

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 1 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590976

研究課題名(和文)新規パラメーターを用いた肝癌化学療法効果予測

研究課題名(英文) Prediction of the effect of chemotherapy for hepatocellular carcinoma with new parameters

研究代表者

能祖 一裕 (Nouso, Kazuhiro)

岡山大学・医歯(薬)学総合研究科・准教授

研究者番号：10314668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円、(間接経費) 1,170,000円

研究成果の概要(和文)：進行肝細胞癌の治療成績の向上のため、治療の効果を事前に予測する、テーラーメイド医療の確立に向け研究を行った。血清中のフォリスタチンなどの血管新生にかかわる8種のサイトカインを一括測定し、発現高値の場合、肝細胞癌の分子標的薬であるソラフェニブ投与後の予後が不良であることを明らかとした。また血清中の蛋白に結合している糖鎖を網羅的に解析し、3分岐糖鎖(G2890)が高値である事も、予後不良につながる事を明らかとした。

研究成果の概要(英文)：To improve survival of the patients with advanced hepatocellular carcinoma, we tried to establish markers that could predict the efficacy of chemotherapies. By measuring serum 8 cytokines simultaneously, close correlation was observed between high cytokine expressions and poor prognosis. In addition, comprehensive glycan analysis revealed that survival of the patients with high serum tri-antenna glycan (G2890) expression was shorter than that with the low expression.

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：肝細胞癌 化学療法

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝細胞癌の約8割は、300万人を超えるB型及びC型肝炎ウイルス罹患患者より発生する。また、男性の死因の第4位であり、如何に肝細胞癌を克服するかが社会的問題となっている。我々は中四国の基幹病院において、3000症例を越える肝細胞癌患者の臨床経過をデータベース化し、肝癌の生命予後規定因子の解析など、様々な観点より分析を行ってきた(Nouso et al. Aliment Pharmacol Ther 2010, Br J Cancer 2008, Am J Gastroenterol 2006 etc.)。これらの解析を通じ、早期肝細胞癌治療成績は、手術やラジオ波焼灼療法などの進歩により改善してきたが、進行肝細胞癌の治療成績は予後延長効果が不十分であるという問題点が明らかとなっている。この主たる要因として、ソラフェニブ等の分子標的薬をはじめとし、様々な進行肝細胞癌治療法が開発されているにもかかわらず、個々の患者様に合った治療法をより早く選択する、いわゆるテーラーメイド医療が確立されていないことが挙げられる。

(2) 一般に化学療法の事前の治療効果予測は、手術で摘出された組織を用いて、SNPsやマイクロアレイ解析、プロテオミクス解析など様々な手法を用い試みられている。しかし現状は大腸癌のセツキシマブの治療効果がEGFRの変異により規定される事や、肺非小細胞癌のシスプラチンに対する感受性がERCC1発現の有無により異なる事など、効果予測はごく一部の分子標的薬で成功しているにすぎない。

2. 研究の目的

(1) 我々が見出した肝細胞癌の予後に関与する follistatin の、予後予測因子としての有用性の検証・機能解析を行う。

(2) 網羅的糖鎖解析、薬剤の細胞への直接効果を測定する pharmacodynamic な解析など、新しい視点からの進行肝細胞癌治療予測パラメーターを確立する。

(3) 得られた新規予測パラメーターを、構築済みの臨床データベースと組み合わせ、統合データベースを作製し、時間依存性共変量解析やデータデータマイニング等、新しい方法論を用いた化学療法効果予測 index を構築し、患者の予後改善に結びつける。

3. 研究の方法

(1) Follistatin 研究

Follistatin は SCID mice の肺癌転移を抑制するなど(Clin Cancer Res 14(3)660-7, 2008)、発癌転移に抑制的に作用する報告がある一方で、骨転移のある前立腺癌や、肝細胞癌で発現が増加している等の抑制

的作用を示唆する報告もあり(J Hepatol 45(5): 673-80, 2006 etc.)。その生物学的意義は、controversial である。また化学療法の効果との関係については我々が肝細胞癌で確認した以外報告がなかった。そこで肝細胞癌保存血清を用い、ELISA法を用い多数例で解析を行なった。

(2) 血清パラメーター解析

糖鎖発現パターン解析

本研究では北海道大学西村紳一郎教授の協力のもと、近年開発された、糖鎖をビーズでトラップし、MALDI-TOF-MSで分子量を定量する網羅的糖鎖解析が可能なシステム(Furukawa et al. Annal Chem 80, 1094-1101, 2008)を導入し、血清中の糖鎖パターンの変化と、肝細胞癌化学療法治療効果との関係を検討し、新たな効果予測パラメーターとしての意義付けを行った。

血清パラメーター解析(糖鎖・サイトカイン)

血清中の VEGF, PDGF, ILs 等のサイトカインを multiplex ELISA で一括測定した。岡山大学関連の機関病院からの血清を含め、これらの測定項目及び臨床検査パラメータについて、治療効果予測への可能性を検討した。

Pharmacodynamic 解析

薬剤の細胞への影響は、癌化による変異がある場合を除けば、遺伝的に規定されている。ソラフェニブの細胞への作用を、リンパ球を用い in vitro で再現する系を確立する。ソラフェニブ投与後の血清を含んだ培地上で同患者のリンパ球を PMA 刺激し、ERK のリン酸化阻害作用を測定する、新たな系の確立を計った。

(3) 治療効果予測マーカーの開発

前述の様々なパラメーターを統合データベース化し、SAS 及び JMP にて解析し、重み付けを行ない Index を作成する。

4. 研究成果

(1) Follistatin 研究

162症例の肝疾患患者における血清中 follistatin濃度を測定し、臨床背景と対比検討した。発現の中央値は肝細胞癌患者、肝硬変、慢性肝炎、健常者において、それぞれ 1168、1606、1324、1661pg/mLであり有意差はなかった。肝細胞癌患者での検討では、高齢、HCV抗体陰性、腫瘍径大、GTPやdes-gamma carboxyprothrombinが高値、そして門脈内腫瘍塞栓の存在下で、follistatinが高値であった。また、follistatin高値の肝細胞癌患者の予後は短く(P=0.004)、多変量解析においても、腫瘍径と門脈内腫瘍塞栓に加え、follistatin高値が予後不良の因子であった(hazard ratio=2.41, 95% confidence interval=1.16-5.00, P=0.02)。本研究結果

はJournal of Gastroenterology and Hepatology2012に掲載され、follistatinの肝癌における意義について示すことができた。Follistatinの培養肝癌細胞への影響は、in vitroで十分に示すことはできなかったが、研究(2)の結果より、抗がん剤投与後の患者予後にも関連していることが示唆された。

(2) 血清パラメーター解析 糖鎖解析

肝癌の分子標的薬であるソラフェニブ投与85症例の糖鎖パターンを解析した。フコシレーションを受けた、2つのシアル酸が結合した3分岐の糖鎖であるG2890発現が高値であることが、ソラフェニブ投与後の予後の独立した危険因子 (hazard ratio=1.88, 95% confidence interval=1.04-3.48, P=0.036) であることが明らかとなった。この結果はhepatology2014に掲載され、さらに現在他の治療を受けた患者の予後予測が可能かどうかについて、検討を進めている。

サイトカイン解析

30症例のソラフェニブ投与症例のちりょう前血清中の9種の血管新生関連サイトカイン発現を検討した。そのうちangiopoietin-2, follistatin, granulocyte colony-stimulating factor, hepatocyte growth factor, interleukin-8, leptin, platelet-derived growth factor-BB, platelet endothelial cell adhesion molecule-1, and vascular endothelial growth factorの8種のサイトカインが治療効果に関連していることを明らかとし、Journal of Gastroenterology and Hepatology2011に掲載された。さらに、金沢大学、杏雲堂病院より、ソラフェニブ投与と症例の治療前血清を供与いただき、前結果の再現性、及び予後との関係を証明し、British Journal of Cancer2013に掲載された。

Pharmacodynamic 解析

ソラフェニブ投与前の血液を採取直後に解析する必要があるが、多施設の症例の解析が困難であり、有意な結果を得ることができなかった。

(4) 統合インデックスの作成

予後に関与するファクター(特に血清パラメーター)は明らかとなっており、それぞれのハザード比を明らかとすることができた。現段階では予後予測ファクターは限定されており、糖鎖のvalidationに向けて、血清を採取・蓄積中である(サイトカインはvalidation済み)。これらの結果が判明した後Indexを作成する予定であり、現在も研究は進行している。

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 27件)

- 1) Miyahara K, Nouso K, Nakamura S, et al. (他6名、2番目) Serum glycan as a prognostic marker in patients with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. *Hepatology* 2014;59:355. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729393>.
- 2) Miyahara K, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他15名、2番目) Efficacy of sorafenib beyond first progression in patients with metastatic hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2014;44:294-301. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23607549>
- 3) Matsumoto K, Shiraha H, Nouso K, et al. (他6名、8番目) Anti-programmed cell death-1 antibody as a new serological marker for type 1 autoimmune hepatitis. *J Gastroenterol Hepatol* 2014;29:110-5. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23869988>
- 4) Nouso K, Miyahara K, et al. (他16名、1番目) Effect of hepatic arterial infusion chemotherapy of 5-fluorouracil and cisplatin for advanced hepatocellular carcinoma in the Nationwide Survey of Primary Liver Cancer in Japan. *Br J Cancer* 2013;109:1904-7. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18349849>
- 5) Miyahara K, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他20名、2番目) Pro-angiogenic cytokines for prediction of outcomes in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Br J Cancer* 2013;109:2072-8. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24045661>
- 6) Takuma Y, Nouso K, et al. (他10名、2番目) Measurement of spleen stiffness by acoustic radiation force impulse imaging identifies cirrhotic patients with esophageal varices. *Gastroenterology* 2013;144:92-101 e2. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23022955>
- 7) Tomoda T, Nouso K, Miyahara K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他10名、2番目) Prognostic impact of serum follistatin in patients with hepatocellular

- carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2013;28:1391-6. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23432377>
- 8) Nouso K, Miyahara K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他17名、1番目) Clinical utility of high-throughput glycome analysis in patients with pancreatic cancer. *J Gastroenterol* 2013;48:1171-9. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23307043>
- 9) Nouso K, Current chemotherapies for advanced hepatocellular carcinoma. *Clin J Gastroenterol* 2013;6:89-93. 査読あり
- 10) Miyahara K, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他11名、2番目) Evaluation of the effect of sorafenib using serum NX-des-gamma-carboxyprothrombin in patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2013;43:1064-70. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23347420>
- 11) Nakamura S, Nouso K, Shiraha H, et al. (他7名、2番目) The Diagnosis of Hypovascular Hepatic Lesions Showing Hypo-intensity in the Hepatobiliary Phase of Gd-EOB- DTPA-enhanced MR Imaging in High-risk Patients for Hepatocellular Carcinoma. *Acta Med Okayama* 2013;67:239-44. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23970322>
- 12) Kinugasa H, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他9名、2番目) Risk factors for recurrence after transarterial chemoembolization for early-stage hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol* 2012;47:421-6. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22048256>
- 13) Kobayashi S, Nouso K, Miyahara K, Kinugasa H, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他9名、2番目) Clinical utility of serum fucosylated hemopexin in Japanese patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatol Res* 2012;42:1187-95. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22639859>
- 14) Miyatake H, Kobayashi Y, Nakamura S, Nouso K, et al. (他6名、9番目) Effect of previous interferon treatment on outcome after curative treatment for hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Dig Dis Sci* 2012;57:1092-101. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21989822>
- 15) Tomoda T, Nouso K, Miyahara K, Nakamura S, et al. (他6名、2番目) Genetic risk of hepatocellular carcinoma in patients with hepatitis C virus: a case control study. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:797-804. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22004425>
- 16) Tanaka S, Shiraha H, Nakamura S, Nouso K, et al. (他14名、16番目) Runt-related transcription factor 3 reverses epithelial-mesenchymal transition in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer* 2012;131:2537-46. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22488108>
- 17) Tanaka H, Iijima H, Nouso K, et al. (他12名、3番目) Cost-effectiveness analysis on the surveillance for hepatocellular carcinoma in liver cirrhosis patients using contrast-enhanced ultrasonography. *Hepatol Res* 2012;42:376-84. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22221694>
- 18) Matsubara M, Shiraha H, Nakamura S, Nouso K, et al. (他9名、12番目) Des-gamma-carboxyl prothrombin is associated with tumor angiogenesis in hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2012;27:1602-8. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22554292>
- 19) Kariyama K, Nouso K, Wakuta A, et al. (他4名、2番目) Percutaneous radiofrequency ablation for treatment of hepatocellular carcinoma in the caudate lobe. *AJR Am J Roentgenol* 2011;197:W571-5. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940528>
- 20) Hagihara H, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他7名、2番目) Effect of pegylated interferon therapy on intrahepatic recurrence after curative treatment of hepatitis C virus-related hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Oncol* 2011;16:210-20. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21940528>

- 152943
- 21) Nouso K, Kobayashi Y, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他12名、1番目) Prognostic importance of fucosylated alpha-fetoprotein in hepatocellular carcinoma patients with low alpha-fetoprotein. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:1195-200. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21410750>
- 22) Wakuta A, Nouso K, Kariyama K, et al. (他6名、2番目) Radiofrequency ablation for the treatment of hepatocellular carcinoma with decompensated cirrhosis. *Oncology* 2011;81:39-44. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21912196>
- 23) Kinugasa H, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他12名、2番目) Hepatocellular carcinoma occurring in hepatobiliary fibropolycystic disease. *Hepatol Res* 2011;41:277-81. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21338456>
- 24) Nakanishi Y, Shiraha H, Nakamura S, Nouso K, et al. (他15名、17番目) Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis. *BMC Cancer* 2011;11:3 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21205319>
- 25) Miyahara K, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. (他10名、2番目) Predicting the treatment effect of sorafenib using serum angiogenesis markers in patients with hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:1604-11. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22011296>
- 26) Takuma Y, Nouso K, Makino Y, et al. (他5名、2番目) Outcomes after curative treatment for cryptogenic cirrhosis-associated hepatocellular carcinoma satisfying the Milan criteria. *J Gastroenterol Hepatol* 2011;26:1417-24. 査読あり
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21884248>
- 27) Kobashi H, Nakamura S, Nouso K, et al. (他9名、9番目) Long-term outcome and hepatocellular carcinoma development in chronic hepatitis B or cirrhosis patients after nucleoside analog treatment with entecavir or lamivudine. *Hepatol Res* 2011;41:405-16. 査読あり

〔学会発表〕(計6件)

宮原孝治、能祖一裕、中村進一郎、白羽英則 他、血管新生関連サイトカインによるソラフェニブ効果予測、第4回日本肝癌分子標的治療研究会、2011年6月18日、東京

宮原孝治、能祖一裕、中村進一郎、白羽英則 他、血管新生関連サイトカインによる進行肝細胞癌の治療効果予測、第39回日本肝臓学会西部会、2011年12月9日、岡山

大西秀樹、能祖一裕、山本和秀 進行肝細胞がんの臨床病態別に見る治療選択、第39回日本肝臓学会西部会、2011年12月9日、岡山

宮原孝治、能祖一裕、中村進一郎、白羽英則 他、ソラフェニブ中止後の腫瘍進展に関する検討 第6回日本肝癌分子標的治療研究会 2012年6月16日 神奈川

宮原孝治、能祖一裕、中村進一郎、白羽英則 他、血清糖鎖マーカーによる進行肝細胞癌の予後予測の可能性 第8回日本肝癌分子標的治療研究会 2013年6月21日 石川

宮原孝治、能祖一裕、山本和秀 血管新生関連サイトカインを用いたソラフェニブ/肝動注療法を選択 第49回日本肝癌研究会 2013年7月11日 東京

〔図書〕(計2件)

能祖一裕 アークメディア メタボ肝癌 2013年 169-172, 229-232 頁

能祖一裕 中外医学社 肝癌診療 Q & A 2013年 118 120 頁

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
なし

6．研究組織

(1)研究代表者

能祖 一裕 (NOUSO KAZUHIRO)

岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・准教授

研究者番号：10314668

(2)研究分担者

白羽 英則 (SHIRAHA HIDENORI)

岡山大学・大学病院・講師

研究者番号：40379748

中村 進一郎 (NAKAMURA SHINICHIRO)

岡山大学・大学病院・助教

研究者番号：70514230

(3)連携研究者

なし