

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：21K16430

研究課題名（和文）膵癌治療抵抗性関連分子の発現制御による新規集学的治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of novel multidisciplinary therapeutic strategies by regulating the expression of pancreatic cancer resistance-associated molecules.

研究代表者

長井 美奈子（Nagai, Minako）

奈良県立医科大学・医学部・学内講師

研究者番号：80646092

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,100,000円

研究成果の概要（和文）：治療抵抗性獲得膵癌に特徴的な遺伝子変異の同定および特定された候補遺伝子とCD200発現との関連性の包括的解明、治療抵抗性メカニズム、候補遺伝子ノックダウンによる抗腫瘍効果の検証を行うことを予定した。腫瘍免疫学的検討として、腫瘍周囲浸潤リンパ球との関連を検討し、CD200発現例でIL-2が有意に低く、治療抵抗性を示す可能性を示した。これら治療抵抗性と関連する遺伝子の同定のため、治療抵抗性を示した症例と、治療奏功した症例を分類し、遺伝子解析を行ったが、現時点で治療抵抗性膵癌に特徴的な遺伝子変異の検出・同定することができなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性膵癌において、抗癌剤や放射線などに対する集学的治療が奏効しない遺伝子変異を同定することができ、それに対する対策を取ることができれば、根治が困難とされる膵癌においても長期生存あるいは根治の可能性が得られる可能性が広がると考えられる。治療抵抗性を示す遺伝子を有する膵癌に対して有効な膵癌治療薬を開発するため治療抵抗性遺伝子の同定を進めてきたが、免疫不活化分子として知られているCD200の発現が膵癌治療抵抗に大きく関わっていることはわかったが、治療抵抗性に特徴的な遺伝子の同定まで至らず、今後さらに検討を進めて行くことで個別化治療の確立に役立つと思われる。

研究成果の概要（英文）：The plan was to identify genetic mutations characteristic of treatment-resistant acquired pancreatic cancer and to comprehensively elucidate the association between the identified candidate genes and CD200 expression, the mechanism of treatment resistance and the anti-tumour effect of complementary gene knockdown. In a tumour immunology study, the association with peri-neoplastic infiltrating lymphocytes showed that IL-2 was significantly reduced in CD200-expressing patients, indicating the possibility of treatment resistance. In order to identify genes associated with treatment resistance, genetic analysis was performed by classifying cases that were resistant to treatment and those that responded to treatment. However, it was not possible to identify or detect specific genes that were associated with treatment resistance.

研究分野：膵癌

キーワード：治療抵抗性関連遺伝子 CD200 治療抵抗性膵癌

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年、新規抗癌剤や様々な治療選択肢の増加により膵癌の予後は改善しつつある。10年前はわずか5%であった5年生存率は現在約10%まで上昇してきているが、未だ予後不良である。唯一の根治療法は外科的切除であるが、診断時に切除可能と判断される症例は、わずか20%程度に過ぎない。局所進行膵癌に対する根治切除率改善のため術前治療が行われるようになったが、治療中に腫瘍増大や遠隔転移の出現により切除不能となる症例や、根治切除が行われたにも関わらず早期再発をきたす症例が10%存在する。このような既存治療に抵抗性を示す症例は予後不良であり、治療抵抗性克服が予後改善の鍵となる。これまで当教室では膵癌予後改善を目的とし腫瘍免疫と膵癌との関連について研究し、報告してきた。特に、最近では免疫不活化分子として認識されているCD200に着目し研究を行なっている。腫瘍細胞上に発現しているCD200は、T細胞に存在するCD200Rに結合し、T細胞による腫瘍免疫を抑制する。応募者らは膵癌においてCD200発現が術後再発および予後に関連することを見出した。さらにCD200発現と既知の癌幹細胞マーカーであるCD44の共発現も認めており、CD200が癌幹細胞マーカーとしての一面も有する可能性が示唆される。一方、近年では次世代シーケンサー技術の登場により複数の癌腫において、網羅的遺伝子解析が行われるようになった。膵癌においても、これまで手術検体を用いた大規模ながんゲノム解析研究が行われ、BIG4と呼ばれるKRAS、CDKN2A、TP53、SMAD4/DPC4の4つの遺伝子異常が高頻度に認められることが明らかになった。また、TGFB2、ACVR1B、BRCA1、BRCA2などのクロマチン修復、TGF- β signaling、軸索誘導、DNA修復など10-12の細胞内シグナル伝達経路の異常と関連した遺伝子変異の存在も報告され、膵癌における遺伝子変異と発癌のメカニズムが解明されつつある。しかし、膵癌治療抵抗性に関する遺伝子変異については未だ不明であり、特定されていない。

2. 研究の目的

治療不応膵癌において治療抵抗性の遺伝子基盤の解明である。CD200発現に関連する治療抵抗性遺伝子を同定し、治療抵抗性獲得のメカニズムの解明および治療抵抗性候補遺伝子と腫瘍免疫との関連を明らかにすることで、腫瘍免疫の活性化だけでなく、癌幹細胞をもターゲットとした、より根治度の高い治療となり、膵癌治療において大きなブレイクスルーとなり得ると考える。

本研究の目的は膵癌を対象として、治療抵抗性関連遺伝子の同定および治療抵抗性を生じるメカニズムを解明することを目的とする。また、治療抵抗性遺伝子をノックダウンさせることにより既存治療の抗腫瘍効果が増強するかどうかを検証し、さらには腫瘍免疫と治療抵抗性関連遺伝子との関連について明らかにすることで、今後、個別化治療を含む、新たな集学的癌治療戦略の構築につなげることを目的とする。近年でこそ術前治療の有効性が注目されているが、2008年から術前治療後非切除となった治療抵抗性膵癌の生検検体や、術後半年以内に早期再発をきたした予後不良症例の手術切除検体の新鮮凍結切片を所有しているのは非常に貴重である。本研究は、これらの貴重な試料を用いて、CD200発現に関連する治療抵抗性候補遺伝子を同定し、腫瘍免疫から見た治療抵抗性メカニズムを明らかにし、これらの調整機構を制御することで、治療抵抗性を獲得した膵癌に対する新規治療薬の開発に繋げることができると考えられ、独自性、創造性を有するものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 治療抵抗性膵癌に特徴的な遺伝子変異を検出し同定する。

当科では2006年から2019年に膵癌に対し443例の膵切除術を経験し、250例に術前化学放射線療法を施行し、193例は手術先行で膵切除を行った。術前治療施行250例中12例では遠隔転移の出現、8例では原発巣増大により非切除となった。このような切除可能膵癌・切除可能境界膵癌に対する術前化学放射線療法中に切除不能となった症例、さらには手術加療後、早期再発をきたした症例、また切除不能膵癌に対する全身化学療法中に腫瘍増大や遠隔転移を認めた治療抵抗性症例において、治療開始前に内視鏡的に採取された膵癌組織検体あるいは切除標本を用いて次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子解析を行う。また、治療抵抗性症例に特異的な遺伝子変異を特定するため、治療抵抗性を示さなかった症例においても手術切除標本あるいは生検検体を用いて網羅的な遺伝子解析を行う。これらから検出された遺伝子変異を比較することで、治療抵抗性を示す症例において有意に検出される特異的な遺伝子変異を同定する。

(2) 宿主免疫機構における治療抵抗性メカニズムの解明

治療抵抗性膵癌症例に特異的に認められた遺伝子変異と腫瘍内の免疫状態の関連性を検討する。治療抵抗性症例の生検検体および切除組織検体に対して、CD200 発現の程度を免疫組織化学染色法を用いて調べる。CD200 高発現例、低発現例それぞれにおいて CD4, CD8, CD45RO などの腫瘍浸潤リンパ球サブセットの分子発現を調べ、腫瘍内リンパ球浸潤能を評価する。治療抵抗性に特異的にみられる遺伝子と腫瘍免疫との関連性を明らかにし、治療抵抗性獲得のメカニズムを解明する。

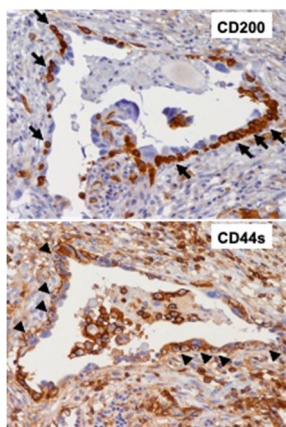
(3) *in vitro* において特定された候補遺伝子と治療抵抗性との関連性メカニズムの包括的解明。

治療抵抗性膵癌において特異的に認められた遺伝子変異をもつ膵癌細胞株において、siRNA 法を用いて腫瘍細胞の治療抵抗性関連遺伝子をノックダウンさせ、コントロール細胞と比較し、腫瘍細胞の増殖能・浸潤能・転移能・治療感受性に及ぼす影響及びその機序を詳細に検討する。10%FBS 含有 RPMI-1640、もしくは MEM/EBSS にてノックダウンされた細胞とコントロール細胞を培養し、FACS や western blot, RT-PCR 等の手法を用いて増殖能・浸潤能・転移能について調べる。さらに、CD200 発現が腫瘍免疫を抑制していることから CD200 発現もノックダウンさせ、更なる抗腫瘍効果が得られるかを評価する。治療抵抗性関連遺伝子が複数同定された場合は、それぞれ個別に当該遺伝子をノックダウンさせ上記の検討を行うと共に、複数の遺伝子を同時にノックダウンさせることでより強い抗腫瘍効果を得られるかどうかを検討する。さらに既存の膵癌化学療法剤 (Gemcitabine, 5FU, Oxaliplatin, Irinotecan, Nab-paclitaxel) を種々の条件で添加するとともに放射線照射も行い化学放射線療法感受性に及ぼす影響を検討する。

(4) CD200 発現に関与する候補遺伝子ノックダウンによる抗腫瘍効果の検証

マウス膵癌細胞株 PAN02 の特定した治療抵抗性関連遺伝子を siRNA 法を用いてノックダウンし、治療抵抗性関連遺伝子ノックダウン細胞株を作成する。その後、治療抵抗性関連遺伝子ノックダウン細胞株とコントロール細胞株をそれぞれ C57/BL6 野生型マウスの皮下に移植し、放射線治療 (7Gy, 低容量 10 回分割照射) および Gemcitabine, 5FU, Oxaliplatin, Irinotecan, Nab-paclitaxel などの既存の化学療法剤を投与し、腫瘍径変化、遠隔転移の有無、転移個数、マウス生存率などを対照群と比較する (図 4)。さらに CD200 発現もノックダウンさせ、更なる抗腫瘍効果が得られるかを評価する。治療抵抗性関連遺伝子が複数同定された場合は、それぞれ個別に当該遺伝子をノックダウンさせ上記と同様の検討を行うと共に、複数の遺伝子を同時にノックダウンさせることでより強い抗腫瘍効果を得られるかを検討する。これらの検討から、治療抵抗性症例に特異的にみられた遺伝子変異をノックダウンすることで抗腫瘍効果増大に結びつく可能性があることを *in vivo* において明らかにすることができる。これら一連の検討を行うことにより、腫瘍免疫と治療抵抗性遺伝子との包括的な解明を行うことができれば、今後、個別化治療の確立とともに治療抵抗性克服による免疫療法を含む集学的治療の構築につながるものと推測する。

4. 研究成果



当科では手術を企図した切除可能・切除可能境界膵癌症例に対して 2008 年より現在に至るまで術前化学放射線療法を一貫して行ってきたが、術前化学放射線療法施行 250 例中 20 例 (8%) が治療抵抗性を示し、切除不能となっていた。

治療抵抗性獲得膵癌に特徴的な遺伝子変異の同定および特定された候補遺伝子と CD200 発現との関連性の包括的解明、治療抵抗性メカニズム、候補遺伝子ノックダウンによる抗腫瘍効果の検証を行うことを予定した。腫瘍免疫学的検討として、腫瘍周囲浸潤リンパ球との関連を検討し、CD200 発現例で IL-2 が有意に低く、治療抵抗性を示す可能性を示した。これら治療抵抗性と関連する遺伝子の同定のため、治療抵抗性を示した症例と、治療奏功した症例を分類し、遺伝子解析を行ったが、現時点で治療抵抗性膵癌に特徴的な遺伝子変異の検出・同定することができなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Nagai Minako, Wright Michael J., Ding Ding, Thompson Elizabeth D., Javed Ammar A., Weiss Matthew J., Hruban Ralph H., Yu Jun, Burkhart Richard A., He Jin, Cameron John L., Wolfgang Christopher L., Burns William R.	4. 巻 30
2. 論文標題 Oncologic resection of pancreatic cancer with isolated liver metastasis: Favorable outcomes in select patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Sciences	6. 最初と最後の頁 1025 ~ 1035
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jhbp.1303	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 該当する
1. 著者名 Nagai Minako, Nakagawa Kenji, Nishiwada Satoshi, Terai Taichi, Hokuto Daisuke, Yasuda Satoshi, Matsuo Yasuko, Doi Shunsuke, Akahori Takahiro, Sho Masayuki	4. 巻 46
2. 論文標題 Clinically Relevant Late Onset Biliary Complications After Pancreatoduodenectomy	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 1465 ~ 1473
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-022-06511-2	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 Nagai Minako, Nakamura Kota, Terai Taichi, Kohara Yuichiro, Yasuda Satoshi, Matsuo Yasuko, Doi Shunsuke, Sakata Takeshi, Sho Masayuki	4. 巻 23
2. 論文標題 Significance of multiple tumor markers measurements in conversion surgery for unresectable locally advanced pancreatic cancer	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pancreatology	6. 最初と最後の頁 721 ~ 728
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.pan.2023.06.001	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 Gemenetzi Georgios, Blair Alex B., Nagai Minako, Groot Vincent P., Ding Ding, Javed Ammar A., Burkhart Richard A., Fishman Elliot K., Hruban Ralph H., Weiss Matthew J., Cameron John L., Narang Amol, Laheru Daniel, Lafaro Kelly, Herman Joseph M., Zheng Lei, Burns William R., Wolfgang Christopher L., He Jin	4. 巻 29
2. 論文標題 Anatomic Criteria Determine Resectability in Locally Advanced Pancreatic Cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Annals of Surgical Oncology	6. 最初と最後の頁 401 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-021-10663-1	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 該当する

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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