

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：37116

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2022

課題番号：16K19376

研究課題名（和文）細胞ストレス防御機構の阻害を介したソラフェニブの抗腫瘍効果

研究課題名（英文）Sorafenib enhances anti-tumor effects via inhibiting cytoprotective mechanisms from cellular stress in hepatocellular carcinoma

研究代表者

本間 雄一（HONMA, Yuichi）

産業医科大学・医学部・助教

研究者番号：30620984

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：小胞体ストレス誘導剤である thapsigargin、tunicamycin、puromycin や、プロテアソーム阻害薬である bortezomib、epoxomicin、ALLN に、ソラフェニブを併用負荷すると unfolded protein response による spliced XBP1 の発現が減少し、レンバチニブの併用では小胞体ストレス誘導により増加した。Autophagic flux はレンバチニブよりもソラフェニブで亢進した。小胞体ストレス誘導剤単独に比し、ソラフェニブまたはレンバチニブの併用で生細胞数は有意に減少したが、アポトーシスはソラフェニブ併用で減少し、レンバチニブ併用で増加した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能な進行肝細胞癌に対する全身薬物療法は、免疫チェックポイント阻害薬の登場により進歩したが、その効果は十分とは言えない。マルチキナーゼ阻害薬であるソラフェニブとレンバチニブは、進行肝細胞癌に対する一次治療薬である。両薬剤の使い分けに明確な基準はなく、VEGFR や PDGFR などの受容体型チロシンキナーゼの阻害作用とは別に、両薬剤の肝細胞への直接作用を解明することは抗腫瘍効果の向上につながると考えられる。本研究により、従来の標的分子以外に、マルチキナーゼ阻害薬でもそれぞれ作用機序が異なることが判明し、薬剤変更は十分に意味があり、小胞体ストレス誘導剤との併用も抗腫瘍効果の上乗せが期待された。

研究成果の概要（英文）：Cotreatment of ER stress-inducers or proteasome inhibitors with sorafenib decreased the spliced XBP1 expression, a downstream of unfolded protein response, but lenvatinib increased spliced XBP1. Sorafenib exacerbated autophagic flux more than lenvatinib. Sorafenib and lenvatinib decreased cell viability cotreated with ER stress inducers.

研究分野：肝細胞における細胞ストレス防御機構とオートファジーの抗腫瘍効果への影響

キーワード：小胞体ストレス 酸化ストレス 肝細胞癌 分子標的薬 オートファジー プロテアソーム ソラフェニブ レンバチニブ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

ウイルス性肝炎やアルコール性肝障害、非アルコール性脂肪肝炎から肝細胞癌に至るまで、様々な肝疾患に酸化ストレスや小胞体ストレスが関係する。これまでに我々は、肝細胞における酸化ストレスや小胞体ストレスと、細胞内の蛋白分解機構のひとつであるオートファジー、肝細胞内封入体であるMallory-Denk体の形成に着目し研究を行ってきた。培養肝細胞において、マルチキナーゼ活性阻害作用をもつソラフェニブが、小胞体ストレスに対する防御機構であるunfolded protein response (UPR) や、肝細胞の中間径線維の構成成分のひとつであるケラチンのリン酸化を阻害し、さらに細胞内の異常蛋白の分解に重要な異常蛋白のコピキチン化や、細胞保護的に作用すると考えられているMallory-Denk体様の肝細胞内封入体の形成を阻害し、プロテアソーム阻害薬との併用で相乗的に細胞死を誘導することを報告した(Honma Y, Harada M, et al. *Exp Cell Res* 2013.)。他にもソラフェニブはAktの活性化を阻害し、下流のmTOR活性を阻害すること、さらに癌細胞の浸潤、転移に関わるJNK、p38といったstress-activated protein kinaseの活性を阻害し、抗腫瘍作用を発揮することを報告した(Honma Y, Harada M, et al. *J Gastroenterol* 2014.)。これらの機序として、ソラフェニブが異常蛋白のコピキチン化に関与するキナーゼや、UPRへ作用し、小胞体ストレスに対する癌細胞の脆弱性を誘導すると考えられた。これらの結果から、ソラフェニブはマルチキナーゼ阻害薬として、従来報告されているRafや受容体型チロシンキナーゼの阻害とは異なる、様々なキナーゼ活性を阻害し、抗腫瘍作用を発揮する可能性があり、その詳細を明らかにすることは抗腫瘍作用や副作用へ関与を解明する上で重要であると考えた。そこで、ソラフェニブのUPRやオートファジーへの詳細な作用や、他の分子標的薬であるレンバチニブとの作用の違いを明らかにするため本研究を開始した。

2. 研究の目的

切除不能な肝細胞癌に対する全身薬物療法の進歩により、抗腫瘍効果や生命予後の改善が得られるようになったが、その効果はいまだ十分なものとは言えない。そこで、薬剤耐性にも関与すると考えられるUPRやオートファジー、酸化ストレスに関与するKeap1-Nrf2系への、肝細胞癌に対する一次治療薬であるソラフェニブ、レンバチニブの作用について明らかにし、肝細胞癌に対する薬物治療の抗腫瘍効果の向上を目指すことを目的とする。

3. 研究の方法

肝癌細胞株 (Huh7、Hep3B、HepG2) と不死化ヒト肝細胞株 (OUMS29) に、ソラフェニブとレンバチニブを負荷し、UPR、オートファジーへの作用を免疫染色による蛍光顕微鏡観察、Western blotting で検討した。小胞体ストレスは sarcoplasmic/endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase (SERCA) 阻害薬の thapsigargin、糖鎖修飾阻害薬の tunicamycin、蛋白合成阻害薬の puromycin を、またプロテアソーム阻害薬の epoxomicin、acetyl-leucyl-leucyl-norleucinal (ALLN) と bortezomib を負荷して誘導した。UPR は IRE1、TRAF2、PERK、phospho-PERK、phospho-eIF2、JNK、phospho-JNK、spliced XBP1、CHOP で、DNA 損傷は H2AX、53BP1 で、apoptosis は cleaved PARP と K18 fragment で評価した。オートファジーは LC3 と p62 の Western blotting、また vacuolar-type H^+ ATPase 阻害薬である bafilomycin A1 を負荷した turnover assay、tandem-fluorescent-tagged LC3 の遺伝子導入による mRFP-LC3 と GFP-LC3 の局在観察でオートファジーの流れ (autophagic flux) を評価した。細胞死はアポトーシスを PARP や K18 の断片化を Western blotting、核の断片化の形態観察で、cell viability assay を trypan blue exclusion test にて行った。

4. 研究成果

Phospho-PERK、phospho-eIF2、phospho-JNK の発現は、小胞体ストレス誘導剤とソラフェニブまたはレンバチニブの併用負荷でいずれも亢進した。一方で、spliced XBP1 の発現は小胞体ストレス誘導剤単独に比し、レンバチニブの併用負荷では増加したのに対し、ソラフェニブの併用負荷では減弱した。XBP1 の発現自体もソラフェニブの併用では減少し、レンバチニブでは増加した。よって、ソラフェニブは UPR のストレスセンサーである ATF6 と、IRE1 の一部を阻害し、XBP1 の発現を減少させると考えられた。小胞体ストレス誘導剤単独に比し、ソラフェニブまたはレンバチニブの併用負荷で生細胞数は有意に減少したが、アポトーシスの誘導はソラフェニブの併用負荷で減少し、レンバチニブの併用負荷で増加した。CHOP の発現はアポトーシスの誘導に関係するが、ATF6 や spliced XBP1 は CHOP の誘導に関与するため、ソラフェニブはそれらを抑制することでアポトーシスが減弱すると考えられた。

オートファジーの検討では、ソラフェニブ、レンバチニブの両者でオートファゴソームの増加を認めた。ソラフェニブ単独に比し、bafilomycin A1 とソラフェニブの併用で細胞死が増加した。レンバチニブでは、bafilomycin A1 との併用による細胞死の増加は限定的であった。Autophagic flux は、tandem-fluorescent-tagged LC3 のトランスフェクションで、プロテアソーム阻害薬との併用下においてソラフェニブで亢進したのに対し、レンバチニブでは逆に抑制された。

小胞体に備わるストレスセンサーである ATF6、IRE1、PERK のうち、ソラフェニブは ATF6 経路と IRE1 経路の XBP1 を介した作用を阻害し、小胞体ストレスへの脆弱性を惹起する可能性

が示された。小胞体ストレスの誘導下において、レンバチニブではアポトーシスによる細胞死が増強するのに対し、ソラフェニブでは CHOP の発現抑制によりアポトーシスが減少するものの、小胞体ストレスに対する漸弱性を高めることでネクローシスによる細胞死を増強すると考えられた。またソラフェニブでは、オートファジーの誘導による細胞保護作用が認められるが、レンバチニブでは細胞保護作用は限定的であり、両薬剤の抗腫瘍効果の差にオートファジーが関与している可能性が示唆され、ソラフェニブではオートファジー阻害剤との併用で抗腫瘍効果の向上が期待されると考えられた。以上の作用は、小胞体ストレス下での肝癌細胞死の誘導に寄与し、抗腫瘍効果に関連すると考えられた。

進行肝細胞癌に対する薬物治療において、肝癌細胞への直接的な作用はそれぞれの分子標的薬で異なる可能性があり、これらを調整することにより、分子標的薬の抗腫瘍効果を高め、治療効果の向上が期待できると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 本間雄一、草永真志、吉富健悟、大江晋司、宮川恒一郎、原田 大
2. 発表標題 肝癌細胞に備わる小胞体ストレス応答へのsorafenibとlenvatinibの作用の相違点
3. 学会等名 第59回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 本間雄一、原田 大
2. 発表標題 小胞体ストレス応答への作用に着目した肝癌分子標的治療
3. 学会等名 第54回日本臨床分子形態学会総会・学術集会
4. 発表年 2022年～2023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
研究協力者	草永 真志 (KUSANAGA MASASHI)		
研究協力者	大江 晋司 (OE Shinji)		

6. 研究組織（つづき）

	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
研究協力者	宮川 恒一郎 (MIYAGAWA Koichiro)		
研究協力者	原田 大 (HARADA Masaru)		

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