

令和 3 年 6 月 9 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K07914

研究課題名(和文) 肝癌細胞特異的薬物搬送とClass選択的HDAC阻害薬による新規肝癌治療開発

研究課題名(英文) Development of novel treatment for liver cancer with class-selective HDAC inhibitors

研究代表者

宮西 浩嗣 (Miyanishi, Koji)

札幌医科大学・医学部・准教授

研究者番号：60372819

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)は様々な癌で発現し、癌治療耐性に関与している。HDAC class IIaは肝癌細胞で認められる。本研究では肝細胞癌に対してHDAC class IIa阻害薬をレンバチニブと併用することで、相乗的な抗腫瘍効果を誘導することを見出した。レンバチニブはFibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4)を阻害することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられている。両薬剤併用でのアポトーシスの誘導はFGFR4の発現に依存していると考えられた。さらにFGFR4の発現低下により、相乗的効果が誘導されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌の標準的な薬物治療には、癌細胞や血管新生因子の増殖を抑制する、レンバチニブ等の分子標的薬治療と、血管新生阻害薬と免疫チェックポイント阻害薬の併用が挙げられる。また、切除できない肝細胞癌の治療として、肝動脈化学塞栓術がある。本研究の結果は、レンバチニブの効果を増強するHDAC class IIa阻害薬を用いた新たな薬物療法が有効である可能性を示した。いずれの治療が選択すべきかについては、肝細胞癌の個数、サイズや肝機能をもとに考えられることが多いが、本研究結果はFGFR4の発現が多い肝細胞癌では本療法がより有効であることを示し、治療効果を予測できる可能性も示唆された。

研究成果の概要(英文)：Histone deacetylase (HDAC) is expressed in various cancers and is involved in cancer treatment resistance. HDAC class IIa is found in hepatocellular carcinoma cells. In this study, we found that the combined use of HDAC class IIa inhibitors with lenvatinib induces a synergistic antitumor effect. Lenvatinib is thought to exert an antitumor effect by inhibition of fibroblast growth factor receptor 4 (FGFR4). It is considered that the induction of apoptosis by the combined use of both drugs depends on the expression of FGFR4. Furthermore, the decreased expression of FGFR4 was considered to induce a synergistic effect.

研究分野：臨床腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 化学療法 ヒストン脱アセチル化酵素 相乗効果

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 肝癌は、本邦における癌死亡原因の第5位であり、年間約28,000人を超える死亡数が推計されている。肝内限局例では切除や局所療法により治癒が見込まれるが、局所および異所再発率が高く、これら治療の反復には限界がある。細胞傷害性抗癌薬は、肝動脈内投与においてのみ有効性が示されているが、全身投与では無効であり、脈管・リンパ節浸潤や遠隔転移を伴う例の予後は極めて不良である。

(2) 全身薬物療法として分子標的薬である Sorafenib と Regorafenib の有効性が無作為化比較試験で明らかにされたものの、プラセボ群よりも2-3ヶ月の予後延長効果を示すのみである。有効性の高い治療法が確立されない原因として、肝癌患者の多くに肝機能低下がみられ、骨髄抑制や消化器毒性が出やすい細胞傷害性抗癌薬では延命効果を示すことができなかつたことがあげられる。その結果、比較的有害事象の少ないマルチキナーゼ阻害薬の開発が多数、現在もなお行われているが、抗腫瘍効果は低く、これまでのところ効果は限定的である。

(3) 従来の問題点を克服する高い抗腫瘍効果の導出方法と有害事象の軽減方法が問われている。今、より効果の高い肝癌治療法開発が必要であり、そのためには、忍容性を保ちつつ腫瘍への高濃度抗癌薬を到達させる工夫と、マルチキナーゼ阻害薬以外の分子標的薬の肝癌治療への応用に、開発研究の余地があるものと考えられる。

2. 研究の目的

(1) *in vitro* において、現在の進行肝細胞癌標準治療薬である lenvatinib および選択的 HDAC Class IIa 阻害薬ならびに両者併用治療の細胞傷害効果を明らかにする。

(2) *in vivo* において、Lenvatinib および選択的 HDAC Class IIa 阻害薬ならびに両者併用治療における抗腫瘍効果と予後改善効果を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 選択的 HDAC Class a 阻害薬による抗腫瘍効果および作用機序の検討。
選択的 HDAC class a 阻害薬、TMP269 を用いて、WST-1 assay により細胞傷害効果の検討を行う。IC50 値を同定し、アポトーシス誘導効果、アポトーシス誘導および抑制因子の発現変化についても検討する。また lenvatinib との併用も行い、相乗効果を Compusyn software を用いた combination index を計算することにより判定し、さらには RNA およびタンパクレベルでの相乗効果の機序の解析を行う。

(2) 肝癌担癌マウスの作製と lenvatinib および選択的 HDAC Class a 阻害薬による抗腫瘍効果の検討

1) ノードマウスに 5×10^6 個のヒト肝癌細胞株を接種し、担癌マウスを作製する。腫瘍径が約 5 mm になった時点で PBS, lenvatinib をマウスに経口投与する。またそれぞれの群に選択的 HDAC class a 阻害薬を併用する群と選択的 HDAC class a 阻害薬単独群も作製する。腫瘍を摘出し HE 染色で腫瘍部位を確認し、抗腫瘍効果を解析する。

2) Lenvatinib をそれぞれの系において 10 匹ずつのマウスに経静脈・経口投与する。またそれぞれの群に選択的 HDAC class a 阻害薬を併用する群と選択的 HDAC class a 阻害薬単独群も作製する。腫瘍径の変化を経時的に観察し、抗腫瘍効果を検討する。投与後 1 週目、2 週目に腫瘍を摘出し、腫瘍細胞内にみられる腫瘍細胞を HE 染色で同定し形態を観察し、さらに同一切片内の凍結切片標本におけるアポトーシス細胞 TUNEL 染色を行い検討する。

(3) Orthotopic model を用いた検討

1) ヒト肝癌細胞株に pGL-4 luciferase vector を遺伝子導入し、hygromycin によってクローニング後 permanent clone を樹立する。これらの細胞株が luciferase 活性を持つことを各細胞から細胞抽出液を作製し luciferase assay で確認した後、*in vivo* モデルに使用する。

2) ノードマウスにケタラールを腹腔内投与し十分な麻酔条件下で開腹後、 1×10^6 個の細胞を肝に移植し、ルシフェリン (100 μ l, 20 mg/ml) を腹腔内投与して IVIS *in vivo* image analyzer で腫瘍を確認する。

3) IVIS *in vivo* image analyzer を用いて real time に腫瘍形成を追跡し、5 mm 大の腫瘍形成が確認された後、PBS, lenvatinib をそれぞれ 5-10 匹のマウスに投与する。またそれぞれの群に選択的 HDAC class a 阻害薬を併用する群と選択的 HDAC class a 阻害薬単独群も作製する。

各群における腫瘍縮小率を経時的に解析する。また治療による生存率 (Kaplan-Meier) を検討する。治療開始 2 週目に HE 染色標本, 同一切片内における凍結切片標本を作製し, Ki-67 染色, TUNEL 染色によるアポトーシスの評価を行う。さらに, 得た腫瘍組織を用いて各種アポトーシス関連分子 (caspase-3, caspase-8, PARP) および AFP-L3 の発現を検討し抗腫瘍効果の分子レベルの解析を同時に施行する。

4. 研究成果

(1) Growth inhibition assay
Lenvatinib 単剤における IC50 は, HuH-7 で 0.35 μ M, JHH-7 で 4.59 μ M, JHH-6 で 18.9 μ M であった。TMP269 単剤における IC50 は, HuH-7 で 36.6 μ M, JHH-7 で 35.4 μ M, JHH-6 で 34.8 μ M であった (図 1)。

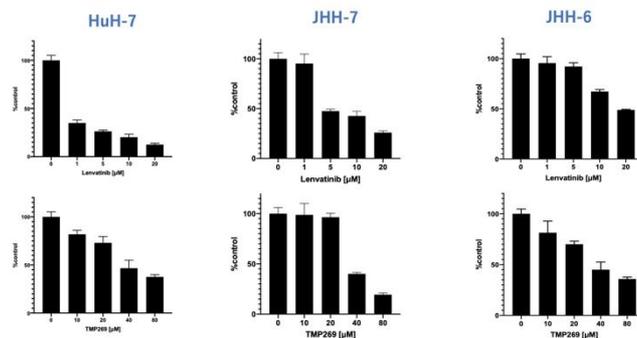


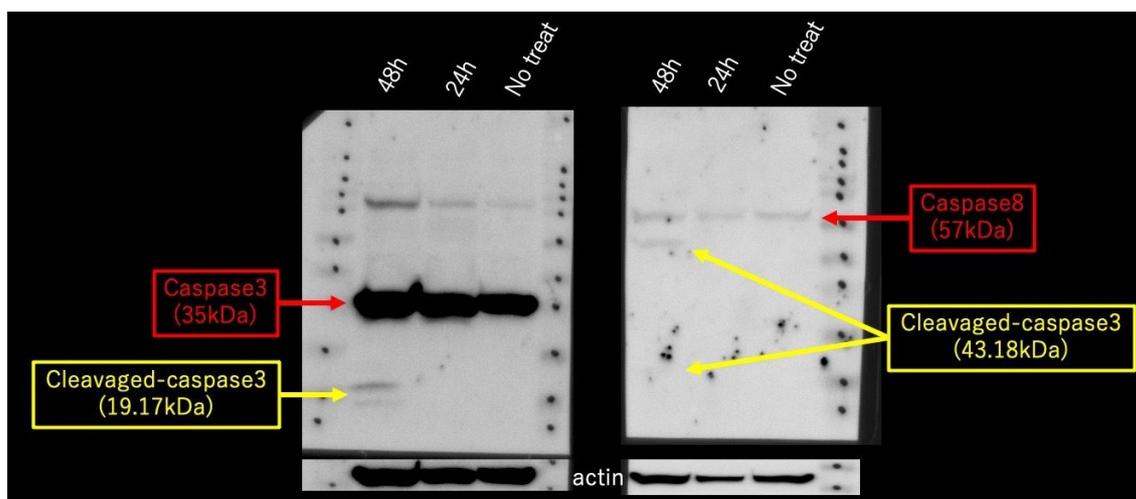
図 1

(2) Apoptosis assay

Lenvatinib 1.2M と TMP269 20-30 μ M を併用し, 7AAD および Annexin V による Apoptosis assay (flow cytometry) を行ったところ, 分化型肝細胞癌株である HuH-7 と JHH-7 において apoptosis 誘導の相乗効果が認められた (HuH-7; TMP269 20 μ M CI 0.74188, TMP269 25 μ M CI 0.70258, TMP269 30 μ M CI 0.76634. JHH-7; TMP269 20 μ M CI 95451, TMP269 25 μ M CI 0.82710, TMP269 30 μ M CI 0.79735.)。未分化型肝細胞癌である JHH-6 では apoptosis 誘導が認められなかった。

(3) Caspase 3/8 induction

同様に Western blotting により caspase-3 と caspase-8 の産生増加が確認された (JHH-7)。



(3) Lenvatinib, TMP269 併用による抗腫瘍相乗効果機序の検討

相乗効果の機序解析として, Lenvatinib 標的蛋白である FGFR4 と FGF19 に着目した。薬剤刺激を加えていない各 cell line の発現状況は, JHH-6 ではどちらも発現なく, HuH-7 と JHH-7 では両者の発現が認められた。TMP269 30 μ M で 48 時間刺激をすると, HuH-7 と JHH-7, 特に JHH-7 で Lenvatinib のターゲットである FGFR4 の発現が低下した。この変化が故に特に JHH-7 で Lenva 併用の apoptosis 効果が強力であると推察された。

(4) 肝癌担癌マウスの作製と lenvatinib および選択的 HDAC Class a 阻害薬による抗腫瘍効果の検討・Orthotopic model を用いた検討

現在, 作製と検討が進行中である。

(5) Lenvatinib, TMP269 内包フコース結合リポソーム

作製が遅延しており, でき次第解析を開始する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 久保智洋、宮西浩嗣、伊藤亮
2. 発表標題 肝細胞癌におけるヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)の発現と HDAC class IIa 阻害剤及び lenvatinib 併用による抗腫瘍効果についての検討
3. 学会等名 日本肝臓学会総会
4. 発表年 2021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
研究分担者	加藤 淳二 (KATO Junji) (20244345)	札幌医科大学・医学部・教授 (20101)	
研究分担者	田中 信悟 (TANAKA Shingo) (60561024)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	
研究分担者	菊地 尚平 (KIKUCHI Shohei) (80515792)	札幌医科大学・医学部・助教 (20101)	

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
---------	---------