

令和 6 年 6 月 15 日現在

機関番号：17401
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2021～2023
課題番号：21K08757
研究課題名（和文）網羅的遺伝子解析に基づいた膵癌に対する新規バイオマーカー及び分子標的治療の開発

研究課題名（英文）Molecular gene signature and molecular targeted therapy for pancreatic cancer

研究代表者
中川 茂樹（Nakagawa, Shigeki）

熊本大学・病院・特任助教

研究者番号：10594872
交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：膵癌は癌の中でも極めて予後が悪いことが知られており、予防や早期診断、治療、再発予防の開発は急務であると言える。膵癌に対する化学療法は限られており、再発高リスク群を同定するマーカーの開発や、それに対して有効な分子標的薬の開発が急務である。今回我々は、網羅的な遺伝子データベースに基づいて再発高リスク群を同定するバイオマーカーを作成すること、網羅的な遺伝子解析を用いて再発高リスク群に対して効果的な治療標的を検討、候補となる治療標的遺伝子（CFL1およびARHGEF2）の作用機序の解明及びヒト検体を用いた効果の検証を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究においては、再発高リスク群を同定するバイオマーカーを作成し検証すること、網羅的な遺伝子解析を用いて再発高リスク群に対して効果的な治療標的を検討すること（Cofilin-1、ARHGEF2）、Cofilin-1及びARHGEF2の作用機序の解明及びヒト検体を用いた効果の検証することを目的とする。本研究における治療標的の検索方法やヒト検体を用いたCofilin-1及びARHGEF2阻害剤の効果検証の方法等は網羅的、かつ非侵襲的にヒト検体における効果を検証する事が可能であり、極めて新規性・有効性が高いものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：Pancreatic ductal adenocarcinoma had a worthy prognosis and there are a fewer chemotherapy regimens for pancreatic cancer. We tried to find the molecular gene signature predictive worth prognosis for pancreatic cancer patients and search the target genes for molecular targeted therapy.

We find CFL1 and ARHGEF2 as a targetable genes and analyze their effect for pancreatic cancer.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：膵癌 Molecular gene signature 予後 バイオマーカー Cofilin-1 ARHGEF2 化学療法

1. 研究開始当初の背景

膵癌に対する再発・予後を予測する分子マーカーは未だ見つかっていない。

膵癌は固形癌の中でも特に予後が悪い事が知られており、近年は化学療法の奏効率も上昇し術前・術後の補助化学療法も導入されてきているが、現在保険収載されている分子標的治療薬は無い。膵癌に対しては手術が唯一の根治的治療法であるが、切除可能な症例は15~20%程度と報告されており(Sultana A et al. J Clin Oncol. 2007)、切除不能症例に対しては化学療法が主な治療となる。更に、術前や術後の化学療法も限られており、術後の再発率は95%(Sperti C et al. World J Surg. 1997)とされており、術前・術後の補助化学療法としても新規化学療法の開発は急務である。

今回、膵癌に対する新しいバイオマーカー及び化学療法の検索と検証を行うに当たって、複数の遺伝子の組み合わせである "gene signature" 及びヒト組織において薬剤の効果を検証できる *ex-vivo* 培養システムを用いる事で臨床試験に準じた知見を得る事ができ、膵癌治療のブレイクスルーに繋がる事が期待できる。

膵癌治療における化学療法は限られており、有効な分子標的治療薬は存在しない。

近年の種々の癌種における治療成績の改善には化学療法・分子標的治療の進歩がその一翼を担っている。しかし、膵癌においては依然として有効な化学療法は非常に限られており、有効な分子標的治療薬は皆無である。膵癌においては手術による根治切除が唯一の根治的な治療であるが、根治切除後の予後も非常に厳しい状況にあり、新しい化学療法の開発が不可欠である。

2. 研究の目的

本研究においては、再発ハイリスク群を同定するバイオマーカーを作成し検証すること、網羅的な遺伝子解析を用いて再発ハイリスク群に対して効果的な治療標的を検討すること (Cofilin-1、ARDHGEF2)、Cofilin-1 及び ARDHGEF2 の作用機序の解明及びヒト検体を用いた効果の検証することを目的とする。以下に述べるその治療標的の検索方法やヒト検体を用いた Cofilin-1 及び ARDHGEF2 阻害剤の効果検証の方法等は網羅的、かつ非侵襲的にヒト検体における効果を検証する事が可能であり、極めて新規性・有効性が高いものと考えられる。

3. 研究の方法

網羅的な遺伝子発現解析を元にした、膵癌根治切除術後の再発ハイリスク症例を同定する "gene signature" の作成と治療標的としての Cofilin-1 及び ARDHGEF2 の同定
膵癌における予後予測 Molecular marker 及び薬物治療標的として有用な遺伝子を検索するため、膵癌症例 80 例の RNA シークエンスデータベースである GSE21501 を用いた *in silico* 解析を行った。cox 比例ハザードモデルにより再発に対するハザード比が 3.0 よりも大きい、または -3.0 よりも小さい遺伝子 44 遺伝子を選び、Molecular gene signature を作成した (図 2)。更に、同データベースを用いて GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) によるパスウェイ解析を行い予後不良症例と相関の強い Molecular pathway を検索した所、PI3K-AKT-MTOR Pathway が最も相関が強い事が分かった。薬物標的遺伝子として、PI3K-AKT-MTOR Pathway を構成する遺伝子の中から最も予後に対する比例ハザード比の高い Cofilin-1 及び ARDHGEF2 を選択し、治療標的としての有用性を検討することとした。同 GSE21501、TCGA のデータベース及び、当科にて利用可能である複数のマイクロアレイデータベースのコホートを用いて、Cofilin-1 及び ARDHGEF2 と相関の高い pathway や、免疫関連マーカーを含む既知の予後不良遺伝子との相関を *in silico* において解析する。

ヒト検体における Molecular gene signature の Validation、及び Cofilin-1 及び ARDHGEF2 発現と再発・予後・臨床病理学的因子との相関の検討

当科保有の臨床検体及びデータベースを用いて、臨床検体における Cofilin-1 及び ARDHGEF2 の機能的な発現意義及び、予後予測因子としての有用性を明らかにする。熊本大学医学部、消化器外科にて 2002 年~2014 年に膵癌に対して根治切除を施行された約 150 症例を用いて、Nanostring を用いて Molecular gene signature を測定し、定量 PCR 及び免疫染色にて RNA レベル、蛋白レベルの Cofilin-1 及び ARDHGEF2 発現を確認する。生命予後や再発等との相関関係を明らかにすると共に、Ki67 や E-cadherin (CDH1)、Vimentin といった、細胞増殖や EMT マーカーとの相関を検討する。

膵癌細胞株を用いた Cofilin-1 及び ARDHGEF2 の機能解析及び阻害剤の効果検証

膵癌細胞株を用いた *in vitro/in vivo* の実験によって、Cofilin-1 及び ARDHGEF2 の癌細胞における働きを明らかにする。当科にて保有している 8 種類の膵癌細胞株に対して、Cofilin-1 及び ARDHGEF2 発現プラスミドベクターを導入し強制発現を、siRNA を用いて発現抑制を行った細胞株を作成し、機能解析を行う。MTT assay にて増殖能、FACS を用いて細胞周期及びアポトーシス、invasion assay にて浸潤能、scratch assay にて遊走能に与える影響を明らかにする (図 4)。更に、癌細胞より分泌された DKK2 の働きを検証する為に癌細胞と免疫細胞の共培養を行い Cofilin-1 及び ARDHGEF2 がリンパ球に対して与える影響を明らかにする。

ヒト癌細胞組織のスライスを用いた ex vivo 培養系を用いて、腫瘍微小環境を含んだ状態での Cofilin-1 及び ARHGGEF2 阻害剤のヒト検体における効果の検証
 手術による切除後すぐの胆管癌組織を、厚さ 300 μ m にスライスし、細胞培養用メディウムを用いて培養を行う。この組織に対して Cofilin-1 及び ARHGGEF2 阻害剤を投与し、MTS アッセイにてその viability を評価する。また、カルチャー後の蛋白、mRNA を回収してその蛋白、遺伝子発現の変化を評価する。このような ex vivo の実験系を用いてヒト胆管癌組織に対する薬剤の効果の評価することで、胆管癌組織中の免疫細胞をはじめとする間質細胞や微小血管などの腫瘍微小環境を残しつつ、薬剤感受性の評価を行う事が可能である。阻害剤単独及び PD-1 阻害剤との併用を行い 48 時間培養した後、細胞の Viability、リンパ球マーカーを測定し、効果を検証する。

本研究により、胆管癌における薬物治療において Cofilin-1 及び ARHGGEF2 を標的とした分子標的治療薬の有用性及びその作用機序が明らかになる事が期待される。

4. 研究成果

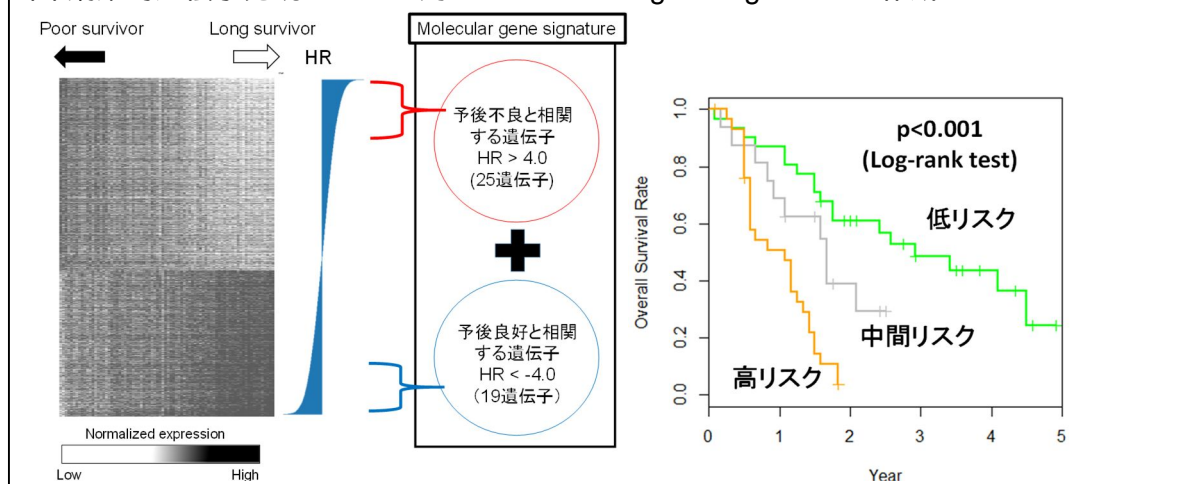
44 遺伝子の発現を用いて膵癌予後を予測する Molecular gene signature を作成した所、高リスク、中間リスク、低リスクの群に層別化され、それぞれ有意に予後予測に有用であった。(図)

膵癌データベースである GSE21501 を用いてパスウェイ解析を行い予後不良症例と相関の強い Molecular pathway を検索した所、PI3K-AKT-MTOR Pathway が最も相関が強い事が分かった。薬物標的遺伝子として、PI3K-AKT-MTOR Pathway を構成する遺伝子の中から最も予後に対する比例ハザード比の高い Cofilin-1 及び ARHGGEF2 を選択し、機能解析を行った。

今期は特に ARHGGEF2 についての実験を進めている。染色濃度と染色領域によって ARHGGEF2 発現を評価し、高発現群(n = 123)および低発現群(n=78)の2群に分類すると、全生存期間(OS)、無再発生存期間(RFS)ともに高発現群で有意に不良であった(OS: p = 0.0018、RFS: p = 0.0007)。さらに OS、RFS に関する予後因子を多変量解析にて検討した。OS に関しては CA19-9 > 37 U/L(RR = 2.20, p = 0.0003)、TS 3(RR = 1.93, p = 0.017)、病理学的リンパ節転移陽性(RR = 2.07, p = 0.0006)、ARHGGEF2 高発現(RR = 1.52, p = 0.047)が独立予後不良因子であった。また RFS に関しては CA19-9 > 37U/L(RR = 1.84, p = 0.0018)、R1 切除(RR = 2.50, p = 0.006)、ARHGGEF2 高発現(RR = 1.77, p = 0.0034)が独立予後不良因子であった。また、また、アクチン制御タンパクの1つである cofilin-1 は RhoA の下流に存在し、癌の浸潤に関与すると言われており、cofilin-1 についても染色濃度と染色領域によってその発現を評価した。高発現群(n = 106)および低発現群(n = 95)の2群に分類して ARHGGEF2 との相関を評価したところ、正の相関を示した(p = 0.04)。

更に ARHGGEF の downstream の機能解析を行い Annals of Surgical Oncology(Nakao et al, 2021)に報告している。

図.網羅的遺伝子発現データを用いた Molecular gene signature の作成



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Lan C	4. 巻 29(6)
2. 論文標題 High Expression of Bloom Syndrome Helicase is a Key Factor for Poor Prognosis and Advanced Malignancy in Patients with Pancreatic Cancer: A Retrospective Study.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol.	6. 最初と最後の頁 3551-3564
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-022-	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Liu Z,	4. 巻 128(5)
2. 論文標題 Hyperglycaemia induces metabolic reprogramming into a glycolytic phenotype and promotes epithelial-mesenchymal transitions via YAP/TAZ-Hedgehog signalling axis in pancreatic cancer.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Br J Cancer.	6. 最初と最後の頁 844-856.
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41416-022-02106-9.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Nakao Yosuke, Nakagawa Shigeki, Yamashita Yo-ichi, Umezaki Naoki, Okamoto Yuya, Ogata Yoko, Yasuda-Yoshihara Noriko, Itoyama Rumi, Yusa Toshihiko, Yamashita Kohei, Miyata Tatsunori, Okabe Hirohisa, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Baba Hideo	4. 巻 28
2. 論文標題 High ARHGEF2 (GEF-H1) Expression is Associated with Poor Prognosis Via Cell Cycle Regulation in Patients with Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 4733 ~ 4743
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1245/s10434-020-09383-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔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
研究分担者	馬場 秀夫 (Baba Hideo) (20240905)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・教授 (17401)	
研究分担者	山下 洋市 (Yamashita Yo-ichi) (00404070)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・准教授 (17401)	
研究分担者	今井 克憲 (Imai Katsunori) (60555746)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員 (17401)	

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
---------	---------