

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：18001

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22851

研究課題名(和文)ゲノム解析を応用した膵癌遠隔転移制御の解明とその新規治療戦略

研究課題名(英文)Molecular alterations and targeted therapy in pancreatic ductal adenocarcinoma

研究代表者

川俣 太(Kawamata, Futoshi)

琉球大学・医学(系)研究科(研究院)・助教

研究者番号：70825629

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：膵癌はKRAS、TP53、CDKN2A、SMAD4がドライバー遺伝子と考えられている。過去に我々は大腸癌原発巣と転移巣のゲノム解析にて肝転移巣で有意にコピー数の増加(ERBB2、FGFR1)を認める症例を同定した。今回、hCGの遺伝子に着目し、分子病理学的検討を施行した。膵癌のhCGの発現は約70%に認められ、hCGの発現は予後不良因子であった。またhCGをノックダウンした膵癌細胞株の浸潤能、遊走能は有意に低下しており、Slug、Vimentin、 $\alpha$ -SMAの発現低下が認められ、EMTへの関与が疑われた。膵癌においてhCGの発現が新たな分子標的マーカーとな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

膵癌は極めて予後不良な悪性疾患である。特に、門脈系浸潤を伴う切除可能境界(borderline resectable:BR)膵癌に対する治療に関しては外科的な解剖学的因子のみならず、ゲノム解析による膵癌の宿主側因子を取り入れることで、術前治療を含む最適な治療戦略を構築できる可能性がある。今回、我々の研究においては、膵癌におけるhCG発現が術後の予後や再発に関与する可能性が示唆されたため、術前遺伝子解析によりhCGのコピー数の増加や遺伝子変異を認めた症例に関しては、術前化学放射線療法(CRT)を選択したり、術前化学療法の期間を長くすることで膵癌の長期予後を改善できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Pancreatic cancer is one of the most common causes of cancer-related deaths. The 4 main driver genes of pancreatic cancer are KRAS, TP53, CDKN2A, and SMAD4. We previously reported that amplification of the clinically actionable genes ERBB2 and FGFR1 was observed in the metastatic tissue of patients but not in the paired primary colorectal cancer. In the present study, we analyzed the correlation between hCG expression and clinicopathological features in pancreatic cancer. hCG expression was the only independent factor for overall survival ( $P = 0.0019$ ). Moreover, hCG-downregulated cell lines had significantly reduced proliferative ability and invasion capacity. Moreover, the expression of cadherin was upregulated, and the expressions of the slug, and  $\alpha$ -SMA were downregulated in the hCG shRNA-transfected pancreatic cancer cell lines. In summary, hCG promotes the EMT signaling pathway, which in turn stimulates pancreatic cancer invasion and metastasis.

研究分野：消化器外科

キーワード：膵癌 遺伝子解析 ドライバー遺伝子 hCG

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

膵癌は極めて予後不良な悪性疾患である。現時点では *KRAS*、*TP53*、*CDKN2A*、*SMAD4* が膵癌発生進展のドライバー遺伝子と考えられているが、それらを治療標的とした臨床成功例の報告は無い。過去に我々は同一患者の大腸癌原発巣と肝転移巣のゲノム解析により、肝転移巣では有意にコピー数の増加 (*ERBB2*、*FGFR1*) を認め、ドライバー遺伝子も原発巣と異なることを報告した(1)。膵癌も大腸癌同様、局所再発・遠隔転移を来しやすく、その再発形式(局所再発・遠隔転移)の違いは原発巣の遺伝子変異やコピー数の変異により異なる可能性がある。今回、EMT を誘導する代表的な分子である TGF と発生学的に共通の塩基配列を有する Chorionic gonadotropin (hCG) が腫瘍の先進部に発現することを発見し、またゲノム解析の結果より、hCG が新たな膵癌発生進展のドライバー遺伝子と考えた(2,3)。

2. 研究の目的

膵癌における hCG 発現とリンパ管浸潤や上皮間葉系移行(EMT)に関する研究を行う事で、膵癌における hCG 発現の意義を解明し、hCG を治療ターゲットとした膵癌の遠隔転移制御の解明とその新規治療戦略につなげるものである。

3. 研究の方法

2011年11月から2020年5月までの膵癌切除検体を対象とした。対象患者は30症例であった。免疫組織学的検討にて切除検体を抗 hCG 抗体(1:350; A0231; Dako)にて染色し、染色強度および染色割合から膵癌における hCG 発現を比較検討し、予後や再発に関する検討を行った。

分子病理学的検討として、膵癌細胞株である AsPC1 および PK45H に shRNA (TRCN 000082825, Sigma-Aldrich)を用いて hCG をノックダウンし、浸潤能、遊走能を比較検討した。また hCG をノックダウンした AsPC1 および PK45H 細胞株とコントロール膵癌細胞株(AsPC1、PK45H:shRNA control SHC002, Sigma-Aldrich)にて、EMT を誘導する代表的な蛋白である E-cadherin, Vimentin, Slug および  $\alpha$ -SMA 等の発現を検討した。

4. 研究成果

(1) 膵癌における hCG 発現と臨床病理学的検討について

膵癌における hCG の高発現は21例(70%)に認められ、hCG の高発現群は術後再発(P=0.011)や腫瘍マーカーである CEA (P=0.001) および CA19-9 (P=0.043) と相関していた。hCG 発現の発現強度と発現割合を検討した IRS (immunoreactive score) を用いた検討では、IRS は膵癌の T 因子、N 因子と有意に相関を認めた(図1)。

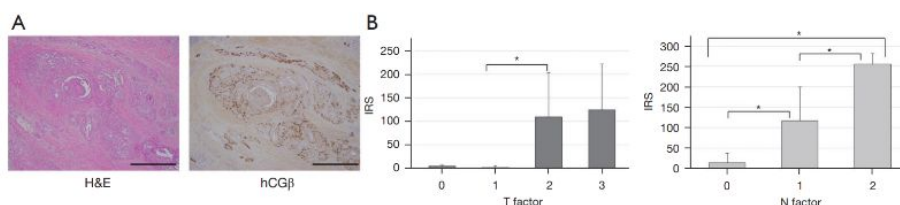


図1：膵癌における hCG 発現と臨床病理学的検討、IRS (immunoreactive score)

(2) 膵癌における hCG 発現と術後予後や再発について

膵癌における hCG の高発現群は術後の予後や再発に有意に相関していた(図2: P<0.001)

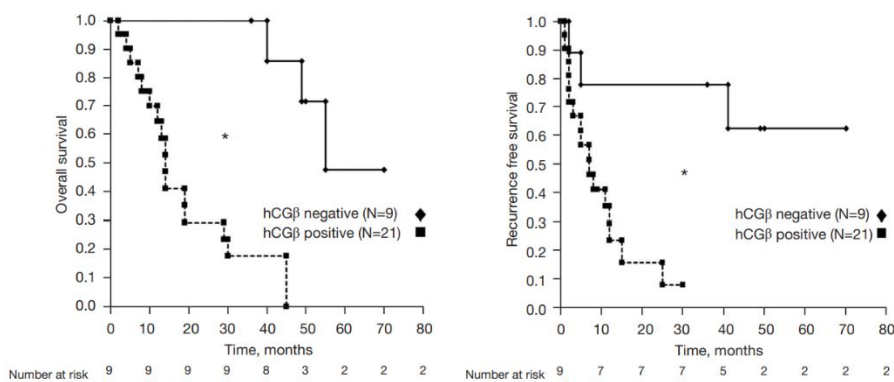


図2：膵癌における hCG 発現と予後や再発

また、多変量解析でも hCG の高発現群は独立した予後不良因子であった ( 図 3 : P = 0.019 )。

	Univariate analysis				Multivariate analysis			
	HR	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P-value	HR	Lower 95% CI	Upper 95% CI	P-value
<b>Overall survival</b>								
Age (<65 or ≥65 years)	0.76	0.30	1.9	0.57				
Sex (male or female)	0.54	0.21	1.4	0.20				
hCGβ (negative or positive)	23.5	2.9	190	0.003	14	1.5	130	0.019
CA19-9 (<37 U/mL or ≥37 U/mL)	2.4	0.80	6.9	0.12	1.1	0.32	3.7	0.9
CEA (<5 ng/mL or ≥5 ng/mL)	3.8	1.34	10.8	0.010	1.9	0.60	6.0	0.28
Stage (I or ≥II)	5.9	0.79	44.6	0.083	3.6	0.41	32	0.25
T factor (1, 2 or 3)	3.1	1.25	7.8	0.015	1.6	0.58	4.5	0.36
N factor (0 or 1, 2)	1.9	0.72	5.1	0.19				
<b>Recurrence free survival</b>								
Age (<65 or ≥65 years)	0.55	0.21	1.4	0.21				
Sex (male or female)	0.58	0.23	1.5	0.25				
hCGβ (negative or positive)	6.0	1.3	27	0.02	4.1	0.87	19	0.074
CA19-9 (<37 U/mL or ≥37 U/mL)	1.5	0.56	4.1	0.41				
CEA (<5 ng/ml or ≥5 ng/mL)	2.5	0.95	6.8	0.064	1.1	0.36	3.1	0.91
Stage (I or ≥II)	6.9	0.92	52	0.060	3.4	0.41	28	0.25
T factor (1, 2 or 3)	3.9	1.5	1.8	0.004	2.4	0.87	6.6	0.090
N factor (0 or 1, 2)	2.3	0.87	6.2	0.092				

hCGβ positivity was an independent associated factor in overall survival. Although hCGβ positivity was not a statistically significant associated factor in recurrence free survival, it showed a very strong association. hCGβ, human chorionic gonadotropin free beta-subunit; CEA, carcinoembryonic antigen; CA19-9, carbohydrate antigen 19-9.

図 3 : 膵癌における hCG 発現と単変量解析および多変量解析

( 3 ) 膵癌細胞株における hCG ノックダウンによるリンパ管浸潤や上皮間葉系移行 ( EMT ) に関する研究

膵癌細胞株である AsPC1 および PK45H に shRNA を用いて hCG をノックダウンし、浸潤能、遊走能を比較検討すると、hCG をノックダウン膵癌細胞株はコントロール膵癌細胞株と比較して、有意に浸潤能、遊走能が低かった ( 図 4 : P < 0.05 )。また、上皮間葉系移行 ( EMT ) に関する検討では、hCG ノックダウン膵癌細胞株はコントロール細胞株と比較し、Slug、Vimentin、 $\alpha$ -SMA の発現低下が認められ、EMT への関与が示唆された ( 図 4 )。

今回の研究において、膵癌における hCG の発現が術後の予後や再発に関与する可能性が示唆された。膵癌において、術前遺伝子解析により hCG のコピー数の増加や遺伝子変異を認められた症例に関しては、術前化学療法 ( CRT ) を選択したり、術前化学療法の期間を長くすることで、膵癌の長期予後を改善できる可能性がある。

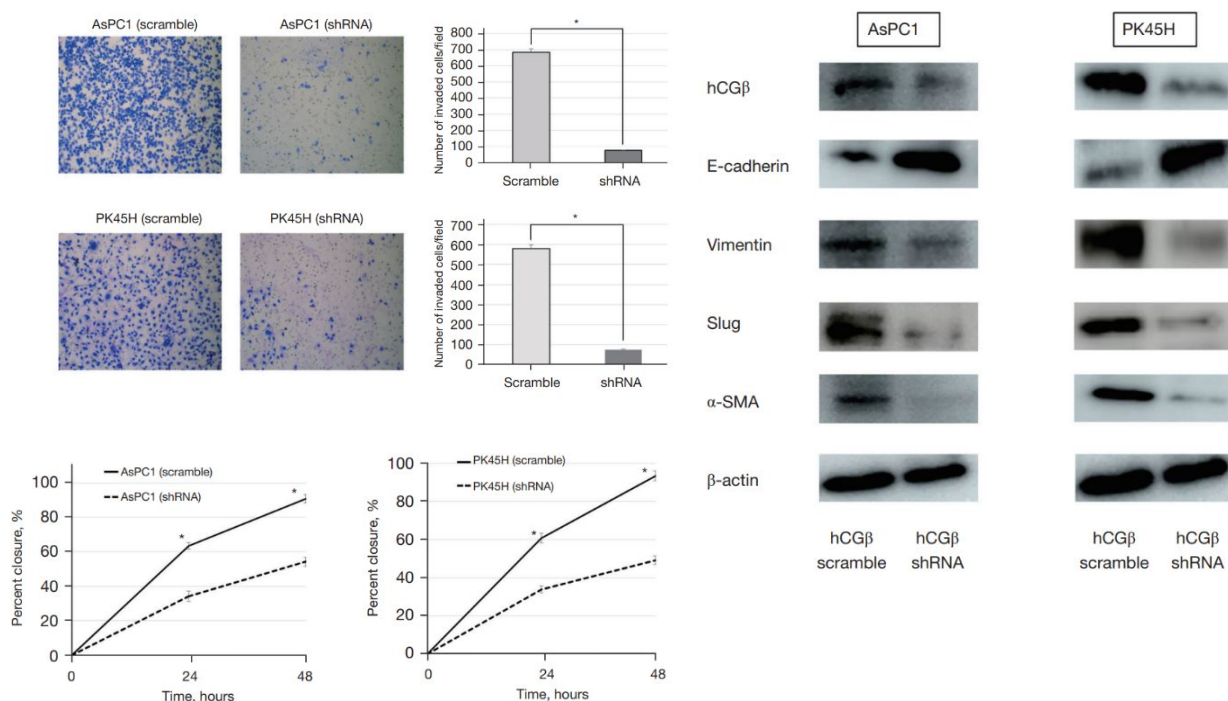


図 4 : hCG をノックダウン細胞株とコントロール細胞株での検討

<引用文献>

- 1) Kawamata F, et al. Copy number profiles of paired primary and metastatic colorectal cancers. *Oncotarget*. 2017 Dec 15;9(3):3394-3405
- 2) Kawamata F et al. Chorionic Gonadotropin- $\beta$  Modulates Epithelial-Mesenchymal Transition in Colorectal Carcinoma Metastasis. *Am J Pathol*. 2018 Jan;188(1):204-215.
- 3) Konishi Y, Kawamata F et al. Tumor budding and human chorionic gonadotropin- $\beta$  expression correlate with unfavorable outcome in colorectal carcinoma. *Medical Oncology* 2018 Jun 11;35(7):104.

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 上里安範
2. 発表標題 膵癌におけるhuman chorionic gonadotropin 発現の意義
3. 学会等名 第121回 日本外科学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 上里 安範
2. 発表標題 膵癌におけるhuman chorionic gonadotropin 発現
3. 学会等名 第122回 日本外科学会総会
4. 発表年 2022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
---------	---------