

血漿 MicroRNA-6826 と 6875 は転移性大腸癌に対するワクチン療法の効果を予測する有用で非侵襲的なバイオマーカーである。

氏名 来嶋 大樹

所属 山口大学大学院 医学系研究科

博士後期課程

応用分子生命科学系専攻

平成 29 年 1 月

目次

1. 要旨	3
2. 背景	3
3. 方法	4
4. 結果	6
5. 考察	7
6. 謝辞	8
7. 参考文献	8
8. 図表	11

1. 要旨

転移性大腸癌に対して様々なワクチン療法が開発され適用されてきた。免疫療法の効果を改善するために効果予測のバイオマーカーが必要とされている。血中の様々な microRNA(miR)が非侵襲的なバイオマーカーとして有用である可能性が報告されている。本研究においては、ワクチン療法の効果に影響する miR をワクチン療法前の症例 13 例の血漿をマイクロアレイで解析しスクリーニングした。スクリーニング結果を検証するためワクチン療法前の 93 例の血漿を用い RT-PCR を行った。miR 発現の網羅的解析結果を用い、Fisher criterion にて 4 つの miR 候補を選定した。検証結果では HLA-A2402 陽性群において血漿 miR6826 発現が高い群は低い群に比べ有意に予後が悪かった。(P=0.048) 一方 HLA2402-A 陰性群では血漿 miR6826 発現の高低による予後の差は認めなかった。(P=0.168) 同様の結果が miR6875 においても得られた。(P=0.029、P=0.754) さらに多変量解析では miR6826 が OS を予測する最も有意な因子となった。(P=0.003、hazard ratio 3.67) 血漿 miR6826 と 6875 はワクチン療法への効果が乏しい群を予測するバイオマーカーになり得ると考えられる。血漿 miR6826 と 6875 の機能や免疫応答との関係性など更なる解析が必要ではあるが、これらはワクチン療法への不応性を予測する有用なバイオマーカーとなり得る。

2. 背景

大腸癌は男性で第 3 位、女性で第 2 位と高い罹患率を認め、世界で毎年 608000 人がなくなっている¹。大腸癌の最も多い死因は遠隔転移である。転移性大腸癌の予後は化学療法や分子標的薬により改善してきているが^{2,3}、まだ十分とは言えない。大腸癌に対してペプチドワクチン療法⁴や樹状細胞療法⁵など様々な免疫療法が開発された。最近では世界で PD-1 抗体が注目されてきている⁶。しかしながら免疫療法の効果を予測する有用なバイオマーカーは腫瘍に浸潤するリンパ球のなかで免疫グロブリン Gκ 鎖の発現によって示される B 細胞などの報告はあるがほとんど確立されたものはない⁷。癌症例での臨床試験で適切な症例選択と評価のため、また癌に対する有効なワクチン療法の開発のためにも免疫療法のバイオマーカーの開発が望まれる^{7,8}。

miR は内在性の 18~24 のヌクレオチドでなる 1 本鎖 RNA であり、標的遺伝子の転写を調節し、様々な細胞内のプロセスに関与する^{9,10}。最近では、免疫応答と miR の関係についていくつか報告がなされている。例えば miR は免疫に関与しており、先天的後天的な免疫応答の重要な調節因子であることが分かってきた¹¹。腫瘍が進行する過程において抗腫瘍免疫の微小環境が強化される中で、miR は抗腫瘍 T 細胞の誘導¹⁴や免疫システムからの認識¹⁵など免疫システムからの監視から逃れるうえで重要な役割を担っている^{12,13}。例えば、ワクチン療法の効果が不十分な群では miR の発現が高くなったり低くなったりしていることで免疫応答を減じている可能性がある。

血漿中の様々な miR が早期大腸癌の発見や再発の予測に有用な非侵襲的バイオマーカーとして報告されている^{16,17}。近年我々の施設で 5 つのエピトープペプチド (3 つは腫瘍関

連腫瘍抗原から、2つは VEGFR 抗体から得られた) を進行大腸癌の患者の治療に適用した第一相試験を行った¹⁸。更に同じワクチンを用い、オキサリプラチンを含む化学療法と併用する第二相試験を行い安全性と CTL の誘導と生存率の改善を評価した¹⁹。これらの試験でワクチン投与後の高い CTL 反応とワクチン注入部の皮膚反応がワクチン療法の効果を予測するバイオマーカーとなり得ることが分かった¹⁸。さらに、好中球/リンパ球比率の低値と血漿中の IL6 の低値²⁰ がワクチン療法の効果を予測するバイオマーカーとなり得ることが分かった¹⁹。また腫瘍中の miR 発現が免疫化学療法の効果予測のために有用であることも報告した²¹。

本研究の目的はワクチン療法の効果を予測する有用なバイオマーカーを探求することである。我々は液性のバイオマーカーを発見するために、第二相試験の転移性大腸癌症例の血漿 miR を検討した。

3. 方法

【第二相試験の概要】

癌ワクチン療法の臨床効果を評価するために、五つの HLA-A2402 拘束ペプチド (RNF43-721²², TOMM34-299²³, KOCI(IMP-3)-508²⁴, VEGFR1-1084²⁵, VEGFR2-169²⁵) を用い HLA の状態を二重盲検とした非無作為試験を行った。第二相試験の詳細なプロトコールは以前に報告した¹⁹。簡潔に述べると、オキサリプラチンを含む化学療法と5種のエピトープペプチドの併用療法である。この試験で使ったペプチドは HLA-A2402 拘束性ペプチドであるが、すべての症例で HLA-A2402 の状態は二重盲検とし、オキサリプラチンを含む化学療法とペプチドカクテル療法を同じレジメで併用した。ペプチドカクテルは5種のペプチドがそれぞれ 3mg 含有し 1.5ml の IFA に混ぜられている。ペプチドカクテルは13週にわたり毎週大腿もしくは腋窩に皮下注射した。その後は2週に1回投与した。

適用基準は20歳以上の進行大腸癌患者で、化学療法の既往がなく、主要臓器機能が保たれており、予後が3か月以上見込まれる症例とした。2009年2月から2012年11月の間に化学療法既往のない96例の結腸癌症例が HLA-A2402 の状態を隠して登録された。

登録された96例のうち93例で miR 解析が可能であった。すべての患者から書面での同意を得ており、試験のプロトコールは倫理委員会の承認を得ている。(H20-102,UMIN000001791)

【症例と血漿】

第二相試験で治療された転移性大腸癌93例 (HLA-A2402 陽性:48例、陰性:45例) で治療前の血漿が miR 解析に利用可能であった。各患者の末梢血が EDTA 採血管に採取された。血液は4°Cで15分遠心した。得られた血漿は使用するまで-80°Cで保存した。

【miR マイクロアレイ】

ワクチン療法の効果に関係する miR をスクリーニングするために、ワクチン療法前の 13 例の転移性大腸癌患者の血漿を用いマイクロアレイにて miR を解析した。13 例は全て HLA-A2402 陽性であり、3 年以上生存が 5 例、生存 2 年未満が 8 例であった。

13 例の血漿から total RNA を抽出し miR のマイクロアレイ解析を行った。Total RNA は 3D-Gene RNA 抽出試薬 (Toray Industries, Inc., Tokyo, Japan) を用いてプロトコールに沿って抽出した。miR 発現の網羅的解析は 3D-gene miRNA Labeling kit と 3D-gene human miRNA oligo Chip (Toray Industries, Inc.) を用い行った。このマイクロアレイは miR Base に登録されている 2555 種の miR を解析できる。各 miR は対応するマイクロアレイのシグナルがシグナル強度の最高値と最低値の 5% に入るものは除外した陰性コントロールの $\text{mean} \pm 2\text{SD}$ 以上で存在すると定義した。miR が存在すると考える場合はシグナル強度の最高値と最低値の 5% に入るものは除外した陰性コントロールの平均シグナル強度がその miR のシグナル強度から減じられた。バックグラウンドを減じた後にシグナルが陰性であった場合はマイクロアレイの中で最も低い値 (\log_2 スケールで -0.1) に置き換えた。異なるマイクロアレイのシグナルを標準化するため、クオンタイル正規化法が行われた。

【ヴァリデーシンのための miR の選定】

Fold change の値と fisher criterion を用い、治療反応群 (OS \geq 3 年) と治療不応群 (OS < 2 年) との間で発現に差のある miR を順位づけた。長期生存群と短期生存群を比較するため、OS が 2 年以上 3 年未満の群は除外した。

【qRT-PCR によるヴァリデーション】

400 μl の血漿から miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen, Tokyo, japan) を用いて total RNA をプロトコールに沿って抽出した。miR191 を内在性コントロールとして用いた^{28,29}。

TaqMan miRNA probes (Applied Biosystems japan Ltd., Tokyo, japan) を用いプロトコールに沿って qRT-PCR を行った。各ステップで血漿 400 μl を用い qRT-PCR にむけ抽出を行った。TaqMan miRNA Reverse Transcription kit (Applied Biosystems) と stem-loop RT primers (hsa-miR-135, hsa-miR-6826, hsa-miR-6835 and hsa-miR-6875, hsa-miR-191) (Applied Biosystems) を用いて total RNA を相補 DNA に逆転写した。RT-PCR は LightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics k.k., Tokyo, japan) を使用した。反応は 95°C 5 分で始め、続いて 95°C 15 秒、60°C 1 分で 40 サイクル行った。すべての反応は duplicate で行った。候補 miR の発現レベルは $\Delta \Delta \text{CT}$ 法を用いて miR191 の発現レベルで標準化し相対値化した。各候補 miR ごとに OS \geq 2 年 (治療反応群) と OS < 2 年 (治療不応群) において CT 値の相対値をプロットした。

【統計解析】

得られた値は $\text{mean} \pm \text{SD}$ で示した。 $\text{mean} \pm 3\text{SD}$ を超える値は各 miR で外れ値として除外

した。治療反応群と不応群の血漿 miR の発現レベルを Scheffe's or Dunnett's test にて比較した。

各 miR につき中央値をカットオフ値とし Kaplan-Meier 法にて生存曲線を作成し、ワクチン療法の効果を評価した。P 値はログランクテストにて計算した。治療反応群と不応群の相対的 Ct 値は T テストで検定し P 値を得た。それぞれの miR に対して HLA-A2402 陽性群陰性群ごとに Kaplan-Meier 法で生存曲線を作成し、ログランクテストで検定した。

コックス比例ハザードモデルとロジスティック回帰分析モデルを用い OS とバイオマーカーあるいは予後に関する臨床情報と治療効果の関係性に対して hazardratio を計算した。統計解析はすべて SPSS Statistics 20.0 (SPSS, Inc, Chicago, IL, USA) を用いた。P < 0.05 を統計学的に有意とした。

4. 結果

【miR マイクロアレイ】

miR 発現のレベルを 3 年以上生存群と 2 年未満生存群とで fisher criterion を用い比較し 10 種の miR 候補を選定した。長期生存群と短期生存群の miR 発現の差が log2 ratio の絶対値が 1.3 以上となった 4 種の miR (miR135a-3p, 6875-5p, 6835-5p, 6826-5p) を最終的に候補として選定した。(table1)

【ヴァリデーション】

ヴァリデーションでは治療反応群を OS \geq 2 年、治療不応群を OS < 2 年と定義した。miR6826 の発現は治療不応群で治療反応群に比べ有意に高かった。(P = 0.002, Fig. 1A) ワクチン療法の効果を検討するために HLA 毎に検討した。miR6826 の発現は HLA-A2402 陽性群では治療不応群において治療反応群に比べ有意に高かった。(P = 0.003, Fig. 1B) 一方 HLA-A2402 陰性群では治療反応群と不応群の間で miR6826 発現に差は認めなかった。(Fig. 1C) この結果より miR6826 の高発現はワクチン療法への不応性を示唆すると考えられた。

各 miR の Ct 値の中央値を高低を規定するカットオフ値として用いた。HLA-A2402 陽性群 miR6826 の発現が低い群は高い群に比べて OS が長かった。(P = 0.048, Fig2A) 一方 HLA-A2402 陰性群では miR6826 発現の高値群と低値群で OS に差はなかった。(Fig, 2B) この結果より miR6826 はワクチン療法の効果を予測する有用なバイオマーカーになり得ると考えられた。

miR6877 と 135 の発現に関しては 2 年以上生存群と 2 年未満生存群で差を認めなかった。(Fig. 3, 4) しかしながら、HLA-A2402 陽性群では miR6875 発現が低い群は高い群に比べ OS が長かった。(P = 0.029, Fig. 5A) さらに HLA-A2402 陰性群においては miR6875 の発現が高い群と低い群で OS に差がなかった。(Fig. 5B) よって、miR6875 もワクチン療法の効果を予測する有用なバイオマーカーとなり得ると考えられた。

miR135 の発現については HLA-A2402 陽性群、陰性群いずれにおいても有意な差を認めなかった。(Fig. 6)血漿 miR6826 と 6875 の発現高値は化学療法併用ワクチン療法だけではなくワクチン療法そのものに対しての不应性を示していると考えられる。

血漿 miR6835 の Ct 値は 55 サイクル以上であっても測定不能であり、血漿の miR6835 の量が極めて少量であると考えられる。

ワクチン療法のバイオマーカーを探求するために、miR 発現のレベルと同様に免疫に関するパラメーター、腫瘍因子についてもコックス比例ハザードモデルとロジスティック回帰分析を用い検討した。コックス回帰モデルの多変量解析では miR6826 の発現が OS に関する最も有意な因子であった。(P=0.003, HR, 3.67) (Table II) さらに HLA2402 陽性群では長期の OS を予測するにあたって miR6826 の感度は 100%であり、陰性的中率も 100%であった。(Table III)

5. 考察

多くの新規のワクチン療法 (whole tumor cell ワクチン、ペプチドワクチン³⁰、ウイルスベクターワクチン、樹状細胞ワクチン) が開発されてきた。しかしながら免疫療法の効果を予測する有用なバイオマーカーはまだ見つかっていない⁷。免疫療法の臨床試験では免疫学的あるいは他のバイオマーカーはほとんど使われていない。

知りうる限りでは、本試験はワクチン療法の効果を予測するため採血検査によって血漿 miR を測定した最初の試験である。まずワクチン療法の効果を予測するバイオマーカーを網羅的解析の結果から 4 種選定し、93 例の血漿 miR を qPCR することによって検証した。

ワクチン療法群では血漿 miR6826 と 6875 の発現が高い群で有意に予後が悪かった。従って血漿 miR6826 と 6875 の高発現はワクチン療法への不应性を示唆するバイオマーカーになると考えられた。さらに miR6826 発現は多変量解析の結果、免疫学的因子、腫瘍因子、miR 発現レベルのなかで最も OS に寄与する因子であった。miR6826 の陰性的中率が 100%であることを考慮すると、次回の免疫療法の臨床試験では miR6826 高発現は免疫療法の適応除外基準となり得る。

以上の結果から miR6826 と 6875 の高発現は免疫抑制に関わっている可能性があり、免疫抑制因子を調節する新規の標的分子と関わっている可能性がある。miR6826 は膵胆道癌症例の血清で高発現しており膵胆道癌の診断的バイオマーカーになるとの報告が最近なされている³¹。また miR6875 は他の 4 種の miR と組み合わせることにより早期乳がんの診断バイオマーカーとなることが報告されている³²。しかしながら、miR6826 と 6875 の免疫システム上の役割についてはまだ報告されておらず、miRbase でも標的となる mRNA は記載されていない。miR は T 細胞と B 細胞の産生と活性化をコントロールことによって先天的な免疫に関係している。miR 発現レベルのダイナミックな変化は抗原提示 T 細胞の分化に関する遺伝子発現の調整に重要である可能性がある。

このような免疫抑制系の miR として miR155 は Treg と骨髄性抑制細胞^{33,34}を増加させる

ことによって宿主の免疫システムから癌細胞を守ることが報告されている¹¹。腫瘍微小環境中のPD-L1, PD-1の高発現とIDOの増加もまたCTLの機能を阻害することが明らかにされた³⁵。近年これらの免疫逃避機構を克服しようと様々な試みがなされてきた^{36,37}。次世代の免疫療法を成功させるためには、ペプチドワクチンに免疫抑制に傾いている腫瘍微小環境を改善する物質を組み合わせなければならない。

miR6826 と 6875 の発現レベルはワクチン療法への不応性をもつ患者を評価し見分けるバイオマーカーとなり得ると考える。miR6826 と 6875 の機能や免疫系のどの分子に関与しているかについてさらに探求しなければならないが、これらの miR は免疫抑制因子の効果を妨げる標的になり得る。

6. 謝辞

本研究は Development of Innovative Research on Cancer Therapeutics (P-Direct), The Japan Agency for Medical Research and Development (AMED) の研究プログラムとして行われた。本研究は Forte Science Communications (Tokyo, Japan) で英文校正された。

7. 参考文献

1. Siegel R, Ma J, Zou Z and Jemal A: Cancer statistics, 2014. *CA Cancer J Clin* 64: 9-29, 2014.
2. Williet N, Fovet M and Phelip JM: Management of metastatic colorectal cancer. *Rev Prat* 65: 793-797, 2015 (In French).
3. Ciombor KK, Wu C and Goldberg RM: Recent therapeutic advances in the treatment of colorectal cancer. *Annu Rev Med* 66: 83-95, 2015.
4. Kibe S, Yutani S, Motoyama S, Nomura T, Tanaka N, Kawahara A, Yamaguchi T, Matsueda S, Komatsu N, Miura M, et al: Phase II study of personalized peptide vaccination for previously treated advanced colorectal cancer. *Cancer Immunol Res* 2: 1154-1162, 2014.
5. Hunyadi J, András C, Szabó I, Szántó J, Szluha K, Sipka S, Kovács P, Kiss A, Szegedi G, Altörjay I, et al: Autologous dendritic cell based adoptive immunotherapy of patients with colorectal cancer-A phase I-II study. *Pathol Oncol Res* 20: 357-365, 2014.
6. Diaz LA Jr and Le DT: PD-1 Blockade in tumors with mismatch-repair deficiency. *N Engl J Med* 373: 1979, 2015.
7. Copier J, Whelan M and Dalglish A: Biomarkers for the development of cancer vaccines: current status. *Mol Diagn Ther* 10: 337-343, 2006.
8. Whiteside TL: Immune responses to cancer: Are they potential biomarkers of prognosis? *Front Oncol* 3: 107, 2013.

9. Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W and Tuschl T: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* 294: 853–858, 2001.
10. Lee RC and Ambros V: An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* 294: 862–864, 2001.
11. Facciabene A, Motz gT and Coukos g: T-regulatory cells: key players in tumor immune escape and angiogenesis. *Cancer Res* 72: 2162–2171, 2012.
12. ueda R, kohanbash g, Sasaki k, Fujita M, zhu X, kastenhuber eR, McDonald hA, Potter DM, hamilton RL, Lotze MT, et al: dicer-regulated microRNAs 222 and 339 promote resistance of cancer cells to cytotoxic T-lymphocytes by down-regulation of ICAM-1. *Proc Natl Acad Sci uSA* 106: 10746–10751, 2009.
13. Sonda N, Simonato F, Peranzoni e, Cali B, Bortoluzzi S, Bisognin A, Wang e, Marincola FM, Naldini L, gentner B, et al: miR-142-3p prevents macrophage differentiation during cancer-induced myelopoiesis. *Immunity* 38: 1236–1249, 2013.
14. Trifari S, Pipkin Me, Bandukwala hS, Äijö T, Bassein j, Chen R, Martinez gj and Rao A: MicroRNA-directed program of cytotoxic CD8⁺ T-cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci uSA* 110: 18608–18613, 2013.
15. Min D, Lv XB, Wang X, zhang B, Meng W, yu F and hu h: Downregulation of miR-302c and miR-520c by 1,25(OH)₂D₃ treatment enhances the susceptibility of tumour cells to natural killer cell-mediated cytotoxicity. *Br j Cancer* 109: 723–730, 2013.
16. huang z, huang D, Ni S, Peng z, Sheng W and Du X: Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer* 127: 118–126, 2010.
17. Yuan d, Li k, Zhu k, Yan R and dang C: Plasma miR-183 predicts recurrence and prognosis in patients with colorectal cancer. *Cancer Biol Ther* 16: 268–275, 2015.
18. hazama S, Nakamura y, Takenouchi h, Suzuki N, Tsunedomi R, Inoue y, Tokuhisa y, Iizuka N, yoshino S, Takeda k, et al: A phase I study of combination vaccine treatment of five therapeutic epitope-peptides for metastatic colorectal cancer; safety, immunological response, and clinical outcome. *j Transl Med* 12: 63, 2014.
19. hazama S, Nakamura y, Tanaka h, hirakawa k, Tahara k, Shimizu R, ozasa h, etoh R, Sugiura F, okuno k, et al: A phase II study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *j Transl Med* 12: 108, 2014.
20. hazama S, Takenouchi h, Tsunedomi R, Iida M, Suzuki N, Iizuka N, Inoue y, Sakamoto k, Nakao M, Shindo y, et al: Predictive biomarkers for the outcome of vaccination of five therapeutic epitope peptides for colorectal cancer. *Anticancer Res* 34: 4201–4205, 2014.

21. Shindo y, hazama S, Nakamura y, Inoue y, kanekiyo S, Suzuki N, Takenouchi h, Tsunedomi R, Nakajima M, ueno T, et al: miR-196b, miR-378a and miR-486 are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment in colorectal cancer. *oncol Lett* (In Press).
22. uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa y, Nakamura y and Tahara H: Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clin Cancer Res* 10: 8577-8586, 2004.
23. Shimokawa T, Matsushima S, Tsunoda T, Tahara h, Nakamura y and Furukawa y: Identification of ToMM34, which shows elevated expression in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *Int J Oncol* 29: 381-386, 2006.
24. Suda T, Tsunoda T, Daigo y, Nakamura y and Tahara h: Identification of human leukocyte antigen-A24-restricted epitope peptides derived from gene products upregulated in lung and esophageal cancers as novel targets for immunotherapy. *Cancer Sci* 98: 1803-1808, 2007.
25. Ishizaki h, Tsunoda T, Wada S, yamauchi M, Shibuya M and Tahara H: Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. *Clin Cancer Res* 12: 5841-5849, 2006.
26. Wada S, Tsunoda T, Baba T, Primus Fj, kuwano h, Shibuya M and Tahara h: Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer Res* 65: 4939-4946, 2005.
27. Smyth gk: limma: Linear models for microarray data. In: *Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor: Statistics for Biology and health*. gentleman R, Carey V, Dudoit S, Irizarry R and huber W (eds). Springer, New york, pp397-420, 2005.
28. hu z, Dong j, Wang Le, Ma h, Liu j, zhao y, Tang j, Chen X, dai J, Wei Q, et al: Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis* 33: 828-834, 2012.
29. zheng g, Wang h, zhang X, yang y, Wang L, Du L, Li W, Li j, Qu A, Liu Y, et al: Identification and validation of reference genes for qPCR detection of serum microRNAs in colorectal adenocarcinoma patients. *PLoS one* 8: e83025, 2013.
30. Boon T and van der Bruggen P: human tumor antigens recognized by T lymphocytes. *j exp Med* 183: 725-729, 1996.
31. kojima M, Sudo h, kawauchi j, Takizawa S, kondou S, Nobumasa h and ochiai A: MicroRNA markers for the diagnosis of pancreatic and biliary-tract cancers. *PLoS*

one 10: e0118220, 2015.

32. Shimomura A, Shiino S, kawauchi j, Takizawa S, Sakamoto h, Matsuzaki j, ono M, Takeshita F, Niida S, Shimizu C, et al: Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci* 107: 326–334, 2016.
33. Chen S, Wang L, Fan J, Ye C, dominguez d, Zhang Y, Curiel TJ, Fang D, kuzel TM and zhang B: host miR155 promotes tumor growth through a myeloid-derived suppressor cell-dependent mechanism. *Cancer Res* 75: 519–531, 2015.
34. zheng y, josefowicz Sz, kas A, Chu TT, gavin MA and Rudensky Ay: genome-wide analysis of Foxp3 target genes in developing and mature regulatory T cells. *Nature* 445: 936–940, 2007.
35. gajewski TF, Schreiber h and Fu yX: Innate and adaptive immune cells in the tumor microenvironment. *Nat Immunol* 14: 1014–1022, 2013.
36. okazaki T, Tanaka y, Nishio R, Mitsuiye T, Mizoguchi A, Wang j, Ishida M, hiai h, Matsumori A, Minato N, et al: Autoantibodies against cardiac troponin I are responsible for dilated cardiomyopathy in PD-1-deficient mice. *Nat Med* 9: 1477–1483, 2003.
37. Pardoll DM: The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 12: 252–264, 2012.

8. 图表

Table I. Selection of the microRNA from the result of the comprehensive analysis of the microarray.

microRNA name	OS ≥3 years (n=5)		OS <2 years (n=8)		Log2 ratio	Fisher ratio
	Mean	SD	Mean	SD		
miR-135a-3p	148.0	131.5	49.7	39.5	1.6	1.02
miR-6875-5p	451.4	431.7	184.3	213.9	1.3	0.61
miR-6798-5p	505.0	309.5	295.6	260.7	0.8	0.59
miR-1233-5p	1,477.7	1,062.1	3,007	2,600.6	1.0	0.57
miR-6124	137.9	102.4	257.7	238.6	0.9	0.57
miR-1275	97.2	67.0	199.4	192.8	1.0	0.54
miR-1229-5p	126.2	85.3	244.3	234.8	1.0	0.50
miR-197-5p	41.1	26.2	90.6	101.9	1.1	0.45
miR-6826-5p	145.3	130.3	425.9	510.7	1.6	0.44
miR-6835-5p	70.9	77.4	253.5	332.6	1.8	0.43

Bold indicates the four mRNAs whose expression difference according to the absolute value of the log2 ratio was >1.30 between the long-term survivor and the short-term survivor. OS, overall survival; SD, standard deviation.

Table II. Univariate and multivariate analyses of the associations between clinical data and overall survival.

Factor	Cut-off	Univariate analysis				Multivariate analysis			
		HR	95% CI		P-value	HR	95% CI		P-value
			Lower	Upper			Lower	Upper	
CRP	>1	1.302	0.635	2.673	0.471				
NLR	>3	1.714	0.882	3.332	0.112				
CEA	>100	1.149	0.578	2.284	0.692				
CA19-9	>100	1.001	0.496	2.020	0.999				
No. of involved organs	Two or more	1.706	0.855	3.406	0.130	2.173	1.030	4.584	0.042
Relative expression of miR-6826	>1.00 (mean value)	3.510	1.551	7.942	0.003	3.670	1.569	8.581	0.003
Relative expression of miR-6875	>0.016 (mean value)	1.389	0.652	2.961	0.395				

CRP, C-reactive protein; NLR, neutrophil/lymphocyte ratio; CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9; CI, confidence interval. HR, hazard ratio.

Table III. Expression of miR-6826 and overall survival.

Parameters	Overall survival	
	≥2 Years	<2 Years
Relative expression of miR-6826		
<1.0	19	16
≥1.0	0	11
Sensitivity	19/19 (100%)	
Specificity	11/27 (40.7%)	
Positive predictive value	19/35 (54.3%)	
Negative predictive value	11/11 (100%)	

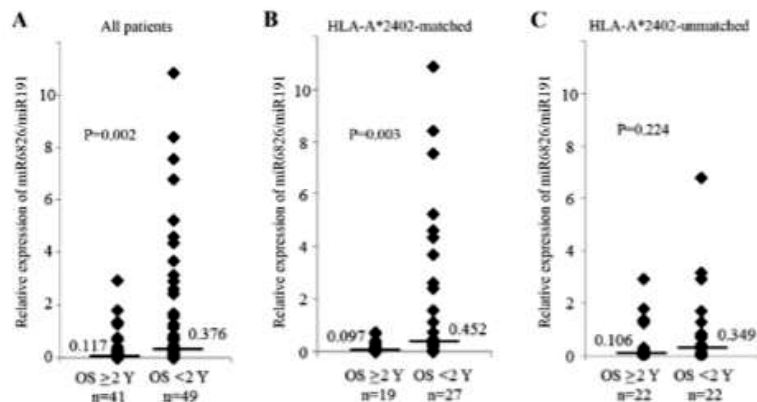


Figure 1. miR-6826 expression in the plasma of responders and non-responders according to overall survival. (A) The expression of miR-6826 was significantly ($P=0.002$) higher in the non-responders than that in the responders ($n=90$). (B) The HLA-A*2402-matched group ($n=46$). The expression of miR-6826 was significantly higher in the non-responders than that in the responders ($P=0.003$). (C) The HLA-A*2402-unmatched group ($n=44$). There was no significant difference in the expression of miR-6826 between the non-responders and the responders. Bars indicate the median values of each group. OS, overall survival; Y, years.

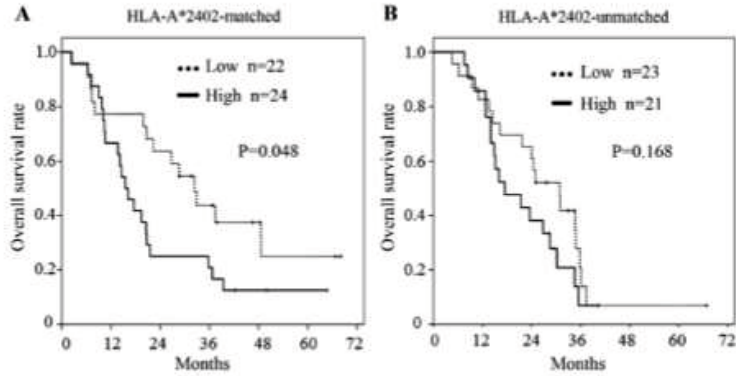


Figure 2. OS according to the expression of miR-6826. (A) The HLA-A*2402-matched group. Patients with a lower miR-6826 expression had a longer OS than those with a higher miR-6826 expression ($P=0.048$). (B) The HLA-A*2402-unmatched group. There was no significant difference in the OS of patients with a high or low level of miR-6826 expression. OS, overall survival.

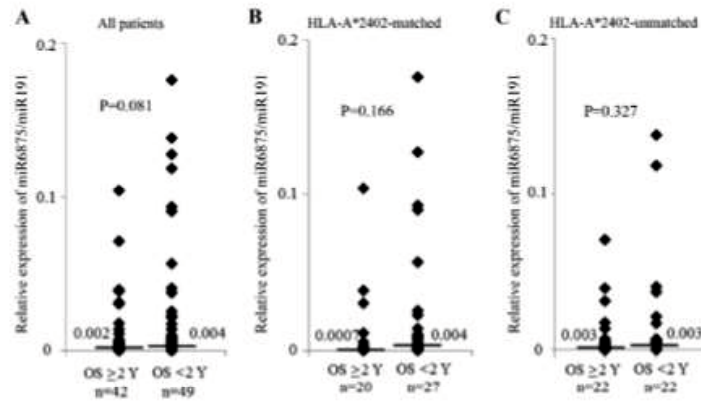


Figure 3. miR-6875 expression in the plasma of responders and non-responders according to overall survival. (A) There was no significant difference between the responders and non-responders ($n=91$). (B) The HLA-A*2402-matched group ($n=46$). There was no significant difference between the responders and non-responders. (C) The HLA-A*2402-unmatched group ($n=44$). There was no significant difference between the responders and non-responders. Bars indicate the median values of each group. OS, overall survival; Y, years.

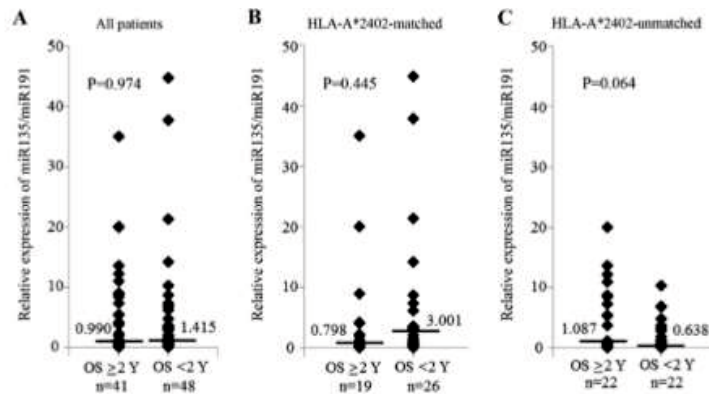


Figure 4. miR-135 expression in the plasma of responders and non-responders according to overall survival. (A) There was no significant difference between the responders and non-responders ($n=89$). (B) The HLA-A*2402-matched group ($n=45$). There was no significant difference between the responders and non-responders. (C) The HLA-A*2402-unmatched group ($n=44$). There was no significant difference between the responders and non-responders. Bars indicate the median values of each group. OS, overall survival; Y, years.

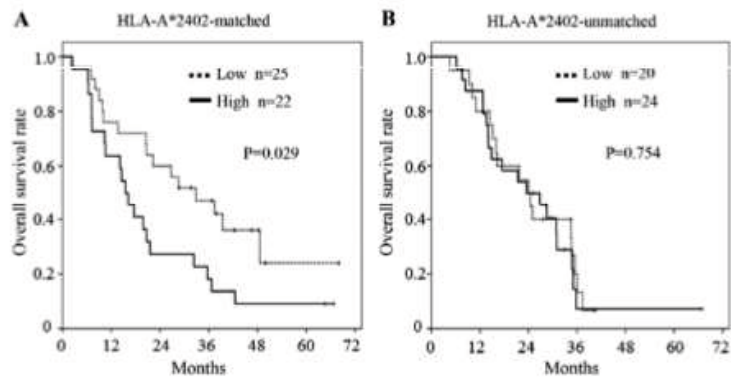


Figure 5. OS curves according to the expression of miR-6875. (A) The HLA-A*2402-matched group. Patients with a lower miR-6875 expression had a longer OS than those with a higher miR-6826 expression ($P=0.029$). (B) The HLA-A*2402-unmatched group. There was no significant difference in OS between patients with a high or low level of miR-6875 expression. OS, overall survival.

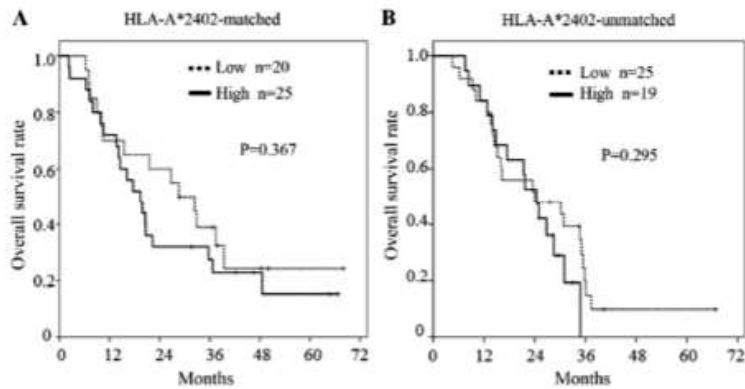


Figure 6. OS curves according to the expression of miR-135. (A) The HLA-A*2402-matched group. There was no significant difference in OS between patients with a high or low level of miR-135 expression. (B) The HLA-A*2402-unmatched group. There was no significant difference in OS. OS, overall survival.