

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 21 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K19331

研究課題名(和文) ソラフェニブ耐性株の樹立とその機序の解析

研究課題名(英文) Establishment and mechanism of sorafenib-resistant cells

研究代表者

友成 哲 (TOMONARI, Tetsu)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：20556807

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：今回我々はソラフェニブ耐性細胞を樹立し、耐性のメカニズムを解析した。ソラフェニブ耐性細胞は、PLC/PRF5細胞を用いて作成した。シグナル伝達系のウェスタンブロット分析を行ったところ、AKT / pAKT、mTOR / pmTOR、またはERK / pERKの発現に有意差を示さなかった。しかしながら、耐性クローンにおけるABCトランスポーターMRP3の発現レベルは、親細胞と比較し有意に高かった。また耐性クローンのMRP3をsiRNAによりノックダウンした際に、ソラフェニブに対するの感受性が回復した。我々のデータは、MRP3がソラフェニブ耐性において重要な役割を果たすことを実証している。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of resistance of hepatocellular carcinoma (HCC) to sorafenib is unknown. Accordingly, we established sorafenib-resistant HCC cells and investigated the mechanism of resistance to sorafenib. Sorafenib-resistant cell lines were established from the HCC cell line PLC/PRF5. Western blot analysis of signal transduction-related proteins showed no significant differences in expression of AKT/pAKT, mTOR/pmTOR, or ERK/pERK between the 2 resistant clones versus parent cells. Likewise, when expression of membrane transporter proteins was determined, there were no significant differences between resistant clones and parent cells. However, the expression levels of MRP3 in the 2 resistant clones were significantly higher than that of parent cells. When MRP3 gene was knocked down by siRNA in PLCPRF5-R2 cells, the sensitivity of the cells to sorafenib was restored. Our data demonstrate that the efflux transporter MRP3 plays an important role in resistance to sorafenib in HCC cells.

研究分野：肝臓学

キーワード：sorafenib

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の死亡率は我が国を含むアジアにおいて高く、全世界においても悪性腫瘍死亡率の第5位を占めており、有効な治療法の確立が急務である。肝細胞癌はほとんどの抗癌剤に自然耐性を示すことから、経動脈的化学塞栓療法やラジオ波などの局所療法を中心に治療が行われてきた。近年、肝癌細胞の増殖や血管新生に関わる Raf、VEGFR、PDGFR などの複数のキナーゼ活性を阻害する分子標的薬ソラフェニブが開発され、大規模臨床試験 (SHARP study) により進行肝細胞癌患者の生存率を有意に延長することが示された (N. Engl. J. Med. 2007)。この結果を基に、諸外国及び我が国においてソラフェニブが広く進行肝癌の治療薬として用いられている。しかし、ソラフェニブの奏功率はきわめて低く、わずか2~3%程度である。また、現在のところソラフェニブの有効性を予測するバイオマーカーは無く、適切なバイオマーカーの開発が求められている。

申請者はこれまで、肝細胞癌細胞株である PLC/PRF5 細胞を低濃度のソラフェニブを含む培地で培養し、その濃度を徐々に上昇させることによりソラフェニブ耐性 PLC/PRF5 細胞 (PLC/PRF5/R; mixed population) を樹立した。申請者は、この細胞が親株に比べてソラフェニブに約4.6倍高い耐性を示すことを確認し、現在クローニングを行っている。

ソラフェニブに対する耐性獲得の機序としては以下の1)~4)が推定される。

1)ソラフェニブ結合部位の変異,2)ソラフェニブ排泄ポンプの過剰発現  
3)RAF-RAS-MEK-ERK 経路以外のシグナル伝達経路の活性化,4)細胞内におけるソラフェニブの sequestration. 申請者はこれまで、PLC/PRF5/R 細胞株を用いてソラフェニブと RAF の結合に関与すると考えられる、RAF の ATP binding pocket 及び DFG motif の DNA 配列を deep sequencer による解析を行ったが、

これらの配列に変異は認められなかった。また preliminary ながら、PLC/PRF5/R 細胞株と親株における各種トランスポーター (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, BSEP, BCRP) の発現を Western blot 法により調べたところ、耐性株では MRP3 が過剰発現していることを見出している。つまり、PLC/PRF5/R 細胞株では MRP3 などの排泄ポンプが過剰発現し、ソラフェニブを細胞外に排泄して耐性を獲得している可能性がある。そこで実際に耐性クローンの MRP 発現を siRNA でノックダウンし、ソラフェニブに対する感受性の変化を解析し、またソラフェニブの主な標的分子である Raf1 キナーゼの遺伝子変異を解析する方針とした。さらに、ソラフェニブ治療を行った進行肝癌症例の臨床検体を用いて MRP3 の発現とソラフェニブの治療効果との関連を検討する方針とした。

## 2. 研究の目的

本研究では、まず申請者がこれまでに樹立したソラフェニブ耐性株のクローニングを行い、PLC/PRF5/R 細胞株と親株における各種トランスポーター (MDR1, MRP1, MRP2, MRP3, MRP4, BSEP, BCRP) の発現を Western blot 法により解析する。さらに、これらの解析結果を基にソラフェニブ耐性に関わる新しいバイオマーカーを開発することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)限界希釈法を用いたソラフェニブ耐性 PLC/PRF5 耐性細胞 (PLC/PRF5/R) のクローニング、ソラフェニブ耐性細胞の培地を除去し、PBS で洗浄し、0.2% trypsin/0.02% EDTA を添加し培養表面全体にいきわたらせる。馴化培地を添加しピペティングにより細胞を分散し単一細胞率の高い細胞浮遊液を調整する。細胞浮遊液を馴化培地で希釈し、10cells/ml の濃度に調製する。細胞浮遊液をピペティングしよく分散させたあと、浮遊

液 100  $\mu$ l をとって 96well plate に移す。位相差顕微鏡下で、細胞が一個だけ入っている well をマークして培養する。マークした細胞が増殖したら順次大きな well に移し替えて継代培養する。

(2) Western blot を用いた親株と耐性株における細胞増殖シグナルの比較

(3) Western blot を用いた親株と耐性株における細胞膜トランスポーターの比較

(4) Raf1 の Direct Sequence を用いた遺伝子変異解析

(5) siRNA を用いた耐性細胞の MRP3 knock down による cell viability の解析

(6) Sorafenib を用いた肝細胞癌症例の MRP3 発現と治療効果との関連の解析

#### 4. 研究成果

まず培養肝癌細胞株をソラフェニブに持続的に暴露することによりソラフェニブに高い耐性を示す細胞株を樹立した。すなわち、親株に比べて IC50 が 4.6 倍の高耐性クローン及び 1.8 倍の低耐性クローンを樹立した。(図 1)

これらのソラフェニブ耐性クローンを用いて、まず 7 つの細胞膜トランスポーターの発現を調べたところ、耐性クローンでは親株に比べて排出ポンプの一つである MRP3 が過剰発現していることを見出した。(図 3,4) また、耐性クローンの MRP 発現を siRNA でノックダウンすると、ソラフェニブに対する感受性が回復した。(図 6) ソラフェニブの主な標的分子である Raf1 キナーゼの遺伝子変異を調べたが、いずれの耐性クローンにも変異は認められなかった。(図 2) さらに、ソラフェニブ治療を行った 9 例の進行肝癌症例の臨床検体を用いて MRP3 の発現を調べたところ、ソラフェニブが有効であった症例では MRP3 蛋白の発現が高いことを見出した。(図 5)

以上のように、本研究では培養肝癌細胞を用いてソラフェニブ耐性クローンを樹立し、

MRP3 が耐性因子の一つであることを明らかにした。つまり、肝細胞癌に過剰発現した MRP3 が、ソラフェニブを細胞外に排出されることにより耐性を獲得することが明らかとなった。また、ソラフェニブ治療を行った肝細胞癌症例の臨床検体を用いて MRP3 発現を解析し、MRP3 が獲得耐性のみならず、自然耐性にも関与する可能性を示した。本研究は、今後の肝細胞癌治療における個別化医療の発展に大きく寄与するものと考えられる。

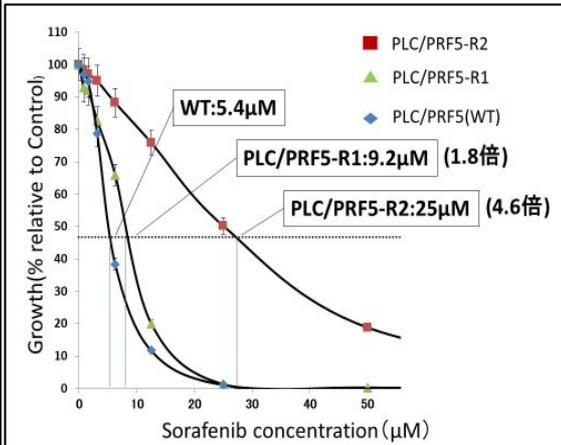


図 1. 耐性クローンの薬剤感受性解析

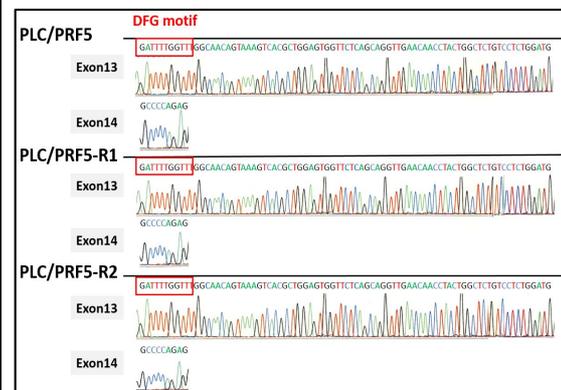


図 2. Raf1 Activation segment の遺伝子

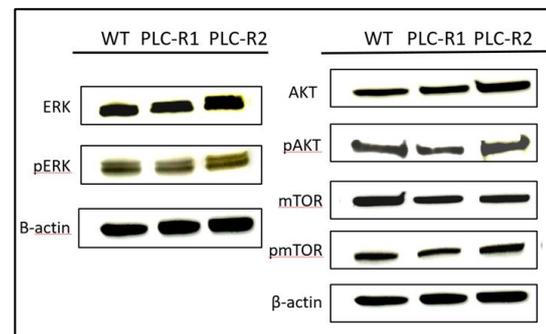


図 3. 細胞増殖シグナルの比較

21-24, 2016, San Diego Convention Center) (San Diego · United States of America)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

友成 哲 (TOMONARI, Tetsu)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部・

特任助教

研究者番号：20556807

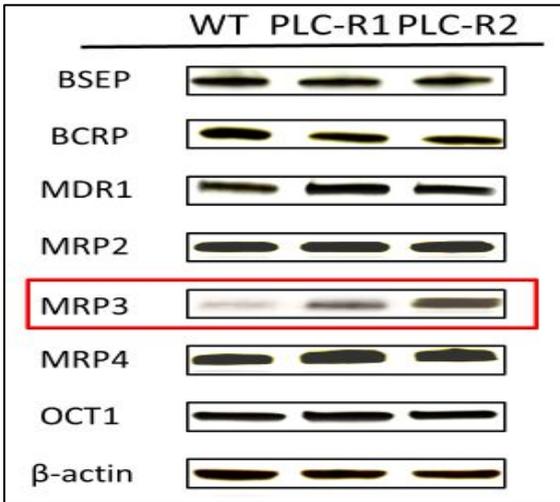


図 4. トランスポーター発現の比較

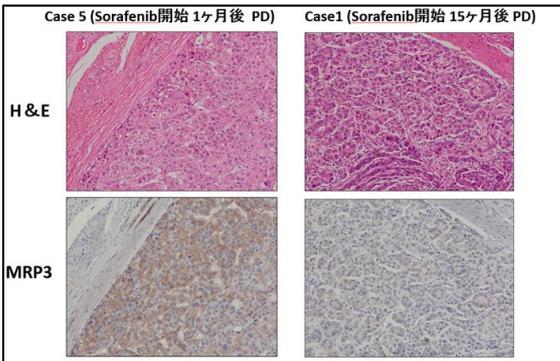


図 5. 肝癌組織における免疫染色

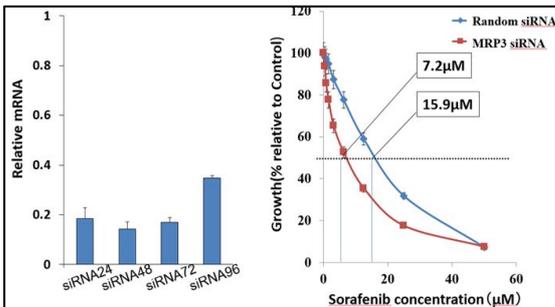


図 6. MRP3 ノックダウンによる効果

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 1 件)

1. Tomonari T, Takeishi S, Taniguchi T, Tanaka T, Tanaka H, Fujimoto S, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Muguruma N, Takayama T. MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2016; 7(6): 7207-7215 (査読有)

[学会発表](計 1 件)

1. Tomonari T, Takeishi S, Taniguchi T, Tanaka T, Tanaka H, Kimura T, Okamoto K, Miyamoto H, Muguruma N, Takayama T. MRP3 As a Novel Resistance Factor for Sorafenib in Hepatocellular Carcinoma. *Gastroenterology*. 2016; 140(4 Supplement1); S514 (DDW2016, May)