

令和 2 年 5 月 16 日現在

機関番号：12301

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K16299

研究課題名(和文) 肝癌関連線維芽細胞を標的とした革新的治療法の開発

研究課題名(英文) Development of innovative treatment targeting liver cancer associated fibroblast

研究代表者

塚越 真梨子 (Tsukagoshi, Mariko)

群馬大学・大学院医学系研究科・助教

研究者番号：60781317

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)：本研究では肝癌における癌関連線維芽細胞(CAF)の機能に注目し、CAFを標的とした新たな治療戦略を開発することを目的とした。肝癌検体からCAFを樹立し機能解析を行った。CAFは肝癌細胞株の浸潤・増殖を促進させた。肝星細胞の活性化および線維化を抑制するConophylline(CnP)がCAFを制御する可能性を検討したところ、CnPはCAFの活性化を抑制し、液性因子産生を抑制した。CnPはCAFによる肝癌細胞株の増殖・浸潤促進およびSorafenib耐性を抑制し、腫瘍を縮小させた。これらの結果から、CnPによる線維化抑制作用により、CAFの活性が抑制され、肝癌の進展が抑制できる可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌は予後不良で、明らかなウイルス肝炎感染を伴わない肝癌が増加傾向であり、新たな治療戦略が求められている。近年、癌の微小環境における癌細胞と周囲間質との相互作用の重要性が報告され、癌関連線維芽細胞(CAF)の機能が注目されている。本研究ではCAFの役割を明らかにし、Conophylline(CnP)の線維化抑制によるCAFの制御の可能性を検討し、肝癌に対する新たな治療戦略を開発することを目的とした。研究の結果、CnPによりCAFの活性が抑制され、肝癌の進展が抑制できる可能性が示された。今後、発癌の抑制や既存制癌剤併用による治療効果の増強など、革新的治療に結びつく可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Hepatocellular carcinoma (HCC) is a malignancy that is challenging to treat. Cancer-associated fibroblasts (CAFs) are reported to promote the malignant behavior of HCC cells. Conophylline (CnP) has been reported to suppress activated hepatic stellate cells in liver fibrosis. We aimed to determine whether CnP is useful in suppressing tumor growth in HCC. CAFs promoted the proliferation and invasion of HCC cells. CnP suppressed activated CAFs and inhibited the HCC-promoting effects of CAFs. CnP significantly reduced the levels of cancer-promoting cytokines secreted by CAFs. An in vivo study demonstrated that combined therapy with CnP and sorafenib against CAFs and HCC cells showed the strongest inhibition of tumor growth compared with the control and single treatment groups. Combination therapy with CnP and existing anti-cancer agents may be a promising therapeutic strategy in overcoming refractory HCC with activated CAFs.

研究分野：消化器外科学

キーワード：癌関連線維芽細胞 肝癌 Conophylline 薬剤耐性 サイトカイン 癌微小環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

肝癌は全世界で年間約 70 万人が罹患し、日本における年間死亡者数は約 3 万人とされる。近年では肥満や非アルコール性脂肪性肝疾患など、明らかなウイルス肝炎感染を伴わない肝癌が増加傾向にある。手術、抗癌剤、放射線治療が行われているが、いずれも治療効果は十分でなく、いまだ難治性で予後不良な疾患であり、新たな治療戦略が必要である。

癌組織は癌細胞のみならず、様々な細胞から構成されている。これまでは、主に癌細胞に注目して癌の増殖、浸潤、転移のメカニズムを解明する研究が行われてきた。近年、癌周囲を取り巻く細胞外マトリックスや、線維芽細胞、血管内皮細胞、免疫担当細胞などの間質細胞が注目され、癌と間質との相互作用の重要性が指摘されている。こうした癌の微小環境は癌の増殖や浸潤、転移などの癌の生物学的な動態にも極めて重要なことが報告されている。

癌間質の中でも線維芽細胞(癌関連線維芽細胞: Cancer associated fibroblast(CAF))は重要とされ、様々な成長因子やサイトカインを分泌することで、癌化の促進や癌細胞の増殖、浸潤に関わる。肝臓においては、慢性炎症や線維化は肝癌発症のリスクとされており、CAF の機能の解明やその制御は、肝癌発現あるいは進展を抑制する上で重要な役割を果たしている可能性がある(Kubo N et al. World J Gastroenterol 2016;22:6841-50)。

我々は以前、タイ原産の熱帯植物 *Ervatamia microphylla* の葉から単離された Conophylline が、*in vitro*, *in vivo* において、肝星細胞の活性化を抑制し、肝臓の線維化を抑制、アポトーシスを誘導することを報告した(Kubo N et al. Liver int 2014;34:1057-67)。Conophylline は肝星細胞の collagen 1,  $\alpha$ -SMA 発現を低下させ、caspase-3 を活性化させてアポトーシスを誘導した。さらに *in vivo* での検討において、conophylline 投与が肝臓の線維化を抑制することが示された。したがって、Conophylline による線維化抑制作用により、肝細胞癌の CAF の活性が抑制され、肝癌の発現あるいは進展が抑制できる可能性があると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は、1. 肝癌進展における CAF の役割を明らかにする、2. Conophylline を用いた CAF の制御による新たな治療開発の可能性を追求する、3. 近年増加している非アルコール性脂肪肝炎発症モデルにおける線維化抑制を介した肝発癌抑制効果を明らかにすることである。

本研究では、発癌や治療抵抗性における癌の微小環境の重要な構成細胞である癌関連線維芽細胞の役割に注目した点が独創的と言える。これまで研究の中心であった癌細胞自体ではなく間質を治療標的とすることで、発癌の抑制や既存の制癌剤との併用による治療効果増強など、革新的な治療に結びつく可能性がある。さらには、動物実験レベルにおいて、conophylline 投与による明らかな副反応は認めていないことから、制癌剤治療の問題点である有害事象を克服した新たな治療ターゲットとなる可能性があり、治療成績の向上や予後の改善が期待できる。

### 3. 研究の方法

#### *in vitro* における CAF の機能解析

はじめにヒト肝癌の CAF の培養系を確立する。肝切除標本より癌部・非癌部の生組織をそれぞれ切除し、コラゲナーゼ処理をした後に遠心分離して培養し、CAF および非癌部肝線維芽細胞(NF)を作成する。分離した細胞は免疫染色( $\alpha$ -SMA, vimentin, Hep Par 1)により線維芽細胞であることを確認する。機能としては、細胞増殖アッセイにてそれぞれの細胞の増殖能を検証し、Matrigel invasion kit を用いて浸潤能を評価、さらに western blot にて筋線維芽細胞マーカー( $\alpha$ -SMA, Collagen 1)の発現を比較検討する。

#### Conophylline による CAF の抑制効果の検討

の培養細胞に Conophylline を濃度を変えて投与し、星細胞および線維化の抑制効果を検証する。細胞増殖能、DNA 合成能、アポトーシス細胞数(DNA ladder, TUNEL 法)を比較検討する。また肝星細胞活性化の指標である  $\alpha$ -SMA の蛍光抗体による染色し、線維化の指標である  $\alpha$ 型コラーゲン、 $\alpha$ -SMA 産生量を western blot にて比較検討する。

#### CAF 培養上清の機能解析および Conophylline 投与による変化を検証

細胞培養上清中のサイトカインをサイトカインアレイを用いて評価し、Cytometric Bead Array を用いて産生量を計測する。またさらに、培養細胞に Conophylline を投与した際のサイトカインの変化を比較検討する。

#### CAF 培養上清による肝癌細胞の薬剤耐性機序の検討

サイトカインアレイデータをもとに、CAF 培養上清中のサイトカインによる肝癌細胞への影響を明らかにするため、CAF 培養上清で肝癌細胞の培養を行い、増殖能を評価する。CAF 培養上清中のサイトカイン等による肝癌細胞の薬剤(gemcitabine, sorafenib)耐性を評価し、Conophylline 投与により薬剤耐性が解除されるか検討する。

#### *in vivo* における CAF の評価および Conophylline の作用の検証

肝癌細胞株と CAF を混合し、NOD-SCID マウスの背部に接種することで、皮下腫瘍モデルを作成する。肝癌細胞単独群と CAF 混合群とで腫瘍の増大に差があるか検証する。さらに両群に Conophylline を投与することで腫瘍増殖に変化が生じるか検証する。

#### *in vivo* における肝癌細胞の薬剤耐性機序の検討

マウス皮下腫瘍モデルにおいて sorafenib 耐性を評価し、Conophylline 投与が薬剤耐性に与える影響を検証する。

#### Conophylline 作用機序の解明

In vitro での検証において、Conophylline がサイトカイン産生の抑制に関わることが明らかとなった。抑制されたサイトカインの発現制御に関わる因子を同定することで、Conophylline の作用機序を明らかにする。

#### 4. 研究成果

##### in vitro における CAF の機能解析

はじめにヒト肝癌切除標本より CAF を樹立し、樹立細胞の SMA を確認。安定した増殖を示す CAF の樹立に成功した。次に CAF の肝癌細胞株に対する影響を検討し、CAF が肝癌細胞株の増殖・浸潤を促進することを明らかにした。

##### Conophylline による CAF の抑制効果の検討

CAF 培養細胞に Conophylline を濃度を変えて投与し、星細胞活性化の指標である SMA の発現を western blot 法で確認。Conophylline が CAF の活性化を抑制することを明らかにした。また肝癌細胞株において、CAF による増殖・浸潤促進効果を Conophylline が抑制することを明らかにした。

##### CAF 培養上清の機能解析および Conophylline 投与による変化を検証

CAF 培養細胞に Conophylline を投与した際のサイトカインの変化を比較検討し、Conophylline がサイトカイン産生を抑制することをサイトカインアレイおよび ELISA を用いて示した。

##### CAF 培養上清による肝癌細胞の薬剤耐性機序の検討

CAF 培養上清中のサイトカイン等による肝癌細胞の sorafenib 耐性を評価し、Conophylline 投与により薬剤耐性効果が抑制されることを明らかにした。

##### in vivo における CAF の評価および Conophylline の作用の検証

肝癌細胞株 PLC と CAF を混合し、NOD-SCID マウスの背部に接種することで、皮下腫瘍モデルを作成した。肝癌細胞(PLC  $5.0 \times 10^6$ )単独群と、肝癌細胞 + CAF 群(PLC  $5.0 \times 10^6$ +CAF  $1.0 \times 10^6$ )で腫瘍増殖を検討したところ、CAF は in vivo においても腫瘍増殖を有意に促進した。

##### in vivo における肝癌細胞の薬剤耐性機序の検討

PLC+CAF のマウス皮下腫瘍モデルにおいて、コントロール群、コノフィリン投与群(Conophylline 1mg/body/every 2days)、ソラフェニブ投与群(sorafenib 10mgbody/every days)、ソラフェニブ + コノフィリン投与群で腫瘍増殖を比較検討した。Conophylline 投与は腫瘍増殖を抑制し、さらに sorafenib 投与群において増殖抑制効果を増強することを明らかにした。

##### Conophylline 作用機序の解明

In vitro での検証において、Conophylline がサイトカイン産生の抑制に関わることが明らかとなった。CAGE 解析により、Conophylline 投与により、GPR68 の mRNA が強く抑制されたことから、サイトカイン制御因子 GPR68 の抑制を介し Conophylline が作用している可能性が示された。

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 山中 崇弘
2. 発表標題 肝細胞癌における癌関連線維芽細胞を標的とした新たな治療の開発
3. 学会等名 第118回 日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 山中 崇弘
2. 発表標題 癌関連線維芽細胞の制御に基づいた肝細胞癌の新規治療の開発
3. 学会等名 第57回 日本癌治療学会
4. 発表年 2019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