

膵癌術後 S-1 治療の効果予測を可能とした 2 因子による 実臨床への応用を目指した研究

東北大学大学院医学系研究科消化器外科学分野

石田 晶 玄

I 要 旨

抗癌剤治療は膵癌治療の中核を担うものであるが、治療前の効果予測は困難である。当科ではこれまで膵癌切除検体を用いて抗癌剤感受性試験である CD-DST 法の結果を使用し免疫染色の手法を用いて感受性を予測する方法の検証を行ってきた。CD-DST 法の結果をもとに定量プロテオミクスの手法にて感受性を予測する因子の抽出を行い、東北大学のコホートをを用いて免疫染色法による効果予測を可能とする 2 因子、C1TC と SAHH を抽出した。C1TC 及び SAHH いずれかの因子が陽性であった場合には、S-1 投与後の再発予防効果が期待できる一方で、いずれの因子も陰性であった場合には、補助治療の効果が著しく低下し、術後の再発予防という点からは S-1 の使用は有用な治療法にはなりえないことを明らかにした。しかしながら先行研究は東北大学単施設による後方視的研究であることから、施設バイアスが発生している可能性があると考え。本研究では、東北大学以外の日本肝胆膵外科学会が認定する高度技能修練施設におけるコホートをを用いて S-1 の効果予測が可能であるかを検証するものである。他施設のコホートでも同様の結果が得られれば、より信頼性の高い検査となる可能性があり、今後前向き研究へとつなげていくことが可能になるものと考え。

II 背景・目的

化学療法は膵癌において中核をなす治療手段である。膵癌診療ガイドライン 2022 年版によると初診時に切除不能と診断された症例に対し、5FU もしくはゲムシタビンいずれかをベースとした治療が推奨され、治癒切除後の補助治療として半年間の S-1 による治療が推奨されている。PREP02/JSAP05 試験の結果が報告されて以降切除可能症例に対し術前治療として抗癌剤による治療を企図する施設も多く、抗癌剤は膵癌治療におけるあらゆる段階において中心的な役割を担っている。

薬剤に対する感受性は個々の症例で異なっており、使用前に抗癌剤の抗腫瘍効果を予測するのは今なお困難である。これまで当施設では薬剤の感受性予測を行うべく様々な検討を重ねてきた。腫瘍細胞を用いた微量 3 次元培養法である CD-DST (Collagen gel Droplet embedded culture Drug Sensitivity Test) 法は、組織から生細胞を採取し、コラーゲン培地に封入後、抗癌剤と接触させ、7 日後に生細胞の割合を評価する方法である。術後の S-1 内服症例を対象とし、5-FU に対する感受性によって群間比較を行ったところ、高感受性群では術後再発までの期間が延長する傾向を認めており、膵癌においても CD-DST 法は術後の抗癌剤治療における感受性を予測するうえでの有用な検査となりうることを期待された¹⁾。しかしながら CD-DST 法の施行には一定数以上の癌細胞が必要となる。膵癌は間質量が多いことから、検査に

必要な癌細胞を確保するには多くの組織検体が必要となり、検体の採取が困難であるという問題がある。過去の検討では本検査を施行した 93 切除例に対し、細胞数不足が問題となり検査にて結果が得られたのは 51 例 (54.8%) にとどまるのみであった。検査には多くの検体が必要となり、特に術前治療を施行した症例では検査が不能な場合が多いことから、術前治療が多くなされる膵癌において、補助治療の効果を予測するにはやや不向きな検査であるとも考えられた。CD-DST 法は成功率が低く、全症例に適用することが困難であることから、より簡便な手法である免疫染色法で感受性を評価することが可能であるかについての検討を行うこととした。CD-DST 法による感受性試験の結果が得られた症例の膵癌組織より蛋白質を抽出し、プロテオミクスによる発現解析を行ない、CD-DST 法の感受性結果を補完しうる因子の抽出を行った。その結果、高感受性例に高発現している因子として、葉酸代謝酵素 Cyclohydrolase and Formyltetrahydrofolate Synthetase 1 (C1TC)、メチオニン代謝酵素 S-Adenosylhomocysteine Hydrolase (SAHH) の 2 つを同定した。免疫染色法による確認を行ったところ、2 因子のいずれかが発現している場合には無再発生存期間 (DFS) が長く、S-1 による再発予防効果が期待できるのに対し、いずれの発現も低い場合には DFS が補助治療未施行群と同等であることが明らかとなった²⁾。

以上の研究から免疫染色法を用いた S-1 補助治療による効果予測の可能性を見出した。しかしながら、これまでの研究成果は東北大学単施設における免疫染色法を用いた予測法に過ぎず、施設バイアスが強くかかっていることから、普遍的に使用が可能なものであるかについては明らかにされていない。本研究では他のハイボリュームセンターにおけるコホートをを用いて C1TC 及び SAHH の 2 因子の発現評価が S-1 補助治療による再発予防効果を予測するうえで

有用な指標となるかを検証することにある。

III 方 法

研究対象

2009 年 1 月から 2020 年 12 月の期間内に日本肝胆膵外科学会高度技能修練施設 (A) に認定されている仙台オープン病院にて膵切除が施行された膵癌症例を対象とした。非浸潤癌と診断された症例及び S-1 以外の補助治療が施行された症例を除外し解析を行うこととした。本研究は仙台オープン病院における倫理委員会にて審査を行い、承認が得られたのちに開始した (承認番号 2022-0035)。

免疫染色法

FFPE 組織から厚さ $4\mu\text{m}$ の薄切スライドを作成し、キシレンで脱パラフィン処理を行い、エタノール溶液で脱水後、蒸留水で再水和した。抗原賦活処理として、10mM クエン酸緩衝液 (pH 6.0) 中で 15 分間のマイクロウェーブ加熱、または 120°C 5 分間のオートクレーブ加熱を行った。一次抗体には、以下の 10 種類をそれぞれの希釈濃度で用いた。抗 AHCY 抗体 (SAHH) (Adenosylhomocysteinase, #10757-2-AP, 1:200, Proteintech Group, Chicago, IL, USA)、抗 MTHFD1 抗体 (C1TC) (Methylenetetrahydrofolate dehydrogenase, cyclohydrolase and formyltetrahydrofolate synthetase 1, #10794-1-AP, 1:500, Proteintech Group)

Protein Atlas のウェブサイトを検索し、各タンパク質が多く発現している正常組織を、それぞれポジティブコントロールとして使用した。各タンパク質の一次抗体は、それぞれのポジティブコントロールで正常に機能することを確認した。切片に一次抗体の希釈液をのせ、 4°C で一晩抗体反応を行った。0.3% 過酸化水素を含むメタノールで内因性ペルオキシダーゼブロッキングを行い、標識抗原を DAKO

EVision+System (Agilent Technologies, Denmark) により検出し、3,3'-ジアミノベンジジシテトラヒドロクロリドで可視化した。

評価方法

判断は Immunoreactivity scoring system (IRS) を用いて行うこととした。IRS は 4 段階評価の免染強度 (Intensity) 【0 点: (-)、1 点: (1+)、2 点: (2+)、3 点: (3+)】〔図 1〕に、5 段階評価の陽性細胞の割合 (Proportion) 【0 点: 陰性、1 点: <10%、2 点: 10-50%、3 点: 51-80%、4 点: > 80%】を乗じて算出した。本研究では 8 点以上を陽性とした。

統計

2 群間の比較として連続変数についてはノンパラメトリック検定を使用し、群間比較にはカイ 2 乗検定を使用した。生存率は Kaplan-Meier 生存曲線を用いて作成し、2 群間の比較はログランク検定にて行った。また COX 比例ハザードモデルを用いて S-1 投与後の再発予測因子解析を行った。統計学的解析には JMP version 16 (SAS Institute Inc, NC) を用いた。いずれの検定結果についても p 値が 0.05 未満を統計学的に有意であるとした。

IV 結 果

コホート背景因子

仙台オープン病院において 2010 年 1 月より 2020 年 12 月の期間内で膵癌の診断にて膵切除を施行した症例は 233 例であった。非浸潤癌と診断された症例 8 例、S-1 による補助治療が施行されていない症例 28 例を除いた 197 例のうち、補助治療が行われなかった 62 症例を除外した 135 例を解析対象とした。

S-1 による補助治療施行例 135 例の年齢中央値は 68 歳、男性 95 例、女性 40 例であった。腫瘍主座は膵頭部が 87 例、膵体尾部が 48 例であり、術前の切除可能分類は切除可能 (R) が 121 例、切除可能境界 (BR) が 14 例含まれて

いた。切除後の病理診断は T1、T2、T3 症例がそれぞれ 25 例、22 例、88 例であり、N0、N1a、N1b 症例は 52 例、52 例、31 例であった (膵癌取り扱い規約第 7 版に準じる)。135 例の生存期間中央値は 51.1 カ月、無再発生存期間中央値は N 群 21.6 カ月であった。

免疫染色

上記 135 例に対し C1TC、SAHH 2 種類の抗体を用いた免疫染色が終了した。現在病理医に評価を依頼しており、発現量について Immunoreactivity scoring system (IRS) を用いた評価を行っている。今後結果の解析を行い、2 因子の発現量を組み合わせることで、S-1 補助治療による再発予測効果が可能となるかを検証する。

V 考 察

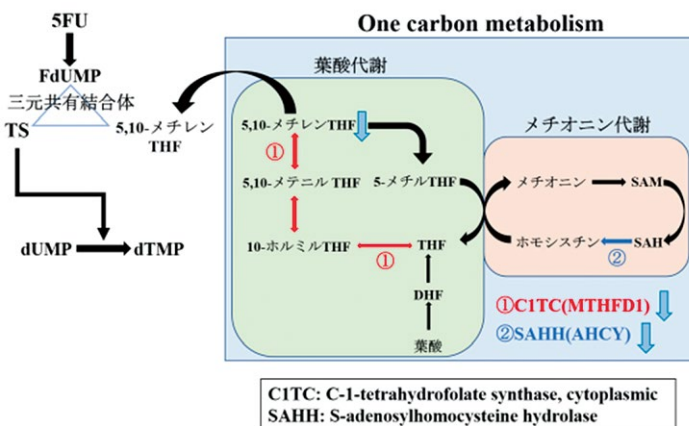
本研究はプロテオミクス的手法を用いて 5-FU の感受性に関与する因子として抽出された 2 因子、C1TC と SAHH を用いて、S-1 保持治療による効果予測が可能となるかについて、他施設のコホートを用いて解析したものである。先行研究による東北大学単施設の検討では、効果予測に有用である可能性が示されているものの、単施設による後方視的研究であることから、施設バイアスを含めた様々なバイアスが問題とされていた。本研究により異なる施設コホートでの効果予測が可能となれば、より信頼性の高い検査になりうるものと考ええる。

S-1 は 5FU の前駆体であるテガフルを有した合剤であり、生体内にて吸収されたのちに、5FU へと変換される。5FU はピリミジン塩基であるウラシルの 5 位の水素がフッ素に置換された化合物である。生体内へ取り込まれたのちにリン酸化されることで、フッ化デオキシウリジン 1 リン酸 (FdUMP) が形成される。FdUMP は還元型葉酸である 5, 10-メチレンテトラヒドロ葉酸 (THF) とともにチミジル酸合

成酵素 (TS) と三元共有結合体 (ternary complex) を形成する。これにより dUMP から dTMP への変換が阻害され DNA 合成障害が誘発され、抗腫瘍効果が発揮される (図)。

5FU が TS の活性化を抑制するには三元共有結合体の形成が必要であり、それには葉酸代謝化合物である 5, 10-メチレン THF の存在が必要とされる。生体内における葉酸代謝経路はメチオニン代謝経路と密接に関与しており、これらの代謝経路は一炭素代謝として認識されている。葉酸は体内に取り込まれたのちに、ジヒドロ葉酸を経て、テトラヒドロ葉酸 (THF) へと変換される。THF は 10-Formyl THF、5, 10-methenyl THF をへて 5, 10-メチレン THF へと合成される。THF から 5, 10-メチレン THF までの間の 3 反応は双方向的に起こる反応であり、その 3 つの反応を触媒する酵素が C1TC (MTHFD1) である。C1TC の発現低下は 5FU の細胞毒性効果を減弱することが報告されているが、本因子の低下は THF を介した 5, 10-メチレン THF への合成能を著しく阻害するものであり、5FU の活性化に必要な三元共有結合体の形成に必要な因子が欠乏することから、TS の阻害効率が低下し 5FU への感受性が低下するものと考えられる。

5, 10-メチレン THF はその後 5-メチル THF へと変換されるが、5-メチル THF はホモシステインにメチル基を供与することでメチオニンへと変換され、自身は THF へと変換される。この反応を介し、葉酸代謝とメチオニン代謝は相補的に関与しあうこととなる。メチオニンは APT を結合することで S アデニルメチオニン (SAM) となり、ここから核酸のメチル化を行いつつ、自らは S アデニルホモシステイン



(SAH) へと変換される。SAH はホモシステインへと変換されるが、それを触媒する酵素として SAHH (AHCY) が存在する。このため、SAHH の発現が低下している細胞株においてはメチオニン代謝経路が阻害されていると考えられる。メチオニンの制限は 5, 10-メチレン THF の合成を約 75% 阻害し、ひいては TS の活性化を 90% 阻害することで 5FU の活性化を抑制するとも報告されている。本検討で抽出された SAHH の発現低下はメチオニン代謝におけるホモシステインの合成を抑制する。このため葉酸代謝経路における 5-メチル THF から THF への変換が阻害され、細胞質内における THF の低下から 5, 10-メチレン THF の合成能が低下し、三元体共有結合が十分に形成されなくなることから、5FU への感受性が低下するものと考えられた。

以上より抗癌剤の感受性とこれら 2 因子との関係には葉酸代謝からの三元共有結合体の形成が重要であることが予想される。今後は細胞株を用いて、C1TC、SAHH 2 因子の発現を調整することで、5, 10-メチレン THF の発現量を評価するとともに、葉酸を含めた何らかの因子を補充することで感受性が改善するかを検証していく必要があると考える。

VI 結 語

S-1 を用いた膵癌術後補助療法の効果予測因子として抽出された SAHH と CITC の 2 因子について、他施設のコホートを用いた発現解析を行った。CITC、SAHH はいずれも一炭素代謝経路内における重要な酵素群であり、これらの発現が低下することによって、5, 10-メチレン THF の発現を介した三元共有結合体の合成が阻害され、5FU の感受性が低下するものと推察される。本因子の発現に基づいた補助治療の選択は膵癌切除後の治療戦略において重要な指標になる可能性があると考えられた。

参考文献

- 1) Ariake K, Motoi F, Mizuma M, et al. Collagen gel droplet-embedded culture drug sensitivity test (CD-DST) predicts the effect of adjuvant chemotherapy on pancreatic cancer. *Surg Today*. 2019 Dec; 49(12): 1035-1043.
- 2) Mitachi K, Ariake K, Shima H, et al. Novel candidate factors predicting the effect of S-1 adjuvant chemotherapy of pancreatic cancer. *Sci Rep*. 2021 Mar 22; 11(1): 6541.