

令和 4 年 5 月 26 日現在

機関番号：11501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K09209

研究課題名(和文) 分子署名に基づいた血中循環腫瘍細胞の細分類化と膵癌集学的治療の精密化への臨床応用

研究課題名(英文) Molecular signature-based classification of circulating tumor cells and its clinical application for refinement of multidisciplinary treatment of pancreatic cancer.

研究代表者

元井 冬彦 (Motoi, Fuyuhiko)

山形大学・医学部・教授

研究者番号：30343057

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：腹腔洗浄液細胞診(CY)で癌細胞が検出される膵癌では、末梢血よりも洗浄液中で腫瘍由来DNA(ctDNA)が検出しやすい。CY ctDNA陽性例は陰性例と比較して有意に予後不良であり、CY ctDNAは不顕性癌遺残を反映するバイオマーカーとしての有用と考えられる。CYからエクソソームを単離して解析すると、エクソソームタンパク質マーカーの発現が確認され、またmiRNAを抽出しデジタルPCRを用いてmiR-21の発現を検討するとCY陽性群でmiR-21がより高発現していることが確認された。エクソソーム分画は腫瘍由来核酸が濃縮された状態で含まれているおり、有用なサンプルとして検討を進めるべきである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

既知の腫瘍マーカーが全ての膵癌症例においてその病勢を正確に反映しているとは限らないため、微小転移診断、治療効果予測、病勢モニタリングなどの用途に応じた、より高精度なバイオマーカーの同定・開発が求められる。本研究では、通常診療で侵襲なく得られる腹腔洗浄液により、得られたサンプルがバイオマーカーとして介入法決断・予後予測に有用である可能性を示唆した。難治癌の代表である膵癌診断・治療技術の進歩に寄与できた。

研究成果の概要(英文)：In pancreatic cancer, tumor-derived DNA (ctDNA) is more easily detected in the peritoneal washing fluid than in the peripheral blood, and CY ctDNA-positive cases have a significantly poorer prognosis than negative cases, suggesting that CY ctDNA is a useful biomarker reflecting minimal residual disease. Exosomes were isolated from CY and analyzed for exosomal protein markers. miRNA was also extracted and its expression was examined using digital PCR, and miR-21 was found to be more highly expressed in the CY-positive group. Exosome fractions contain concentrated tumor-derived nucleic acids (DNA&RNA) and should be evaluated for useful samples.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は依然として予後不良であり、その治療成績の向上は社会的要請度・緊急度が極めて高い。長期生存を得るための唯一の治療法は根治切除であるが、今後さらなる予後向上のためには根治切除と非手術治療(放射線治療や化学療法)を組み合わせた集学的治療法の改良が求められる。我々は、切除を企図した膵癌に対する集学的治療の安全性と有用性を明らかにするため、これまでにいくつかの臨床試験を主導し (UMIN000014498, UMIN000017746, UMIN000021305)、治療成績の向上を支持する新たな知見を得ることができた (Motoi F, J Gastroenterol. 2018. Unno M, ASCO-GI, 2019)。しかし一方では、化学療法による治療効果が乏しく切除機会を喪失する症例、遺残のない切除をしえたとしても術後早期に再発をきたす症例もしばしば経験する。これらの臨床的背景から、感受性予測や微小転移・遺残を詳細に把握した上で個々の症例に応じた治療方針を決定することが喫緊の課題といえる。

切除を企図した膵癌の診療において、不顕性の微小転移または微小遺残腫瘍の存在は治療方針の決定に直結するため高精度な診断が求められる。我々は以前より周術期における腫瘍マーカーの動的な評価に着目し、膵切除後に腫瘍マーカーが正常化した症例は予後良好であること (Motoi F, Ann Surg Oncol. 2011)、非手術治療前と後の腫瘍マーカー比から conversion surgery(非手術治療の長期奏功例に対する外科切除)の適応について報告してきた。しかし、既知の腫瘍マーカーが必ずしも全ての膵癌症例においてその病勢を正確に反映しているとは限らないため、微小転移診断、治療効果予測、病勢モニタリングなどの用途に応じた、より高精度なバイオマーカーの同定・開発が求められる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、切除企図膵癌に対する集学的治療の個別化・層別化に有用なバイオマーカーを同定することである。近年では腹膜転移を伴う膵癌に対する腹腔内化学療法の有用性を示す報告が増えつつあることから、血行性転移、播種性転移のそれぞれの転移形式に着目し、血液と腹腔洗浄液から転移・再発部位特異的なバイオマーカーを探索・検証することとした。

当初は血液中の循環腫瘍細胞 (circulating tumor cell, CTC)や腹腔洗浄液中の浮遊腫瘍細胞を解析対象としたが、これまでの研究実施報告書に記載のとおり、企業との共同研究として使用予定であったセルソーターが機器の不具合によって使用困難となった。したがって、本研究は生体試料に含まれるセルフリー分画に着目し、循環腫瘍 DNA(circulating tumor DNA, ctDNA)とエクソソームを解析対象とした。

### 3. 研究の方法

切除企図膵癌症例を対象に、診断時、術前治療後、手術前に血液および腹腔洗浄液を採取した。

#### 3-1. ctDNA 解析

血液および腹腔洗浄液から cell-free DNA (cfDNA)を抽出し、KRAS 遺伝子変異をデジタル PCR(droplet digital-PCR system, Bio-rad)を用いて検出した。Quantasoft software (Bio-rad)を用いて変異アレル頻度を求め、臨床所見や予後との関連について定性的・定量的に検証した。

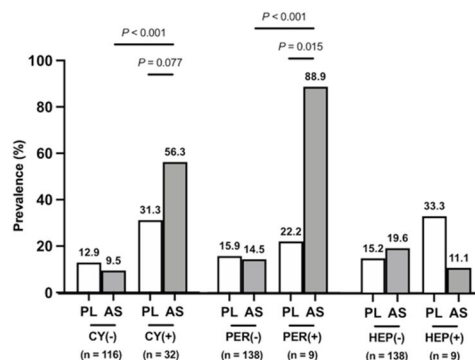
#### 3-2. エクソソーム解析

血液および腹腔洗浄液からポリマー沈殿法を用いてエクソソームを単離し、Nanoparticle tracking analysis (NanoSight NS300)およびプロテインアレイにてエクソソーム分画を確認した。さらに、エクソソーム分画から DNA および miRNA を抽出し、デジタル PCR を用いて KRAS 遺伝子変異解析を行った。

### 4. 研究成果

#### 4-1. 腹腔洗浄液と血液中の ctDNA 解析

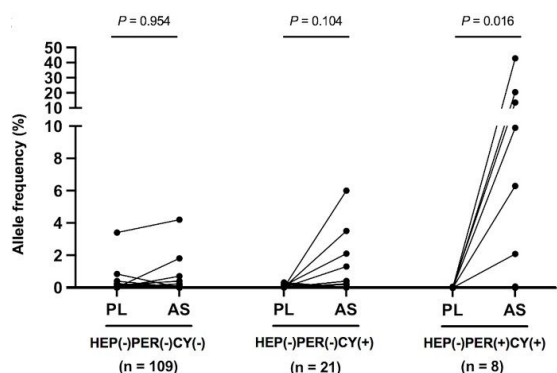
腹腔内微小転移の診断における ctDNA 測定の有用性を明らかにするべく、当科で審査腹腔鏡または開腹によって腹腔内が精査された膵癌 115 症例から得られた 148 ペアサンプル (腹腔洗浄液と同時期に採血した末梢血)を用いて、ctDNA の陽性率と微小転移所見の関連について検証した。腹腔洗浄細胞診が陽性(CY+)であった 32 ペアサンプルの比較では腹腔洗浄液中の ctDNA の陽性率 (56.3%)は末梢血中の陽性率 (31.3%)より高い傾向にあり、腹膜転移陽性(PER+)であった 9 ペアサンプルの比較では、腹腔洗浄液中の ctDNA の陽性率(88.9%)は末梢血中の陽性率 (22.2%)より有意に高率であった(図 1、 $P = 0.015$ )。腹腔内精査の結果、肝転移なし(HEP-)/PER+/CY+と診断された 8 例のペアサンプル中に含まれる KRAS 遺伝子



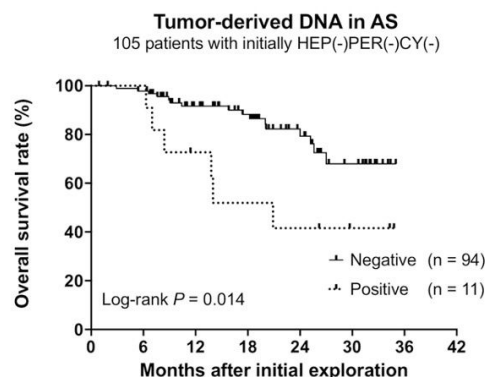
(図1) 腹腔内微小転移所見別の、血液 (PL)と腹腔洗浄液(AS)のctDNAの陽性率  
CY, 腹腔洗浄細胞診; PER, 腹膜転移; HEP, 肝転移

変異アレル頻度は末梢血と比較して腹腔洗浄液で有意に高値であった(図2、 $P = 0.016$ )。

次に、腹腔洗浄液中の ctDNA が予後に与える影響を明らかにするべく、腹腔内精査で HEP(-)かつ腹膜転移を認めず(PER-)、さらに腹腔洗浄細胞診が陰性(CY-)であった 105 例について検討を加えると、腹腔洗浄液中の ctDNA が陽性であった 11 例は陰性であった 94 例と比較して有意に予後不良であった(図3、 $P = 0.014$ )。この結果は、腹腔内に転移を認めない症例においても腹腔洗浄液中の ctDNA が予後不良因子であることから、腹腔洗浄液中の ctDNA は腹腔内の minimal residual disease を反映するバイオマーカーとしての有用性が示唆された。



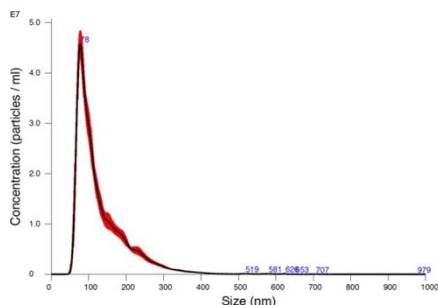
(図2) 腹腔内微小転移所見別の、血液 (PL) と腹腔洗浄液(AS)のKRAS遺伝子変異アレル頻度の比較検討  
CY, 腹腔洗浄細胞診; PER, 腹膜転移; HEP, 肝転移



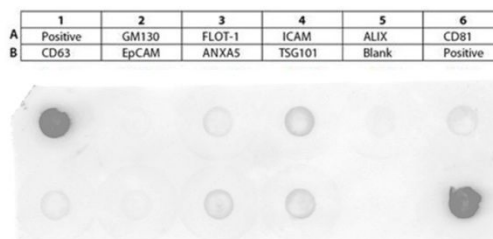
(図3) 初回の腹腔内検索で転移の所見を認めなかった105例における、腹腔洗浄液中のctDNAの有無別の全生存期間  
Log-rank  $P = 0.014$

#### 4-2. 腹腔洗浄液と血液中のエクソソーム解析

市販のキット (ポリマー沈殿法) を用いて腹腔洗浄液 500 $\mu$ L からエクソソームを単離した。NTA で粒径を確認したところ、78nm にシングルピークを認めるエクソソーム分画を単離することができた(図4)。プロテインミニアレイを用いてエクソソーム分画のタンパク質発現解析を行とところ、エクソソームタンパク質マーカーの発現が確認され、かつ細胞成分のコンタミが最小化されていることを確認した(図5)。

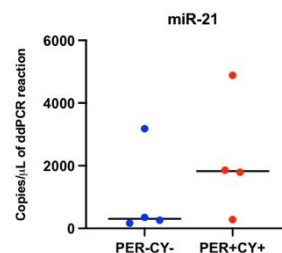


(図4) Nanoparticle tracking analysis (NTA)を用いた肺癌患者由来の腹腔洗浄液中のエクソソーム分画の単離



(図5) 腹腔洗浄液から単離されたエクソソーム分画を用いたプロテインアレイの結果。A1とB6ウェルはアレイの陽性コントロール。A2(GM130)は細胞成分のコンタミを検出するスポット。B5は抗体プロットの陰性コントロール、その他のウェルはエクソソームのタンパク質マーカーを示す。

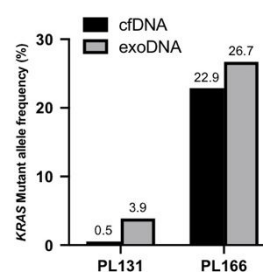
さらに、単離されたエクソソーム分画から miRNA を抽出した。探索的コホートとして PER+CY+と診断された腹腔洗浄液 4 サンプルと PER-CY-と診断された 4 サンプルを対象に、デジタル PCR を用いて miR-21 の発現を比較検討した。単位腹腔洗浄液中の miR-21 の発現を比較検討すると、PER+CY+群で miR-21 がより高発現している傾向がみられた(図6)。



(図6)腹腔洗浄液中のエクソソーム由来miR-21の発現

#### 4-3. 血中エクソソーム由来 DNA(ExoDNA)の抽出と KRAS 遺伝子変異アレル頻度の測定

切除不能局所進行肺癌 2 症例から得た血液試料(PL131, PL166)から exoNA と cfDNA をそれぞれ抽出した。デジタル PCR を用いて exoNA と cfDNA 中の KRAS 遺伝子変異アレル頻度測定、比較検討した。PL131 と PL166 の exoDNA の収量はそれぞれ 0.082 ng/ $\mu$ L、0.128 ng/ $\mu$ L であり、cfDNA の収量それぞれ 2.33 ng/ $\mu$ L、4.27 ng/ $\mu$ L であった。exoDNA 量は cfDNA 全体の 1/10 以下であったが、KRAS 変異アレル頻度は PL131 と PL166 のいずれも exoDNA で高値を示し(図7) エクソソーム分画には腫瘍由来核酸がより濃縮された状態で含まれていることが示唆された。



(図7)血中エクソソーム由来DNA(ExoDNA)とセルフリーDNA(cfDNA)を用いたKRAS遺伝子変異アレル頻度の比較

## 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 Hata T, Mizuma M, Motoi F, Iseki M, Omori Y, Hayashi H, Nakagawa K, Morikawa T, Kamei T, Naitoh T, Furukawa T, Unno M.	4. 巻 49
2. 論文標題 Serum Anti-p53 Antibody Can Serve as a Predictive Marker for Histological Grade of Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms of the Pancreas.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreas.	6. 最初と最後の頁 768-773
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MPA.0000000000001570.	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 Aoki S, Mizuma M, Hayashi H, Yoshimachi S, Hata T, Miura T, Takadate T, Maeda S, Ariake K, Kawaguchi K, Masuda K, Ishida M, Ohtsuka H, Nakagawa K, Morikawa T, Motoi F, Unno M.	4. 巻 20
2. 論文標題 Prognostic impact of intraoperative peritoneal cytology after neoadjuvant therapy for potentially resectable pancreatic cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Pancreatology.	6. 最初と最後の頁 1711-1717
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.pan.2020.08.022.	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 Toyama Y, Hotta M, Motoi F, Takanami K, Minamimoto R, Takase K.	4. 巻 10
2. 論文標題 Prognostic value of FDG-PET radiomics with machine learning in pancreatic cancer.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Surg Today.	6. 最初と最後の頁 17024
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73237-3.	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 Hata T, Mizuma M, Motoi F, Omori Y, Ishida M, Nakagawa K, Hayashi H, Morikawa T, Kamei T, Furukawa T, Unno M.	4. 巻 10
2. 論文標題 GNAS mutation detection in circulating cell-free DNA is a specific predictor for intraductal papillary mucinous neoplasms of the pancreas, especially for intestinal subtype.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 17761
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-74868-2.	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3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 元井冬彦
2. 発表標題 膵癌に対する集学的治療
3. 学会等名 第82回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 元井冬彦, 大塚英郎, 水間正道, 中川圭, 林洋毅, 森川孝則, 亀井尚, 内藤剛, 海野倫明.
2. 発表標題 切除不能膵癌に対するConversion Surgeryの適応指標
3. 学会等名 第75回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 元井冬彦, 中森正二, 松本逸平, 里井壯平, 平野聡, 川畑康成, 庄雅之, 本田五郎, 木村康利, 岸和田昌之, 青笹季文, 岡野圭一, 北川裕久, 村上義昭, 海野倫明
2. 発表標題 初診時切除不能膵癌に対する非手術療法奏効後切除の前向き観察研究: Prep04
3. 学会等名 第51回日本膵臓学会大会
4. 発表年 2021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	古川 徹  (Furukawa Toru)  (30282122)	東北大学・医学系研究科・教授    (11301)	

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	畠 達夫  (Hata Tatsuo)  (30806237)	東北大学・医学系研究科・大学院非常勤講師    (11301)	

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