

令和 5 年 5 月 21 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K07699

研究課題名（和文）術前の段階で術後予後を予測する膵癌予後予測マーカーの臨床応用

研究課題名（英文）Clinical application of prognostic markers for pancreatic cancer to predict postoperative prognosis at the preoperative stage

研究代表者

小笠原 光成 (Ogasawara, Mitsunari)

高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・助教

研究者番号：10605215

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：独自の基礎研究により膵癌細胞の浸潤・転移に関わるRUVBL1とPRDX1を同定した。本研究では、2022年度に後ろ向き試験の予後解析を終了し、RUVBL1とPRDX1をノックダウンしたヒト膵癌細胞株を用いたマウス実験を実施する。後ろ向き臨床試験は手術前に採取した膵癌生検組織を用いて術後2年生存率の予後解析を行った結果、RUVBL1とPRDX1の両方が高発現である群は低発現群に比べて有意に予後不良であった。ヒト膵癌浸潤・転移モデルマウスを用いた基礎研究では、RUVBL1とPRDX1を発現抑制したヒト膵癌細胞株PANC-1細胞を膵臓に移植したマウスは、コントロール群に比較して予後が延長した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

全身状態、CA19-9、肝転移、腹膜播種などが膵癌の予後予測因子として報告されている。しかし、これらの論文報告では、臨床病期との比較が詳細に行われていない。膵癌患者の予後を手術前に高い精度で予測できる方法を定めることができれば、特にステージIIAまでの切除可能膵癌において術前治療の適応基準を決めることが臨床の現場の重要課題であり、本研究の成果が術前化学療法を必要とする患者を絞り込むことに貢献できる可能性がある。本研究は、臨床病期だけでは不十分な予後予測を補完することのできる世界初のバイオマーカー同定を目指しており、臨床のニーズに合致した研究を推進できると考えている。

研究成果の概要（英文）：Through our own basic research, we identified RUVBL1 and PRDX1 associated with the invasiveness and metastasis of pancreatic cancer cells. Currently, we are conducting a retrospective clinical study for prognostic analysis of RUVBL1 and PRDX1 by immunohistochemical staining using 25 pancreatic cancer tissue samples preoperatively obtained by the fine-needle aspiration biopsy. In this study, (1) we completed the prognostic analysis of the retrospective study in 2022, and (2) we completed mouse experiments using human pancreatic cancer cell lines with knockdown of RUVBL1 and PRDX1. This clinical study showed that the group with high expression of both RUVBL1 and PRDX1 had a significantly worse prognosis than the low expression group. In a basic study using a mouse model, the prognosis of mice transplanted with human pancreatic cancer cell line PANC-1 cells, in which the expression of RUVBL1 and PRDX1 was suppressed, showed a longer prognosis than that of the control group.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 予後予測マーカー

1. 研究開始当初の背景

日本における膵癌は近年増加傾向にあり、日本人の癌による死因の全体で肺、胃、大腸に次いで第4位である。膵癌の5年生存率は5~10%と極めて低い数値である。予後不良の膵癌は、臨床病期により治療法が決定され、また、臨床病期は膵癌予後の指標としても用いられている。しかし、臨床病期がステージIの膵癌であっても術後の5年生存率は40%であり、膵癌予後を正確に予測できる予後規定因子を同定することは臨床的意義がある。最近、遠隔転移のない局所進行膵癌症例において、手術前の化学療法もしくは放射線療法と手術の併用により治癒する症例が増えてきている。どのような症例に対して積極的な術前治療を行うかを判断するためにも、臨床病期に比較して優れた予後予測のマーカーが必要である。

「膵癌の予後を臨床病期より正確に予測することのできるマーカーがあるのか」という問いから研究を進めている。膵癌は2cm以下の小さなサイズの段階から浸潤・転移する傾向がある。膵癌の浸潤・転移機構を解明する基礎研究を行うことにより、浸潤・転移に関わるシグナル伝達分子の中から予後予測因子を同定できるのではないかと考えた。

2. 研究の目的

膵癌細胞の浸潤・転移に関わる重要なシグナル伝達因子である RUVBL1 と PRDX1 の組み合わせが臨床病期に基づく予測よりも高い精度で手術前の段階で予後を正確に予測できるかを解析することを目的とする。現在、後ろ向き臨床試験(UMIN000032835)を高知大学医学部消化器内科において実施しており、2022年12月に予後解析を終了予定である。手術適応の膵癌25症例を対象とし、手術前に超音波内視鏡下穿刺吸引法(EUS-FNA)により採取した膵癌生検組織を用いる。抗 RUVBL1 抗体および抗 PRDX1 抗体を用いた免疫組織染色の結果を、染色の強さと範囲によりスコア化し、RUVBL1 と PRDX1 の両方が高発現している膵癌症例では手術を受けたにも関わらず予後が不良であるかを解析する。膵癌症例の予後を術前に正確に予測することは、手術前の化学療法の必要性を決定する際に有用な情報となり得る。膵癌患者にとって治療法を適切に選択することは、予後改善のために重要である。

3. 研究の方法

① 本研究の予後予測因子が術前の段階で臨床ステージ分類よりも正確に予後を予測できるかを解析する。

RUVBL1 と PRDX1 の組み合わせが、臨床病期に基づく予測よりも高い精度で術前の段階で術後予後を正確に予測できるかを明確にすることを目的とした後ろ向き臨床試験(UMIN000032835)を実施している。手術適応である膵癌25症例を対象とし、手術前にEUS-FNAにより採取した膵癌生検組織を用いる。それぞれの抗体を用いた免疫組織染色

の結果を、染色の強さと範囲によりスコア化する。Kaplan-Meier 生存曲線、log rank test による 1 年生存率の予後解析を終了した。RUVBL1 と PRDX1 の両方が高発現である群では低発現群に比べて統計学的に有意に予後不良であり ($p=0.006$)、術前の段階で正確な予後を予測し得ることが示された。臨床病期を調整した多変量 cox 比例ハザードモデルを用いた解析では、RUVBL1 と PRDX1 の両方が高発現の症例の予後は統計的に有意に不良であった ($p=0.04$)。EUS-FNA により採取した膵癌組織を用いた場合、RUVBL1 と PRDX1 の組み合わせは手術を受けたにもかかわらず予後不良であった症例を 1 年生存率という極めて早い段階で正確に予測できていた。2022 年度まで予後追跡を行う。本研究において最終の予後解析を実施し、術前の段階で術後予後を正確に予測できるかを明確にする。

② RUVBL1 と PRDX1 の組み合わせが膵癌の予後に関わるかを *in vivo* 実験により解析する

RUVBL1 と PRDX1 をノックダウンするために、RNA 干渉の一つである small interfering RNA (siRNA) を発現するベクターをヒト膵癌細胞株 PANC-1 に遺伝子導入する。RUVBL1 と PRDX1 を標的とするそれぞれの siRNA を組み込んだ pGFP-V-RS レンチウイルスベクター (OriGene Technologies 製) を用いる。RUVBL1 に対する siRNA と PRDX1 に対する siRNA の両方を安定的に発現する PANC-1 細胞由来のクローン細胞を樹立する。スクランブルコントロール siRNA を恒常的に発現する PANC-1 クローン細胞も樹立する。モデルマウスは、既に実験手法を確立しているヒト膵癌浸潤・転移モデルマウスを用いる (*Cancer Res* 2011;71:895-905, *Oncotarget* 2014;5:6832-45)。ヌードマウスを麻酔下で開腹し、膵臓内にヒト膵癌細胞を移植し閉腹する。マウス膵臓で形成された膵癌組織は継時的に増大し、後腹膜浸潤、腹膜播種、肺と肝臓への遠隔転移が生じるので、ヒト膵癌の進展に類似した同所移植モデルマウスである。本研究では、RUVBL1 と PRDX1 の両方を発現抑制した PANC-1 細胞とコントロール細胞を各群 10 匹のヌードマウスの膵臓に移植する。移植後 12 週目までの生命予後および全身状態の変化を観察する。RUVBL1 と PRDX1 をノックダウンした PANC-1 細胞を移植した群において、スクランブルコントロール群に比較して予後が延長したかを解析する。また、後腹膜浸潤、腹膜播種および肺と肝臓への遠隔転移の程度を病理組織学的に検討し、RUVBL1 と PRDX1 をノックダウンした PANC-1 細胞を移植した群において浸潤・転移抑制効果の有無を明確にする。

4. 研究成果

① 後ろ向き臨床試験における RUVBL1 と PRDX1 の予後解析

術前膵癌生検組織を用いた後ろ向き臨床試験において本研究の予後予測因子が臨床病期に基づく予測よりも高い精度で術前の段階で予後を正確に予測できることを明らかにした。2 年生存率の予後解析を実施し、RUVBL1 と PRDX1 の組み合わせは 1 年生存率の予後解析の結果同様に術前の段階で 2 年生存の予測を正確に行うことができた。術前化

学療法を行うべき症例を絞り込めるかを解析したが、後ろ向き試験では術前治療を受けた症例の登録が少なかった。ある程度の傾向をつかむことができたので、別試験である前向き試験において術前化学療法との関連性を解析する予定である。

② ヒト膵癌オルガノイド・モデルマウスを用いた *in vivo* 実験結果

RUVBL1 に対する siRNA と PRDX1 に対する siRNA の両方を安定的に発現する PANC-1 細胞由来のクローン細胞を樹立した。これらの細胞とスクランブルコントロール siRNA を恒常的に発現する PANC-1 クローン細胞をヌードマウスの膵臓に同所移植を行った。移植後 12 週間の予後観察を終了し、予後データと膵癌腫瘍組織の固定標本を得た。

RUVBL1 と PRDX1 をノックダウンした膵癌細胞を移植されたマウス群では、コントロールと比較して予後改善することを示すデータを得ている。現在、病理組織学的解析を行っており、今後は異なる膵癌モデルマウスを用いて再現性の確認実験を行う必要がある。

<論文>

1. Taniuchi K, Ogasawara M: KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer. *Oncotarget* 11:131-147, 2020.
2. 谷内恵介: 10mm 以下膵癌診断における膵癌細胞エクソソーム由来 RNA 検索の可能性. *胆と膵* 41:401-407, 2020.
3. 谷内 恵介、岡林 雄大、阪口 昌彦、岩田 純: 膵管内乳頭粘液性腫瘍の診断マーカー同定と診断応用. *日本消化器病学会雑誌* 118:235-244, 2021.
4. Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, Furihata M, Taniuchi K: Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid. *Hum Cell* 35:735-744, 2022.
5. Taniuchi K, Ueno M, Yokose T, Sakaguchi M, Yoshioka R, Ogasawara M, Kosaki T, Naganuma S, Furihata M: Upregulation of PODXL and ITGB1 in pancreatic cancer tissues preoperatively obtained by EUS-FNAB correlates with unfavorable prognosis of postoperative pancreatic cancer patients. *PLoS ONE* 17:e0265172, 2022.

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 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tanaka C, Furihata K, Naganuma S, Ogasawara M, Yoshioka R, Taniguchi H, Furihata M, Taniuchi K.	4. 巻 35
2. 論文標題 Establishment of a mouse model of pancreatic cancer using human pancreatic cancer cell line S2-013-derived organoid.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Human Cell	6. 最初と最後の頁 735-744
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s13577-022-00684-7.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taniuchi K, Ueno M, Yokose T, Sakaguchi M, Yoshioka R, Ogasawara M, Kosaki T, Naganuma S, Furihata M.	4. 巻 17
2. 論文標題 Upregulation of PODXL and ITGB1 in pancreatic cancer tissues preoperatively obtained by EUS-FNAB correlates with unfavorable prognosis of postoperative pancreatic cancer patients.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLoS One	6. 最初と最後の頁 e0265172
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0265172.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 Taniuchi K, Ogasawara M.	4. 巻 11
2. 論文標題 KHSRP-bound small nucleolar RNAs associate with promotion of cell invasiveness and metastasis of pancreatic cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Oncotarget	6. 最初と最後の頁 131-147
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18632/oncotarget.27413	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -
1. 著者名 谷内 恵介、岡林 雄大、阪口 昌彦、岩田 純	4. 巻 118
2. 論文標題 膵管内乳頭粘液性腫瘍の診断マーカー同定と診断応用.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 日本消化器病学会雑誌	6. 最初と最後の頁 235-244
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.11405/nisshoshi.118.235	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1件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 谷内 恵介
2. 発表標題 新規治療薬の承認を目指した膵癌研究.
3. 学会等名 第38回日本ヒト細胞学会総会（招待講演）
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 膵がん及び膵管内乳頭粘液性腫瘍のマーカー	発明者 谷内 恵介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-115619	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 膵がん診断キット	発明者 谷内 恵介	権利者 高知大学
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-174333	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計1件

産業財産権の名称 Marker for pancreatic cancer and intraductal papillary mucinous neoplasms	発明者 谷内 恵介	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、2016367349 (Australia)	取得年 2021年	国内・外国の別 外国

〔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	谷内 恵介 (Taniuchi Keisuke) (50626869)	高知大学・教育研究部医療学系臨床医学部門・准教授 (16401)	

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