

令和 3 年 5 月 19 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18148

研究課題名（和文）膵がん術前治療における耐性獲得と機序の解明

研究課題名（英文）Evaluation of the resistant acquisition mechanisms in the pancreatic cancer with preoperative treatment

研究代表者

岩上 佳史（Iwagami, Yoshifumi）

大阪大学・医学系研究科・助教

研究者番号：60597441

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）：in vitroにおいては化学療法暴露、放射線照射後に膵がん細胞におけるc-Metの発現が上昇することを確認し、2系統の膵がん細胞株を用いてc-Metの強制発現クローンのmRNAの網羅的発現解析を行った。in vitroにおける浸潤能の増加、治療抵抗性獲得の機序解明を目指しパスウェイの解析を行っている。一方膵がん患者の術前治療前後および術後の臨床検体（組織・血液）においては、引き続きサンプルの回収を継続している状況であり解析にまでは至っていない。

研究成果の学術的意義や社会的意義

術前治療、根治切除術、さらに今回の研究により同定された治療効果予測因子と新規治療標的の同定が実現できれば、膵がんの生存率向上に寄与できるものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：I confirmed that the expression of c-Met in the pancreatic cancer cell increased after chemotherapy and radiation exposure in vitro and performed the mRNA microarray analysis of the two pancreatic cancer cell strains under overexpression of c-Met. To elucidate the mechanisms of increased invasion ability and treatment-resistant acquisition, we try to find out the dominant pass-ways. It is in progress at the present to collect the before and after treatment, or postoperative clinical specimens in the preoperative patients with pancreatic cancer, and does not reach the analysis.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵がん 術前治療 治療抵抗性 cMet

1. 研究開始当初の背景

膵がんは、本邦において主要ながん死の原因のひとつである。根治切除が可能であっても、その治療成績は未だ十分なものとは言えず、術後補助化学療法により予後改善が認められているが、その効果は限られたものである(Oettle H, et al. *JAMA* 2007, Uesaka K, et al. *Lancet* 2016)。近年、膵がんに対する術前治療の有効性を示唆する報告が散見され(Evans DB, et al. *J Clin Oncol* 2008, Varadhachary GR, et al. *J Clin Oncol* 2008)、全身化学療法・放射線療法を併用する集学的治療は重要度を増している。

大阪大学ではこれまで切除可能膵がんに対する治療戦略として術前化学放射線療法施行後に根治切除を行う臨床試験を積極的に行ってきた(Eguchi H, et al. *Hepatogastroenterology* 2013, Eguchi H, et al. *Dig Surg* 2017)。しかし術前治療は予後改善が期待できる戦略である一方、治療抵抗性のがん幹細胞(Cancer Stem Cell: 以下、CSC)の割合を増加させる可能性があるとする仮説も存在する(Dean M, et al. *Nat Rev Cancer* 2005, Baumann M, et al. *Nat Rev Cancer* 2008, Tomihara H, et al. *Cancer Sci* 2017)。一方、治療抵抗性がん細胞の表現型はCSCと類似し、上皮間葉転換(Epithelial Mesenchymal Transition: 以下、EMT)を起こしているという報告も散見される(Shah AN, et al. *Ann Surg Oncol* 2007, Du Z, et al. *Dig Dis Sci* 2010)。術前治療に抵抗性を示す症例の予後は極めて悪いことが実際に明らかとなりつつある中で(White RR, et al. *Ann Surg Oncol* 2005, Chatterjee D, et al. *Cancer* 2011)、臨床検体を用いたCSC、EMTに関する詳細な検討は十分とは言えない。

膵がんにおけるCSCの存在については、他がん腫と同様にマーカーが幾つか報告されており、CD44+/CD24+(Li C, et al. *Cancer Res* 2007)、CD133+(Hermann PC, et al. *Cell Stem Cell* 2007)、ALDH+(Kim MP, et al. *PLoS One* 2011)、CD44+/c-Met^{high}(Li C, et al. *Gastroenterology* 2011)がその代表的なものであるが、その中でc-Metに関しては、HGFをリガンドとしたc-Metシグナル経路が膵がんCSCの維持に不可欠であると同時に、阻害剤を用いた治療標的となり得る可能性が示唆されている。近年、EMTを起こしたがん細胞はCSCの表現型と類似していることが明らかとなりつつあり、その制御にmicroRNA(以下、miRNA)の関与が示唆されている。申請者らはこれまでに、膵がん薬剤耐性の制御機構に関わるmiRNAについて報告してきた(Iwagami Y, et al. *Br J Cancer* 2013, Nagano H, et al. *Int J Oncol* 2013, Takiuchi D, et al. *Pancreatol* 2013)。miRNAの制御もまた核酸医薬の中でも実現可能性の高い分野であり、既に臨床第Ⅰ相試験が行われているためmiRNA創薬への期待は大きい。

本研究で、申請者は術前治療前後のがん組織と血液サンプルを用いて、術前治療により治療感受性の膵がん細胞のCSC、EMTのpopulationが短時間で増加し、耐性を獲得する機序を解明することを立案した

2. 研究の目的

本研究の目的は、治療感受性のがん細胞が、術前治療により短時間で耐性を獲得する機序を解明することにより集学的治療の新たな展開を目指すことである。術前治療、根治切除術、さらに今回の研究により同定された治療効果予測因子と新規治療標的の同定が実現できれば、膵がんの生存率向上に寄与できるものと考えられる。

3. 研究の方法

(1) 術前治療前後の組織におけるCSCマーカー発現の比較解析

臨床検体がん組織において、術前治療がCSCおよびEMTのpopulationをそれぞれの程度増加させるのかを解析する。術前治療前EUS-FNAにより採取した組織と術前治療後切除標本より採取した組織において、免疫組織化学染色を用いてCSC、EMTマーカーの発現を比較する。

(2) 術前治療前後の組織と血液におけるmiRNA/mRNA網羅的発現比較解析

術前治療前と根治切除後に得られた臨床検体がん組織と血液サンプルでmiRNA/mRNA発現プロファイルの網羅的発現解析を行う。miRNA/mRNAの網羅的スクリーニングには東レ社製の高感度チップ3D-Gene®を使用し、得られたmiRNA発現プロファイルとmRNA発現プロファイルのセットを用いてパスウェイ解析を行い、術前治療により耐性を獲得する機序を解明する。

(3) 化学療法暴露・放射線照射に伴う膵がん細胞株におけるCSCマーカー発現とmiRNA/mRNAの網羅的発現の比較解析 (in vitroの研究)

in vitroにおいて化学療法暴露・放射線照射におけるがん細胞株CSC、EMTマーカーの発現増加の確認と膵がん細胞株から得られたmiRNA/mRNA発現プロファイルの比較を行う。化学療法暴露および放射線照射後にCSCの割合が増加するという報告は数多くあり、申請者らはこれまで、放射線長期照射が膵がん細胞および間質に与える影響について研究を進め、放射線長期照射により、膵がん細胞ではc-Metの発現が上昇すること、また間質ではがん関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast: CAF)が誘導されがん細胞の悪性度に影響を与え得ることを確認してきた。miRNA/mRNAのパスウェイ解析を行い、CSC、EMTの増加、治療抵抗性獲得の機

序を解明する

(4) 術前治療効果予測因子の同定と候補治療標的の選出

(1)(2)における術前治療前後の CSC, EMT 分画の変化, および(2)(3)における術前治療とがん部 miRNA/mRNA の発現プロファイルについて、臨床検体から得られた解析結果(1)(2)と in vitro の研究から得られた解析結果(3)を総合的に評価し、治療感受性のがん細胞が、術前治療により短時間で耐性を獲得する機序を解明する。

4. 研究成果

(1)として、当院では原則 EUS-FNA で診断を確定した後に治療を開始しており、昨年では消化器外科として140例以上の入院、40例近くの手術を行った。引き続き膵がん患者の術前治療前および術後の臨床検体(組織・血液)の回収を継続している状況である。

(2)として、現在網羅的解析を行う上で適切と考えられる症例の選択と解析に必要な数を検討している。症例選択が終了次第、網羅的発現解析を行う。

(3)(4)として、これまで in vitro において化学療法暴露、放射線照射後に膵がん細胞における c-Met の発現を中心としたがん幹細胞マーカーの発現が上昇することを確認してきた。同様の結果は、複数系統の膵がん細胞株においても確認し、再現性を得ることができた。特に c-Met に着目して解析を追加したところ、放射線照射後に c-Met^{high} fraction が有意に増加すること、またそれらの細胞が高い浸潤能を有していることを確認した。2系統の膵がん細胞株(MIAPaCa2, PSN1)を用いた c-Met の強制発現およびクローニングに成功したため、mRNA の網羅的発現解析に提出し、結果を得た。c-Met 強制発現クローンにおいては、放射線照射後の c-Met^{high} fraction と同様に高い浸潤能を有することを確認した。

c-Met 強制発現クローンにおける mRNA マイクロアレイの結果を用いて、パスウェイ解析を行い、浸潤能の増加、治療抵抗性獲得の機序解明を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------