

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年6月20日現在

機関番号： 82504
 研究種目： 若手研究（B）
 研究期間： 2010年度 ～ 2012年度
 課題番号： 22790678
 研究課題名 切除不能進行膵がんにおける網羅的ゲノム解析による個別化治療法の確立に関する研究
 研究課題名 Comprehensive genomic analysis of unresectable pancreatic cancer.
 研究代表者
 須藤 研太郎（SUDO KENTARO）
 千葉県がんセンター（研究所）・消化器内科・医長
 研究者番号： 60400884

研究成果の概要（和文）：

本研究では切除不能進行膵癌患者より超音波内視鏡下生検によって採取した膵癌組織を用いて網羅的ゲノムコピー数異常解析を行い、治療の有効性などの臨床的因子との関連性を解析し、治療効果予測因子となりうる新規ゲノムバイオマーカーについて探索的な検討を行った。切除不能膵癌患者からの生検癌組織を用いたゲノム解析の報告は少なく、本研究により得られた知見は切除不能膵癌の個別化治療への礎になるものと期待される。

研究成果の概要（英文）：

We performed array-based comparative genomic hybridization analysis using biopsy samples obtained by endoscopic ultrasound-guided fine-needle aspiration biopsy (EUS FNA) in patients with unresectable advanced pancreatic cancer. We investigated genomic copy number profiles in association with therapeutic outcomes to explore a novel genomic biomarker.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2012年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	2,800,000	840,000	3,640,000

研究分野： 医歯薬学

科研費の分科・細目： 内科系臨床医学、消化器内科学

キーワード： 膵癌、ゲノム解析

1. 研究開始当初の背景

膵癌は難治癌のひとつに数えられ、なかでも外科的切除不能な進行膵癌の予後はきわめて不良である。従来、切除不能進行膵癌に対す

る標準的治療はゲムシタビンによる全身化学療法とされるが、その生存期間中央値はわずか6-7ヶ月に過ぎない。治療成績の向上のためには有効な治療

法の開発が急務である。

近年、遺伝子解析技術の進歩により癌細胞の網羅的ゲノム解析が可能となっており、腫瘍の分子生物学的性質の解明に向けた取り組みは大きく加速している。われわれの施設（千葉県がんセンター研究局）では神経芽腫において癌組織の遺伝子マーカーの検索、DNAチップを用いた遺伝子発現解析、ゲノムコピー数異常解析を行ってきた実績を持つ。

現在、超音波内視鏡下生検の普及により切除不能膵癌においても容易に癌細胞を採取することが可能となっており、個々の腫瘍の特性に応じた個別化治療への期待が高まっている。一方、微小な超音波内視鏡下生検検体を用いたゲノム解析の報告はきわめて少なく、その実現可能性を含め不明な点は多く、今後の取り組みに期待される。

2. 研究の目的

外科的切除不能な進行膵癌患者を対象として、治療前に超音波内視鏡下生検によって採取された膵癌組織を用いて、網羅的ゲノムコピー数異常解析を行い、化学療法の効果や予後などに関わる分子情報を解明し、膵癌の治療成績向上に向けた新規診断法の開発、個別化治療の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) 膵癌組織の採取、保存

切除不能進行膵癌患者を対象として治療前の診断時に行われる超音波内視鏡下生検により膵癌組織を採取する。検体保存にはすでに運用されている当センターの組織バンクを利用し、匿名化後、凍結保存する。

(2) 化学療法または化学放射線療法

膵癌組織採取後、患者に化学療法（ゲムシタビン療法やゲムシタビン+S-1療法など）や化学放射線療法を行う。治療開始後、抗腫瘍効果・有害事象・生存期間などの臨床データを集積する。

(3) 網羅的ゲノムコピー数異常解析

凍結保存した膵癌組織よりDNAを採取し、Agilent Technologies製のオリゴマイクロアレイを使用し、ゲノムコピー数変化の網羅的解析を行う。

(4) 統計解析

解析によって得られたゲノムコピー数異常パターンに対して、定期的に収集した臨床データと組み合わせた統計解析を行い、進行膵癌における薬剤感受性、予後など症例の臨床的特徴に強く相関する遺伝子要因を検索する。データの再現性については新規症例に対し

て解析を行い有用性について確認、評価を行う。

4. 研究成果

(1) 超音波内視鏡生検検体からの核酸抽出とKRAS変異解析

これまで117例の生検検体よりDNA抽出を行っており、平均2.24 μ gのDNA抽出が可能であった。また、KRAS変異解析

(Direct Sequence法または一塩基伸長法)を行った75例中61例(81.3%)に遺伝子変異を認めた。このKRAS変異解析結果は過去に報告された切除標本のデータと比較して同様の成績であり、微小な超音波内視鏡生検検体であっても膵癌細胞のDNA抽出およびゲノム解析が可能であることが示唆された。

(2) 網羅的ゲノムコピー数異常解析

図1に76例のゲノムコピー数プロファイルを示す。図2はゲノム上の各プロンプトにおけるgain、lossの頻度を表す。基線上側の赤線がgainの頻度、下側の緑線がlossの頻度を示している。

図1

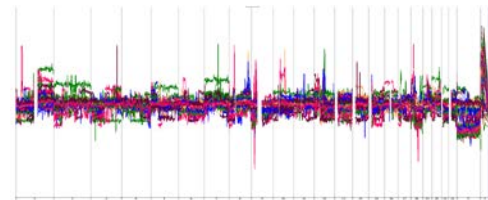


図2



今回の検討では膵癌における代表的な癌抑制遺伝子であるp16およびSMAD4のlossを各々62%および47%の症例に認めた。このほか、MYCやKRASなどの癌遺伝子のgainが約33%および20%の症例に認められた。p16やSMAD4のlossの頻度は上記KRAS変異解析と同様に、切除標本を用いた解析パターンと比較し再現性を有しており、生検検体であってもゲノム解析が可能であることが示唆された。

(3) ゲノムコピー数異常と治療効果

本検討では臨床データの集積された70例について治療効果とゲノムコピー数変化との関連性を検討した。治療法の内訳はゲムシタビン単剤41例、ゲムシタビン+S-1療法29例であり、各々の治療法について進行度（遠隔転移例/局所進行例）および無増悪生存期間により治療有効群と無効群に分け、膵癌ゲノムコピー数異常プロファイルを比較検討した。ゲムシタビンによる治療を行った41例のうち、有効群16例の全生存期間中央値（MST）は13.5ヶ月と無効群25例のMST5.5ヶ月と比べ有意に良好であった。（ $P < 0.0001$ ）また、ゲムシタビン+S-1療法を行った29例においても有効群15例のMSTは19ヶ月と無効群14例3.7ヶ月と比べ有意に良好であった。（ $p < 0.0001$ ）ゲノムコピー数異常と治療効果の関連性の検討ではゲムシタビン有効群と無効群の間で3q、8q、13q、15qのgainや9qのlossなどの頻度に差がみられる傾向があった。また、ゲムシタビン+S-1療法有効群と無効群の比較では6q、17pのlossや6pのgainの頻度に差がみられる傾向にあった。これらの領域から、予後または治療効果予測に関わる候補遺伝子を絞り込み、発現解析などを加え詳細に検討を行う。

膵癌患者の80-90%は外科的切除不能な状況で発見されるため、癌組織の採取は生検に頼らざるを得ない。本研究ではまず初めにゲノム解析に超音波内視鏡下生検検体を用いることの妥当性について検討した。KRAS変異やp16、SMAD4のlossなど膵癌においてこれまで報告される主要なゲノム変化は超音波内視鏡下生検検体を用いた本研究でも再現可能であった。本研究では次いでゲノムコピー数異常とゲムシタビン療法やゲムシタビン+S-1療法などの化学療法の効果との関連性について解析を行っている。本研究で得られたこうした知見は難治癌の代表である切除不能膵癌に対する個別化治療確立に向けた礎になるものと期待される。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 1件）

①須藤研太郎，横井左奈，大平美紀 et al.（他13名、1番目）切除不能膵癌におけるEUS-FNA検体を用いた網羅的ゲノム解析による個別化治療確立の試み 胆と膵 34：185-189，2013（査読なし）

〔学会発表〕（計 5件）

①須藤研太郎，切除不能進行膵癌における網羅的ゲノム解析による個別化治療法の確立の試み、2012年10月27日、横浜

②Kentaro Sudo，Advances in oncologic and endoscopic management for unresectable pancreatic cancer. 第20回日本消化器関連学会週間、2012年10月12日、神戸

③須藤研太郎，切除不能進行膵癌における網羅的ゲノム解析による個別化治療確立の試み 第43回日本膵臓学会大会、2012年6月29日、山形

④Kentaro Sudo，Array-based comparative genomic hybridization analysis of unresectable pancreatic cancer: our recent approach to individualized treatment. The 2nd Japan-China symposium on cancer research, 2012年5月9日、幕張

⑤須藤研太郎，切除不能進行膵癌における網羅的ゲノム解析による個別化治療法の確立の試み 第98回日本消化器病学会総会、2012年4月20日、東京

〔図書〕（計 0件）

〔産業財産権〕
なし

〔その他〕
ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

須藤 研太郎 (SUDO KENTARO)
千葉県がんセンター (研究所) ・ 消化器内科 ・
医長
研究者番号 : 60400884

(2) 研究協力者

横井 左奈 (YOKOI SANA)
千葉県がんセンター (研究所) ・ がんゲノム
センター ・ 部長
研究者番号 : 30372452

大平 美紀 (OHIRA MIKI)
千葉県がんセンター (研究所) ・ がんゲノム
センター ・ がんゲノム研究室 ・ 室長
研究者番号 : 20311384

山口 武人 (YAMAGUCHI TAKETO)
千葉県がんセンター (研究所) ・ 副病院長

中村 和貴 (NAKAMURA KAZUYOSHI)
千葉県がんセンター (研究所) ・ 消化器内科