

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 26 日現在

機関番号：12501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21390225

研究課題名（和文） 肝細胞癌に対する血管新生阻害薬の治療効果予測因子の検討

研究課題名（英文） The analysis of the predictive marker for the efficacy of the angiogenesis inhibitor for the treatment of hepatocellular carcinoma

研究代表者

横須賀 収 (YOKOSUKA OSAMU)

千葉大学・大学院医学研究院・教授

研究者番号：90182691

研究成果の概要（和文）：（基礎）肝細胞癌患者の癌組織 26 検体を用いて血管新生および細胞増殖に関連する計 37 遺伝子について発現解析を行った。その結果と、臨床背景因子（病理学的分化度・CT アンギオグラフィーによる腫瘍濃染、血管侵襲）の関連を検討したところ、すべての因子に有意に相関していたのは HIF1 α のみであった。（臨床）ソラフェニブ内服中の 54 名の肝細胞癌患者を対象に早期治療効果予測のための画像診断、腫瘍マーカーの有用性を検討したところ、ダイナミック CT における modified RECIST と AFP が有用であった。

研究成果の概要（英文）：(Basic) We explored the mRNA expression of angiogenesis-related or cell proliferation-related genes (total 37 genes) in 26 hepatocarcinoma tissues. Only HIF1 α expression was correlated with pathological differentiation, tumor vascularity, and macroscopic vascular invasion. (Clinical) We explored the predictive marker for the treatment efficacy of sorafenib in 54 hepatocellular carcinoma patients and revealed that modified RECIST findings and AFP level were useful for the prediction of the efficacy of the sorafenib treatment.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	4,900,000	1,470,000	6,370,000
2010 年度	4,400,000	1,320,000	5,720,000
2011 年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：肝臓学

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、手術・経皮的ラジオ波焼灼療法・肝動脈塞栓療法が肝内病変の治療に有効である一方、遠隔転移・血管内浸潤・胆管浸潤をきたすと予後不良であり、発癌抑止とともに有効な化学療法の開発が望まれている。近年の生命科学の進歩は、このような標準治療の無効な肝細胞癌に有効な薬剤を生み出

しつつある。肝細胞癌は、栄養血管に富んだ悪性腫瘍であり、高分化型肝細胞癌から中低分化型肝細胞癌に脱分化すると、劇的に腫瘍血管が増生し、血管新生は悪性転換の必要な因子と考えられている。腫瘍の血管新生の複雑なプロセスは分子レベルで明らかになりつつあるが、血管新生関連因子でも中心的役割をはたす血管内皮増殖因子 (Vascular

endothelial growth factor, VEGF)は肝細胞癌でも過剰発現が認められ、発現量の多い肝細胞癌は予後不良である (Poon RT, et al., Ann Surg Oncol 2007)。また、肝細胞癌でも腫瘍血管の構築の安定化に寄与する周細胞 (Pericyte)の維持に血小板由来増殖因子受容体 (Platelet-derived growth factor receptor, PDGFR β)が重要であることが知られている。肝細胞癌の決定的な治療標的因子は未だ同定されていないが、動脈塞栓術が標準治療と位置づけられるほぼ唯一の癌であり、腫瘍血管を標的とする治療法開発のしのが削られている。

当初 B-raf 阻害剤として見出され、強力な血管新生阻害作用をもつソラフェニブ (ネクサバル[®])は肝細胞癌患者の全生存期間を44%延長し (SHARP 試験) (Llovet JM, et al., N Engl J Med 2008)、欧米で肝細胞癌に対する適応を取得し、本邦においても2009年5月に肝細胞癌に対し保険承認がなされた。一方われわれは、VEGFR-2, PDGFR, FGFRの阻害活性を有する血管新生阻害剤 TSU-68の進行肝細胞癌に対する治験を通して、肝細胞癌に対する血管新生阻害剤の有効性および安全性の検討を行ってきた (2008 American Society of Clinical Oncology (ASCO) Annual Meeting および第44回日本肝臓学会発表)。興味深いことに、開発中の血管新生阻害剤が単独で効果を発揮する癌腫は、血管に富む腎細胞癌と肝細胞癌である。現在、臨床応用されつつある薬剤は他の癌、例えば大腸癌などで使用されている薬剤の転用であり、実際に肝細胞癌に適した治療であるかに関する検証はほとんど行われていないのが現状である。一方、大腸癌治療で用いられている VEGF 中和抗体であるベバシズマブ (アバスタチン[®])は単剤では大腸癌に対する抗腫瘍効果はなかったものの、化学療法と併用することで有意な延命効果を得た。

しかしながら、多くの検討課題が残されている。肝細胞癌の全身化学療法として、はじめて生命予後改善を証明した血管申請阻害剤であるが、効果は限定的である。RECIST (Response Evaluation Criteria In Solid Tumors)の奏効率は10%未満であり、腫瘍縮小よりむしろ安定化 (腫瘍の増殖を止める)効果に留まる。いわゆる殺細胞性の抗がん剤や肝動脈塞栓術との併用も試みられているが、組み合わせの科学的根拠に乏しい。また、一定の効果がみられる症例とそうでない症例があり、感受性規定因子や効果予測マーカーについては未だ明らかではない。一方、血管新生は正常組織ではその促進因子と抑制因子により厳密にコントロールされているが、癌組織ではそのアンバランスによって過剰な血管新生がおこっている。これらの因子の肝細胞癌組織における役割については

不明な点が多い。VEGF 以外に治療の鍵となる血管増殖因子の同定も必要である。肝細胞癌患者の多くは慢性肝炎あるいは肝硬変を患っており、薬剤開発においては肝機能に対する配慮も必要である。

2. 研究の目的

肝細胞癌に対する腫瘍血管を標的とした治療法開発は、肝細胞癌罹患率の極めて高いアジア、特に医療水準では世界の先端を行く日本が中心となって進めるべき喫緊の問題であり、そのためには肝細胞癌特異的な血管新生システムの理解を分子レベルで進めると同時に、臨床情報とも関連付けて解析を行う必要がある。そのために以下の3点を目的とする。

① 肝細胞癌患者データベースの構築

ソラフェニブを含む各種血管新生阻害療法が日常臨床に導入されているが、抗腫瘍効果は RECIST にとらわれず生存の延長をエンドポイントに評価していく必要がある。有効性や安全性と関連するバイオマーカーを明らかにするには、後に述べる血管新生関連因子を含む各種臨床パラメーターをデータベース化する必要がある。

② 肝細胞癌患者における各種血管新生および細胞増殖関連因子の検討

まずは、治療目的で入院した患者の腫瘍組織検体を用いて各種血管新生および細胞増殖関連因子の発現解析を行い、どの因子が発癌・進展に大きく関与するかを明らかにすることを目的とする。また、肝動脈塞栓術、ラジオ波焼灼術、血管新生阻害剤の内服などの治療により発現がどう変化するかを検討するため、治療後のサンプルも可能な限り検討する。

③ 肝細胞癌における腫瘍濃染、血管侵襲と各種血管新生および細胞増殖関連因子の関連の検討

肝細胞癌は一般的に高分化型から中・低分化型になるに従い血管新生が盛んになり、VEGFが鍵分子の一つと考えられているが、メカニズムは不明な点も多い。造影 CT、造影 MRI、ソナゾイド造影超音波などによる血流評価と血管新生および細胞増殖関連因子発現につき検討し、肝細胞癌における「マクロの」血流を規定する因子の探索を行うことを目的とする。

以上3点が具体的な目的である。

肝細胞癌の発育・進展における血管新生の果たす役割は極めて大きい。肝動脈塞栓術が肝細胞癌の標準治療として確立されていることから明らかであり、それらを標的とした治療法の開発は、現在行われている治療のいずれよりもインパクトをもって臨床適応が考えられる。本研究はこれまでの多くの研

究を踏まえたうえで、肝細胞癌の新たな血管新生関連因子の分子標的の探索を行うものであり、難治癌とされる肝細胞癌の治療法を考える上で極めて重要かつ必要な検討であると考えられる。

また、血管新生阻害剤の有効性と安全性を最大限にするためには、「投与してみたが結果的に効かなかった」ということはできうる限り避けたい。現在のところ血管新生阻害剤の有効性を予測する確固たるマーカーは存在せず、患者の臨床病理学的背景因子、画像所見、血液所見、さらに今回検討する血管新生ならびに細胞増殖関連因子発現を詳細に解析することで responder と non-responder の区別ができ、結果的に個々の患者に対する治療の最適化(テーラーメイド医療の確立)ができれば日常臨床において大変有意義であると考えられる。

3. 研究の方法 (基礎)

2006年1月から2009年10月に、千葉大学医学部附属病院消化器内科に治療目的にて入院した肝細胞癌患者24名(男性19名、女性5名、平均年齢66.5歳(52-82歳))を対象とした。文書による同意書を取得後、肝細胞癌の診断目的に、超音波ガイド下に21ゲージ針で腫瘍から組織採取を行った。診断のために供した残余検体を解析対象とした。また、比較検討のため非癌部肝組織からも癌部同様の組織採取を行った。組織採取した癌部は計26病変で平均45.0mm(10-138mm)であった。組織学的分化度は高分化5、中分化17、低分化4病変であった。また、腫瘍濃染の有無はCTアンギオグラフィーで、血管侵襲の有無は造影CT、CTアンギオグラフィー、造影MRIおよび超音波にて評価した。

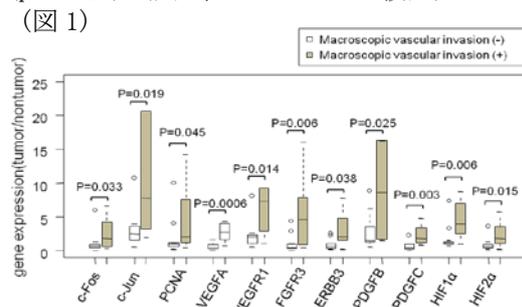
癌組織および非癌組織から RNesay Mini kit を用いてトータルRNAを抽出、DNaseによる消化の後、500ngのトータルRNAを対象に、Quantitect Reverse Transcription Kit を用いて逆転写を行った。作成されたcDNAのうち50μgを用いて解析対象の遺伝子特異的プライマー・プローブセット(Taqman Gene Expression Assays)により定量的RT-PCRを行った。なお、発現解析を行った遺伝子は以下のごとくである。c-Myc, c-Fos, c-Jun, JunB, JunD, Ki67, PCNA, VEGFA, VEGFB, VEGFC, VEGFD, PlGF, VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3, FGF1, FGF2, Tie2, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, EGF, ERBB1, ERBB2, ERBB3, ERBB4, PDGFA, PDGFB, PDGFC, PDGFD, PDGFRα, PDGFRβ, HIF1α, HIF2α, Angiopoietin1, Angiopoietin2 の37遺伝子。これらの遺伝子の癌部・非癌部での発現量について、β2ミクログロブリンの発現量にて補正を行った。(臨床)

2009年6月より2011年10月までに千葉大学医学部附属病院消化器内科で切除不能肝細胞癌に対する一次治療としてソラフェニブを投与された患者76名のうち、ダイナミックCTおよび腫瘍マーカー(AFP, PIVKA-II)で治療開始前(2週間以内)および治療開始早期(3-6週)に治療効果判定を行った54例について、治療開始早期のダイナミックCTにおけるRECIST、modified RECIST(mRECIST)による効果判定および腫瘍マーカーの変動が、治療効果を予測しうるかを検討した。なお、返礼中央値は70歳、男性45名、女性9名、Child-Pugh分類A47名、B7名、病期III/IVa/IVb期はそれぞれ22/11/21例であった。

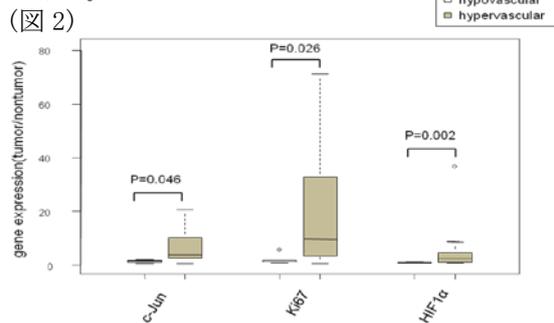
4. 研究成果 (基礎)

①上記26病変のうち腫瘍濃染ありは21病変、腫瘍濃染なしは5病変であった。また、血管侵襲ありは11病変、血管侵襲なしは15病変であった。

②血管侵襲と各種遺伝子発現量との関連解析した37遺伝子のうち、血管侵襲あり病変で、癌部において非癌部に比べて有意に発現亢進していた遺伝子は以下のとおりである。c-Fos (p=0.033)、c-Jun (p=0.019)、PCNA (p=0.045)、VEGFA (p=0.0006)、VEGFR1 (p=0.014)、FGFR3 (p=0.006)、ERBB3 (p=0.038)、PDGFB (p=0.025)、PDGFC (p=0.003)、HIF1α (p=0.006)、HIF2α (p=0.015) (図1、studentのt検定)



③腫瘍濃染と各種遺伝子発現量との関連解析した37遺伝子のうち、腫瘍濃染を認めた病変で、癌部において非癌部に比べて有意に発現亢進していた遺伝子は以下のとおりである。

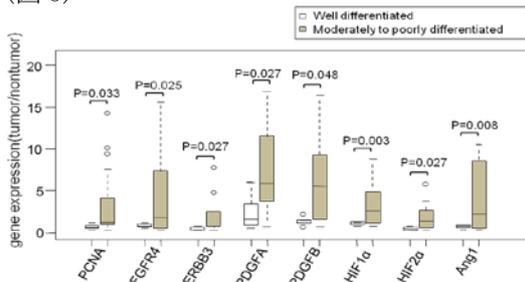


c-Jun (p=0.046)、Ki67 (p=0.026)、HIF1 α (p=0.002) (図 2、student の t 検定)

④ 癌組織分化度と各種遺伝子発現量との関連

解析した 37 遺伝子のうち、中・低分化度の癌で、癌部において非癌部に比べて有意に発現亢進していた遺伝子は以下のとおりである。PCNA (p=0.033)、FGFR4 (p=0.025)、ERBB3 (p=0.027)、PDGFA (p=0.027)、PDGFB (p=0.048)、HIF1 α (p=0.003)、HIF2 α (p=0.027)、Ang1 (p=0.008) (図 3、student の t 検定)

(図 3)



以上の結果を表にまとめると以下のようになる。

	分化度	腫瘍濃染	血管侵襲
c-Fos			+
c-Jun		+	+
Ki67		+	
PCNA	+		+
VEGFA			+++
VEGFR1			+
FGFR3			++
FGFR4	+		
ERBB3	+		+
PDGFA	+		
PDGFB	+		+
PDGFC			++
HIF1 α	++	++	++
HIF2 α	+		+
Ang1	++		

(+, ++, +++はそれぞれ student の t 検定の <0.05, <0.01, <0.001 に対応)

この表からわかることは HIF1 α が腫瘍濃染、血管侵襲、分化度の低下のすべてに関連するということである。HIF1 α は Hypoxia inducible factor 1 α という名前からも明らかのように低酸素状態でその発現が亢進する遺伝子である。このことを踏まえて、今回の結果を解釈すると、腫瘍の増大に伴い低酸素領域が出現し、その結果 HIF1 α の発現 \Rightarrow VEGF 発現亢進 \Rightarrow 腫瘍血管の増勢 \Rightarrow 腫瘍濃染となったものと考えられた。また、血管新生阻害剤投与で低酸素状態になるとかえってその腫瘍は浸潤などの悪性形質を獲得することが知られており (Páez-Ribes M, Cancer

Cell 2009)、今回も、低酸素状態の出現が血管侵襲の出現、分化度の低下という悪性形質の獲得を導いたものと考えられた。

(臨床)

観察期間中央値 6.0 ヶ月、全生存期間 (Overall survival, OS) 中央値 8.6 ヶ月であった。RECIST および mRECIST の早期治療効果判定はそれぞれ CR/PR/SD/PD が 0/1/35/18, 3/4/29/18 であった。mRECIST の PD 群は全例で新規病変を認め RECIST と一致した。PD 群の OS は 4.1 ヶ月と予後不良であった。mRECIST の SD 群の無増悪期間 (Time to progression, TTP) が 3.0 ヶ月であるのに対して CR+PR 群では 17.4 ヶ月と有意に長かった (p=0.0248)。mRECIST の SD 群の OS が 11.6 ヶ月であるのに対して CR+PR 群では 1 名を除いて生存しており有意に長かった (p=0.0422)。CR+PR 群の観察期間中央値は 19.9 ヶ月であった。治療開始早期の AFP 上昇が 20%以上の群 (non-responder, NR 群) の TTP は 1.5 ヶ月であり、20%未満の群 (objective responder 群) の 3.8 ヶ月に比べ有意に短かった (p=0.0023)。NR 群の OS は 5.0 ヶ月であり OR 群の 16.7 ヶ月と比べ有意に短かった (p=0.0002)。これらの結果から、ダイナミック CT における mRECIST と AFP はソラフェニブの早期治療効果予測に有用であると考えられた。引き続き、日常診療での検証を継続している。

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 1 件)

- ① Ogasawara S, Kanai F, Obi S, Sato S, Yamaguchi T, Azemoto R, Mizumoto H, Koushima Y, Morimoto N, Hirata N, Toriyabe T, Shinozaki Y, Ooka Y, Mikata R, Chiba T, Okabe S, Imazeki F, Yoshikawa M, Yokosuka O. Safety and tolerance of sorafenib in Japanese patients with advanced hepatocellular carcinoma. Hepatol Int 2011;5:850-856: 査読有 : DOI:10.1007/s12072-010-9249-4

[学会発表] (計 4 件)

- ① 多田素久, 横須賀收, 金井文彦, 他. 肝細胞癌における血管新生および細胞増殖関連因子の発現の検討. 第 47 回日本肝臓学会総会一般口演. 2011 年 6 月 2 日. ホテルグランパシフィック LE DAIBA.
- ② 小笠原定久, 横須賀收, 金井文彦, 他. ソラフェニブ治療における早期の有効性 サロゲートマーカーとしての RECIST の検

証 第 47 回日本肝臓学会総会ポスターセッション。2011 年 6 月 2 日。ホテルグランパシフィックLE DAIBA。

- ③ 鳥谷部武志、横須賀收、金井文彦。肝細胞癌の増殖および腫瘍血管新生に関する遺伝子発現プロファイルの検討。第 46 回日本肝臓学会総会シンポジウム。2010 年 5 月 28 日。ホテルメトロポリタン山形。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横須賀 收 (YOKOSUKA OSAMU)
千葉大学・大学院医学研究院・教授
研究者番号：90182691

(2) 研究分担者

金井 文彦 (KANAI FUMIHIKO)
千葉大学・大学院医学研究院・講師
研究者番号：70334399

新井 誠人 (ARAI MAKOTO)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：30396684

多田 素久 (TADA MOTOHISA)
千葉大学・医学部附属病院・助教
研究者番号：00554239

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

