

令和 6 年 6 月 19 日現在

機関番号：17401

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07221

研究課題名（和文）革新的治療法開発を目指した膵癌のKRAS遺伝子変異subtypeの網羅的解析

研究課題名（英文）Analysis of KRAS point mutation in pancreatic cancer

研究代表者

近本 亮（Chikamoto, Akira）

熊本大学・病院・教授

研究者番号：10419640

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）：オルガノイド構築にやや難渋しており、目的の表現系評価まで至れていない。並行して臨床検体サンプルの整理、databaseのupdateを行い、遺伝子変異解析準備を行なっている。臨床検体サンプル整理およびdatabase updateの過程で、周術期における輸血が術後生存期間に与える影響、根治切除術後早期再発因子に関する検討、術後合併症と早期再発に関する検討を行い、臨床的に有益な結果と思われ、論文として報告した。引き続き膵腫瘍モデルマウスを用いたin vivoにおける評価、および臨床検体を用いた膵癌におけるKRAS遺伝子点突然変異の評価を行い特徴を明らかにしていく。

研究成果の学術的意義や社会的意義

KRAS遺伝子変異は、下流遺伝子も多岐に渡るためundruggableな遺伝子と称され、詳細な分子メカニズムも未解明であったが、近年遺伝子変異の違いによって表現系が異なる可能性が示唆されている。KRAS遺伝子点突然変異subtypeに関する知見およびr癌化に関する下流シグナルおよび抗腫瘍免疫を同定することで、新規治療戦略を探索するTranslational researchとして大きな意義を持つと考えられる。

研究成果の概要（英文）：The difficulty of the formulation of organoid composed by human pancreatic ductal carcinoma caused delays of research plan. Since we found some beneficial results in the process of searching database, we had reported the some papers.

研究分野：膵臓外科

キーワード：KRAS遺伝子変異 膵癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

膵癌は消化器癌の中でも極めて悪性度が高く難治性であり、5年生存率は未だ10%未満で新規治療戦略が日不要不可欠である。膵癌の特徴として、90%以上の症例がKRAS遺伝子変異を有するという点があり、膵癌の発癌進展メカニズムおよびその悪性度の高さに関して極めて重要な働きを担っている可能性が高い。膵癌を自然発症するモデルマウスは数種報告されているが、いずれも膵特異的 *Kras* 遺伝子変異をベースとしており、膵癌における *KRAS* 遺伝子変異の重要性が示唆される。これまで *KRAS* 遺伝子変異は、下流遺伝子も多岐に渡るため undruggable な遺伝子と称され、詳細な分子メカニズムも未解明であったが、近年遺伝子変異の違いによって表現系が異なる可能性が示唆されている。

2019年に *KRAS* G12C の遺伝子異常に対する有効な治療薬が報告され (Canon et al. Nature. 2019) 非小細胞肺癌において臨床的にその非常に良好な治療成績が報告された (Hong et al. New Engl J Med. 2020)。消化器領域においては、*KRAS* G12C に対する新規治療薬である Adagrasib の治療効果が報告され、G12C 遺伝子異常を有する胆道癌 12 例の治療成績は、奏効率が 40%で、生存期間の中央値は 15 ヶ月とこちらも驚異的な成績であった (Tanios et al. J Clin Oncol. 2023)。膵癌においても Sotorasib 単剤の驚異的な治療成績が報告された (Strickler et al. New Engl J Med. 2023)。様々な癌種において *KRAS* はその癌の進展に深くかかわることが知られているため、Precision Medicine の標的として新たな時代が今後展開されることが期待される。

それらの *KRAS* を標的とした治療薬は、まだ本邦では保険承認されていないものの、今後承認が期待される新規治療薬に関わる遺伝子異常の臨床的な意義解明は、多くの症例を有する施設でかつトランスレーショナルな研究を積極的に行っている施設でしか達成できない。当施設の特長として、外科の教室でありかつ基礎的な研究やトランスレーショナルな研究も積極的にこれまで行ってきたことから、膵癌において、詳細な長年にわたる臨床情報を基にした遺伝子異常の意義解明という有意義な研究となると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、*KRAS* 遺伝子点突然変異の subtype における表現系の特徴を解明し、臨床的意義を明らかにして新規治療戦略を確立することである。多数の臨床サンプル、樹立したオルガノイド、その知見から得られた新規膵癌モデルマウスを用いた包括的な解析を行うことで、膵癌、ひいては全癌腫における *KRAS* 遺伝子点突然変異 subtype の癌化に関与する下流シグナルおよび抗腫瘍免疫を同定し、新規治療戦略を探索する Translational research として大きな意義を持つと考えられる。

## 3. 研究の方法

(1)膵癌細胞株の *KRAS* 遺伝子変異解析を行う。それぞれの細胞株の分化度や増殖能、浸潤能評価を行ったのち、EGFR 阻害薬などの *KRAS* タンパクの下流遺伝子を含む分子標的治療薬を投与し、治療効果の判定を行う。

(2)熊本大学消化器外科で切除を行なった膵癌切除組織サンプルを用いて、膵癌オルガノイドを樹立する。樹立したオルガノイドの *KRAS* 遺伝子点突然変異を測定し、分子標的治療薬の drug screening を行う。

(3)*KRAS* 遺伝子点突然変異 subtype の膵特異的 *Kras* 変異マウスを作製する。それらのマウスと当教室で保有している膵特異的 *Kras*<sup>G12D</sup> 変異マウスの表現系の違いを評価する。

(4)ヒト膵癌切除標本組織から抽出したDNAを用いて、*KRAS* 遺伝子点突然変異の測定のほか、膵癌で頻度の高い3つの遺伝子変異検索も行う。*KRAS* 遺伝子点突然変異 subtype における臨床組織学的因子や他3種の遺伝子変異の相関、腫瘍内免疫細胞や予後との相関解析を行い、臨床的意義を検証する。

## 4. 研究成果

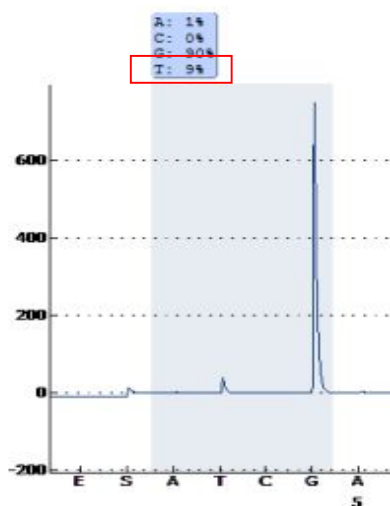
オルガノイド構築に難渋しており、目的の表現系評価まで至ることができていない。培養液の器質、Growth factor を含めた至適環境の調整の問題であるが、様々な条件で検証中である。並行して臨床検体サンプルの整理、database の update を行い、遺伝子変異解析準備を行なっている。臨床検体サンプル整理および database update の過程で、周術期における輸血が術後生存期間に与える影響 (Kitano et al. Pancreas 2022)、根治切除術後早期再発因子に関する検討 (Ono et al. Surgery 2022)、術後合併症と早期再発に関する検討 (Miyata et al. Langenbecks Arch Surg 2022)、膵切除後の脂肪肝に関連するメカニズムの検討 (Yamamura et al. Ann

Gastroenterol Surg.) 膵神経内分泌腫瘍におきえるリンパ節転移のリスクファクターの検討 (Nakao et al. World J Clin Oncol 2022)、肺転移症例の他施設共同研究 (Homma et al. J Hepatobiliary Pancreat Sci 2022) を行い、症例報告も含めて (Ogawa et al. BMJ Case Rep) 臨床的に有益な結果と思われ、論文として報告した。

ヒト膵癌パラフィン固定切片から DNA を抽出し、Pyrosequence 法を用いて様々な KRAS 遺伝子変異の検出を行っている。コドン 13 からは変異を認めず、97 例中 90 例 (92.8%) に KRAS 遺伝子変異を認めた。今後 Sotorasib といった分子標的治療薬が期待される、報告上も膵癌例全体の 1%程度に見られる G12C 変異もこれまでの検証で 1 例認めた (右下図 Sample ID #11)。膵癌症例は 2000 年以降、これまで 450 例の膵切除症例があるため、引き続き KRAS 遺伝子変異解析を行い、変異箇所と臨床的な特性が関連するかについても調べていく予定である。

膵癌細胞株を用いた表現系の評価はや、膵癌組織由来オルガノイドを用いた表現系の評価、膵腫瘍モデルマウスを用いた *in vivo* における評価、および臨床検体を用いた膵癌における KRAS 遺伝子点突然変異の評価と予後解析を行い、KRAS 遺伝子点突然変異 subtype の特徴を明らかにしていく。

Well: B3  
Assay: KRAS NEW PF2  
Sample ID: #11  
Note: PF2  
Analysis version: 2.0.6



Sequence to analyze:  
A/C/T/GGTGGCGTAGGCAAGAG

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ono S, Adachi T, Ohtsuka T, Kimura R, Nishihara K, Watanabe Y, Nagano H, Tokumitsu Y, Nanashima A, Imamura N, Baba H, Chikamoto A, Inomata M, Hirashita T, Furukawa M, Idichi T, Shinchi H, Maruyama Y, Nakamura M, Eguchi S	4. 巻 172
2. 論文標題 Predictive factors for early recurrence after pancreaticoduodenectomy in patients with resectable pancreatic head cancer: A multicenter retrospective study	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgery	6. 最初と最後の頁 1782 ~ 1790
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.surg.2022.08.004	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kitano Yuki, Yamashita Yo-ichi, Matsumoto Takashi, Kinoshita Shotaro, Itoyama Rumi, Kaida Takayoshi, Hayashi Hiromitsu, Imai Katsunori, Chikamoto Akira, Baba Hideo	4. 巻 51
2. 論文標題 Survival Impact of Perioperative Red Blood Cell Transfusion During Pancreatectomy in Patients With Pancreatic Ductal Adenocarcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Pancreas	6. 最初と最後の頁 200 ~ 204
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/MPA.0000000000001997	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔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
研究分担者	有馬 浩太 (Arima Kota) (10792616)	熊本大学・大学院生命科学研究部(医)・特定研究員  (17401)	
研究分担者	林 洋光 (Hayashi Hiromitsu) (80625773)	熊本大学・病院・講師  (17401)	

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