

平成 30 年 6 月 4 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09000

研究課題名(和文) 肝細胞癌化学療法の革新的選択基準開発

研究課題名(英文) Development of revolutionary markers to select drugs for advanced hepatocellular carcinoma

研究代表者

能祖 一裕 (Nouso, Kazuhiro)

岡山大学・医学部・客員研究員

研究者番号：10314668

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では進行肝細胞癌の治療効果予測を、サイトカイン、糖鎖発現、癌で生じている遺伝子変異を血液で捉えるリキッドバイオプシーの観点から試みた。

サイトカインの治療効果予測能は十分ではなかったが、治療前のアンギオポエチン2の発現が生存率に深く関わっていること、1次治療の効果が得られなかった時点での血中濃度が、その後の生存率にも関係していることを見出した。また、診断・予後にかかわる糖鎖の存在や、癌の不死化にかかわる遺伝子変異による予後予測の可能性を明かとし、リキッドバイオプシー診断への方向性を示した。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to elucidate the predictive ability of cytokines, glycans, and circulating tumor DNA for the treatment effect of chemotherapies in patients with advanced hepatocellular carcinoma.

Predictive ability of cytokines were weak; however, serum angiopoietin2 level was closely related to overall survival of the patients. In addition, the level at progressive disease could determine the post progression survival. We also found out that serum levels of some glycans were correlated with the presence of the tumor and with overall survival. In examination of resected tumor, gene mutation related to cancer immortalization was found out to be the marker of short progression free survival and might be useful as the target of circulating tumor DNA.

研究分野：消化器疾患、肝臓癌

キーワード：進行肝細胞癌 分子標的薬 サイトカイン 糖鎖 リキッドバイオプシー

1. 研究開始当初の背景

我々は中四国の基幹病院との共同研究で、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、肝癌を様々な観点より解析してきた (Aliment Pharmacol Ther 2010;31:407-14, Br J Cancer 2008;98:1161-5, Am J Gastroenterol 2006;101:2038-43 etc.)。これらの結果を俯瞰すると、現在肝癌治療の最も重要な課題は、進行肝細胞癌治療に対する化学療法をいかに効率的に行うかという事である。多くの肝癌は肝硬変を合併しているため、初回化学療法により肝障害が進展し、2次治療に移行できない場合が多い。従って、どの治療法が最も適切であるかを事前に予測、あるいは薬剤変更のタイミングを早期に判定する方法論を確立することが、予後延長のためには極めて重要である。

肺癌では、EGFR、ALK 変異等で、ゲフィニチブやクリゾチニブの有効性を事前に行うことができる。しかし肝細胞癌については、FGF3/4 の遺伝子増幅がソラフェニブ治療効果と相関する事が荒尾らにより報告されているが (Hepatology 2013;57:1407-15)、いまだ確立された治療選択の基準がないというのが現状であった。

我々は、化学療法前後で採取した数百症例の血清を用い、肝癌の分子標的薬であるソラフェニブの治療効果が、血清中の血管新生サイトカイン量に依存し、動注療法との使い分けの指標として応用できる可能性がある事 (Br J Cancer 2013;109:2072-8, J Gastroenterol Hepatol 2011;26:1604-11)、

特定の糖鎖発現が、ソラフェニブ治療症例の予後にかかわる事 (Hepatology 2014;59:355-6)、発癌・再発予測のファクターとして、フコシル化ヘモペキシンや数種の SNPs が応用できる可能性のある事など (J Gastroenterol Hepatol 2013, Hepatol Res 2012;42:1187-95) 治療効果予測によるテーラーメイド医療の足がかりとなる研究を、世界に先駆けて行ってきた。

また膵癌の RAS 変異や、胃がんの HER2 の腫瘍における遺伝子増幅を、デジタル PCR を用い血液中で検出するリキッドバイオプシーの系を確立するなど (Cancer 2015;121:2271-80, Br J Cancer 2015;112:1652-5) 肝癌症例に応用可能なトランスレーショナルリサーチを継続していた。

2. 研究の目的

本研究の目的は、我々が今まで進めてきたサイトカインマーカー、糖鎖マーカー、liquid biopsy などの研究をさらに発展させ、進行肝細胞癌に対する様々な化学療法の治療効果予測や中止変更の基準となる、診断方法を構築し、臨床に還元する事である。

3. 研究の方法

(1) 次世代統合サイトカインマーカーによる予測

我々は Angiopoietin 2、VEGF 等の複数のサイトカインの同時測定が、化学療法の治療効果予測に有用であることを報告してきた。本研究では、因子の追加や重み付けを行い、より精度の高い実践的な index を構築し、その有用性を検証する。その際、化学療法の事前効果予測の前向き多施設共同研究として集積した血清を用い、施設間での普遍性も検証する。

(2) 新規糖鎖マーカーによる予測

我々は、糖鎖 (G2890) が肝細胞癌のソラフェニブ治療の予後予測因子となる事や、3種の糖鎖が膵癌のゲムシタピンによる治療後の予後予測となる事 (Pancreas 2015;44:551-6.) を明らかとしている。本研究では、他の様々な肝細胞癌化学療法薬について同様の検討を行い、糖鎖による治療選択基準の確立をはかる。

(3) 血清中癌特異的遺伝子変化 (リキッドバイオプシー) による予測

胃癌や膵癌の組織中の RAS 変異や HER2 遺伝子増幅を、デジタル PCR や次世代シーケンサーを用いて、血清サンプルから検出する系を、我々は確立している。本研究ではこの技術を肝細胞癌に応用し、ソラフェニブの治療効果に関与するとされている FGF3/4 の遺伝子増幅等、分子標的薬の治療効果に係わる様々な遺伝子変異の、血清中での検出を試みる。

また、癌の不死化の要となるテロメラーゼ蛋白 (hTERT) の発現が、プロモーター領域の変異で制御されていることが報告されているが (Nat Commun 2013;4:2218)、本研究では、前述の方法論を用い、血清でこの変異を捉える系を確立し、癌の存在を検出する新規の検査法として、早期治療効果判定や再発の検出に応用する。

(4) 血液中循環癌細胞 (CTC) による治療効果予測

我々は、hTERT が発現している細胞 (癌細胞) で GFP が発現するアデノウイルス (テロメスキャン: Fujiwara et al. J Clin Invest 2009;119:3172-81) を用いて、血液中に循環している癌細胞 (CTC) を検出してきた。本研究では、得られた CTC を用い、薬剤耐性への関与が報告されている ERCC1 や EpCAM 等の発現変化を検出し、治療選択基準への応用の可能性を検討する。

(5) データマイニングを用いた効果予測 index の構築

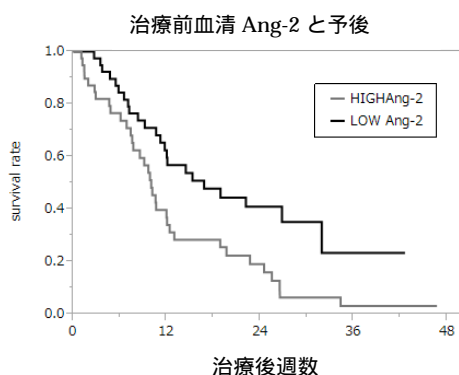
上記の多角的基礎研究で得られたデータを、患者情報や治療、臨床経過を統合したり

レーショナルデータベースに組み込み、化学療法効果予測、副作用予測、中止基準となる、新たな index を確立する。経過中変化するパラメーターを加味した検討を、一般的な線形モデルによる解析に加えて行い、精度を向上させる。また別に、マーケティングの分野で汎用されているデータマイニングを用いて、指標とするファクターを絞り込み、確率を数値化する事により、簡便かつ患者にもわかりやすい index の構築も行う

4. 研究成果

(1) 血清サイトカインによる予測

サイトカインについては、後ろ向き研究でソラフェニブ治療効果との関係が示されていた、8種類の治療前血清サイトカインを中心に、様々な血清サイトカインについて前向きに採取した血清を用い解析した。既報のサイトカインは、ある程度治療効果により発現が異なっているが、予測するには至らないことが判明した。しかし、経時的に採取した血清での発現解析の結果、angiopoietin-2(Ang-2)がソラフェニブ治療に有用である事、また経時変化によって、早期の効果判定が可能となることを見出し、多くの国内外の学会で報告した(下図)。



また、ソラフェニブによる治療効果が悪化(PD)と診断された時点の angiopoietin2 を測定することにより、その後の生命予後が予測できることも明らかとし、現在論文を投稿中である。また、angiopoietin2 はソラフェニブの2次治療の選択基準となりうると思われるため、その有用性について現在検討を進めている。

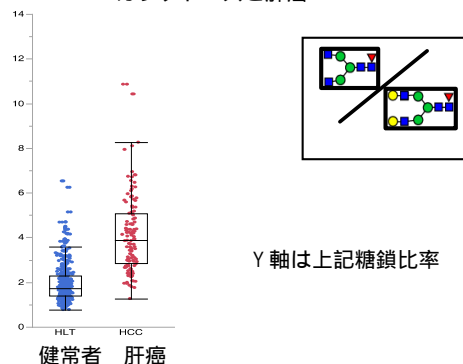
(2) 血清糖鎖による予後予測

前述のサイトカインと同様のサンプルで血清中の糖鎖とソラフェニブ治療効果との関連を検討した。以前報告した m/z2890 を含む数種類の多分岐糖鎖の発現が生命予後に関与する事は確認できたが、ソラフェニブの治療効果予測因子としては、不十分であると考えられた。

糖鎖は免疫グロブリンにも結合している

ため、免疫チェックポイント阻害剤を含めたソラフェニブ以外の新規薬剤の感受性予測への可能性があり、現在検討を進めている。特にガラクトースを含まない免疫グロブリン結合糖鎖が、多くの消化器癌で増加していることが明らかとなったので、汎腫瘍マーカーとしての可能性も今後検討課題となると考えられた(下図)。本検討結果については現在論文作成中である。

ガラクトースと肝癌

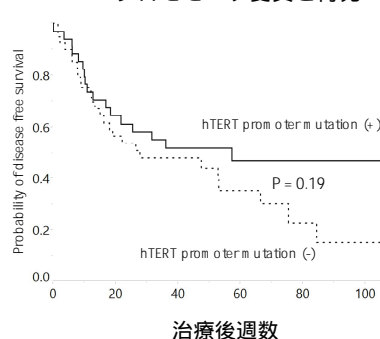


また、癌特異的に上昇が認められる糖鎖(m/z2890)が結合している蛋白について解析を進めてきたが、1 acid glycoprotein が最有力候補として挙げられた。数多くの血清サンプルで検討し、その臨床応用の可能性を明かすため、現在ハイスループットな検出系の確立を目指し研究を進めている。前述のガラクトースの変化は、技術的に簡便に検討することが困難であるが、単一の変化を捉える本測定系の確立は実現の可能性が高いと考えられる。この測定系が確立できれば肝癌のみならず、様々な消化器癌のマーカーとなりうる可能性がある。

(3) 血清中癌特異的遺伝子変化(リキッドバイオプシー)による予測

癌特異的遺伝子変化として、hTERT プロモーター変異の組織での解析を、根治的手術を施行した症例で行い、癌組織でプロモーター変異が検出された症例では、手術後の再発が多い事を見出した(下図、論文投稿中)。

hTERT プロモーター変異と再発



このプロモーター変異のリキッドバイオプシーへの応用を長らく試みてきたが、遺伝

子配列がGCリッチであり、困難を極めた。研究最終年度後半に、ようやく検出系の糸口がつかむことができ、現在研究を進めている。

(4) その他

CTCについては、肝癌では数が少なく、確証は得られていない。テロメスキャンにて陽性となる細胞は血中に検出できるものの、その同定には至っていない。また、データマイニングについても、前述の予後予測因子の診断能が十分とは言えなかったため、施行には至らなかった。

(5) 今後の展望

本研究課題を通じ、サイトカイン・糖鎖・リキッドバイオプシーについて様々な知見が得られた。この1年で、レゴラフェニブ、レンパチニブといった、ソラフェニブ以外の分子標的薬が使用可能となり、さらに近い将来、ニボルマブを含めた様々な薬剤が肝癌治療に応用可能となる予定である。選択肢が増えたことで、事前に効果の薄い治療を避け、治療効果の高い薬剤を選択することが、よりいっそう重要になる。現在、薬剤の開発段階より、予後を予測するコンパニオン診断薬を見出す試みがなされるようになっており、特にサイトカインについては数多く検討されてきたが、今だ確定的なものはない。

本研究はサイトカインに加え、糖鎖やリキッドバイオプシーといった新たな因子を加え総合的に解析する研究であり、この結果を元にして今後さらにマーカーの開発を進めることにより、実臨床への還元が図れると考えられる。

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)

[学会発表](計7件)

Dohi C, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. Changes of Immunoglobulin-bound Glycans in Patients with Gastro-Intestinal Cancers. Digestive Disease Week, 2016年5月21日~24日 サンディエゴ(USA).

Ako S, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. Characteristics of HCC patients with hTERT promoter mutation. Digestive Disease Week, 2016年5月21日~24日 サンディエゴ(USA).

Dohi C, Nouso K, Nakamura S, Shiraha H, et al. Changes of Immunoglobulin-bound Glycans in Patients with Hepatocellular Carcinoma. JSH single topic

conference. 2016年9月29日~30日. 金沢日航ホテル(石川県金沢市)

Adachi S, Nouso K, Okada H. Follistatin is a useful biomarker predicting the effect of sorafenib for the treatment of hepatocellular carcinoma with extrahepatic spread. APDW 2017年9月23-26日、香港(中国)

足立卓哉、能祖一裕、中村進一郎、白羽英則他、進行肝細胞癌に対するソラフェニブ治療における鉄マーカーとの関係性、日本肝癌分子標的治療研究会 2017年1月14日、イイノホール(東京都千代田区)

足立卓哉 能祖一裕 岡田裕之 進行肝細胞癌(HCC)に対するソラフェニブ治療の予後予測マーカーとしてのFollistatinの有用性 JDDW 2017年10月12-14日 福岡国際センター(福岡県福岡市)

足立卓哉、能祖一裕、中村進一郎、白羽英則他、進行肝細胞癌におけるソラフェニブ治療の長期生存症例と短期終了症例のそれぞれの特徴、日本肝癌分子標的治療研究会 2018年1月13日、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

能祖一裕(NOUSO, Kazuhiro)
岡山大学・医学部・客員研究員
研究者番号: 10314668

(2) 研究分担者

中村進一郎(NAKAMURA, Shinichiro)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号: 70514230

白羽英則(SHIRAHA, Hidenori)
岡山大学・大学病院・講師
研究者番号: 40379748