

令和 2 年 6 月 9 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K15816

研究課題名(和文) ソラフェニブ耐性肝細胞癌のメタボローム解析に基づくバイオマーカーの解明

研究課題名(英文) Evaluation of biomarkers based on metabolome analysis of sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma

研究代表者

友成 哲 (TOMONARI, Tetsu)

徳島大学・病院・助教

研究者番号：20556807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究ではソラフェニブ耐性細胞であるPLC/PRF5/R-1、R-2細胞と親株のconditioned mediaを用いて代謝物を網羅的メタボローム解析を行いソラフェニブ耐性肝癌と感受性肝癌の違いを明らかにすることを目的とした。ソラフェニブ耐性株と親株のconditioned mediaを作成し、CE-TOFMを用いて代謝産物の測定を行った。現在、検出されたピークに基づいて抽出された約1000の成分を既存の分析データと照合し、ソラフェニブ耐性株と親株との代謝プロファイルを比較して特異的な代謝産物を同定中である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

解析した代謝産物が、肝細胞癌患者におけるソラフェニブ投与時バイオマーカーとして用いることが可能となれば、ソラフェニブによる肝細胞癌治療に個別化医療が導入されることになり、本研究の意義は非常に大きいと考えられる。特にソラフェニブ代謝産物は血清中や尿中に豊富にあることから、血清や尿検査による診断が可能になる。さらに、本研究の成果はソラフェニブ耐性を呈する癌に対する新たな治療薬の開発にも繋がり、進行肝癌患者の予後改善に大きく寄与するものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the difference between sorafenib-resistant hepatocellular carcinoma (HCC) and susceptible HCC by comprehensive metabolome analysis of metabolites using sorafenib-resistant cells PLC / PRF5 / R-1, R-2 cells and conditioned media of the parent strain. The conditioned media of sorafenib resistant cell and parent cell were prepared and metabolites were measured using CE-TOFM. Currently, about 1000 components extracted based on the detected peaks are collated with existing analysis data, and specific metabolic products are being identified by comparing the metabolic profiles of the sorafenib resistant cell and the parent cell.

研究分野：肝細胞癌 分子標的治療

キーワード：ソラフェニブ 肝細胞癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の悪性腫瘍に占める死亡率は全世界で第5位であり、とくに本邦をはじめとするアジアにおいて高く、有効な治療法の確立が急務である。肝細胞癌はほとんどの抗癌剤に自然耐性を示すことから、経動脈的化学塞栓療法やラジオ波焼灼療法などの局所治療を中心に行われている。

一方、近年、肝癌細胞の増殖や血管新生に関わる複数のキナーゼを阻害する分子標的薬ソラフェニブが開発され、大規模臨床試験 (SHARP study) により進行肝細胞癌患者の生存期間を有意に延長することが示された (N. Engl. J. Med. 2007)。この結果を基に、諸外国及び本邦においてソラフェニブが進行肝細胞癌の標準治療として広く用いられるようになった。しかし、その奏効率はわずか数%と低く、効果を予測する有効なバイオマーカーは存在しない。また、ソラフェニブに対する耐性の機序も明らかにされていない。

研究代表者は、これまで肝細胞癌細胞株である PLC/PRF5 細胞をソラフェニブに持続的に暴露することによりソラフェニブに高い耐性を示す細胞株を樹立した。すなわち、親株に比べて IC50 が 1.8 倍の低耐性クローン (PLC/PRF/5-R1) 及び 4.6 倍の高耐性クローンを樹立した (図 1)。これらのソラフェニブ耐性クローンを用いて、トランスポーターである MRP3 が過剰発現していること、MRP3 をノックダウンすると感受性が回復することを示し、MRP3 が耐性因子であることを明らかにした (Oncotarget, 7:7206-7215, 2016)。さらに、ソラフェニブ治療を行った 9 例の進行肝癌症例の臨床検体を用いて MRP3 の発現を調べたところ、ソラフェニブが無効であった症例では MRP3 蛋白の発現が高いことを見出した。つまり、研究代表者は肝細胞癌のソラフェニブに対する獲得耐性および、自然耐性に MRP3 蛋白が関与していることを見出した (Oncotarget, 7:7206-7215, 2016)。MRP3 は肝類洞側膜に発現し、肝臓で代謝されたグルクロン酸抱合体及び抗生物質や消炎剤のような様々な非抱合型有機アニオン系化合物を輸送する ABC (ATP-binding cassette) トランスポーターであることが知られており、また抗癌剤ではエトポシドやメトトレキサートなどの薬剤耐性に関与することが報告されている。一方でソラフェニブは肝内で CYP3A4 による第 Ⅲ 相酸化的代謝と UGT1A9 による第 Ⅱ 相グルクロン酸抱合反応の 2 経路により代謝されることが報告されている。このことからグルクロン酸抱合されたソラフェニブ代謝産物が MRP3 から排泄されることが薬剤耐性の機序として推定される。実際に、研究代表者は耐性株を DMEM 培地にて培養中、早期に培地が黄色に変色するという変化を確認し、ソラフェニブ耐性株からのトランスポーターを介した代謝産物が排泄されていることを示唆する重要な変化であると考えている。しかし、薬物トランスポーターの生体内低分子マーカーに関する報告は、過去にほとんど例がなく、ソラフェニブの代謝産物から薬剤耐性の機序をメタボロミクスの観点で解析した報告はない。

2. 研究の目的

本研究ではソラフェニブ耐性細胞である PLC/PRF5/R-1、R-2 細胞と親株の conditioned media を用いて代謝物について網羅的メタボローム解析を行いソラフェニブ耐性肝癌と感受性肝癌の違いを明らかにする。次にソラフェニブ耐性細胞の MRP3 をノックダウンした細胞を用いてメタボローム解析を行い、代謝産物の変化が MRP3 発現及び、耐性に関連したものであるかどうかを調べる。また、ヌードマウスの皮下にソラフェニブ耐性株及び、親株を移植し、血清及び尿中のメタボローム解析を行う。さらにヒト肝癌症例の血清を用いてソラフェニブ耐性を予測しうるバイオマーカー分子を見出し、個別化医療への展開するための基礎的知見を得ることを目的とする。

3. 研究の方法

本研究ではソラフェニブ耐性株 (PLC/PRF5-R1, R2) と親株を用い、in vitro、in vivo において以下の実験を行う。

- (1) ソラフェニブ耐性株と親株を培養し、細胞数が確保された段階で over night incubation を行い、conditioned media を作成する。
- (2) 得られた conditioned media の細胞内代謝産物を CE-TOFMS を用いて網羅的に分析し、化合物の一斉比較定量を行い、耐性株と親株の代謝プロファイルの比較を行う。
- (3) MRP3 をノックダウンしたソラフェニブ耐性細胞を用いて conditioned media を作成しメタボローム解析を行う。
- (4) ソラフェニブ耐性細胞株を xenograft model に移植後、ソラフェニブを投与した後に血清を採取し、メタボローム解析を行う。
- (5) ヒト肝癌症例の血清を用いてメタボローム解析を行い、バイオマーカーとなり得る因子を同定する。

4. 研究成果

近年、第三相試験においてレンバチニブがソラフェニブと比較して、生存期間における非劣勢を示した (Lencet.2018)。実臨床ではレンバチニブが一次治療のみならず、二次治療 (ソラフェニブ不耐症例)、三次治療 (ソラフェニブ-レゴラフェニブ後症例) に対しても用いられているのが現状である。しかし、ソラフェニブとレンバチニブのどちらを一次治療として開始するのが最も予後を延長させるのかは明らかにされていない。また治療選択に関連するバイオマーカーとなりうる因子は明らかではなく、実臨床において重要なテーマとなっており、ソラフェニブ耐性株とレンバチニブとの関連を検討する方針となった。

研究代表者が樹立した PLC-R2 に対し、レンバチニブを暴露し細胞増殖試験を行ったところ、PLC-R2 はレンバチニブに対しても親株と比較して、4.7 倍の耐性を有していた (図 1)。すなわち、ソラフェニブ耐性肝癌はレンバチニブに対して Cross-resistance を有することを見出した。また、レンバチニブの耐性機序を明らかにするために 1205 個の蛋白のリン酸化を網羅的に解析可能なプロテインアレイを用いて、レンバチニブ関連リン酸化シグナル数の変化を解析したところ、親株では 16 個のレンバチニブ関連シグナル伝達経路が抑制されたのに対し、PLC-R2 ではわずか 3 個の経路が抑制されたのみであった (図 2)。

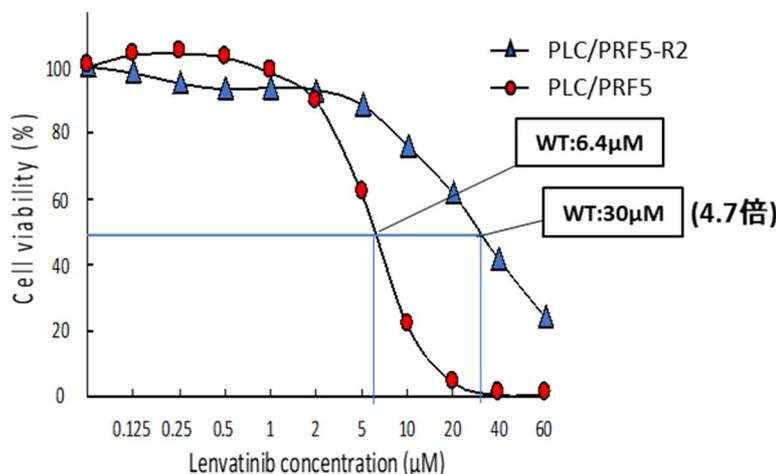


図 1 : ソラフェニブ耐性細胞株と親株に対するレンバチニブの IC50

PLC/PRF5_LEN		PLC/PRF5-R2_LEN	
Pathway	Pathway category	Pathway	Pathway category
Negative_regulation_of_FGFR3_signaling_B	Signaling_by_FGFR	Negative_regulation_of_FGFR3_signaling_B	Signaling_by_FGFR
Spry_regulation_of_FGF	Signaling_by_FGFR	Spry_regulation_of_FGF	Signaling_by_FGFR
p-CBL_GRB2_binds_p-FRS2_activated_FGFR1	Signaling_by_FGFR	Negative_regulation_of_FGFR2	Signaling_by_FGFR
Negative_regulation_of_FGFR1	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-FRS2_p-PPTN11_binds_GRB2_GAB1_PIK3R1	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-FRS2_p-PPTN11_GRB2_GAB1_PIK3R1_binds_PIK3CA	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR3_p-FRS2_p-PPTN11_GRB2_GAB1_PIK3R1_binds_PIK3CA	Signaling_by_FGFR		
CBL_ubiquitinates_FRS2_and_FGFR1	Signaling_by_FGFR		
FRS-mediated_FGFR1_signaling	Signaling_by_FGFR		
CBL_ubiquitinates_FRS2_and_FGFR3	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-FRS_bind_to_PPTN11	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-SHC1_binds_GRB2_SOS1	Signaling_by_FGFR		
STAT_binds_to_the_active_receptor	Signaling_by_PDGF		
SHP2_binds_to_the_active_receptor	Signaling_by_PDGF		
Grb2-Sos1_complex_binds_to_the_active_receptor	Signaling_by_PDGF		
p38_MAPK_activation_by_VEGFR	Signaling_by_VEGF		

図 2 : ソラフェニブ耐性細胞株と親株における抑制されたレンバチニブ関連リン酸化シグナル

さらに、レンバチニブの重要な標的遺伝子である FGFR について解析を行ったところ、PLC-R2 では FGFR の主要な下流分子である FRS2 のリン酸化は親株と比較して有意に低下していた。つまりソラフェニブ耐性肝癌では FRS2 のリン酸化活性が低下していることを見出した。FRS2 は、チロシンリン酸化を受け、RAS/ERK パスウェイ、PI3K/mTOR パスウェイを活性化する重要なハブ遺伝子であることが知られている。また FRS2 は RET チロシンキナーゼによっても活性化し、FRS2 の活性化は癌の悪性化へと進展させる主経路と考えられており耐性化との関連が強い。以上のことから FRS2 は進行肝癌治療における新規バイオマーカー及び、分子標的候補として今後の肝癌治療戦略において重要な分子であると考えられ、今後は臨床応用へ展開していく方針である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----