

令和 4 年 4 月 19 日現在

機関番号：14401  
研究種目：若手研究  
研究期間：2020～2021  
課題番号：20K17669  
研究課題名(和文) 膵癌集学的治療の個別化を目指した門脈血中腫瘍由来エクソソーム内包遺伝子の解析  
  
研究課題名(英文) To investigate the exosomal microRNA within portal blood for the aim of individualization of the multimodal therapy for pancreatic cancer  
  
研究代表者  
山田 大作 (Yamada, Daisaku)  
  
大阪大学・医学系研究科・助教  
  
研究者番号：60571396  
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では画像診断でとらえられない膵癌のsubclinical腫瘍をモニタリングするバイオマーカーの開発を目標とした。術後保存血液サンプルを用いてmicro RNA(miR)の網羅的発現検索を行い、その臨床経過からsubclinical tumorの有無及び化学療法感受性のマーカーとなりうる候補遺伝子群を選出した。また膵癌細胞株を用いて抗癌剤感受性と関わる遺伝子群を抽出し、結果を統合して候補遺伝子群の内、抗癌剤感受性に関与する遺伝子群を多く標的としているものを選定し、miR26a-5pを有用なバイオマーカー候補と同定した。膵癌細胞株及び他の血液サンプルにて検証し、有用である可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義  
本研究では画像診断でとらえられない膵癌のsubclinical腫瘍に対する治療効果モニタリングに有用な診断ツールを開発することで、最適な治療を過不足なく行える、個別化した膵癌集学的治療の確立を最終目標としている。  
本研究では、subclinical腫瘍に対する治療である術後補助化学療法について着目し、その治療効果をモニタリングできる可能性のある候補遺伝子バイオマーカーを同定し、発表した。この結果は膵癌集学的治療をより効果的に運用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic ductal adenocarcinoma (PDAC) is a critical disease with a poor prognosis because of high recurrence rate after curative resection. Multidisciplinary treatments including adjuvant chemotherapy (AC) significantly improved prognosis of patients with PDAC. However, there is no useful biomarker to manage the administration of AC. It is awaiting the optimal biomarker which can indicate not only the presence of subclinical tumor but also the tumor concerning chemo-sensitivity. We have conducted a comprehensive investigation of microRNA (miR) expression in various patient blood after surgery for PDAC to identify candidate miR which would be an optimal indicator for AC. We detected miR-26a-5p as a crucial candidate indicating the patients who were sensitive to AC. In this study, we evaluated whether the candidate gene expression in blood after surgery could distinguish the patients who were sensitive to AC.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 集学的治療 バイオマーカー subclinical tumor

## 1. 研究開始当初の背景

・膵癌は本邦において癌死亡数の第4位に位置付けられており、年間約40000人が罹患し約33000人が死亡している。5年生存率は他癌種と比較しても不良であり、約7%とされている(国立がん研究センターがん情報サービスより)。これは膵癌が早期に発見することが困難であること(病期で診断される膵癌は約5%<sup>1</sup>、手術可能な状態で発見されても手術治療のみでは約90%再発すること<sup>2</sup>が原因と考えられる。拡大切除など手術治療の工夫では予後を延長しなかったことから、画像上切除可能と判断される膵癌においても、画像では同定できない subclinical 腫瘍細胞が全身へ拡がっており、術後に遺残するこうした subclinical 腫瘍が再発の原因と考えられる。

そこで現在は、手術治療に組み合わせて抗癌剤治療、放射線治療を行う集学的治療が標準的な治療方法となり、予後の改善が認められた<sup>3,4</sup>。しかし、画像で同定できない subclinical 腫瘍に対して治療効果をモニタリングする方法はなく、代替的に原発巣に対する腫瘍の縮小効果や一定期間腫瘍の進展がないことなどを目安に subclinical 腫瘍の進展を予測して手術を施行している<sup>5</sup>。このため、転移部分における subclinical 腫瘍に対する実際の治療効果は不明であり、さらに手術後にはモニタリングする方法はない。現在は画一的な治療を全症例に施行し、その長期予後成績を比較することで治療効果を比較しているが、再発をきたす症例、つまり治療が不十分であった症例は少なからず存在しており、また治療過剰であった症例も存在していることが予想される。subclinical 腫瘍の存在に対してモニタリングできるバイオマーカーを開発することで、膵癌集学的治療の終了・継続を個別化し、より効果的なものへと改善できると考えられる。さらに、集学的治療をより効果的なものへするためには、画一的な抗癌剤治療を選択するのではなく個人に最適な治療を選択すべきである。膵癌は転移臓器によって予後が違ふことが示されている。肝転移をきたす膵癌は肺転移をきたす膵癌より抗癌剤治療成績が悪く、予後が不良であり<sup>6,7,8</sup>、転移する膵癌細胞の機能が違ふ可能性が示されている<sup>9</sup>。そこで、本研究は subclinical 腫瘍の存在のみならず転移部位や機能(抗癌剤感受性など)についても診断がつくバイオマーカーを開発し、膵癌集学的治療をより効果的な治療戦略とすることを最終目標としている。

膵癌患者の保存血液サンプルを用いてバイオマーカーの選定を行う方針とした。現在、膵癌治療における最も有用なバイオマーカーは CA19-9 であり、subclinical 腫瘍の存在について、臨床的に暗示していることも多く、subclinical 腫瘍の治療効果指標として報告も散見される<sup>10</sup>。しかし CA19-9 の高低値は抗癌剤の感受性を暗示することはなく、こうした欠点を補うようなバイオマーカーであることが望ましい。つまり、subclinical 腫瘍の存在を示すだけでなく、抗癌剤の感受性などの機能を示すようなバイオマーカーを同定することが望ましいと思われる。

この目的のため、我々は血中 miRNA (以下 miR) の発現に着目した。血中の miR は subclinical 腫瘍の特性を反映し、その存在だけでなく遺伝子情報を基に治療抵抗性などの

検出に役立つ可能性がある。実際，miRNA の発現プロファイルはバイオマーカーとなる可能性は高い。血液サンプルのなかでも術中に採取する門脈血液中のエクソソーム内に含まれる miR の発現は腫瘍の特性を反映している可能性は高く，またこのサンプルを対象とした報告はない。また血中のエクソソーム内 miR の発現は，その放出元の細胞の特性を内包している事が多く，担癌患者の血中エクソソーム内 miR 発現はバイオマーカー選定の一助となると考えられる。我々は膵癌膵癌から直接流入する門脈血中には腫瘍由来エクソソームが多く含まれると考え，術中に採取する門脈保存血液サンプルも用いて，エクソソーム内 miR 発現を候補遺伝子選定に利用した。

## 2．研究の目的

Subclinical 腫瘍の存在を示し，抗癌剤感受性を予測できるバイオマーカー候補を同定する。

## 3．研究の方法

以下の5段階にて候補バイオマーカー遺伝子を，臨床血液サンプルから探索・選定し，その検証を行う。

臨床血液サンプルによる網羅的遺伝子解析を用いた候補 miRNA の抽出。(探索)

抗癌剤耐性膵癌株とその親株の網羅的遺伝子解析比較を用いた抗癌剤感受性に関与する遺伝子群の抽出。(探索)

，の結果統合，候補 miRNA の選定。(選定)

膵癌細胞株を用いた，候補 miRNA の発現比較と機能(抗癌剤耐性 / 増殖能 / 浸潤能)の比較検討。および，候補 miRNA の標的遺伝子の同定。(検証)

臨床サンプルにおける候補 miRNA の発現・その標的遺伝子発現と予後との関係性の検討。(検証)

## 4．研究成果

臨床血液サンプルによる網羅的遺伝子解析を用いた候補 miRNA の抽出。(探索)

膵癌の根治切除術後に保存していた血液サンプルを用いて subclinical 腫瘍の存在を示す miR の選定を行った。手術中と術後4週目に採血できた門脈血サンプルの比較において有意差を持って手術中のサンプル血液中のエクソソーム内に高値であった miR の62遺伝子を同定した。さらに，術後補助化学療法を行わずに再発しなかった症例と，術後再発した症例の末梢血サンプル中 miR の発現比較を行い，再発した症例で有意に発現の高かった miR を147遺伝子同定した。両者で共通の遺伝子を subclinical 腫瘍の存在を示す miR と想定した。さらに，補助化学療法中に再発した症例と補助化学療法終了後半年以上経過してから再発した症例の末梢血サンプル中 miR の発現比較を行い，抗癌剤治療感受性に関連する末梢血で検査できる遺伝子として28遺伝子を選出した。これらの結果を統合し，subclinical 腫瘍の存在を示し，抗癌剤治療感受性に関与する候補 miR として **13 遺伝子を同定した**。

抗癌剤耐性膵癌株とその親株の網羅的遺伝子解析比較を用いた抗癌剤感受性に関する遺伝子群の抽出。(探索)

抗癌剤耐性膵癌株とその親株の網羅的遺伝子解析の結果から GSEA を行い、Integrin-mediated cell adhesion に分類される遺伝子群が 1 位にランクされ、抗癌剤耐性株で特徴的であることが示された。

の結果統合、候補 miRNA の選定。(選定)

で絞り込んだ 13 遺伝子と の GSEA の結果を統合し、13 遺伝子のうちで Integrin に最も関連している miR-26a-5p を subclinical tumor の存在を示しかつ抗癌剤感受性を示すバイオマーカー候補として同定した。

膵癌細胞株を用いた、候補 miRNA の発現比較と機能(抗癌剤耐性 / 増殖能 / 浸潤能)の比較検討。および、候補 miRNA の標的遺伝子の同定。(検証)

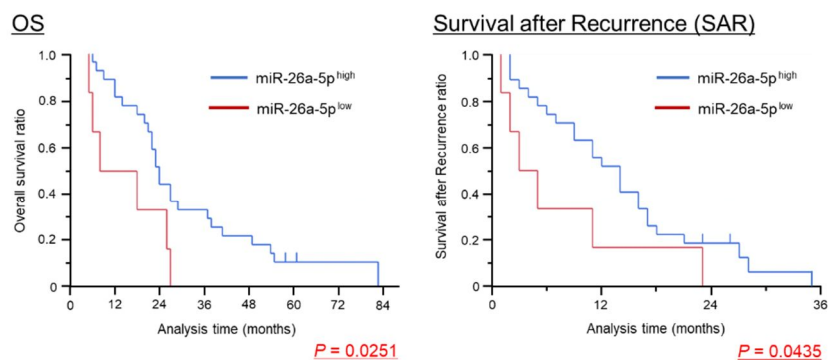
膵癌細胞株の検討では、全ての細胞株上清で miR-26a-5p の発現が確認でき、発現が高い細胞株では Gemcitabine 感受性が高く、細胞浸潤能が低かった。Anti-miR-26a-5p を遺伝子導入すると Gemcitabine 感受性は有意に減弱され、浸潤能を有意に高めた。miR-26a-5p の遺伝子発現と逆相関する Integrin-mediated cell adhesion に分類される遺伝子群を mRNA 発現を用いて検索し、ITGA5 の発現がいずれの検討でも逆相関していることを確認し、膵癌細胞における miR-26a-5p の評点遺伝子として ITGA5 に着目することとした。

臨床サンプルにおける候補 miRNA の発現・その標的遺伝子発現と予後との関係性の検討。(検証)

術後再発した症例の中で、術後血液サンプルを保存している症例を対象とした。まず膵癌切除 FFPE サンプルにおける ITGA5 の免疫染色を行い、血液サンプルを用いて miR-26a-5p の発現を評価した。ITGA 陽性 / 陰性の結果から血中 miR-26a-5p 値のカットオフ値を設定し、miR-26a-5p 値のカットオフ値より高値/低値の症例を比較した。再発症例群の中で、miR-26a-5p が高値の症例では再発までの期間が長く、再発後生存は有意に長い結果となり、浸潤・転移や抗癌剤感受性に関与している可能性が考えられた。また、既存のバイオマーカーと合わせた評価を考慮するため、原発巣根治切除後に CA19-9 が基準値以上となっている症例において、同様の検討を行った結果、CA19-9 が術後も基準値以上の症例において、miR-26a-5p が高値の症例では術後再発までの期間が有意に長く、再発後の生存期間も有意に長いことが示された(下図)。

以上の結果より、miR-26a-5p が高発現な膵癌細胞では Gemcitabine に感受性が高く浸潤能は低い可能性が示された。また臨床においては、血中の miR-26a-5p が認められる間は術後補助化学療法を継続するという形で応用できる可能性があり、CA19-9 と組み合わせることによって膵癌の治療方針に寄与するバイオマーカーとなり得る可能性が示唆された。

## 再発あり症例 (n=33)



miR-26a-5p高値であれば、OS/SAR共に有意に予後が良い。

## 参考文献

1. Egawa S, Toma H, Ohigashi H, et al. Japan Pancreatic Cancer Registry; 30th year anniversary: Japan Pancreas Society. *Pancreas* 2012; 41(7):985-92.
2. Oettle H, Post S, Neuhaus P, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial. *JAMA* 2007; 297(3):267-77.
3. Oettle H, Neuhaus P, Hochhaus A, et al. Adjuvant chemotherapy with gemcitabine and long-term outcomes among patients with resected pancreatic cancer: the CONKO-001 randomized trial. *JAMA* 2013; 310(14):1473-81.
4. Uesaka K, Boku N, Fukutomi A, et al. Adjuvant chemotherapy of S-1 versus gemcitabine for resected pancreatic cancer: a phase 3, open-label, randomised, non-inferiority trial (JASPAC 01). *Lancet* 2016; 388(10041):248-57.
5. Satoi S, Yamaue H, Kato K, et al. Role of adjuvant surgery for patients with initially unresectable pancreatic cancer with a long-term favorable response to non-surgical anti-cancer treatments: results of a project study for pancreatic surgery by the Japanese Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery. *J Hepatobiliary Pancreat Sci* 2013; 20(6):590-600.
6. Yamada D, Eguchi H, Iwagami Y, et al. The investigation of the survival time after recurrence in patients with pancreatic ductal adenocarcinoma for individualization of adjuvant chemotherapy. *Surg Today* 2018.
7. Groot VP, Gemenetzi G, Blair AB, et al. Implications of the Pattern of Disease Recurrence on Survival Following Pancreatectomy for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg Oncol* 2018; 25(8):2475-2483.
8. Groot VP, Gemenetzi G, Blair AB, et al. Defining and Predicting Early Recurrence in 957 Patients With Resected Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Ann Surg* 2018.
9. Hoshino A, Costa-Silva B, Shen TL, et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* 2015; 527(7578):329-35.
10. Takahashi H, Ohigashi H, Ishikawa O, et al. Serum CA19-9 alterations during preoperative gemcitabine-based chemoradiation therapy for resectable invasive ductal carcinoma of the pancreas as an indicator for therapeutic selection and survival. *Ann Surg* 2010; 251(3):461-9.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹田佑, 山田大作, 小林省吾, 岩上佳史, 富丸慶人, 秋田裕史, 野田剛広, 後藤邦仁, 土岐祐一郎, 江口英利
2. 発表標題 膵癌集学的治療の個別化を目指した血中microRNA遺伝子の検討
3. 学会等名 日本外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Takeda, Daisaku Yamada, Shogo Kobayashi, Yoshifumi Iwagami, Yoshito Tomimaru, Hirofumi Akita, Takehiro Noda, Kunihiro Gotoh, Yuichiro Doki, Hidetoshi Eguchi
2. 発表標題 The investigation of candidate biomarkers for individualizing cases of adjuvant chemotherapy resistance in pancreatic cancer.
3. 学会等名 日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Yu Takeda, Daisaku Yamada, Shogo Kobayashi, Yoshifumi Iwagami, Yoshito Tomimaru, Hirofumi Akita, Takehiro Noda, Kunihiro Gotoh, Yuichiro Doki, Hidetoshi Eguchi
2. 発表標題 The investigation of new biomarkers for individualizing adjuvant chemotherapy for pancreatic cancers
3. 学会等名 日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 竹田佑, 山田大作, 小林省吾, 岩上佳史, 富丸慶人, 秋田裕史, 野田剛広, 後藤邦仁, 土岐祐一郎, 江口英利
2. 発表標題 膵癌集学的治療の個別化を目指した血中microRNA遺伝子の検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------