

令和 4 年 6 月 1 日現在

機関番号：13501

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K08418

研究課題名（和文）膵癌の腫瘍免疫療法を目指した免疫チェックポイントの網羅的探索と治療効果予測

研究課題名（英文）Comprehensive gene analysis for tumor immunotherapy of pancreatic cancer and prediction of therapeutic efficacy.

研究代表者

深澤 光晴（Fukasawa, Mitsuharu）

山梨大学・大学院総合研究部・特任講師

研究者番号：00377508

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）：膵癌の予後改善のためには治療標的の同定および個別に対応した治療薬の選別が重要となる。本研究では近年登場した分子標的薬や免疫チェックポイント阻害剤など膵癌の新規治療法選択に重要なEUS-FNA検体の解析について検討した。必要なEUS-FNAの検体量はDNA3ng以上であり、それを達成するために迅速病理が有用であった。遺伝子解析の結果、FDAで認可されている分子標的薬のマーカーとなる遺伝子異常は20%に認め、実臨床で使用されているFOLFIRINOXのマーカーとなりうるHRR関連遺伝子の異常は14%の症例にみられた。また、予後に関連する遺伝子異常の解析も可能であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

膵癌の予後延長に期待が持たれる個別化医療であるが、その障害となりうる組織採取において、膵癌で通常行われるEUS-FNAという検体採取法で遺伝子解析が十分可能という結果を得た。本研究からも治療標的になりうると思われる遺伝子異常が多数得られたが、今後は検索する遺伝子の範囲を適正化し、さらなる精度の向上を検討する足掛かりとなった。

研究成果の概要（英文）：Identification of therapeutic targets and selection of individualized therapeutic agents are important to improve the prognosis of pancreatic cancer. In this study, we examined the analysis of EUS-FNA samples, which are important for the selection of novel therapies for pancreatic cancer, such as molecular targeted drugs and immune checkpoint inhibitors that have recently emerged. The required EUS-FNA specimen volume was more than 3 ng of DNA, and rapid pathology was useful to achieve this. Genetic analysis showed that 20% of patients had genetic abnormalities that could be markers for FDA-approved molecular-targeted drugs, and 14% of patients had abnormalities in HRR-related genes that could be markers for FOLFIRINOX, which is used in actual clinical practice. Analysis of prognosis-related genetic abnormalities was also possible.

研究分野：消化器内科学

キーワード：膵癌 EUS-FNA 個別化医療

## 1. 研究開始当初の背景

- ✓ 本研究の核心をなす学術的『問い』として、膵癌・胆道癌では腫瘍免疫療法は不可能なのか、という問題を提起したい。胃癌や肝臓癌などを含む様々な消化器癌で抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤が脚光を浴びる中、膵癌・胆道癌においてはこの話題から取り残されている印象があり、本研究ではこの問題に取り組みたいと考える。
- ✓ 膵癌および胆道癌は最も予後不良な癌の一つであり、これらの疾患の克服は人類の喫緊の課題である。これらの疾患が予後不良な原因は、早期発見が非常に困難なこと、および手術以外の有効な治療法が存在しないことである。膵癌においては長期生存が期待できるStage I (UICC)と診断されるのは全膵癌患者の12%であり、約50%の膵癌患者は診断時に遠隔転移を伴っているいわゆる手遅れな状態である (*日本膵臓学会膵癌登録, Egawa et al. Pancreas 2012*)。別の言い方をすると、長期生存が見込める有効な治療法は手術であるが、その手術により恩恵を受けられるのでは現時点では膵癌患者全体の12%であり、遠隔転移症例も含め残りの88%の膵癌患者は手術や化学療法などの治療を駆使してもその生存期間はせいぜい2年以内というデータである。
- ✓ 近年、様々な癌種において、および消化器癌でも肝臓癌や大腸癌などにおいて、分子標的薬や腫瘍免疫療法と呼ばれる抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤が脚光を浴びている。分子標的薬の登場により副作用の少ない良好な治療成績が報告され、抗PD-1抗体などの腫瘍免疫療法では遠隔転移を有する進行癌であるにも関わらず著効する症例も多数報告され非常に注目されている。一方で、腫瘍免疫療法は非常に高価でありその薬剤に反応する症例も限られていることから、治療効果を事前に予測するマーカーの開発も急がれている。抗PD-1抗体においてはPD-1の発現が必ずしも奏効率と一致せず、近年ではMSI-highあるいは腫瘍内の遺伝子変異数(TMB, Tumor mutational burden)が非常に多い症例で奏功することが明らかになってきた。
- ✓ 抗PD-1抗体などの免疫チェックポイント阻害剤が奏功する症例、すなわちMSI-highあるいはTMB-highな(変異が非常に多い)症例は、胃癌・大腸癌・肝臓癌などにおいて約10-30%の症例とされている。一方で、膵癌においては網羅的遺伝子解析をしたビッグデータから、それに相当する症例は1%未満とされており極めて残念な結果である (TCGA, The cancer genome atlas)。
- ✓ この結果は抗PD-1抗体を対象とした場合およびTumor mutational burdenに着目した結果であり、膵癌および胆道癌で腫瘍免疫療法の見込みが全くないというわけではない。本研究では、膵癌および胆道癌における腫瘍免疫療法の可能性を模索すべく、免疫チェックポイント関連因子の網羅的探索およびTMB以外の治療予測因子を用いた膵癌の腫瘍免疫療法の可能性模索を行うことを目的とする。

## 2. 研究の目的

- ✓ 本研究の目的は、抗PD-1抗体などの腫瘍免疫療法が膵癌・胆道癌でも有効である可能性があるかを検証すること、である。
- ✓ 抗PD-1抗体などの腫瘍免疫療法は非常に高価であり、医療費削減の観点からも治療効果を予測し、効果が見込まれる症例に投与を限定していく必要がある。現時点で抗PD-1抗体の治療効果予測因子として知られているのは、MSI-highあるいはTMB (Tumor mutational burden) が非常に高い症例とされており、この予測因子に基づきTCGAなどのビッグデータで検証すると膵癌では1%程度にしか奏功しないこととなる。これはひとつの指標から推測したものであり、実際にはより多くの症例で治療の恩恵を受けられる可能性は否定できない。
- ✓ 本研究では従来のMSI-highあるいはTMBによる治療効果予測のみでなく、腫瘍免疫抗原(neoantigen)、免疫チェックポイント関連因子の網羅的探索から抗PD-1抗体の治療効果に関連する因子を同定し、従来とは異なる指標から治療効果予測をする。また、この治療効果予測を切除組織から抽出した遺伝子発現を見るのではなく、切除不可能な遠隔転移症例からEUS-FNAや胆道鏡などにより実臨床で得られる臨床検体を用いて、治療効果予測を実現する点に本

研究の独自性がある。

- ✓ **切除可能な症例と切除不可能な症例では遺伝子発現、本研究においては腫瘍免疫に関連する遺伝子発現が異なっている可能性がある。従来の遺伝子解析は切除可能な症例を対象として行っており、切除不可能症例から得た臨床検体で治療効果予測を行う点、TMBとは異なる視点で治療効果予測を行う点が本研究の創造性であり独自性の高い点である。**

### 3. 研究の方法

#### 1. 切除組織、EUS-FNAや胆道鏡下生検組織など臨床検体からの核酸抽出

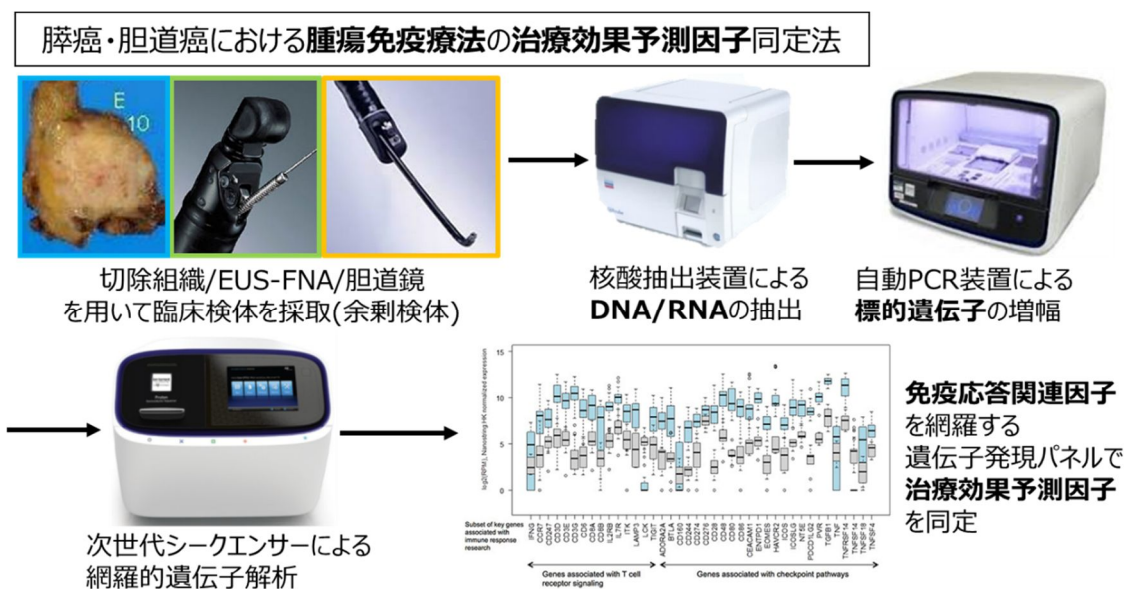
- ✓ 切除検体や内視鏡下に得られた検体(EUS-FNA生検組織、胆道鏡下生検組織)から正確に目的組織を切り出し、DNA/RNAの抽出を行う。
- ✓ 本教室は消化器内科の臨床教室であり、研究利用目的に同意書を得た臨床検体が豊富に存在する。得られた臨床検体は使用するまで-80℃保存し(EUS-FNA検体、凍結切除組織)、あるいはホルマリン固定パラフィン包埋検体 (FFPE) を用いる。
- ✓ 本研究では切除組織(パラフィン包埋切片、凍結標本)よりレーザーキャプチャーマイクロダイゼクションを用いて正確に腫瘍部と非腫瘍部を切り分け、それぞれのDNA/RNAを抽出する。
- ✓ 核酸の抽出には既存の抽出キットを用いるが、効率的にDNA/RNAを抽出するために当施設では核酸抽出自動化装置を2台配備しており、多数の臨床検体にも対応可能である。

#### 2. 次世代シーケンサーによる免疫チェックポイント関連因子の網羅的探索

- ✓ 主に抽出したRNAから免疫応答関連因子を網羅した遺伝子発現解析を行う。すでにこれらの遺伝子パネルが市販されており、免疫応答関連因子に特化したパネルを用い、あるいは全遺伝子発現を網羅したRNA sequenceを次世代シーケンサーにより行い、腫瘍免疫抗原および免疫応答関連因子を網羅的に解析し、膵癌で腫瘍免疫療法にตอบสนองする因子を同定する。
- ✓ また、抗PD-1抗体などの腫瘍免疫療法に関与するとされるT細胞炎症性遺伝子発現プロファイルも近年明らかになりつつあり (Cristescu et al. *Science* 2018)、これらの発現や関連した遺伝子変異を検索する。

#### 3. データ解析および real-time PCR やデジタル PCR での検証

- ✓ 網羅的探索で得られた膵癌あるいは胆道癌に特異的な治療効果予測因子を多数の検体で検証する。
- ✓ 生検検体で良好な結果を得た次には、将来的な研究として、血液検体や体液などを利用したいわゆるキッドバイオプシーによる可能性を模索する。

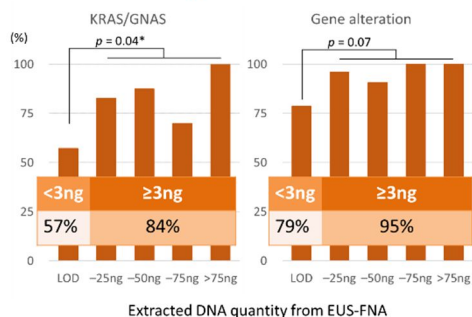


### 4. 研究成果

(1) EUS-FNA 検体による遺伝子解析成功に関わる因子の解明

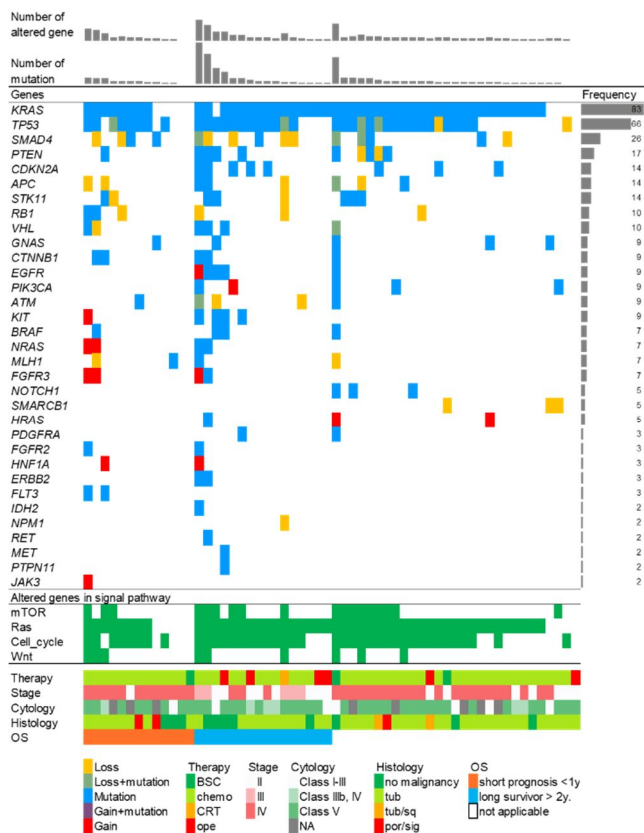
EUS-FNA 検体での遺伝子解析成功率およびその成功に関わる因子を検討した。対象は膵癌 161 症例 (Stage I/II/III/IV=6/72/22/61, Ph/Pbt=83/78), 延べ 171 回の EUS-FNA で, うち 137 例に対し遺伝子解析を施行した。細胞診・組織診に加え, EUS-FNA の FFPE 検体から癌関連 78 遺伝子を次世代シーケンス解析し, 何らかの遺伝子異常を認めたものを遺伝子解析成功と定義し算出した。結果 1: EUS-FNA の陽性率は細胞診 80% (137/171), 組織診 73% (124/171), 遺伝子解析成功 93% (128/137) で, 細胞診+組織診で 85%, さらに遺伝子解析を加えると 96%であった。得られた DNA 量別に解析すると, 3ng 以上の DNA が得られた場合に遺伝子異常検出率が改善した。結果 2: 多変量解析では細胞診・組織診陽性に関わる因子として女性, 迅速病理診断施行が同定され (p < 0.01), 遺伝子解析成功に十分な DNA 量は迅速病理診断施行により得られた (p < 0.01)。まとめると迅速病理診断が細胞診・組織診のみならず, 遺伝子解析成功に必要な因子であった。本研究から, 微量な検体からも遺伝子解析が十分に施行できる可能性が示唆された。

Detection rate of genetic variants



(2) 膵癌の個別化医療を目指した EUS-FNA 検体による次世代シーケンス解析

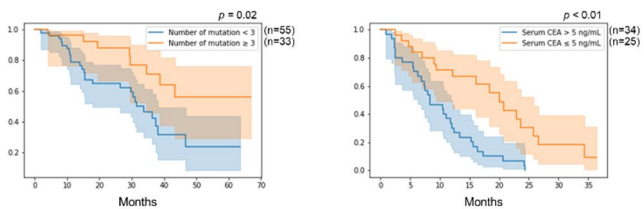
膵癌患者の EUS-FNA 検体 (FFPE) を次世代シーケンサーにて解析し, さらにバイオインフォマティクス処理を施すことで治療標的遺伝子同定の可能性を模索した。膵癌に対して EUS-FNA を施行した 62 症例を対象とし, EUS-FNA の FFPE サンプルから平均 34.2ng の DNA が得られ, 13 例は測定感度以下であった。標的遺伝子は 62 例中 58 例 (93.5%) で増幅され次世代シーケンスを行うことが可能であった。この 58 症例について臨床因子との対比を行ったところ Stage II/III/IV=16/5/37 であり, 得られた変異は多い順に KRAS (83%), TP53 (62%), CDKN2A, SMAD4, PTEN (14%) であった。1 症例当たりの遺伝子変異数は中央値で 3 個 (0-40) であり, 分子標的薬の標的となりうる遺伝子変異は 17 変異 9 症例 (15.5%) に認められた。使用した遺伝子パネル中にマイクロサテライト領域を 4 か所認め, バイオインフォマティクス処理によるシーケンスリード中のマイクロサテライト領域の異常は 2 症例に認められた。さらに予後不良に関連する因子を統計解析し, 多変量解析では遺伝子変異数 < 10 (p=0.026), 遠隔転移 (p=0.003) が同定された。



(3) (2)に関連してさらに症例数や検索遺伝子数を増やし解析を続けた。膵癌に対して EUS-FNA を

施行した 161 症例 (Stage I/II/III/IV=6/72/22/61 例) を対象とした。膵癌のドライバー遺伝子と治療標的となりうる遺伝子異常を公共データベース (COSMIC, TCGA, OncoKB) から抽出し, 78 遺伝子を増幅するオリジナルパネルを作成した。EUS-FNA の FFPE 検体より抽出した DNA を用いて次世代シーケンス解析を施行した。検討 1: EUS-FNA 検体量別の遺伝子解析成功率と成功に関わる因子の解析。

Without metastasis				Metastasis			
	Multivariate analysis				Multivariate analysis		
(N = 88)	HR (95%CI)	p value		(N = 89)	HR (95%CI)	p value	
Non-operative therapy	1.73 (0.81-3.68)	0.16		Non-operative therapy	2.64 (0.35-20.1)	0.35	
Size > 20mm	1.35 (0.57-3.20)	0.49		Size > 20mm	3.01 (1.01-8.98)	0.05	
CEA > 5 ng/mL	0.98 (0.43-2.23)	0.97		CEA > 5 ng/mL	3.65 (1.83-7.30)	<0.01**	
Number of mutation < 3	2.63 (1.16-5.98)	0.02*		Number of mutation < 3	1.48 (0.72-3.04)	0.29	



検討 2: 網羅的遺伝子解析の結果。検討 3: 治療標的となりうる遺伝子異常の同定と治療効果。【結果】結果 1: EUS-FNA の FFPE サンプルから中央値で 16ng の DNA が得られ, 標的遺伝子は 93% の検体で増幅され次世代シーケンスを行うことが可能であった。DNA 量として 3ng 以上得られると遺

伝子解析成功率が上昇し、それにかかわる因子はEUS-FNA手技のうち迅速病理陽性であった。結果 2: 得られた遺伝子異常は多い順に *KRAS* (82%), *TP53* (57%), *SMAD4* (19%), *RET* (16%) であった。結果 3: FDA で認可されている分子標的薬のマーカ-となる遺伝子異常は 93 か所 30 症例 (20%) に認め、実臨床で使用されている FOLFIRINOX のマーカ-となりうる Homologous recombination repair 関連遺伝子の異常は 14% の症例にみられた。さらに、得られた遺伝子異常と臨床因子を比較検討した結果、転移のない症例では遺伝子変異数の少ない症例、転移ありの症例では CEA 高値が予後不良因子であることが、多変量解析から示された。



## 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 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Fukasawa Yoshimitsu, Kawakami Satoshi, Hayakawa Hiroshi, Kuratomi Natsuhiko, Kadokura Makoto, Maekawa Shinya, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 5
2. 論文標題 Digital next generation sequencing of cell free DNA for pancreatic cancer	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 508 ~ 516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12530	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 Ishida Yasuaki, Takano Shinichi, Maekawa Shinya, Yamaguchi Tatsuya, Yoshida Takashi, Kobayashi Shoji, Iwamoto Fumihiko, Kuno Toru, Hayakawa Hiroshi, Matsuda Shuya, Fukasawa Mitsuharu, Shindo Hiroko, Inoue Taisuke, Nakayama Yasuhiro, Ichikawa Daisuke, Sato Tadashi, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 4
2. 論文標題 Fractionated small cell free DNA increases possibility to detect cancer related gene mutations in advanced colorectal cancer	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 JGH Open	6. 最初と最後の頁 978 ~ 986
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/jgh3.12379	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 Kuratomi Natsuhiko, Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 22
2. 論文標題 MiR-10a in Pancreatic Juice as a Biomarker for Invasive Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm by miRNA Sequencing	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 3221 ~ 3221
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22063221	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 Takano Shinichi, Fukasawa Mitsuharu, Shindo Hiroko, Takahashi Ei, Hirose Sumio, Fukasawa Yoshimitsu, Kawakami Satoshi, Hayakawa Hiroshi, Kuratomi Natsuhiko, Kadokura Makoto, Maekawa Shinya, Sato Tadashi, Enomoto Nobuyuki	4. 巻 10
2. 論文標題 Clinical significance of genetic alterations in endoscopically obtained pancreatic cancer specimens	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Medicine	6. 最初と最後の頁 1264 ~ 1274
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cam4.3723	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8件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸
2. 発表標題 個別化医療を目指した分子バーコード併用次世代シーケンスによる膵癌リキッドバイオプシー
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸
2. 発表標題 膵癌の個別化医療を目指したEUS-FNA検体による次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第98回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸
2. 発表標題 遺伝子解析を見据えたEUS-FNA検体採取法についての検討
3. 学会等名 第28回JDDW
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸
2. 発表標題 予後不良な膵癌の個別化医療を目指したEUS-FNA検体による次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第28回 JDDW
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高野 伸一, 深澤 光晴, 榎本 信幸
2. 発表標題 治療標的探索を目指した膵癌の EUS-FNA検体による遺伝子解析
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高野伸一, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 切除不能膵癌の予後予測および治療標的の同定を目指したEUS-FNA検体の次世代シーケンス解析
3. 学会等名 第97回 日本消化器内視鏡学会総会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 早川宏, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 IPMN組織亜型診断における膵液中CEAの有用性
3. 学会等名 第27回 JDDW
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 吉村大, 深澤光晴, 榎本信幸
2. 発表標題 早期膵癌のCT所見に関する検討
3. 学会等名 第27回 JDDW
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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