

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：13401

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K15944

研究課題名（和文）血中循環腫瘍細胞を標的とした新規肝がんリスク診断法の開発

研究課題名（英文）Development of a novel liver cancer risk diagnostic method targeting circulating tumor cells

研究代表者

大藤 和也 (Ofuji, Kazuya)

福井大学・学術研究院医学系部門・特別研究員

研究者番号：60597699

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）：本研究では、肝がんに対するAtezolizumab-Bevacizumab併用療法における血中循環腫瘍細胞の定量性、遺伝子発現について評価した。PR・SD群のCTC数は治療経過で減少し、PD群と比較し有意に低値であった。NGSによるCTC遺伝子発現解析では治療経過において上皮間葉転換、幹細胞性や増殖能などががん進展に関連する99遺伝子の発現の変動が確認され、階層的クラスタリング解析により治療効果良好PR・SD群と不良PD群の2つのクラスターに層別化された。パスウェイ解析ではPR・SD群でアポトーシス関連シグナル経路遺伝子、PD群でTGF- β シグナル経路関連遺伝子の発現が有意に上昇していた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究課程においてAtezolizumab-Bevacizumab併用療法肝がん症例における血中循環腫瘍細胞の定量性、遺伝子発現について解析可能であった。その結果、治療経過に応じてCTC定量性の変動が確認された。また、CTC遺伝子発現解析により免疫療法奏効例においてアポトーシスシグナル経路が亢進している一方、TGF- β シグナル経路の活性化が免疫療法中の治療耐性において重要な役割を担っていることが示唆された。以上の結果より、肝癌複合免疫療法中におけるCTCはがん進展・治療耐性をきたすがん細胞プロファイルを明らかにする有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：In this study, we evaluated the quantitative and gene expression of circulating tumor cells in the blood of patients with hepatocellular carcinoma treated with atezolizumab-bevacizumab combination therapy. The number of CTCs in the PR/SD group decreased over the course of treatment and was significantly lower than that in the PD group. NGS analysis of CTC gene expression revealed changes in the expression of 99 genes related to cancer progression, including epithelial-mesenchymal transition, stemness, and proliferative potential, during the course of treatment, and hierarchical clustering analysis stratified the treatment effect into two clusters: PR/SD group and poor PD group. Pathway analysis showed that the expression of apoptosis-related signaling pathway genes in the PR/SD group and TGF- β signaling pathway-related genes in the PD group were significantly upregulated.

研究分野：Oncology

キーワード：肝がん 血中循環腫瘍細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝がんは治療後においても再発、転移が高率であり、再発予測と制御が重要な課題である。がん組織より血中に遊離する循環腫瘍細胞(CTC;circulating tumor cell) は新たな診断・予後予測のバイオマーカー候補である。本研究では CTC の遺伝子発現解析による肝がんの進展・転移リスク予測評価法の構築を目的とする。CTC 遺伝子発現群による新規肝がんリスク診断法を開発する。CTC 解析による再発、転移リスク評価法開発は、再発、転移制御を目的とした個別化医療への応用、展開が期待される。

2. 研究の目的

がん組織より血中に遊離する CTC は新たな診断・予後予測のバイオマーカー候補である。本研究では CTC の遺伝子発現解析による肝がんの進展・転移リスク予測評価法の構築を目的とする。細胞表面マーカーを用いて CTC 候補細胞を濃縮測定することで、肝がん薬物療法臨床経過との関係性を評価する。さらに次世代シーケンサー (NGS) にて CTC の遺伝子発現を網羅的に解析することで再発、転移に関する因子を同定する。CTC 解析による再発、転移リスク評価法が確立されれば、再発、転移制御を目的とした個別化医療への応用、展開が期待される。

3. 研究の方法

(1) Atezolizumab-Bevacizumab 併用療法肝がん症例の治療前、3 週後、効果判定時に末梢血より RosetteSep (STEMCELL Technologies) で CTC を濃縮、BD FACS Aria II を用いて細胞表面マーカー (CD45, CD90, CD133, PanCK, EpCAM, Vimentin) を解析した。CD45 陰性かつ PanCK 陽性細胞を CTC と定義し、その定量性について評価した。

(2) Atezolizumab-Bevacizumab 併用療法奏効例、非奏効例においてそれぞれ CTC から RNA を抽出しがん進展に関連する 373 遺伝子の発現変化を次世代シーケンサー(NGS)で解析、GSEA (Gene Set Enrichment Analysis) でパスウェイ解析を行った。

4. 研究成果

(1) PR・SD 群の CTC 数は治療経過で減少し (治療前/効果判定時: 139 vs.75, $p < 0.05$), 治療効果判定時には PD 群と比較し有意に低値であった (PR・SD 群/PD 群: 75 vs. 202, $p < 0.01$). 細胞サブセット解析で PD 群の治療前 Vimentin 陽性 CTC 数が多かった (PR・SD 群/PD 群: 1.8 vs.11.6) (図 1).

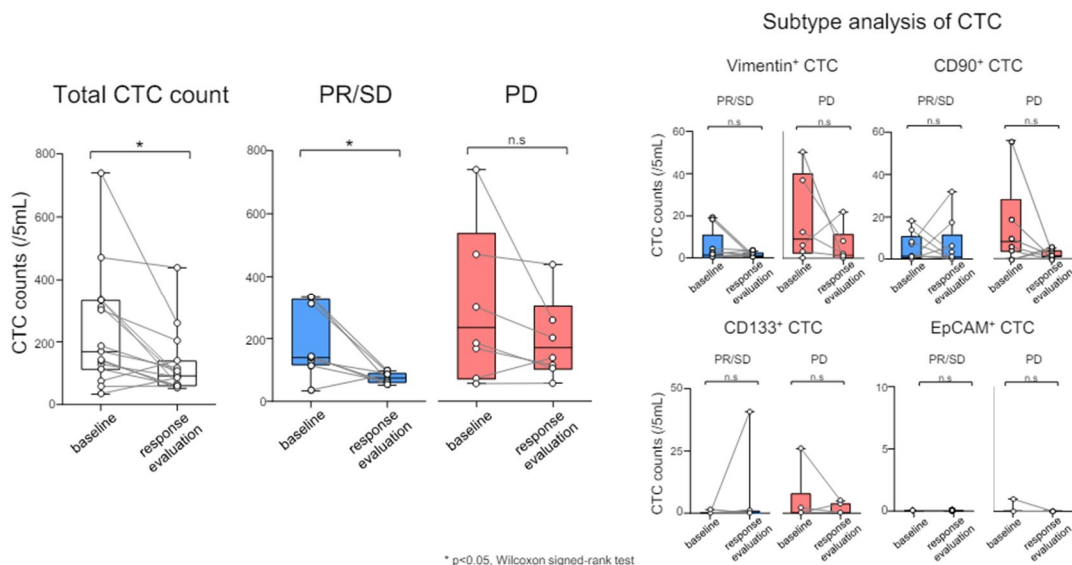


図 1 治療経過における CTC 数変化

(2) NGS による遺伝子発現解析では治療経過において上皮間葉転換 (SERPINE1, E2F1), 幹細胞性 (SALL4, CD9) や増殖能 (FGF2, TGF-β1) などがん 進展に関連する 99 遺伝子の発現が変動していた (図 2)

治療前後遺伝子発現変化(治療前-治療効果判定時)

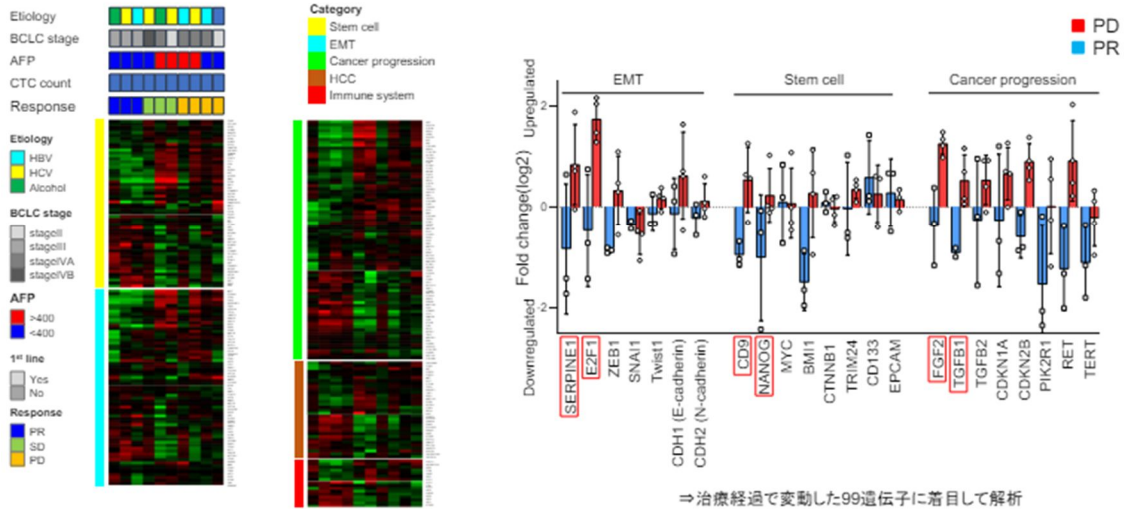


図2 循環腫瘍細胞の遺伝子発現解析

(3) 階層的クラスタリング解析により治療効果良好 PR・SD 群と不良 PD 群の2つのクラスターに層別化された(図3)。

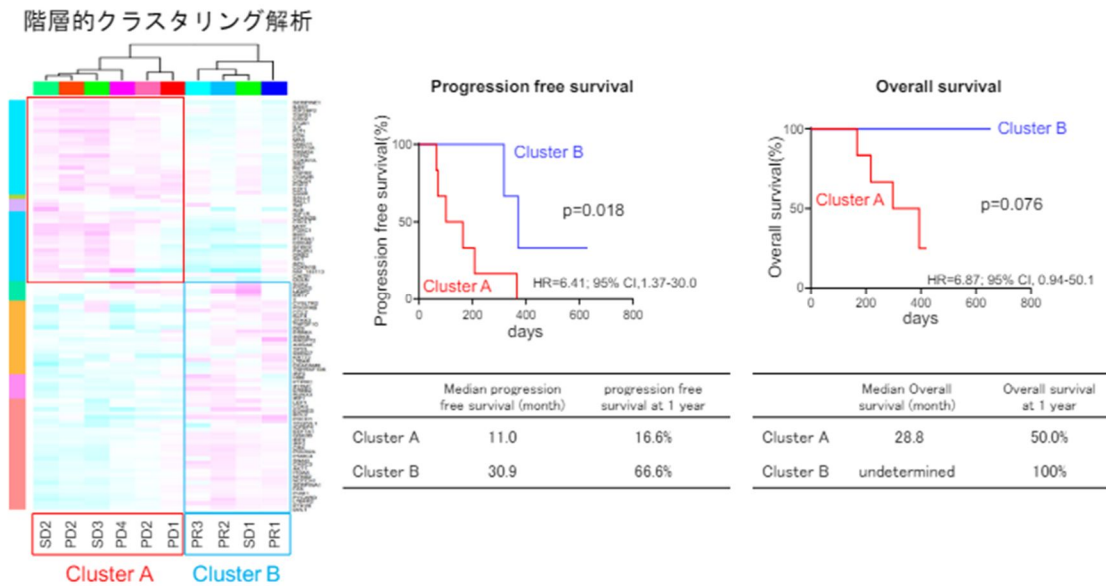


図3 クラスタリング解析

(4) パスウェイ解析では治療効果良好 PR・SD 群でアポトーシス関連シグナル経路遺伝子 (CASP8, FAS) の発現が上昇し, 不良 PD 群で TGF-β シグナル経路関連遺伝子 (TGF-β1, SMAD2) の発現が有意に上昇していた (p < 0.05)。

(5) 上記の研究課程において Atezolizumab-Bevacizumab 併用療法肝がん症例における血中循環腫瘍細胞の定量性、遺伝子発現について解析可能であった。その結果、治療経過に応じて CTC 定量性の変動が確認された。また、CTC 遺伝子発現解析により免疫療法奏効例においてアポトーシスシグナル経路が亢進している一方、TGF-β シグナル経路の活性化が免疫療法中の治療耐性において重要な役割を担っていることが示唆された。以上の結果より、肝癌複合免疫療法中における CTC はがん進展・治療耐性をきたすがん細胞プロファイルを明らかにする有用なバイオマーカーとなる可能性が示された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 0件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Takahashi K, Ofuji K, Nosaka T, Naito T, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Harada K, Naiki H, Nakamoto Y. | 4. 巻 15(3) |
| 2. 論文標題 Elderly onset congenital hepatic fibrosis with portal hypertension diagnosed after recurrent cholangitis: a case report. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 611-616 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-022-01620-w. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Naito T, Nosaka T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Imamura Y, Yamauchi T, Nakamoto Y. | 4. 巻 15(5) |
| 2. 論文標題 Successful early diagnosis of monomorphic epitheliotropic intestinal T-cell lymphoma manifesting as chronic diarrhea and hypokalemia using video capsule endoscopy and double-balloon enteroscopy. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 913-919 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-022-01676-8. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Tsuji A, Hiramatsu K, Namikawa S, Yamamoto A, Midori Y, Murata Y, Tanaka T, Nosaka T, Naito T, Takahashi K, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Imamura Y, Iino S, Hasegawa M, Nakamoto Y. | 4. 巻 15(5) |
| 2. 論文標題 A rare case of eosinophilic gastritis induced by nivolumab therapy for metastatic melanoma. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 876-880 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12328-022-01680-y. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Yamashita J, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Kobayashi M, Nakamoto Y. | 4. 巻 101(39) |
| 2. 論文標題 Cholesterol crystal embolism in multiple organs after transarterial chemoembolization for hepatocellular carcinoma: An autopsy case report. | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Medicine (Baltimore) | 6. 最初と最後の頁 e30769 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1097/MD.00000000000030769. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-----------------------|
| 1. 著者名 Matsuda H, Nosaka T, Hiramatsu K, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Ohtani M, Imamura Y, Iwasaki H, Nakamoto Y. | 4. 巻 16(2) |
| 2. 論文標題 Histology and cytokine levels in hepatic injury accompanying a case of non-severe COVID-19. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Clin J Gastroenterol. | 6. 最初と最後の頁 270-278 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s12328-023-01755-4. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|----------------------|
| 1. 著者名 Nosaka T, Murata Y, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Hiramatsu K, Imamura Y, Goi T, Nakamoto Y. | 4. 巻 162 |
| 2. 論文標題 Hepatocellular carcinoma progression promoted by 5-lipoxygenase activity in CD163(+) tumor-associated macrophages. | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 Biomed Pharmacother. | 6. 最初と最後の頁 114592 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.biopha.2023.114592. | 査読の有無 無 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Akazawa Y, Ohtani M, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Hiramatsu K, Nakamoto Y |
| 2. 発表標題 Clinical Usefulness of Skeletal Muscle Quantity as Prognostic Factor in Elderly Patients with Advanced Pancreatic Cancer Receiving Nab-Paclitaxel Plus Gemcitabine Chemotherapy |
| 3. 学会等名 DDW 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Ohtani M, Ofuji K, Akazawa Y, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Matsuda H, Hiramatsu K, Nakamoto Y |
| 2. 発表標題 Risk Factors for Pancreatic Malignancies in Patients with Low-Risk Branch Duct Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms after 5 Years of Long-Term Follow-Up |
| 3. 学会等名 DDW 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yamamoto A, Ofuji K, Nosaka T, Akazawa Y, Naito T, Takahashi K, Matsuda H, Ohtani M, Nakamoto Y |
| 2. 発表標題 Increased Liver Volume Measured using a 3d Medical Imaging in Patients with Advanced Decompensated Cirrhosis Treated with Balloon-Occluded Retrograde Transvenous Obliteration (B-Rto) |
| 3. 学会等名 AASLD 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Murata Y, Nosaka T, Takahashi K, Naito T, Ofuji K, Matsuda H, Ohtani M, Nakamoto Y |
| 2. 発表標題 Stem Cell Signature of Peripheral Circulating Tumor Cells correlated with therapeutic effects of Atezolizumab plus Bevacizumab in unresectable HCC patients |
| 3. 学会等名 AASLD 2022 (国際学会) |
| 4. 発表年 2022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 |
|---------|---------|
|---------|---------|