

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K08358

研究課題名(和文) 肝予備能不良進行肝細胞癌に対する鉄キレート剤と再生療法によるハイブリッド療法開発

研究課題名(英文) Development of hybrid therapy using iron chelators and regenerative therapy for advanced hepatocellular carcinoma with decompensated liver cirrhosis

研究代表者

高見 太郎 (Takami, Taro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：60511251

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)：Choline-deficient L-amino acid-defined食でラットを飼育する「肝発癌肝硬変モデル」において、鉄キレート剤(DFO)投与は病態を抑制させる傾向であったが、ラット骨髄MSC効果についてはMSC継代数等の条件検討が必要であった。そこでDFOの抗腫瘍機序を癌細胞株で解析したところ、DFO耐性癌細胞株では解糖系への代謝シフトにより乳酸産生の増加が引き起こされていた。以上より、DFO抗腫瘍効果は癌微小環境の乳酸濃度上昇が少ない方が高くなると考えられ、MSCが癌細胞株の解糖系シフトを抑制させる新たな作用機序が想起された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝臓領域のアンメット・メディカルニーズのひとつは「分子標的薬投与ができない肝予備能不良例(Child-Pugh B)における切除不能進行肝細胞癌」である。今回、ラット肝発癌肝硬変モデルおよび細胞共培養系により鉄キレート剤の抗腫瘍メカニズムを検証することができ、新たなMSC抗腫瘍機序を想起することができ、今後のハイブリッド療法の開発につながる。

研究成果の概要(英文)：In rats fed with choline-deficient L-amino acid-defined diet, developing cirrhosis with liver tumors, iron chelator treatment tended to suppress the tumor development, but further investigation of the effects of MSCs including MSC passages was necessary. On the other hand, in the iron chelator-resistant cancer cell line, an increase in lactate production was caused by a metabolic shift to the glycolytic pathway, showing that the anti-tumor effect of iron chelator was enhanced when the lactate concentration in the cancer microenvironment was lower. Therefore, these results suggest that MSCs may have a novel effect of suppressing the glycolytic shift of hepatocellular carcinoma cells in liver cirrhosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝硬変症 肝細胞癌 鉄キレート剤 間葉系幹細胞

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

医学が進歩し新薬開発が盛んな今日であっても「アンメット・メディカルニーズ」、治療がない疾患に対する医療ニーズが存在する。なかでも切除不能な進行肝細胞癌治療においては分子標的薬が薬事承認され免疫チェックポイント阻害剤を加えたプロトコル開発が行われているものの、肝予備能良好例(Child-Pugh A)に適応が限定されている。したがって、肝予備能不良例(Child-Pugh B)における切除不能な進行肝細胞癌は、明確な「アンメット・メディカルニーズ」である。一方、鉄は生体の DNA 合成に必須の元素であることから、癌状態では DNA 合成が盛んとなるため多くの鉄を必要とし、肝細胞癌でも同様であることが知られている (*Takami T, et al. J Clin Biochem Nutr. 2011*)。そこで研究協力者の坂井田および山崎らは、肝細胞癌治療には鉄除去が有効なのではないかと着想し、進行肝細胞癌に対する鉄キレート剤 Deferoxamine(DFO) 肝動注投与が有用であることを世界に先駆けて報告した (*N Engl J Med. 365:576-8 2011*)。また我々は、非代償性肝硬変症に対する肝臓再生療法として、イヌ肝線維化モデルで培養自己骨髄 MSC 末梢静脈投与の肝臓再生効果を実証し、2014 年 8 月からの Phase I 臨床研究で安全性を確認した。さらに本研究申請時(2019 年)は、肝細胞癌合併のない非代償性肝硬変症を対象に、より治療効果を高めた「培養自己骨髄 MSC 肝動脈投与療法」の臨床研究を行っている。

2. 研究の目的

非代償性肝硬変症を背景に持つ進行肝細胞癌に対して「抗癌作用としての鉄キレート肝動注治療」と「肝機能サポートとしての培養骨髄 MSC 肝動脈投与療法」のハイブリッド療法の有効性をラット肝硬変合併肝癌モデルで検証し、ハイブリッド療法の治療メカニズムを解明する。さらに DFO 耐性株のどの代謝ターゲットが癌細胞の生存にとって重要なのかを明らかにすることにより、鉄キレート剤と MSC 併用効果を高める方法を開発する。

3. 研究の方法

3-1 ラット肝硬変合併肝癌モデル

投与 28 週時点で高率に肝硬変と肝癌を合併することが確認できている「ラット肝硬変合併肝癌モデル (オス Wister Rat に対して choline-deficient L-amino acid-defined(CDAA)食で飼育する)」に対して、CDAA 食 28 週飼育時点より DFO 腹腔内投与を開始し、さらに同種同系培養骨髄 MSC 投与を行い、肝線維化や肝発癌動態を組織学的に評価する。

3-2 増殖アッセイ

HeLa 細胞を 1 ウェルあたり 3,000 個の MSC を有する 96 ウェルプレートに DFO 添加し、Incucyte HD イメージングシステム (Essen BioScience, Ann Arbor, MI) を用いて細胞の面積を測定することにより細胞増殖を測定する。

3-3 ウェスタンブロット

細胞溶解バッファは、62.5mM Tris-HCl (pH6.8)、4%ドデシル硫酸ナトリウム (SDS)、200mM ジチオスレイトールで調製し、電気泳動は 12%アクリルアミドゲルで実施する。その後、タンパク質をポリフッ化ビニリデン (PVDF) 膜に移し、5%脱脂乳を用いた非特異的エピソードブロッキングを施した後、抗体を一晩反応させる。

3-4 メタボローム解析

細胞ペレットをメタノール抽出し、正、負または極性イオンモードでの超高性能液体クロマト

グラフィー / 質量分析 (UHPLC / MS) およびガスクロマトグラフィー / 質量分析 (GC / MS) により解析する。

3-5 トータル RNA の単離と SAGE 解析

TRIzol Reagent (Life Technology) を用いて全 RNA を単離する。RNA は定量し、Experion System (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) で品質を確認する。ライブラリは Ion Ampliseq Transcriptome Human Gene Expression Kit (Life Technologies) を使用し、Ion Proton 次世代シーケンサーライブラリーを作成し、Ion PI IC 200 Kit (Life Technologies) および Ion PI Chip Kit v2 BC を使用して、Ion Proton 次世代シーケンサーによるシーケンサー解析を行う。

4 . 研究成果

4-1 鉄キレート剤投与はラット肝病態進展抑制傾向がある

ラット CDAA 食モデルに対する DFO 腹腔内反復投与により肝病態抑制傾向を認めた。一方、骨髄 MSC 投与は明らかな変化がなく、より細胞継代数の少ない (高品質な) MSC をより多く投与する等の改良が必要であると考えられた。

4-2 HeLa 細胞に DFO を投与すると増殖能の低下とミトコンドリア活性の低下がおこる

ラット in vivo 研究を補完するため、DFO 耐性癌細胞株解析を並行で行うこととした。初めに広く癌研究に用いられている HeLa 細胞を用いて DFO の増殖に及ぼす影響を評価した。

DFO の濃度依存的に増殖抑制が認められ、特に 100 μ M 以上では著明な増殖抑制が認められた (図 1A)。フラックスアナライザで Oxygen consumption rate (OCR) を評価したところ、DFO の濃度依存的に OCR の低下が認められた (図 1B)。さらに Extracellular Acidification Rate (ECAR) / OCR 比を評価すると DFO の濃度依存的に Glycolytic になり、また less metabolic になった (図 1C)。DFO 投与による遺伝

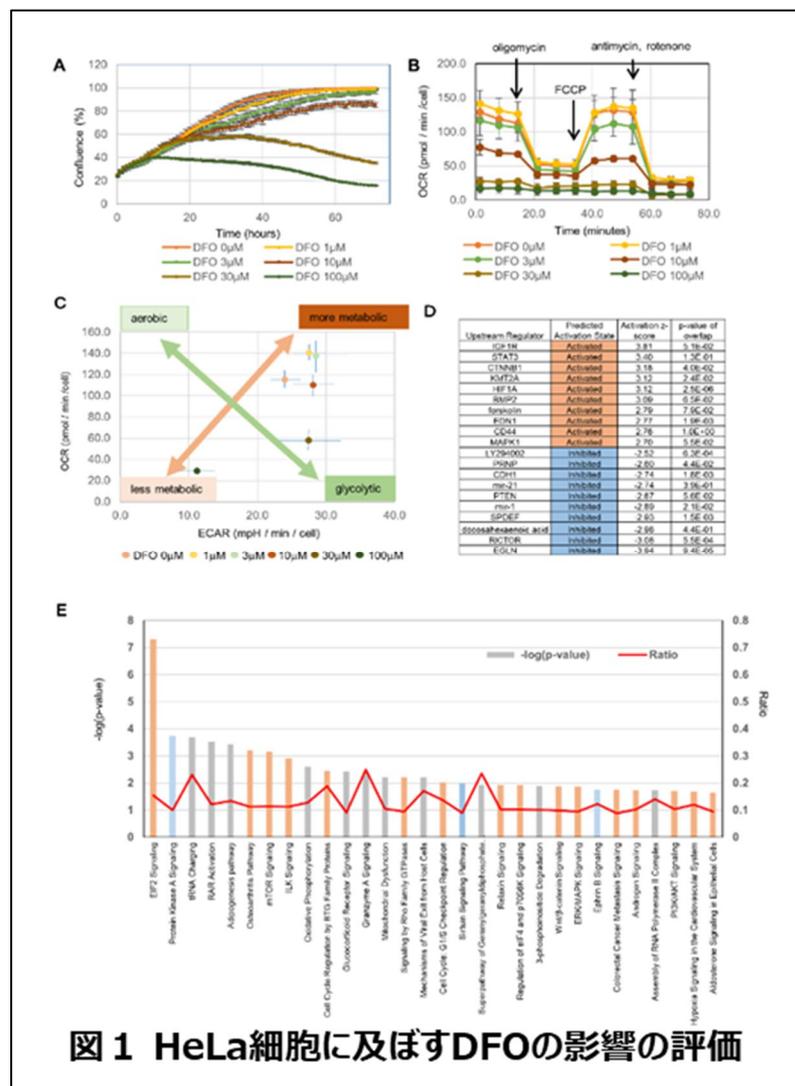


図 1 HeLa細胞に及ぼすDFOの影響の評価

子発現変化を SAGE 解析で評価し Ingenuity Pathway Analysis (IPA) 解析を行ったところ、upstream regulator として鉄キレート剤による HIF1 の蓄積および活性化や、EGLN (Egl Nine Homolog)の抑制があげられた(図 1D)。Pathway 解析では Hypoxia signaling の他にタンパク合

成低下を示唆する EIF2 signaling、tRNA Charging の変化や cell cycle checkpoint regulation などの細胞増殖に関わるパスウェイや mitochondrial dysfunction などミトコンドリアに関わるパスウェイの変化が認められた(図 1E)。

4-3 HeLa 細胞株では核酸サルベージ回路、de novo 合成、解糖系を亢進させ、ミトコンドリア代謝を低下させることが DFO 投与下で生存に有利になる

DFO 耐性 HeLa 細胞株の作成のため DFO 濃度を徐々に上昇させ約 6 か月かけ耐性株を確立した(図 2A)。親株と DFO 耐性株それぞれについて DFO100 μM 投与の有無による代謝変化をメタボローム解析で評価した。PCA 解析では親株 DFO 非投与群 (Parent Veh)、親株 100 μM DFO 投与群 (Parent DFO)、耐性株 DFO 非投与群 (Resistant Veh)、耐性株 100 μM DFO 投与群 (Resistant DFO) の 4 群はそれぞれ明確に分離された(図 2B)。また階層的クラスタリングでも 4 群で明らかな変化が認められた(図 2C)。更に Parent Veh と Resistant Veh を比較し

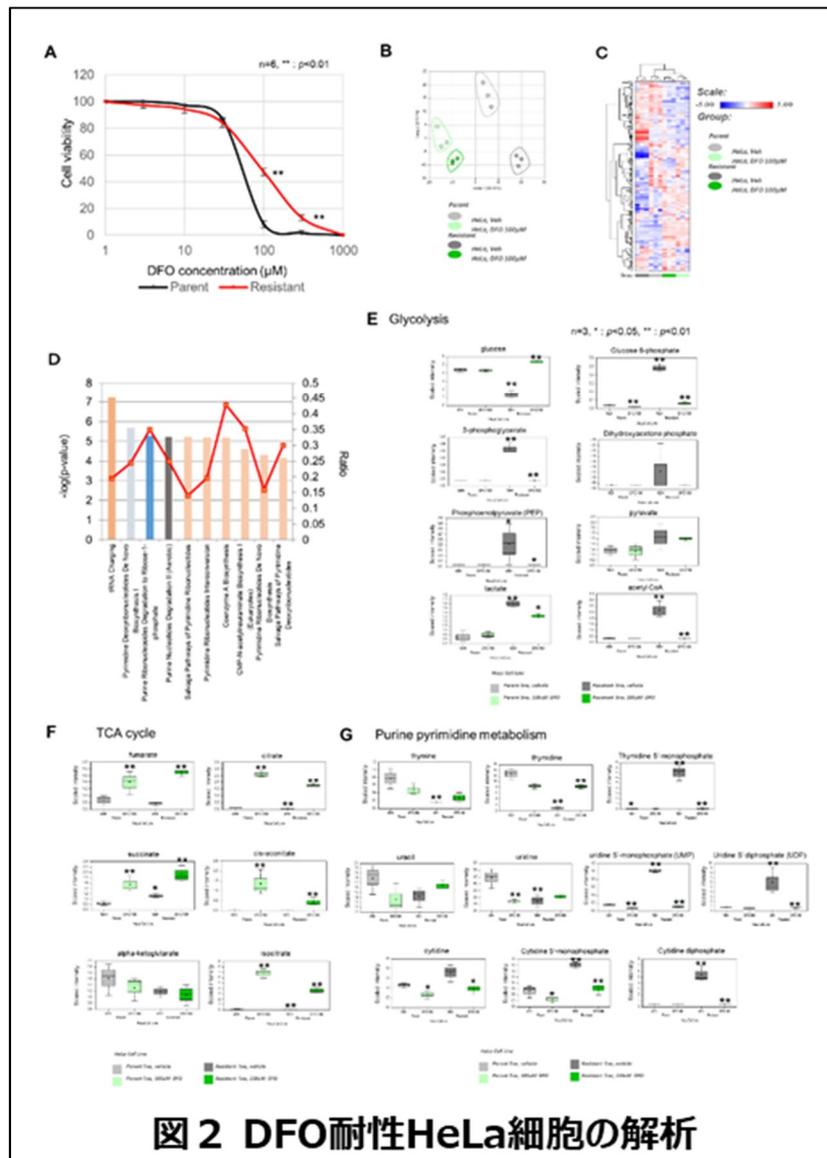


図 2 DFO耐性HeLa細胞の解析

たメタボローム解析のデータに SAGE 解析による遺伝子発現のデータを結合して IPA 解析で評価した。プリンとピリミジンのサルベージ回路、de novo 合成、分解に関わるパスウェイの変化や tRNA charging などが Canonical pathway の上位に認められた(図 2D)。メタボローム解析で解糖系に関わる代謝産物を Parent Veh と Resistant Veh とで比較したところ Resistant Veh で glucose-6-phosphate, 3-phosphoglycerol, acetyl-CoA, pyruvate, lactate の増加が認められた(図 2E)。また Parent および Resistant とともに DFO 投与により TCA 回路の代謝産物の蓄積が認められミトコンドリアの活性低下が示唆された。Parent DFO 群と Resistant DFO 群を比較すると citrate, cis-aconitate, isocitrate が Resistant DFO 群で統計学的に有意に低下していた(図 2F)。またプリンとピリミジンに関わる代謝産物では TMP, UMP, UDP などの増加、thymidine, thymine, uracil, uridine の低下が Resistant DFO で認められた(図 2G)。

4-4 HeLa 細胞において DFO と乳酸排出抑制剤との併用により相乗効果をもたらす

DFO 投与による解糖系の亢進が DFO に対する生存率向上に関係があることが示唆されたこ

とから、詳細な各種濃度の DFO 投与による乳酸濃度の詳細な変化を評価した。DFO 投与により培地中に分泌される乳酸が有意に増加した(図 3A)。DFO 投与により解糖系への代謝のシフトが起こり乳酸を多く産生することから、乳酸の細胞外排出を抑制する α -cyano-4-hydroxy cinnamate (CHC) を用いて DFO との併用効果の有無について評価したところ、併用によって細胞増殖抑制が認められた(図 3B)。さらに詳細

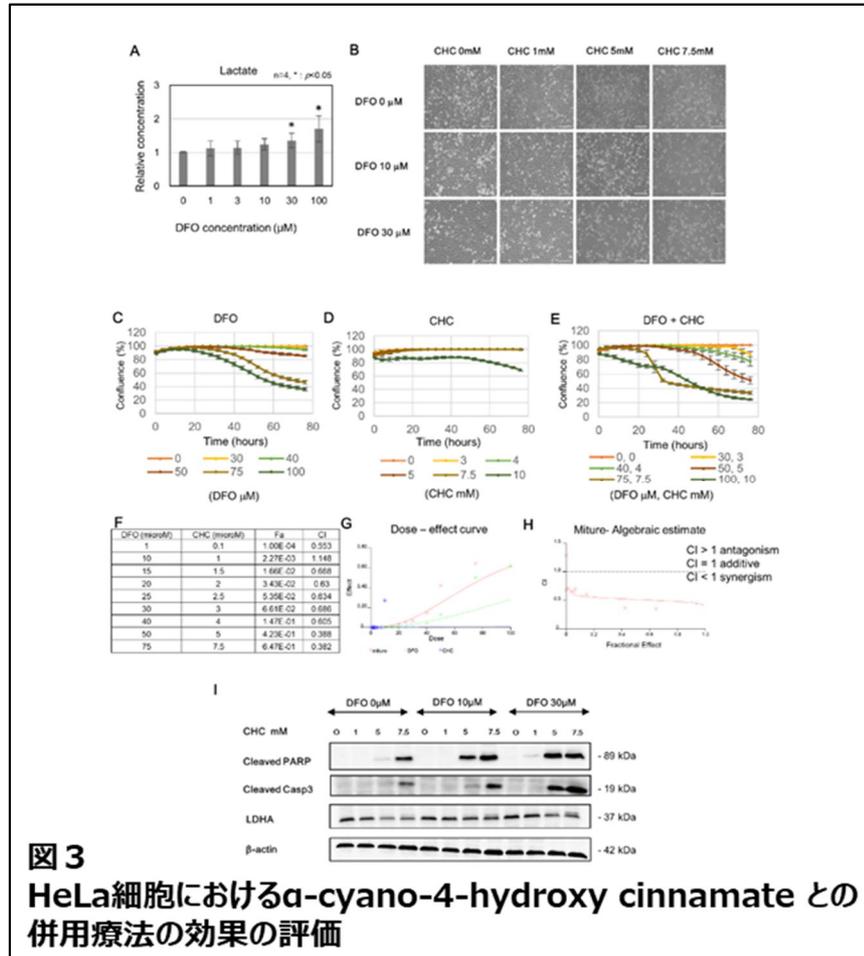


図 3 HeLa細胞における α -cyano-4-hydroxy cinnamate との併用療法の効果の評価

に各薬剤濃度で検討したところ、DFO 単独及び CHC 単独の場合と比べ CHC と DFO の併用で抗癌効果の増加が認められた(図 3C-E)。さらに Combination index (CI)は 1.0 未満を示し DFO と CHC の併用効果は相乗的と考えられた(図 3F-H)。アポトーシスに関わる cleaved PARP と Activated Caspase3 は併用で相乗的に増加していた(図 3I)。

まとめ

鉄キレート剤DFOは、主にエンドサイトーシスによって細胞内に取り込まれる。鉄のキレート化はPHD酵素を阻害し、HIF1 の蓄積をもたらし、それによって通常の酸素条件下で低酸素応答を誘発し、乳酸(解糖の最終生成物)産生を増加させる。過剰に産生された乳酸塩は、モノカルボキシレートトランスポーター(MCT)によって細胞から排泄される。CHCによるこの排泄過程の抑制は、細胞内の乳酸の蓄積をもたらす。これにより、細胞内の酸性度が高まり、最終的に細胞に損傷を与える。従って、鉄キレート剤とMSCを併用投与するハイブリッド療法の治療効果を高めるには、MSCが鉄キレート投与による低酸素環境における癌細胞株の解糖系シフトを抑制する作用があれば良いと考えられたため、さらなる検討を進める。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 19件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 12件）

1. 著者名 Fujisawa K, Takami T, Matsumoto T, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I.	4. 巻 10(1)
2. 論文標題 An iron chelation-based combinatorial anticancer therapy comprising deferoxamine and a lactate excretion inhibitor inhibits the proliferation of cancer cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cancer Metab.	6. 最初と最後の頁 8
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s40170-022-00284-x.	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8件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 高見太郎、松本俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 培養自己骨髄間葉系幹細胞肝動脈投与による医師主導治験「自己完結型肝硬変再生療法」の開発
3. 学会等名 第107回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高見太郎、松本俊彦、坂井田 功
2. 発表標題 肝硬変に対する医師主導治験「自己完結型肝硬変再生療法」の開発とNASH肝硬変モデルに対する有効性評価
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高見太郎、松本俊彦、大田久美江、児玉雅季、藤村瑠意、小島奈緒美、山本直樹、坂井田 功
2. 発表標題 医師主導治験「自己完結型肝硬変再生療法」の開発とNASH肝硬変への有効性評価
3. 学会等名 第21回日本再生医療学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高見太郎, 松本俊彦, 坂井田 功
2. 発表標題 非代償性肝硬変に対する自己完結型肝硬変再生療法の開発
3. 学会等名 第106回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高見太郎, 松本俊彦, 坂井田 功
2. 発表標題 非代償性肝硬変に対する培養自己骨髄間葉系幹細胞による自己完結型肝硬変再生療法
3. 学会等名 第56回日本肝臓学会総会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高見太郎, 松本俊彦, 坂井田 功
2. 発表標題 培養自己骨髄間葉系幹細胞肝動脈投与による「自己完結型肝硬変再生療法」の医師主導治験に向けた取り組み
3. 学会等名 第28回日本消化器関連学会週間
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>医師主導治験「自己完結型肝硬変再生療法」 https://www.ichinai-yamaguchi.jp/news/381 肝細胞研究会 研究交流「自己完結型肝硬変再生療法」 http://hepato.umin.jp/kouryu/kouryu62.html 医師主導治験「自己完結型肝硬変再生療法」 http://www.hosp.yamaguchi-u.ac.jp/news/news/post_375.html</p>

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	藤澤 浩一 (Fujisawa Koichi) (00448284)	産業医科大学・産業生態科学研究所・教授 (37116)	
研究分担者	山本 直樹 (Yamamoto Naoki) (90448283)	山口大学・教育・学生支援機構・教授 (15501)	
研究分担者	松本 俊彦 (Matsumoto Toshihiko) (70634723)	山口大学・大学院医学系研究科・講師 (15501)	

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