が可能となり、治療効果のみならず医療経済の観点からも大きな意義がある。そこで臨床試験 JCOG1509 の附随研究として主に術前 SOX 療法の効果予測因子となりうるバイオマーカー開発研究を立案し準備を進めている。薬物療法の効果予測因子の同定は、個別化治療を実施する上で大きな意義があり、ゲフィチニブにおける *EGFR* 遺伝子変異（肺癌）、トラスツズマブにおける HER2 の過剰発現（乳癌、胃癌）などは既に臨床応用されている［3, 4］。ただしこれらの因子は限られた分子標的治療薬に特異的な効果予測因子であり、現時点で胃癌における効果予測の対象を薬物療法全般へと拡大するためにはフッ化ピリミジン＋プラチナ製剤という補助化学療法や一次治療で用いられる代表的な抗癌剤における効果予測因子の同定と検査法の確立が望まれている。

JCOG1509 本体研究登録症例を対象に附随研究のための試料収集・保管が開始されており、将来の附随研究では後述のごとく治療前血液検体を対象とした血漿中タンパク／microRNA の解析、主に術前生検組織 FFPE 検体を対象とした癌パネル解析、手術標本から得る凍結組織および FFPE 検体を対象に組織中タンパク／microRNA の解析を包括的に行うことで術前 SOX 療法の奏効度と相関する遺伝子学的バイオマーカーを同定することとなっている。この附随研究においては癌パネル解析の対象検体や、血漿中タンパクおよび microRNA 解析のバイオマーカー候補分子についての詳細が確定しておらず、万全の体制で附随研究を実施するためにこれらを事前に解決しておく必要がある。本研究では、名古屋大学医学部附属病院で術前化学療法を施行した進行胃癌を対象に、JCOG1509 附随研究で解析対象とするバイオマーカー候補分子の同定のためのマルチオミクス解析を行うことと、術前生検検体からの癌パネル解析が実施可能かを確認することを目的とした。並行して、このバイオマーカー研究の裏付けとなる科学的根拠をより強固にすることと、別の切り口から候補マーカーを同定することを目的として、胃癌化学療法耐性のメカニズム解明のための基礎研究を実施した。これにより、SOX 療法不応とみなされた患者あるいは SOX 療法後に再発した患者の新たな治療戦略開発の基盤となるデータ構築を図った。

S-1＋オキサリプラチンによる術前化学療法の効果予測因子はこれまでに報告されていない。本研究では既存の固形癌の治療効果予測バイオマーカーにとらわれず、マルチオミクス解析を行い、全く新規のバイオマーカーを広く検索した。

方　法

1. 治療前血漿検体を対象にしたプロテオーム解析

血液検体は非侵襲的かつ反復して採取可能であり、これを用いた治療前の効果予測バイオマーカーが同定されることが理想的である。JCOG1509 附随研究で解析対象とする血液中バイオマーカー候補タンパクを探索するため、名古屋大学医学部附属病院で術前 FU 系＋プラチナ系化学療法を施行した胃癌のうち、病理学的奏効度を基準に術前化学療法著効例 4 例と無効例 4 例から得た治療前の血漿検体を対象にプロテオーム解析を行い、マーカー候補タンパクを抽出した。

2. 治療前血漿検体を対象にした microRNA array

microRNA は癌由来の異常を比較的安定的に循環血液中に反映するとされ、血液中バイオマーカー解析の標的に適している。1 のプロテオーム解析と同じ対象から得た治療前血漿検体を用いて microRNA array 解析を行い、術前化学療法奏効度に相関する microRNA を抽出した。

3. 治療前内視鏡的生検 FFPE 検体を対象にしたゲノム解析

患者固有の胃癌ゲノムの状態を評価するために理想的な検体は治療前内視鏡的生検によって得られる癌組織であるが、FFPE 保存による DNA 損傷や検体量不足ががんパネル解析実施において不利な要素となりうる。そこで、内視鏡下生検で得た胃癌組織の FFPE 検体を対象にがんパネル解析に適する DNA の抽出が可能であることを確認した。

4. 胃癌化学療法耐性のメカニズム解明

名古屋大学で SOX 療法と同様の FU 系薬剤とプラチナ系薬剤の併用化学療法を受けた患者から採取した胃癌原発組織を用いた RNA-sequencing により同定した、化学療法耐性への関与が示唆される新規バイオマーカー候補について基礎実験を行った。

・siRNA および shRNA によるノックダウン胃癌細胞株を作製した。
・*in vitro* 実験：ノックダウン細胞株と親株の間で細胞増殖能、抗癌剤感受性を比較解析した。
・*in vivo* 実験：ノックダウン細胞株と親株を nude マウスに移植し、これらに対する抗癌剤の効果を比較した。
・発現解析：230 例の胃癌患者組織中の発現を調べ、予後を含めた各種臨床病理学的因子との相関を解析した。

結　果

1. 治療前血漿検体を対象にしたプロテオーム解析

プロテオーム解析により、術前 FU 系＋プラチナ系化学療法施行後に病理学的奏効度を基準に著効群（grade 2 もしくは 3）と無効群（grade 0 もしくは 1a）の間で網羅的に血清中タンパク発現を比較した。その結果、著効群で無効群の 2 倍以上の発現度であったタンパクを 8 種同定した。

2. 治療前血漿検体を対象にした microRNA array

1 のプロテオーム解析と同様に血清中 microRNA 量を網羅的に比較した結果、術前化学療法著効例で発現が増加する microRNA と低下する microRNA のクラスターが確認された（図 1）。

3. 治療前内視鏡的生検 FFPE 検体を対象にしたゲノム解析

内視鏡下生検で得た胃癌組織の FFPE 検体を対象に DNA 抽出、quality check を経てがんパネル解析を実施した。その結果、80%で解析に必要なゲノムシーケンスデータが取得できた。

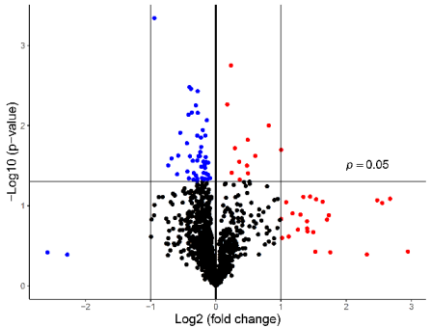


図 1. 治療前血清を対象とした microRNA array
著効群で血清中発現が増加したmicroRNA（赤点）と、低下したmicroRNA（青点）のクラスターを認めた。

4. 胃癌化学療法耐性のメカニズム解明

組織検体を用いた RNA-sequencing により、化学療法抵抗例の胃癌原発巣組織中で特異的に高発現する 16 分子を同定した。そのうち、cysteine and serine rich nuclear protein 3（CSRNP3）を有望な胃癌化学療法感受性の調整因子かつバイオマーカーと考え、詳細に調査した。230 例の胃癌根治切除症例から得た胃癌原発巣組織中 CSRNP3 発現度を定量的 PCR 法で測定し、発現量の中央値により高発現群と低発現群に分類した。CSRNP3 高発現群では、術後全生存期間（ハザード比 2.56、95%信頼区間 1.42～4.63、P=0.0017）、術後無再発生存期間（ハザード比 1.73、95%信頼区間 1.07～2.81、P=0.0252）ともに有意に短縮していた。siRNA を用いて CSRNP3 の特異的ノックダウンを行い、*in vitro* での化学療法抵抗性胃癌細胞株 MKN1 の形質について評価したところ、CSRNP3 ノックダウンにより 5-FU とオキサリプラチンに対する感受性が増加した（図 2）。未処理の胃癌細胞株 HGC-27（コントロール群：n=6）と、shRNA によって CSRNP3 を安定的ノックダウンした HGC-27（CSRNP3 ノックダウン群：n=6）を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作製した。これらに対してシスプラチン（5 mg/kg を 2 週間、週 2 回）投与と経過観察で腫瘍径を比較したところ、コントロール群ではシスプラチンの腫瘍増大抑制効果が乏しかったが、CSRNP3 ノックダウン群ではシスプラチンにより腫瘍増大が抑制された。

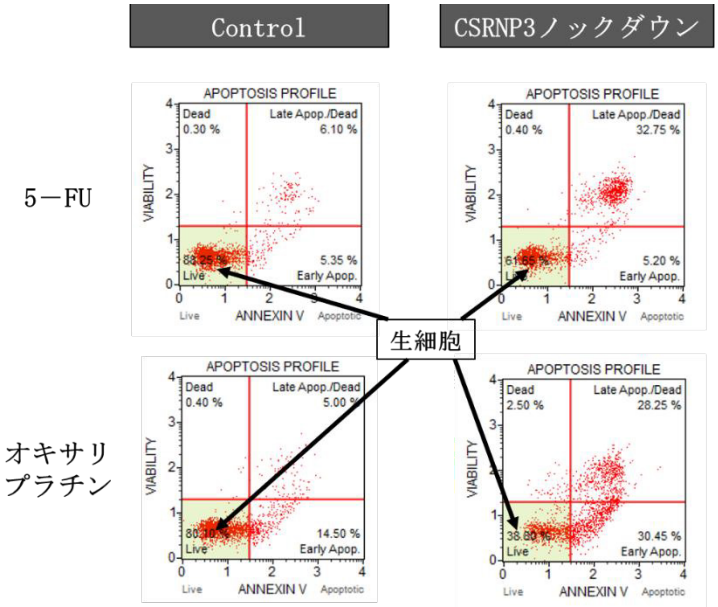


図 2. CSRNP3 ノックダウンによる胃癌細胞抗癌剤感受性の変化
MKN1細胞に対してCSRNP3をノックダウンすることにより、5-FU（上段）およびオキサリプラチン（下段）投与後の生細胞比率が低下した。

考　察

本研究では、JCOG1509 の附随研究である術前化学療法効果予測バイオマーカー開発研究を万全の体制で実施するために必要なデータ取得を行った。治療前血清を対象としたマルチオミクス解析により、有望な血清タンパクおよびmicroRNA が同定できた。これらについては将来の JCOG1509 附随研究で、その意義を検証することになる。さらに、内視鏡下生検検体からもがんパネル解析が高率に実施できることが確認できたことは、今後のあらゆる癌研究においても重要な知見である。さらに新規に胃癌化学療法感受性調節因子として同定した CSRNP3 の発現が抑制されれば胃癌細胞の抗癌剤感受性が向上することが示唆された。本研究の成果により、個別化された進行胃癌の集学的治療の実現に、大きな前進が得られると考えている。

文　献

1) Sasako M, Sakuramoto S, Katai H, Kinoshita T, Furukawa H, Yamaguchi T, Nashimoto A, Fujii M, Nakajima T, Ohashi Y. Five-year outcomes of a randomized phase III trial comparing adjuvant chemotherapy with S-1 versus surgery alone in stage II or III gastric cancer. J Clin Oncol. 2011 Nov 20;29(33):4387-93. PMID: 22010012 doi: 10.1200/JCO.2011.36.5908.

2) Noh SH, Park SR, Yang HK, Chung HC, Chung IJ, Kim SW, Kim HH, Choi JH, Kim HK, Yu W, Lee JI, Shin DB, Ji J, Chen JS, Lim Y, Ha S, Bang YJ; CLASSIC trial investigators. Adjuvant capecitabine plus oxaliplatin for gastric cancer after D2 gastrectomy (CLASSIC): 5-year follow-up of an open-label, randomised phase 3 trial. Lancet Oncol. 2014 Nov;15(12):1389-96. PMID: 25439693 doi: 10.1016/S1470-2045(14)70473-5.

3) Lynch TJ, Bell DW, Sordella R, Gurubhagavatula S, Okimoto RA, Brannigan BW, Harris PL, Haserlat SM, Supko JG, Haluska FG, Louis DN, Christiani DC, Settleman J, Haber DA. Activating mutations in the epidermal growth factor receptor underlying responsiveness of non-small-cell lung cancer to gefitinib. N Engl J Med. 2004 May 20;350(21):2129-39. PMID: 15118073 doi: 10.1056/NEJMoa040938.

4) Bang YJ, Van Cutsem E, Feyereislova A, Chung HC, Shen L, Sawaki A, Lordick F, Ohtsu A, Omuro Y, Satoh T, Aprile G, Kulikov E, Hill J, Lehle M, Rüschoff J, Kang YK; ToGA Trial Investigators. Trastuzumab in combination with chemotherapy versus chemotherapy alone for treatment of HER2-positive advanced gastric or gastro-oesophageal junction cancer (ToGA): a phase 3, open-label, randomised controlled trial. Lancet. 2010 Aug 28;376(9742):687-97. PMID: 20728210 doi: 10.1016/S0140-6736(10)61121-X.