

平成 30 年 6 月 16 日現在

機関番号：34419

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09028

研究課題名(和文) 血清分泌型マイクロRNAを用いたソラフェニブ治療効果予測マーカーの開発

研究課題名(英文) Development of biomarker for sorafenib treatment using serum microRNA in patients with hepatocellular carcinoma

研究代表者

工藤 正俊 (KUDO, Masatoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号：10298953

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：血清分泌型microRNA(miR)定量によるソラフェニブ効果予測を試みた。screening、validation cohortにより、対象miR絞り込んだ。3ヶ月以上のdisease control (DC)例とnon-DC例、健常者間で血清中miR-181a-5pを定量したところ、non-DC群ではDC群、健常者群と比較して有意にmiR-181a-5p量は低値であった。BCLC-stage C例を対象として、多変量解析を行い、血清miR-181a-5p量が独立して治療開始後のDC、全生存期間に影響することを確認した。血清中miR-181a-5p定量により、病勢制御効果が予測できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the specific miRNAs in serum that could predict the early response of HCC to sorafenib treatment. Analyzing the sera from screening cohort, we selected five miRNAs. Through further analysis using a validation cohort and healthy control subjects, we found that miR-181a-5p and miR-339-5p showed significant differences in serum levels among patients with partial response (PR), stable disease (SD), and progressive disease (PD). We also analyzed the factors associated with disease control (DC); patients with DC showed a significantly higher level of serum miR-181a-5p than non-DC patients or healthy control subjects. We further conducted multivariate analysis among HCC patients with Barcelona Clinic Liver Cancer stage C using extrahepatic metastasis, serum decarboxiprotrombin and miR-181a-5p levels as covariables; serum miR-181a-5p was the only independent factor for achieving DC and affecting overall survival.

研究分野：消化器内科

キーワード：マイクロRNA ソラフェニブ 肝細胞癌 バイオマーカー 分子標的療法 生存期間 化学療法 BCLCステージ

1. 研究開始当初の背景

進行肝臓に対する治療としてソラフェニブが承認されて以来、この薬剤は肝動脈塞栓術(TACE)不応例、不能例、肝外転移例に対する中心的薬剤であった。しかし、その効果を予測するマーカーは存在せず、特に腫瘍縮小効果に乏しいにも関わらず、生存期間延長に寄与する薬剤のバイオマーカー同定は困難である可能性が考えられてきた。

一方、血中には脂質に包まれた microRNA (miR) が存在し、肝細胞癌 (肝臓) 診断のマーカーとして報告されている。脂質内の miR は、ターゲット細胞である肝臓細胞に取り込まれシグナル伝達に影響する可能性があり、血清 miR プロファイルがソラフェニブの反応性を予測するバイオマーカーとなりうる可能性があるが、その役割は不明である。

2. 研究の目的

本研究では、miR が肝臓細胞の薬剤感受性を規定する場合を想定し、分泌型 miR の定量によるソラフェニブ効果予測を試みた。

3. 研究の方法

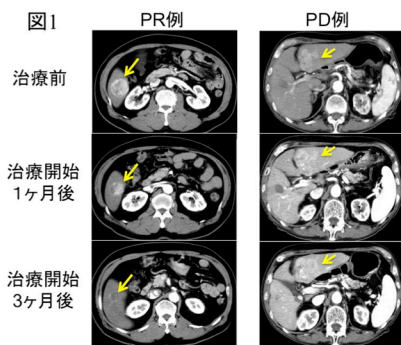
(1) ソラフェニブ治療を受けた肝臓例のうち、3ヶ月以上 PR の持続した 8 例 (PR 群)、1ヶ月目で PD と判定された 8 例 (PD 群) の治療前血清を用い、血清中での存在が知られている 179 種の miR で、両群で差のあるものを選択した。(Screening cohort)

(2) 53 例のソラフェニブ治療を受けた 56 例の肝臓症例 (投与期間中央値 99 日、1ヶ月目の反応; PR/SD/PD=11 例/22 例/20 例、3ヶ月以上 PR 又は SD 持続; 16 例)、及び 8 例の健常者の血清で、これらの miR を定量した (Validation cohort)。微量の miR を安定して定量するため locked nucleic acid (LNA) を用いた qPCR を用い、reference として血清中に安定して存在する 5 種の miR を定量、ターゲット miR との Cq 値の差 (ΔCq) を求めた。

4. 研究成果

(1) Screening cohort の選択

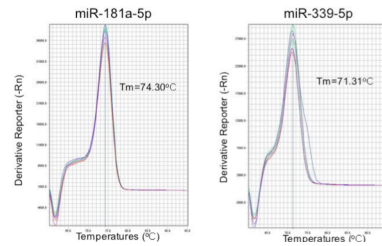
ソラフェニブ治療を受けた肝臓例のうち、3ヶ月以上 PR の持続した 8 例 (PR 群)、1ヶ月目で PD と判定された 8 例 (PD 群) を選択した。判定には造影 CT を用い、modified RECIST (mRECIST) の基準に基づき判定した。典型例を図 1 に示す。



(2) Screening cohort を用いた miR の絞り込み

179 種の miR のうち、9 種の miR で PR 群と PD 群の治療前血清中の miR 量に差が認められた ($p=0.0109\sim0.0578$)。増幅効率の良い 5 種 (miR-17-5p, miR-181a-5p, miR-33a-5p, miR-339-5p, and miR-148b-3p) の miR にターゲットを絞り込んだ (図 2)。

図2: LNA-primerを用いた定量における Melt Curve



治療前血清においてPR群とPD群で含量に差が認められたmiR (候補となるmiR)

miR	Mean ΔCq	PR群 中央値 (分布)	PD群 中央値 (分布)	T-test p値	PDと比較した PR例のmiR量
hsa-miR-136-5p	6.707	5.573 (4.954-7.162)	7.957 (7.146-7.996)	0.0046	上昇
hsa-miR-17-5p	5.361	5.630 (5.016-6.622)	4.919 (3.842-5.048)	0.0144	低下
hsa-miR-181a-5p	2.555	2.098 (1.720-3.388)	2.972 (2.112-3.554)	0.0238	上昇
hsa-miR-182-5p	7.455	7.648 (7.272-9.466)	6.918 (6.046-8.044)	0.0275	低下
hsa-miR-33a-5p	5.52	4.987 (4.066-5.744)	5.976 (4.818-8.374)	0.0342	上昇
hsa-miR-335-5p	6.684	6.279 (4.578-7.31)	6.903 (5.784-8.916)	0.0423	上昇
hsa-miR-339-5p	5.958	5.804 (4.568-6.414)	6.254 (5.348-7.368)	0.0428	上昇
hsa-miR-148b-3p	2.068	1.950 (0.628-2.270)	2.474 (1.574-3.118)	0.0443	上昇

(3) Validation cohort による解析

Validation cohort の患者背景を示す。(表 1)。

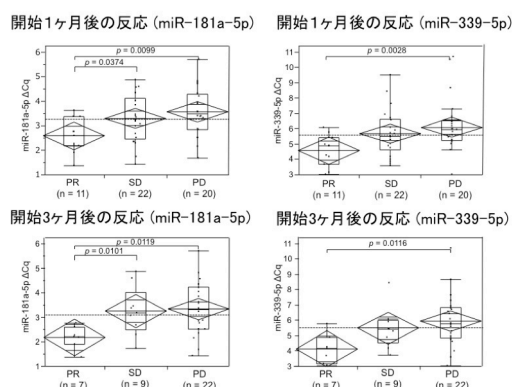
表1 Validation cohort の患者背景

年齢	74 y.o (67.5~79.5)
性別: (男性 / 女性)	45 / 8
成因: (HBV / HCV / virus-negative)	13 / 22 / 18
初期投与量: (200mg / 400mg / 800mg)	1 / 16 / 36
投与期間 (日)	99 days (56~233.5)
投与前AFP値 (ng/mL)	70 (10~4846)
投与前DCP値 (mIU/mL)	1186 (68.5~7865)
肝外転移の有無: (あり / なし)	23 / 30
PVTT (Vp3/4): (あり / なし)	11 / 42
BCLC stage (A / B / C)	8 / 15 / 30
ソラフェニブ投与後の反応	
投与1ヶ月目の反応: (PR / SD / PD)	11 / 22 / 20
投与3ヶ月目の反応: (PR / SD / PD)	7 / 9 / 22
3ヶ月間のPR・SD持続: (持続あり / 持続なし)	16 / 37

53 例ソラフェニブ治療前の肝臓例、8 例の健常者血清で解析し、miR-181a-5 及び miR-339-5p において、ソラフェニブ治療後 1ヶ月目、3ヶ月目の反応性と治療前の血清中 miR 量の間に関係が認められた (miR-181a-5; PR 例/SD 例/PD 例の中央値 = 2.61/3.31/3.50; miR-339-5p; PR 例/SD 例/PD

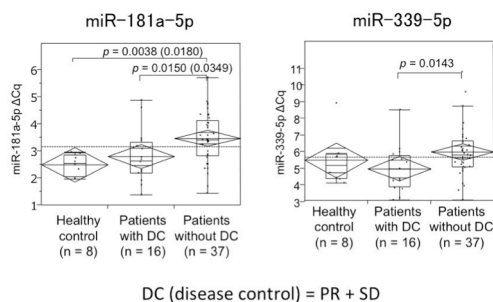
例=4.89/5.52/5.99: 図3)。

図3: 治療前血清中miR量と sorafenibに対する腫瘍の反応



また、3ヶ月以上のPR又はSD持続を disease control (DC)例とし、DC、non-DC及び健常者間で血清中miR-181a-5、miR-339-5を定量したところ、non-DC群ではDC群、健常者群と比較して有意にmiR量は低値であった。特にmiR-181a-5に関して、病勢制御が得られた症例では得られなかった例に比較し、miR-181a-5量が高値であり、正常コントロール例と同程度の血清量を示した (p = 0.0349, non-DC vs. DC; p = 0.0180 non-DC vs. 健常者) (図4)。

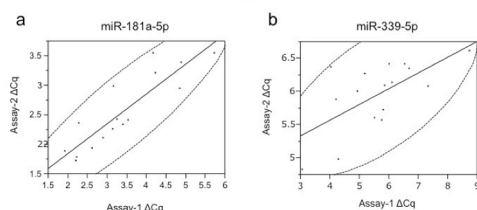
図4 治療前血清中miR量と治療開始3ヶ月後の病勢制御の関係



DC (disease control) = PR + SD

(4) Intra-assay validationの検討
referenceのmiRの組み合わせを変えて inter assay variationを検討し、miR-181a-5はmiR-339-5pより安定して定量できた。(図5)

図5 Reference miRの組み合わせを変えた場合の inter-assay variation



一般的なソラフェニブの適応である BCLC-stage C 例を対象として、単変量で有意差のあった因子 (肝外転移の有無、血清 DCP 値、血清 miR-181a-5 量) を用いて多変量解析をおこなったところ、血清 miR-181a-5 量が独立して治療開始後の DC を予測した (p=0.0092, OR=0.139, 95%CI=0.011-0.658)。また miR-181a-5 量は独立して全生存期間に影響した (p=0.0194, HR=0.269; 0.070-0.818)。

【結論】ソラフェニブ治療前の血清中 miR-181a-5 の LNA を用いた定量により、治療後の病勢制御効果が予測できる可能性がある。

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 13 件)

1) Ikeda M, Kudo M, Aikata H, Nagamatsu H, Ishii H, Yokosuka O, Torimura T, Morimoto M, Ikeda K, Kumada H, Sato T, Kawai I, Yamashita T, Horio H, Okusaka T; Miriplatin TACE Study Group. Transarterial chemoembolization with miriplatin vs. epirubicin for unresectable hepatocellular carcinoma: a phase III randomized trial. *J Gastroenterol.* 2018 Feb;53(2):281-290. doi: 10.1007/s00535-017-1374-6.

2) Kudo M, Cheng AL, Park JW, Park JH, Liang PC, Hidaka H, Izumi N, Heo J, Lee YJ, Sheen IS, Chiu CF, Arioka H, Morita S, Arai Y. Orantinib versus placebo combined with transcatheter arterial chemoembolisation in patients with unresectable hepatocellular carcinoma (ORIENTAL): a randomised, double-blind, placebo-controlled, multicentre, phase 3 study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* 2018 Jan;3(1):37-46. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30290-X.

3) Kudo M. Lenvatinib in Advanced Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer.* 2017, Nov;6(4):253-263. doi: 10.1159/000479573.

4) Nishida N, Kudo M. Role of Immune Checkpoint Blockade in the Treatment for Human Hepatocellular Carcinoma. *Dig Dis.* 2017;35(6):618-622. doi:10.1159/000480258.

5) Ueshima K, Nishida N, Kudo M. Sorafenib-Regorafenib Sequential Therapy in Advanced Hepatocellular Carcinoma: A Single-Institute Experience. *Dig Dis.*

2017;35(6):611-617.
doi: 10.1159/000480257.

6) Kudo M, Moriguchi M, Numata K, Hidaka H, Tanaka H, Ikeda M, Kawazoe S, Ohkawa S, Sato Y, Kaneko S, Furuse J, Takeuchi M, Fang X, Date Y, Takeuchi M, Okusaka T. S-1 versus placebo in patients with sorafenib-refractory advanced hepatocellular carcinoma (S-CUBE): a randomised, double-blind, multicentre, phase 3 trial. *Lancet Gastroenterol Hepatol*. 2017 Jun;2(6):407-417. doi: 10.1016/S2468-1253(17)30072-9.

7) El-Khoueiry AB, Sangro B, Yau T, Crocenzi TS, Kudo M, Hsu C, Kim TY, Choo SP, Trojan J, Welling TH Rd, Meyer T, Kang YK, Yeo W, Chopra A, Anderson J, Dela Cruz C, Lang L, Neely J, Tang H, Dastani HB, Melero I. Nivolumab in patients with advanced hepatocellular carcinoma (CheckMate 040): an open-label, non-comparative, phase 1/2 dose escalation and expansion trial. *Lancet*. 2017 Jun 24;389(10088):2492-2502. doi: 10.1016/S0140-6736(17)31046-2.

8) Bruix J, Qin S, Merle P, Granito A, Huang YH, Bodoky G, Pracht M, Yokosuka O, Rosmorduc O, Breder V, Gerolami R, Masi G, Ross PJ, Song T, Bronowicki JP, Ollivier-Hourmand I, Kudo M, Cheng AL, Llovet JM, Finn RS, LeBerre MA, Baumhauer A, Meinhardt G, Han G; RESORCE Investigators. Regorafenib for patients with hepatocellular carcinoma who progressed on sorafenib treatment (RESORCE): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 3 trial. *Lancet*. 2017 Jan 7;389(10064):56-66. doi: 10.1016/S0140-6736(16)32453-9.

9) Nishida N, Arizumi T, Hagiwara S, Ida H, Sakurai T, Kudo M. MicroRNAs for the Prediction of Early Response to Sorafenib Treatment in Human Hepatocellular Carcinoma. *Liver Cancer*. 2017 Feb;6(2):113-125. doi: 10.1159/000449475. Epub 2016

10) Marrero JA, Kudo M, Venook AP, Ye SL, Bronowicki JP, Chen XP, Dagher L, Furuse J, Geschwind JH, de Guevara LL, Papandreou C, Takayama T, Sanyal AJ, Yoon SK, Nakajima K, Lehr R, Heldner S, Lencioni R. Observational registry of sorafenib use in clinical practice across Child-Pugh subgroups: The GIDEON study. *J Hepatol*. 2016 Dec;65(6):1140-1147. doi: 10.1016/j.jhep.2016.07.020.

11) Abou-Alfa GK, Puig O, Daniele B, Kudo M, Merle P, Park JW, Ross P, Peron JM, Ebert O, Chan S, Poon TP, Colombo M, Okusaka T, Ryou BY, Minguez B, Tanaka T, Ohtomo T,

Ukrainskyj S, Boisserie F, Rutman O, Chen YC, Xu C, Shochat E, Jukofsky L, Reis B, Chen G, Di Lorenzo L, Lee R, Yen CJ. Randomized phase II placebo controlled study of codrituzumab in previously treated patients with advanced hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2016 Aug;65(2):289-95.

doi: 10.1016/j.jhep.2016.04.004.

12) Kudo M, Ikeda M, Takayama T, Numata K, Izumi N, Furuse J, Okusaka T, Kadoya M, Yamashita S, Ito Y, Kokudo N. Safety and efficacy of sorafenib in Japanese patients with hepatocellular carcinoma in clinical practice: a subgroup analysis of GIDEON. *J Gastroenterol*. 2016 Dec;51(12):1150-1160.

13) Cheng AL, Thongprasert S, Lim HY, Sukeepaisarnjaroen W, Yang TS, Wu CC, Chao Y, Chan SL, Kudo M, Ikeda M, Kang YK, Pan H, Numata K, Han G, Balsara B, Zhang Y, Rodriguez AM, Zhang Y, Wang Y, Poon RT. Randomized, open-label phase 2 study comparing frontline dovitinib versus sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2016 Sep;64(3):774-84.

doi:10.1002/hep.28600.

[学会発表] (計 11 件)

1) Nishida N and Kudo M. Clinicopathological characteristics and mutational profile of PD-L1 positive hepatocellular carcinoma. 68th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). Parallel Session 22: Hepatocarcinogenesis. 2017. 10. 20-24 (Washington, D. C)

2) Nishida N. 2nd generation targeted therapy and immune check-point inhibitor for advanced HCC. The 2nd MYONJI International Liver Symposium. 2017. 9. 8 (Seoul, Korea)

3) 西田直生志、工藤正俊. PD-L1 陽性肝癌の臨床病理学的特徴と遺伝子変異プロファイル. 第 103 回日本消化器病学会総会 シンポジウム 8 「肝発癌メカニズムのパラダイムシフトとこれからの展望」. 2017. 4. 20-22 (東京).

4) 西田直生志、岩西美奈、南知宏、千品寛和、河野匡志、有住忠晃、田北雅弘、矢田典久、依田広、萩原智、南康範、上嶋一臣、工藤正俊. Locked Nucleic Acids を用いた血清中マイクロ RNA 定量とソラフェニブ治療に対する反応予測. 第 15 回日本肝がん分子標的治療研究会 (優秀演題). 2017. 1. 14 (東京)

5) Nishida N, Kudo M. Identification of fetal liver-type hepatocellular carcinoma based on a methylome analysis and its

association with genetic alterations. 第 24 回日本消化器関連学会週間 (第 20 回日本肝臓学会大会) International Session, Symposium 1. 「Genetics of hepatocellular carcinoma: Hepatitis virus infection and hepatocarcinogenesis」. 2016.11.3-11.4 (神戸)

6) 西田直生志、工藤正俊. ゲノム・エピゲノム・染色体情報に基づいた肝癌の亜分類と転移再発予測. 第 52 回日本肝臓研究会 パネルディスカッション 2 肝細胞癌の新たなサブクラス分類と治療ストラテジー. 2016.7.1-2 (東京)

7) Nishida.N. Immunotherapy for HCC; hype or hope. The 1st MYONJI International Liver Symposium. 2016.9.2 (Seoul, Korea)

8) Nishida N and Kudo M. Classification of tumors based on the integrated profile of genetic and epigenetic alterations and the biological behavior of human hepatocellular carcinoma. 66th Annual meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD). 2015.11.13-17(San Francisco, CA)

9) Nishida N, Kudo M. Tumor characteristics and genetic and epigenetic profile of human hepatocellular carcinoma. 第 23 回日本消化器関連学会週間 (第 19 回日本肝臓学会大会) International Session, Symposium 1. 「Hepatocellular carcinoma: Molecular approaches for diagnosis, prognosis, and therapy」. 2015.10.8-10 (東京).

10) 西田直生志、工藤正俊. 分子生物学的特徴に基づいた肝癌のマネージメント. 第 51 回肝臓学会総会 シンポジウム 1 「肝発癌研究と臨床への展開」. 2015.5.21-22 (熊本).

11) 西田直生志、工藤正俊. 血清中マイクロ RNA プロファイルとソラフェニブに対する肝細胞癌の反応予測. 第 51 回肝臓学会総会 ワークショップ 1 「肝細胞癌の亜分類と個別化医療」. 2015.5.21-22 (熊本)

〔図書〕 (計 1 件)

1) 西田直生志、工藤正俊. [肝細胞癌の分子解析と悪性度診断] 肝細胞癌の発生とエピゲノム制御(解説/特集). 日本消化器病学会雑誌 113(15-24)775-784, 2016

6. 研究組織

(1) 研究代表者

工藤 正俊 (KUDO, Masatoshi)

近畿大学・医学部・教授

研究者番号： 1 0 2 9 8 9 5 3

(2) 研究分担者

西田 直生志 (NISHIDA, Naoshi)

近畿大学・医学部・准教授

研究者番号： 6 0 2 8 1 7 5 5