

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 15 日現在

機関番号：37104

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K21555

研究課題名(和文)腫瘍AMPKの血管新生阻害剤耐性への関与及び治療効果予測と治療標的としての可能性

研究課題名(英文)The possibility of resistance for anti-angiogenic therapy and therapeutic biomarker in tumor AMP-activated protein kinase

研究代表者

岩本 英希 (Iwamoto, Hideki)

久留米大学・医学部・助教

研究者番号：40529541

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)：本研究は肝細胞癌に対する血管新生抑制治療に対する耐性メカニズムについてエネルギー代謝の観点から研究を行ったものである。細胞が飢餓状態に陥るとAMPKが活性化することで、細胞の危機的状況を回避する事が知られている。我々の研究では癌細胞においても血管新生抑制治療を行うと、腫瘍のAMPKが活性化する事が分かった。癌細胞のAMPKの役割を知る為に、AMPKを欠損した肝癌細胞株を作製し、実験培養及び実験マウスを用いて検証したが、AMPKは血管新生抑制治療に対する耐性には関与していなかった。一方、癌細胞の低酸素誘導蛋白(HIF)の抑制は肝細胞癌に対する抗腫瘍効果を示した。

研究成果の概要(英文)：The purpose of this study is to clarify whether energy metabolism is related to resistance for anti-angiogenic therapy. It is generally known that AMPK was activated when the cells fell into starved condition. We have found that AMPK was activated even in cancer cells by anti-angiogenic therapy. To know the function of tumor AMPK in anti-angiogenic therapy, we have generated AMPK deleted hepatoma cell lines. And we have performed in vitro and in vivo experiments using these cell lines. However, AMPK did not correlate with resistance for anti-angiogenic therapy. In contrast, inhibition of hypoxia inducible factor (HIF) showed significant anti-tumor effect for hepatocellular carcinoma.

研究分野：肝細胞癌

キーワード：肝細胞癌 血管新生 血管新生抑制治療

### 1. 研究開始当初の背景

これまで進行期における悪性腫瘍の薬物療法は細胞障害性の抗癌剤が主流であった。しかし、癌の増殖、浸潤に関わる分子が解明されていく中で、それらの分子を標的とした分子標的薬が近年、多くの悪性腫瘍に対する治療薬として使用されている。肝細胞癌に対しては有効な薬剤はこれまで無かったが、ソラフェニブと呼ばれる血管血管内皮増殖因子受容体(VEGFR)、血小板由来増殖因子受容体(PDGFR)、細胞内転写因子 Raf を抑制する薬剤が、大規模臨床試験によって肝細胞癌に対して有効な結果を示し、標準治療薬となった。ソラフェニブは血管新生阻害剤とも呼ばれ、主な抗腫瘍メカニズムは腫瘍を栄養する腫瘍血管新生の抑制である。腫瘍血管新生の抑制は、癌細胞を虚血・飢餓状態に陥れ腫瘍壊死・細胞死をもたらす。ソラフェニブは 2009 年より本邦で承認され臨床で広く使われる事となった。申請者も、96 症例の肝臓癌患者へソラフェニブの投与を行い、その治療成績をまとめ報告した (Nakano M, Iwamoto H, et al., Oncology, 2013;84(2))。しかし、我々の報告及び、他施設からの報告においても、ソラフェニブの生存延長効果は充分とは言えないのが現状である。ソラフェニブの効果が充分と言えない理由として、ソラフェニブ投与に対する癌細胞の耐性獲得が挙げられる。ソラフェニブによる特定の因子の抑制は癌細胞に他の様々な因子の活性化を引き起こす(側副経路の活性化)(Yano S et al., Cancer Res. 68:9479)。従って、この様な側副経路の活性化をいかに抑制するかがソラフェニブを始めとする分子標的薬治療の大きな課題と言える。

全ての細胞はアデノシン 3 リン酸(ATP)を消費し細胞活動を行っている。それは増殖をし続ける癌細胞においても非常に重要な事であり、癌のエネルギー代謝は大きな研究テーマの一つである。細胞にはエネルギーの量を調整する AMP 活性化プロテインキナーゼ (AMPK) と呼ばれる調整因子が存在する。この AMPK は AMPK $\alpha$ , AMPK $\beta$ , AMPK $\gamma$  の複合体により構成され、細胞内の ATP レベルが低下した際に活性化する。AMPK の活性化は ATP 産生に関わる代謝経路及び、抗細胞死に関わる経路の活性化を引き起こし細胞内の ATP の維持と抗細胞死効果をもたらす。血管新生阻害剤は虚血により癌細胞を飢餓状態に陥れる。申請者は本研究においてこの癌細胞の飢餓状態に血管新生阻害剤に対する耐性メカニズムが関与していると仮説を立て、その検証を行う。

### 2. 研究の目的

申請者は本研究において、“AMPK の活性化が肝細胞癌のソラフェニブ治療における耐性獲得に関与する”と仮説を立てる。血管新生阻害剤は腫瘍の血管新生を抑制し癌細胞に虚血・飢餓状態をもたらす事で、細

胞内の ATP レベルが低下し細胞死を引き起こす。しかし、ATP レベルの低下は腫瘍 AMPK の活性化を引き起こし、エネルギー代謝の活性により癌細胞内の ATP の恒常性を保とうとする。それは癌細胞にとって血管新生阻害剤の耐性獲得メカニズムとして非常に有効な手段であると考えられる。

### 3. 研究の方法

#### 1. 現象の確認：肝細胞癌に対するソラフェニブ投与による AMPK 及び下流経路の活性化の評価

申請者の属する研究施設では、数多くのヒト肝細胞癌患者から単離培養された肝細胞癌細胞株を有する(Yano H, et al. Hepatology. 1993 Aug; 18(2):320-7)。この細胞バンクから 5~10 種類のヒト肝細胞癌株をそれぞれヌードマウス皮下に移植しソラフェニブ治療を行いソラフェニブの抗腫瘍効果を評価する。治療後の腫瘍組織の腫瘍血管数、増殖細胞数、アポトーシス細胞数、腫瘍内の低酸素程度をそれぞれ CD31, PCNA, Ki67, TUNEL, Cleaved caspase 3, Pimonidazole, CA9 などの抗体を使い免疫染色法で比較評価する。それぞれの細胞株でのソラフェニブの抗腫瘍効果を上記 ~ の項目で感受性、抵抗性において分類する。

全ての細胞株の治療群及び対照群の AMPK の活性化及びその下流経路の活性化を免疫染色、Western blotting 法、リアルタイム PCR によって評価する。(1)の分類と照らし合わせ、AMPK が抗腫瘍効果に関与するか推察する。また、腫瘍の AMPK の活性程度と抗腫瘍効果を比較する事で AMPK の活性が血管新生阻害治療のバイオマーカーとして有用であるかも評価可能となる。

ソラフェニブによる腫瘍 AMPK の活性化を網羅的に解析する為に、治療群及び対照群の腫瘍組織をマイクロアレイ法にて解析・比較する。より臨床に近い実験モデルを使うために、皮下腫瘍モデルのみならず、肝細胞癌肝臓移植モデルを用いて上記(1),

(2)を評価する。

2. 仮説の証明：肝細胞癌に対するソラフェニブ投与によって活性化された腫瘍 AMPK がソラフェニブへの耐性獲得に関与している事の検証とそのメカニズムの解明

(1) 癌細胞の AMPK 機能亢進誘導実験

ソラフェニブに対する耐性に AMPK の活性化が関与している事を裏付ける為に、腫瘍 AMPK 活性化の更新実験を AMPK 活性化剤を用いた薬理的更新実験と AMPK 過剰発現肝細胞癌を遺伝子導入法によって作成し遺伝的亢進実験を *in vivo*, *in vitro* の実験系で行う。

(2) AMPK 欠失肝細胞癌を用いた高エネルギー源環境下での AMPK の機能補填実験

AMPK 欠失肝細胞癌を AMPK sh-RNA によって作成する。AMPK 欠失肝細胞癌を用いて、ソラフェニブの抗腫瘍効果に AMPK が関連する事を *in vivo*, *in vitro* の実験で評価する。次に、*in vivo* の系では高エネルギー食を食餌させたマウスモデルを、*in vitro* の系では糖濃度もしくは他のエネルギー源の高い培養液を用いて AMPK 欠失によって失われたソラフェニブ耐性効果が高エネルギー源環境によって補填されるかを検証する。

(3) AMPK のソラフェニブ耐性メカニズムの解明の為に AMPK 下流シグナルの解析

マイクロアレイによる網羅的解析のデータ及び、AMPK 下流シグナルとして既知のエネルギー代謝や抗細胞死に関わる分子をリアルタイム PCR、Western blotting 法で解析する。薬理的抑制及び sh-RNA を用いた遺伝的抑制実験でどの下流シグナルがソラフェニブ耐性獲得に寄与しているのかを

解明する。

3. 仮説に基づいた新規治療戦略の提示：ソラフェニブ投与によって活性化した腫瘍 AMPK の抑制を目的とした治療の確立

(1)癌細胞の AMPK の機能欠失実験

ソラフェニブによって活性化された腫瘍 AMPK の抑制がソラフェニブと相乗的な抗腫瘍効果を示す事を検証する為に、腫瘍 AMPK 活性化の抑制実験を AMPK 抑制剤を用いた薬理的抑制実験を *in vivo*, *in vitro* の実験系で行う。

4. 仮説の一般化：ソラフェニブ以外の血管新生阻害剤及び肝細胞癌以外の癌種でも本研究の仮説及び仮説に基づいた新規治療戦略が有効である事の検証

(1) 血管新生阻害剤が腫瘍 AMPK を活性化させる事の一般化

大腸癌における抗 VEGF 抗体を用いた血管新生阻害治療、膵臓癌におけるソラフェニブ、抗 VEGF 抗体を用いた血管新生阻害剤治療による AMPK の活性化の検証を平成 27 年度実験計画 1. と同様の過程で検証する。

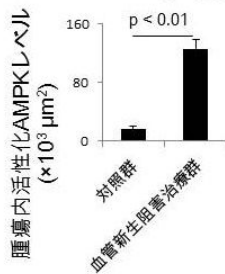
(2) 血管新生阻害剤との腫瘍 AMPK の抑制を目的とした併用療法の有効性の一般化

大腸癌及び膵臓癌において血管新生阻害剤と活性化した AMPK の抑制の併用療法の有効性の検証を平成 28 年度実験計画 2. と同様の過程で検証する。

4. 研究成果

マウス肝細胞癌株をマウスに接種し、腫瘍を形成させた後に、ソラフェニブ 30mg/kg/day を経口投与を 2 週間行った。ソラフェニブの投与により、腫瘍は対照群に比べ、有意に縮小された。治療後の腫瘍を回収し、対照群及びソラフェニブ投与群の組織から蛋白を抽出し AMPK の活性化レベルを評価した。以下の図の様に、血管新生阻害剤（ソラフェニブ）を投与した群が明らかに AMPK の活性化が見られていた。

血管新生阻害治療後の腫瘍  
AMPKの活性化の比較



加えて、それぞれの群の血管数を評価する為にCD31抗体を用いて免疫染色を行ったところ、ソラフェニブ投与群において有意に血管数の減少を認めた。

AMPKがソラフェニブ投与により腫瘍内で活性化する事が明らかになったため、次にshRNAを用いて肝細胞癌株のAMPKを欠損させた細胞株の作成を試みた。

ヒト肝細胞癌株 Hep3B, Huh-7 の AMPK 欠損株 (AMPK-KD) を作製した。いずれの細胞株も80%以上のAMPKの発現低下を確認した。

AMPK-control 細胞 (対照肝細胞癌株) と AMPK-KD 細胞を用いて、細胞培養の系と実験マウスを用いた系で腫瘍におけるAMPKの役割について検証した。

細胞培養の系では、通常環境での培養(糖あり、正酸素)、1%低酸素環境、無糖培養の3つの環境下でAMPK-control、AMPK-KD細胞を培養し、それぞれの増殖を比較を行った。これらの環境は、実際にソラフェニブ投与によって起こり得る腫瘍の環境を細胞培養レベルに抽出したものである。

AMPK-KD細胞株はAMPK-controlに比べ正環境下で若干増殖速度が速い傾向があった。しかし、低酸素、無糖環境で培養しても2群に有意な変化は見られなかった。

Hep3B及びHuh-7の二つの肝細胞癌株で上記、培養実験を行ったが、AMPK-KDとcontrolに増殖において有意な差は認めなかった。

更なる検証の為に、Huh-7-AMPK-KDとcontrolをマウス皮下へ接種し腫瘍を形成させた後にソラフェニブを投与した。

無治療群の比較で、Huh-7 controlとHuh-7-AMPK-KDに腫瘍増大速度に差は見られなかった。また、ソラフェニブ投与においても2群に差は見られなかった。

上記、培養実験及びマウス実験から腫瘍のAMPKはソラフェニブ投与の耐性には関与しないと判断した。

次に、その他の癌細胞のエネルギー代謝において重要な分子に着目し、それらの検証を行った。CD147は細胞の乳酸排泄に関わる分子、PKM2は細胞の解糖系代謝に関わる重要な分子として知られ、それらの欠損肝細胞癌株をsh-RNAを用いて作成した。

mRNAからcDNAを作製しリアルタイムPCRを用いて評価したところ、80%以上の標的遺伝

子の発現低下を確認した。

CD147-KD、PKM2-KD肝細胞癌株を前述の種々の環境下でcontrol細胞と増殖において差が出るか検証したが、明らかな差は認めなかった。エネルギー代謝は単一の分子だけでなく、様々なシグナル伝達が相補的に作用しているため、一つの分子を標的として評価検証を行っても結果が出なかったことが予測される。

ソラフェニブ投与など血管新生阻害剤では腫瘍の虚血が引き起こされる。虚血に伴う強い低酸素状態により癌細胞は壊死、アポトーシスを引き起こす。低酸素状態は細胞に低酸素誘導蛋白(Hypoxia-inducible factor)の活性化をもたらす。

皮下腫瘍モデルでソラフェニブなどの血管新生阻害剤を投与すると強い低酸素が引き起こされ、HIFとその下流蛋白が活性化する事を本研究で確認した。

肝細胞癌株皮下腫瘍モデルに対してHIF抑制剤を投与すると有意に抗腫瘍効果を認めた。また、免疫染色法で血管数を評価すると有意に治療群で減少が見られた。血管新生に関わる蛋白発現を評価すると、種々の血管新生誘導蛋白が治療群では有意に減少している事が明らかになった。これらの結果を国際学術誌に2015年に報告した。

#### 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 2 件)

研究代表者 筆頭著者

Hideki Iwamoto, Toru Nakamura, Hironori Koga, Mitsuhiko Abe, Takuji Torimura

Inhibition of hypoxia-inducible factor via upregulation of von Hippel-Lindau protein induces angiogenic switch off in a hepatoma mouse model

Molecular Therapy Oncolytics  
2015-2-15020, 査読有

研究代表者 責任著者

Takuji Torimura, Hideki Iwamoto, Toru Nakamura, Mitsuhiko Abe, Hironori Koga

Antiangiogenic and antitumor activities of aflibercept, a soluble VEGF receptor-1 and -2, in a mouse model of hepatocellular carcinoma

[学会発表](計 4 件)

日本臨床分子形態学会

2015年9月18日~2015年9月19日

長崎県 長崎大学医学部 ポンペ会館

肝癌における血管新生の重要性

日本消化器病学会 肝臓大会  
2015年10月8日～2015年10月11日  
東京都 グランドプリンス新高輪  
腫瘍 Transglutaminase 2 を標的とした新規  
血管新生阻害剤 SQAP の肝細胞癌に対する  
効果の基礎的検討

第52回肝臓学会総会  
2016年5月19日～2016年5月20日  
千葉県 千葉市美浜区  
マウス肝癌モデルを用いた Notch 抑制剤の効果  
検討

第75回日本癌学会学術総会  
2016年10月6日～2016年10月8日  
パシフィコ横浜  
PIGF-induced VEGFR1-dependent vascular  
remodeling determines opposing antitumor  
effect and drug resistance

〔図書〕(計 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

岩本 英希 (IWAMOTO, Hideki)  
久留米大学・内科学講座消化器内科部門・  
助教  
研究者番号: 40529541

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )