

令和 6 年 5 月 15 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K09094

研究課題名(和文)ゲノム・遺伝子変異プロファイル解析を用いた膵癌における新規治療戦略の構築

研究課題名(英文) Possibility of prognosis prediction by genomic mutation analysis using preoperative ctDNA and resected specimens in pancreatic ductal cancer

研究代表者

浅野 賢道 (Asano, Toshimichi)

北海道大学・大学病院・助教

研究者番号：10756688

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)：術前ctDNAを用いた解析では、K-rasおよびTP53の遺伝子変異が再発予測因子として同定され、K-ras/TP53変異陽性例は陰性例に比べ、有意に無再発生存期間(recurrence-free survival ;RFS)が短かった(2.7か月vs not reached, $p<0.001$)。切除検体を用いた解析では、1年未満の早期再発群でK-ras、TP53、SMAD4、CDKN2Aの遺伝子変異が同定された。ゲノム情報と臨床病理学的因子を検討した結果、CA19-9、TP53とSMAD4を用いたmutation scoreの2因子が長期生存予測に有用である可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

消化器癌の中で最も予後不良である膵癌における予後予測因子を明らかにすることは喫緊の課題であり、血液中に含まれる腫瘍細胞から得られるDNA(ctDNA)情報を用いた術前再発予測因子の同定は治療戦略を構築する上で非常に有益な情報である。また、切除検体を用いた遺伝子レベルでの早期再発予測因子の同定も同様に有益である。以上より、画一的な治療ではなく、個別化医療の実践に向けたの可能性を明らかにすることができ、社会的意義は非常に大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：In analysis using preoperative ctDNA, K-ras and TP53 gene mutations were identified as recurrence predictors, and patients with positive K-ras/TP53 mutations had significantly shorter recurrence-free survival than those with negative mutations (2.7 months vs not reached, $p<0.001$). On the other hand, in analysis using resection specimens, gene mutations in K-ras, TP53, SMAD4, and CDKN2A were identified in the early recurrence group (less than 1 year). As a result of examining genomic information and clinicopathological factors, it was suggested that two factors, CA19-9, mutation score using TP53 and SMAD4, may be useful for predicting long-term survival.

研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 リキッドバイオプシー 個別化治療 次世代シーケンサー ゲノム変異 ctDNA circulating tumor DNA

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中で最も予後不良である。近年、本邦では FOLFIRINOX 療法や Gemcitabine+nab-Paxlitaxel 併用療法といった従来の治療法に比して高い抗腫瘍効果を有する新規抗癌剤治療が、切除不能膵癌に対して相次いで保険適応となり、一次治療として用いられている。さらに切除可能境界膵癌に対しても術前治療として行われる機会が増え、予後改善効果が期待されている。われわれは、良好な予後が期待される切除可能膵癌において、術後早期再発例が存在する (Nakamura T, et al. J Gastrointest Surg, 2018) 一方で、切除不能膵癌の中でも化学 (放射線) 療法が奏効し、外科的切除が可能となり、長期生存例も存在する (Asano T, et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2018) ことを明らかにしてきた。このような現状を踏まえ、予後予測因子の同定を目指した種々の臨床病理学的研究が盛んに行われているが、最適な化学療法の選択を含めた治療戦略はいまだに構築されていない。現行のランダム化試験の結果に基づいた画一的な治療を施すのみでは、膵癌の持つ biological な heterogeneity に対応することは困難で、このような状況を打開するためには個別化治療戦略の開発が急務である。一方、次世代シーケンス (NGS) などの分子生物学的技術がめざましい進歩を遂げ、膵癌においてもゲノム・遺伝子変異が徐々に明らかになっている。いまだ新規治療法または治療戦略の確立には至っていないものの、膵癌治療に対する breakthrough となる可能性に大きな注目を集めている。以上より、膵癌の増殖・浸潤および化学療法に対する抵抗性などに関連するゲノム・遺伝子変異を網羅的に解析し、高精度な臨床情報と統合させることにより、ゲノムバイオマーカーを同定し、膵癌における precision medicine の確立が期待されている。

2. 研究の目的

本研究は、現行の膵癌治療ガイドラインを超えた、新しい診断基準による治療指針を構築するもので、現行治療の組み合わせを効率良く患者に適応し、最大限の治療効果を得ることに主眼を置いている。早期発見のための技術開発や新規治療法の開発には、多くの資源や時間を要するが、現行治療の組み合わせを効率よく行うための治療戦略の開発は、資源や時間を節約でき、限られた予算の中で最大限の効果を発揮する手法となりえる。最適な化学療法選択のための遺伝子変異パターンが同定されれば、診断時に行われる endoscopic ultrasound-guided fine needle aspiration (EUS-FNA) や liquid biopsy により得た検体を用いた遺伝子変異解析により、最も有効な薬剤を効率的かつ効果的に導入することが可能になる。さらに、早期再発の変異パターンが判れば、無駄な手術治療を回避でき、症例ごとに外科的手術介入の有益性を判断することが可能となる。

本研究ではゲノム・遺伝子解析により、患者ごとに最適な治療を行うための戦略を構築し、治療介入の最適化を目指す。

3. 研究の方法

(1) NGS による遺伝子変異の網羅的解析

生検検体および切除検体の遺伝子変異解析を行い、化学療法前後の遺伝子変異プロファイルを明らかにするために、次の実験を計画した。

【方法】当施設で化学療法後に手術を受けた膵癌患者 50 例を対象とする。遺伝子パネルには GeneRead DNAseq Targeted Panels V2, Human Comprehensive Cancer Panel[®] (Qiagen 社) を用いる (変異解析対象 160 遺伝子)。生検検体および切除検体のホルマリン固定パラフィン包埋

(formalin-fixed paraffin-embedded; FFPE)組織からマイクロダイセクション法により DNA を抽出し、ライブラリーDNA を作成する。ターゲットシーケンスは Ion PGM™ システム (Thermo Fisher Scientific 社) にて行う。

(2) 新規治療戦略の確立を目指したゲノムバイオマーカーの探索

遺伝子変異と高精度な臨床病理学的情報を統合し、最適な化学療法薬剤選択モデルの開発および術後早期再発予測を目指したゲノムバイオマーカーを同定するため、次の実験を計画した。

【方法】

最適な化学療法薬剤選択モデルの開発：生検検体の遺伝子変異情報と切除検体の病理組織学的腫瘍縮小効果判定 (Evans分類) の関連を検討し、化学療法レジメン別および薬剤別の感受性および抵抗性に関する特徴的な遺伝子変異を同定し、遺伝子変異情報による最適な化学療法薬剤選択のモデルを構築する。

術後早期再発 (1年以内再発) 予測を目指したゲノムバイオマーカーの同定：術後1年以内に再発した早期再発例に特徴的な遺伝子変異を検討し、術前に予測可能なゲノムバイオマーカーの同定を行う。また、副次的に術後5年以上生存例や再発部位別などの検討もを行い、ゲノムバイオマーカーを探索する。

(3) Liquid biopsy による術前診断法の開発

術前に採取された血漿中の cell-free DNA (cfDNA) の解析を行い、切除検体の遺伝子変異情報と比較することにより、術前診断における低侵襲化の可能性を検討するため、次の実験を計画した。

【方法】本研究の解析対象である 50 症例の術前に採取された血漿より NucleoSnap® DNA Plasma (タカラバイオ) を用いて cfDNA を抽出する。膀胱癌由来の DNA (circulating tumor DNA: ctDNA) の有無については、Takai らの報告 (Takai E, et al. Sci Rep, 2015) を参考に、KRAS 遺伝子の変異をベンチマークとし Droplet digital PCR (Bio-Rad 社) を用いてスクリーニングとして行う。ライブラリー調製を行った後、前項で使用した遺伝子パネルを用いてターゲットシーケンスを行う。そして、切除検体の遺伝子変異情報と比較・検討し、術前診断の可能性を追求する。

4. 研究成果

化学療法前後の遺伝子変異プロファイルを明らかにすべく、生検検体および切除検体の NGS による遺伝子変異解析を行った。化学療法前の解析には EUS-FNA により得られた生検検体を用いることを予定しており、22G 針で採取されるため検体量が少ないことは想定していたものの、症例により検体量に大きな差があることが判明した。パイロット的に比較的多く採取されている検体を用いてマイクロダイセクション法による DNA の抽出・精製を行ったが、ターゲットシーケンスに用いるだけの十分な DNA の抽出が極めて困難であった。技術的要因も多分にあると考えられたが、この状況を鑑みると、他の少量検体ではより一層困難であることは容易に予測でき、生検検体を用いた化学療法前の遺伝子変異解析は断念せざるを得なかった。術前治療前の患者から得られている試料は生検検体と血液のみであるため、血液を用いた解析 (liquid biopsy) を優先的に行うことにし、術前治療施行前に採取された血液の血漿中 ctDNA の解析を行った。

(1) 術前 ctDNA を用いた再発予測因子の同定

28 症例に対する術前治療前 ctDNA の解析を行った結果、変異を認めた症例は 12 例 (43%) であり、TP53、K-ras、EGFR の順に多かった。この結果を元に tumor informed approach (TIA) を行ったところ、変異を有した症例は 15 例 (54%) に上昇し (ctDNA-TIA)、変異数はやはり TP53、K-

ras、*EGFR*の順に多く認められた。28症例の切除組織におけるゲノム変異を解析し、ctDNA-TIA との一致率を検討したところ、49%であった。また、同一症例の術前治療後の血液検体の解析も行ったが、変異を認めた症例は7例(25%)であり、*K-ras*、*TP53*、*SF3B1*のみであった。ctDNA-TIA における変異陽性例と陰性例では無再発生存期間(recurrence-free survival; RFS)に有意差を認めなかったが、個別の遺伝子変異に着目すると、*K-ras* 変異陽性例は陰性例比べ有意にRFS が短く(11 months vs not reached, $p<0.001$)、*K-ras* / *TP53* 両陽性の場合はさらにRFS が短いという結果であった(2.7 months vs not reached, $p<0.001$)。術前 ctDNA による早期再発予測に *K-ras* と *TP53* が有用である可能性が示唆された。

(2) 切除検体を用いた早期再発および長期生存予測因子の同定

1年未満で再発を認めた症例を「早期再発」、5年以上生存した症例を「長期生存」とし、各群25例の切除組織を用いた変異解析を行った。その結果、早期再発群で変異を認めたのは、*K-ras*、*TP53*、*SMAD4*、*CDKN2A*であり、特に *TP53* と *SMAD4* は長期生存群との間に差を認める傾向にあった ($p<0.1$)。ゲノム情報と臨床病理学的因子を検討した結果、予後予測因子としてリンパ節転移や門脈浸潤、*TP53* と *SMAD4* を用いた mutation score、CA19-9 が同定された。これらのうち、リンパ節転移や門脈浸潤は術前画像診断による正確な評価が困難であることより、CA19-9、*TP53* と *SMAD4* を用いた mutation score の2因子が長期生存予測に有用である可能性が示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Kazunori Watanabe, Siew-Kee Low, Toru Nakamura, Yasutoshi Kimura, Masayo Motoya, Kimitaka Tanaka, Aya Matsui, Yoshitsugu Nakanishi, Toshimichi Asano, Takehiro Noji, Takahiro Tsuchikawa, Satoshi Hirano
2. 発表標題 Detection of ctDNA in pancreatic cancer using ultradeep targeted NGS using unique molecular index
3. 学会等名 第34回日本肝胆膵外科学会・学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中村 透、渡邊 一永、木村 康利、浅野 賢道、村上 武志、篠原 良仁、北山 陽介、福田 啓人、竹政 伊知朗、平野 聡
2. 発表標題 浸潤性膵管癌における術前 ctDNA の有用性- 臨床実装化への課題-
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
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
研究分担者	中村 透 (Nakamura Toru) (70645796)	北海道大学・医学研究院・助教 (10101)	
研究分担者	土川 貴裕 (Tsuchikawa Takahiro) (50507572)	北海道大学・大学病院・講師 (10101)	

6. 研究組織（つづき）

	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	平野 聡 (Hirano Satoshi) (50322813)	北海道大学・医学研究院・教授 (10101)	
研究分担者	畑中 豊 (Hatanaka Yutaka) (30589924)	北海道大学・大学病院・特任准教授 (10101)	
研究分担者	畑中 佳奈子 (Hatanaka Kanako) (10399834)	北海道大学・大学病院・特任講師 (10101)	
研究分担者	天野 虎次 (Amano Toraji) (20374514)	北海道大学・大学病院・特任助教 (10101)	

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