

令和 3 年 6 月 3 日現在

機関番号：16201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K17401

研究課題名(和文) アンジオテンシン受容体拮抗薬と分子標的薬の肝癌抑制とエクソソームmiRNA解析

研究課題名(英文) Antitumor effect of HCC and exosome microRNA by angiotensin II receptor blockers and molecular target drugs

研究代表者

大浦 杏子(Oura, Kyoko)

香川大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：80834639

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)：telmisartanは分子標的治療薬(sorafenib, lenvatinib)と併用することで強い細胞増殖抑制効果を示し、血管新生分子群のアレイ解析ではtelmisartanによってFGF発現亢進を認めたと、分子標的治療薬との併用でキャンセルされた。肝細胞癌の腫瘍異種移植モデルマウスではtelmisartan+lenvatinibで4分子のmicroRNA(miR-571, miR-655-5p, miR-2681-5p, miR-3122)が有意に変化した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、肝細胞癌(HCC)に併存する高血圧治療の際や、分子標的治療薬の副作用である血圧上昇に対してアンジオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)を処方する機会が増えている。本研究でARBであるtelmisartanに分子標的治療薬を併用することで抗腫瘍効果の増強を認め、分子標的治療薬治療中に生じた高血圧に対してどの降圧薬を選択すべきかの一つの指針となりうると考える。細胞由来とエクソソーム由来のmicroRNA(miRNA)解析を行うことで、新たな癌抑制機構のエクソソームmiRNAを同定し、miRNAを標的とした治療戦略の可能性について検討することができた。

研究成果の概要(英文)：Telmisartan showed a strong cell proliferation inhibitory effect when used in combination with molecular-targeted drugs (sorafenib, lenvatinib), and array analysis of angiogenic molecules showed that telmisartan increased FGF expression, but the change was canceled in combination with molecular-targeted drugs. In hepatocellular carcinoma tumor xenograft model mice, telmisartan + lenvatinib significantly changed 4 molecules of microRNA (miR-571, miR-655-5p, miR-2681-5p, miR-3122).

研究分野：肝臓内科

キーワード：アンジオテンシン受容体拮抗薬 肝細胞癌 microRNA 分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

B型肝炎(HBV)やC型肝炎(HCV)の新規感染患者の減少および抗ウイルス療法の普及により、肝細胞癌(HCC)の成因別背景は急激に変化している。2003年~2017年の15年間に当科で診療したHCC患者802名を対象とした疫学研究においても、HBVやHCVに起因するHCCが減少するに伴って、飲酒や生活習慣病を背景とする非ウイルス性HCCが増加し、診療の中心となっていることが分かった。非ウイルス性HCCの臨床的特徴としては、生活習慣病を合併することが多く、さらに発癌までにスクリーニング検査が実施されていないことが多いため、診断時には既に進行癌で発見されることが多い。このような傾向は全国的にさらに加速するとされており、今後は生活習慣病を背景とする非ウイルス性HCC患者を対象とした、特に進行期HCCに対する治療戦略がより重要になると考える。

脈管浸潤や遠隔転移によって切除不能となった進行期HCCの治療では、分子標的治療薬が一般的であり、現在本邦ではsorafenibもしくはlenvatinibが一次治療として選択可能である。これらの分子標的治療薬は血管内皮細胞増殖因子(VEGF)を阻害する事が主な作用機序であるが、末梢血管抵抗維持に関わる細小血管床量を減少させるため、血圧上昇を来す事が少なくない。一酸化窒素の合成低下が主な原因であり、降圧薬としてアンギオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)が推奨される。興味深いことに、近年のARB研究において、基礎研究では泌尿器科や婦人科分野を中心に腫瘍増殖抑制効果が報告されており、ARBが抗腫瘍効果を有するならば、高血圧症を併存するHCC患者にとっては2重のメリットがあると考えられる。

申請者はこれまでにARBであるtelmisartanのHCC細胞株に対する抗腫瘍効果を論文報告し(Oura K, et al. *Oncol Rep* 38(5), 2825-2835: 2017)、AMPK α /mTOR/p70S6K経路を介する細胞周期制御について解析し、さらに関連するmicroRNA(miRNA)について同定した。しかし一方で、telmisartan投与48時間以降では腫瘍増殖抑制効果がプラトーに達し、線維芽細胞増殖因子(FGF)など一部の血管新生分子の発現増強を認め、薬剤耐性獲得に関連する可能性あると考えた。さらにもう一つの問題点として、抗腫瘍効果を認めた50~100 μ Mという濃度は、臨床使用上限量80mgを反復投与した際の薬物動態から換算される最高血中濃度の約60~120倍にあたり、telmisartan単独治療は高用量でなければ抗腫瘍効果はないという結果であった。これら先行研究の課題を踏まえて、血管新生分子阻害を主な作用機構とするsorafenibもしくはlenvatinibと併用することで、臨床使用されるより低用量でARBの抗腫瘍効果を期待できるのではないかと、本研究の着想に至った。

2. 研究の目的

近年、肝細胞癌(HCC)に併存する高血圧治療の際や、分子標的治療薬の副作用である血圧上昇に対してアンギオテンシンII受容体拮抗薬(ARB)を処方する機会が増えており、ARBが抗腫瘍効果を有するならば、高血圧症を併存するHCC患者にとっては二重のメリットがある。我々はこれまでにARBであるtelmisartanのHCCに対する抗腫瘍効果を報告してきたが、血管新生分子の発現増強により薬剤耐性を獲得している可能性がある点や、telmisartan単独では高用量でなければ抗腫瘍効果を認めない点が問題点として挙げられた。先行研究の課題を踏まえて、血管新生分子阻害を主な作用機構とするsorafenibもしくはlenvatinibと併用することで、より臨床使用に近い用量でARBの抗腫瘍効果を期待できるのではないかと、本研究の着想に至った。本研究の目的はARBおよび分子標的治療薬併用によるHCCの抗腫瘍効果を検討し、microRNA(miRNA)解析を行うことで、新たな癌抑制機構のmiRNAを標的とした治療戦略の可能性について基礎研究を行うことである。

3. 研究の方法

- (1) ARBおよび分子標的治療薬併用によるHCC細胞増殖抑制効果を検討する。
 - (a) 96-well plateで 5.0×10^3 cells/wellのHCC株(HepG2, HuH-7, PLC/PRF/5, HLE, HLF)を培養し、薬剤添加後24~72時間後にcell counting kitを用いて細胞増殖assayを行う。ARB(telmisartan, losartan, irubesartan, valsartan, azilsartan)0~10 μ M、分子標的治療薬(sorafenib, lenvatinib)0~10 μ Mを使用し、ARB単独、分子標的治療薬単独、ARB+分子標的治療薬併用で比較検討する。
 - (b) 薬剤投与後6~48時間までの細胞を回収し、細胞周期変化とアポトーシス誘導効果をflow cytometryで解析をする。
 - (c) 薬剤投与後6~48時間までの細胞を回収し、レセプター型チロシンキナーゼ群および血管新生分子群、アポトーシス関連分子群についてアレイ解析をする。
- (2) ARBおよび分子標的治療薬の腫瘍増殖抑制に関連するエクソソームmiRNAを同定する。
 - (a) HepG2の腫瘍異種移植マウスモデルを作製し、miRNeasy Mini Kit(Qiagen社)を用いて細胞由来のmiRNAを抽出する。Agilent 2100 bioanalyzer(Agilent technologies)で品質保証する。
 - (b) miRCURY Hy3 Power Labeling Kit(Exiqon社)を用いてmiRNA Oligo Chip(v.21; Toray Industries社)にhybridizationし、3D-Gene Scanner 3000(Toray Industries社)で変化する2555分子のmiRNAについて網羅的解析をする。

4. 研究成果

ARB(telmisartan, losartan, irubesartan, valsartan, azilsartan)のHCC細胞株(HepG2,

HuH-7, PLC/PRF/5, HLE, HLF) に対する抗腫瘍効果を検討した。telmisartan は濃度依存性に各 HCC 株に腫瘍増殖抑制を示したが、一方で他の ARB は同濃度では HCC 株に対して抗腫瘍効果がないことが確認された。Telmisartan 0 ~ 10 μ M と分子標的治療薬 (sorafenib, lenvatinib) 0 ~ 10 μ M を使用し、細胞増殖アッセイで telmisartan 単独, 分子標的治療薬, telmisartan+分子標的治療薬併用で比較したところ、併用群で最も強い細胞増殖抑制効果を認めた。薬剤投与後の細胞を回収し、フローサイトメトリーで細胞周期変化を検討したところ、telmisartan+分子標的治療薬投与によって G1 アレストを認めた。レセプター型チロシンキナーゼ分子のアレイ解析では telmisartan 投与によって ErbB3 の発現低下が見られたが、分子標的治療薬併用投与によっても同様の変化であった。血管新生分子群のアレイ解析では telmisartan 投与によって FGF の発現が亢進していたが、分子標的治療薬と併用によって FGF の発現亢進がキャンセルされた。

HepG2 の腫瘍異種移植マウスモデルを作製し、telmisartan+lenvatinib の投与を行ったところ、control と比較して腫瘍増殖抑制効果を認めた (図 1)。腫瘍を回収して、2555 分子の microRNA について網羅的に解析をしたところ、control と比較して telmisartan+lenvatinib で有意に変動した microRNA は 4 分子 (miR-571, miR-655-5p, miR-2681-5p, miR-3122) であった (図 2)。

図 1 腫瘍異種移植モデルの検討

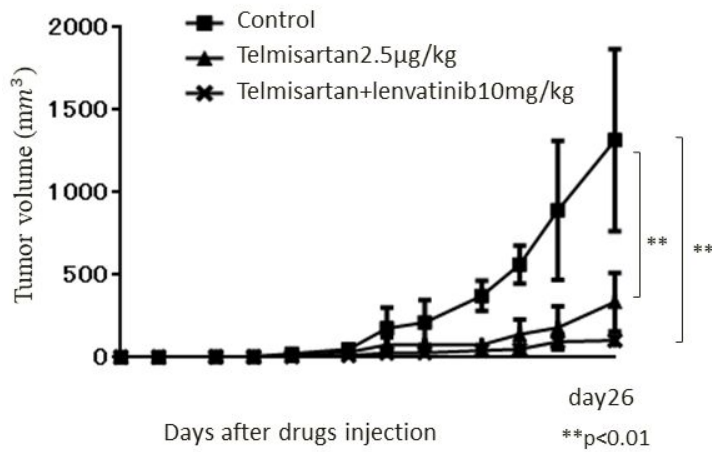
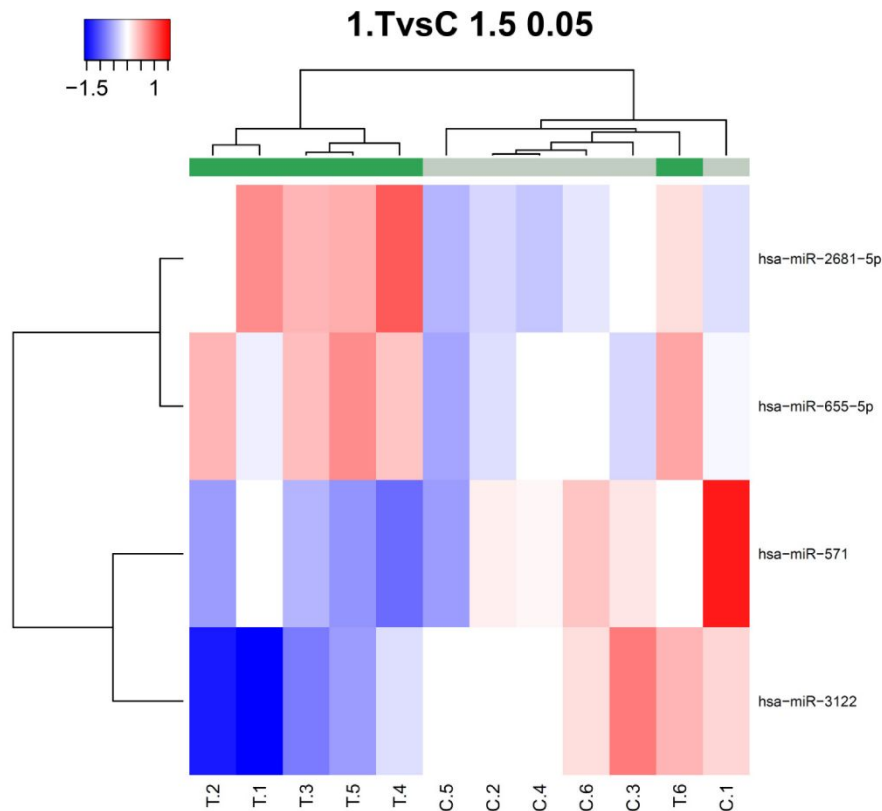


図 2 microRNA クラスタ解析



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 大浦杏子
2. 発表標題 肝細胞癌におけるバイオマーカーとしてのcirculating microRNAの検討
3. 学会等名 肝臓病学会総会
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
---------------------------	-----------------------	----

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