

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K16381

研究課題名(和文) 微小環境クロストークによるNrf2依存を介した肝癌薬剤耐性機序解明に関する研究

研究課題名(英文) Liver cancer drug resistance through Nrf2 dependence in tumor microenvironment

研究代表者

寺奥 大貴 (TERAOKU, Hiroki)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：80737106

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：近年急速に新たな治療が進んでいる肝細胞癌に対する薬物療法において、癌の薬剤抵抗性の獲得が重要な課題である。研究代表者は肝癌細胞と癌関連線維芽細胞(CAF)をはじめとする腫瘍微小環境での悪性度獲得の機序に注目した。肝癌細胞のソラフェニブ・レンバチニブ耐性株を作成することに成功し、薬剤抵抗性の獲得には癌細胞とCAFの相互作用が重要な役割を果たしており、その機序として転写因子Nuclear Factor(erythroid-derived 2)-Like 2 (Nrf2)が重要な役割をになっていることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

癌細胞自身に対する薬剤耐性メカニズムは研究が進んでいるが、癌細胞の悪性度獲得において重要な役割を果たす腫瘍微小環境が薬剤耐性に与える影響については不明な点が多い。近年急速に新たな治療が進んでいる肝細胞癌に対する薬物療法において、腫瘍微小環境構築の根幹となるCancer cell-CAF interactionを解除し、薬剤耐性に対する治療戦略確立を目指すことの社会的意義は大きく、癌人口が増加の一途をたどるの現状を考慮すると、本研究は腫瘍微小環境の糸口となる治療法開発につながる可能性があり意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Acquisition of drug resistance in cancer is an important issue in drug therapy for hepatocellular carcinoma, for which novel immunotherapy are rapidly progressing in recent years. In this study, we focused on the mechanism of malignancy acquisition in the tumor microenvironment, including hepatocellular carcinoma cells and cancer-associated fibroblasts (CAFs). We succeeded in creating sorafenib/lenvatinib-resistant liver cancer cells respectively, and found that the interaction between cancer cells and CAFs plays an important role through Nuclear Factor (erythroid-derived 2)-Like 2 (Nrf2) in the acquisition of drug resistance.

研究分野：肝細胞癌、腫瘍微小環境、薬剤耐性

キーワード：Nrf2 薬剤耐性 肝細胞癌 腫瘍微小環境 CAF

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(Hepatocellular carcinoma: HCC)が予後不良である原因の1つとして、薬剤抵抗性の獲得が挙げられ、機序として薬剤を細胞外に排出する ATP Binding Cassette (ABC) トランスポーターの発現、癌幹細胞様の特性獲得などが報告されているが、その全貌は未だ明らかになっていない。近年、癌関連線維芽細胞(cancer associated fibroblast: CAF)をはじめとする腫瘍微小環境の形成が悪性度獲得の機序として注目されており、研究代表者は転写因子 Nuclear Factor(erythroid-derived 2)-Like 2 (Nrf2)が、腫瘍微小環境を介して肝胆膵癌の悪性度獲得に寄与することを発見した。また Nrf2 が恒常的に発現している状態(Nrf2 依存)が薬剤耐性に関与するという報告があり、HCC の薬剤耐性獲得に関しても、腫瘍微小環境を介した Nrf2 依存が重要な役割を果たしていると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、Nrf2 シグナルが微小環境クロストークに与える影響について検討し、HCC における薬剤抵抗性獲得の解明を目的とした。肝細胞癌における薬剤耐性獲得機序について以下の仮説を立てた。つまり、癌細胞において薬剤投与のストレスが Nrf2 の核内移行を引き起こすことにより、幹細胞マーカーの発現や ABC トランスポーターの発現増強を促進し、薬剤耐性を獲得する、さらにこの薬剤耐性を獲得した腫瘍細胞は通常の癌細胞に比べて CAF をさらに活性化し、IL-11をはじめとする液性因子により癌細胞の Nrf2 依存を亢進し、さらなる薬剤耐性や悪性度獲得につながるというものである。つまり本研究は、Nrf2 を介した腫瘍と微小環境のクロストークによる薬剤耐性獲得機序を明らかにすることを目的としている。特に薬剤耐性株が微小環境に与える影響に関して検討した報告はなく、腫瘍と微小環境のクロストークを詳細に解明することは、HCC 治療におけるブレークスルーになる可能性が高く、学術的独自性と創造性に富んでいる。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性肝癌における Nrf2 の役割、(2) 薬剤耐性細胞株由来の CAF 活性化における Nrf2 の役割、(3) 薬剤耐性細胞株由来の CAF による Nrf2 依存を介した腫瘍悪性度・薬剤耐性獲得機序を検討する。

(1) 薬剤耐性肝癌細胞株における Nrf2 の役割の解明

ソラフェニブ・レンバチニブ耐性肝癌細胞株の確立と特性の確認

肝癌細胞株(Huh7、PLC)を使用。ソラフェニブ・レンバチニブを含む培地で培養し、濃度を徐々に上昇させることにより耐性株を樹立し、以下の項目を親株と耐性株で比較検討を行う。

- ・ Cell morphology
- ・ Viability: Cell Counting Kit-8
- ・ Proliferation: colony forming assay.
- ・ Migration/invasion rates: transwell/scratch assay
- ・ Stemness 関連遺伝子発現 (EPCAM, CD44, Nanog): RT-PCR
- ・ ABC トランスポーター遺伝子発現 (ABCC1, ABCG2, ABCB2, ABCA6): RT-PCR
- ・ Nrf2 発現: Western blot、免疫蛍光染色 (核内移行の確認)

Nrf2 ノックダウンによる細胞株の特性の変化に関する検討

耐性株が獲得した特性において、Nrf2 pathway の影響を検討するために、Si-RNA により Nrf2 をノックダウンした耐性株を用いて、実験1の検討項目を確認する。

(2) 薬剤耐性細胞株由来 CAF における Nrf2 pathway の検討

薬剤耐性肝癌細胞株(Huh7、PLC)で24hr培養による Cancer condition medium (Cancer-CM) を作成。臨床検体より分離した肝星細胞 (1×10^4 個) (もしくは肝星細胞株 LX2) から CAF を作成する。

耐性株由来 CAF と親株由来 CAF における特性変化を検討する。

- ・ CAF markers (SMA, FAP): RT-PCR
- ・ Nrf2 発現: Western blot、免疫蛍光染色 (核内移行の確認) IL-11, IL-6, CXCL14

(3) 薬剤耐性細胞株由来 CAF による腫瘍増殖能・遊走能獲得の検討

肝癌細胞株(Huh7、PLC)と薬剤耐性細胞株由来の CAF (1×10^5 個) を共培養し、親株由来の CAF と共培養した場合と腫瘍悪性度や治療抵抗性を比較検討する。

- ・ Cell viability: Cell Counting Kit-8
- ・ Migration ability: Transwell and scratch assay
- ・ Proliferation: colony forming assay.
- ・ EMT マーカー (E-cadherin, N-cadherin): Western blot, RT-PCR

- ・腫瘍増殖関連因子(TGF- β , Akt, STAT3, bcl-2, survivin) :
Western blot, RT-PCR
- ・腫瘍の Nrf2 発現 : Western blot, 免疫蛍光染色 (核内移行の確認)

(4)耐性株由来 CAF 移植による in vivo における検討

上記検討(2)で作成した耐性株由来 CAF を肝癌細胞株とともに 4~5 週齢 Balb/c ノードマウス背部に皮下注射し異所性モデルを作成。4 週間後に sacrifice し、癌進展・転移促進の検討を行い、癌細胞のみを皮下注射した群と比較する。また、ソラフェニブ、レンバチニブ投与による治療抵抗性についても比較検討する。

腫瘍重量、転移巣の検索、IHC 染色 : Ki-76 labeling index, Nrf2、RT-PCR: Stemness 関連遺伝子発現 (EPCAM, CD44, Nanog) EMT マーカー (E-cadherin, N-cadherin) 細胞増殖因子(STAT3, bcl-2, survivin)

4 . 研究成果

(1)薬剤耐性肝癌における Nrf2 の役割の解明

ソラフェニブ・レンバチニブ耐性肝癌細胞株の確立と特性の確認

ソラフェニブ耐性株作成は、1 週ごとに培養液中のソラフェニブ濃度を 0.5 μ M ずつ上げていき、8.0 μ M の時点で耐性株完成とした。

レンバチニブ耐性株作成は、1 週毎に培養液中のレンバチニブ濃度を増加させ、3 か月間で 2 μ M 20 μ M(Huh7), 23 μ M (PLC) まで濃度を上昇させ耐性株を作成し、更にその後 3 か月間 Lenvatinib 存在下で耐性株の増殖や形質が安定していることを確認した。

ソラフェニブ耐性株の細胞形態は、より heterogenous で細胞質が豊富であり、耐性株ではソラフェニブへの感受性が低下した。遺伝子発現について、EpCAM や Nanog といった stemness marker や、Nrf2、下流の HO-1 が耐性株で有意に高発現でした。また ABC トランスポーター発現が耐性株で有意に高い結果であった。

レンバチニブ耐性株は浸潤能、遊走能、増殖能が保たれていた。耐性株で Nrf2 の遺伝子発現は増強し、ABC トランスポーター (ABCA6, ABCC2, ABCG2) の発現増強と Stemness marker である Nanog, CD44, EPCAM の高発現を確認した。

Nrf2 ノックダウンによる細胞株の特性の変化に関する検討

Si-RNA によって Nrf2 発現を抑制すると、ソラフェニブ耐性株における stemness marker や ABC トランスポーターの発現上昇が抑制され、耐性株で上昇した浸潤、転移能に関しても、Nrf2 阻害により抑制された。

レンバチニブ耐性株に関しても、siRNA を用いて Nrf2 をノックダウンすると、耐性株の浸潤・遊走・増殖能は非耐性株と同程度にまで解除された。

(2)薬剤耐性細胞株由来 CAF における Nrf2 pathway の検討

CAF マーカーである SMA、FAP の mRNA 発現はソラフェニブ耐性 Huh7 由来 CAF、レンバチニブ耐性 Huh7 由来 CAF いずれにおいても LX2、親株由来 CAF と比較し、有意に高発現していた。また Nrf2、IL6 発現に関しても同様の結果が確認された。

(3)薬剤耐性細胞株由来 CAF による腫瘍増殖能・遊走能獲得の検討 (令和 3 年~4 年)

薬剤耐性細胞株由来の CAF とのを共培養では Viability に差を認めなかったが、浸潤能・遊走能は親株由来の CAF よりも増強していることが確認された。また Nrf-2 の核内移行もより増強していた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------