

総括研究報告書

1. 研究開発課題名：「分子プロファイリングによる新規標的の同定を通じた難治がん治療法開発」
(肝がんの多施設検体コホートに基づく難治性規定分子の同定と分子標的治療の開発)
2. 研究開発代表者：田中真二 (国立大学法人東京医科歯科大学医歯学総合研究科分子腫瘍医学分野)
3. 研究開発の成果

肝がん手術症例をまとめ、がん部及び非がん部の検体採取とデータ収集を統括した。肝がん基準外再発・基準内検体及び原発巣・再発巣ペア検体を用いて、がん部及び非がん部の全エクソンシーケンス解析を支援基盤との連携によって行い、再発様式に対応する特異的遺伝子変異を検出した。全エクソンシーケンス解析、網羅的エピゲノム解析、網羅的遺伝子発現解析などを含めた分子プロファイリングによる肝がんオミックス解析によって、3種類の分子サブタイプに分類されることを明らかにした。M期染色体分配 (AURKB など) および幹細胞性遺伝子群 (EPCAM など) が高く発現するサブタイプは、早期再発が多く予後不良の難治性肝がんを示すことを見出した。M期染色体分配および幹細胞性遺伝子群の発現が低い群は、特異的遺伝子変異および高度 DNA メチル化を特徴とするサブタイプと、DNA メチル化が低く糖尿病、脂質異常症、肥満などメタボリック症候群を特徴とするサブタイプに分類された。原発巣・再発巣ペアの全ゲノム配列解析によって、再発による遺伝子変化を殆ど認めない肝内転移 (intrahepatic metastasis; IM) タイプと、大きく変動する多中心性 (multicentric; MC) タイプの2つに分かれることが明瞭となり、後者は背景肝の線維化・炎症と有意に相関した。

次に、培養及び動物実験による治療効果モデルを用いて、薬剤の治療効果検証システムを構築した。上記の分子サブタイプ解析によって同定された難治性肝がんを規定する M 期染色体分配分子 AURKB に加え、血管新生因子受容体 VEGFR のキナーゼ活性も標的とした新規二重阻害剤の解析を進めた。その結果、肝がんに対する抗腫瘍効果は、癌細胞内 AURKB 活性の低下 (リン酸化 H3S10)、腫瘍血管床の減少 (CD31)、腫瘍内低酸素領域の拡大 (pimonidazole) と有意に相関することを治療効果検証システムによって証明した (Nakao, Tanaka et al. *Cancer Sci* 2015)。さらに同システムを用いて薬剤反復投与による継代移植を進めた結果、生体内耐性ヒト肝癌株を新たに樹立し、継代に伴って段階的に増強する耐性促進因子 Rx を同定した。クロマチン免疫沈降法による Rx プロモーター解析によって、複合的なエピゲノム異常による耐性獲得メカニズムの存在が明らかとなり、臨床検体における薬剤耐性と有意に相関することを証明した。

また、肝がん切除検体における OATP8 トランスポーターの発現を解析した結果、Gd-EOB-DTPA 造影 MRI 画像所見と相関し肝がん発生進展過程に関連していること、OATP8 遺伝子発現は WNT シグナル経路によって制御されていることを明らかにした (Ueno et al. *J Hepatol* 2014)。WNT シグナル標的遺伝子のひとつである LGR5 を導入または発現抑制した肝がん培養細胞のマイクロアレイ解析により、肝がんの悪性度と関連する分子 X および Y が同定された。LGR5 導入細胞はソラフェニブ存在下での生存率が向上したことから、LGR5 は薬剤抵抗性に関与していることが示された。ソラフェニブの標的分子の下流に存在するシグナル伝達仲介分子 Z の免疫染色を行ったところ、分化度が低く、AFP 高値を示し、予後の悪い肝がん症例に多く発現が認められ、また分子 X および Y の発現とも相関した。分子 Z の活性化はソラフェニブによって抑制を受けるが、抑制を強く受ける細胞ほどソラフェニブに対する感受性が高いことが示唆された。以上のことから、肝がんには、OATP8 や LGR5 を発現し WNT シグナル経路が活性化しているサブグループと、分子 XYZ を発現する悪性度の高いサブグループが存在し、ソラフェニブに対する感受性に差があることが示唆された。