

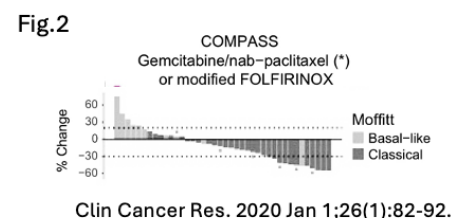
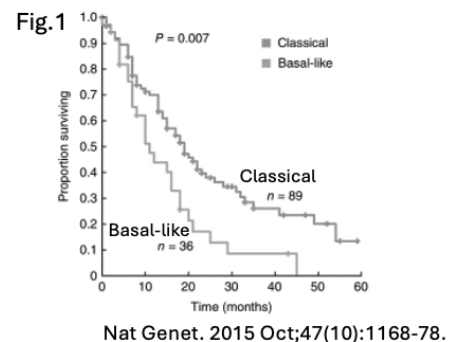
膵癌個別化医療の実現に向けた 膵癌分子サブタイプ予測 AI の開発

国立大学法人東海国立大学機構
名古屋大学医学部附属病院
腫瘍外科 病院助教
馬場 泰輔
消化器内科 講師
石川 卓哉
腫瘍外科 教授
江畑 智希

1. 研究の背景・目的

膵癌の5年生存率は約10%と悪く、固形癌の中で最も予後が不良である。手術単独では予後の改善に限界があり、近年は術前術後の周術期補助化学療法が膵癌治療ガイドラインで推奨され、標準治療となっている。すなわち、現状では切除可能な膵癌に対しても、術前補助化学療法を行っているが、この戦略には術前治療中に腫瘍が増大するリスクが存在する。したがって、もし化学療法感受性を精度高く予測するマーカーが存在すれば、術前治療の対象を効果が期待できる症例のみに制限すべきだが、現状では化学療法感受性に関する有用なマーカーは存在しない。

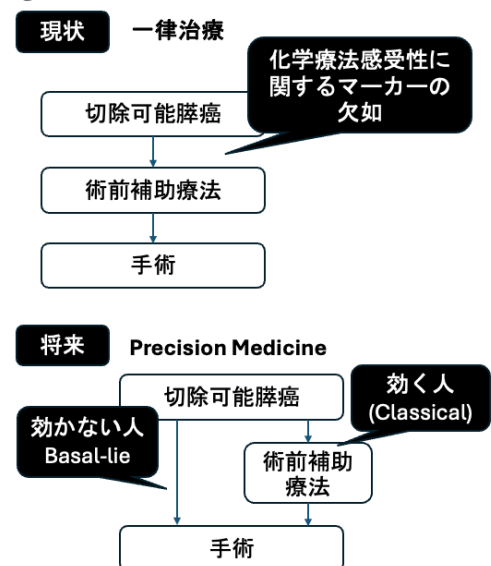
RNA-seqをはじめとするトランスクリプトーム解析の蓄積により、膵癌の遺伝子発現パターンの多様性が明らかとなっている。Moffitt ら(1)は、膵癌の遺伝子発現パターンが「Classical サブタイプ」と「Basal-like サブタイプ」の二つの主要な分子サブタイプに分類されることを見出し、特に「Basal-like サブタイプ」は他のサブタイプに比べて予後が悪いことを示した (Fig. 1)。興味深いことに COMPASS 試験では、Classical サブタイプの化学療法感受性が高いことが示され、このサブタイプが化学療法の効果を正確に予測する新たなマーカーになることが期待されている (Fig. 2) (2, 3)。



我々はこれまでに、網羅解析を臨床応用するために必要なシングルサンプル分類アルゴリズムを開発し特許出願を行った (Inverse Pairs Boosting (IPB 法)、出願番号 2023-054539, 2023-142853)。この手法は、z-score のような従来のデータセットレンジに依存した手法と異なり、シングルサンプルに対してもバッチ誤差の影響を最小限にした精度の高い分類予測を可能にする。さらに IPB 法では、RNA-seq とリアルタイム PCR (RT-PCR) のような全く異なるモダリティの統合解析が可能で、公開されている大量の RNA-seq データを学習した AI モデルを構築し、迅速・安価な RT-PCR に適用するといった運用を可能にする。我々はこの技術に応用することで超音波内視鏡下穿刺吸引法 (EUS-FNA) によって得られた微小な生検サンプルから術前の膵癌分子サブタイプを予測できると考えた。

本研究の目的は、EUS-FNA 検体の RT-PCR 結果を RNA-seq ベースの AI モデルに入力し、膵癌分子サブタイプを予測することが可能か検証することである。将来的には化学療法感受性の予測に基づき、術前治療の有無を選択する「Precision medicine」の実現を目指す (Fig. 3)。

Fig.3



2. 研究の対象ならびに方法

名古屋大学医学部附属病院で EUS-FNA を受ける膵癌患者を対象とし、EUS-FNA 検査時に得られた余剰検体から RNeasy micro kit を用いて RNA を抽出する。得られた total RNA から cDNA を作成し、17 個のマーカー遺伝子について RT-PCR を行い発現量を測定する。得られたデータは我々の開発した独自アルゴリズムである IPB 法で処理し、既存の RNA-seq データ上にマップし、サポートベクターマシン (SVM) を用いた機械学習モデルで膵癌の分子サブタイプを予測する。その後、切除可能膵癌では術前補助化学療法 / 切除不能膵癌では通常の化学療法を行い (内容は指定しない)、2~3 ヶ月後の評価 CT で標的病変のサイズ変化を計測し、分子サブタイプとの関連を評価する。また、余剰検体が多く、RNA-seq も可能な十分な量の RNA が得られた症例については RNA-seq も行い、RT-PCR に基づくサブタイプ予測と RNA-seq に基づく真のサブタイプの一致を検証する。目標症例数は 40 例 (Basal-

like サブタイプを 10 例程度見込む) とする。

3. 研究結果

患者背景

合計 54 症例から同意を取得し、そのうち 35 症例から実際に余剰サンプルを採取した。このうち 2 症例は病理診断により膵癌ではないことが判明したため除外し、最終的に 33 症例を解析対象とした。さらに、1 症例において PCR が不成功であったため、実際の解析は 32 症例 (96.6%) で実施された (Fig. 4)。

年齢中央値は 69 歳 (64~74 歳)、男女比は 16:17 であった。EUS-FNA 後の治療内容は、GEM ベース治療が 24 例 (73%)、Upfront 手術または BSC により化学療法を行わなかった症例が 6 例 (21%)、その他 (S-1 単独または陽子線+S-1) が 2 例であった。FOLFIRINOX 治療を受けた症例はなかった。

目標としていた 40 症例の登録前に 8 割に相当する症例が集積された時点で、FOLFIRINOX 治療を受けた症例が存在しなかったことから、本研究は 32 症例で一旦登録を中止し、中間解析を実施した。

RNA-seq・Microarray データと RT-PCR データの統合

IPB 法により、既存データとの統合が可能かどうかを検討した。RNA 収量の多かった 9 サンプルを RNA-seq に提出し、RT-PCR と RNA-seq の両データに IPB 法を適用して得られたスコアを比較した。その結果、RT-PCR と RNA-seq 間でのスコアには相関係数 $R = 0.96$ ($p = 5.2 \times 10^{-5}$) と非常に強い相関が認められた (Fig. 5)。

一方で、スコアの分布は RNA-seq や Microarray と比較してやや広がる傾向があり、今後、補正等の追加検討が必要であると考えられた (Fig. 6)。

Fig. 4

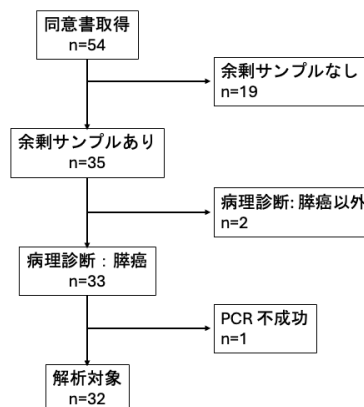


Fig. 5

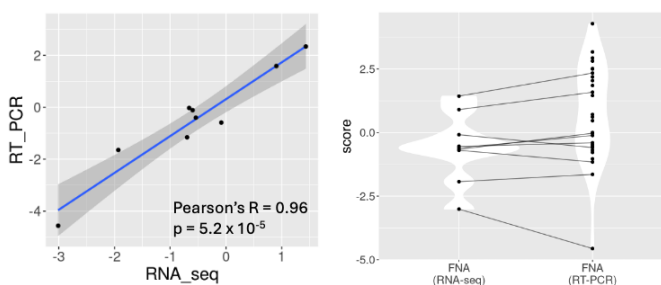
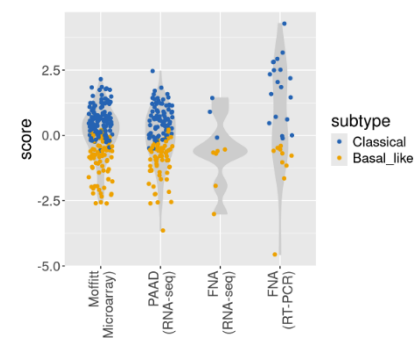


Fig. 6



分子サブタイプ予測・抗がん剤感受性予測

RT-PCR のデータから AI により膵癌の分子サブタイプを予測したところ、Classical サブタイプが 21 例 (65.6%)、Basal-like サブタイプが 11 例 (34.4%) と、従来報告と一致する頻度であった (Fig. 7)。

これまでの研究により、分子サブタイプは FOLFIRINOX 治療に対する効果予測には有用である一方で、GEM ベース治療には適用が難しいことが知られている。今回のコホートでは、FOLFIRINOX 治療を受けた患者がいなかったため、感受性予測の妥当性を評価することはできなかった。

GEM ベース治療を受けた患者のうち、CT で評価可能であった 18 例中、3 例が 20% 以上の腫瘍増大を示した (Fig. 8)。しかし、分子サブタイプと抗がん剤感受性との間に明確な相関は認められなかった (既報通り (2))。

Fig. 7

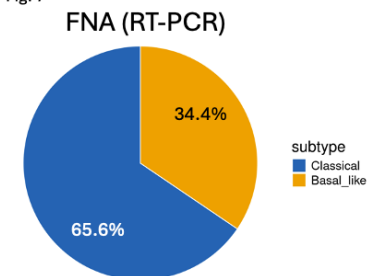
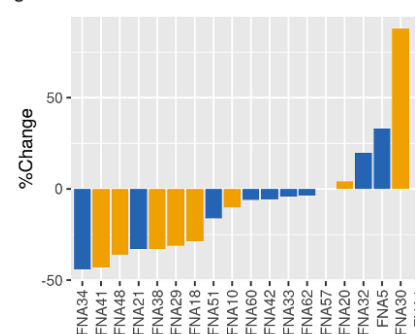


Fig 8



4. 考察

本研究では、FOLFIRINOX 感受性を予測可能なマーカーとして膵癌分子サブタイプを推定する AI モデルの構築を目指した。臨床応用を見据え、EUS-FNA などの微量な生検材料を前提とし、RNA-seq よりも迅速・簡便・低コストな RT-PCR を用いることを目標とした。

実際の EUS-FNA 検体において、97% の症例で RT-PCR が可能であったこと、また RT-PCR による AI スコアと RNA-seq による AI スコアが高い相関を示したことから、微量検体においても RT-PCR を用いて分子サブタイプの予測が可能であることが示された。

一方で、本研究のコホートには FOLFIRINOX 治療を受けた症例が含まれていなかったため、FOLFIRINOX に対する感受性予測の性能は検証できなかった。また、RT-PCR によるスコアには RNA-seq に比べてやや広がりが見られるなどの課題も明らかとなった。

今後は、FOLFIRINOX 治療を受けた過去の症例を用いて、抗がん剤感受性予測の実際の有効性についてさらに検討する予定である。

5. 文献

1. Richard A Moffitt, Raoud Marayati, Elizabeth L Flate, Keith E Volmar, S Gabriela Herrera Loeza, Katherine A Hoadley, Naim U Rashid, Lindsay A Williams, Samuel C Eaton, Alexander H Chung, Jadwiga K Smyla, Judy M Anderson, Hong Jin Kim, David J Bentrem, Mark S Talamonti, Christine A Iacobuzio-Donahue, Michael A Hollingsworth, Jen Jen Yeh: Virtual microdissection identifies distinct tumor- and stroma-specific subtypes of pancreatic ductal adenocarcinoma, *Nat Genet*, 47(10):1168–78, 2015.
2. Naim U Rashid, Xianlu L Peng, Chong Jin, Richard A Moffitt, Keith E Volmar, Brian A Belt, Roheena Z Panni, Timothy M Nywening, Silvia G Herrera, Kristin J Moore, Sarah G Hennessey, Ashley B Morrison, Ryan Kawalerski, Apoorve Nayyar, Audrey E Chang, Benjamin Schmidt, Hong Jin Kim, David C Linehan, Jen Jen Yeh: Purity Independent Subtyping of Tumors (PurIST), A Clinically Robust, Single-sample Classifier for Tumor Subtyping in Pancreatic Cancer, *Clin Cancer Res*, 26(1):82–92, 2020.
3. Xu Zhou, Kai Hu, Kai Hu, Peter Bailey, Peter Bailey, Christoph Springfield, Christoph Springfield, Susanne Roth, Susanne Roth, Roma Kurilov, Roma Kurilov, Benedikt Brors, Benedikt Brors, Thomas Gress, Thomas Gress, Malte Buchholz, Malte Buchholz, Jingyu An, Jingyu An, Kongyuan Wei, Kongyuan Wei, Teresa Peccerella, Teresa Peccerella, Markus W. Büchler, Markus W. Büchler, Thilo Hackert, Thilo Hackert, John P. Neoptolemos: Clinical Impact of Molecular Subtyping of Pancreatic Cancer, *Front Cell Dev Biol*, 9:743908, 2021.

6. 論文発表

未定