

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 24 年 3 月 31 日現在

機関番号：34419

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2011

課題番号：23650627

研究課題名（和文） 肝細胞癌のソラフェニブ著効例における感受性規定遺伝子変異の探索

研究課題名（英文） Identification of sensitivity determinant factors of srafenib treatment in 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

研究成果の概要（和文）：

本研究の成果として、肝細胞がんに対するソラフェニブ治療著効例の効果予測因子となる 11q13 の遺伝子増幅を初めて特定した。動物実験において、FGF4 強制発現がん細胞はソラフェニブに奏功することを確認した。臨床的因子としては、肺転移症例および低分化型組織例がソラフェニブ著効例の効果予測因子となることを示した。本研究の成果により、血管新生阻害薬の奏功メカニズムにおいてがん細胞側の効果規定因子があることを初めて示し、臨床的に有効なバイオマーカーを特定した。

研究成果の概要（英文）：

A real-time PCR-based copy number assay revealed that *FGF3/FGF4* amplification was observed in responders to sorafenib, but not observed in non-responders ( $p=0.006$ ). The clinicopathological features showed that multiple lung metastases and a poorly differentiated histological type were frequently observed in responders. Our findings may provide a novel insight into the molecular background of HCC and sorafenib responders, warranting further prospective biomarker studies.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：腫瘍学・臨床腫瘍学

キーワード：肝細胞癌、遺伝子増幅、FGFR シグナル、ソラフェニブ、バイオマーカー

## 1. 研究開始当初の背景

ソラフェニブは VEGFR2 標的の血管新生阻害薬として認識されているが、活性を有する標的の中で直接的にがん細胞に作用し、治療効果に関連する on-target は全く同定されていない。興味深いことに、SHARP 試験をはじめとする欧米の試験においては、ほとんど認められなかった著効例（CR 例、good PR 例）が、我が国をはじめとするアジア諸国で 10% 前後認められることががん専門医の間で話題となっている。著効例は肝細胞癌では比較的まれな微小肺転移巣が多発し、やや低分化型の組織型が多

いなど、生物学的に一般的な高分化型肝細胞癌と異なる知見も得られてきている。このような知見は肺癌における EGFR チロシンキナーゼ阻害薬治療に対する EGFR 活性型遺伝子変異のエビデンスに極めて近似しており、肝細胞がんにおける未知の活性型遺伝子変異あるいは遺伝子増幅が「がん細胞側」の依存シグナル経路として存在し、ソラフェニブ著効例の原因となっていることが強く疑われる。

## 2. 研究の目的

本研究はソラフェニブ著効の原因となる肝細胞癌の遺伝子変化を探索し、治療選択のための強力なバイオマーカーを同定することを目的とする。国内主要組織におけるソラフェニブ治療を受けた肝細胞癌症例に対して、著効例を抽出して共通する肝細胞癌の体細胞変異およびコピー数異常のゲノムワイドな遺伝子解析を実施する。

### 3. 研究の方法

ソラフェニブに対して著効した肝細胞癌症例の遺伝子解析

日本肝がん研究会の参加組織を対象に本研究のプロトコールを作成し、各施設における倫理委員会の承認を得る。ソラフェニブに対して著効した肝細胞癌症例の組織（凍結、パラフィン包埋切片）を収集し、解析を行う。ソラフェニブ著効例のゲノム異常を特定する。パラフィン包埋切片由来のDNAでも簡便に検出できる新しい方法の確立を目指す。

CGH arrayのコピー数変化の解析  
ソラフェニブ著効例がん組織を試料に解析する。

MassArrayシステムを用いた遺伝子変異解析

TOF-MSであるMassARRAYシステムのOncocarta®を用い、EGFR, KRAS等を含む238種類の半網羅的体細胞変異解析の解析を行う。

### 4. 研究成果

ソラフェニブに対して著効した肝細胞癌症例の遺伝子解析

肝細胞がんに対するソラフェニブ治療著効例の効果予測因子となる11q13の遺伝子増幅を初めて特定した。多施設共同臨床試験において全国からソラフェニブ著効例を集積して解析したところ、10例中3例に遺伝子増幅を認めたが、非著効例では1例も認めなかった( $p=0.006$ )。FISH解析でもFGF3の著明な遺伝子増幅を確認した。動物実験において、FGF4強制発現がん細胞はソラフェニブに奏功することを確認した。臨床的因子としては、肺転移症例および低分化型組織例がソラフェニブ著効例の効果予測因子となることを示した。これらの結果は現在投稿中である (Hepatology, in revise)。本研究の成果により、血管新生阻害薬の奏功メカニズムにおいてがん細胞側の効果規定因子があることを初めて示し、臨床的に有効なバイオマーカーを特定した。ソラフェニブに対して著効した肝細胞癌症例の組織（凍結、パラ

フィン包埋切片）は、今後も収集を続けることでバイオマーカー研究のさらなる進展が期待できる。

CGH arrayのコピー数変化の解析については、ソラフェニブ著効例がん組織を試料に解析し、上記の11q13遺伝子増幅領域を同定した。パラフィン包埋切片由来のDNAでも簡便に検出できる新しい方法として、定量的PCRベースの技術であるCopy number assayを臨床応用した。

MassArrayシステムを用いた遺伝子変異解析においては、29例の肝細胞がんに対して解析を行い、いくつかの異常を検出した。

### 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20件)

Matsuoka, H., Arao, T., Makimura, C., Takeda, M., Kiyota, H., Tsurutani, J., Fujita, Y., Matsumoto, K., Kimura, H., Otsuka, M., Koyama, A., Imamura, CK., Tanigawara, Y., Yamanaka, T., Tanaka, K., Nishio, K., Nakagawa, K. Expression changes in arrestin 81 and genetic variation in catechol-O-methyltransferase are biomarkers for the response to morphine treatment in cancer patients. *Oncol Rep*, 27(5): 1393-9, 2012.

Kaneda, H., Okamoto, I., Sakai, K., Tanizaki, J., Takeda, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Marked response to both S-1 and pemetrexed in a patient with echinoderm icrotubule-associated protein-like 4-anaplastic lymphoma kinase-positive lung adenocarcinoma. *Acta Oncol*, E-pub ahead of print, 2012.

Aomatsu, K., Arao, T., Abe, K., Kodama, A., Sugiyoka, K., Matsumoto, K., Kudo, K., Kimura, H., Fujita, Y., Hayashi, H., Nagai, T., Shimomura, Y., Nishio, K. Slug is upregulated during wound healing and regulates cellular phenotypes in corneal epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 53(2): 751-6, 2012.

Tanaka, K., Arao, T., Tamura, D., Aomatsu, K., Furuta, K., Matsumoto, K., Kaneda, H., Kudo, K., Fujita, Y., Kimura, H., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio,

K. SRPX2 is a novel chondroitin sulfate proteoglycan that is overexpressed in gastrointestinal cancer. *Plos One*, 7(1): e27922, 2012.

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.

Tanizaki, J., Okamoto, I., Takezawa, K., Sakai, K., Azuma, K., Kuwata, K., Yamaguchi, H., Hatashita, E., Nishio, K., Janne, PA., Nakagawa, K. Combined effect of ALK and MEK inhibitors in EML4-ALK-positive non-small-cell lung cancer cells. *Br J Cancer*, 106(4): 763-7, 2012.

Sakamoto, H., Kimura, H., Sekijima, M., Matsumoto, K., Arao, T., Chikugo, T., Yamada, Y., Kitano, M., Ito, A., Takeyama, Y., Kudo, M., Nishio, K. Plasma concentrations of angiogenesis-related molecules in patients with pancreatic cancer. *Jpn J Clin Oncol*, 42(2): 105-12, 2012.

Takeda, M., Okamoto, I., Sakai, K., Tanaka, K., Terashima, M., Nishio, K., Nakagawa, K. Successful long-term treatment with pemetrexed of NSCLC associated with EML4-ALK and low thymidylate synthase expression. *Clin Lung Cancer*, 13(2): 157-9, 2012.

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.

Goto, K., Ichinose, Y., Ohe, Y., Yamamoto, N., Negoro, S., Nishio, K., Itoh, Y., Jiang, H., Duffield, E., McCormack, R., Saijo, N., Mok, T., Fukuoka, M. Epidermal growth factor receptor mutation status in circulating free DNA in serum: from IPASS, a

phase III study of gefitinib or carboplatin/paclitaxel in non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 7(1): 115-21, 2012.

Makimura, C., Arao, T., Matsumoto, K., Takeda, M., Kiyota, H., Tsurutani, J., Fujita, Y., Matsumoto, K., Kimura, H., Otsuka, M., Koyama, A., Imamura, CK., Yamanaka, T., Nishio, K., Nakagawa, K. Prospective study evaluating the plasma concentrations of twenty-six cytokines and response to morphine treatment in cancer patients. *Anticancer Res*, 31(12): 4561-8, 2011.

Arao, T., Matsumoto, K., Megawa, M., Nishio, K. What can and cannot be done using a microarray analysis? Treatment stratification and clinical applications in oncology. *Biol Pharm Bull*, 34(12): 1789-93, 2011.

Murakami, H., Tamura, T., Takahashi, T., Nokihara, H., Naito, T., Nakamura, Y., Nishio, K., Seki, Y., Sarashina, A., Shahidi, M., Yamamoto, N. Phase I study of continuous afatinib (BIBW2992) in patients with advanced non-small cell lung cancer after prior chemotherapy/erlotinib/ gefitinib (LUX-Lung 4). *Cancer Chemother Pharmacol*, E-pub ahead of print, 2011.

Nishio, M., Yamanaka, T., Matsumoto, K., Kimura, H., Sakai, K., Sakai, A., Sone, T., Horiike, A., Koizumi, F., Kasahara, K., Ohira, T., Ikeda, N., Saijo, N., Arao, T., Nishio, K. Serum heparan sulfate concentration is correlated with the failure of epidermal growth factor receptor tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with lung adenocarcinoma. *J Thorac Oncol*, 6(11): 1889-94, 2011.

Fujita, Y., Islam, R., Kaneda, H., Kudo, K., Tamura, D., Aomatsu, K., Nagai, T., Kimura, H., Matsumoto, K., Velasco, MA., Arao, T., Okawara, T., Nishio, K. Aza-derivatives of resveratrol are potent macrophage migration inhibitory factor inhibitors. *Invest New Drugs*, E-pub ahead of print, 2011.

Yonesaka, K., Zejmullahu, K.,

Okamoto, I., Satoh, T., Cappuzzo, F., Souglakos, J., Ercan, D., Rogers, A., Roncalli, M., Takeda, M., Fujisaka, Y., Philips, J., Shimizu, T., Maenishi, O., Cho, Y., Sun, J., Destro, A., Taira, K., Takeda, K., Okabe, T., Swanson, J., Shivdasani, RA., Nishio, K., Fukuoka, M., Verella-Garcia, M., Nakagawa, K., Janne, PA. Activation of ERBB2 signaling causes resistance to the EGFR-directed therapeutic antibody cetuximab. *Sci Transl Med*, 3(99): 99ra86, 2011.

Kaneda, H., Arao, T., Matsumoto, K., Velasco, MA., Tamura, D., Aomatsu, K., Kudo, K., Sakai, K., Nagai, T., Fujita, Y., Tanaka, K., Yanagihara, K., Yamada, Y., Okamoto, I., Nakagawa, K., Nishio, K. Activin a inhibits vascular endothelial cell growth and suppresses tumor angiogenesis in gastric cancer. *Br J Cancer*, 5(8): 1210-7, 2011.

Arao, T., Matsumoto, K., Furuta, K., Kudo, K., Kaneda, H., Nagai, T., Sakai, K., Fujita, Y., Tamura, D., Aomatsu, K., Koizumi, F., Nishio, K. Acquired drug resistance to vascular endothelial growth factor receptor 2 tyrosine kinase inhibitor in human vascular endothelial cells. *Anticancer Res*, 31(9): 2787-96, 2011.

Kodera, Y., Katanasaka, Y., Kitamura, Y., Hitoshi, T., Nishio, K., Tamura, T., Koizumi, F. Sunitinib inhibits lymphatic endothelial cell functions and lymph node metastasis in a breast cancer model through inhibition of vascular endothelial growth factor receptor 3. *Breast Cancer Res*, 13(3): R66, 2011.

Tanizaki, J., Okamoto, I., Fumita, S., Okamoto, W., Nishio, K., Nakagawa, K. Roles of BIM induction and survivin downregulation in lapatinib-induced apoptosis in breast cancer cells with HER2 amplification. *Oncogene*, 30(39): 4097-106, 2011.

[学会発表](計8件)

松本和子、西尾和人、血清ヘパラン硫酸濃度とEGRチロシンキナーゼ阻害薬耐性、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋市

木村英晴、西尾和人、大腸がんにおけるHS6ST2発現とその臨床的特徴、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋市

永井知行、工藤正俊、西尾和人、肝細胞癌におけるTJP-1とTwist発現の肝癌切除後の予後への影響、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋市

藤田至彦、西尾和人、非小細胞肺癌におけるEGFR T790の変異の新規検出法、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋市

荒尾徳三、西尾和人、胃癌のEMT関連遺伝子発現と化学療法治療予後、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.3-5、名古屋市

Yamamoto, N., Nishio, K. An analysis of serum heparan sulfate concentration and EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with non-small cell lung adenocarcinoma. *American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2011*, 2011.6.3-7, Chicago.

Nishio, M., Nishio, K. An analysis of serum heparan sulfate concentration and EGFR tyrosine kinase inhibitor treatment in patients with non-small cell lung adenocarcinoma. *American Society of Clinical Oncology Annual Meeting 2011*, 2011.6.3-7, Chicago.

Aomatsu, K., Nishio, K. Slug is upregulated during wound healing and downregulates TP63 in corneal epithelial cell. *ARVO 2011 Vision Genomics*, 2011.5.1-5, Florida.

[産業財産権]  
出願状況(計1件)

名称: ソラフェニブの効果予測方法  
発明者: 西尾和人、他  
権利者: 近畿大学、他  
種類: 特許権  
番号: 特願 2011-104275  
出願年月日: 2011.5.9  
国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

西尾 和人 (KAZUTO NISHIO)  
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 (MASATOSHI KUDO)

近畿大学・医学部・教授  
研究者番号：10298953