

令和 5 年 5 月 16 日現在

機関番号：12501

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17041

研究課題名（和文）FGF19・FGFR4シグナル阻害による肝癌分子標的薬の新規治療戦略

研究課題名（英文）New molecular target therapeutic strategies for hepatocellular carcinoma by inhibition of FGF19/FGFR4 signaling

研究代表者

神崎 洋彰（Hiroaki, Kanzaki）

千葉大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：10835086

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）：レンバチニブは、ソラフェニブと比較して、肝癌細胞株におけるFGF19-FGFR4シグナルを強く抑制した。ソラフェニブ投与患者における投与前血清FGF19高値群は、低値群に比較して有意に予後が短かった。ソラフェニブ耐性細胞株ではFGF19分泌能が上昇し、FGF19-FGFR4シグナルも増強していた。ソラフェニブ投与後の血清FGF19は治療前と比較して上昇していた。レンバチニブ耐性細胞株ではVEGF分泌能および血管新生能が上昇していたが、カボザンチニブにより増強した血管新生は抑制された。さらにはレンバチニブ投与後の血清VEGFは治療前と比較して上昇しており、VEGF-A遺伝子発現も上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

FGF19-FGFR4シグナルの強力な阻害は、マルチチロシンキナーゼ阻害薬による抗腫瘍効果に重要である。また血清FGF19濃度は、ソラフェニブ投与患者における治療効果予測、生存予測のマーカーとして機能する可能性がある。ソラフェニブ耐性獲得後はFGF19-FGFR4シグナル阻害が耐性克服に重要で、レンバチニブ耐性獲得後はより強力なVEGFシグナル阻害が耐性克服に重要である可能性がある。これらにより、進行肝細胞癌患者に対するマルチチロシンキナーゼ阻害薬の使用順序に根拠をもたらす可能性がある。

研究成果の概要（英文）：Lenvatinib strongly suppressed FGF19-FGFR4 signaling in hepatoma cell lines compared to sorafenib. Patients with high serum FGF19 levels before treatment in sorafenib-treated patients had a significantly shorter prognosis than those with low serum FGF19 levels. FGF19 secretory capacity was increased and FGF19-FGFR4 signaling was also enhanced in sorafenib-resistant cell lines. Serum FGF19 levels were elevated after sorafenib treatment compared to before treatment. VEGF secretory capacity and angiogenic potential were increased in lenvatinib-resistant cell lines, but the angiogenesis suppressed by cabozantinib. Furthermore, serum VEGF levels were elevated after lenvatinib treatment compared to before treatment, and VEGF-A gene expressions were also elevated.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 マルチチロシンキナーゼ阻害薬 FGF19-FGFR4シグナル 薬剤耐性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

全世界での原発性肝癌の年間患者発生数は約 75 万人であり、全癌腫中第 6 位である。また年間死亡者数は約 70 万人であり、全癌腫中第 3 位である。日本や中国を含むアジアとアフリカで発症頻度が高く、最近では欧米でも増加しており、対策が急がれている。原発性肝癌には、肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma: HCC)と胆管細胞癌が含まれるが、約 85% 程度を HCC が占める。HCC は、B 型肝炎や C 型肝炎などのウイルス性疾患、原発性胆汁性胆管炎や原発性硬化性胆管炎、自己免疫性肝炎などの自己免疫性疾患、非アルコール性脂肪肝炎などの代謝性疾患、アルコール性肝障害や薬物性肝障害などの中毒性疾患と、多岐に渡る疾患群を病因とする。本邦のガイドラインでは根治切除の対象とならない進行 HCC に対して、肝動脈化学塞栓術、肝動注化学療法のほか、全身化学療法が推奨されている。全身化学療法は主に分子標的薬が使用されており、2009 年にソラフェニブが初めて承認された。ソラフェニブは、プラセボと比較する二重盲検無作為化比較試験(SHARP trial: Sorafenib Hepatocellular carcinoma Assessment Randomized Protocol)において、無増悪期間中央値 5.5 ヶ月(プラセボ群 2.8 ヶ月)また生存期間中央値 10.7 ヶ月(プラセボ群 7.9 ヶ月)と有意な延長を認めた。しかしソラフェニブの効果が認められない症例やソラフェニブの効果が認められたとしても十分な生命予後が認められない症例が多く存在した。そのため、複数の化合物の開発が行われ、2017 年に、2 次治療としてのレゴラフェニブ、1 次治療としてのレンバチニブ、2019 年に、2 次治療としてのラムシルマブが承認された。現在 4 剤の分子標的薬が臨床応用されている。このように進行 HCC に対する分子標的薬の選択肢が増えるなかで、腫瘍と薬剤、それぞれの分子生物学的特性に基づいた適切な薬剤選択が求められる。Fibroblast growth factor 19(FGF19)・FGF Receptor4(FGFR4)シグナルは HCC の増殖や脱分化、抗アポトーシスに密接に関与すると同時に、分子標的薬の重要な標的経路の一つである。そこで申請者は、HCC における FGF19・FGFR4 シグナルの重要性、分子標的薬の治療効果や耐性変化との関係性を解析することで、新たな治療戦略が提示できるとともに、血清 FGF19 の HCC における腫瘍マーカーとしての有用性を見出していることから、血清 FGF19 を用いた進行 HCC 患者への適切な薬剤の選択方法を提案できるものと考えた。

2. 研究の目的

本研究では HCC における FGF19・FGFR4 シグナルの解析を、分子標的薬との関連を含めて行い、FGF19・FGFR4 シグナルを中心に腫瘍と薬剤、それぞれを分類することで、それらを踏まえた分子標的薬の新規治療戦略と選択方法の提案を目指すことを目的とした。

3. 研究の方法

複数の肝癌細胞株(Huh7 及び JHH7)を用いて、マルチチロシンキナーゼ阻害薬(ソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ)処理を行い、FGFR4/ERK シグナル阻害の影響を *in vivo*、*in vitro* により分析した。92 例の肝癌切除検体を用いて FGF19 および FGFR4 の免疫組織染色を行い、臨床病理学的解析を行った。ソラフェニブを投与された 173 例、レンバチニブを投与された 40 例の患者血清を用い、血清 FGF19 濃度を ELISA 法により測定し、無増悪生存期間(PFS)、全生存期間(OS)を含めて、臨床学的背景因子との関係を分析した。

複数の肝癌細胞株(Huh7 及び JHH7)を用いて、マルチチロシンキナーゼ阻害薬(ソラフェニブ、レンバチニブ)を 3 ヶ月以上かけて投与することにより、耐性細胞株を樹立した。その後、それぞれの耐性細胞株における FGF19 分泌能や FGFR4/ERK シグナルへの影響を分析した。またソラフェニブ耐性細胞株における FGFR4 阻害剤の効果を検証した。ソラフェニブを投与され、その後病勢増悪が確認された 51 例の患者、およびレンバチニブを投与され、その後病勢増悪が確認された 20 例の患者の治療前後の血清を用い、血清 FGF19 濃度の変化を ELISA 法により測定した。

レンバチニブ耐性細胞株に関しては、FGF19・FGFR4 シグナルと同様に肝細胞癌の重要な治療標的である VEGF シグナルに着目し、VEGF 分泌能や、Wound-healing assay、血管内皮細胞株 HUVEC を用いた Tube formation assay を行い、VEGF シグナルへの影響を分析した。また Wound-healing assay と Tube formation assay に関しては、マルチチロシンキナーゼ阻害薬カボザンチニブの効果を検証した。レンバチニブを投与され、その後病勢増悪が確認された 20 例の患者の治療前後の血清を用い、血清 VEGF 濃度の変化を ELISA 法により測定した。

進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ投与前および病勢増悪後の VEGF-A 遺伝子発現を比較した。

4. 研究成果

レンバチニブでは、ソラフェニブおよびレゴラフェニブと比較して、FGFR4/ERK シグナルが強く抑制された。FGFR4 阻害剤とソラフェニブまたはレゴラフェニブを併用すると、FGFR4/ERK シグナルが単剤に比較して、より抑制され、肝癌細胞増殖も相乗的に抑制された。切除検体を用いた検討では、FGF19 および FGFR4 の発現がそれぞれ 50 例(54.3%)、36 例(39.1%)で認められ、かつ FGF19 と FGFR4 の発現は高い一致率を示した($r=0.601$ $p<0.001$)。ソラフェニブ投与患者にお

ける投与前血清 FGF19 濃度高値群は、低値群に比較して有意に無増悪生存期間(FGF19^{high} median 86 days FGF19^{low} median 139 days p=0.003)、全生存期間(FGF19^{high} median 353 days FGF19^{low} median 494 days p=0.039)が短かったが、レンバチニブ投与患者においては、無増悪生存期間(FGF19^{high} median 195 days FGF19^{low} median 190 days p=0.487)、全生存期間(FGF19^{high} median 733 days FGF19^{low} median 464 days p=0.275)に同様の傾向は認められなかった。

ソラフェニブおよびレンバチニブの耐性細胞株における FGF19 分泌能を測定すると、コントロールと比較して、ソラフェニブ耐性細胞株では FGF19 の分泌能が上昇し、一方でレンバチニブ耐性細胞株では FGF19 分泌能が低下していた。耐性細胞株において、FGF19・FGFR4 シグナルの下流の分子である pFRS2 や pERK はソラフェニブ耐性細胞株では増強していた。ソラフェニブ耐性細胞株に対し、FGFR4 阻害薬と併用することで、増強していた pFRS2 や pERK は抑制された。進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブ投与後の血清 FGF19 濃度を測定すると治療前と比較して血清 FGF19 濃度は上昇していたが、レンバチニブ投与後の血清 FGF19 濃度を測定すると治療前と比較して血清 FGF19 濃度に変化は認められなかった。

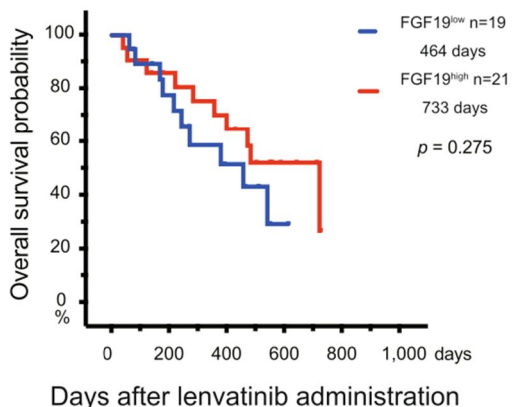
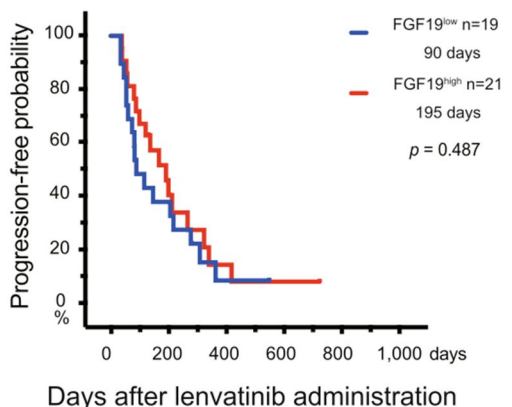
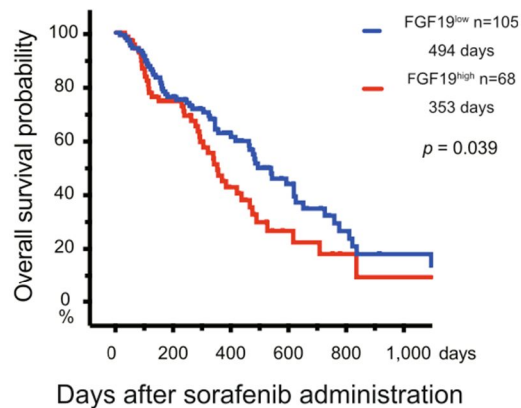
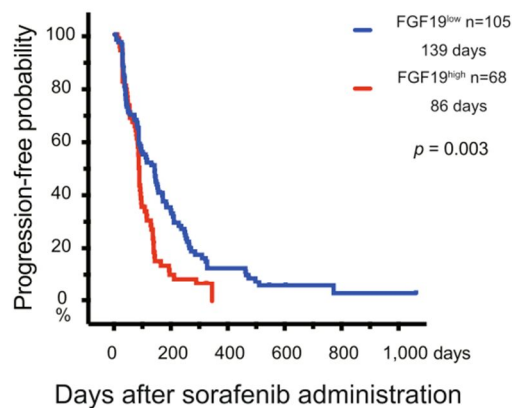
レンバチニブ耐性細胞株における VEGF 分泌能を測定すると、コントロールと比較して、レンバチニブ耐性細胞株では VEGF の分泌能が上昇していた。Wound-healing assay を行うと、コントロールと比較して、レンバチニブ耐性細胞株では 24 時間後、48 時間後の wound closure は上昇していたが、カボザンチニブを使用すると、上昇していた wound closure は低下した。また血管内皮細胞株 HUVEC を用いた Tube formation assay を行うと、コントロールと比較して、レンバチニブ耐性細胞株では junction 数、segment 数、および総長は上昇していたが、カボザンチニブを使用すると、上昇していた junction 数、segment 数、および総長は低下した。進行肝細胞癌患者におけるレンバチニブ投与後(n=20)の血清 VEGF 濃度を測定すると治療前と比較して血清 VEGF 濃度は上昇していた。

進行肝細胞癌患者におけるソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ投与前および病勢増悪後の VEGF-A 遺伝子発現を比較するとレンバチニブ投与例において VEGF-A 遺伝子発現が投与前から病勢増悪後にかけて上昇していた。

FGF19・FGFR4 シグナルの強力な阻害は、マルチチロシンキナーゼ阻害薬による抗腫瘍効果に重要である。

また血清 FGF19 濃度は、ソラフェニブ投与患者における治療効果予測、生存予測のマーカーとして機能する可能性がある。

ソラフェニブ耐性獲得後は FGF19・FGFR4 シグナル阻害が耐性克服に重要で、レンバチニブ耐性獲得後はより強力な VEGF シグナル阻害が耐性克服に重要である可能性がある。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kanzaki H, Chiba T, Ao J, Koroki K, Kanayama K, Maruta S, Maeda T, Kusakabe Y, Kobayashi K, Kanogawa N, Kiyono S, Nakamura M, Kondo T, Saito T, Nakagawa R, Ogasawara S, Suzuki E, Ooka Y, Muroyama R, Nakamoto S, Yasui S, Tawada A, Arai M, Kanda T, Maruyama H, Mimura N, Kato J, Zen Y, Ohtsuka M, Iwama A, Kato N	4. 巻 11
2. 論文標題 The impact of FGF19/FGFR4 signaling inhibition in antitumor activity of multi-kinase inhibitors in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-12
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-84117-9	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 0件）

1. 発表者名 神崎洋彰
2. 発表標題 マルチキナーゼ阻害剤耐性化におけるFGFシグナルとVEGFシグナルの関わり
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 神崎洋彰
2. 発表標題 血清FGF19・VEGF値からみた進行肝癌症例におけるソラフェニブ及びレンパチニブ治療反応性と病勢進行に伴う変化の検討
3. 学会等名 第43回肝臓学会東部会
4. 発表年 2020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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------