

令和 2 年 6 月 19 日現在

機関番号：15401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15948

研究課題名(和文) circulating tumor DNAを用いた肝癌の治療耐性獲得機序の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of therapeutic resistance in liver cancer using circulating tumor DNA

研究代表者

大野 敦司 (ONO, ATSUSHI)

広島大学・医系科学研究科(医)・助教

研究者番号：80774645

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)：レンパチニブによる治療を行った進行肝癌症例の治療前および治療中の血中循環腫瘍DNAとサイトカインを解析した。有害事象による相対用量強度の低下がレンパチニブ治療における課題の一つであるが、本研究では治療開始前の血中サイトカイン濃度があるパターンを示す症例では、相対用量強度が低下し、それに伴い無増悪生存期間や全生存期間が短くなることを明らかにした。治療開始前および治療中の血中循環腫瘍DNAの変異プロファイルの変化については現在解析を継続している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

相対用量強度(あらかじめ決められた抗癌剤の標準投与量と比べて実際の投与量の抗癌剤治療強度を評価する指標)を高く保つことは癌に対する薬物治療の効果を高めるのに重要である。相対用量強度の低下の多くは副作用により治療の中断を余儀なくされることが原因である。本研究で同定された血中サイトカインのパターンにより治療開始前に相対用量強度が低下しやすい症例を予想することができれば、早期に予定休薬日を設ける等の内服スケジュールの調整を行うことにより、長期の休薬期間を回避し、相対用量強度を高く保つことができる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Circulating tumor DNA and serum cytokines in the advanced liver cancer patients before and during the treatment with lenvatinib have been analyzed. Decreasing relative dose intensity due to side effects is one of the biggest challenges of lenvatinib treatment. In the current study, we identified the pattern of the serum levels of 9 cytokines before the start of treatment which is associated with low relative dose intensity leading to the short progression-free survival and overall survival. Changes of ctDNA profile and mutant allele frequency during the treatment is still under analysis.

研究分野：肝癌

キーワード：肝癌 レンパチニブ サイトカイン

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

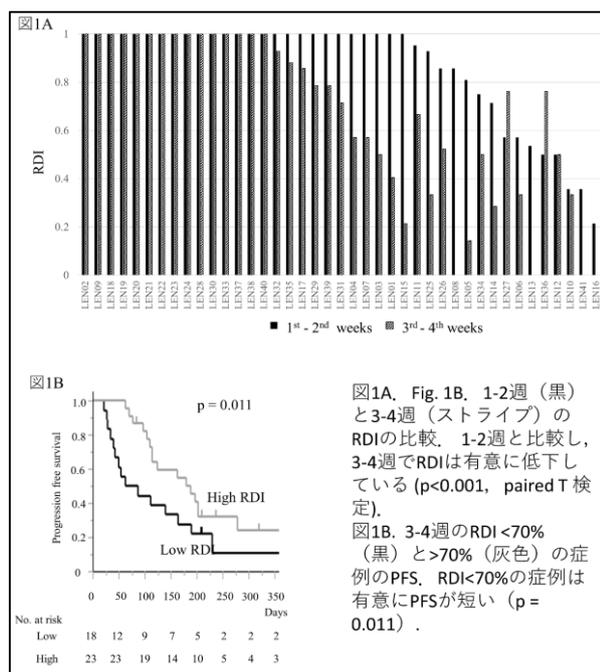
肝細胞癌 (以下肝癌) は、全世界で男性の癌関連死の原因の第2位、女性の癌関連死の第6位であり、保健上の大きな問題となっている。本邦においても、肝癌死亡者数は年間3万人を超えており、早急な対策を要するがん腫の一つである。肝癌の多くは、手術やラジオ波などの局所治療による根治が期待できない進行した状態で発見される。進行肝癌には現在、肝動注化学療法 (HAIC) またはソラフェニブが中心的治療として位置づけられている。高度な脈管浸潤が初発時からみられる肝予備能の良好な症例に対しては肝動注化学療法を優先し、肝動脈科学塞栓術 (TACE) を繰り返した末に不応となり、制御不良となった症例ではソラフェニブを優先させるという使い分けが推奨されている (肝臓学会編集 肝癌診療マニュアル第3版) が、いずれの治療法においても、個々の症例でみると無増悪期間、生存率が著明に延長する症例を認めるものの、全体的には無増悪期間、生存率ともに劇的に改善させるには至っていない。また、HAIC には、カテーテルの埋め込みという侵襲を伴い、繰り返しの入院が必要となるデメリットがあり、一方のソラフェニブは薬価が高額な事、副作用が強いというデメリットがある。これらの理由から、治療開始前に有効な治療法を予測でき、経過中に出現した耐性を早期に発見できる非侵襲的なバイオマーカーの開発が望まれている。近年、非侵襲的なコンパニオン診断のバイオマーカーとして血中循環腫瘍 DNA (circulating tumor DNA ; ctDNA) が注目されており、肺癌、乳癌、大腸癌、卵巣癌等の多くの固形癌において、血中 ctDNA は分子標的薬や化学療法に対する耐性のマーカーとして有効である可能性が示されている。Russo らは、TRK 阻害剤であるエントレチニブによる治療で、当初は奏功を認め縮小を認めたものの、経過中に耐性を獲得し、増悪を認めた大腸癌症例の ctDNA の経過中の変化を調べることで、NTRK1 上の 2 か所の変異、p.G595R 及び p.G667C がエントレチニブの耐性獲得に寄与する事を明らかにした (Russo et al. CANCER DISCOVERY 2015)。ctDNA の治療経過中のプロファイリングの変化を調べる事は、がん種を問わず、有効な手法であると思われる。申請者らはこれまでに肝がんで肝切除術を受けた症例の血中 ctDNA の研究に取り組み、術前の ctDNA が陽性であった症例では、術後早期の再発や遠隔転移が高率に起こり、ctDNA は顕微鏡的脈管侵襲の予測因子として有用である事、ctDNA 量は病勢を反映して推移する事を明らかにした。また、原発巣切除後に再発した症例において、ctDNA のエクソーム解析と、その2年前に切除した原発巣のがん組織のエクソーム解析とを比較し、原発巣のがん組織で認めた体細胞変異の 83% を cell-free DNA のエクソーム解析で検出する事に成功した (図1, Ono et al. Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology 2015)。

2. 研究の目的

本研究では、肝動注化学療法 (HAIC)、または分子標的療法中の肝がん症例の ctDNA を次世代シーケンサーで解析することにより、未知の薬剤耐性変異の解明を目指す。薬剤耐性変異の解明は、新規治療標的開発への応用が期待される。また、これらの変異を血中でモニタリングすることで、個々の症例の、その時点での最適の治療法を選択するオーダーメイド医療が可能となると考える。

3. 研究の方法

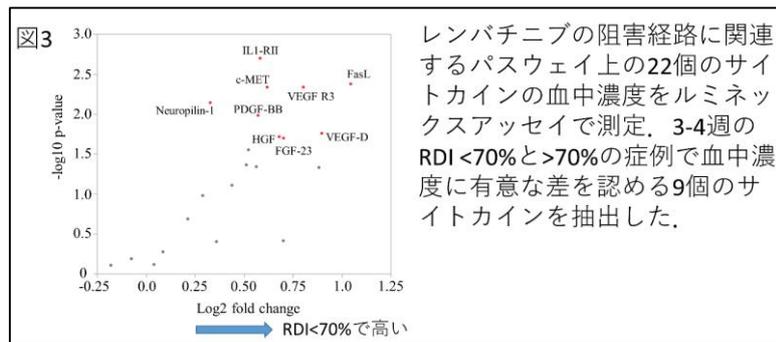
本研究課題採択後、進行肝癌に対する一次治療として約 10 年ぶりにレンバチニブが認可されたことを踏まえ、本研究ではレンバチニブにフォーカスして研究を進めることとした。また、申請者らの施設でのレンバチニブの使用経験上、レンバチニブは治療早期に相対用量強度 (RDI) が低下する症例が少なからず存在し、RDI 低下による奏効率の低下と、腫瘍そのものの biological な治療抵抗性からの非奏功とは区別する必要があると考えた (図1)。また、RDI の低下に関連する因子を解析するにあたり、腫瘍の遺伝子変異のみでは不十分と考えた。そこで、本研究では、ctDNA の解析に加え、血中サイトカインの解析も行うこととした。【症例】2018 年 4 月~11 月に広島大学医学部附属病院でレンバチニブ治療を開始した進行肝癌患者 41 名 (化学塞栓療法 (TACE) または肝動脈注入化学療法 (HAIC) の経カテーテル治療の既往歴のある症例 32 名、ソラフェニブ治療歴のある症例



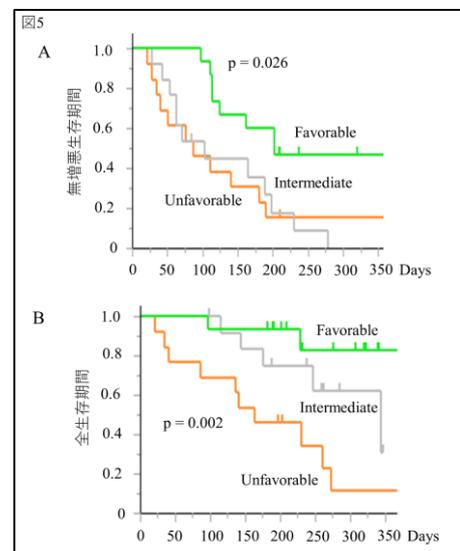
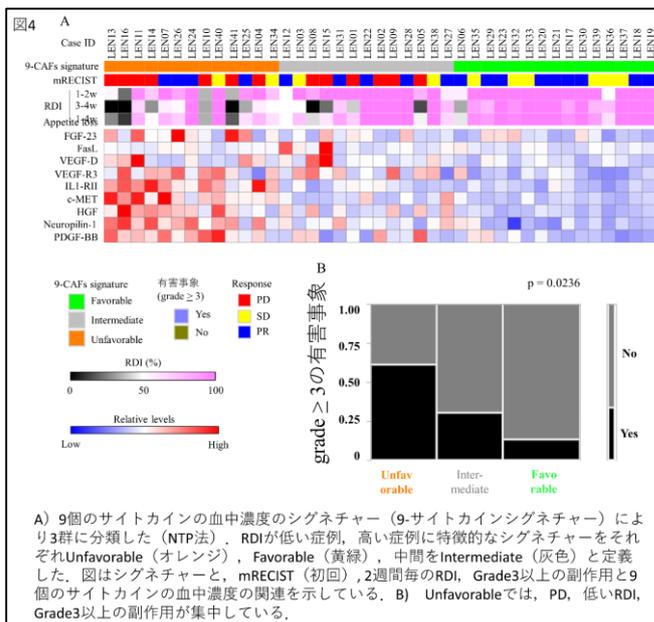
18例, レゴラフェニブ治療歴のある患者10例(一部重複あり)を含む.)を本研究の対象として後ろ向きに解析を行った. 追跡終了は2019年1月であり, 追跡期間中央値は6.9カ月であった. 【治療レジメン】体重60kg以上の症例で12mg, 60kg未満の症例で8mgのレンバチニブを1日1回の経口投与で行った. 治療は, 症例が亡くなるか, 以下のクライテリアを満たす場合に中止した: 原疾患の進行(PD), 治療の継続が困難な有害事象の出現, ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) performance statusの4以上への増悪, 肝機能の増悪, または本人に中止の希望がある場合. PD判定となった31例では, 7例でレンバチニブ以外の全身抗癌治療, 6例で局所治療を行い, その他はベスト・サポータティブ・ケアを行った. 【評価項目】治療開始前の血算, 生化学所見, 腫瘍マーカーの評価を行った. 肝機能の評価には, Albumin-Bilirubin (ALBI) scoreを使用した(≤ -2.60 = grade 1, greater than -2.60 to ≤ -1.39 = grade 2, greater than -1.39 = grade 3). 治療効果判定にはmRECIST (modified Response Evaluation Criteria in Solid Tumors)を用い, 治療開始1ヶ月後と以後1ヶ月毎の評価を行った. 腫瘍評価項目として無増悪生存期間(PFS), 副次評価項目として全生存期間(OS)の評価を行った. 治療開始前の血中サイトカインの測定にはHuman Luminex® Assay kit (R&D systems, Minneapolis, MN, USA)を用いて行った. 測定するサイトカインの項目は, レンバチニブの治療標的である, vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), fibroblast growth factor receptor (FGFR), platelet-derived growth factor (PDGF), the type III transmembrane receptor tyrosine kinase KIT, rearranged during transfection (RET), protein kinase B (AKT), and mitogen-activated protein kinase (MAPK)と関連するパスウェイ上のサイトカインを, BIOCARTA, REACTOME, or KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)のデータベースをもとに22個選択した. 治療開始前および治療経過中のctDNAについては, 次世代シーケンサー(NGS)でのシーケンス用のライブラリー作製を行い, シーケンスを行った.

4. 研究成果

3-4週のRDI<70%と>70%の症例における治療開始前の血中サイトカイン濃度の比較を行った結果, 両群間で有意な差を認める9個のサイトカインを同定した(図3). この9個のサイトカインにより, NTP (nearest template prediction)法(Hoshida



Y. PLoS One. 2010)を用いて, RDIが高い症例に特徴的なシグネチャーを持つFavorable, 低い症例に特徴的なシグネチャーを持つUnfavorable, およびその中間のIntermediateの3群に分類した. Unfavorableシグネチャーの群にGrade3以上の有害事象および1ヶ月後(初回評価時)のmRECIST PDの症例が集中していた(図4). また, 本シグネチャーは, 無増悪生存期間ならびに全生存期間の層別化にも有用であることが示された(図5).



相対用量強度を高く保つことは癌に対する薬物治療の効果を高めるのに重要である。相対用量強度の低下の多くは有害事象により治療の中断を余儀なくされることが原因である。本研究で同定された血中サイトカインのパターンにより治療開始前に相対用量強度が低下しやすい症例を予想することができれば、早期に予定休薬日を設ける等の内服スケジュールの調整を行うことにより、長期の休薬期間を回避し、相対用量強度を高く保つことができる可能性がある。治療開始前および治療中の血中循環腫瘍 DNA の変異プロファイルの変化については現在解析を継続している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Atsushi Ono, Hiroshi Aikata, Masami Yamauchi, et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Circulating cytokines and angiogenic factors based signature associated with the relative dose intensity during treatment in patients with advanced hepatocellular carcinoma receiving lenvatinib	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Therapeutic Advances in Medical Oncology	6. 最初と最後の頁 online
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.1177/1758835920922051	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 大野 敦司
2. 発表標題 進行肝臓におけるレンバチニブ治療のバイオマーカーの探索
3. 学会等名 第56回 日本臨床分子医学会学術集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Atsushi Ono, Hiroshi Aikata, Masami Yamauchi, et al.
2. 発表標題 EXPLORATORY ANALYSIS OF BIOMARKERS ASSOCIATED WITH CLINICAL OUTCOMES OF LENVATINIB IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA
3. 学会等名 The Liver Meeting 2019（国際学会）
4. 発表年 2019年

〔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
---------------------------	-----------------------	----