

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K07964

研究課題名(和文) プロテインアレイを用いた肝細胞癌に対するレンバチニブの新たなバイオマーカーの解明

研究課題名(英文) Protein Array Reveals New Biomarker for Lenvatinib in Hepatocellular Carcinoma

研究代表者

友成 哲 (TOMONARI, Tetsu)

徳島大学・病院・講師

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)：近年、Multi-Target Agent(MTA)である分子標的治療薬ソラフェニブ、レンバチニブが進行肝臓癌治療のkey drugとして広く用いられているが、ソラフェニブ耐性後のレンバチニブの成績は不明であり、効果を予測するバイオマーカーの開発が求められている。本研究では、研究代表者がこれまでに樹立したソラフェニブ耐性株と親株を用いてプロテインアレイを行い、レンバチニブ関連シグナルのリン酸化を解析することでソラフェニブ耐性後のバイオマーカーとなりうる因子を明らかにし、実臨床での100例の肝臓癌患者の検体を用いてレンバチニブの有効性との関連を解析することを目的とする。

研究成果の学術的意義や社会的意義

複数の遺伝子を標的とするマルチキナーゼインヒビターは現在の進行肝臓癌治療の中心であり、プロテインアレイを用いたリン酸化プロファイルの網羅的解析はその治療効果や、耐性の機序解析に最も適した解析方法である。ソラフェニブ耐性肝臓癌患者におけるレンバチニブ投与時の効果を予測するバイオマーカーが同定されれば、レンバチニブによる肝臓癌治療に個別化医療が導入されることになる。さらに、本研究の成果はソラフェニブやレンバチニブに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、進行肝臓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 recent years, the molecular targeted agents sorafenib and lenvatinib, which are Multi-Target Agents (MTAs), have been widely used as key drugs for the treatment of advanced liver cancer, but the results of lenvatinib after sorafenib resistance are unknown, and the development of biomarkers to predict efficacy is required. In this study, protein arrays were performed using sorafenib-resistant strains and parental strains established by the applicant to analyze phosphorylation of lenvatinib-related signals to identify factors that may serve as biomarkers after sorafenib resistance, and lenvatinib. The purpose of this study is to analyze the relationship between the efficacy of lenvatinib and the efficacy of sorafenib using 100 real-life liver cancer patient samples.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：レンバチニブ ソラフェニブ 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

近年、MTA であ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)。その後、2017 年にソラフェニブ治療による病勢進行後の二次治療としてレゴラフェニブが有意に生存期間の延長を示すことが報告され (Lancet.2017)、2018 年には第三相試験においてレンパ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 (Lancet.2018)。実臨床ではレンパ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パ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い。

研究代表者はこれまでに肝癌細胞株である 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 4.6 倍の高耐性クローン (PLC-R2) を樹立した (図 1) (Oncotarget, 7:7206-7215, 2016)。

さらに、PLC-R2 に対し、レンパチニブを暴露し細胞増殖試験を行ったところ、PLC-R2 はレンパ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 2)。すなわち、ソラフェニブ耐性肝癌はレンパチニブに対して Cross-resistance を有することを見出した。

また、レンパ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、レンパ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 個のレンパ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 3)。

さらに、レンパ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させ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る。

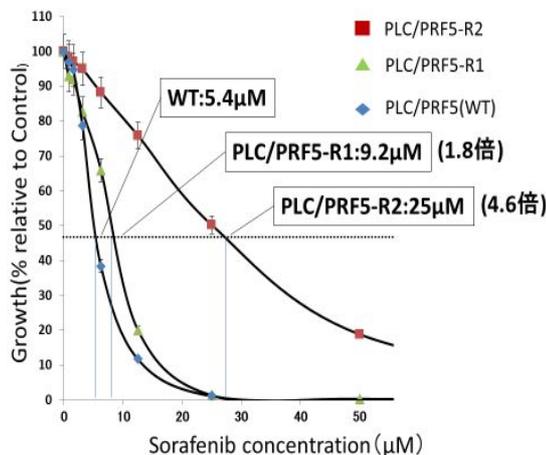


図 1 : ソラフェニブ耐性細胞株と親株に対する IC50

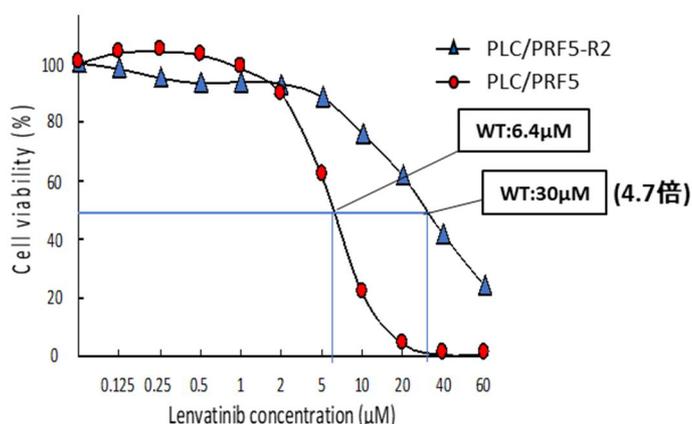


図 2 : ソラフェニブ耐性細胞株と親株に対するレンパチニブの IC50

2. 研究の目的

本研究の目的は、肝癌細胞株を用いたプロテインアレイを行い、レンバチニブ関連シグナルのリン酸化を解析し、治療選択に寄与する新規バイオマーカーを同定することである。これまでにプロテインアレイを用いたリン酸化プロファイルから MTA の耐性機序にアプローチした報告はない。これまでに、研究代表者は *in vitro* でソラフェニブ耐性肝癌はレンバチニブに対しても耐性があることを確認しており、網羅的にリン酸化を解析可能なプロテインアレイを用いて、FGFR 下流のハブ遺伝子である

FRS2 が key molecule であることを見出している。これらの *in vitro* における解析結果を *in vivo* に展開し、実臨床における進行肝癌治療戦略に応用する。複数の遺伝子を標的とするマルチキナーゼインヒビターは現在の進行肝癌治療の中心であり、プロテインアレイを用いたリン酸化プロファイルの網羅的解析はその治療効果や、耐性の機序解析に最も適した解析方法である。ソラフェニブ耐性肝癌患者におけるレンバチニブ投与時の効果を予測するバイオマーカーが同定されれば、レンバチ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る。さらに、本研究の成果はソラフェニブやレンバチニブに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。

3. 研究の方法

本研究ではプロテインアレイの解析結果からソラフェニブ耐性肝癌のバイオマーカーを探索することを目的とし、以下の研究項目を予定している。

- (1) FRS2過剰発現、FRS2ノックダウン肝癌細胞株 (Lenti,Retro virus) を用いたレンバチニブに対する感受性の評価。
- (2) CRISPR-CasシステムによるFRS2ノックアウト肝癌細胞株の樹立。
- (3) xenograft modelを用いた*in vivo*での検討。
- (4) ヒト肝癌症例を対象としたプロテインアレイ解析によるFRS2の評価。

ソラフェニブ耐性肝癌に対するレンバチニブの感受性変化が、FRS2 に基づくものであることを裏付けるために、複数の肝癌細胞株 (PLC/PRF5、HepG2、Hep3B、HLF、HuH-7) を用いて FRS2 過剰発現、FRS2 ノックダウン肝癌細胞株 (Lenti,Retro virus system) を樹立し、それぞれのレンバチニブに対する感受性の評価を解析する。具体的な方法としては siRNA を用いて、FRS2 ノックダウン細胞株及び、Lenti,Retro virus system により FRS2 過剰発現株を樹立し、細胞増殖試験を用いてレンバチニブに対する Cell viability を比較する。遺伝子操作した細胞の *in vivo* での挙動を確認するにはノックアウト細胞株が望ましいため、新たなゲノム編集技術である CRISPR Cas にて肝癌細胞株の FRS2 ノックアウト細胞株を樹立する。ノックアウトする際にレポーター蛋白として蛍光蛋白を発現するようにベクターを構築しノックアウト細胞の selection 及び、*in vivo* imaging の際に利用する。同時に親株肝癌細胞株も樹立し、樹立細胞から Total RNA を抽出し、Real time PCR による遺伝子発現解析によって、ノックアウト効率の確認を行う。FRS2 ノックアウト細胞株を樹立後、*in vivo* での実験の前に *in vitro* でのこれまで得られた結果と同様の結果が得られるかを確認する。

次に *in vivo* での検討のため樹立した FRS2 過剰発現株及び、FRS2 ノックアウト細胞株、と親株それぞれマウスに皮下移植する。短期間であれば Lenti,Retro virus システムを用いた過剰発現株が事実上の安定過剰発現株として扱うことが可能であるため、本研究においては Lenti,Retro virus を用いた過剰発現株を使用する。マウスはヌードマウス (Male Nude Mouse:5-6weeks old, CLEA Japan) を用いる。移植する細胞数はそれぞれ 1×10^7 個で、5-6 週間の飼育を行い、その後レンバチニブをマウス尾静脈から連日投与する。投与開始直後から毎日 *in vivo*

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_P13KR1	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-FRS2_p-PPTN11_GRB2_GAB1_P13KR1_binds_PIK3CA	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR3_p-FRS2_p-PPTN11_GRB2_GAB1_P13KR1_binds_PIK3CA	Signaling_by_FGFR		
CBL_ubiquitinates_FRS2_and_FGFR1	Signaling_by_FGFR		
FRS2-mediated_FGFR1_signaling	Signaling_by_FGFR		
CBL_ubiquitinates_FRS2_and_FGFR3	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-FRS2_binds_to_PPTN11	Signaling_by_FGFR		
Activated_FGFR1_p-SHC1_binds_GRB2_SOS1	Signaling_by_FGFR		
STAT1_binds_to_the_active_receptor	Signaling_by_PDGFR		
SHP2_binds_to_the_active_receptor	Signaling_by_PDGFR		
Grb2-Sos1_complex_binds_to_the_active_receptor	Signaling_by_PDGFR		
p38_MAPK_activation_by_VEGFR	Signaling_by_VEGFR		

図 3 : 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

imaging 観察を行う。in vivo imaging 装置は徳島大学バイオイメージング研究部門所有の小動物用 imaging 機器である、IVIS Spectrum (Caliper Life Science 社) を用いて、それぞれの肝癌株におけるレンバチニブの反応を確認する。

4 . 研究成果

現在、研究成果を臨床応用へ展開するため、これまでに研究代表者が既に十分な informed consent を得て保存した 100 例のヒト肝癌症例の検体と、さらに採取可能であった 100 例の検体を用いてプロテインアレイ解析を行い、FRS2 とレンバチニブの治療効果 (腫瘍縮小率 : RR、無増悪生存期間 : PFS、全生存期間 : OS) との関係を解析し、感受性因子としての関わりを解析予定である。今後さらに臨床検体採取を継続し、十分な臨床データの観察期間が得られた後に生存期間との関連を解析予定である。

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
研究分担者	佐藤 康史 (SATO Yasushi) (80343383)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・特任教授 (16101)	
研究分担者	六車 直樹 (MUGURUMA Naoki) (90325283)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門 研究員 (16101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関