

令和元年6月17日現在

機関番号：34417

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K19372

研究課題名(和文) 進行肝細胞癌に対する分子標的治療の効果を予測する新規バイオマーカーの探求

研究課題名(英文) Predicting the treatment effect of sorafenib using new biomarker in patients with hepatocellular carcinoma

研究代表者

山口 隆志 (YAMAGUCHI, Takashi)

関西医科大学・医学部・助教

研究者番号：10730202

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌株にソラフェニブを添加した実験で、リン酸化Smadを介するシグナルは、癌化シグナルであるpSmad3Lが抑制され、癌抑制シグナルであるpSmad3Cが増強されることを確認した。次に、患者全血から循環癌細胞(CTC)を単離する方法を検討した。抗CD45抗体と抗EpCAM抗体を用いてautoMACS Pro Separator(ミルテニーバイオテク)でCTCの単離を試みたが、患者血液中のCTCを回収することはできなかった。今後、CTCの単離の方法について、さらに検討する必要がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能な進行肝細胞癌の第一選択薬であるソラフェニブは、その治療効果が個々の患者によって大きく異なるため、早期の治療効果判定が必要であるが、実臨床では画像診断に頼らざるを得ないため、リアルタイムでの効果判定は不可能である。本研究では、進行肝細胞癌に対するソラフェニブ治療のリアルタイムな治療効果判定を可能にするバイオマーカーの開発を行った。リン酸化Smadシグナルの解析はソラフェニブの効果をリアルタイムで反映するため、有用なバイオマーカーとなる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Sorafenib inhibits the proliferation by switching the phospho-Smad3 signaling from the carcinogenic pSmad3L pathway to the tumor-suppressive pSmad3C pathway in hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. To isolate circulating tumor cells (CTC) from peripheral blood, immunomagnetic methods using autoMACS Pro Separator with anti-EpCAM antibodies specific to epithelial antigens and anti-CD45 antibodies used for negative selection of leucocytes in combination with immunocytochemistry with anti-pSmad3L antibodies were established. The whole blood, treated using this strategy, obtained from patients with HCC before sorafenib treatment. However, no CTC obtained from any patients. Thus, this strategy should be improved to detect CTC. The interest in development of domain specific phospho-Smad antibodies should lead to more sensitive and specific detection of CTC in the future.

研究分野：肝臓学

キーワード：肝細胞癌 ソラフェニブ TGF-beta Smad 循環癌細胞

1. 研究開始当初の背景

ソラフェニブは切除不能な進行肝細胞癌の第一選択薬として位置づけられているが、その治療効果は限定的で個々の患者により治療効果が大きく異なる。しかし、治療効果判定は画像診断に頼らざるを得ないため、リアルタイムでの効果判定は不可能である。そのため、早期に治療効果を予測し、患者を選別できる新規バイオマーカーの同定が急務である。これまで我々は、ウイルス慢性肝疾患における癌化過程で、肝細胞の Transforming Growth Factor beta (TGF-beta)シグナル伝達に注目して研究を行ってきた。ヒト肝生検標本を用いた検討で肝炎ウイルスの持続感染により pSmad3C を介する癌抑制シグナルから pSmad3L を介する癌化シグナルへ変遷することで高発癌状態が形成されると報告した。しかし、ヒトの肝生検標本を用いた細胞内シグナルの検討は、肝生検が必要であったため、その汎用性に問題があった。近年、血中循環癌細胞 (Circulating tumor cells; CTC)の解析は、がん罹患患者の転移による再発や、転移の進行のリスクを予測するための、新しい診断分野として期待されている。肝細胞癌患者においては、上皮性腫瘍細胞の大きさによる単離系 (Isolation by size of epithelial tumor cells; ISET) が報告された (Hepatology 2004, 39: 792-97)。その後、細胞表面マーカーである抗 EpCAM 抗体を用いた免疫磁気法による検出法を用いて、肝癌術後患者の再発や転移に CTC が重要な働きをしていることが示された (Hepatology 2013, 57: 1458-68)。今回我々は、ソラフェニブによる治療を行う進行肝細胞癌患者を対象に、治療前後の血中循環癌細胞 (Circulating tumor cells; CTC)の癌化シグナルを検討し、画像診断による抗腫瘍効果、生命予後の延長と比較することで治療効果判定のバイオマーカーの可能性について評価する。

2. 研究の目的

切除不能な進行肝細胞癌の第一選択薬であるソラフェニブは、その治療効果が個々の患者によって大きく異なるため、早期の治療効果判定が望まれる。しかし、現在、実臨床では画像診断に頼らざるを得ないため、リアルタイムでの効果判定は不可能である。そこで、本研究では、進行肝細胞癌に対するソラフェニブ治療のリアルタイムな治療効果判定を可能にするバイオマーカーの開発を行う。

3. 研究の方法

< 培養細胞を用いた実験 >

我々のこれまでに行ったウエスタンブロット法を用いた検討では肝癌細胞株 Huh7, HepG2 とともに癌化シグナルである pSmad3L が強発現していることを確認している。そこで、本研究では Huh7 および HepG2 にソラフェニブを添加し、細胞内の癌化シグナルである pSmad3L と癌抑制シグナルである pSmad3C にソラフェニブが与える影響を検討する。

< CTC の単離方法の確立 >

上皮細胞接着分子 (epithelial cell adhesion molecule: EpCAM) は古くから知られる癌特異表面抗原であるが、上皮系腫瘍のマーカーであり、肝細胞癌における癌幹細胞マーカーの一つとして報告されている (Yamashita T, et al Gastroenterology 2009)。また、EpCAM 高発現肝細胞癌は予後不良因子となることが報告されている (Murakata A, et al Ann Surg 2011)。この EpCAM に基づく検出法が CTC の分析では多数報告されている。本研究では、CTC の単離のために autoMACS Pro Separator (型番 130-092-545 ミルテニーバイオテック) を用いる。抗 CD45 抗体を使い白血球を取り除くネガティブ選択と抗 EpCAM 抗体を用いたポジティブ選択を組み合わせる。プロトコルを確立するために、健康人の全血に Huh7 を加えたものを用いて、回収率を評価する。

< CTC の分析 >

ソラフェニブの投与を予定している進行肝細胞癌患者の全血を用いて、CTC の単離を行う。単離した CTC の細胞内における癌化シグナルである pSmad3L と癌抑制シグナルである pSmad3C を蛍光免疫染色にて評価する。

4. 研究成果

ソラフェニブを肝癌細胞株 HepG2, PLC/PRF/5 に添加した実験で、ソラフェニブは Raf キナーゼのリン酸化をブロックし cyclinD1 の発現を抑制する。一方で、eIF4E のリン酸化を抑制し Mcl-1 の発現を抑制する。これらの作用によりソラフェニブは細胞増殖を抑制しアポトーシスを促進することが報告されている (Cancer Res 2006, 66:11851-8)。このソラフェニブの細胞増殖抑制効果を反映して、リン酸化 Smad を介するシグナルは癌化シグナルである pSmad3L が抑制され、癌抑制シグナルである pSmad3C が増強されることを肝癌細胞株 (Huh7, および HepG2) でウエスタンブロット法にて確認した (Figure 1)。

次に、患者全血から CTC を単離する方法を検討した。autoMACS Pro Separator(型番 130-092-545 ミルテニーバイオテック) を用いて、抗 CD45 抗体を使い白血球を取り除くネガティブ選択と抗 EpCAM 抗体を用いたポジティブ選択を組み合わせることで CTC の単離を試みた。プロトコルを確立するために、健常人の全血に Huh 7 を加えたものを用いて、回収率を評価した。まず、肝癌細胞株 (Huh 7) の EpCAM の発現率と EpCAM/pSmad3L 共陽性細胞数を蛍光免疫染色法で確認した (Figure 2)。健常人の全血 3 c c に Huh 7 約 1000 個の細胞を溶解し、autoMACS Pro Separator を用いて抗 CD45 抗体によるネガティブセレクションと抗 EpCAM 抗体によるポジティブセレクションを行い、Huh7 の回収率を検討した。その結果、約 20% の回収率を得ることができた。ソラフェニブの投与を予定している進行肝細胞癌患者の全血中の CTC の単離を上記のプロトコルで試みた。しかし、残念ながら、患者血液中の CTC を回収することはできなかった。回収が難しい原因として、細胞の viability の低下により抗体反応が起こらないことが一因と考えられた。

本研究で、肝癌細胞株を用いた培養実験で、リン酸化 Smad を介する細胞内シグナルは、ソラフェニブによる細胞増殖抑制効果を反映して、癌化シグナルである pSmad3L から、癌抑制シグナルである pSmad3C にシフトすることを確認できた。今後、CTC の単離の方法について、さらに検討する必要がある。

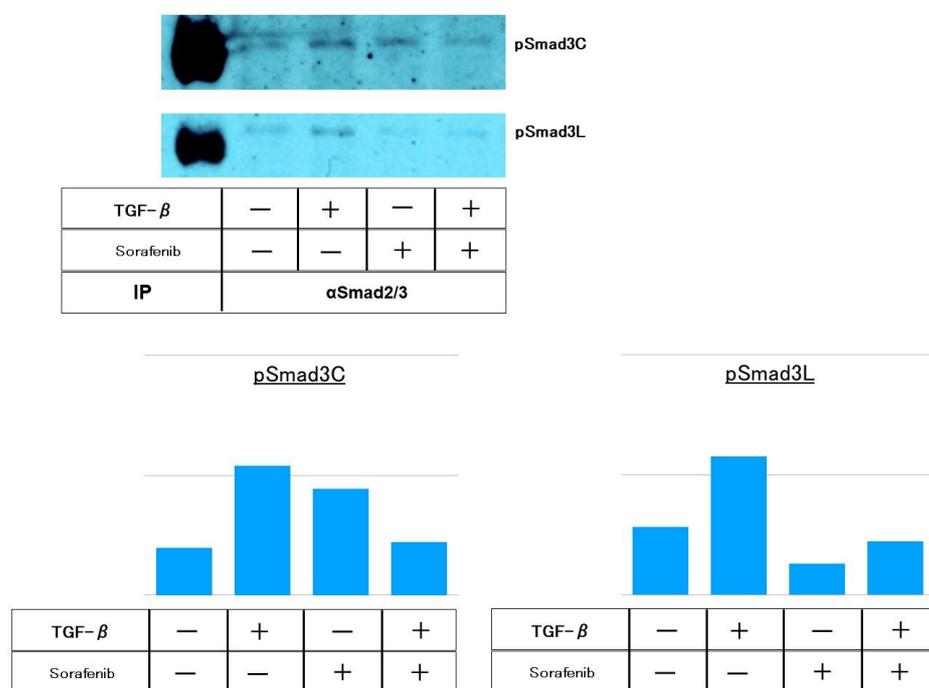


Figure 1. ソラフェニブは、TGF-β による Smad3 のリン酸化を抑制する

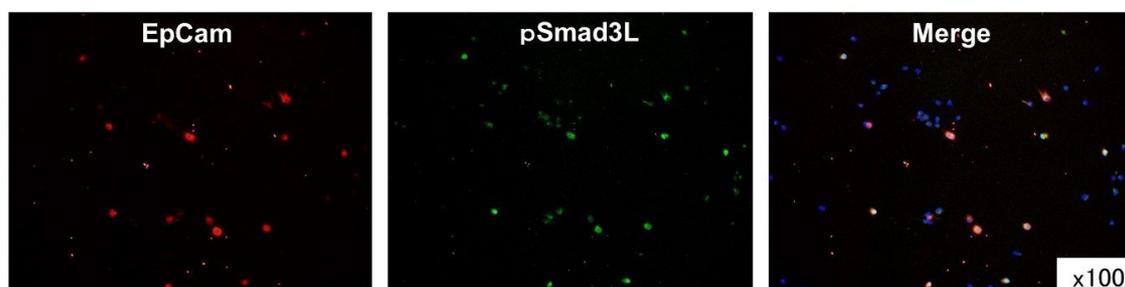


Figure2. 健常人の全血に Huh7 細胞を溶解し、autoMACS Pro Separator を用いて回収した細胞を EpCAM (red) , pSmad3L (green) で免疫染色した。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

Clinico-Pathological Importance of TGF- β /Phospho-Smad Signaling during Human Hepatic Fibrocarcinogenesis. Yoshida K, Matsuzaki K, Murata M, Yamaguchi T, Suwa K, Okazaki K. Cancers (Basel). 5;10(6), 2018 査読有

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。