

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：32661
研究種目：基盤研究(C)（一般）
研究期間：2020～2022
課題番号：20K07141
研究課題名（和文）分子標的薬による誘導性NK依存性細胞傷害を利用した肝細胞がんリモデリング薬の開発

研究課題名（英文）Development of remodeling medicine on hepatocellular carcinoma for inducible NK dependent cytotoxicity by molecular target medicine

研究代表者
梶貝 孝慈（HIGAI, Koji）

東邦大学・薬学部・教授

研究者番号：70297711
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）：本研究により、ソラフェニブによるhST3Gal5およびADAM-9の転写制御機構を解明することが出来た。さらに、進行性肝細胞がんを標的として、テセントリク/アバスチンを投与された患者の血清中MICA、FGF19およびFGF-R4濃度の測定を行った。その結果、テセントリク+アバスチン治療に対するバイオマーカー候補を見出すことが出来た。これらの結果は、今後のテセントリク・アバスチン投与症例の選択に対して、重要な知見をもたらすものと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、進行性肝細胞がんを標的とした分子標的薬の新規作用および免疫系関連分子の発現の影響を明らかにすることができた。この結果は、今後の免疫療法に対して重要な知見が得られたものと考えられる。また、テセントリク・アバスチンを投与された進行性肝細胞がん患者における血中免疫関連分子血中濃度測定結果と奏効率および進行度との比較から、実臨床におけるバイオマーカー候補が示唆された。この結果は、今後のテセントリク・アバスチン投与症例の選択に対して、重要な知見をもたらすものと考えられる。

研究成果の概要（英文）：In this study, we identified transcriptional regulation of hST3Gal5 and ADAM-9 (regulation molecule of MICA). Furthermore, we clarified that these molecules were regulated by sorafenib. We quantitatively determined the concentration of MICA, FGF-19 and FGF-R4 in sera obtained from patients with HCC treatment with tecentriq and avastin. We were able to identify candidate biomarkers for the tecentriq and avastin treatment. These findings are believed to provide important insights for the selection of future tecentriq and avastin administration cases.

研究分野：腫瘍免疫

キーワード：肝細胞がん 腫瘍免疫

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

申請者は、がん細胞に対する NK 細胞による糖鎖依存性細胞傷害を提唱し、難治性の進行性肝細胞がんを標的として、糖鎖制御機構の基盤的検討を行ってきた。その結果、NK 細胞は、陰性荷電を持つ糖を認識し傷害することを明らかにした。さらに、分子標的治療薬ソラフェニブは、肝がん細胞に対して、様々な糖転移酵素や NK 細胞に認識されるタンパク質性リガンドの発現を変化させることが明らかとなった。このことは、ソラフェニブ (SF) が NK 細胞による傷害のイムノケミカルモジュレーターとして働くことを意味する。現在臨床にて標準治療として使用されている 3 種の分子標的薬やさまざまな化合物を用い、「肝細胞がんの糖鎖およびタンパク質性リガンドのリモデリングにより NK 細胞による細胞傷害を誘導して (誘導性 NK 依存性細胞傷害) 殺腫瘍効果を向上させる分子標的薬・化合物の開発を目指す」ことを目的として、基礎的メカニズムと臨床における治療効果の両面から解析した。

2. 研究の目的

本研究の目的は、「肝細胞がんの糖鎖およびタンパク質性リガンドのリモデリングにより NK 細胞による細胞傷害を誘導し殺腫瘍効果を向上させる分子標的薬や免疫調節薬の開発を目指す」ことである。また、第一選択薬であるテセントリク+アバスチン治療における肝がん患者の MICA、FGF-19、FGF-R4 分子の発現と奏効率、Child Pugh 分類、進行度 (ステージ) との比較検討を臨床からのアプローチの目的とした。

3. 研究の方法

標的細胞モデルとして肝がん細胞株 HepG2 を使用して、SF、レゴラフェニブ (RF)、レンバチニブによる肝がん細胞の糖鎖合成およびリガンドの発現への影響を、各種糖転移酵素遺伝子およびタンパク質性リガンドのプロモーター活性、mRNA 発現、タンパク質発現をレポーターアッセイやリアルタイム PCR、ウェスタンブロットで解析した。また、細胞内 ROS の発生は、蛍光顕微鏡にて観察した。臨床的検討としては、現在第一選択薬として用いられているテセントリク+アバスチン治療を受けた患者血清中の NK 受容体のタンパク質性リガンドである MICA および血管新生および増殖に關与する FGF-19、FGF-R4 分子を ELISA 法にて測定した。

4. 研究成果

初めに、標的細胞モデルとして肝がん細胞株 HepG2 を使用して、ソラフェニブ (SF)、レゴラフェニブ (RF)、レンバチニブによる肝がん細胞のシアル酸転移酵素遺伝子 (ST3Gal1-5) の変動を解析した。なお、以前、我々はシアル酸転移酵素 3 (ST3Gal3) が、SF で発現量が上昇すること、ST3Gal3 の上昇は、細胞表面のシアル酸量を増加させ、NK 細胞による細胞傷害を増加させることをすでに見出している。そこで、CD94 や NKG2D/A などの糖鎖リガンドである N 結合型の多分岐 2-3 シアル酸の生合成に關与する (1) ST3Gal1-5 の遺伝子発現変化の解析および NKG2D のリガンドタンパク質性リガンドである MICA の発現を制御する (2) ADAM-9 の遺伝子発現制御機構の解析をおこなった。

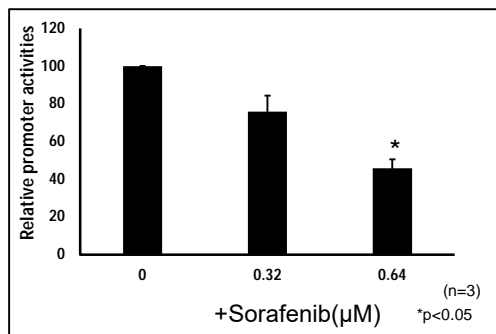
共同分担者の永井は、臨床における検討として (3) テセントリク+アバスチン治療を投与している肝がん患者の MICA、FGF-19、FGF-R4 分子と奏効率、Child Pugh 分類、進行度 (ステージ) との比較検討を行った。

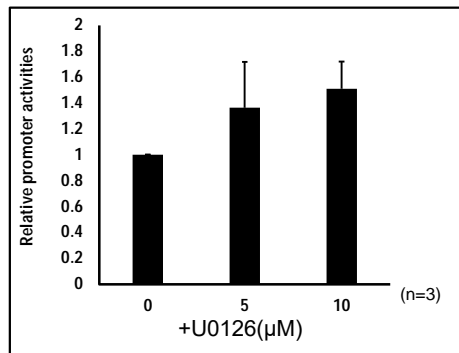
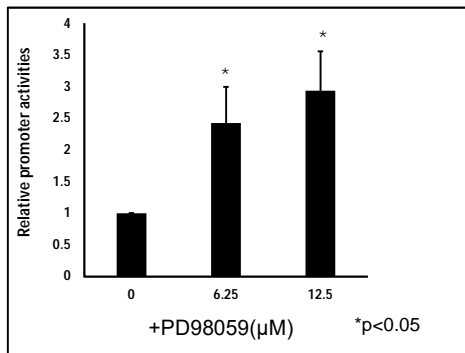
(1) ST3Gal1-5 の分子標的薬による遺伝子発現変化の解析

標的細胞モデルとして肝がん細胞株 HepG2 を使用して、ソラフェニブ (SF)、レゴラフェニブ (RF)、レンバチニブによる肝がん細胞のシアル酸転移酵素遺伝子 (ST3Gal1-5) の変動をプロモーター活性を中心に解析した。その結果、ST3Gal5 のプロモーター活性が、SF により減少することを見出した (図 1)。一方で、MEK 阻害剤の PD98059 や U0126 では、ST3Gal5 プロモーター活性が増加すること (図 2)、MEKK の過剰発現により、ST3Gal5 のプロモーター活性が減少すること (図 3) が明らかとなった。このことは、SF の主作用である Raf の阻害では説明がつかず、マルチキナーゼである SF の他の作用を介していることを示唆するものである。その後の検討で、CRE を介した制御機構の可能性が考えられた。

(2) ADAM-9 の遺伝子発現制御機構の解析

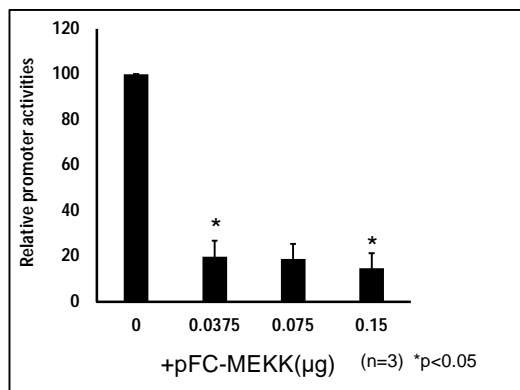
NKG2D のタンパク質性リガンドである MICA の細胞表面発現を制御するメタロプロテアーゼである ADAM-9 について、その遺伝子制御機構を解析した結果、転写開始点より -500 ~ -250 および -250 ~ +1 にプロモーター活性が認められた (図 4)。(図 1) SF 処理による ST3Gal5 のプロモーター活性



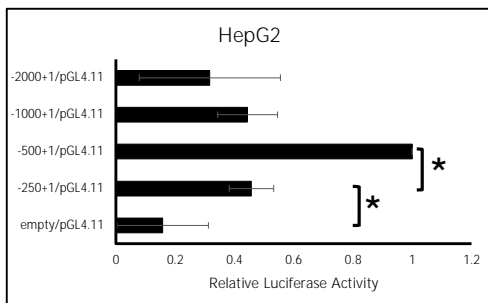


(図2) PD98059 (左) および U0126 (右) による ST3Gal5 のプロモーター活性

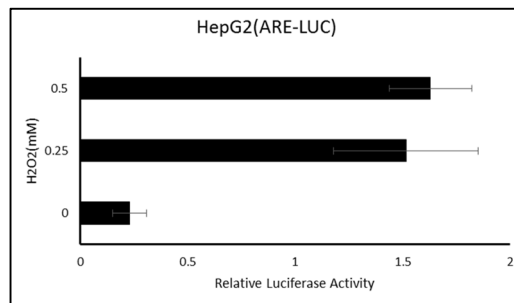
その領域に結合する転写因子の探索を行った結果、プロモーター領域に転写因子 Nrf2 結合可能配列が見出されたことから、細胞内 ROS や酸化ストレスにより ADAM-9 遺伝子の発現が誘導される可能性が示唆された。そこで、過酸化水素の刺激条件を ARE-LUC を用いたルシフェラーゼアッセイ (図5) および ROS Assay Kit -Highly Sensitive DCFH-DA-により確立した (図6)。そして、過酸化水素による ADAM-9 およびその基質である MICA の mRNA 発現量を解析した結果、MICA および ADAM-9 mRNA の増加が認められた (図7)。これらの結果から、がん細胞はストレス刺激により、NK 細胞からの細胞傷害を受けやすくなる (図3) pFCMEKK による ST3Gal5 のプロモーター活性可能性が示唆された。



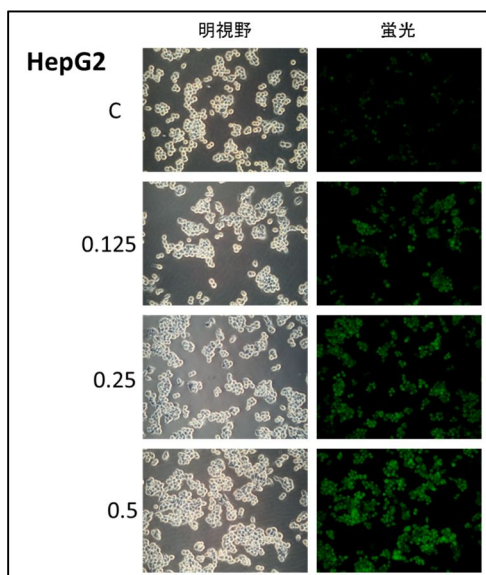
この結果を受けて、細胞内 ROS を産生することが知られている化合物を検討した結果、ADAM-9 および MICA mRNA 発現が増加したことから、化合物 A が免疫調節薬の候補となりうる可能性が示唆された。



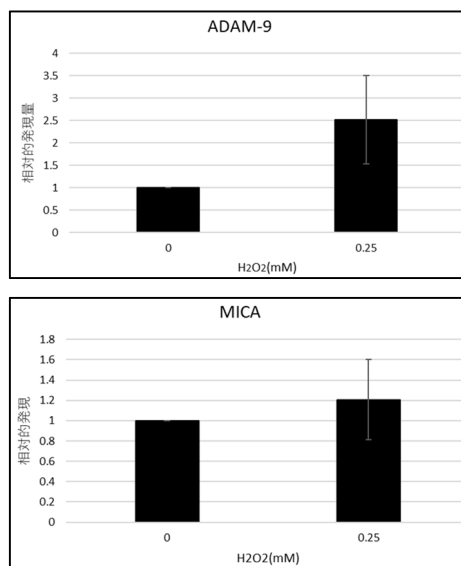
(図4) 5' 非翻訳領域のプロモーター活性



(図5) ARE-LUC を用いたルシフェラーゼアッセイ



(図6) 細胞内 ROS の観察



(図7) 過酸化水素による ADAM-9 および MICA mRNA 発現

(3) テセントリク+アバスタチン治療を投与している肝がん患者の MICA、FGF-19、FGF-R4 分子と奏効率、Child Pugh 分類、進行度 (ステージ) との比較検討

臨床的検討としては、NK細胞上の活性化受容体である NKG2D のタンパク質リガンドである MICA の可溶性型 (sMICA) の測定を、テセントリク+アバスタチン治療前後の肝細胞がん患者 59 例に対して行った。さらに、FGF 受容体 4 のリガンドである FGF-19 についても測定を行った。

Table1. 1 患者サマリー

項目	値	項目	値
患者数	59名	Child-Pugh (A/B/C/不明)	48/8/1/2
Age	73.3±9.52	治療前 AFP	28338±151109
性別 (男/女)	44/15	3週間後AFP	17163±101734
Stage(/ / / A/ B)	1/6/24/21/7	治療前 PIVKA-	17720±62247
Response rate (PR/SD/PD/不明)	5/37/1/16	3週間後PIVKA-	25336±79088

その結果、sMICA は Stage が進むにつれて高値であったが、FGF-19、FGF-R4 量に差は認められなかった (Table.2)。また、奏効率別分類において、sMICA や FGF-19 は PD 症例が共に高値であったのに対して、FGF-R4 は逆相関が認められた (Table.3)。

Table1. 2 Stage 別の MICA、FGF-19 および FGFR4 濃度

【治療前】

Stage	MICA (pg/mL)	FGF-19 (pg/mL)	FGF-R4 (pg/mL)
I (1)	1820.56	363.62	256.67
II (6)	2935.27±4463.70	251.81±299.84	404.48±296.07
III (24)	5591.70±6542.84	1068.17±2368.21	2447.25±6273.99
IV A (21)	8763.77±9168.76	601.90±654.64	2538.35±4939.49
IV B (7)	9078.38±7842.35	384.89±433.12	683.90±393.26

Table1. 3 奏効率別の MICA、FGF-19 および FGFR4 濃度

【治療前】

奏効率	MICA (pg/mL)	FGF-19 (pg/mL)	FGF-R4 (pg/mL)
PR (5)	8384.30±6028.92	295.92±537.38	3911.43±7180.79
SD (37)	4557.21±6212.04	843.00±1925.99	1875.64±5111.24
PD (1)	12110.29	1047.50	356.67
不明 (16)	-	-	-

がんの進展に関与する FGF-19 や NK 細胞からの傷害を避ける sMICA が PD 症例で高値であったのは、がんの増殖や宿主免疫からの回避の観点からも重要な知見であると考えられる。

研究期間全体を通じて実施した研究の成果として、基礎検討からはがんに対する免疫調節薬候補を見出すことができ、臨床検討からはテセントリク+アバスタチン治療に対するバイオマーカー候補を見出すことが出来た。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mukoza Takanori, Nagai Hidenari, Matsui Daigo, Mohri Kunihide, Watanabe Go, Yoshimine Naoyuki, Amanuma Makoto, Kobayashi Kojiro, Ogino Yu, Matsukiyo Yasushi, Matsui Teppei, Daido Yasuko, Wakui Noritaka, Shinohara Mie, Momiyama Koichi, Higai Koji, Igarashi Yoshinori	4. 巻 89
2. 論文標題 Adaptation of lenvatinib treatment in patients with hepatocellular carcinoma and portal vein tumor thrombosis	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Chemotherapy and Pharmacology	6. 最初と最後の頁 11～20
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00280-021-04359-2	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Kobayashi Kojiro, Higai Koji, Mukozu Takanori, Matsui Daigo, Amanuma Makoto, Yoshimine Naoyuki, Ogino Yu, Matsui Teppei, Wakui Noritaka, Shinohara Mie, Momiyama Koichi, Daido Yasuko, Nagai Hidenari, Igarashi Yoshinori	4. 巻 43
2. 論文標題 Tivantinib Decreases Hepatocyte Growth Factor-Induced BCRP Expression in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biological and Pharmaceutical Bulletin	6. 最初と最後の頁 1421～1425
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1248/bpb.b19-01100	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Nagai Hidenari, Mukozu Takanori, Kobayashi Kojiro, Nogami Akira, Nagumo Hideki, Mohri Kunihide, Watanabe Go, Amanuma Makoto, Yoshimine Naoyuki, Ogino Yu, Matsui Daigo, Daido Yasuko, Matsukiyo Yasushi, Matsui Teppei, Wakui Noritaka, Momiyama Koichi, Higai Koji, Matsuda Takahisa	4. 巻 101
2. 論文標題 Lenvatinib Might Induce Activation of Host Immunity in Patients with Hepatocellular Carcinoma	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Oncology	6. 最初と最後の頁 32～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1159/000527306	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 諏訪原千絵歌、毛利州秀、桧貝孝慈、巽康彰、和久井紀貴、永井英成
2. 発表標題 肝細胞癌患者血清中可溶性MICAおよびFGF-19濃度
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小菅ほのか、桧貝孝慈、渡邊剛、小林康次郎、和久井紀貴、永井英成
2. 発表標題 NKG2D リガンドULBP1 の転写調節
3. 学会等名 日本薬学会第142年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 京増 優佳、毛利 州秀、巽 康彰、和久井 紀貴、永井 英成、桧貝 孝慈
2. 発表標題 肝細胞がんにおけるアテゾリズマブ/ベバシズマブ併用療法に対するバイオマーカーの検討
3. 学会等名 日本薬学会第143年会
4. 発表年 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
研究分担者	永井 英成 (NAGAI Hidenari) (30349899)	東邦大学・医学部・臨床教授 (32661)	

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