

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：32713

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26670387

研究課題名(和文) 肝がん治療効果予測分子診断システムの構築

研究課題名(英文) Development of molecular diagnostic system for the prediction of therapeutic effect in liver cancer

研究代表者

奥瀬 千晃 (Okuse, Chiaki)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授

研究者番号：00318940

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌は、原発性肝腫瘍の中で最も多い予後不良な癌である。マルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブは、肝細胞癌に用いられる分子標的治療薬である。ソラフェニブは、RAS/RAF/MAPKシグナル経路やVEGFR、PDGFRのチロシンキナーゼ活性を阻害し、腫瘍細胞増殖・血管新生抑制作用を示す。肝細胞癌細胞株や組織においてVEGFR1～3とPDGFR遺伝子のDNAメチル化を明らかにした。また末梢血中遊離DNAを用いて同様の解析をすることができた。肝細胞癌患者由来の末梢血中遊離DNAを用いたメチル化検出が、ソラフェニブの効果予測バイオマーカーになる可能性があり、その基盤的成果を得た。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is the most common primary liver cancer with poor prognosis. Sorafenib, an oral multikinase inhibitor, has been recognized as a new molecular-targeted therapy for HCC. Sorafenib suppresses tumor growth and angiogenesis by inhibiting the RAS/RAF/MAPK signaling pathway and tyrosine kinase receptors including vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) and platelet derived growth factor receptor beta (PDGFRB). We analyzed DNA methylation of VEGFR and PDGFRB genes. We have detected DNA methylation of VEGFR and PDGFRB genes in a subset of HCC cell lines and tissues. We were also able to analyze DNA methylation of these genes using circulating cell free DNA. DNA methylation of these genes may become a biomarker for the prediction of Sorafenib sensitivity in patients with HCC. Our results warrant further investigation.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 Sorafenib 治療効果予測 DNAメチル化 VEGFR PDGFR pyrosequencing

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌においては Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase (RAF1) シグナル伝達経路と vascular endothelial growth factor (VEGF) シグナル伝達経路が重要な役割を担う¹⁾。ソラフェニブはセリンスレオニンキナーゼ活性の阻害および血管内皮増殖因子受容体 (vascular endothelial growth factor receptor; VEGFR) と血小板由来増殖因子受容体 β (Platelet Derived Growth Factor Receptor Beta; PDGFRB) のチロシンキナーゼ活性の阻害により、腫瘍細胞増殖・血管新生抑制作用を示す。また VEGFR は、VEGFR1 (Fms Related Tyrosine Kinase 1: FLT1)、VEGFR2 (Kinase Insert Domain Receptor: KDR)、VEGFR3 (Fms Related Tyrosine Kinase 4 FLT4) に分類される。

肝細胞癌の治療として、ソラフェニブが導入された。肝細胞癌に対するソラフェニブ療法はいまだ検討課題が多く、現状では治療開始のタイミング、年齢等による至適用量の設定および乏血性肝細胞癌への治療効果等を模索している状況が継続している。

ソラフェニブは良好な効果が期待できる薬剤ではあるが、一方で高額かつ重篤な副作用が懸念される側面を有しており、非侵襲的治療予測因子の確立は、肝細胞癌診療に携わる全世界の関係者が望むことである。

問題点として、ソラフェニブ治療に対して 30-40%の無効例が認められる²⁾。したがって、治療効果予測因子についても同様に議論されているが、現状では有用な指標は提唱されていない。肝細胞癌組織における VEGF 発現の過多と治療効果の関連性については検討する価値を有するが、実臨床においては腫瘍生検による播種の危険性等から実施することは容易ではない。また、手足症候群、消化管出血や肝性脳症等の重篤な副作用を惹起することがあるため、適応例を慎重に判断する必要がある。

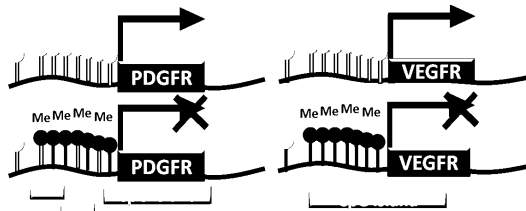
現在、進行肝細胞癌に対するソラフェニブ療法においては、治療効果予測に有用な指標は皆無である。したがって、治療効果予測因子の確立により、高額かつ重篤な副作用発症の可能性を有するソラフェニブ療法において効果的な患者選択と治療遂行が可能となりうる。

ゲノムワイド関連解析 (genome wide association study; GWAS) を試みる手法もあるが、GWAS を用いた研究は、むしろ誰もが考え得る状況であり、今後も多くの施設で検討される可能性があり、斬新なアイデアやチャレンジ性という観点に合致しない。

我々はソラフェニブ無効の分子機構の一要因として標的遺伝子のメチル化による不活化に注目した。つまり、VEGFR1~3 あるいは PDGFR にメチル化が存在する場合は、ソラフェニブの効果が乏しいとの仮説を立てた。

つまり、VEGFR1~3 および PDGFR 遺伝子はプロモーター領域に CpG island を有しており、

同部位にメチル化が存在する場合は、遺伝子不活化が惹起されることから、下流へのシグナル伝達が途絶えるため、ソラフェニブによる治療効果は期待できない (図)。ゆえに、VEGFR1~3 と PDGFR のメチル化の有無がソラフェニブの治療効果予測因子として有用である可能性を推測した。



Me はメチル化を表す

Name	Chr	CpG island
PDGFR	:Ch 04	Yes
VEGFR1/FLT1:Ch 13		Yes
VEGFR2/KDR:Ch 04		Yes
VEGFR3/FLT4: Ch 05		Yes

癌組織においては、細胞死が盛んに起こっているため、担癌患者では細胞死を起こした細胞由来の DNA が積極的に血中に流れ込み、健常者と比べて血中に存在する DNA の量が増加する傾向にあることが知られており、我々はこの末梢血中遊離 DNA に着目した。

我々の研究は、ソラフェニブ療法の標的である VEGFR1~3 と PDGFR の DNA メチル化というエピジェネティックな因子に着目し、末梢血中遊離 DNA を用いることで、実臨床において、非侵襲的かつ容易に応用可能な治療効果予測因子を確立するという試みである。斬新なアイデアやチャレンジ性を有していると考える。

また、ソラフェニブは肝細胞癌のみならず腎癌に対しても使用可能な薬剤であり、腎癌における治療効果予測因子としての有用性も示唆され、一つの領域にとどまらない卓越した成果になり得ると考えられる。

2. 研究の目的

本研究は以下を目的とする。

- (1) 肝細胞癌細胞株における VEGFR1~3 と PDGFR の DNA メチル化と遺伝子発現との関連を明らかにする。DNA メチル化は、バイサルファイトーピロシーケンス解析を確立する。
- (2) 肝細胞癌細胞株における VEGFR1~3 と PDGFR の DNA メチル化とソラフェニブによる効果を検討する。
- (3) 肝細胞癌組織における VEGFR1~3 と PDGFR の DNA メチル化を解析し、発現との相関を検討する。
- (4) 末梢血中遊離 DNA を用いて VEGFR1~3 と PDGFR の DNA メチル化解析ができるかを検討する。
- (5) 上記でポジティブな結果が得られれば、末梢血遊離 DNA を用いた VEGFR1~3 あるいは

PDGFR DNAメチル化解析によるソラフェニブ治療効果との関連を解析し、治療効果予測因子としての有用性の検討を行う。

3. 研究の方法

(1) 肝細胞癌細胞株の培養、DNA、total RNA抽出

肝細胞癌細胞株を常法に従い培養した。培養肝細胞癌細胞株からフェノール・クロロホルム法を用いて、DNAを抽出した。また、肝細胞癌細胞株を脱メチル化剤で処理し、再発現実験を行った。脱メチル化剤で処理後DNAを抽出した。

Epiect DNA Bisulfite Modification KitでDNAのバイサルファイト処理を行った。バイサルファイト処理済みDNAを用いてVEGFR1~3とPDGFR遺伝子のプロモーター領域のバイサルファイトシーケンス解析を行った。その後、プライマーを設計し、パイロシーケンス解析を行った。

パイロシーケンス解析にはQIAGEN社のPyroMark24を使用し、各遺伝子プロモーター領域に特異的なBiotinated-Primerを用いて、サンプルDNAをビオチン化させPCR増幅し解析に用いた。

また、trizol試薬を用いて、total RNAを抽出した。total RNAを用いて、TaqMan assayによりVEGFR1~3とPDGFRの定量的発現解析を行った。さらに、VEGFR1~3とPDGFRに対する抗体をそれぞれ用いて、細胞染色を行った。

(2) 肝細胞癌細胞株に対するソラフェニブの効果

肝細胞癌細胞株をソラフェニブ処理し、MTTアッセイキットを用いて細胞増殖およびAnnexin V Apoptosis Detection Kitキットを用いてアポトーシスに与える影響を検討した。

(3) 市販肝細胞癌組織切片を用いた解析

パラフィン切片から腫瘍部および非腫瘍部を分けて採取した。得られた切片を、10% SDS、SEDTAおよびProteinase Kにより50°C、3時間で処理した後に、標準的なフェノール・クロロホルム法にてDNAを抽出した。バイサルファイト処理は、前述のようにEpiect DNA Bisulfite Modification Kitを用いて行った。バイサルファイト処理済みDNAをテンプレートとして、パイロシーケンス法によりVEGFR1~3とPDGFRのDNAメチル化を定量解析した。また、VEGFR1~3とPDGFRに対する抗体をそれぞれ用いて、免疫組織染色を行った。

(4) 末梢血中遊離DNAを用いたDNAメチル化の検討

血漿300 μ lに、1% SDS 300 μ l、20 mg/ml Proteinase K 20 μ lを加え、50°C、3時間反応させ、タンパク消化した。反応液と同量のフェノール・クロロホルム溶液にてDNAを抽

出し、5 mg/ml グリコーゲン 5 μ lを加えた後、エタノール沈殿した。DNAペレットを50 μ lの5 mM tris bufferに溶解し、バイサルファイト処理に使用した。

抽出したDNA溶液の各20 μ lずつをEpiect DNA Bisulfite Modification Kitにてバイサルファイト処理した。バイサルファイト処理済み検体2 μ lをテンプレートとして、Premix Ex Taq™を用いて、パイロシーケンス法により、VEGFR1~3とPDGFRのDNAメチル化を解析した。

4. 研究成果

(1) シグナル受容体であるVEGFR1~3とPDGFRのDNAメチル化に関し、機能的意義を有するDNAメチル化を明らかにするために、肝細胞癌細胞株の脱メチル化剤処理による再発現実験を行った。この結果に基づき、VEGFR1~3とPDGFRのDNAメチル化に関し、バイサルファイトシーケンス解析を行った。その結果、いくつかの重要なCpG領域を明らかにした。これに基づき、プライマーの設計を行い、ビオチン化プライマーを用いて、バイサルファイト処理したサンプルDNAのパイロシーケンス解析を行った。

これにより、肝細胞癌細胞株の一部では、VEGFR1~3とPDGFR遺伝子のDNAメチル化と遺伝子発現が相関することを明らかにしたが、相関しない細胞株も認めた。したがって、DNAメチル化と遺伝子発現の相関を認めなかった肝細胞癌細胞株では、片アレルのみのDNAメチル化や一部の細胞のみでのヘテロなDNAメチル化が示唆された。

また、ほとんどの肝癌細胞株においてDNAメチル化している遺伝子はなかった。VEGFR1~3とPDGFRは、増殖因子受容体であり、少なくとも検討した肝細胞癌細胞株では、これらの受容体遺伝子のDNAメチル化のpositive pressureは高くないことが示唆された。

(2) 肝細胞癌細胞株をソラフェニブで処理し、細胞増殖、アポトーシスに与える影響を検討した。肝細胞癌細胞株の種類によって、さまざまな感受性を示した。最も重要な点として、VEGFR1~3あるいはPDGFRのDNAメチル化の有無とソラフェニブ感受性の相関を示す結果は得られなかった。

ソラフェニブは、マルチキナーゼ阻害薬であり、複数のキナーゼを標的とする。したがって、VEGFR1~3あるいはPDGFRの中で単独の遺伝子のDNAメチル化による不活化だけでは、ソラフェニブの感受性に大きく影響しない可能性が示唆された。

(3) 組織での検討では、肝細胞癌組織切片から腫瘍部、非腫瘍部を別々に採取し、パイロシーケンス法で解析できるレベルの量および質のDNAを抽出できた。バイサルファイト処理DNAを用いたパイロシーケンス解析により、

いくつかの症例で VEGFR1~3 あるいは PDGFR の DNA メチル化を検出した。

DNA メチル化を認めた症例の一部で、免疫組織染色による発現低下を認めたが、DNA メチル化と発現が相関しない症例の方が多かった。これは、肝細胞癌細胞株でみられたものと同様の結果であり、DNA メチル化と発現の相関を認めなかった症例では、片アレルのみの DNA メチル化や一部の癌細胞だけでのヘテロな DNA メチル化が示唆された。

(1)~(3)の結果から、VEGFR1~3 あるいは PDGFR の中で単独の遺伝子の DNA メチル化を解析することによって、ソラフェニブの感受性を予測することは困難であることが示唆された。

(4) 健常人の血液検体を用いて、末梢血中遊離 DNA を抽出した。バイサルファイト処理した DNA をテンプレートとして、Premix Ex Taq™ を用いたピロシーケンス法により、VEGFR1~3 および PDGFR の DNA メチル化を解析した。非メチル化という結果であったが、ピロシーケンス解析が可能であることが明らかになった。今後、肝細胞癌患者由来の末梢血中遊離 DNA を用いたメチル化検出につながる基盤的成果を得た。

しかしながら、末梢血中遊離 DNA を検体として用いても、VEGFR1~3 あるいは PDGFR の中で単独の遺伝子の DNA メチル化を解析することによって、ソラフェニブの感受性を予測することは困難であると考えられた。したがって、肝細胞癌細胞株や肝細胞癌組織検体を用いた基礎的な解析をさらに行った上で、末梢血中遊離 DNA を用いた検討を行う必要があると考えられた。また、末梢血中遊離 DNA の中で、腫瘍由来 DNA は、数%と言われている。したがって、今後、DNA メチル化の検出系に関してもさらなる検討が必要である。

<引用文献>

- ① Ito Y, et al. Activation of mitogen-activated protein kinases/extracellular signal-regulated kinases in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 1998; 27: 951—958.
- ② Llovet JM, et al. Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *New Engl J Med* 2008; 359: 378—390.

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)

[雑誌論文] (計 0 件)

[学会発表] (計 0 件)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

奥瀬 千晃 (OKUSE, Chiaki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号: 40332910

(2) 研究分担者

山本 博幸 (YAMAMOTO, Hiroyuki)
聖マリアンナ医科大学・医学部・准教授
研究者番号: 40332910

伊東 文生 (ITO, Fumio)

聖マリアンナ医科大学・医学部・教授
研究者番号: 90223180