

令和 4 年 6 月 17 日現在

機関番号：17201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K16776

研究課題名（和文）NASH/NAFLD肝癌に対するファルネシル転換酵素阻害薬による新規治療戦略

研究課題名（英文）Novel therapeutic strategy for hepatocellular carcinoma by farnesyltransferase inhibitor

研究代表者

田中 智和（Tanaka, Tomokazu）

佐賀大学・医学部・助教

研究者番号：60781903

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）：近年、NAFLD/NASHに起因する肝癌は明らかに増加しているが、有効な予防法や薬剤は存在しない。本研究では、NAFLD/NASH肝癌に対する新規治療戦略として、ファルネシル転換酵素阻害薬（FTI）の抗腫瘍効果とそのメカニズムを検証した。FTIは複数の肝癌細胞株で抗腫瘍効果を認めた他、NAFLD/NASH肝癌を想定した炎症惹起または脂肪滴産生モデルでより強い抗腫瘍効果を示し、その作用メカニズムに抗炎症効果の関与が示された。また、NASH肝癌発生モデルマウスを用いた動物実験でもFTIの抗腫瘍効果が確認され、NAFLD/NASH肝癌に対する新規治療薬として期待の持てる結果となった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果（FTIのNAFLD/NASH肝癌に対する抗腫瘍効果の証明とその作用機序の検討）によって、今後も増加が見込まれるNAFLD/NASH肝癌患者に対する新たな治療選択肢の一つとなり得る可能性がある。さらに、抗腫瘍効果の作用機序の一端として、NAFLD/NASH肝癌の発癌および進行過程に大きく寄与すると思われる炎症反応をFTIが制御することから、NAFLD/NASH肝癌の治療（腫瘍縮小や進行抑制）のみならず、NAFLD/NASHに対して使用することで後の発癌抑制につながる可能性がある。

研究成果の概要（英文）：In recent years, hepatocellular carcinoma (HCC) caused by NAFLD/NASH has clearly increased, but there is no effective preventive method or therapeutic drug. In this study, we examined the antitumor effect of farnesyltransferase inhibitor (FTI) and its mechanism as a novel therapeutic strategy for NAFLD/NASH-related HCC. In addition to the antitumor effect observed in several HCC cell lines, FTI showed a stronger antitumor effect in an inflammation-inducing model or lipid droplet production model assuming NAFLD/NASH-related HCC, and the anti-inflammatory effect is involved in the mechanism of the action. Moreover, the antitumor effect of FTI was confirmed in animal experiment using NASH-related HCC development model mice, and our results in this study showed that FTI will be promising as a new therapeutic agent for NAFLD/NASH-related HCC.

研究分野：消化器癌

キーワード：ファルネシル転換酵素阻害薬 NAFLD/NASH関連肝癌 HIF-1 ファルネシル化 抗炎症反応

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

代表的な肝細胞癌の発癌素因であったウイルス性肝炎は、近年減少傾向にあり、特にC型では直接作用型抗ウイルス薬の登場により95%以上がウイルス排除されるようになった。一方、非アルコール性脂肪性肝障害 (non-alcoholic fatty liver disease : NAFLD) /非アルコール性脂肪性肝炎 (non-alcoholic steatohepatitis : NASH) に起因する肝癌は、近年明らかに増加している。NAFLD/NASH に対する有効な薬剤は存在しないことから、今後、同患者数や NAFLD/NASH 肝癌患者数はさらに増加し、2030年には NAFLD/NASH 肝癌患者数が現在の1.37倍になると予想されている^{1), 2)}。現在までに、NAFLD/NASH の発症・進展に関わる感受性遺伝子や病理学的特徴など、多くの研究報告がなされているが、NAFLD/NASH および NAFLD/NASH 肝癌における臨床的課題は多く、特にその有効な治療法が確立していない点は重要である。生活習慣病を基盤として発症するという観点から食事・運動療法は必須と考えられるが、NAFLD/NASH の進展および発癌抑制に特異的あるいは有効な薬剤の高いエビデンスはなく、既存の治療戦略では不十分と言わざるを得ない。従って、NAFLD/NASH の進展、発癌過程における新たな関連因子および治療ターゲットを検索し、これまでにない治療機序による新たな治療戦略が待望される。研究申請者はこれまでにファルネシル転換酵素 (FTase : Farnesyltransferase) に着目した研究を行い、同酵素阻害薬 (Farnesyltransferase inhibitor : FTI) の急性肝障害予防効果³⁾やインスリン抵抗性改善効果⁴⁾、さらに乳癌における転移抑制効果⁵⁾、高率に腹膜播種を来たす高悪性度胃癌細胞株に対する選択的抗腫瘍効果⁶⁾といった研究成果を報告してきた。よって、慢性炎症やインスリン抵抗性を基礎に惹起されると推定される NAFLD/NASH 肝癌に対して、FTI が有効な新規治療薬となる可能性に期待している。

2. 研究の目的

これまでの研究成果を NAFLD/NASH 肝癌における基礎的研究に応用し、本研究では「NAFLD/NASH の進展、発癌過程におけるファルネシル化の意義を分子レベルで解明すること」、また「ファルネシル転換酵素阻害薬による NAFLD/NASH 肝癌への抗腫瘍効果の検証とその作用メカニズムを解明すること」を目的とする。

3. 研究の方法

<NAFLD/NASH におけるファルネシル化と関連因子の評価、および FTI のそれらに対する是正効果の in vitro モデルでの検証>

複数の肝癌細胞株 (HepG2、Hep3B、Huh7) を用い、HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) および FTase の発現の程度を評価する。さらに、ファルネシル転換酵素阻害剤 (Tipifarnib) による HIF-1 抑制効果 ()、FTase の発現変化を評価する。なお、評価法としては主に Western blot を用いる。

(癌の悪性度やエネルギー代謝変容、また炎症に関わる key factor の一つである HIF-1 に着目)

NAFLD/NASH 肝癌を想定して炎症惹起モデル (TNF + IFN + LPS 添加) および脂肪滴産生モデル (パルミチン酸添加) を確立し、両モデルにおける HIF-1 および FTase、ファルネシル化の変化を評価する。さらに、それらの Tipifarnib 投与による発現変化 (HIF-1 抑制効果を含む) を評価する。なお、評価法としては主に Western blot を用いる。

コントロールおよび両モデルにおける癌悪性度 (腫瘍増殖能など) を評価する。なお、評価法としては主に Trypan blue を用いたセルカウント法を用いる。

コントロールおよび両モデルにおける炎症関連因子 (IL-6 など)、インスリン抵抗性 (PTP-1B、PTEN など)、酸化ストレス (活性酸素測定、酸化リン酸化の評価など)、アポトーシス (Caspase-3 や PARP の評価など) の変化について評価し、さらに、それらに対する Tipifarnib による是正効果を検証する。なお、評価法としては主に Western blot、ELISA、Flow cytometry を用いる。

<マウスモデルを用いた FTI の NAFLD/NASH 肝癌に対する抗腫瘍効果の検証>

NAFLD/NASH 肝癌モデルとして “STAM マウスモデル” および “DEN + CDAHFD モデル ()” の両モデルを用い、FTI による NAFLD/NASH 肝癌に対する抗腫瘍効果を検証する。FTI 投与は肝癌形成後に開始し、抗腫瘍効果の評価は腫瘍数やサイズを計測して評価、または肝臓をパラフィン切片化し、病理学的に評価する。

また、マウス血清にける IL-6 を評価し、FTI 投与による抗炎症作用についても評価する。

(DEN : N-nitrosodiethylamine、CDAHFD : choline-deficient, L-amino acid-defined, high-fat diet)

4. 研究成果

(上記、3. 研究の方法の番号 (~ / ~) と以下の番号は対応しない)

3種の肝癌細胞株 (HepG2、Hep3B、Huh7) を用いて、HIF-1 の発現を Western blot で評価した。いずれの細胞株においても HIF-1 の発現を認め、また、FTI である Tipifarnib の投与に

よってその発現は抑制された (Figure 1)。なお、その抑制効果は濃度依存性 (Figure 2) であり、その結果から以降の *in vitro* 実験においては Tipifarnib を 300 nM の濃度で使用した。

Figure 1

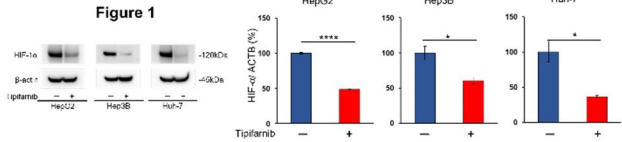
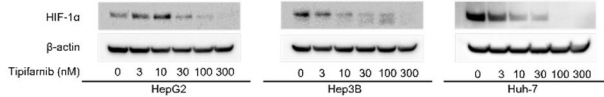


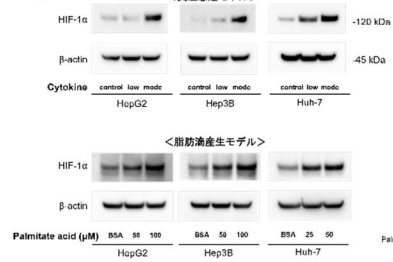
Figure 2



② NAFLD/NASH 肝癌を想定して炎症惹起モデル (TNF α + IFN γ + LPS 添加) および脂肪滴産生モデル (パルミチン酸添加) を確立し、それぞれ TNF α 、IFN γ 、LPS、

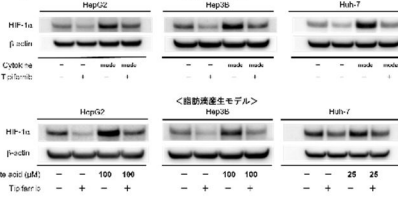
およびパルミチン酸の濃度を決定した。HepG2、Hep3B、Huh7 の全ての肝癌細胞株において、炎症惹起モデルおよび脂肪滴産生モデルにおいて HIF-1 の発現増強を認めた (Figure 3)。両モデルに対して Tipifarnib を投与したところ、増強した HIF-1 の発現を抑制した (Figure 4)。

Figure 3



(※Figure 内では TNF α + IFN γ + LPS は “cytokine” として、パルミチン酸は “Palmitate” として記載)

Figure 4



細胞増殖能の評価を行ったところ、炎症惹起モデルではコントロールと比較して増殖能に変化は認めず、また、いずれにおいても Tipifarnib の投与で増殖能の抑制効果が

認められた。ただし、HepG2 と Hep3B では炎症惹起モデルに Tipifarnib を投与した場合に死細胞率が最も高かった (Figure 5)。脂肪滴産生モデルではコントロールと比較して増殖能は概ね同様の動向を示したが、HepG2 と Huh7 では脂肪滴産生モデルに Tipifarnib を投与した場合に最も増殖能が低下した。ただし、HepG2、Hep3B、Huh7 の全ての肝癌細胞株において脂肪滴産生モデルに Tipifarnib を投与した場合に死細胞率が最も高かった (Figure 6)。

Figure 5

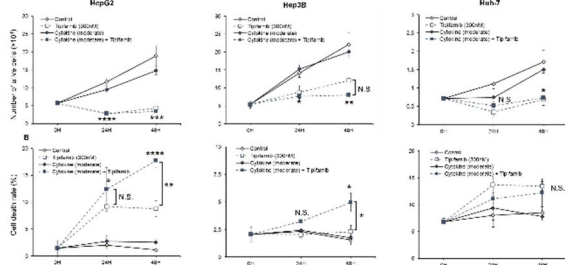
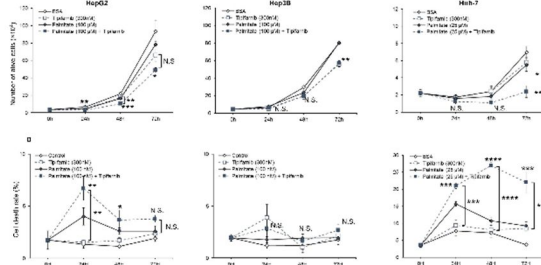
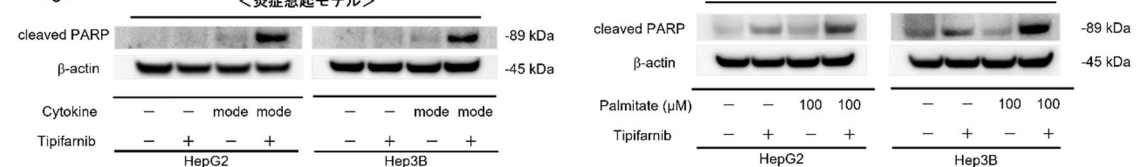


Figure 6



アポトーシスの評価として cleaved PARP の発現を評価したところ、HepG2 と Hep3B では炎症惹起モデル、脂肪滴産生モデルの両モデルにおいて Tipifarnib を投与した場合に最も強い cleaved PARP の発現が認められた (Figure 7)。

Figure 7



④ 活性酸素を評価したところ、HepG2、Hep3B、Huh7 の全ての肝癌細胞株において、コントロール、炎症惹起モデル、脂肪滴産生モデルの全てで Tipifarnib の投与で活性酸素量の増加を認めた (Figure 8)。

⑤ 炎症反応の評価として ELISA 法で IL-6 を評価したところ、HepG2 と Hep3B ではコントロールに比して炎症惹起モデル、脂肪滴産生モデルの両モデルにおいて IL-6 の明らかな上昇を認めた。一方、Tipifarnib の投与によってそれらの上昇は有意に低下した (Figure 9)。

Figure 9

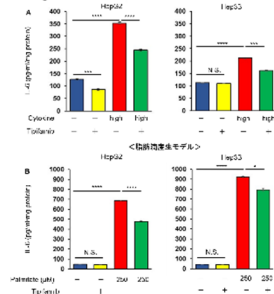
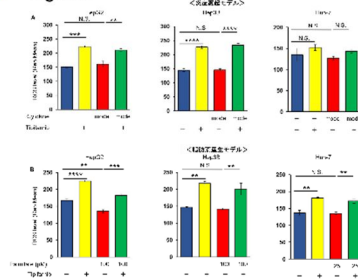


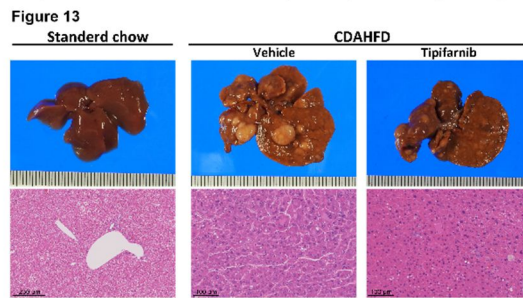
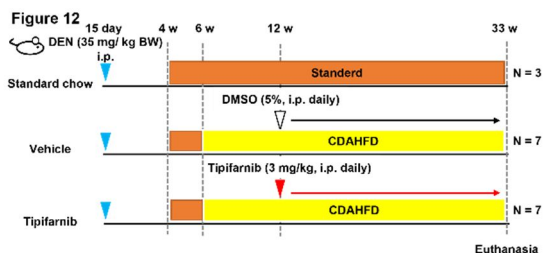
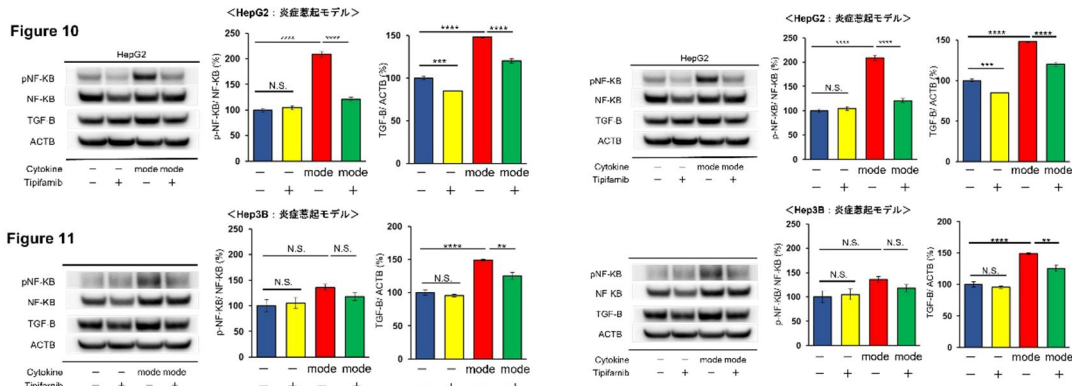
Figure 8



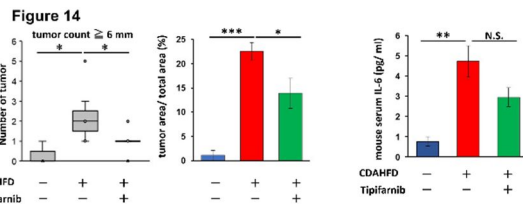
さらに、NF- κ B および pNF- κ B/TGF- β の発現変化を評価したところ、HepG2 ではコントロールに比して炎症惹起モデル、脂肪滴産生モデルの両モデルにおいて pNF- κ B/TGF- β 、TGF- β の有意な上昇を認めた。なお、それらは Tipifarnib の投与によって明らかに抑制された。Hep3B においても有意差こそないものの、同様の傾向を示した (Figure 10 and 11)。

⑦ NAFLD/NASH 肝癌モデルとして、まずは “STAM マウスモデル” を用いたところ、FTI が抗腫瘍効果を示す傾向は得られたものの、個体差が大きく、また腫瘍形成の安定化が得られなかった。次いで “DEN + CDAHFD モデル” (Figure 12)

を用いたところ、Tipifarnib 投与によって有意に腫瘍個数 (6mm の腫瘍) の減少が得られ、また、全肝に占める腫瘍の割合が有意に縮小した。病理学的には Tipifarnib 投与によって異型度が抑制されていることが確認された (Figure 13 & 14)。さらに、マウス血清における IL-6 を評価したところ、Tipifarnib 投与によって有意に抑制された (Figure 14)。



以上の実験結果より、FTI である Tipifarnib は、肝癌細胞に対して抗腫瘍効果を発揮することが明らかとなったが、特質すべきは、NAFLD/NASH 肝癌を想定した炎症惹起モデルや脂肪滴産生モデルにおいて増強した HIF1- や炎症関連因子を是正し、両モデルの条件下でより強力な抗腫瘍効果を示す可能性が示唆された点である。そのメカニズムの一端として申請者が想定した FTI の抗炎症作用が関与している可能性があり、炎症やインスリン抵抗性を基礎に惹起されると推定される NAFLD/NASH 肝癌に対して FTI が有効な治療薬となる可能性がある。また、HIF-1 は癌の浸潤能や抗癌剤耐性⁶⁾などの癌悪性度に関与する他、炎症にも強く関与する因子であり、FTI による HIF-1 の制御は NAFLD/NASH 肝癌の治療ターゲットとして効果的と考えられる。加えて、申請者の既報^{7), 8)}の如く、HIF-1 の制御によって細胞内活性酸素の上昇が認められており、過剰な活性酸素産生が細胞死 (アポトーシス) を導く一因となったことが示唆された。さらに、本研究では、NAFLD/NASH 肝癌モデルマウスにおいても FTI の抗腫瘍効果および抗炎症効果が確認されており、FTI の NAFLD/NASH 肝癌に対する有効性が強く示唆される結果となった。



<参考文献>

- 1) Modeling the epidemic of nonalcoholic fatty liver disease demonstrates an exponential increase in burden of disease. Chris Estes, et al., *Hepatology*. 2018; 67(1): 123-133.
- 2) Modeling NAFLD disease burden in China, France, Germany, Italy, Japan, Spain, United Kingdom, and United States for the period 2016-2030. Chris Estes, et al., *Hepatology*. 2018; 69(4): 896-904.
- 3) Farnesyltransferase inhibitor, tipifarnib, prevents galactosamine/lipopolysaccharide-induced acute liver failure. Shirozu K, et al., *Shock*. 2014; 42(6): 570-577.
- 4) Role of protein farnesylation in burn-induced metabolic derangements and insulin resistance in mouse skeletal muscle. Nakazawa H, et al., *PLoS One*. 2015; 10(1): e0116633.
- 5) Low-Dose Farnesyltransferase Inhibitor Suppresses HIF-1 and Snail Expression in Triple-Negative Breast Cancer MDA-MB-231 Cells In Vitro. Tanaka T, et al., *J Cell Physiol*. 2017; 232(1): 192-201.
- 6) Antitumor effects of low-dose tipifarnib on the mTOR signaling pathway and reactive oxygen species production in HIF-1-expressing gastric cancer cells. Egawa N, et al., *FEBS Open Bio*. 2021; 11(5): 1465-1475.
- 7) The Apoptotic Effect of HIF-1 Inhibition Combined with Glucose plus Insulin

Treatment on Gastric Cancer under Hypoxic Conditions. Tanaka T, et al., PLoS One. 2015; 10(9): e0137257.

- 8) Low-dose YC-1 combined with glucose and insulin selectively induces apoptosis in hypoxic gastric carcinoma cells by inhibiting anaerobic glycolysis. Wakiyama K, et al., Sci Rep. 2017; 7(1): 12653.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田 浩平、田中 智和、松藤 祥平、伊藤 孝太郎、江川 紀幸、能城 浩和
2. 発表標題 Effectiveness of farnesyltransferase inhibitor on non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma
3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 山田浩平、田中智和、松藤祥平、伊藤孝太郎、北島吉彦、能城浩和
2. 発表標題 蛋白ファルネシル化に着目した NASH 肝癌に対する新規薬物治療の可能性
3. 学会等名 第122回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山田浩平、田中智和、松藤祥平、伊藤孝太郎、北島吉彦、能城浩和
2. 発表標題 Farnesyltransferase inhibitor has anti-inflammatory and anti-tumor effects of HCC cell lines on NASH like condition
3. 学会等名 第80回日本癌学会学術総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山田浩平、田中智和、松藤祥平、伊藤孝太郎、江川紀幸、北島吉彦、能城浩和
2. 発表標題 NASH様状態における肝細胞癌細胞株に対するファルネシル転換酵素阻害薬の細胞増殖抑制作用の可能性
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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