

平成 28 年度 委託研究開発成果報告書

I. 基本情報

- 事業名： (日本語) 次世代がん医療創生研究事業
(英語) Project for Cancer Research and Therapeutic Evolution
- 研究開発課題名： (日本語) 大腸がんに対する抗 EGFR 抗体薬の効果を予測する新規バイオマーカー・DNA メチル化状態診断キットの開発
(英語) Development of DNA methylation status diagnostic kit predicting an effect of the anti-EGFR antibody on colorectal cancer
- 研究開発担当者 (日本語) 国立大学法人東北大学 加齢医学研究所 臨床腫瘍学分野
教授 石岡 千加史
- 所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University, Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Department of Clinical Oncology. Professor. Chikashi Ishioka
- 実施期間： 平成 28 年 5 月 25 日 ～ 平成 29 年 3 月 31 日
- 分担研究 (日本語) 研究総括
開発課題名： (英語) Supervision of the research
- 研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 加齢医学研究所 臨床腫瘍学分野
教授 石岡 千加史
- 所属 役職 氏名： (英語) Tohoku University, Institute of Development, Aging and Cancer (IDAC), Department of Clinical Oncology. Professor. Chikashi Ishioka
- 分担研究 (日本語) 臨床的有用性の検証、規制当局対応、事業性関連
開発課題名： (英語) Verification of clinical utility, Regulatory authorities matters, Business related matters

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学 加齢医学研究所 臨床腫瘍学分野
助教 高橋 信
所属 役職 氏名: (英語) Tohoku University, Institute of Development, Aging and Cancer
(IDAC), Department of Clinical Oncology. Assistant Professor.
Shin Takahashi

分担研究 (日本語) 臨床的有用性の検証
開発課題名: (英語) Verification of clinical utility

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学病院 腫瘍内科 講師 高橋 雅信
所属 役職 氏名: (英語) Tohoku University hospital. Department of Medical Oncology.
Senior Assistant Professor. Masanobu Takahashi

分担研究 (日本語) 診断キット開発、診断薬としての性能評価
開発課題名: (英語) Diagnostic kit development, Performance evaluation of diagnostic
kit

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東北大学病院 腫瘍内科 特任助手 大内 康太
所属 役職 氏名: (英語) Tohoku University hospital. Department of Medical Oncology.
Research Associate. Kota Ouchi

分担研究 (日本語) 診断キット開発
開発課題名: (英語) Diagnostic kit development

研究開発分担者 (日本語) 国立大学法人東京大学 先端科学技術研究センター
特任講師 永江 玄太
所属 役職 氏名: (英語) The University of Tokyo, Research Center for Advanced Science and
Technology. Genome Science. Project Lecturer. Genta Nagae

II. 成果の概要 (総括研究報告)

大内康太特任助手(東北大学病院)および永江玄太特任講師(東京大学・先端研)は、診断キットを開発するために最適なプローブセットを再検討した。最初に、彼らは、これまで選定していた 24 プローブを 21 プローブまで減らした場合の診断性能を検討した。その結果、彼らは、21 プローブ中、13 または 14 以上のプローブにメチル化を認める場合を高メチル化と診断する時に網羅的 DNA メチル化を精度 100% で診断できることを確認した。また、彼らは、コスト、結果の再現性や検査手技の簡便性等の視点からメチル化ステータスの診断キットに使用する方法を複数検討した。その

結果、A法に優位性があることを明らかにした。一方、遺伝子のプロモーター領域の CpG アイランドにメチル化を認める場合に、その遺伝子の発現が抑制されることが知られているため、遺伝子発現プロファイルを用いて、メチル化ステータスが判定できる可能性がある。そこで、97例の大腸がんを対象として網羅的 DNA メチル化解析と網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、メチル化レベルと発現レベルが相関する遺伝子リストが得られた。この遺伝子リストに含まれる個々の遺伝子の機能を詳細に検討するとともに、発現プロファイルを用いてメチル化ステータスを診断することができるかどうか検討した。

高橋信助教（東北大学）および高橋雅信講師（東北大学）は、臨床的有用性を検証するために、研究 A:試験実施中の前向き臨床試験に付随する後ろ向き解析研究、研究 B:試験を終了した前向き臨床試験に付随する後ろ向き解析研究、研究 C:新規の多施設後ろ向き観察研究の計画と実施、研究 D:登録を終了した前向き臨床試験に付随する後ろ向き解析研究の 4つの研究を進めた。研究 A では、2016年 12 月末に症例登録を終了し、計 66 例が登録された。平成 29 年 3 月までに 51 検体が収集され、そのうち十分な DNA 量が得られた 29 例について、Infinium Methylation EPIC Kit (Illumina) を用いてゲノムワイド DNA メチル化状態を解析した。研究 B では、計 28 検体が収集され、研究 A 同様にそのうち十分な DNA 量が得られた 27 検体についてゲノムワイド DNA メチル化状態を解析した。研究 C については、「DNA メチル化状態及び遺伝子発現状態に基づく大腸癌の抗 EGFR 抗体薬治療効果予測」（後ろ向き試験）の研究計画書を作成し、東北大学大学院医学系研究科倫理委員会の承認を得た（承認番号 2016-1-570）。研究 D については、338 例の検体が収集され、このうち十分な DNA 量が得られた 235 例についてゲノムワイド DNA メチル化状態の解析を開始した。

規制当局対応に関しては、高橋信助教（東北大学）は、東北大学病院臨床研究推進センターの支援を得て、独立行政法人医薬品医療機器総合機構（PMDA）の開発前面談に向けてデータの準備を開始した。

事業性関連として、石岡千加史教授（東北大学・加齢研）、高橋信助教（東北大学・加齢研）、大内康太特任助手（東北大学病院）は東北大学臨床研究推進センター及び東北テクノアーチの支援を得て、平成 28 年度中に 4 回、国内臨床検査会社 R 社の担当者と共同研究開始に向けた交渉を行った。その結果、共同研究契約締結の内諾を得た。平成 28 年度末時点で、具体的な契約内容について交渉中である。また、これまでの研究成果について、第 75 回日本癌学会学術総会等において発表を行った。

Kota Ouchi (Tohoku University) and Genta Nagae (University of Tokyo) reviewed an optimal probe set to develop a diagnostic kit of the DNA methylation status. They examined diagnosis performance when 24 probes chosen so far were reduced to 21 probes first. As a result, they confirmed that comprehensive DNA methylation could be diagnosed in precision 100% when the case that probes 13 or 14 or more had methylation was diagnosed with high methylation among 21 probes. Also, they examined plural methods to use for a diagnostic kit of the methylation status from viewpoints such as cost, the reproducibility of results or the handiness of the laboratory technique. As a result, it was determined that the A method included superiority. Whereas methylation status may be judged using a gene expression profile because the genetic expression is known to be inhibited when the CpG island of the genetic promoter region has methylation. Therefore comprehensive DNA methylation analysis and comprehensive gene expression analysis were conducted in 97 colorectal cancers. As a result, a list of genes which a methylation

level and level of expression correlated with was obtained. The individual genetic functions included in the list of these genes were examined in detail, and it was examined whether methylation status could be diagnosed using an expression profile.

Shin Takahashi and Masanobu Takahashi (Tohoku University) pushed forward four studies of study A: the retrospective analysis study associated with an ongoing prospective clinical trial, study B: the retrospective analysis study associated with a completed prospective clinical trials, study C: new multicenter retrospective observational study, and study D: the retrospective analysis study associated with the prospective clinical trials that completed registration to test a clinical utility. In study A, case registration was completed in the end of December, 2016, and 66 patients in total were enrolled. 51 specimens were collected by March, 2017 and, about 29 cases that enough DNA content of those was obtained, analyzed a genome wide DNA methylation status using Infinium Methylation EPIC Kit (Illumina). In study B, 28 specimens in total were collected and analyzed a genome wide DNA methylation status about 27 specimens that enough DNA content of those was obtained similar to study A. About study C, a study plan of "anti-EGFR antibody effect of treatment prediction of colorectal cancer based on a DNA methylation state and the gene expression status" (retrospective study) was made, and the approval of the Ethics Committee. Tohoku University Graduate School of Medicine was obtained (approval number 2016-1-570). About study D, the specimens of 338 cases were collected and, of these, started the analysis of the genome wide DNA methylation status about 235 cases that enough DNA content was obtained.

About the correspondence for the regulator, Shin Takahashi (Tohoku University) prepared for a document for pre-development consultation in PMDA with support of the Clinical Research, Innovation and Education Center (CRIETO), Tohoku University Hospital.

As business-related association, Chikashi Ishioka, Shin Takahashi, and Kota Ouchi (Tohoku University) negotiated with the person in charge of Company R (a domestic laboratory company) about collaborative investigation four times by the end of 2016 with support of CRIETO and the Tohoku Techno Arch Co., Ltd. As a result, the informal consent of the collaborative investigation contract was obtained. At the end of 2016, concrete contract content is negotiated. Also, we gave a presentation on current results of the research in the 75th Annual Meeting of Japan Cancer Society.

III. 成果の外部への発表

(1) 学会誌・雑誌等における論文一覧（国内誌 0 件、国際誌 2 件）

1. Zhang, X., Shimodaira, H., Soeda, H., Komine, K., Takahashi, H., Ouchi, K., Inoue, M., Takahashi, M., Takahashi, S., Ishioka, C. CpG island methylator phenotype is associated with the efficacy of sequential oxaliplatin- and irinotecan-based chemotherapy and EGFR-related gene mutation in Japanese patients with metastatic colorectal cancer. Int J Clin Oncol. 2016,21,6,1091-1101

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*. 2017,24,2,336-340

(2) 学会・シンポジウム等における口頭・ポスター発表

1. microRNA-193a-3p acts as a tumor suppressor in BRAF-mutated colorectal cancer, Poster, Takahashi, H., Takahashi, M., Takahashi, S., H., S., Ishioka, C. AACR 2016, 2016/4/18, New Orleans, USA. 国外
2. 消化器癌治療の最前線, 口頭, 石岡千加史, がんプロフェッショナルによるがん医療最前線 (仙台) 2016/10/1, 国内
3. 大腸がん治療におけるエピジェネティックバイオマーカー, 口頭, 高橋信, 大内康太, 石岡千加史, 第75回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016/10/6, 国内.
4. DNA methylation status as a biomarker of anti-epidermal growth factor receptor treatment for metastatic colorectal cancer, 口頭, Ouchi, K., Takahashi, S., Yamada, Y., Tsuji, S., Tatsuno, K., Takahashi, H., Takahashi, N., Takahashi, M., Shimodaira, H., Aburatani, H., Ishioka, C., 第75回日本癌学会学術総会 (横浜), 2016/10/8, 国内

(3) 「国民との科学・技術対話社会」に対する取り組み

1. 知っておきたい医学研究と医療の関係, 口頭, 石岡千加史, 宮城県仙台第二高等学校 一日大学 (仙台) 2016/12/8, 国内
2. がん医療の質の向上を目指した病診連携, 口頭, 高橋信, 第6回がん治療病診連携セミナー (仙台) 2016/6/23. 国内
3. 進行がんの抗がん剤治療について. 口頭, 高橋信, デンタル TG 会講演会 (仙台) 2016/11/19. 国内

(4) 特許出願

該当なし。