

miR-125b-1 と miR-378a は  
大腸癌ワクチン療法の  
効果予測バイオマーカーである。

氏名 田中 宏典

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 12 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	12

## 1.要旨

大腸癌標準治療では効果が十分とは言えないため、作用機序の異なる免疫療法の開発が進められている。我々はすでに進行再発大腸癌に対して HLA-A\* 2402 拘束性ペプチドワクチンを用いた第 I 相試験、次いで化学療法と併用した第 II 相試験を行った。HLA-A\*2402 適合群と不適合群で全生存期間 (OS) に差を認めなかったが、免疫療法の効果には個人差があり、治療前に効果を適切に予測できるバイオマーカーの開発が重要である。今回、ペプチドワクチン療法前の大腸癌組織における microRNA (miRNA) 発現を解析し、効果予測に関する検討を行った。第 I 相試験および第 II 相試験の治療前の大腸癌組織 (凍結組織) から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析を行った。レスポンドと非レスポンドで発現に差を認めた 6 つの miRNA が抽出された。次に、第 II 相試験の治療前の大腸癌組織 (FFPE 組織) 68 検体から、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法を用いて癌細胞と間質細胞を分離して採取し、qRT-PCR 法にて 6 つの miRNA を発現解析した。各 miRNA の発現量の高低で二群に分け、生存分析を行ったところ、癌細胞における miR-125b-1 発現 ( $P=0.040$ )、癌細胞 ( $P=0.009$ ) および間質細胞 ( $P<0.001$ ) における miR-378a 発現の 3 つが効果予測因子であった。HLA-A \* 2402 適合群でのみ OS と負に相関し、HLA-A \* 2402 不適合群では相関しなかった。多変量解析では、間質細胞における miR-378a の発現は独立した予測因子であった。大腸癌組織における miR-125b-1、miR-378a の発現は、大腸癌ペプチドワクチン療法の効果予測のネガティブバイオマーカーとなり得る。miR-378a-3p、miR-125b-1-3p は免疫抑制因子として働く可能性があり、新たな治療標的の同定につながると考えられた。

## 2.背景

大腸癌は、世界で最も頻度の高いがんのひとつで、男性第 3 位、女性第 2 位と高い罹患率を認め、2012 年には推定 140 万人が発症し、693,900 人が死亡している<sup>1)</sup>。過去 10 年間の化学療法と抗体治療の進歩により予後は改善しつつあるが、まだ十分とは言えない。進行再発大腸癌に対する免疫療法は、免疫応答を活性化することによって、生存期間の延長が期待される治療である<sup>2)</sup>。癌ワクチンの一種であるペプチドワクチンは、腫瘍関連抗原由来ペプチドを用いて腫瘍特異的 T 細胞を誘導する。ペプチドワクチンを使用した多くのフェーズ I および II の臨床試験が実施されているが、その臨床効果は限定的である<sup>3),4)</sup>。われわれは、すでに 5 つのエピトープペプチドを進行再発大腸癌患者に投与した第 I 相および第 II 相試験を報告した<sup>5),6)</sup>。しかし、エピトープペプチドを用いた能動免疫療法では、宿主の免疫機能が保たれている必要がある。したがって、良好に免疫応答が得られる可能性が高い患者を選択するために、効果予測バイオマーカーを同定し、効果的に細胞傷害性 T 細胞 (CTL) を誘導することが望ましい。

マイクロ RNA (miRNA) は、転写後レベルで遺伝子発現を調節する 18~25 ヌクレオチ

ドからなる 1 本鎖 RNA である<sup>7)</sup>。miRNA は大腸癌において、腫瘍の発生や進展などのプロセスの調節因子として働く一方、免疫応答の重要な調節因子でもある<sup>8)</sup>。免疫系における miRNA の異常発現または機能不全は、がんが大きく関与している。例えば、p53 は非小細胞肺癌において miR-34 を介して PD-L1 を阻害し、免疫応答を調節する<sup>9)</sup>。また、miR-20b、-21 および-130b は、進行再発大腸癌において高発現され、PD-L1 の過剰発現を招く<sup>10)</sup>。さらに、いくつかの miRNA は、免疫療法の有望なバイオマーカーとして報告されている<sup>11)-13)</sup>。

がん組織は、がん細胞と間質細胞からなり、間質細胞は炎症細胞、免疫担当細胞、内皮細胞および繊維芽細胞で構成される。がん間質は、miRNA を介してがん細胞と相互作用し、がん細胞のニッチを形成する<sup>14)</sup>。Yao Q らの研究では、がん間質における miR-21 は、繊維芽細胞から筋線維芽細胞への分化に関与することが知られている<sup>15)</sup>。

本研究の目的は、治療前に免疫療法の効果を予測すべく、バイオマーカーとして miRNA を探索することである。われわれは、以前 3 つの miRNA が有用なバイオマーカーとなり得ると報告した<sup>16)</sup>。さらに、本研究ではその局在を明らかにするために、レーザーキャプチャーマイクロダイセクション (LCM) 法を使用し、癌細胞と間質細胞を分離して検討した。miRNA マイクロアレイ解析および qRT-PCR の結果を示し、miR-125b-1 および miR-378a の大腸癌ワクチン療法の効果予測バイオマーカーとしての有用性を検討する。

### 3.方法

#### 【第 I 相試験の概要】

対象は、1) 組織学的に大腸癌であることが確認され、2) 標準治療不応で、3) ヒト白血球抗原 (HLA) -A \* 2402 アレルを有する進行再発大腸癌患者とした。HLA-A \* 2402 拘束性 CTL によって認識される、RNF43-721<sup>17)</sup>、TOMM34-299<sup>18)</sup>、KOC1 (IMP-3) -508<sup>19)</sup>、VEGFR1-1084<sup>20)</sup> および VEGFR2-169<sup>21)</sup> の 5 種類のペプチドを投与した。3 patient cohorts にて各ペプチドを 0.5mg、1mg、3mg と用量増加を実施した。ペプチドは、1, 8, 15 および 22 日目に太腿または腋窩の皮下に投与した。推奨用量は 3.0mg に決定され、続いて 5 種類のペプチドカクテルの注射を行った。3.0mg のペプチドカクテルが 6 人の患者に投与された。試験に登録された 18 人の HLA-A \* 2402 適合患者のうち、8 つの大腸癌組織が miRNA マイクロアレイ解析に使用された。

#### 【第 II 相試験の概要】

大腸癌ワクチンの臨床効果を評価するために、HLA の状態を二重盲検とした非無作為化試験を実施した。簡潔に述べると、オキサリプラチンを含む 1 次化学療法に 5 種のエピトープペプチドを上乗せした第 II 相試験である。各 3mg の 5 種類のペプチドカクテルを、不完全フロイントアジュバント 1.5ml と混合し、13 週間まで毎週太腿または腋窩に皮下投与し、14 週間後からは隔週投与した。対象は、組織学的に大腸癌であることが確認された、

20歳以上の進行再発大腸癌患者で、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、96人の患者が登録された。96人の患者の中で、26の大腸癌組織がmiRNAマイクロアレイ解析に、68の大腸癌組織がqRT-PCR解析に使用された。

#### 【材料】

第I相試験では、治療前に18人の患者から8つの大腸癌原発巣組織が手術により得られた。組織は液体窒素中で急速冷凍し-80℃で保存した。第II相試験では、96人の患者から同様に26の大腸癌原発巣組織を凍結組織として得られ、うち16検体はHLA-A\*2402適合群、10検体はHLA-A\*2402不適合群の検体であった。また、68の大腸癌原発巣組織をホルマリン固定パラフィン包埋（FFPE）組織として保存し、HLA-A\*2402適合群およびHLA-A\*2402不適合群はそれぞれから34検体ずつであった。この研究は、山口大学医学部附属病院および関連病院で実施され、治療前に書面による同意がすべての患者で得られた。山口大学の倫理審査委員会によって承認され（H20-102、UMIN000001791）、ヘルシンキ宣言に従って実施された。

#### 【miR マイクロアレイ解析】

mirVana™ miRNA Isolation Kit（Life Technologies）を用い、凍結組織からtotal RNA（tRNA）を抽出した。分光光度計を使用してtRNAの濃度および純度を評価し、Agilent RNA 6000 Nano Kit（Agilent Technologies）を用いてRNA integrityを検証した。miRCURY LNA™ microRNA Array 6th generation（Exiqon）およびGenePix®4000B（Molecular Devices）を使用して、miRNAアレイ解析を行った。ハイブリダイゼーションシグナルの相対強度は、Microarray Data Analysis Tool Ver3.2（Filgen）を用いて評価した。

#### 【レーザーキャプチャーマイクロダイセクション】

FFPE組織を厚さ15μmに薄片し、ヘマトキシリンおよびエオジン（H&E）染色した<sup>22）</sup>。LCMはLMDシステムLMD6000（Leica Microsystems）を用いて行い、1つの大腸癌組織から少なくとも30mm<sup>2</sup>の癌細胞および45mm<sup>2</sup>の間質細胞が採取された。

#### 【qRT-PCR】

QIAGEN miRNeasy FFPE Kit（QIAGEN）を用いて、tRNAを抽出した。癌細胞および間質細胞におけるmiRNAの発現を、TaqMan® MicroRNA Assays（Life Technologies）を用いてqRT-PCR解析した。まず、TaqMan miRNA Reverse Transcription kit（Applied Biosystems）とstem-loop RT primers（hsa-miR-125b-1, hsa-miR-224, hsa-miR-486, hsa-miR-147b, hsa-miR-196b, rno-miR-422b, RNU6B）（Life Technologies）を用いてtRNA

を相補的 DNA に逆転写した。qRT-PCR は LightCycler® 480 System II (Roche Diagnostics k.k.) を使用し、duplicate とした。インキュベートは 95°C 10 分間、次いで 95°C 15 秒間、60°C 60 秒間で 55 サイクル行った。SDS software v1.3.1 (Life Technologies) を用いてデータを分析した。

#### 【*In situ* hybridization (ISH)】

Discovery ULTRA automated ISH instrument (Ventana Medical Systems) を用いて、厚さ 5µm の FFPE 組織に ISH を行った。プローブは、5' ジゴキシゲニン (DIG) 標識 ISH LNAs (miRCURY-LNA detection probes; Exiqon) を使用した。プロテイナーゼ K で処理した後、スライドをプローブと 52°C で 8 時間ハイブリダイズさせた。ジゴキシゲニンは、ポリクローナル抗 DIG 抗体およびアルカリホスファターゼ結合二次抗体 (Ventana Medical Systems) を用いて検出した。BlueMap NBT/BCIP substrate kit (Ventana Medical Systems) を用いてシグナルを検出した。

#### 【統計解析】

マイクロアレイ解析では、正規化したデータの log<sub>2</sub> 変換によりシグナルを計算し、fold-change および Fisher index にて発現に差のある miRNA を同定した<sup>23)</sup>。qRT-PCR の相対量は、内在性コントロールである RNU6B で正規化した後、2- $\Delta\Delta$ CT 法を用いて検出した<sup>24)</sup>。群間の差は、Mann-Whitney U 検定を用いて検定した。カットオフ値は各 ROC 分析の Youden's index を用いて決定した。生存曲線を Kaplan-Meier 法および log-rank 検定によって分析し、Cox の比例ハザードモデルを用いてハザード比 (HR) および 95% 信頼区間 (CI) を分析した。統計分析は JMP V11 (SAS Institute Inc.) を用い、P < 0.05 を統計的有意差とした。

## 4. 結果

#### 【効果予測バイオマーカーとなり得る候補 miRNA の抽出】

第 I 相試験に登録された患者の 8 つの凍結組織を用いて、1425 個の miRNA の発現プロファイルについてマイクロアレイ解析を行った。患者をレスポonder と非レスポonder の 2 つのグループに分類した。レスポonder は、1) 無増悪生存期間が 150 日を超える、または 2) 追加の化学療法なしに OS が 300 日を超える患者と定義した。非レスポonder は、1) 90 日未満の無増悪生存期間、かつ 2) OS が 200 日より短い患者と定義した。続いて、2 つのグループ間で発現量が異なる上位 30 の miRNA を抽出した (Table S1)。次に、第 II 相試験の 26 の凍結組織を miRNA マイクロアレイ解析した。30 の候補 miRNA の発現量および臨床転帰との関連性を検討した。6 つの miRNA の発現量は、HLA-A \* 2402 適合群でのみ、有意に予後と関連し、HLA-A \* 2402 不適合群においては予後に差はなかった。これらの 6 つの miRNA は、ワクチン療法の効果予測バイオマーカーである可能性が示された

(Table 1)。

#### 【候補 miRNA の発現と臨床転帰との関連性の検証】

第 II 相試験の 68 の FFPE 組織において、これら 6 つの miRNA の発現を qRT-PCR 解析した。FFPE 組織を LCM 法により癌細胞と間質細胞に分離し、それぞれで miRNA 発現量と臨床転帰との関連性を検討した。68 人の患者の背景を Table 2 に示す。HLA-A \* 2402 適合群と HLA-A \* 2402 不適合群との間に差は認めなかった。両群において、各 miRNA の発現量の高低で二群に分け、生存分析を行った (Table 3)。癌細胞における miR-125b-1 発現 ( $P = 0.040$ )、癌細胞 ( $P = 0.009$ ) および間質細胞 ( $P < 0.001$ ) における miR-378a 発現の 3 つが効果予測因子であった。HLA-A \* 2402 適合群でのみ OS と負に相関し、HLA-A \* 2402 不適合群では相関しなかった。miR-125b-1 と miR-378a の高発現群および低発現群の生存曲線を Fig. 1 に、単変量および多変量解析の結果を Table 4 に示す。癌細胞 (HR, 2.853; 95%CI 1.281-6.788;  $P = 0.010$ ) および間質細胞 (HR, 3.984; 95%CI 1.661-9.243;  $P = 0.003$ ) における miR-378a の発現は、OS と有意に相関していた。間質細胞における miR-378a の発現は、多変量解析により OS の独立した予測因子であった (HR, 2.730; 95%CI, 1.027-7.585;  $P = 0.044$ )。

#### 【腫瘍組織における miR-125b-1 および miR-378a の局在】

組織における miR-125b-1 および miR-378a の局在の同定のために、予後不良の患者の組織切片を用いて ISH を行った。miR-125b-1 は、癌細胞および間質細胞の双方で高度の発現を認めた (Fig. 2A)。間質細胞では、線維芽細胞 (Fig. 2B) および単核細胞 (Fig. 2C) で強い miR-125b-1 のシグナルを検出した。miR-378a のシグナルは微弱ではあった (Fig. 2F)。

## 5. 考察

本研究により、miR-125b-1 および miR-378a が、大腸癌ワクチン療法の効果を予測するネガティブバイオマーカーであることが示された。われわれは以前、miRNA マイクロアレイ解析で、miR-196b、miR-378a、および miR-486 が効果予測バイオマーカーとなり得ることを示したが、サンプルサイズは小さく、これらの miRNA の局在は不明であった。本研究では、サンプル数を増やし LCM を用いて癌細胞と間質細胞を分離した。さらに、miRNA の局在同定のために ISH を行った。

まず、癌細胞における miR-125b-1 高発現が、HLA 適合患者の予後不良と有意に相関していることが示された。すでに、miR-125b は免疫機構において様々な役割を果たしていることが知られている<sup>25)</sup>。miR-125b の過剰発現は、好酸球性慢性副鼻腔炎の気道上皮細胞における I 型 IFN 発現を促進する<sup>26)</sup>。また、miR-125b は、新生児単球における TNF- $\alpha$  発現を抑制し、LPS に応答する適切な TNF- $\alpha$  産生を阻害する<sup>27)</sup>。癌細胞における miR-125b-1

の発現は間質細胞 (Fig. 1A, 1B) よりも重要と考えられるが、間質細胞でも強いシグナルが観察された (Fig. 2B, 2C)。miR-125b-1 は、癌細胞または間質細胞から産生され、両細胞間でのクロストークにより、免疫抑制因子として働く可能性があると考えられた。次に、癌細胞および間質細胞における miR-378a 高発現が、HLA 適合患者の予後不良と有意に相関していることが示された。miR-378a はヒト NK 細胞の細胞傷害活性を阻害することが報告されており<sup>28)</sup>、miR-125b-1 と同様に、miR-378a は免疫抑制因子として作用する可能性がある。しかしながら、ISH におけるシグナルは微弱であり、ISH プローブの親和性に問題があるのかもしれない。

免疫療法と miR-125b-1 および miR-378a との関連は明らかでなく、標的遺伝子を同定することは非常に重要である。われわれは、第 II 相試験の 22 の大腸癌組織を用いて RNA シークエンシングを行い、Ingenuity Pathways Analysis ソフトウェアを用いてパスウェイ解析した。その結果、miR-125b-1 の標的として receptor activator of NF- $\kappa$ B (RANK)、miR-378a の標的として ring finger protein 125 (RNF125) がそれぞれ同定された (データ非公開)。TNF 受容体ファミリーのメンバーである RANK およびそのリガンド RANKL は、免疫系において重要な役割を果たす。RANKL 発現の結果として活性化された T 細胞は、RANK を発現する樹状細胞を刺激して T 細胞応答の誘導を促進する<sup>29),30)</sup>。RNF125 もまた T 細胞活性化の調節因子である<sup>31)</sup>。したがって、miR-125b-1 および miR-378a は、免疫抑制因子として働く可能性がある。

miR-125b-1 および miR-378a の発現は、大腸癌ワクチン療法の効果を予測する新規バイオマーカーとなり得る。ワクチン療法のより良い結果を期待できる患者を選択するため、大規模な研究において確認されるべきである。さらに、miR-125b-1-3p は免疫抑制因子として働く可能性があり、新たな治療標的の同定につながると考えられた。

## 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。

## 7. 参考文献

- [1] Torre LA, Bray F, Siegel RL, Ferlay J, Lortet-Tieulent J, Jemal A. Global cancer statistics, 2012. *CA: a cancer journal for clinicians*. 2015; 65: 87-108.
- [2] Xiang B, Snook AE, Magee MS, Waldman SA. Colorectal cancer immunotherapy. *Discovery medicine*. 2013; 15: 301-8.
- [3] Rosenberg SA, Yang JC, Restifo NP. Cancer immunotherapy: moving beyond current vaccines. *Nat Med*. 2004; 10: 909-15.
- [4] Nagorsen D, Thiel E. Clinical and Immunologic Responses to Active Specific



- Cancer Vaccines in Human Colorectal Cancer. *Clinical Cancer Research*. 2006; 12: 3064-9.
- [5] Hazama S, Nakamura Y, Takenouchi H, 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. *Journal of translational medicine*. 2014; 12: 63.
- [6] Hazama S, Nakamura Y, Tanaka H, et al. A phase I trial study of five peptides combination with oxaliplatin-based chemotherapy as a first-line therapy for advanced colorectal cancer (FXV study). *Journal of translational medicine*. 2014; 12: 108.
- [7] Bartel DP. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell*. 2004; 116: 281-97.
- [8] Wang S, Wang L, Bayaxi N, et al. A microRNA panel to discriminate carcinomas from high-grade intraepithelial neoplasms in colonoscopy biopsy tissue. *Gut*. 2013; 62: 280-9.
- [9] Cortez MA, Ivan C, Valdecanas D, et al. PDL1 Regulation by p53 via miR-34. *Journal of the National Cancer Institute*. 2016; 108.
- [10] Zhu J, Chen L, Zou L, et al. MiR-20b, -21, and -130b inhibit PTEN expression resulting in B7-H1 over-expression in advanced colorectal cancer. *Human immunology*. 2014; 75: 348-53.
- [11] Zhang Q, Di W, Dong Y, et al. High serum miR-183 level is associated with poor responsiveness of renal cancer to natural killer cells. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*. 2015; 36: 9245-9.
- [12] Galore-Haskel G, Nemlich Y, Greenberg E, et al. A novel immune resistance mechanism of melanoma cells controlled by the ADAR1 enzyme. *Oncotarget*. 2015; 6: 28999-9015.
- [13] Kijima T, Hazama S, Tsunedomi R, et al. MicroRNA-6826 and-6875 in plasma are valuable non-invasive biomarkers that predict the efficacy of vaccine treatment against metastatic colorectal cancer. *Oncology reports*. 2017; 37: 23-30.
- [14] Nishida N, Nagahara M, Sato T, et al. Microarray Analysis of Colorectal Cancer Stromal Tissue Reveals Upregulation of Two Oncogenic miRNA Clusters. *Clinical Cancer Research*. 2012; 18: 3054-70.
- [15] Yao Q, Cao S, Li C, Mengesha A, Kong B, Wei M. Micro-RNA-21 regulates TGF-beta-induced myofibroblast differentiation by targeting PDCD4 in tumor-stroma interaction. *International journal of cancer*. 2011; 128: 1783-92.
- [16] Shindo Y, Hazama S, Nakamura Y, et al. miR-196b, miR-378a and miR-486 are predictive biomarkers for the efficacy of vaccine treatment in colorectal cancer. *Oncol Lett*. 2017; 14: 1355-62.

- [17] Uchida N, Tsunoda T, Wada S, Furukawa Y, Nakamura Y, Tahara H. Ring finger protein 43 as a new target for cancer immunotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2004; 10: 8577-86.
- [18] Shimokawa T, Matsushima S, Tsunoda T, Tahara H, Nakamura Y, Furukawa Y. Identification of TOMM34, which shows elevated expression in the majority of human colon cancers, as a novel drug target. *International journal of oncology*. 2006; 29: 381-6.
- [19] Suda T, Tsunoda T, Daigo Y, Nakamura Y, 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 science*. 2007; 98: 1803-8.
- [20] Ishizaki H, Tsunoda T, Wada S, Yamauchi M, Shibuya M, Tahara H. Inhibition of tumor growth with antiangiogenic cancer vaccine using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 1. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2006; 12: 5841-9.
- [21] Wada S, Tsunoda T, Baba T, et al. Rationale for antiangiogenic cancer therapy with vaccination using epitope peptides derived from human vascular endothelial growth factor receptor 2. *Cancer research*. 2005; 65: 4939-46.
- [22] Espina V, Wulfkuhle JD, Calvert VS, et al. Laser-capture microdissection. *Nature protocols*. 2006; 1: 586-603.
- [23] Iizuka N, Oka M, Yamada-Okabe H, et al. Oligonucleotide microarray for prediction of early intrahepatic recurrence of hepatocellular carcinoma after curative resection. *Lancet (London, England)*. 2003; 361: 923-9.
- [24] Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)*. 2001; 25: 402-8.
- [25] Sun YM, Lin KY, Chen YQ. Diverse functions of miR-125 family in different cell contexts. *Journal of hematology & oncology*. 2013; 6: 6.
- [26] Zhang XH, Zhang YN, Li HB, et al. Overexpression of miR-125b, a novel regulator of innate immunity, in eosinophilic chronic rhinosinusitis with nasal polyps. *Am J Respir Crit Care Med*. 2012; 185: 140-51.
- [27] Huang HC, Yu HR, Huang LT, et al. miRNA-125b regulates TNF-alpha production in CD14+ neonatal monocytes via post-transcriptional regulation. *Journal of leukocyte biology*. 2012; 92: 171-82.
- [28] Wang P, Gu Y, Zhang Q, et al. Identification of resting and type I IFN-activated human NK cell miRNomes reveals microRNA-378 and microRNA-30e as negative regulators of NK cell cytotoxicity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2012; 189: 211-21.

- [29] Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, et al. A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*. 1997; 390: 175-9.
- [30] Renema N, Navet B, Heymann MF, Lezot F, Heymann D. RANK-RANKL signalling in cancer. *Bioscience reports*. 2016; 36.
- [31] Giannini AL, Gao Y, Bijlmakers MJ. T-cell regulator RNF125/TRAC-1 belongs to a novel family of ubiquitin ligases with zinc fingers and a ubiquitin-binding domain. *The Biochemical journal*. 2008; 410: 101-11.

8. 图表

Table 1. Microarray analysis of candidate miRNA expression and phase II study patient survival analysis (log-rank test)

miR name	expression in cancer tissue			Cut off value	<i>HLA-A*2402</i>	group	n	P value		
	Mean	SD	Median							
196b-5p	689.1	666.5	526.5	400		Matched	Low	7	0.001	
							High	9		
						Unmatched	Low	5		0.366
							High	5		
147b	483.6	185.2	460.0	500		Matched	Low	9	0.040	
							High	7		
						Unmatched	Low	5		0.366
							High	5		
378a-3p	6225.6	2216.9	6336.7	6500		Matched	Low	9	0.066	
							High	7		
						Unmatched	Low	5		0.515
							High	5		
486-5p	345.3	71.0	339.0	365		Matched	Low	11	0.006	
							High	5		
						Unmatched	Low	6		0.998
							High	4		
224-5p	343.2	290.8	272.2	270		Matched	Low	8	0.011	
							High	8		
						Unmatched	Low	5		0.657
							High	5		
125b-1-3p	604.0	312.0	518.0	550		Matched	Low	11	0.021	
							High	5		
						Unmatched	Low	5		0.092
							High	5		

Abbreviations: miRNA and miR, microRNA, SD, standard deviation,

HLA, human leukocyte antigen

Table 2. Clinical characteristics of the patients in the phase II study whose tissues were analyzed for miRNA using qRT-PCR

Characteristics	<i>HLA-A*2402</i> matched (n=34)	<i>HLA-A*2402</i> unmatched (n=34)	<i>P</i> value
Sex			
M	14	19	0.225
F	20	15	
Age			
Mean	68	64	0.080
SD	8	8	
Range	47-82	38-77	
Unresectable site			
Liver	19	26	0.073
Lung	11	10	0.793
Dissemination	4	3	0.690
Bone	0	2	0.151
Lymph node	5	8	0.355
Other	3	1	0.303
Number of involved organs			
One	27	22	0.302
Two	6	8	
Three	1	4	
Primary tumor site			
Colon	22	25	0.431
Rectum	12	9	

Abbreviations: SD, standard deviation; HLA, human leukocyte antigen.

Table 3. qRT-PCR analysis of candidate miRNA expression and phase II study patient survival analysis (log-rank test)

miR name	Expression in cancer cells				<i>HLA-A*2402</i>	group	n	P value
	Mean	SD	Median	Cut off value				
196b-5p	$135.079 \times 10^{-2}$	$169.617 \times 10^{-2}$	$63.862 \times 10^{-2}$	$108.588 \times 10^{-2}$	Matched	Low	24	0.652
						High	10	
					Unmatched	Low	22	0.120
						High	12	
147b	$1.237 \times 10^{-2}$	$1.254 \times 10^{-2}$	$0.834 \times 10^{-2}$	$1.527 \times 10^{-2}$	Matched	Low	28	0.210
						High	6	
					Unmatched	Low	27	0.046
						High	7	
378a-3p	$61.995 \times 10^{-2}$	$65.306 \times 10^{-2}$	$40.041 \times 10^{-2}$	$27.856 \times 10^{-2}$	Matched	Low	15	0.009
						High	19	
					Unmatched	Low	13	0.777
						High	21	
486-5p	$5.450 \times 10^{-2}$	$20.571 \times 10^{-2}$	$2.299 \times 10^{-2}$	$2.290 \times 10^{-2}$	Matched	Low	18	0.165
						High	16	
					Unmatched	Low	16	0.798
						High	18	
224-5p	$101.859 \times 10^{-2}$	$113.0851 \times 10^{-2}$	$61.063 \times 10^{-2}$	$68.359 \times 10^{-2}$	Matched	Low	20	0.172
						High	14	
					Unmatched	Low	18	0.512
						High	16	
125b-1-3p	$0.786 \times 10^{-2}$	$1.690 \times 10^{-2}$	$0.289 \times 10^{-2}$	$0.498 \times 10^{-2}$	Matched	Low	27	0.040
						High	7	
					Unmatched	Low	23	0.429
						High	11	

(Continued on the following page)

Table 3. qRT-PCR analysis of candidate miRNA expression and phase II study patient survival analysis (log-rank test) (Continued)

miR name	Expression in stromal cells				<i>HLA-A*2402</i>	group	n	<i>P</i> value
	Mean	SD	Median	Cut off value				
196b-5p	$33.801 \times 10^{-2}$	$40.004 \times 10^{-2}$	$18.673 \times 10^{-2}$	$22.450 \times 10^{-2}$	Matched	Low	22	0.311
						High	12	
					Unmatched	Low	18	0.218
						High	16	
147b	$0.599 \times 10^{-2}$	$0.535 \times 10^{-2}$	$0.424 \times 10^{-2}$	$0.413 \times 10^{-2}$	Matched	Low	17	0.290
						High	17	
					Unmatched	Low	17	0.515
						High	17	
378a-3p	$43.009 \times 10^{-2}$	$44.441 \times 10^{-2}$	$28.802 \times 10^{-2}$	$43.080 \times 10^{-2}$	Matched	Low	23	0.001
						High	11	
					Unmatched	Low	23	0.215
						High	11	
486-5p	$7.569 \times 10^{-2}$	$8.741 \times 10^{-2}$	$4.725 \times 10^{-2}$	$4.766 \times 10^{-2}$	Matched	Low	19	0.092
						High	15	
					Unmatched	Low	17	0.124
						High	17	
224-5p	$19.249 \times 10^{-2}$	$19.626 \times 10^{-2}$	$13.315 \times 10^{-2}$	$10.984 \times 10^{-2}$	Matched	Low	16	0.525
						High	18	
					Unmatched	Low	13	0.990
						High	21	
125b-1-3p	$2.311 \times 10^{-2}$	$2.371 \times 10^{-2}$	$1.554 \times 10^{-2}$	$1.690 \times 10^{-2}$	Matched	Low	20	0.089
						High	14	
					Unmatched	Low	18	0.136
						High	16	

Abbreviations: miRNA and miR, microRNA; SD, standard deviation; has, Homo sapiens; HLA, human leukocyte antigen.

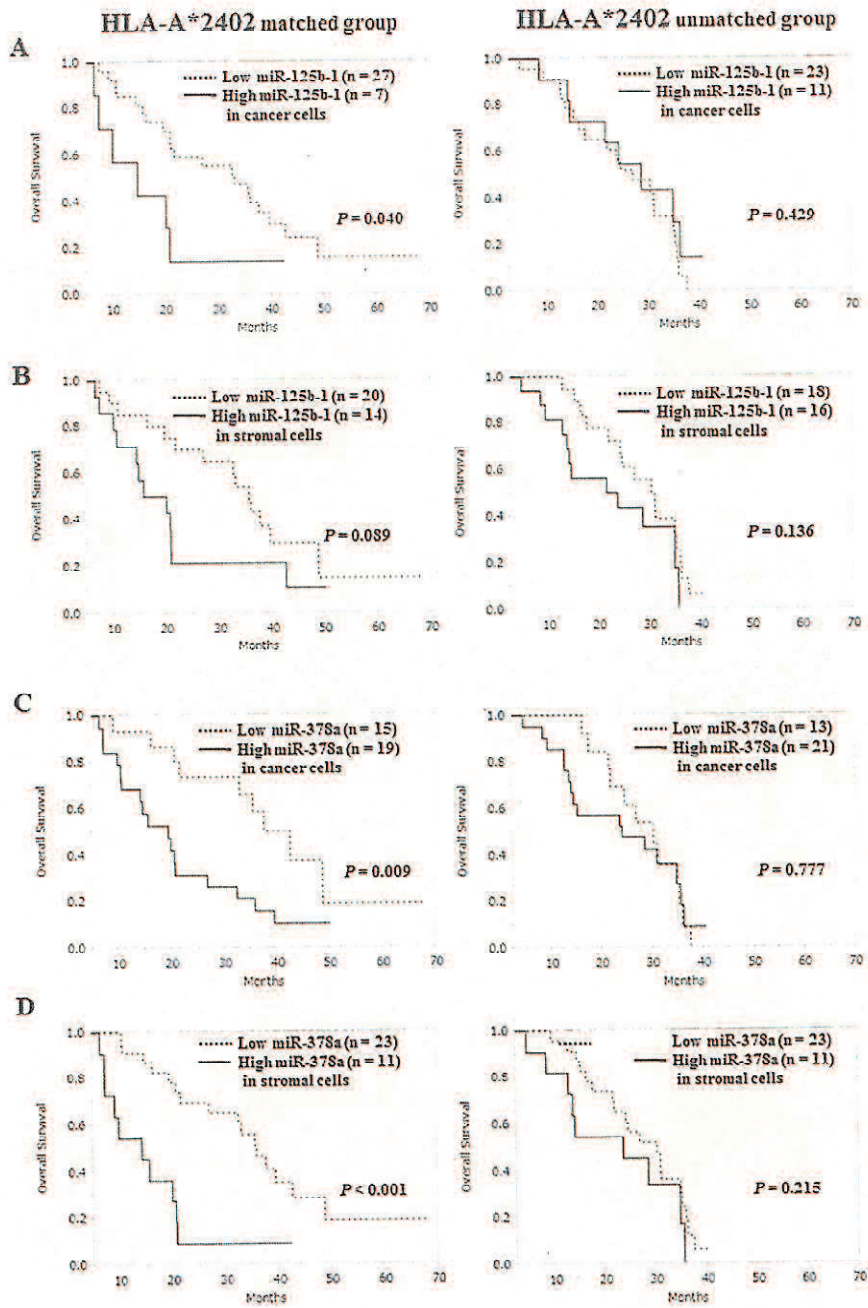
Table 4. Univariate and multivariate analyses of associations between clinical data and overall survival.

Factor	Cut-off	Univariate analysis				Multivariate analysis			
		Hazard ratio	95% CI		P-value	Hazard ratio	95% CI		P-value
			lower	upper			lower	upper	
CRP	> 1	1.537	0.619	3.525	0.338				
NLR	> 3	1.298	0.542	2.939	0.544				
CEA	> 16	1.972	0.871	4.784	0.105				
CA19-9	> 21	2.010	0.907	4.514	0.085				
Number of involved organs	One or more	2.487	0.960	5.759	0.060				
Relative expression of miR-378a-3p in cancer cells	$> 27.856 \times 10^{-2}$	2.853	1.281	6.788	0.010	1.888	0.695	5.031	0.207
Relative expression of miR-378a-3p in stromal cells	$> 43.080 \times 10^{-2}$	3.984	1.661	9.243	0.003	2.730	1.027	7.585	0.044
Relative expression of 125b-1-3p in cancer cells	$> 0.498 \times 10^{-2}$	2.586	0.925	6.286	0.068				
Relative expression of 125b-1-3p in stromal cells	$> 1.690 \times 10^{-2}$	1.950	0.876	4.279	0.100				

Abbreviations: NLR, Neutrophil/lymphocyte ratio, CRP, C-reactive protein, CI, confidence interval, CEA, carcinoembryonic antigen, CA19-9, carbohydrate antigen 19-9



Figure 1.



**Figure. 2**

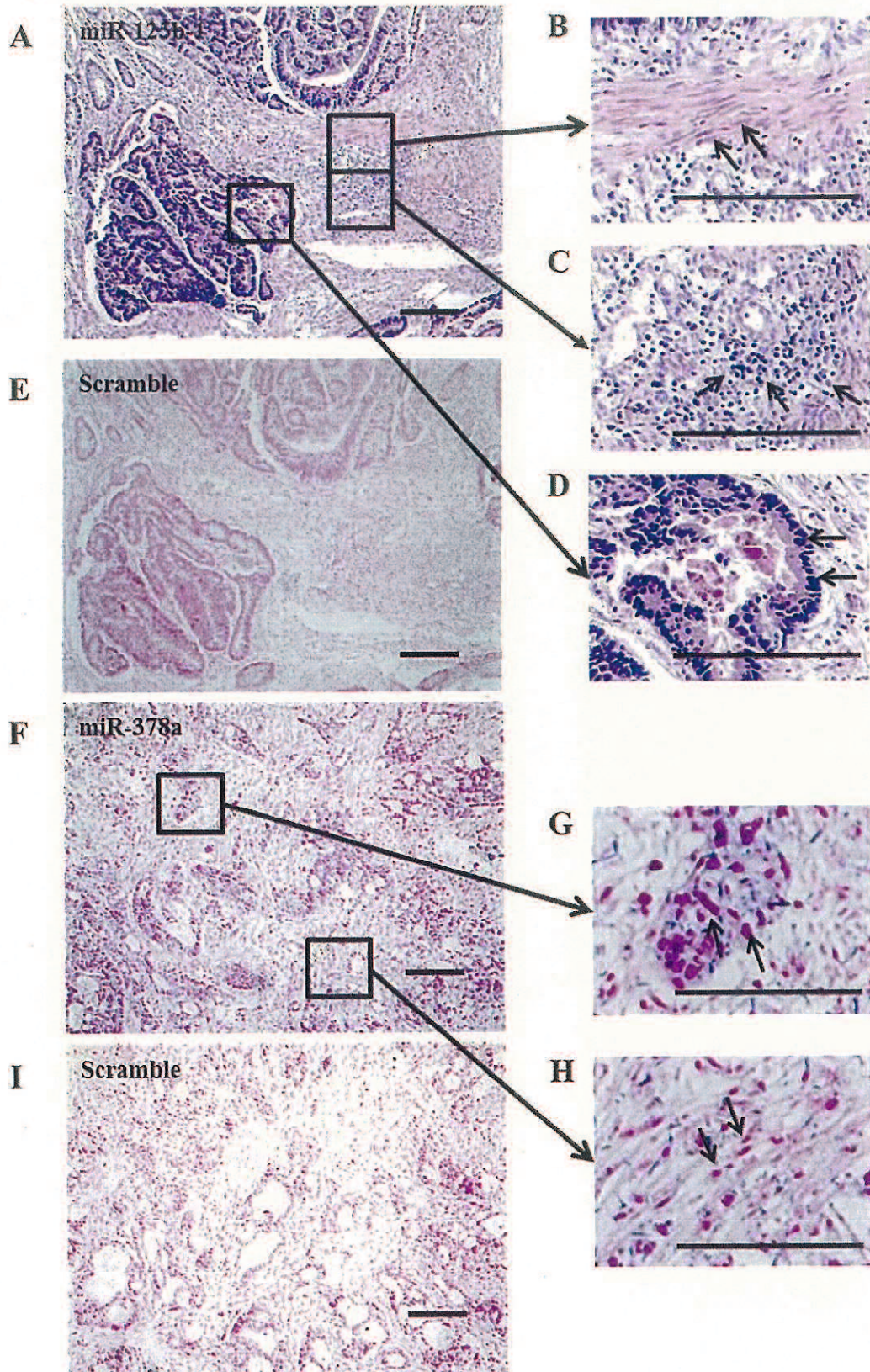


Table S1. Top 30 miRNAs upregulated or downregulated in a responder group compared with a non-responder group, as assessed using microarray analysis

Rank	Systematic name	Responder group (n = 4)		Non-responder group (n = 4)		Log2 ratio	Fisher ratio
		Mean	SD	Mean	SD		
1	hsa-miR-142-5p	1,606.3	275.3	3,697.8	1,734.8	-1.203	4.798
2	hsa-miR-196b-3p	295.7	83.2	164.2	26.1	0.849	4.532
3	hsa-miR-196b-5p	678.0	381.6	172.0	56.5	1.979	3.644
4	hsa-miR-147b	332.9	86.0	778.3	366.0	-1.225	3.445
5	hsa-miR-320b	4,480.4	2,085.6	8,208.7	1,799.7	-0.874	3.408
6	hsa-miR-378a-3p	5,711.6	2,043.9	9,709.1	2,499.3	-0.765	2.976
7	hsa-miR-320e	3,293.1	1,831.7	6,073.7	1,557.0	-0.883	2.862
8	hsa-miR-486-5p	289.0	53.4	516.7	244.3	-0.838	2.696
9	hsa-miR-378c	950.8	522.4	1,978.7	732.5	-1.057	2.615
10	hsa-miR-320a	4,823.1	2,574.0	9,183.3	2,923.4	-0.929	2.376
11	hsa-miR-378d	1,861.8	959.2	3,791.6	1,413.6	-1.026	2.347
12	hsa-miR-320c	3,072.4	1,342.7	5,477.7	2,086.2	-0.834	2.236
13	hsa-miR-222-3p	4,697.3	2,096.1	9,492.6	4,188.9	-1.015	2.006
14	hsa-miR-29c-3p	3,297.1	1,611.8	5,688.2	1,383.5	-0.787	1.934
15	hsa-miR-492	3,563.2	1,692.9	1,992.6	753.1	0.839	1.892
16	hsa-miR-663a	938.7	519.6	453.6	93.4	1.049	1.869
17	hsa-miR-1247-5p	1,240.8	1,146.6	454.8	152.9	1.448	1.856
18	hsv1-miR-H18	948.5	485.3	504.6	118.1	0.910	1.811
19	sv40-miR-S1-5p	10,436.1	3,623.7	22,261.0	12,834.3	-1.093	1.763
20	hsa-miR-182-5p	884.5	571.8	313.1	262.6	1.498	1.673
21	hsa-miR-203	1,632.6	1,197.1	502.2	270.9	1.701	1.541
22	hsa-miR-144-3p	966.3	678.3	2,682.2	2,499.8	-1.473	1.451
23	hsa-miRPlus-C1070	161.2	76.0	94.1	24.5	0.776	1.384
24	hsa-miR-224-5p	271.7	139.0	157.6	46.1	0.786	1.338
25	hsa-miR-3178	2,099.7	2,438.2	642.3	161.1	1.709	1.302
26	hsa1-miR-H5-3p	1,007.0	449.0	558.6	361.2	0.850	1.290
27	hsa-miR-196a-5p	557.8	288.7	257.9	158.5	1.113	1.205
28	hsa-let-7d-3p	900.9	362.3	1,880.1	1,299.6	-1.061	1.191
29	hsa-miR-532-5p	328.2	223.8	161.8	41.6	1.020	1.150
30	hsa-miR-125b-1-3p	262.0	126.9	660.6	595.1	-1.334	1.116

Abbreviations: miRNA and miR, microRNA, SD, standard deviation, hsa, Homo sapiens.