

学 位 論 文 要 旨

氏名 圓福 真一郎

論 文 題 目

An 80-gene set to predict response to pre-operative chemoradiotherapy for rectal cancer by principle component analysis

(主成分解析を用いた直腸癌に対する術前化学放射線療法の感受性を予測する80遺伝子セットの同定)

要 旨

[緒言] 進行直腸癌に対する術前化学放射線療法 (CRT) は臓器温存や術後の局所再発の制御に寄与する。術前 CRT は欧米では標準治療とされ、日本でも近年その有用性が報告されているが、治療効果が期待できる患者のみを選別し治療を行う個別化治療はまだ実現していない。これまで直腸癌の術前 CRT の感受性に関する1つもしくは数個の遺伝子についての報告はあるが、抗癌剤の作用機序はとても複雑であるため、バイオマーカーとして臨床応用することは難しい。そこで本研究の目的は、当科で行った「局所進行直腸癌に対する TS-1 を用いた術前 CRT の第二相前向き試験 (UMINID03396)」の付随研究において、DNA マイクロアレイ法の結果をもとに新しい統計学的手法である主成分解析を行い、術前 CRT の感受性予測因子を同定することである。

[研究対象および方法] 対象は2009年から2012年に治療前生検組織が解析可能であった術前 CRT 施行の進行直腸癌 (TNM 分類第7版において T3-4, N0-3, M0) 26例とした。術後の摘出標本の組織学

的効果判定により Grade0,1a,1b を non-responder、Grade2,3 を responder として、臨床的因子を比較検討した。臨床データはカイ二乗検定を行い、 $p < 0.05$ を有意差ありとした。解析に用いた生検材料は、治療前に原発巣の腫瘍の豊富な部位より採取し、HE 染色で癌細胞の最も多く含まれたサンプルの RNA を抽出した。全 RNA は cDNA に逆転写し、網羅的 DNA マイクロアレイ法にて 40000 プローブのシグナル値を計測した。シグナル値が 2 群間で有意差のある遺伝子を抽出した。これらの遺伝子のうち k 個の遺伝子を効果判定に用いた場合、2 群の判別のしやすさを Silhouette 距離で示し、最適な遺伝子群の数を決定した。さらに non-responder および responder を平面上にプロットするため、主成分解析を用いて次元数を 2 次元まで削減した。感受性を弁別する最適な遺伝子群に含まれる遺伝子の機能解析を GeneSpring v11.5, および DAVID v6.7 を用いて行った。

[結果] 術後摘出標本の組織学的効果判定により、non-responder は 15 例、responder は 11 例であった。2 群間の臨床的背景に有意差は認められなかった。40000 の遺伝子の p 値は、 $0.06 \leq p < 0.07$ にピークを持ち、1000 以上の遺伝子が $p < 0.05$ に存在することが判明した。プローブ数と Silhouette 距離の解析では、80 個の遺伝子を選択した場合にもっとも判別しやすい結果であった。non-responder で有意に発現している遺伝子のうち 22 個の遺伝子が alternative splicing に関するものであり、responder で有意に発現している遺伝子のうち 4 つの遺伝子が septin に関するものであった。

[考察] 本研究は non-responder と responder の 2 群間で有意差を認めた複数の遺伝子から 80 遺伝子に絞り込む過程において、Silhouette 距離で最適な遺伝子数を決定し、さらに主成分解析を用いて 2 次元の表面上に治療感受性を示せたことが新しい発見である。また本研究は prospective phase II 臨床試験の付随研究であり、全例に均一な治療と臨床病理学的評価が行われた中で生検組織の遺伝子解析がなされている。今回同定したバイオマーカーによって、responder に対して術前 CRT を行うという臨床的ストラテジーを構築でき、また今後は臨床応用に向けた validation study を行っていく予定である。

[結論] 治療前生検材料を用いた網羅的 DNA マイクロアレイ解析データを主成分解析することにより、局所進行直腸癌に対する術前 CRT の感受性を予測しうる 80 遺伝子セットを同定した。

学位論文審査の結果の要旨

審査区分 課・論	第 562 号	氏名	圓 福 真一朗
審査委員会委員		主査氏名	白尾 國昭 
		副査氏名	江崎 敏理 
		副査氏名	伊奈 啓輔 
論文題目			
An 80-gene set to predict response to pre-operative chemoradiotherapy for rectal cancer by principle component analysis (主成分解析を用いた直腸癌に対する術前化学放射線療法の感受性を予測する 80 遺伝子セットの同定)			
論文掲載雑誌名			
Molecular and Clinical Oncology			
論文要旨			
<p> [緒言]進行直腸癌に対する術前化学放射線療法 (CRT) は臓器温存や術後の局所再発の制御に寄与するとされている。しかし、現在のところ有用なバイオマーカーとして臨床応用されているものはない。本研究の目的は、「局所進行直腸癌に対する TS-1 を用いた術前 CRT の第二相前向き試験 (UMINID03396)」で得られた情報を用いて、DNA マイクロアレイ法の結果をもとに新しい統計学的手法である主成分解析を行い、有用な術前 CRT の感受性予測因子を見出すことである。[研究対象および方法] 対象は 2009 年から 2012 年に術前 CRT を行った進行直腸癌 26 列であった。術後の摘出標本の組織学的効果判定により Grade0,1a,1b を non-responder、Grade2,3 を responder として、両者の臨床的因子を比較検討した。術前生検材料は、原発巣の腫瘍の豊富な部位より採取し、HE 染色で癌細胞の最も多く含まれたサンプルの RNA を抽出した。全 RNA は cDNA に逆転写し、網羅的 DNA マイクロアレイ法にて 40000 プローブのシグナル値を計測した。シグナル値が 2 群間で有意差のある遺伝子を抽出し、これらの遺伝子のうち k 個の遺伝子を効果判定に用いた場合、2 群の判別のしやすさを Silhouette 距離で示し、最適な遺伝子群の数を決定した。さらに non-responder および responder を平面上にプロットするため、主成分解析を用いて次元数を 2 次元まで削減した。感受性を弁別する最適な遺伝子群に含まれる遺伝子の機能解析を行うため GeneSpring v11.5, および DAVID v6.7 を用いた。[結果]non-responder は 15 例、responder は 11 例であった。2 群間の臨床的背景に有意差は見られなかった。40000 の遺伝子のうち、1000 以上の遺伝子が $P < 0.05$ を示した。プローブ数と Silhouette 距離の解析では、80 個の遺伝子を選択した場合にもっとも判別しやすいという結果が得られた。non-responder で発現している遺伝子のうち 22 個が alternative splicing に関するものであり、responder で発現している遺伝子のうち 4 つが septin に関するものであった。[考察]本研究での新しい発見は、2 群間の判別において Silhouette 距離を用いて最適な遺伝子数を決定し得たこと、さらに主成分解析を用いて 2 次元の表面上に治療感受性を示せたことである。以上より、本研究で同定した 80 遺伝子を用いて、responder に対してのみ術前 CRT を行うという臨床的ストラテジーを構築できた。[結論]治療前生検材料を用いた網羅的 DNA マイクロアレイ解析データの主成分解析によって、局所進行直腸癌に対する術前 CRT の感受性を予測するためには本研究で同定した 80 遺伝子セットを用いるのが最適であることを示すことができた。 </p>			
<p> 本研究は進行直腸癌に対する術前化学放射線療法 (CRT) の有用性が期待できる症例を治療前生検材料を用いた網羅的 DNA マイクロアレイ解析データの主成分解析によって予測できるという可能性を示したものであり、80 の遺伝子セットを用いることが感受性の高い症例を判別するために最も有用であると結論付けている。侵襲の大きな癌治療において、治療の効果予測因子を見出すことは無駄な治療を行わず、効率のよい治療効果を挙げるために非常に有用なことである。本研究は、この点に着目したものであり、今後の発展が期待される有意義なものである。以上、本論文は審査委員の合議により学位論文に値するものと判定した。 </p>			

最終試験
の結果の要旨
~~学力の確認~~

審査区分 ①・論	第 562 号	氏名	圓 福 真一朗
審 査 委 員 会 委 員		主査氏名	白尾 国昭 
		副査氏名	石崎 敏理 
		副査氏名	伊奈 啓輔 
<p>学位申請者は本論文の公開発表を行い、各審査委員から研究の目的、方法、結果、考察について次の質疑を受けた。</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 最も肛門側に近いところから組織を採取する理論的理由は？ 2. 腫瘍の採取部位により、遺伝子発現が異なるのではないかと。1つの腫瘍について、1ヶ所だけの解析で発現が高低している遺伝子を特定してよいのか。 3. 放射線感受性に関わる因子はどのようなものがあるのか。その例として、低酸素状態が細胞死に対する感受性を大きく変化させるが、サンプルをとる際、どのような注意を払ったのか。 4. シルエット距離の算出法について説明せよ。 5. 各個人間のシルエット距離はどのように算出するのか？ 6. 主成分解析方法について説明せよ。 7. 臨床病理学的所見と CRT の病理学的効果についての検討において、術式は必要か？ 8. Responder と non-responder との間で、遺伝子発現の差が治療の感受性に寄与しているという根拠はあるのか。 9. 特定の遺伝子 (p53) の変異がそもそも放射線に対する感受性の差を生じさせるという報告があるが、そのような因子の変異などを考慮せずに解析を行ってよいものなのか。 10. 既報でも同様な研究がおこなわれているが、今回得られた発現の増減を認めた遺伝子は既報においても同様に増減が確認されているのか。 11. 80 遺伝子はそれぞれ、治療効果との関係において重み付けはないか？ 12. リン酸化タンパク質の発現の増減と治療の感受性との間にどのような関係があるのか。 13. Septin の発現量が responder で上昇しているが、どのような機序が考えられるのか。 14. 本研究のこれからの発展性と臨床応用について説明せよ。 <p>これらの質疑に対し、申請者は概ね適切に解答した。よって審査委員の合議の結果、申請者は学位取得有資格者と認定した。</p>			

(注) 不要の文字は2本線で抹消すること。