

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 12 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2012～2014

課題番号：24240122

研究課題名(和文) FGF3 遺伝子増幅による肝細胞癌ソラフェニブ治療の効果予測

研究課題名(英文) Prediction of sorafenib response by FGF3 gene amplification for patients with hepatocellular carcinoma

研究代表者

西尾 和人 (NISHIO, Kazuto)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10208134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 34,200,000 円

研究成果の概要(和文)：肝細胞がんにおいて、ソラフェニブの効果を予測するFGF3、FGF4遺伝子増幅以外の新たなバイオマーカーの探索を多施設臨床研究で実施した。収集した著効例のコピー数変動解析よりFGF19のコピー数変動を見出した。

多施設共同前向き試験として、次世代シーケンサーを用いて肝生検FFPEサンプルを用いた遺伝子解析を実施した。DNAシーケンシングにより、「がん遺伝子の変異の頻度」、RNAシーケンシングによりTGF- $\beta$  およびPECAM1が腫瘍縮小効果に関連するバイオマーカーとして、Neuregulin 1遺伝子発現が、無増悪生存期間延長の予測マーカーであることを示した。

研究成果の概要(英文)：We have analyzed the copy number variation of hepatocellular carcinoma (HCC) tumor in a multicenter clinical study. We found increased copy number of FGF19 was a new predictive biomarker for sorafenib response in addition to FGF3/FGF4 gene amplification in HCC. Separately, we conducted DNA and RNA sequencing of tumor FFPE samples in another multicenter clinical trials for HCC patients treated with sorafenib. DNA amplicon sequencing and RNA sequencing targeted 50 candidate genes were performed using FFPE tumor samples obtained by liver core needle biopsy. HCC tumor with low oncogene mutation numbers were sensitive to sorafenib treatment, suggesting that oncogene mutational burden in the tumor might be associated with the clinical response to sorafenib. We have also identified candidate genes (TGF- $\beta$ , PECAM1, and NRG1) for the prediction of sorafenib response and progression free survival by RNA sequencing.

研究分野：分子生物学

キーワード：肝細胞がん ソラフェニブ バイオマーカー TGF- $\beta$  PECAM1 NRG1

### 1. 研究開始当初の背景

ソラフェニブは RAF および VEGFR2 阻害薬であるが、FGFR への阻害活性も有する多標的キナーゼ阻害薬である。ソラフェニブ切除不能肝細胞癌に対するソラフェニブの保険承認が得られ、現在わが国では 5,000 名を超える肝細胞癌患者を対象に投与されている。興味深いことに、欧米の試験においては、1%の頻度の著効例 (CR 例および PR 例) が、我が国をはじめとするアジア諸国で 3%前後の症例で認められることが明らかになってきた。我々は現在までに 10 例のソラフェニブ著効例肝細胞癌を全国の日本肝がん研究会の参加施設を対象に集積し遺伝子解析を行った。肝細胞癌においてほとんど報告のない *FGF3/FGF4* のゲノムコピー数増幅がソラフェニブ著効例でのみ 10 例中 3 例認められ、有意に高頻度に認められたことを明らかにした。また臨床的には低分化型肝細胞癌および肺転移症例が著効することが多いことなどを特定した。一方、残りの 7 例の著効例については、メカニズムが明らかになっていない。全ゲノムレベルで遺伝子変異を特定することにより、別の遺伝子変異によるメカニズムの解明が期待される。また、我々は治療前の血清を試料として、リガンドパネルによるチロシンキナーゼ阻害薬の効果予測臨床試験を実施しており、血清サンプルにより 80%以上の症例で EGFR チロシンキナーゼ阻害薬の治療効果予測が可能なることを報告した。これらの研究結果をベースに、ソラフェニブ治療の非侵襲的なバイオマーカーの開発が望まれている。

### 2. 研究の目的

我々は、これまでに特定した肝臓癌へのソラフェニブ治療における *FGF3* 遺伝子増幅のバイオマーカーの可能性の検証ならびに新規バイオマーカー探索を目的として、下記の研究を進展させることを目的とする。

- (1) *FGF3/FGF4* による治療効果予測の基礎的・臨床的研究
- (2) 次世代シーケンスを用いたソラフェニブ著効例の遺伝子変異解析
- (3) リガンドパネルによるソラフェニブ効果予測の検討

### 3. 研究の方法

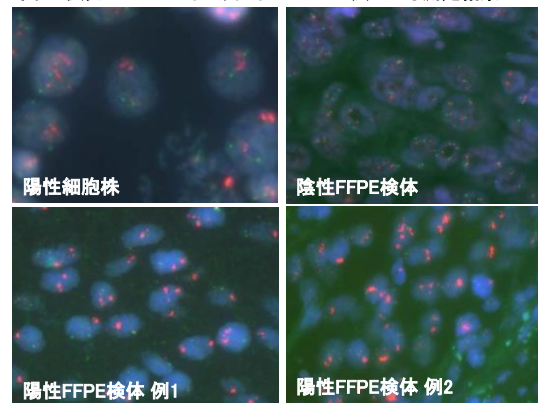
- (1) *FGF3/FGF4* による治療効果予測の基礎的・臨床的研究: *FGF3/FGF4* 伝子増幅をバイオマーカーとし、日本肝がん研究会等の参加施設と連携して臨床試験で検証を行う。基礎研究により感受性更新メカニズムを明らかにする。
- (2) 次世代シーケンサーを用いたソラフェニブ著効例の遺伝子変異解析: 遺伝子異常による *FGF3/FGF4* 遺伝子増幅以外のバイオマーカーを次世代シーケンサーでの遺伝子配列解析により特定する。
- (3) リガンドパネルによるソラフェニブ効

果予測の検討: 現在進行中の多施設共同臨床試験により集積されたソラフェニブ治療前の血清をサンプルとした効果予測バイオマーカーを Antibody suspension bead arrays system により特定する。

### 4. 研究成果

*FGF3/FGF4* 遺伝子増幅による治療効果予測の基礎的・臨床的研究として、*FGF3/FGF4* を含む領域の遺伝子増幅診断法として、標準法である蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法による測定系の構築を行った。また、より簡便な測定法としてリアルタイム PCR 法によるコピー数アッセイを実施し、ソラフェニブ著効例のバイオマーカーとしての *FGF3/FGF4* 遺伝子増幅の検出法を確立した (図 1)。

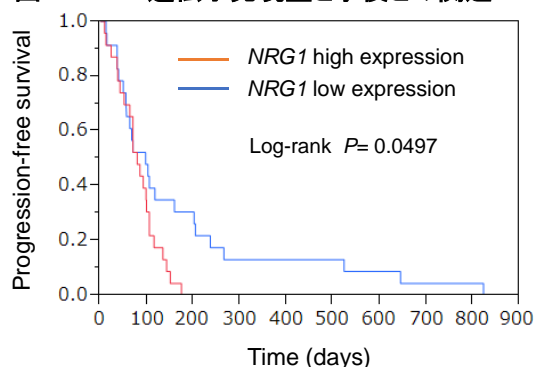
図 1. 蛍光 *in situ* ハイブリダイゼーション法による測定結果



FFPE検体: ホルマリン固定パラフィン包埋検体

ソラフェニブ効果予測因子の新たな探索として、多施設共同研究での肝細胞癌におけるソラフェニブ著効例の組織検体を対象とした探索研究を実施した。次世代シーケンサーを用いたソラフェニブ著効例の遺伝子変異解析およびコピー数変動を実施した結果、ソラフェニブの新たな効果予測因子として、*FGF19* コピー数の増加を見出した。また、ソラフェニブの奏効例に対する新たなバイオマーカー探索として、多施設共同研究によるソラフェニブ効果予測因子の探索研究を実施した。ソラフェニブ治療前の肝針生検腫瘍組織検体を用いて、次世代シーケンサーによる体細胞遺伝子変異ならびに遺伝子発現解析を行った。DNA シーケンスにより、 $\beta$ カテニン遺伝子、*TP53* 遺伝子での遺伝子変異が既報と同等の頻度で検出された。他に複数のがん遺伝子での遺伝子変異が検出され、変異検出頻度の解析を行った結果、がん抑制遺伝子を除いた遺伝子変異の頻度は、ソラフェニブ奏効例と不応例との間に有意な差異を認めた。RNA シーケンスの結果からは、耐性関連因子である *Neuregulin 1 (NRG1)* 遺伝子の発現量との相関が見出された。すなわち、腫瘍部での *NRG1* 低値群では、高値群に比べて無増悪生存期間を有意に延長することが示された (図 2)。

図2. NRG1遺伝子発現量と予後との関連



血清中のタンパク質測定によるソラフェニブ効果予測としては、多施設共同臨床試験による血清検体を集積した。本研究終了時点で、臨床試験が進行中のため、治療反応性ならびに予後との関連の中間解析を行った。その結果、同一症例でのソラフェニブ投与前および投与後のペア検体を測定することによりソラフェニブ治療への応答性に関連する増殖因子を見出した。この増殖因子は、ソラフェニブの治療効果を推定する血清バイオマーカー候補と考えられる。

以上の結果から、肝細胞がんにおいて、ソラフェニブの効果予測因子として、*FGF3* および *FGF4* 遺伝子増幅に加え、多施設共同研究での探索研究から、ソラフェニブに対する治療反応性のバイオマーカーとして、*FGF19* のコピー数変動およびがん遺伝子の変異の頻度、ソラフェニブ治療に対する無増悪生存期間延長の予測マーカーとして *Neuregulin 1* 遺伝子発現を見出した。

#### 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 9 件)

すべて査読有

1. Sakai K, Kazama S, Nagai Y, Muroto K, Tanaka T, Ishihara S, Sunami E, Tomida S, Nishio K, Watanabe T. Chemoradiation provides a physiological selective pressure that increases the expansion of aberrant TP53 tumor variants in residual rectal cancerous regions. *Oncotarget*, 5(20): 9641-9, 2015.
2. Sakai K, Takeda M, Okamoto I, Nakagawa K, Nishio K. Multiple regulatory mechanisms of hepatocyte growth factor expression in malignant cells with a short poly(dA) sequence in the HGF gene promoter. *Oncology Letter*, 9(1): 405-410, 2015.
3. Kawakami H, Okamoto I, Yonesaka K, Okamoto K, Shibata K, Shinkai Y, Sakamoto H, Kitano M, Tamura T, Nishio

K, Nakagawa K. The anti-HER3 antibody patritumab abrogates cetuximab resistance mediated by heregulin in colorectal cancer cells. *Oncotarget*, 5(23): 11847-56, 2014.

4. Terashima M, Fujita Y, Togashi Y, Sakai K, Velasco MA, Tomida S, Nishio K. KIAA1199 interacts with glycogen phosphorylase kinase b-subunit (PHKB) to promote glycogen breakdown and cancer cell survival. *Oncotarget*, 5(16): 7040-50, 2014.
5. Togashi Y, Arao T, Kato H, Matsumoto K, Terashima M, Hayashi H, de Velasco MA, Fujita Y, Kimura H, Yasuda T, Shiozaki H, Nishio K. Frequent amplification of *ORA0V1* gene in esophageal squamous cell cancer promotes an aggressive phenotype via proline metabolism and ROS production. *Oncotarget*, 5(10): 2962-73, 2014.
6. Kato H, Arao T, Matsumoto K, Fujita Y, Kimura H, Hayashi H, Nishiki K, Iwama M, Shiraishi O, Yasuda A, Shinkai M, Imano M, Imamoto H, Yasuda T, Okuno K, Shiozaki H, Nishio K. Gene amplification of *EGFR*, *HER2*, *FGFR2* and *MET* in esophageal squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*, 42(4): 1151-8, 2013.
7. Arao T, Ueshima K, Matsumoto K, Nagai T, Kimura H, Hagiwara S, Sakurai T, Haji S, Kanazawa A, Hidaka H, Iso Y, Kubota K, Shimada M, Utsunomiya T, Hirooka M, Hiasa Y, Toyoki Y, Hakamada K, Yasui K, Kumada T, Toyoda H, Sato S, Hisai H, Kuzuya T, Tsuchiya K, Izumi N, Arii S, Nishio K, Kudo M. *FGF3/FGF4* amplification and multiple lung metastases in responders to sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*, 57(4): 1407-15, 2013.
8. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Nishio K, Yamada Y. *FGFR2* gene amplification and clinicopathological features in gastric cancer. *Br J Cancer*, 106(4): 727-32, 2012.
9. Furuta K, Arao T, Sakai K, Kimura H, Nagai T, Tamura D, Aomatsu K, Kudo K, Kaneda H, Fujita Y, Matsumoto K, Yamada Y, Yanagihara K, Sekijima M, Nishio K. Integrated analysis of whole genome exon array and array-comparative genomic hybridization in gastric and colorectal cancer cells. *Cancer Sci*, 103(2): 221-7, 2012

[学会発表] (計 6 件)

1. Yonesaka K, Kawakami H, Kaneda H, Okamoto I, Hirotsu K, Nishio K, Nakagawa K. The expression level of HER3 ligand heregulin mRNA as a predictive biomarker for anti-HER3 antibody patritumab combined with erlotinib in non-small cell lung cancer. American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2014, Chicago, 2014.
2. Kawakami H, Okamoto I, Yonesaka K, Okamoto K, Kuwata K, Morita Y, Yamaguchi H, Nishio K, Nakagawa K. Novel HER3 neutralizing antibody, patritumab abrogates cetuximab resistance mediated by a heregulin-antocrine loop in colorectal cancer. American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2014, San Diego, 2014.
3. Yonesaka K, Okamoto I, Satoh T, Zejnullahu K, Nishio K, Fukuoka M, Pasi AJ, Nakagawa K. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutics antibody cetuximab. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2012, Chicago, 2012.
4. Nagai T, Arao T, Matsumoto K, Sakai K, Kaneda H, Tamura D, Aomatsu K, Kimura H, Fujita Y, Hagiwara S, Sakurai T, Ueshima S, Kudo M, Nishio K. Impact of TJP-1 and TWIST expression on post-operative prognosis in hepatocellular carcinoma. American Association for Cancer Research 102<sup>nd</sup> Annual Meeting 2012, Chicago, 2012.
5. Matsumoto K, Arao T, Hamaguchi T, Shimada Y, Kato K, Oda I, Taniguchi H, Koizumi F, Yanagihara K, Sasaki H, Yamada Y, Nishio K. Frequency of FGFR2 gene amplification in gastric cancer. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2012, Chicago, 2012.
6. Kato H, Aaro T, Matsumoto K, Fujita Y, Kimura H, Nishiki K, Shiraishi O, Yasuda A, Peng YF, Shinkai M, Imano M, Imamoto H, Yasuda T, Okuno K, Shiozaki H, Nishio K. Gene amplification of EGFR, HER2, HER3 and HER4 in esophageal cell carcinoma. American Association for Cancer Research 102nd Annual Meeting 2012, Chicago, 2012.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

名称: FGF4 遺伝子増幅腫瘍の医薬組成物  
発明者: 西尾和人、他 4 名  
権利者: 近畿大学、住友ベークライト  
種類: 特許権  
番号: 特願 2013-208361  
出願年月日: 2013 年 10 月 3 日  
国内外の別: 国内

○取得状況 (計 1 件)

名称: 大腸癌マーカー、および予後の予測方法  
発明者: 西尾和人、他 4 名  
権利者: 近畿大学、住友ベークライト  
種類: 特許権  
番号: 特許公開 2013-205362  
出願年月日: 2012 年 3 月 29 日  
取得年月日: 2013 年 10 月 7 日  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 和人 (NISHIO Kazuto)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 10208134

(2) 研究分担者

工藤 正俊 (KUDO Masatoshi)  
近畿大学・医学部・教授  
研究者番号: 10298953