

令和 6 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K16443

研究課題名（和文）PDOXモデルを用いたWarburg効果を標的とする肝内胆管癌外科治療戦略の開発

研究課題名（英文）Development of surgical treatment strategies for intrahepatic cholangiocarcinoma targeting the Warburg effect using PDOX models

研究代表者

楊 知明（Yoh, Tomoaki）

京都大学・医学研究科・助教

研究者番号：20842826

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）：本研究ではWarburg効果を標的とした治療開発やメカニズム解明を患者由来異種移植（PDX）モデルを用いて行うことを目的とした。

PDXモデルは生着率の低さから本研究期間内では達成できなかった。一方、Warburg効果を含む糖代謝制御に着目しバイオマーカーの探索を行い、フェロトシス制御因子であるglutathione peroxidase 4(GPX4)が肝内胆管癌術後の予後を層別化し、糖代謝との関連も見出した。また細胞株を用いた検証ではGPX4阻害により腫瘍進展や糖代謝マーカー発現が抑制され、さらにはGPX4による糖代謝制御がAkt-mTOR経路を介する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝内胆管癌は未だ予後不良な癌であり、予後改善には集学的外科治療の開発が求められる。本研究では新規細胞死であるフェロトシス制御因子GPX4が肝内胆管癌において有意な予後因子であり、Warburg効果を含む糖代謝にGPX4が関与する可能性を明らかにした。このことはGPX4が単にバイオマーカーとして有用であるというだけでなく、GPX4による糖代謝制御を介した細胞死誘導など、今後の新たな癌治療法の開発につながる可能性を含んでいると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The aim of this study was to develop therapies targeting the Warburg effect and to investigate the mechanism using a patient-derived xenograft (PDX) model.

The PDX model could not be achieved within this study period due to the low viability of the graft specimens. On the other hand, we explored biomarkers focusing on the regulation of glucose metabolism including the Warburg effect, and found that glutathione peroxidase 4 (GPX4), a regulator of ferroptosis, stratified the prognosis in patients with intrahepatic cholangiocarcinoma after surgery and was also identified the association with glucose metabolism. In vitro and vivo studies, we revealed that GPX4 inhibition suppressed tumor progression and expression of markers of glucose metabolism, and further demonstrated that regulation of glucose metabolism by GPX4 may be mediated via Akt-mTOR pathway.

研究分野：肝胆膵外科

キーワード：肝内胆管癌 Warburg効果 糖代謝

## 1. 研究開始当初の背景

肝内胆管癌の予後は未だ不良であるため、down-staging や予後延長を目的とした集学的外科治療が期待される。われわれは癌細胞が有酸素下でもミトコンドリアの酸化的リン酸化よりも、解糖系で ATP を産生する現象である Warburg 効果が肝内胆管癌の術後予後に関連することを示しており、術前治療の良い標的であるとの仮説を立てた。しかしながら、肝臓外科の術前治療には「肝機能」を保持した「腫瘍」の効果的な制御が重要である為、これまでにない前臨床的な実験系が必要である。前臨床的な実験を行う目的で、腫瘍組織の不均一性・微小環境などを忠実に再現する患者由来同所性異種移植(Patient-Derived Orthotopic Xenograft [PDOX]) モデルに着目した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝内胆管癌 PDOX モデルを作成し、Warburg 効果を標的とする肝内胆管癌外科治療開発の基盤実験を行う事である。

## 3. 研究の方法

### 1: PD(O)X モデルの作成

肝内胆管癌に対する肝切除症例を対象に、患者の同意を得て腫瘍組織の一部を採取し、免疫不全マウスの皮下に移植を行い、PDX モデルを作成する。皮下で増殖した腫瘍は継代を行い、最終的には免疫不全マウスの肝臓に皮下腫瘍片を移植し PDOX モデルを作成する。

### 2: Warburg 効果を標的としたバイオマーカーの探索と糖代謝制御のメカニズム解明

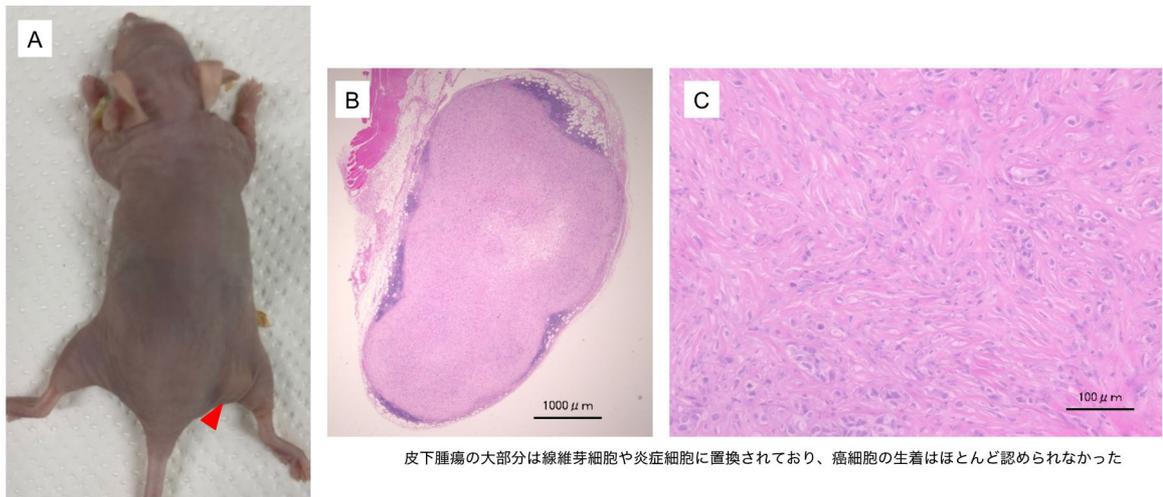
切除標本を用いた免疫染色により、Warburg 効果の代表的マーカーである GLUT1 をはじめとした様々な制御因子の発現と臨床病理学的因子や生命予後との関連を評価する。また関連が同定された因子について、細胞株を用いた基礎的な実験により、腫瘍進展や Warburg 効果をはじめとする糖代謝との関連について、分子生物学的メカニズムを解明する。

## 4. 研究成果

### 1: PD(O)X モデルの作成

研究期間中、肝内胆管癌で肝切除を施行した 9 人の患者より同意を得て、手術検体より腫瘍組織を採取し免疫不全マウスに皮下移植を行い PDX モデルの作成を試みた。このうち 3 症例で皮下での腫瘍形成が認められ、3 ヶ月程度の飼育ののち犠死させ皮下腫瘍を採取して組織を観察した(図 1A)。しかし腫瘍組織のごく一部に癌細胞の集簇が確認されたのみで、大部分は線維芽細胞や炎症細胞に置換されており、純粋な癌細胞の生着は確認されなかった(図 1B、C)。研究期間後半では細胞外基質を用いた皮下移植も行ったが、この方法でも腫瘍組織の形成は確認できなかった。皮下での腫瘍生着が見られなかったため、肝臓へ腫瘍組織を移植する PDOX モデルを用いた実験系は実施できなかった。

図1



マウス皮下に腫瘍形成を認めた(n=3/9, 33%)

## 2 : Warburg 効果を標的としたバイオマーカーの探索と糖代謝制御の新規メカニズム解明

2012 年に提唱された鉄依存的な過酸化脂質の蓄積によって特徴付けられるプログラム細胞死の一種である “フェロトーシス (ferroptosis)” の誘導作用は肝内胆管癌の代表的遺伝子変異である p53 変異下でも保持されることが報告された (Jiang L, et al. Nature. 2015.)。 p53 変異は癌特異的糖代謝とも関連することから、フェロトーシスの制御因子である glutathione peroxidase 4(GPX4)に着目して解析を行なった。

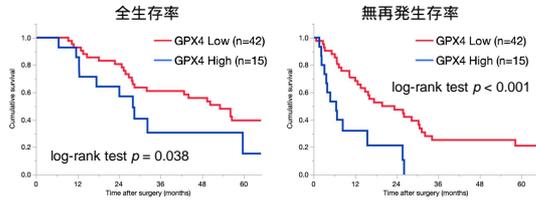
切除標本を用いた免疫染色により GPX4 の発現によって肝内胆管癌患者の予後が有意に層別化できることが明らかとなった(図 2A)。また、Warburg 効果の代表的サロゲートマーカーである GLUT1 発現や FDG-PET における SUVmax 高値との関連も示された。

詳細なメカニズムを検討するために細胞株実験を行なった。また、代表的フェロトーシス誘導薬である RSL3 (RAS synthetic lethality) により、GPX4 を阻害することによって細胞増殖能・遊走能が有意に抑制されるとともに(図 2B)、Warburg 効果に関連する GLUT1 や HIF1a、LDHA の発現が抑制されることが明らかになった(図 2C)。

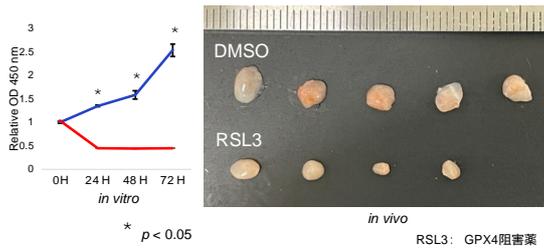
そのメカニズムに関して、Akt-mTOR 経路に着目して評価を行った。その結果、GPX4 を阻害することで Akt-mTOR 経路の活性化と GLUT1 発現が抑制される一方、mTOR を活性化させることによって GPX4 阻害により抑制される GLUT1 発現が回復することが示された(図 2D)。GPX4 による Warburg 効果をはじめとした糖代謝制御が Akt-mTOR 経路によって制御されるという 1 つのメカニズムを示唆するものであると考えられた。

図2

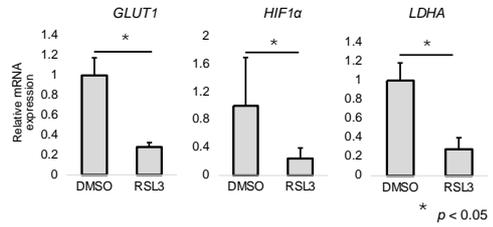
**A** GPX4発現による肝内胆管癌切除後の予後



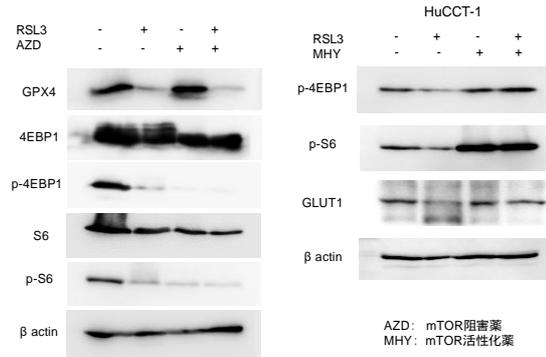
**B** GPX4阻害薬による抗腫瘍効果の検証



**C** GPX4阻害と糖代謝関連マーカーの関連



**D** GPX4とmTORシグナル経路との関連



## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 8件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Yoh T, Cauchy F, Soubrane O	4. 巻 275
2. 論文標題 Oncological Resection for Liver Malignancies: Can the Laparoscopic Approach Provide Benefits?	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Annals of Surgery	6. 最初と最後の頁 182-188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1097/SLA.0000000000003851	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 該当する
1. 著者名 Yoh T, Ishii T, Nishio T, Koyama Y, Ogiso S, Fukumitsu K, Uchida Y, Ito T, Seo S, Hata K, Hatano E.	4. 巻 47
2. 論文標題 A Conceptual Classification of Resectability for HepatoCellular Carcinoma.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 World Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 470-478
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-022-06803-7	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 該当する
1. 著者名 Yoh T, Seo S, Ogiso S, Morino K, Nishio T, Koyama Y, Fukumitsu K, Ishii T, Taura K, Hatano E	4. 巻 36
2. 論文標題 Learning process of laparoscopic liver resection and postoperative outcomes: chronological analysis of single-center 15-years' experience	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Surgical Endoscopy	6. 最初と最後の頁 3398-3406
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00464-021-08660-2	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 該当する
1. 著者名 Morino Koshiro, Seo Satoru, Yoh Tomoaki, Toda Rei, Yoshino Kenji, Nishio Takahiro, Yamamoto Gen, Ishii Takamichi, Taura Kojiro, Hatano Etsuro	4. 巻 47
2. 論文標題 Impact of the Intermittent Pringle Maneuver for Predicting Post-hepatectomy Liver Failure: A Cohort Study of 597 Consecutive Patients	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 World Journal of Surgery	6. 最初と最後の頁 1058 ~ 1067
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00268-023-06904-x	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 該当する

1. 著者名 Makino Kenta, Ishii Takamichi, Yoh Tomoaki, Ogiso Satoshi, Fukumitsu Ken, Seo Satoru, Taura Kojiro, Hatano Etsuro	4. 巻 8
2. 論文標題 The usefulness of preoperative bile cultures for hepatectomy with biliary reconstruction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Heliyon	6. 最初と最後の頁 e12226 ~ e12226
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.heliyon.2022.e12226	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 該当する

1. 著者名 Ogiso Satoshi, Seo Satoru, Yoh Tomoaki, Koyama Yukinori, Fukumitsu Ken, Ishii Takamichi, Hatano Etsuro	4. 巻 27
2. 論文標題 Laparoscopic Parenchyma-Sparing Resection of Difficult-to-Resect Deep Posterosuperior Liver Lesions: Conceptual Technique to Ensure Optimal Margin	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Gastrointestinal Surgery	6. 最初と最後の頁 790 ~ 793
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11605-022-05497-5	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 該当する

1. 著者名 Ogiso S, Seo S, Ishii T, Yoh T, Koyama Y, Fukumitsu K, Taura K.	4. 巻 28
2. 論文標題 Transfissural Approach for Laparoscopic Resection of a Deep Segment 8 Lesion in Contact with the Hepatocaval Confluence	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Ann Surg Oncol .	6. 最初と最後の頁 2990
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1245/s10434-020-09309-5	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 Yoh T, Seo S, Ogiso S, Morino K, Fukumitsu K, Ishii T, Nakamoto Y, Taura K.	4. 巻 23
2. 論文標題 Quantitative assessment of microvascular invasion in hepatocellular carcinoma using preoperative serological and imaging markers.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 1039-1045
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2020.10.024.	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 Yoh T, Perrot A, Beaufriere A, Hobeika C, Sartoris R, Paradis V, Vilgrain V, Soubrane O, Cauchy F, Ronot M.	4. 巻 31
2. 論文標題 Liver surface nodularity: a novel predictor of post-hepatectomy liver failure in patients with colorectal liver metastases following chemotherapy	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Eur Radiol.	6. 最初と最後の頁 5830-5839
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00330-020-07683-y	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 該当する

1. 著者名 Yoshino K, Yoh T, Taura K, Seo S, Ciria R, Briceno-Delgado J.	4. 巻 23
2. 論文標題 A systematic review of prediction models for post-hepatectomy liver failure in patients undergoing liver surgery.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 HPB	6. 最初と最後の頁 1311-1320.
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.hpb.2021.05.002.	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 該当する

[学会発表] 計12件(うち招待講演 0件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 楊 知明 瀬尾 智 西尾 太宏 山本 玄 小山 幸法 小木曾 聡 福光 剣 石井 隆道 秦 浩一郎 増井 俊彦 田浦 康二郎 波多野 悦朗
2. 発表標題 当院におけるBCLC Intermediate Stage 肝細胞癌に対する切除先行治療の検証
3. 学会等名 第122回日本外科学会学術集会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 知明 石井隆道 西尾太宏 小山幸法 小木曾聡 福光剣 瀬尾智 波多野悦朗
2. 発表標題 肝細胞癌における切除可能性分類の提唱
3. 学会等名 第58回日本肝癌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Tomoaki YOH, Takamichi ISHII, Takahiro NISHIO, Yukinori KOYAMA, Satoshi OGISO, Ken FUKUITSU, Satoru SEO, Koichiro HATA, Toshihiko MASUI, Kojiro TAURA, Etsuro HATANO
2. 発表標題 Evaluation of Liver Function for Borderline Resectable Hepatocellular Carcinoma
3. 学会等名 第34回日本肝胆膵外科学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 知明 瀬尾 智 西尾太宏 小山幸法 小木曾聡 福光剣 石井隆道 田浦康二郎 波多野悦朗
2. 発表標題 再発肝細胞癌に対する肝外転移巣切除の意義
3. 学会等名 第77回日本消化器外科学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Makoto KURIMOTO, Satoru SEO, Tomoaki YOH, Yuichi TAKAMATSU, Yutaro HORI, Rei TODA, Takahiro NISHIO, Yukinori KOYAMA, Satoshi OGISO, Ken FUKUMITSU, Takamichi ISHII, Kojiro TAURA, Etsuro HATANO
2. 発表標題 Superior Prognostic Value of Metabolic Tumor Volume to Conventional Parameter by 18F-FDG PET/CT for Hepatocellular Carcinoma after Hepatectomy
3. 学会等名 AOS 2022 & KCA Annual Meeting 2022 (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 栗本信、楊知明、瀬尾智、西尾太宏、山本玄、小山幸法、小木曾聡、福光剣、石井隆道、田浦康二郎、波多野悦朗
2. 発表標題 肝内胆管癌における至適リンパ節郭清に関する検討
3. 学会等名 第122回日本外科学会学術集会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 瀬尾 智 楊知明 波多野悦朗
2. 発表標題 FDG-PETにPIVKA-IIを組み合わせた肝細胞癌におけるMicrovasucular Invasionの術前予測
3. 学会等名 第108回日本消化器病学会総会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井隆道, 楊知明, 小山幸法, 小木曾聡, 福光剣, 瀬尾智, 田浦康二郎, 波多野悦朗
2. 発表標題 切除可能境界肝細胞癌に対する当科での肝切除
3. 学会等名 第58回日本肝癌研究会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石井隆道, 楊知明, 波多野悦朗
2. 発表標題 肝細胞癌における切除可能性について
3. 学会等名 第58回日本肝臓学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 楊 知明, 瀬尾 智, 西尾 太宏, 小山 幸法, 小木曾 聡, 福光 剣, 石井 隆道, 田浦 康二郎, 波多野 悦朗
2. 発表標題 当院における肝内胆管癌の外科治療戦略の現況：リンパ節転移に着目したTailored Therapyに向けて
3. 学会等名 第57回日本肝癌研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊 知明, 瀬尾 智, 西尾 太宏, 小山 幸法, 小木曾 聡, 福光 剣, 石井 隆道, 田浦 康二郎, 波多野 悦朗
2. 発表標題 術前に肝内胆管癌と診断されなかった切除症例の検討
3. 学会等名 第57回日本胆道学会学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 楊 知明, 瀬尾 智, 西尾 太宏, 小山 幸法, 小木曾 聡, 福光 剣, 石井 隆道, 田浦 康二郎, 波多野 悦朗
2. 発表標題 肝切除後に肝内胆管癌と診断された症例の臨床像から至適術式を再考する
3. 学会等名 第83回日本臨床外科学会総会
4. 発表年 2021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
---------	---------