

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16385

研究課題名（和文）個別化治療を目指した網羅的解析による膵癌再発予測miRNAパネルの開発

研究課題名（英文）Identification of a miRNA panel for predicting recurrence after surgery in pancreatic cancer by comprehensive analysis

研究代表者

西和田 敏 (Nishiwada, Satoshi)

奈良県立医科大学・医学部・研究員

研究者番号：80745795

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,500,000円

研究成果の概要（和文）：癌と神経新生、軸索誘導（Axon Guidance, AG）との関連性を基に、膵癌術後神経叢再発予測AG関連miRNAパネル（AGMP）を開発した。miRPathDB 2.0を用いて、AGに関連する13 miRNAを抽出した。続いて膵癌切除標本462例、血液検体53例を用いてqRT-PCRにて各miRNA発現を調査し、AGMPを創出した。このAGMPは複数コホート及び血液コホートにおいて良好に術後神経叢局所再発を予測した（AUC=0.95, 0.94, 0.91, 0.86）。結論：膵癌局所制御を予測するAGMPは手術適応の厳格化および治療方針決定においてブレイクスルーとなり得る。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌は最も悪性度の高い癌であり、世界的に増加すると予想されている。完全なる局所制御が根治に必須であるが、膵癌は大血管周囲神経叢に容易に浸潤を来し、根治術後であっても高率に局所再発を来す。近年、癌と神経新生、軸索誘導（Axon Guidance, AG）との関連性が着目されており、この関連分子が神経周囲浸潤や転移を促進するとの報告がある。今回我々は統合解析を基に、膵癌術後神経叢局所再発予測AG関連miRNAパネル（AGMP）を開発した。膵癌手術における局所制御は根治に向けた大前提であり、その術前予測を可能とするAGMPは手術適応の厳格化および治療方針決定においてブレイクスルーとなり得る。

研究成果の概要（英文）：We performed biomarker discovery to identify an Axon guidance-related miRNA panel (AGMP) for risk-stratification of perivascular plexus recurrence (PPR) after surgery in PDAC. The pathway-miRNA interaction analysis using the miRPathDB 2.0 identified 13 miRNAs related to the axon guidance pathway. Subsequently, the predictive performance of the 13-miRNA risk-prediction model, AGMP was trained and validated in three independent surgically resected sample cohorts [Upfront surgery (US) cohort: n = 162, NACRT cohort: n = 217, Arterial invasion cohort: n = 62], which robustly distinguished PPR after surgery in the US (AUC: 0.95), NACRT (AUC: 0.94), and Arterial invasion cohort (AUC: 0.91). Furthermore, we additionally validated the performance of AGMP in a pretreatment blood cohort (n = 53), which again confirmed the robustness of risk-stratification for PPR (AUC: 0.86). Conclusions: We developed a novel biomarker, AGMP, that demonstrated remarkable predictive performance for PPR in PDAC.

研究分野：膵癌

キーワード：膵癌 microRNA 術後再発予測パネル

1. 研究開始当初の背景

我が国における癌患者数、癌死亡数は未だに増加傾向にある。膵癌が最も高悪性度の癌の一つであることは論を俟たず、世界的に今後さらに増加していくと予想されている。一方、近年の癌治療の進歩はめざましく、新規化学療法や分子標的治療、免疫療法等により、多くの癌腫において治療成績は徐々に向上している。しかし、特に膵癌における治療成績は未だ満足できるものではなく、5年生存率は8-9%程度に留まっている。膵癌に対する外科治療は唯一の根治治療であるが、膵切除は非常に高侵襲治療であるにもかかわらず、術後再発率が極めて高く、再発後の治療は困難となる。このように、膵癌治療を取り巻く環境は未だ発展途上であり、術前・術後治療を含めた集学的治療戦略の構築が必須である。これらを総合的に考えると、各患者の術後予後リスクを層別化し、不要な手術の回避、または適切な周術期集学的治療提供の指標となり得るバイオマーカーが必要であるが、既存の腫瘍マーカーや臨床因子では不十分であり、新たな観点からの新規バイオマーカーの同定が急務である。

MicroRNA (miRNA) は20-25塩基長からなる noncoding RNA であり、対象となる mRNA に結合することで遺伝子発現を調節している。各癌において高頻度に発現異常がみられ、発癌や癌の進展、転移などに関与していると報告されている。さらに、サイズが小さいことで組織、血液、便、尿やその他の体液中でも安定した形態を保持し、mRNA 等に比べ、より堅牢な低侵襲バイオマーカーとしての可能性が注目されている。本研究では包括的解析により膵癌術後再発を精密に予測する miRNA パネルの開発を目的とする。さらに血液検体での検証を行うことで、治療前に各患者のリスク層別化を図り、手術適応厳密化や術前治療適応の選別による新規集学的治療戦略の構築を目標とする。

2. 研究の目的

膵癌の根治には完全なる局所制御が必須であるが、膵癌は大血管周囲神経叢に容易に浸潤を来すことを特徴とし、病理学的根治切除後であっても高率に局所再発を来す。高度神経浸潤例は予後不良であることが報告されており、膵癌-神経ネットワークの解明は局所進展のみならず、腫瘍学的アウトカムの改善のために重要である。近年、癌と神経新生、軸索誘導 (Axon Guidance, AG) との関連性が着目されており、この関連分子が神経周囲浸潤や転移を促進するとの報告がある。膵癌術後再発予測に関する網羅的解析、包括的解析を複数の独立したコホート、複数の異なるサンプルを用いて詳細に検討した報告はなく、本研究は独創性、新規性の高い研究である。今回我々は神経浸潤と局所再発との関連を調査するとともに、miRNA プロファイル統合解析を基に、膵癌術後神経叢局所再発予測 Axon guidance 関連 microRNA パネル (AGMP) を開発した。これは、今現在の膵癌治療におけるリアルタイムの臨床的問題点に遺伝子学的観点からのアプローチを試みた、ベンチとベッドサイドの直結を目指すトランスレーショナルリサーチの代表的研究と考えられるものである。本研究の目的が達成し得れば、将来の前向き臨床試験、他癌腫での検討など、近い将来の癌個別化治療においてブレイクスルーとなる得るものと考えられる。

3. 研究の方法

新規バイオマーカーの探求には、候補遺伝子の選別が最も重要である。今回我々は miRNA pathway 検索ツールである miRPathDB 2.0 を用いて、AG に関連する候補 miRNA を抽出し、その予測精度を独立した複数の臨床コホートにより検証する方針とした。

続いて当科で2006年から2020年に手術加療し、臨床データが確かで R0 切除が得られた膵癌計 441 例 [1. Upfront surgery (US) 群, Resectable (R)/Borderline resectable (BR) -PV: 162 例 (神経叢局所再発: 41 例, 25.3%), 2. Neoadjuvant chemoradiotherapy (NACRT) 群, R/BR-PV: 217 例 (同再発: 20 例, 9.2%), 3. 動脈浸潤陽性 BR-A/LA 群: 62 例 (同再発: 11 例, 17.7%)] の切除標本より RNA を抽出し、qRT-PCR にて各 miRNA 発現を調査し、術後神経叢局所再発有無を基に、AGMP を創出した。さらに、治療前血液サンプルから Exosomal miRNA を抽出し、このパネルの治療前神経叢周囲再発リスク予測能を検証した (血液コホート: n = 53, 神経叢再発: 7 例, 13.2%)。研究の Flow を図 1 に示す。

図 1 : Study flow

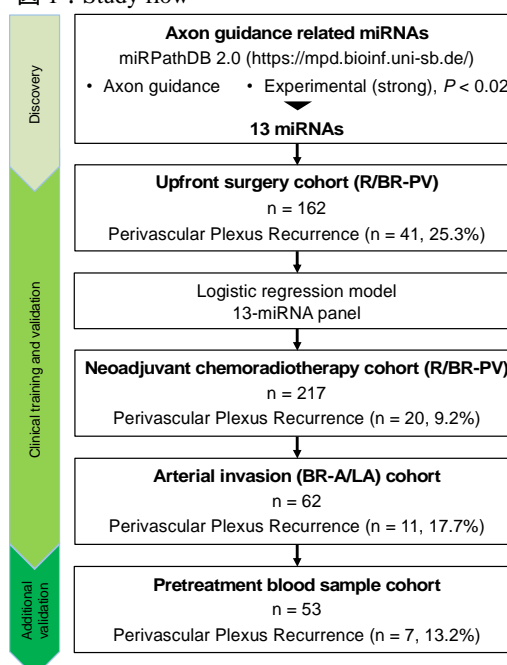
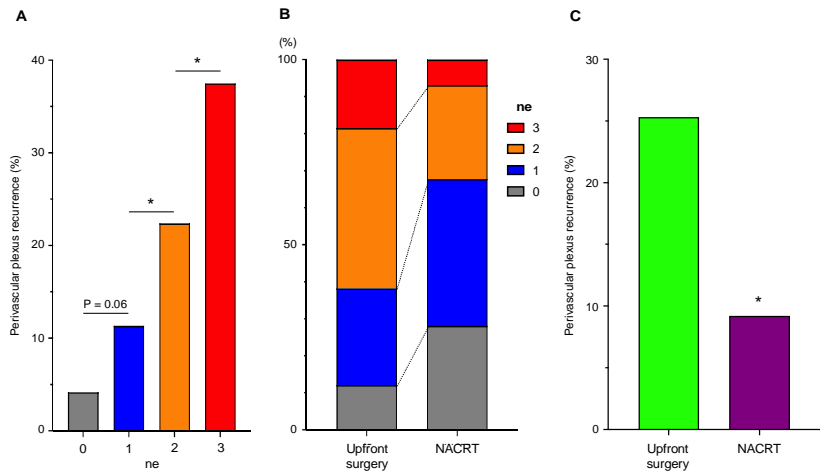


図2：膵癌神経浸潤と神経叢再発，NACRT との関連

4. 研究成果

(1) 膵癌神経浸潤と神経叢再発，NACRT との関連

まず膵癌切除標本における神経浸潤(ne)と術後神経叢再発の関連，さらに NACRT による神経侵襲への影響を調査した．その結果，膵内神経浸潤の程度により術後神経叢局所再発率は有意に増加した．また NACRT 群は US 群に比べ，神経浸潤が軽度で神経叢再発も低率であった (図2)．



(2) 網羅的解析による候補 miRNA の選別

先の膵内神経浸潤と術後局所神経叢再発の関連性を基に，miRNA pathway 検索ツールである miRPathDB 2.0 (<https://mpd.bioinf.uni-sb.de/>)を用いて，AG に有意に強く関連する 13 miRNA を抽出した．

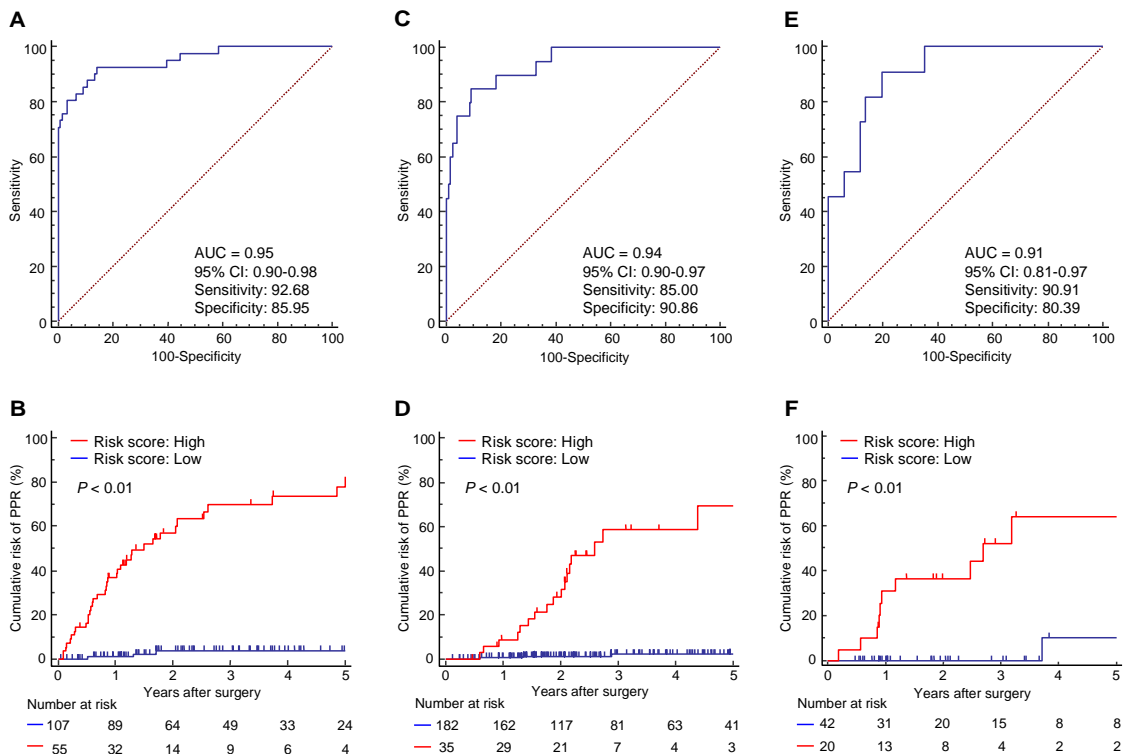
(3) Axon guidance 関連 microRNA パネル (AGMP) の統計学的開発・最適化

続いて診断パネルの確立のため，US コホートにおいて候補 13 miRNA の発現量を qPCR にて測定し，Logistic 回帰モデルにて算出された係数を基に，AGMP を構築した．この AGMP は US コホートにおいて良好に術後神経叢局所再発を予測した (図 3A, AUC=0.95)．AGMP にて高リスク群に分類された患者は，低リスク群に比して有意に不良な累積神経叢再発率を示した (図 3B, P<0.01)．

(3) 独立した術前治療後切除検体コホートによる AGMP の局所神経叢再発予測能の検証

真に臨床実用可能なバイオマーカーの開発には，独立した患者コホートによる予後予測能の検証が必須である．さらに，近年の膵癌診療においては術前治療が積極的に行われるようになり，一般的治療になりつつある．開発した AGMP がこれらの患者群に適応可能かどうかの検証は，バイオマーカーの汎用性の検討において重要な位置を占める．この理論を背景に，我々は NACRT 後根治術を施行した患者群 [NACRT 群, R/BR-PV: 217 例 (神経叢再発: 20 例, 9.2%)] に対し同様に qPCR を施行し，先に構築した AGMP を当て嵌め，その神経叢再発予測能を検証した．その結果，AGMP は NACRT コホートにおいても良好な神経叢再発予測および累積神経叢再発リスクの層別化が可能であった(図 3C, D, AUC=0.94, P<0.01)．

図3：AGMP の膵癌術後神経叢局所再発予測能



(4) 診断時動脈浸潤陽性膵癌コホートにおける AGMP の有用性の検討

前述の通り、膵癌は容易に大血管周囲神経叢に浸潤を来し、初診時に局所進行切除不能と診断されることが少なくない。しかし、近年の集学的治療の発展により、このような症例に対して化学療法や放射線療法が著効した場合、切除可能となることがある。その一方、CT などの画像診断だけでは、特に血管周囲神経叢浸潤遺残の有無の判断は非常に困難であり、さらに、そのような症例において本当に拡大手術により術後神経叢再発が制御できるかどうかの予測は困難を極める。そのため、本研究では初診時画像所見にて動脈浸潤陽性と判断された患者[動脈浸潤陽性群, BR-A/LA: 62 例 (同再発: 11 例, 17.7%)]を集積し、このサブグループに対する AGMP の予測能を検証した。その結果、動脈浸潤陽性群においても同様の高い予測能を示した (図 3E, F, AUC=0.91, $P < 0.01$)。

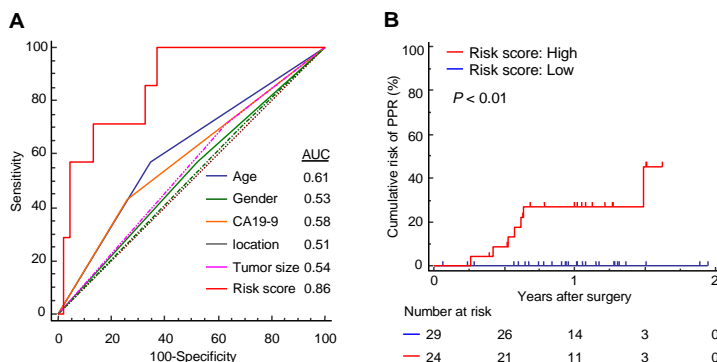
(5) 治療前血液サンプルコホートを用いた術後神経叢再発予測能の検証

実臨床において実用的なバイオマーカーには、低侵襲に採取できる検体で測定可能なことが望まれる。本研究のこれまでの項目では、即座に利用可能なサンプル数および組織サイズが十分に確保できていることを考慮し、切除標本を利用し解析してきた。前述した通り、医療科学技術の革新により体液中の微小遺伝子の検出が可能となり、Liquid biopsy の有用性、可能性は広く研究されている。miRNA はサイズが微小で血液中に移行しやすく、また血中での安定した形態を維持することが特徴である。

血液検体にも開発した miRNA パネルの有益性が証明できれば、臨床において術前のリスク評価が可能となり、さらに治療経過に沿って複数回評価できる可能性があり、低侵襲で真に理想的なバイオマーカーとなる。本項目では治療前血液サンプルから Exosomal miRNA を抽出し AGMP の治療前神経叢周囲再発リスク予測能を検証した (血液コホート: $n = 53$, 神経叢再発: 7 例, 13.2%)。その結果、AGMP は治療前血液コホートにおいても、CA19-9 を含めた従来の臨床病理学的因子と比べ明らかに良好な神経叢局所再発予測能を呈した (図 4A, B, AUC=0.86, $P < 0.01$)。

膵癌手術における局所制御は根治に向けた大前提であり、その術前予測を可能とする AGMP は手術適応の厳格化および治療方針決定においてプレイクスルーとなり得る。膵癌における神経新生および Axon guidance の解明が、神経叢浸潤に対する特異的分子標的治療開発への道標となる可能性がある。

図 4: 治療前血液サンプルにおける AGMP の術後神経叢局所再発予測能



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西和田 敏
2. 発表標題 Axon guidance関連microRNAパネルによる膵癌術後大血管周囲神経叢局所再発の予測
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023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
---------	---------