

学 位 論 文 題 名

Chemosensitivity prediction in esophageal squamous cell carcinoma: Novel marker genes and efficacy-prediction formulae using their expression data

(食道癌における抗癌剤感受性予測 : 新規効果予測遺伝子の同定とそれらの発現量を用いた効果予測モデルの開発)

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

【背景・目的】

食道癌は難治性の固形癌である。治療成績の向上を目指して様々な治療開発研究が進められ、現時点では術前・術後化学療法が、生存期間延長のための最も有効な治療手段の一つとされている。しかしながら、他の癌と同様、同一の治療法であってもその効果には著明な個体差がある。抗癌剤化学療法の効果の投与前予測、すなわち至適治療の個別選択が食道癌においても強く求められている。

これまでの研究から、腫瘍組織における遺伝子発現プロファイルが効果予測に重要であることや幾つかの有用なバイオマーカーが示唆されてきたが、いまだ広範な臨床展開が期待できる予測系の確立には至っていない。薬剤応答は多因子によって構成される複雑系である。同じ薬剤・レジメンでも個々の腫瘍間で薬剤応答を規定する遺伝子発現プロファイルは大きく異なる。効果予測の大きな障壁となっている巧妙で複雑な薬剤応答機構、その理解に基づいた簡便で正確な効果予測系の開発が望まれている。

本研究ではヒト培養食道癌細胞株を用いて、まず、2種の網羅的遺伝子発現解析と定量的遺伝子発現解析を通じて食道癌特異的な効果予測遺伝子を選択し、次いでそれらの遺伝子発現量を用いた *in vitro* 抗癌剤効果予測モデル、さらに臨床効果予測モデルの確立を試みた。

【材料・方法】

ヒト食道癌細胞株 (KYSE) 20株を用い、2種の網羅的遺伝子発現解析 (cDNA microarray と oligonucleotide array) と、8抗癌剤 (5-FU、CDDP、MMC、DOX、CPT-11、SN-38、TXL、TXT) における MTT assay を行った。得られた発現量と IC₅₀ 値に関し、順位相関解析を行い、各々の薬剤の効果に深く関連する遺伝子を抽出、これら多くの候補遺伝子の中から 1) 抗癌剤効果へ関連することが機能的にすでに証明された遺伝子、と、2) 機能的意義は未確定ながら、発現量と抗癌剤効果との間に強い相関性が認められた遺伝子、を効果予測指標遺伝子候補として選択した。これら遺伝子に関して定量的遺伝子発現解析 (real-time RT-PCR) を行い、両者の相関性に関し再現性が認められた遺伝子を効果予測遺伝子として選択した。次に、これらの遺伝子の発現量から、複数の抗癌剤効果を同時に予測可能とするモデルの作成を試みた。すなわち、real-time RT-PCR による効果予測遺伝子の発現量を説明変数 (x_1, x_2, \dots, x_p)、各種抗癌剤の IC₅₀ 値を反応変数 (y) とし、重回帰分析を用いて $y = x_1\hat{e}_1 + x_2\hat{e}_2 + \dots + x_p\hat{e}_p + \hat{a}$ ($\hat{e}_1, \dots,$

e_p は係数、 a は定数) からなる *in vitro* 効果予測モデルを求めた。重回帰分析には広島大学原医研計量生物分野で開発された NLReg を用いた。さらに、同一の遺伝子セットを用いて、食道癌における術後補助化学療法 (5-FU based) の臨床効果 (無再発生存期間、生存期間) の予測モデルを設定した。

【結果】

1. 効果予測候補遺伝子のスクリーニング

cDNA microarray、oligonucleotide array を用いたスクリーニングにより、抽出された候補遺伝子数 (順位相関、 $P<0.05$) は各々、5-FU で 500 と 520、MMC で 494 と 997、DOX で 644 と 978、CDDP で 479 と 867、TXL で 437 と 1105、TXT で 416 と 291、CPT-11 で 619 と 311、そして SN-38 で 509 と 1007 であった。

2. 効果予測遺伝子の決定

1) 上記候補遺伝子のうち、すでに抗癌剤効果関連遺伝子としての機能が証明された 50 遺伝子について検索したところ、スクリーニングの範囲を拡大 (いずれかのアレイにおいて $P<0.1$ までの相関を示した遺伝子) することで、6 種の抗癌剤に対する 11 遺伝子が候補として選択された。real-time RT-PCR での再現性確認を経て、最終的に 5 抗癌剤に対する 5 遺伝子 (5-FU : *DPYD*、DOX : *BCL2*、CDDP : *GSTP1*、CPT-11 : *XRCC1*、SN-38 : *MGMT*) を効果予測遺伝子とした。2) 遺伝子発現量と抗癌剤感受性が双方のアレイ解析において強い相関を示す ($P<0.01$) 遺伝子として 20 遺伝子が候補として選択された。real-time RT-PCR での再現性確認を経て、最終的に 4 抗癌剤に対する 9 遺伝子 (5-FU : *B4GALT5*、*UGCG*、*XBPI*、DOX : *NRCAM*、CDDP : *ARFRP1*、*IFITM1*、*KIAA0685*、*SIPA1L2*、CPT-11 : *CALU*) を効果予測遺伝子とした。

3. 4 種抗癌剤に対する *in vitro* 効果予測モデル

選択した 2 組の遺伝子、すなわち 1) 既知 5 遺伝子と 2) 新規 9 遺伝子、の 2 セットを効果予測遺伝子とし、それらの発現量を用いて、4 種の抗癌剤 IC_{50} 値を同時に予測可能とする *in vitro* 効果予測モデルをそれぞれの遺伝子セットで求めた。作成したモデルはいずれも高い効果予測の可能性を示したが、新規 9 遺伝子から構成されるモデルがより相関性・予測性が高いことが示唆された。

4. 臨床効果予測モデル

2 組の遺伝子セットに関する臨床検体 (14 検体) の発現データから、生存期間および無再発生存期間を臨床効果指標とする予測モデルを設定し、新たな 4 検体を試験サンプルとしてその有用性を検討した。同モデルについても *in vitro* 効果予測モデルでの結果と同様、新規 9 遺伝子によるモデルの予測優位性が示唆された。

【考察】

抗癌剤効果予測モデルの確立研究を長期にわたり継続してきた。その成果として、様々な臓器由来のヒト腫瘍細胞 19 株を用いた解析により、既知 12 遺伝子を用いた 8 種の抗癌剤効果の *in vitro* 予測モデル、および高度進行胃癌における 5-FU 臨床効果予測モデルをすでに報告している。しかしながら、癌種によって効果予測指標遺伝子が異なること、また、cDNA microarray のみを用いた候補遺伝子の抽出や抗癌剤効果関連遺伝子として機能的に証明された遺伝子だけに焦点を当てた解析には明らかに限界がある。本研究では対象を難知性固形癌の代表である食道癌にしぼり、発現量－抗癌剤感受性の相関解析のみから有力な因子をスクリーニングするために、2 種の網羅的遺伝子発現解析を同時に行い、より有力で特異的な効果予測遺伝子の選択を試みた。選定した既知 5 遺伝子は、複数の基礎・臨床研究において

抗癌剤効果の指標となりうることが証明されており、新規 9 遺伝子は抗癌剤効果に関する機能は未知ではあるものの、その発現量が抗癌剤効果と密接に関連する遺伝子である。いずれも効果予測指標として有用なものと考えられるが、各々単独での薬剤効果予測には限界があった。しかしながら、重回帰分析を用いてこれら 2 セットの効果予測遺伝子の発現量の相互関係を理解し、それらを効果という単一指標に変換することで、*in vitro* および臨床での抗癌剤効果を簡便かつ正確に予測しうることが示された。このことは、食道癌化学療法の個別化に大きく貢献するものと考えられる。現在、新規 9 遺伝子の機能解析、さらに有力な効果予測規定遺伝子の探索を続行するとともに、確立したモデルの実践的価値を評価するための *prospective study* を計画している。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 秋 田 弘 俊
副 査 教 授 福 田 諭
副 査 教 授 藤 堂 省

学位論文題名

Chemosensitivity prediction in esophageal squamous cell carcinoma: Novel marker genes and efficacy-prediction formulae using their expression data

(食道癌における抗癌剤感受性予測：新規効果予測遺伝子の同定とそれらの発現量を用いた効果予測モデルの開発)

難治性固形癌の食道癌において現時点では、補助化学療法が生存期間延長のための有効な治療方法のひとつとされている。しかしながら、その効果には著明な個人差があり、化学療法の効果の投与前予測、ならびに至適治療の個別選択が強く求められている。しかし、腫瘍の薬剤応答機構が複雑であるために、現在までのところ広範な臨床展開が期待できる予測系の確立には至っていない。本研究では、食道癌におけるテイラード化学療法の実現のため、選択した複数のマーカー遺伝子の発現量を用いた抗癌剤の効果予測モデルの確立を試みた。ヒト培養食道癌細胞株を用いて、2種の網羅的遺伝子発現解析(cDNA microarray, oligonucleotide array)の遺伝子発現量とMTTアッセイによるIC₅₀値の間で順位相関解析を行い、8種類の抗癌剤効果に關与する多数の候補遺伝子を抽出し、real-time RT-PCRによる定量的遺伝子発現解析を通じて抗癌剤効果に關与する食道癌特異的な効果予測規定遺伝子(既知5遺伝子および新規9遺伝子)を選定した。次いで重回帰分析を用いて、それら2セットの遺伝子発現量の相互関係を基盤とする*in vitro*抗癌剤効果予測モデルを作成した。さらに食道癌臨床検体において、5-FUをベースとする術後補助化学療法を施行された症例の臨床効果指標(全生存期間および無再発生存期間)を予測するモデルを、*in vitro*効果予測モデルと同一の2つの遺伝子セットを用いて作成できることを示した。

公開発表にあたり、副査の福田教授より1)タキサン系薬剤、MMCに關する効果予測規定遺伝子が選定されてこなかった理由、2)5-FUにおける*in vitro*効果予測モデルと臨床効果予測モデルでの結果の相違、3)新規9遺伝子に關する現在までの知見、について質問があった。これらの質問に対し、1)“既知遺伝子に關しては順位相関解析のscreeningの範囲を広げても抽出されなく、新規遺伝子についてはreal-time RT-PCRの遺伝子発現解析においてvalidationが得られなかった。今後は新規遺伝子におけるscreeningの範囲を広げ、

可能性のある遺伝子に関して、順次 real-time RT-PCR での validation を図る必要がある。”、2) “臨床症例において、5-FU の総投与量が症例毎に異なることや低用量の CDDP が投与されていることなど、純粋な 5-FU 治療でないことが原因と考えられる。今後、症例間の抗癌剤 regimen を統一した形での前向き研究により、予測モデルを再度作成する検討が必要である。”、3) “*ARFRP1* : trans-Golgi network に属し小胞輸送に関与、*B4GALT5* : 糖転移酵素のひとつ、*UGCG* : 糖脂質の合成に関与、*NRCAM* : 神経突起の成長に関与。”、との回答があった。

副査の藤堂教授からは、1) 2種の網羅的遺伝子発現解析を同時に用いた理由、2) 作用機序の異なる複数の抗癌剤の効果を単一の予測式で示すことの是非、について質問があった。これらの質問には、1) “microarray による網羅的遺伝子発現解析から screening されてくる多数の候補遺伝子の中から、ある特定の遺伝子を選定するための方法論が確立されていない。発現量-抗癌剤効果の相関解析のみから、より有力な遺伝子を選択する一手段として、2種の網羅的遺伝子発現解析を用いた。”、2) “regimen を統一した形での前向き研究による評価が必要であるが、本研究の仮説として挙げた「複数の抗癌剤・regimen に対する効果予測を単一の式で同時に表す」ことは実際上難しく、多剤併用で複数の regimen からなる抗癌剤化学療法の現状を考慮すると、将来的には regimen 毎の効果予測モデルを確立し、予測値を比較していく方法が実践的と考えられる。”、との回答があった。

最後に主査の秋田教授より、1) 新規 9 遺伝子の薬剤感受性への関与、2) 既知 5 遺伝子よりも新規 9 遺伝子で構成される予測式が有用となった理由、3) 進行癌・再発癌症例における効果予測、について質問があった。これらの質問に対し、1) “新規遺伝子を導入した食道癌細胞の抗癌剤感受性試験において、幾つかの遺伝子が耐性・感受性を変化させている結果が得られていること（広島大学での継続研究内容）、肺癌細胞株 PC-6 とその CDDP 耐性株 (PC-6/CDDP) において、今回選択した *ARFRP1* の real-time RT-PCR での遺伝子発現量をみると PC-6/CDDP において発現量の増加があること (*ARFRP1* が汎用性のある CDDP 効果規定因子である可能性) など、今回選択した新規遺伝子に関する promising な結果が得られている。新規 9 遺伝子が食道癌特異的な因子かどうかも含めて、さらに解析を進めていく必要がある。”、2) “新規 9 遺伝子は既知 5 遺伝子よりも、各々の発現量が抗癌剤効果と強く相関することから、遺伝子発現量から構成される重回帰式においてより相関の高いモデルをもたらしたものと考えられる。”、3) “進行・再発癌などの担癌状態においては臨床効果指標として腫瘍縮小効果が加わることになる。進行・再発食道癌に対する治療として化学療法よりも放射線化学療法が優先される現況において、抗癌剤効果予測モデルを作成することは難しく今後の課題となる。”、との回答があった。

本論文は、抗癌剤効果に関連する限定した遺伝子セットの発現量から、複数の抗癌剤の効果を同時に予測するモデルの作成を試みた興味深い報告であり、今後の研究の展開が期待される。

審査員一同は、これらの成果を高く評価し、大学院課程における研鑽や取得単位なども併せ申請者が博士（医学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと判定した。