

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：83802

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H04288

研究課題名(和文)大規模臨床試験検体を用いたバイオマーカーによる膵癌テーラーメイド補助療法の確立

研究課題名(英文) Establishment of tailor-made adjuvant therapy for pancreatic cancer with biomarker using JASPAC 01 samples

研究代表者

上坂 克彦 (Uesaka, Katsuhiko)

静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員

研究者番号：20283434

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：JASPAC 01研究に参加登録した377例中、326例の検体に対し、hENT1、DPDの免疫染色を行った。326例中、hENT1は100例で陽性、DPDは63例で陽性であった。S-1治療群では、hENT1陽性群で生存期間中央値が58か月とhENT1陰性群の30.9か月と有意に良好であったが( $P=0.007$ )、DPD発現の有無は予後に関連しなかった。一方、塩酸ゲムシタピン治療群では、hENT1、DPD発現のいずれもが予後に関連を認めなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌切除後の補助化学療法は、わが国においてはS-1が第一選択肢であるが、hENT1発現陽性の患者においては、塩酸ゲムシタピンも第一選択肢となる可能性が示唆された。mRNA発現解析によって、予後予測に有用なバイオマーカー候補が検出され、これら新規バイオマーカーを組み合わせることで、より感度の高い予後予測、個別化した補助化学療法の実施に発展できると考えられた。

研究成果の概要(英文)：The specimens were available for 326 of 377 (86.5%) patients. High expression of hENT1 and DPD was observed in 100 and 63 of 326 patients (30.7% and 19.3%), respectively. In the S-1 arm, the median overall survival (OS) for the S-1-treated patients with low hENT1 was 58.0 months compared with 30.9 months for those with high hENT1, with hazard ratio of 1.75 ( $P = 0.007$ ). In contrast, there were no significant differences of OS, stratified by DPD expression in the S-1 arm and hENT1 and DPD expressions in the gemcitabine arm.

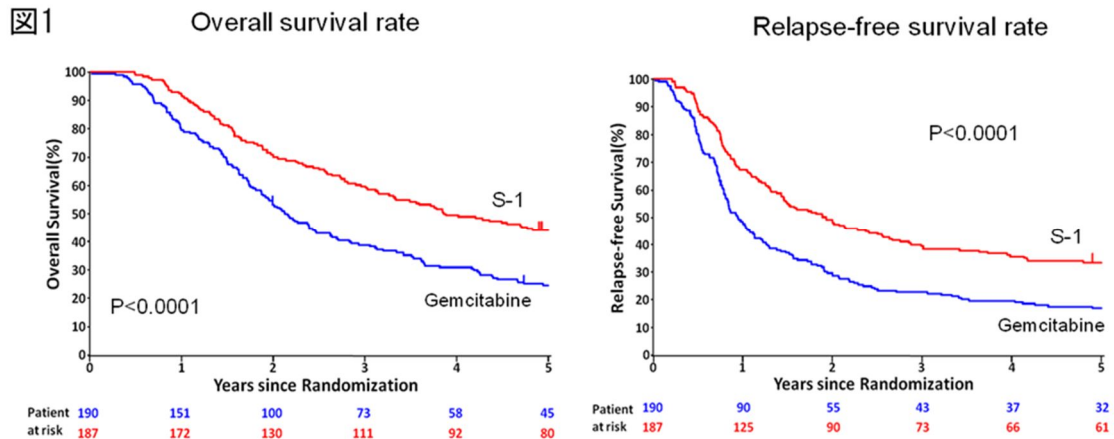
研究分野：消化器外科学

キーワード：膵癌 補助化学療法 S-1 塩酸ゲムシタピン hENT1 DPD

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌治療後の補助化学療法は長きにわたって塩酸ゲムシタピンのみが使用されてきたが、その効果は限定的であり、我々は多施設共同第III相試験であるJASPAC 01試験を実施した。この試験は、膵癌治療後の補助化学療法としてGEMとS-1の効果と比較したものであるが、S-1が、GEMに対して高い優越性(ハザード比 0.57)を示した結果をLancet誌に報告した(図1)(Uesaka et al. Lancet 2016)。この結果はわが国の実地診療に大きな影響を与え、すみやかに膵癌診療ガイドラインに反映されている。



JASPAC 01試験が大きな成果と同時にもたらした課題として、GEMおよびS-1の有効性に大きな個人差があった点が挙げられる。各群全体の生存率はS-1群が上回ったものの、GEM群でも長期無再発生存者が含まれ、逆にS-1群にも早期再発死亡例が含まれていた。とくに再発形式をみると、S-1がGEMより局所、肝再発を強く抑制しているのにくらべ、リンパ節、腹膜再発の抑制効果が弱いことがわかる。肺再発においては、統計学的有意差は認めないものの、S-1の方が23例(12%)とGEMの16例(8%)より多いのは注目すべき点である。

我々は、JASPAC 01のこれらの結果に今後の膵癌補助化学療法のさらなる成績向上の鍵があると考えた。そこで大規模臨床試験であるJASPAC 01のデータ、試料を用いて、バイオマーカー探索をすることで膵癌治療全体のテーラーメイド治療が可能になるのではと着想し、本研究を計画した。

膵癌治療後の予後をさらに改善させるためには、より適した治療を、より適した患者に行う、テーラーメイド治療が必要である。これを可能とするためには鋭敏な治療効果予測バイオマーカーが必要であるが、膵癌において実用段階に達しているものはない。過去の研究は、限定的な症例数をretrospectiveに解析したものが多く、信頼性のあるデータが得られていない。私たちはわが国の膵癌診療ガイドラインのみならず国際的にもインパクトを与えた前向き臨床試験であるJASPAC 01のデータおよび付随する試料をもとに検討を行うという大きなアドバンテージがある。

S-1は本邦で開発された抗腫瘍剤であるが、膵癌において大規模臨床試験データを活用し、効果予測バイオマーカーについて検討した報告はなく、抗腫瘍剤の効果、忍容性は人種によって大きいことが知られている。本研究は日本人を対象として膵癌治療全体の成績向上につながる効果予測バイオマーカーの同定を目指している点において重要な意義があると考えられる。

S-1およびGEMの効果、副作用が事前に予測できれば、個別に最適な治療法選択、治療期間決定に加えて、フォローアップ方法も至適化が可能であり、これまでS-1、GEMの薬剤感受性に関しては、DPYD(DPD)、SLC29A1(hENT1)が有用なバイオマーカーとの報告がある。

本研究により提案されるバイオマーカーは、現在の膵癌診療現場にすみやかに還元され、バイ

オマーカーによる膵癌治療アルゴリズムへの発展、最も悪性度の高い固形癌である膵癌の治療成績を改善させうるものと考える。

術後補助化学療法のアルゴリズムは、過去の報告より以下の4パターンが想定される。この仮説を証明することにより、GEMの方がS-1より効果が期待できる症例の広い上げが可能となる。

過去の報告より、SLC29A1+の場合、GEMが有効、DPYD-の場合、S-1が有効と考える

- | 発現パターン            | 推奨補助療法       | 今後の展望                                  |
|-------------------|--------------|--|
| a) SLC29A1+/DPYD- | S-1+GEM>S-1? | S-1+GEMがより奏功する可能性あり。                   |
| b) SLC29A1+/DPYD+ | GEM>S-1?     | <b>この群の拾い上げにより切除例のさらなる治療成績向上が可能となる</b> |
| c) SLC29A1-/DPYD- | S-1          |  |
| d) SLC29A1-/DPYD+ | S-1?         | C)群との治療成績比較が重要                         |

## 2. 研究の目的

1. これまで、S-1においてはDPYD低発現、GEMにおいてはSLC29A1高発現が、治療効果良好の予測因子であると報告されている。しかし、発現評価方法や至適カットオフ値を含む判定基準については一定の見解を得ない。JASPAC 01 検体をもとにS-1およびGEMの感受性予測に重要と考えるDPYD、SLC29A1のmRNA発現解析、免疫染色を行い、治療効果予測に有用な判定基準を明らかにする。また判定手段として、mRNA発現量、免疫染色のいずれが高感度であるかも明らかにする。
2. JASPAC 01 検体を用いて、膵癌バイオマーカー候補遺伝子のmRNA発現解析を行い、予後、有害事象発生と強い相関を示す遺伝子を明らかにする。
3. 予後、有害事象発生と強い相関を示す遺伝子に関しても、免疫染色を行い、mRNA発現においては、有用なカットオフ値を設定し、判定手段として、mRNA発現量、免疫染色のいずれが高感度であるかも明らかにする。

## 3. 研究の方法

本研究における測定因子候補は、過去の文献報告等を参考に抽出した13遺伝子と、公開データベース上の膵がんの遺伝子発現プロファイリングデータセットを再解析し、予後関連遺伝子として抽出した9遺伝子をあわせた計22遺伝子とする。

SLC29A1	TP53	VEGFA	CDKN3	FOXM1
DPYD	CDKN2A/p1	SPARC	CIT	NPR3
TYMS	SMAD4/DPD4	RUNX3	DSG2	TUBB
KRAS	RRM1	ADAM19	E2F7	WDHD1
EGFR	UMPS			

### 1). 免疫組織化学染色

解析を予定する22種類の候補遺伝子のうち、SLC29A1、DPYDは、本研究の主目的であるS-1およびGEMの効果予測に重要であるため、他の候補遺伝子に優先して免疫染色・解析を行う。

次にmRNAの発現解析と臨床データの比較検討より得られた、SLC29A1、DPYD以外の臨床応用への可能性が高いバイオマーカー候補遺伝子の免疫染色を行う。

## 2). mRNA 発現解析

表内 22 遺伝子の mRNA レベルを以下の流れで測定する。

- ・ホルマリン固定パラフィン包埋標本から得られる薄切切片から、HE 染色によるガイドスライドを参考に癌病変部を確認して癌部組織をマイクロダイセクションする。
- ・RNA 抽出 kit を用いて均一かつ高品質な RNA を抽出後、cDNA 合成を行う。
- ・プレ増殖を行うための PCR を行う。
- ・TaqMan Array 法にてリアルタイム PCR を行い、mRNA 発現量を測定する。

## 4 . 研究成果

### 1). 免疫組織化学染色 (SLC29A1, DPYD)

JASPAC 01 に登録された 377 例中 326 例 (86.5%) において、DPYD, SLC29A1 の免疫組織化学染色を行い得た。326 例中、GEM 群が 166 例、S-1 群が 160 例 (図 2) であり、患者背景は JASPAC 01 同様、2 群間に有意差を認めなかった。

染色強度は、absence, weak, moderate, strong の 4 段階に分け (図 3)、absence/weak を low group、moderate/strong を high group として予後に関する解析を行った。

SLC29A1 は、染色強度 absence, weak, moderate, strong を 80, 146, 69, 31 例でそれぞれ認め、DPYD low は 226 例、high は 100 例であった。

DPYD は、染色強度 absence, weak, moderate, strong を 95, 168, 54, 9 例でそれぞれ認め、DPYD low は 263 例、high は 63 例であった

### SLC29A1, DPYD 発現と予後の関係

#### SLC29A1

GEM 治療が行われた SLC29A1 low 群の生存期間中央値が 26.1 か月に対し、SLC29A1 high 群の生存期間中央値は 25.5 か月と統計学的有意差は認めなかった (ハザード比 1.05、 $P=0.786$ : 図 4A)

が、S-1 治療が行われた SLC29A1 low 群の生存期間中央値は 58 か月と、SLC29A1 high 群の生存期間中央値 30.9 か月と比較し、有意に良好であった (ハザード比 1.76、 $P=0.007$ : 図 4B)。

#### DPYD

GEM 治療が行われた DPYD low 群の生存期間中央値が 26.1 か月に対し、DPYD high 群の生存期間中央値は 25.5 か月と統計学的有意差は認めず (ハザード比 1.18、 $P=0.444$ : 図 4C)

S-1 治療が行われた DPYD low 群の生存期間中央値は 44.6 か月、DPYD high 群の生存期間中央値 42.7 か月と比較し有意差は認めなかった (ハザード比 0.95、 $P=0.833$ : 図 4D)。

図2

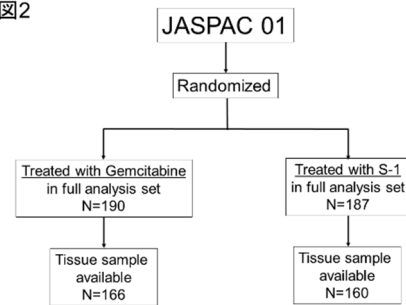


図3 SLC29A1

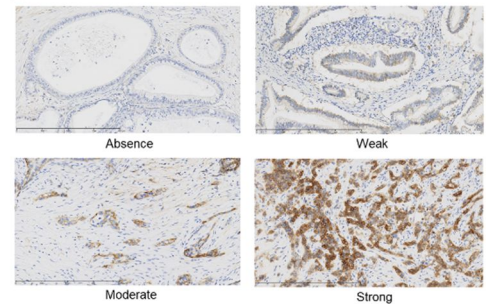
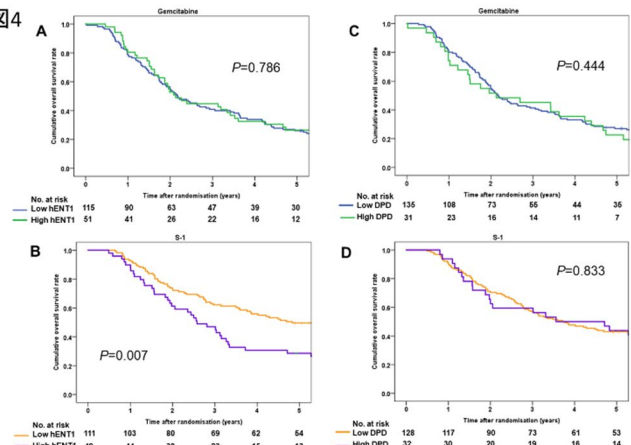


図4



本検討からは、当初の仮説は否定され、SLC29A1, DPYD 発現から考えられる膀胱癌術後補助化学療

法の推奨レジメンは以下の通りとなる。

発現パターン	当初の仮説	本検討結果からの推奨レジメン
a) SLC29A1+/DPYD-	S-1+GEM>S-1?	S-1 or GEM
b) SLC29A1+/DPYD+	GEM>S-1?	S-1 or GEM
c) SLC29A1-/DPYD-	S-1	S-1
d) SLC29A1-/DPYD+	S-1?	S-1

S-1 治療群において、予後因子について解析すると、SLC29A1 high (moderate/strong)は、CA19-9、所属リンパ節転移、がん遺残度とならび、独立した予後因子となった(ハザード比 1.61, 95% 信頼区間 1.06-2.45、P=0.027)。

## 2). mRNA 発現解析

DPD, hENT1 mRNA 発現量と予後の関係

検体集積が可能であった 326 例中、DPD mRNA 発現量は 310 例、hENT1 mRNA 発現量は 309 例で解析可能であった。それぞれの中央値は、8.7 (範囲: 0.7-161.2)、19 (範囲: 1-272.1)であった。術後 2 年生存に対する cut-off を決めるため、ROC 曲線を用いて解析を行ったが、術後 2 年生存に対する DPD, hENT1 mRNA 発現量の AUC (area under the curve)は、それぞれ 0.524、0.535 と 0.7 を下回っており、予後予測に有用な mRNA 発現量の cut-off 値は設定するのは困難であった。

DPD, hENT1 mRNA 発現量と免疫染色発現強度の関係

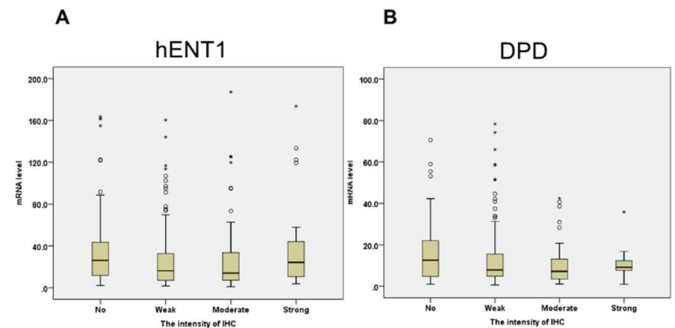
hENT1

免疫染色強度 absence, weak, moderate, strong の mRNA 発現量の中央値は、それぞれ 26.2, 16.2, 7.2, 24.3 であり、mRNA 発現量と免疫染色強度に相関は認めなかった (図 5A)。

DPD

免疫染色強度 absence, weak, moderate, strong の mRNA 発現量の中央値は、それぞれ 12.6, 7.9, 7.2, 9.2 であり、mRNA 発現量と免疫染色強度に相関は認めなかった (図 5B)。

図5



表内 22 遺伝子の mRNA 発現量と予後の関係

バイオマーカー候補 22 遺伝子中、E2F transcription factor 7 (E2F7) の mRNA 発現量が予後と相関していた (図 6)。

Website

上

(<http://kmpplot.com/analysis/>) の Kaplan-Meier Plotter でも結果の再現性が確認でき、E2F7 の発現は膵癌においても他癌腫と同様に予後と相関しており、臨床応用につながる新規膵癌関連分子となると考えられた。

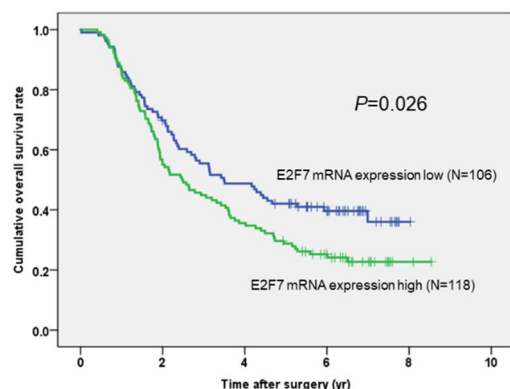


図6: JASPAC 01の検体を用いたバイオマーカー研究において、膵がん腫瘍組織中のE2F7高発現群は低発現群と比較し、有意に予後不良であった。この結果は、E2F7発現レベルが、膵がん切除後の予後予測マーカーとなりうることを示唆している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Okamura Y, Yasukawa S, Narimatsu H, Boku N, Fukutomi A, Konishi M, Morinaga S, Toyama H, Kaneoka Y, Shimizu Y, Nakamori S, Sata N, Yamakita K, Takahashi A, Kainuma O, Hishinuma S, Yamaguchi R, Nagino M, Hirano S, Yanagisawa A, Mori K, Uesaka K	4. 巻 111
2. 論文標題 Human equilibrative nucleoside transporter 1 expression is a predictor in patients with resected pancreatic cancer treated with adjuvant S-1 chemotherapy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Cancer Science	6. 最初と最後の頁 548 ~ 560
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/cas.14258	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Y. Okamura, S. Yasukawa, K. Mori, N. Boku, A. Fukutomi, M. Konishi, S. Morinaga, H Toyama, Y. Kaneoka, Y. Shimizu, S. Nakamori, N. Sata, O. Kainuma, Y. Kitano, H. Sakamoto, R. Yamaguchi, S. Hishinuma, S. Hirano A. Yanagisawa, K. Uesaka
2. 発表標題 DPD and hENT1 are not predictive in patients with resected pancreatic cancer treated with adjuvant S-1 or gemcitabine chemotherapy: Collaborative study of the JASPAC 01 trial.
3. 学会等名 Society of Surgical Oncology 72nd Annual Cancer Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yukiyasu Okamura, Katsuhiko Uesaka
2. 発表標題 Dihydropyrimidine dehydrogenase (DPD) and human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) are not predictive in patients with resected pancreatic cancer treated with adjuvant S-1 or gemcitabine chemotherapy: Collaborative study of the JASPAC 01 trial.
3. 学会等名 ESMO 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年 ~ 2019年

1. 発表者名 Okamura Y, Yasukawa S, Narimatsu H, Evans A, Boku N, Fukutomi A, Konishi M, Morinaga S, Toyama H, Kaneoka Y, Shimizu Y, Nakamori S, Sata N, Yamakita K, Sakamoto H, Takayama W, Yamaguchi R, Yanagisawa A, Neoptolemos J, Uesaka K
2. 発表標題 The human equilibrative nucleoside transporter1 evaluated by SP120 and 10D7G2 had the potential to predict the prognosis in the patients with pancreatic cancer treated with adjuvant gemcitabine: Collaborative study of the JASPAC 01 trial
3. 学会等名 51st European Pancreatic Club ( (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamura Y, Yasukawa S, Narimatsu H, Boku N, Fukutomi A, Konishi M, Morinaga S, Toyama H, Kaneoka Y, Shimizu Y, Nakamori S, Sata N, Uesaka K
2. 発表標題 High human equilibrative nucleoside transporter-1 (hENT1) expression is a significant unfavorable prognostic factor in patients with resected pancreatic cancer treated with adjuvant S-1 chemotherapy
3. 学会等名 日本癌学会学術総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Okamura Y, Yasukawa S, Narimatsu H, Evans A, Boku N, Fukutomi A, Konishi M, Morinaga S, Toyama H, Kaneoka Y, Shimizu Y, Nakamori S, Sata N, Yamakita K, Sakamoto H, Takayama W, Yamaguchi R, Yanagisawa A, Neoptolemos J, Uesaka K
2. 発表標題 The hENT1 evaluated by SP120 and 10D7G2 had the potential to predict the prognosis in the patients with pancreatic cancer treated with adjuvant gemcitabine: Collaborative study of the JASPAC 01 trial
3. 学会等名 日本癌治療学会学術集会
4. 発表年 2019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	岡村 行泰  (Okamura Yukiyasu)  (10704489)	静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員   (83802)	
研究分担者	杉浦 禎一  (Sugiura Teiichi)  (10402588)	静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員   (83802)	
研究分担者	伊藤 貴明  (Ito Takaaki)  (30765938)	静岡県立静岡がんセンター(研究所)・その他部局等・研究員   (83802)	