

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14401

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H03000

研究課題名（和文）膵癌患者の飛躍的予後改善をめざした個別的治療方針決定法の策定

研究課題名（英文）Establishment of personalized medicine for the dramatic improvement in the prognosis of pancreatic cancer patients

研究代表者

江口 英利 (Eguchi, Hidetoshi)

大阪大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：90542118

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ゲムシタピンベースの術前治療を施行した膵癌切除症例を、効果良好群と効果不良群の2群に分類し、術前治療前に採取した末梢血エクソソームから抽出したmiRNAを用いて、miRNAマイクロアレイと機械学習により治療効果に関連するmiRNAを同定した。効果良好群の選別に6種、効果不良群の選別に3種のmiRNAを使用することが最良の組み合わせであることを明らかにした。さらに、膵癌の放射線治療耐性にかかわるmiRNAも別途同定し、放射線治療感受性の予測に応用可能であることを証明した。以上の知見は、miRNAを用いた治療効果予測および治療効果改善が、実臨床でも実現可能であることを示唆している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞が抗癌剤耐性を獲得することは大きな問題であり、エピジェネティックな変化がその耐性機序に関係することを証明できたことの意義は大きい。本研究では、癌ゲノム診断（遺伝子パネル検査）では検出不可能な、癌細胞のエピジェネティックな変化をmiRNAの観点から明らかにし、さらには治療効果を予測する具体的方法を確立したことにより、実臨床での活用が大いに期待される。さらには放射線治療の感受性を予測するための方策として、キーとなるmiRNAを同定し得たことは、放射線治療をすべき患者さんの同定や、さらには放射線治療の効果増強にも応用可能であり、臨床的意義も大きい。

研究成果の概要（英文）：We classified pancreatic cancer resection patients who underwent gemcitabine-based preoperative treatment into two groups, good response group and poor response group, and used miRNAs extracted from peripheral blood exosomes collected before preoperative treatment to identify miRNAs associated with treatment response using miRNA microarrays and machine learning. We found that the best combination was to use six miRNAs for selection of the good response group and three miRNAs for selection of the poor response group. In addition, miRNAs involved in radiotherapy resistance of pancreatic cancer were separately identified and proved to be applicable to the prediction of radiotherapy sensitivity. These findings suggest that prediction of treatment efficacy and improvement of treatment efficacy using miRNAs are feasible in clinical practice.

研究分野：消化器外科

キーワード：miRNA 膵癌 薬剤感受性 放射線感受性

### 1. 研究開始当初の背景

膵癌は日本人の癌死亡者数の第4位を占める頻発疾患であり、5年生存率は9%と極めて低い。根治のためには外科的切除が不可欠であるが、現実的には切除不能な状態で発見される膵癌症例が大多数であり、また手術可能な症例であっても手術だけでは根治が難しいことから、術前や術後に化学療法や放射線療法を併用する集学的治療が積極的に試みられ、その有効性が明確になってきている。しかし、せっかく切除可能な状態で発見された症例であっても、術前療法の効果が乏しく、術前療法の期間中に膵癌が進行してしまい切除不可能となる症例もしばしば経験する。にもかかわらず、現時点では術前療法はあらゆる症例に一律に推奨されているだけであり、どのような症例には術前療法を行うべきか、行うべきではないかについて全く指針が示されておらず、効果予測法の開発はアンメット・メディカル・ニーズと言える。

microRNA (miRNA) は約 20 塩基の一本鎖 non-coding RNA であり、標的となる複数 mRNA に不完全な相同性を持って結合し、その翻訳抑制を行うことでエピジェネティックに遺伝子の発現を制御している。miRNA が膵癌の抗癌剤耐性と関わることがこれまでも多数報告されており、乳癌など他癌腫でも miRNA を用いた抗癌剤耐性の予測法が開発されている。そこで本研究では、実際に治療を行った臨床検体を用いて miRNA を網羅的に解析し、化学療法感受性や放射線感受性を予測する方法を構築することとした。

### 2. 研究の目的

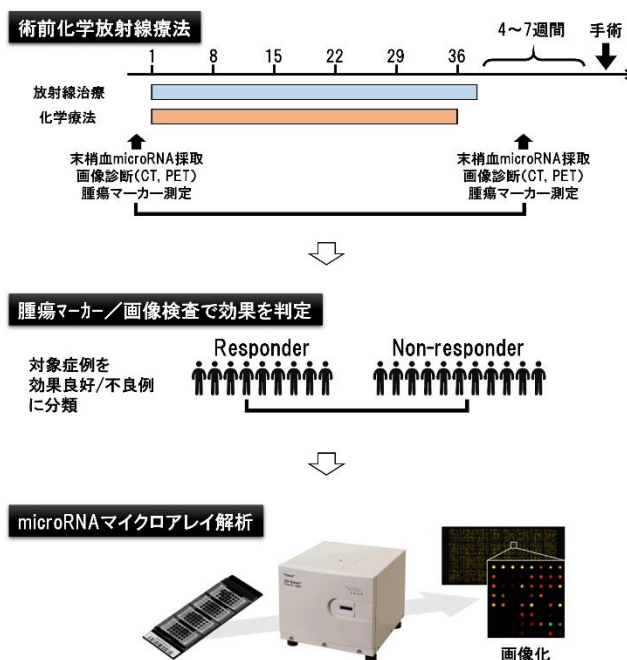
各種の腫瘍において化学療法感受性や放射線感受性を予測する方法は盛んに研究されているが、膵癌では、(1) 体幹の深部に主病巣があって内視鏡でも観察不可のため腫瘍細胞が採取しにくい、(2) 癌間質が多い癌腫であり、主病巣の一部を採取しても腫瘍全体の性格を代表していないことが多く、腫瘍生検の意義が乏しい場合がある、(3) TMB (Tumor Mutational Burden) が低いために免疫チェックポイント阻害剤の有効性が乏しい、(4) 有効性の高い分子標的薬の選択肢が極めて少なく、有効とされる細胞傷害性抗癌剤はほんの数種類しかない、といった特徴を有しており、化学療法や放射線療法の感受性を主病巣の生検によって予測する試みはことごとく失敗している。

上述の通り、膵癌では主病巣の生検では感受性予測が極めて難しいことから、liquid biopsy としての末梢血、唾液、尿などを検体として主病巣全体の character を把握しようとする試みが大いに期待されている。主病巣から分泌される miRNA は、エクソソームに包まれて末梢血中に分泌され、比較的安定な状態で浮遊していることが既に証明されており、末梢血中の miRNA を主病巣の総和として評価できれば、患者の癌病巣を総体として評価できる可能性が高い。体幹の深部に存在する膵癌でそれが可能となれば、臨床的な意義は極めて大きいと言える。そこで本研究では、実際に治療を行った臨床検体(術前化学療法施行後の切除検体・体液検体)を用いて、最新の解析法を駆使して miRNA およびそのターゲット mRNA を解析することで、パブリック・データのドライ解析を凌駕する結果を得ることを目的としている。

### 3. 研究の方法

Gemcitabine ベースの術前治療を施行した膵癌症例 86 例を対象とし (Discovery cohort : n=20, Validation cohort : n=66) 術前治療前後の CA19-9 の減少率によって、効果良好群と効果不良群の 2 群に分類した。Discovery cohort では、術前治療前に採取した末梢血エクソソームから miRNA を抽出し、miRNA マイクロアレイと機械学習を用いて治療効果に関連する miRNA を同定し、single-model と multi-model を用いた治療効果予測モデルを構築した。

【図1】集学的術前療法の効果良好例と効果不良例における末梢血中microRNA



Validation cohort においては、qRT-PCR を用いて各 miRNA の発現量を測定し各予測モデルの予測能を検証した。

術前化学放射線治療施行後に治癒切除を施行した 10 症例の術前治療前の末梢血 exosome を対象とし、マイクロアレイにて miRNA 発現プロファイルを網羅的に評価し、放射線治療感受性にかかわる候補 miRNA を抽出した【図 1】。放射線治療感受性にかかわると考えられる候補 miRNA を膵癌細胞株に過剰発現させ、mRNA を抽出の上で GSEA にて解析を行い、どのような経路が活性化されているかを同定した。さらには Target scan による検索で候補 miRNA のターゲットとなる mRNA を予測し、放射線治療効果を増強する方策を構築した。

#### 4 . 研究成果

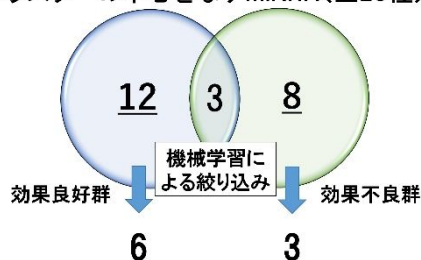
Gemcitabine ベースの術前治療を施行した膵癌症例 86 例を対象とした Discovery cohort で、治療効果に関連する miRNA として、効果良好群では 6 種の miRNA を、効果不良群では 3 種の miRNA を同定した【図 2】。これらの miRNA を組み合わせた multi-model の治療効果予測 ROC の AUC 値は効果良好群・効果不良群それぞれで single-model の AUC 値よりも良好であった。さらに Validation cohort においても、multi-model の AUC 値は single-model よりも向上した。

術前化学放射線治療施行後に治癒切除を施行した 10 症例の術前治療前の末梢血エクソソームを用いて、放射線治療感受性にかかわる候補 miRNA を同定でき、その miRNA を膵癌細胞株 (PSN-1、Panc-1) に過剰発現させ、放射線照射を加えると放射線耐性の増強を認めた。

本研究を通じて、末梢血のエクソソーム中の miRNA を抽出し解析することにより、抗癌剤治療の治療効果を予測できるシステムが構築できる可能性を示し、また放射線治療の効果を増強するシステムが構築できる可能性を示した。本研究は臨床検体をベースとした研究であり、近い将来に臨床応用できる可能性が高い研究成果と言える。

【図2】機械学習とNetwork解析によるmiRNAの同定

クラスターの中心をなすmiRNA(全23種)



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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 植田 大樹, 高橋 秀典, 小林 省吾, 佐々木 一樹, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 miRNA-6855-5pはEMTを誘導し, 膵癌の放射線耐性を増悪する
3. 学会等名 第82回日本癌学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植田 大樹, 高橋 秀典, 小林 省吾, 佐々木 一樹, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 膵癌におけるmiR-6855-5pの放射線感受性に与える影響についての検討
3. 学会等名 第78回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 植田 大樹, 高橋 秀典, 小林 省吾, 佐々木 一樹, 岩上 佳史, 山田 大作, 富丸 慶人, 野田 剛広, 土岐 祐一郎, 江口 英利
2. 発表標題 膵癌におけるmiR-6855-5pの放射線感受性に与える影響についての検討
3. 学会等名 第123回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2023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	石井 秀始  (Ishii Hideshi)  (10280736)	大阪大学・大学院医学系研究科・特任教授(常勤)    (14401)	

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	小林 省吾  (Kobayashi Shogo)  (30452436)	大阪大学・大学院医学系研究科・准教授    (14401)	
研究分担者	野田 剛広  (Noda Takehiro)  (50528594)	大阪大学・医学部附属病院・講師    (14401)	

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