

令和 5 年 5 月 11 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K17039

研究課題名（和文）肝細胞癌幹細胞におけるレンバチニブ耐性機構の解明

研究課題名（英文）Mechanism of lenvatinib resistance in HCC-CSCs

研究代表者

前原 経（Maehara, Osamu）

北海道大学・薬学研究院・助教

研究者番号：80836338

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）：研究期間を通じた成果を以下に列挙する。

HCC細胞株に対してlenvatinib,sorafenibの耐性細胞を作成した。耐性細胞におけるCSCs (CD133high/CD44high)の割合はsor耐性細胞とlen耐性細胞では異なる結果となり、耐性の性質が異なることが示唆された。sor,len耐性細胞は親細胞と比較して優れた腫瘍形成能を有していたものの耐性細胞間では有意な差は認められなかった。耐性細胞における遺伝子発現の変化を網羅解析し、耐性細胞に共通する候補遺伝子の耐性への影響をin vitroで検討した結果、候補遺伝子A,B,Cが協調して耐性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

HCCにおいてsorafenib耐性細胞とCSCsとの関連を報告した研究は数多く存在する一方で、lenvatinib耐性細胞の性質やCSCsとの関係性を検証した報告はこれまでに報告が少なかった。さらに、それぞれの薬剤の耐性細胞同士を比較検討した報告もなかったため本研究を実施した。実際、lenvatinib耐性細胞とsorafenib耐性細胞の性質やCSCsとの関係性には特異性と共通性があることが一部ではあるが明らかになった。この解明は、lenvatinib不応例を含むHCCに対する治療最適化や新規治療法開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The following is a list of results achieved throughout the study period.

(1) Lenvatinib and sorafenib resistant cells were generated against HCC cell lines. (2)The ratio of CSCs (CD133high/CD44high) in resistant cells was different between sor- and len-resistant cells, suggesting that the nature of resistance differs between the two cell lines.(3) Although sor- and len-resistant cells had superior tumorigenic potential compared to their parent cells, there was no significant difference between the resistant cells.(4)The results of in vitro analysis of the effects of candidate genes common to resistant cells on resistance suggested that candidate genes A, B, and C may be involved in resistance in a concerted manner.

研究分野：腫瘍生物学

キーワード：癌幹細胞

1. 研究開始当初の背景

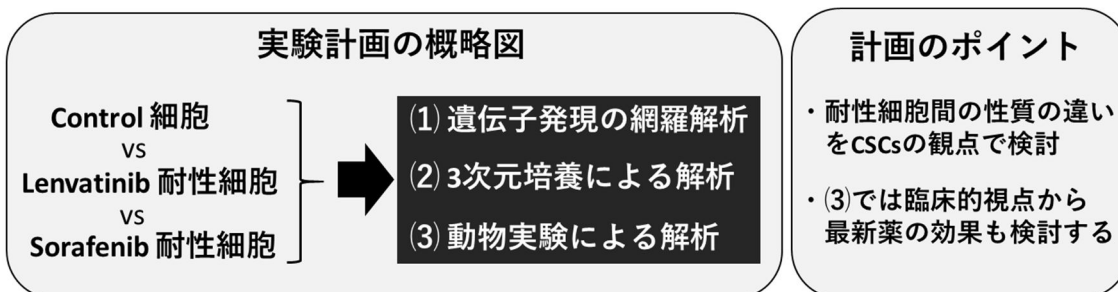
HCC は進行した段階で発見されることが多いこと、さらには他癌腫で用いられる殺細胞性抗がん剤に対して耐性を示すことから治療選択肢が少ないこと(全身薬物療法では sorafenib のみ)が問題点であった。最近、HCC の 1 次治療薬として lenvatinib が承認され広く使用されているが、この薬剤に対しても効果不十分な症例が多く存在する。現状では lenvatinib に対する治療抵抗性・耐性機構に関してはほとんど明らかとなっていない。我々はこれまでに複数の観点からがん幹細胞(CSCs)に関する研究に従事してきており、CSCs の存在が治療抵抗性・耐性機構に密接に関わることが予想される。そこで lenvatinib に対する治療抵抗性・耐性機構を sorafenib への耐性と比較することで、両薬剤耐性に特異的な性質は新たな効果予測因子の発見(両剤の使い分けによる治療最適化)に、両薬剤耐性に共通する性質は CSCs を標的とした新たな治療標的の発見につながると考えられる。

2. 研究の目的

lenvatinib 耐性細胞の性質や CSCs との関係性を *in vitro* と *in vivo* の実験を用いて明らかにすることを目的として遂行した。

3. 研究の方法

- (1)複数の HCC 細胞株を用いて lenvatinib, sorafenib 耐性細胞を作成し、それぞれの細胞における遺伝子発現変化の網羅的解析や腫瘍形成能を含む CSCs 特性の変化を *in vitro* (通常培養・3 次元培養)の実験系を用いて検証した。
- (2) (1)の結果から lenvatinib, sorafenib 耐性細胞に特異的な遺伝子、共通する遺伝子を抽出し、それらの遺伝子の役割・機能を *in vitro* の実験系を用いて検証した。
- (3) *in vitro* の実験で得られた結果を *in vivo* の実験で再検証した。



4. 研究成果

HCC 細胞株(Huh7)に対して lenvatinib, sorafenib を低濃度で長期間培養し、それぞれの耐性細胞を作成した。耐性細胞の IC50 は lenvatinib、sorafenib とともに親細胞株と比較して約 2 倍の濃度となった。

作成した耐性細胞における CSCs-population の変化を FACS を用いた CD44/CD133 の二重染色により親細胞株と比較検討した。その結果、sorafenib 耐性細胞は親細胞に比べて CD44high/CD133high 細胞が増加したが、lenvatinib 耐性細胞では逆に減少していた。

作成した sorafenib、lenvatinib 耐性細胞、親細胞の 3 種類をヌードマウスの皮下に移植し、腫瘍形成能を比較検討した。その結果、それぞれの耐性細胞は親細胞に比較して優れた腫瘍形成能を有していた。また、耐性細胞間では腫瘍形成能に有意な差は認められなかった。これらの結果から、特に lenvatinib 耐性細胞では CD44/CD133 以外の遺伝子や機序が薬剤耐性や腫瘍形成に関与していることが示唆された。

作成した sorafenib、lenvatinib 耐性細胞、親細胞の 3 者間の遺伝子発現の変化を DNA マイクロアレイにより検討した。その結果、各薬剤耐性に特異的な遺伝子と共通する遺伝子の候補を複数種類ピックアップすることができた。

マイクロアレイの結果から耐性に共通する候補遺伝子の解析を優先して行った。具体的には恒常的過剰発現・ノックダウン細胞を作成し、lenvatinib、sorafenib 耐性への影響を *in vitro* で検討した。その結果、細胞内の活性酸素除去に関わる遺伝子 A は lenvatinib、sorafenib 耐性に部分的に関与する可能性が示唆された。さらに、候補遺伝子 A の CSCs マーカーの発現への影響を検討したところ、コントロール群と比較して有意な変化が確認できた。

作成した sorafenib、lenvatinib 耐性細胞を用いた 3 次元培養(浮遊培養、biomaterial を用いた培養)の条件検討を行い、最適な培養条件を確認した。その後、複数の候補遺伝子の耐性への影響を検討した。候補遺伝子に関しては 3 次元培養時でも通常培養時と同様の結果となった。また lenvatinib 耐性に関しては、候補遺伝子 A に加えて候補遺伝子 B,C も協調して耐性に関与する可能性が示唆された。

3 次元培養をした sorafenib、lenvatinib 耐性細胞、親細胞の 3 種類から RNA を抽出し、RNA-seq により遺伝子発現の網羅解析を行った。正確な比較とはならないものの、で行った通常培養時のマイクロアレイの結果と照らし合わせた結果、通常培養と 3 次元培養両方で共通して発現変動が見られた遺伝子や 3 次元培養によって初めて発現変動が見られた遺伝子のピックアップに成功した。前述の遺伝子 A,B,C は通常培養と 3 次元培養両方で共通して耐性細胞において発現が上昇していた。今後は 3 次元培養によって始めて発現変動が見られた遺伝子に関して詳細な検討を進めていきたい。

耐性細胞株と親細胞株をヌードマウスの皮下に移植後、実際に lenvatinib、sorafenib をゾンデを用いて経口投与し、薬剤投与量の最適化と *in vivo* レベルでの耐性について確認検討した。その結果、想定通り親細胞株移植群に対しては薬剤の効果が見られたものの、耐性細胞株では *in vivo* においても薬剤耐性が確認できた。現在、候補遺伝子の恒常的過剰発現・ノックダウン細胞を用いて、候補遺伝子が *in vivo* レベルで薬剤耐性に関わっているか検討中である。

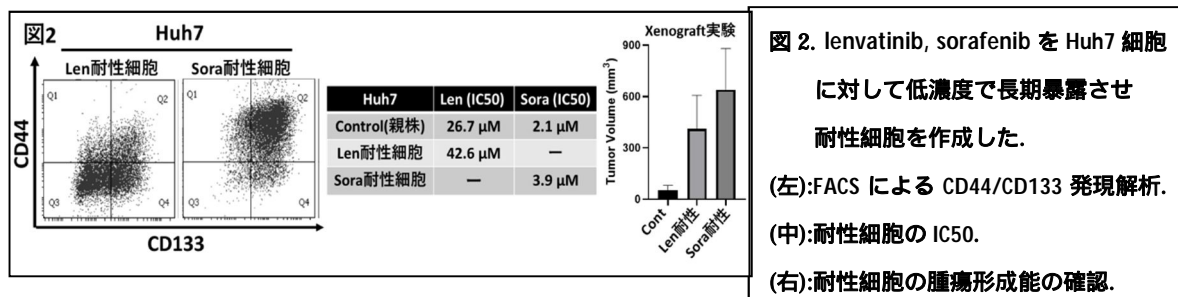


図 2. lenvatinib, sorafenib を Huh7 細胞に対して低濃度で長期暴露させ耐性細胞を作成した。
(左):FACS による CD44/CD133 発現解析。
(中):耐性細胞の IC50。
(右):耐性細胞の腫瘍形成能の確認。

マイクロアレイや RNA-seq で候補遺伝子と薬剤耐性・CSCs に関わる遺伝子の発現の HCC 検体での相関解析を TCGA データを用いて行った。その結果、一部の候補遺伝子において、本研究で用いている耐性細胞株での結果と類似する結果が得られた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Yang Zijian, Suda Goki, Maehara Osamu, Ohara Masatsugu, Yoshida Sonoe, Hosoda Shunichi, Kimura Megumi, Kubo Akinori, Tokuchi Yoshimasa, Fu Qingjie, Yamada Ren, Kitagataya Takashi, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohnishi Shunsuke, Sakamoto Naoya | 4. 巻 14 |
| 2. 論文標題 Changes in Serum Growth Factors during Lenvatinib Predict the Post Progressive Survival in Patients with Unresectable Hepatocellular Carcinoma | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 232 ~ 232 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers14010232 | 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 Kubo Akinori, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Tokuchi Yoshimasa, Kitagataya Takashi, Ohara Masatsugu, Yamada Ren, Shigesawa Taku, Suzuki Kazuharu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuzaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohnishi Shunsuke, Sakamoto Naoya | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Characteristics and Lenvatinib Treatment Response of Unresectable Hepatocellular Carcinoma with Iso-High Intensity in the Hepatobiliary Phase of EOB-MRI | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancers | 6. 最初と最後の頁 3633 ~ 3633 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/cancers13143633 | 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 Maehara Osamu, Suda Goki, Natsuzaka Mitsuteru, Shigesawa Taku, Kanbe Gouki, Kimura Megumi, Sugiyama Masaya, Mizokami Masashi, Nakai Masato, Sho Takuya, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Ohashi Shinya, Kagawa Shingo, Kinugasa Hideaki, Naganuma Seiji, Okubo Naoto, Ohnishi Shunsuke, Takeda Hiroshi, Sakamoto Naoya | 4. 巻 22 |
| 2. 論文標題 FGFR2 maintains cancer cell differentiation via AKT signaling in esophageal squamous cell carcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Cancer Biology & Therapy | 6. 最初と最後の頁 372 ~ 380 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15384047.2021.1939638 | 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 Shigesawa T, Maehara O, Suda G, Natsuizaka M, Kimura M, Shimazaki T, Yamamoto K, Yamada R, Kitagataya T, Nakamura A, Suzuki K, Ohara M, Kawagishi N, Umemura M, Nakai M, Sho T, Morikawa K, Ogawa K, Ohnishi S, Sugiyama M, Mizokami M, Takeda H, Sakamoto N | 4. 巻 42 |
| 2. 論文標題 Lenvatinib suppresses cancer stem-like cells in HCC by inhibiting FGFR1-3 signaling, but not FGFR4 signaling | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Carcinogenesis | 6. 最初と最後の頁 58 ~ 69 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/carcin/bgaa049 | 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 Shigesawa Taku, Suda Goki, Kimura Megumi, Maehara Osamu, Tokuchi Yoshimasa, Kubo Akinori, Yamada Ren, Furuya Ken, Baba Masaru, Kitagataya Takashi, Suzuki Kazuharu, Ohara Masatsugu, Kawagishi Naoki, Nakai Masato, Sho Takuya, Natsuizaka Mitsuteru, Morikawa Kenichi, Ogawa Koji, Sakamoto Naoya | 4. 巻 16 |
| 2. 論文標題 Baseline serum angiopoietin-2 and VEGF levels predict the deterioration of the liver functional reserve during lenvatinib treatment for hepatocellular carcinoma | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 PLOS ONE | 6. 最初と最後の頁 e0247728 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0247728 | 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2件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

| |
|---|
| 1. 発表者名 Yang Z, Suda G, Maehara O, Ogawa K, Kubo A, Toshida S, Tokuchi Y, Kimura M, Kitagataya T, Sho T, Shigesawa T, Yamada R, Nakai M, Morikawa K, Sakamoto N. |
| 2. 発表標題 Sequential changes in growth factors during Lenvatinib treatment in patients with unresectable hepatocellular carcinoma |
| 3. 学会等名 第2回 International Liver Conference (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 前原経、夏井坂光輝、大西俊介、坂本直哉 |
| 2. 発表標題 Lenvatinib suppresses cancer stem-like cells in HCC by inhibiting FGFR1-3 signaling, but not FGFR4 signaling |
| 3. 学会等名 第79回日本癌学会学術総会 |
| 4. 発表年 2020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 |
|---------|---------|
|---------|---------|