

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 30 日現在

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23790421

研究課題名(和文) ヒト肝癌転移モデルを用いた分子標的治療薬の機能解明

研究課題名(英文) Functional analysis of molecular targeted therapy used human hepatocellular carcinoma a metastasis model

研究代表者

杜 ぶん林 (Du, Wenlin)

慶應義塾大学・医学部・助教

研究者番号：90348798

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、肝細胞癌の進行症例に相当する肝細胞癌転移モデルを用いて、分子標的治療薬の機能と作用機序について検討した。In vitroで分子標的薬sorafenibの投与による肝細胞癌株の細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導が顕著にみられ、リン酸化LYNとFGFR4発現の低下がみられた。In vivoモデルにおいてはsorafenib投与による肝内転移抑制傾向が認められた。Sorafenib投与臨床症例の肝細胞癌検体では、血管内皮障害がみられた。FGFR4, LYNなどは分子標的治療薬sorafenibの治療効果予測因子として有用性が期待でき、これからは臨床検体でさらに検討すべきと考える。

研究成果の概要(英文)：Multikinase inhibitor sorafenib is reported to have obtained a better effect than conventional chemotherapy for hepatocellular carcinoma. The influence and function of sorafenib on tumor invasion or metastasis is unknown. In this study, we aimed to analyze the mechanism of sorafenib on hepatocellular carcinoma(HCC) extension including tumor growth, invasion and metastasis and establish predictive model of sorafenib efficacy. Sorafenib inhibited the proliferation of HCC cell KYN2 more than Li7. Sorafenib also induced apoptosis on KYN2 not Li7. Sorafenib reduce the phosphorylation level of LYN and expression of FGFR4 on KYN2, but not on Li7. Microarray resulted the signal of LYN, FGFR4 of KYN2 were more than Li7. The difference expression of these tyrosinase molecular could be useful to find candidate biomarker for prediction of sorafenib response. In the case of HCC treated with sorafenib, the injury of endothelium was observed.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：基礎医学・人体病理学

キーワード：肝細胞癌 分子標的治療薬

1. 研究開始当初の背景

日本における肝細胞癌の大部分は慢性肝炎や肝硬変を背景としており、早期発見率および早期肝癌に対する治療成績は向上したが、局所療法や切除術、肝移植術の対象外の症例が多く、切除術後も5年生存率が25-50%で、肝細胞癌全体としての予後は依然不良である。再発を繰り返す症例や肝内転移を来す症例など肝細胞癌の進行例に対しては、一般的な癌治療法として化学療法が選択されるが、肝細胞癌の場合、慢性肝炎や肝硬変が背景にあるため、間質の複雑な影響で肝細胞癌は抗癌剤に対する感受性が低く、また、肝機能や全身状態不良のために抗癌剤の継続投与が難しく、従来の抗癌剤では有効な化学療法が確立されていないのが現状である。肝細胞癌は血管密度が高く、EGFR, FGFR, C-Met, PDGFR, IGF1R, VEGFRなど各種の成長因子レセプターとRaf/MEK/ERK, PI3K/Akt/mTOR, Jak/Satなど各signal pathwayの活性化が肝細胞癌細胞の成長、浸潤、転移に緊密関連している。

近年、これらの分子を標的とする肝細胞癌治療薬の開発が進められている。その中でも、特にSorafenibやSunitinibなど多標的チロシンキナーゼ阻害薬が複数のキナーゼを阻害することで抗腫瘍効果がより広範囲に期待できるとされている。欧米とアジアではこれらの分子標的治療薬についての第II相、第III相臨床試験で生存期間中央値の延長が得られたと報告されている(Hepatology 48, 1312-1318, 2008; Lancet Oncol 2009;10:25-34)。SorafenibとSunitinibは受容体であるFLT-3, VEGFR(1-3)およびPDGFR- α を標的とし、Sorafenibは更に細胞内RAFを阻害することにより、癌細胞の増殖と腫瘍の血管新生を抑制し、アポトーシスを誘導すると報告されている(Cancer Research 64, 7099-7109, 2004)。BivanibはVEGFR-2とFGFR-1チロシンキナーゼの阻害剤であり、細胞増殖と血管新生の阻害や細胞周期調節因子のdown-regulationなどを通して治療効果が期待されている。また、IGF-1RはIGF-I, IIと結合し、EGFRといくつかの共通のsignal pathwayが活性化されるため、IGF-1Rに対するmonoclonal抗体が(IMC-A12など)が開発され、治験に進んでいる。上記のような分子標的薬は細胞分子レベルの機序が解明されているが、生体内で癌の浸潤・転移に与える影響についてはいまだ不明である。癌の浸潤・転移は癌細胞と腫瘍間質との複雑な相互作用によって起きる高次な現象である。肝細胞癌は周囲の環境との関連は特に特異的であり、癌の発生、進展は慢性肝炎や肝硬変による関与が強く、癌細胞と腫瘍間質との相互作用がより複雑であり、治療薬の効果に影響を与えている。分子標的薬の治療効果を予測するバイオマーカーの確立が重要な課題である。当研究室では、分子標的薬の中のsorafenibについて、肝内

転移の起こしやすい一部の肝細胞癌株に対して、高い細胞増殖抑制とアポトーシス誘導を引き起こすとの研究結果を得ており、現在は担癌モデルでの解析を進行しており、治療効果予測因子の発見が期待されている。

一方、最近では網羅的な遺伝子解析で、ヒト肝細胞癌は発現分子の違いによって予後良いグループと予後悪いグループに分けられると報告されている。再発・転移が起きやすい予後悪い肝細胞癌グループはAkt, IGF2などの発現が高い上、CK19やEpCAMなど肝前駆細胞マーカー陽性の癌細胞が存在していると報告されている(Seminars In Liver Disease 30, 35-53, 2010)。このように発現分子によってグループ分けされた肝細胞癌は分子標的治療薬に対する反応性の違いも予想される。

2. 研究の目的

本研究では、肝細胞癌担癌モデル、特に独自に確立した肝細胞癌転移モデルを用いて、これら分子標的薬の癌の進展に与える影響とその機序について解明し、分子標的薬の治療効果予測バイオマーカーの探索を目的とする。

3. 研究の方法

(1) ヒト肝細胞癌株における分子標的治療薬の細胞増殖への影響の解析

分子標的薬 Sorafenib [N-(3-trifluoromethyl-4-chlorophenyl)-N'-(4-(2-methylcarbamoyl pyridin-4-yl)oxyphenyl)urea]はバイエル薬品株式会社より提供されている。In vitro実験で使用する時、sorafenibは100%DMSOにて溶解し、RPMI1640にて各濃度に希釈する。ヒト肝細胞癌株 KYN-2, Li7, KIM1は国立がんセンターより譲渡された。ヒト肝細胞癌株 HepG2, PLC/PRF/5はATCCより購入した。各肝細胞癌株は10%FBSを含むRPMI1640で5%CO₂, 37°Cの条件下で接着培養する。また、poly-HEMAでコーティングした培養皿で浮遊培養を行う。分子標的薬 Sorafenib(最終濃度0.01 μ M~10 μ M)を添加し、5%CO₂, 37°Cの条件下で培養する。72時間後、増殖アッセイ用試薬 WST-1を添加し、1時間反応後、培養上清をマイクロリーダーで測定する。また、上記濃度の sorafenib 添加 24, 48, 72 時間時の細胞数計測も行う。

(2) 分子標的治療薬のアポトーシス誘導の解析

ヒト肝細胞癌株(KYN-2, Li7, HepG2, PLC/PRF/5, KIM1)を接着培養し、分子標的薬 Sorafenib(最終濃度0.1 μ M~10 μ M)を添加した48時間後、細胞を0.25% trypsinで培養皿から剥がし、AnnexinVを添加し、

15 分反応した後、フローサイトメーターでアポトーシス細胞について計測する。

(3)ヒト肝細胞癌株におけるチロシンキナーゼの発現、リン酸化の解析

ヒト肝細胞癌株 (KYN-2, Li7, HepG2, PLC/PRF/5, KIM1) の DNA マイクロアレイを行う。Sorafenib による細胞増殖抑制、アポトーシス誘導の効果が認められたグループと認められないグループ間のチロシンキナーゼ遺伝子の発現差を検討する。イムノブロットング法にて各肝細胞癌株が sorafenib 投与後のチロシンキナーゼ分子の発現、リン酸化の変化を解析する。各肝細胞癌株は 25000/ウェル 6 ウェルプレート 24 時間培養後、sorafenib を最終濃度 1 μ M, 5 μ M, 10 μ M になるように添加し、8 時間後に HGF 25ng/ml で 10 分間刺激する。ライシスバッファで細胞溶解液を作製する。20 μ g のタンパクを NuPAGE 4-12% Bis-Tris ゲルで電気泳動し、ニトロセルロース膜に転写する。抗 Lyn 抗体 (Santacruz)、抗リン酸化 Lyn 抗体 (Santacruz), 抗 FGFR4 抗体 (Abcam), 4G10 抗体 (Millipore) および HRP2 次抗体でプロット後、ECL で検出する。

(4)肝細胞癌転移モデルにおける検討

ヒト肝細胞癌株 (KYN-2, Li7, HepG2, Alexander, KIM1) は 3 \times 10⁶/20 μ l を重度免疫不全マウス NOD/SCID の肝内に移植する。2 週後に sorafenib を 10mg/Kg, 30mg/Kg, 100mg/Kg 毎日 1 回投与する。溶媒のみ投与するコントロール群も作製する。Sorafenib 投与 2 週後にマウス肝臓を摘出し、肝の全重量、腫瘍の重量とサイズ、肝内転移の有無と転移巣数の計測を行う。また、一部の実験マウスは解剖せず、生存期間の検討を行う。摘出されたマウス肝に形成された腫瘍組織に対して、免疫染色法により、細胞増殖能、アポトーシス、チロシンキナーゼ分子の発現、リン酸化を検討し、比較する。また、病理組織学的に検討し、腫瘍の形態、増殖能と浸潤能について比較検討する。

(5)肝細胞癌分子標的治療薬臨床症例における検討

インフォームドコンセントの得られた分子標的治療の行われた肝細胞癌症例の手術検体と施行されていなかった肝細胞癌手術検体を材料として、HE 染色、銀染色、CK19, CD31, ERK およびリン酸化 ERK 抗体を用いた免疫染色法を行って、比較検討する。

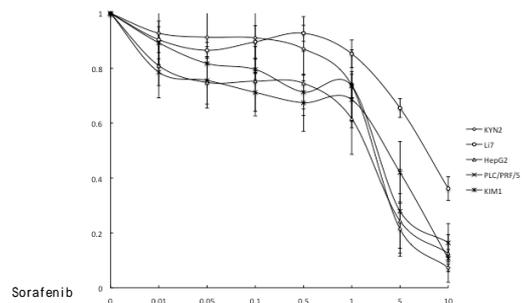
4. 研究成果

(1)細胞増殖能抑制

接触培養条件下で sorafenib と 72 時間添加し、WST-1 増殖アッセイで測定した結果では、KYN2 と HepG2 は sorafenib の添加により、顕著な増殖抑制効果が認められた。一方、Li7 および PLC/PRF/5 は増殖抑制効果が低い。KIM1 の反応性はその中間に位置する。

(図 1)

図 1 Sorafenib 添加後の肝細胞癌の増殖能 WST-1 アッセイ



接着培養条件下で sorafenib を添加し、24 時間、48 時間、72 時間時点での細胞数計測の結果は WST-1 アッセイとほぼ同様で、KYN2 と HepG2 に sorafenib による増殖抑制が顕著であるのに対し、Li7 と PLC/PRF/5 の増殖抑制効果は低い (図 2)。KIM1 に対する増殖抑制強化は KYN2 と Li7 の中間に相当する。

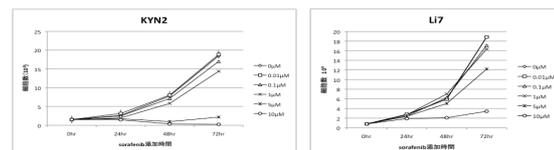


図 2 Sorafenib 添加時の肝細胞癌細胞数

Poly-HEMA でコーティングした培養皿を使用して浮遊培養を行い、sorafenib を添加し、WST-1 増殖アッセイと細胞数計測を行った。

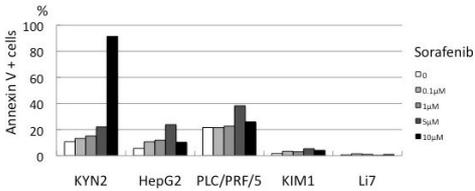
接着培養時と類似して、KYN2 と HepG2 は sorafenib による増殖抑制効果が顕著に認められたが、Li7 の増殖抑制効果は低い。KIM1 と PLC/PRF/5 は KYN2 と Li7 の中間に相当する抑制がみられた。但し、KIM1 は浮遊培養時増殖能が低い。

生体内での腫瘍の発育進展における多様な状況を反映すると考えられる各種培養条件により、反応性に若干の variation が見られるが、全体として、KYN2, HepG2, KIM1 が高感受性、PLC/PRF5, Li7 が低感受性と分類できる可能性がある。特に Li7 の感受性が低いことは有意な所見とみなされる。

(2)アポトーシス誘導

ヒト肝細胞癌株 (KYN2, HepG2, KIM1, PLC/PRF/5, Li7) を接着培養し、sorafenib 添加 48 時間後に Annexin でアポトーシス細胞を測定した。KYN2 は sorafenib に濃度依存性にアポトーシス誘導が認められた。一方、Li7 は sorafenib によるアポトーシス誘導は認められなかった。HepG2, PLC/PRF/5 および KIM1 は sorafenib による顕著なアポトーシス誘導はみられない。(図 3)

図 3 Sorafenib 添加による各肝細胞癌細胞の AnnexinV 陽性アポトーシス細胞比



KYN2 と Li7 の sorafenib によるアポトーシス誘導性の違いは有意であると考える。

(3)チロシンキナーゼの発現とリン酸化

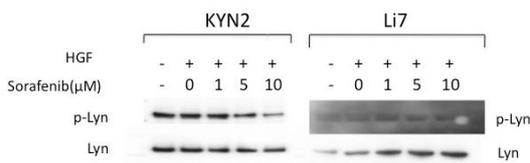
DNA microarray のチロシンキナーゼ解析データについて、KYN2 と Li7 を中心に検討した。KYN2 と Li7 間にシグナル 3 倍以上の違いがみられたのは、IRS1, LYN, FGFR3, FGFR4, ERBB3, ERBB4 である。

Probe set	Resistant		Sensitive			Mean Signal			Gene Title
	Alex	Li7	HepG2	KIM-1	KYN-2	R	S	R/S	
851_s_at	573.3	74.6	414.7	1164.7	596.8	324.0	725.4	0.45	IRS1
41049_at	737.6	60.5	471.7	1436.3	608.0	399.1	836.7	0.48	IRS1
31805_at	1371.1	283.7	1185.9	2482.2	770.2	827.4	1479.4	0.56	FGFR3
1291_s_at	8006.8	1194.9	8777.3			4337.6	3600.9	0.74	FGFR4
1742_at	997.8	1144.6	2104.3	1310.9	654.5	1071.2	1356.6	0.79	ERBB3
32787_at	4686.6	782.1	3480.4	4940.9	1807.0	2739.4	3409.4	0.80	ERBB3
1402_at	1912.7	680.3	1386.0	764.5	1489.6	1296.5	1213.4	1.07	LYN

Signal >= 1000 at least in HepG2/KIM1/KYN-2

肝細胞癌株 KYN2 と Li7 に sorafenib を添加し、48 時間培養後に細胞ライセートを収集し、抗 LYN 抗体および抗 LYN リン酸化抗体を用いてウェスタンブロッティングを行った。Sorafenib 未添加時、KYN2 と Li7 いずれも LYN 発現が認められるが、Li7 の LYN タンパク量は KYN2 より少ない。Sorafenib 添加後、KYN2 においてはリン酸化 LYN の減少が認められたのに対し、Li7 においては LYN のリン酸化に有意な変化はみられなかった。(図 4)

図 4 Sorafenib が KYN2 の LYN リン酸化を阻害する。



(4) 肝細胞癌移植動物モデルにおける sorafenib の in vivo の効果

肝細胞癌株 (KYN2, HepG2, PLC/PRF/5, KIM1, Li7) を 3X10⁶ 個免疫不全マウス NOG の肝内に移植し、2 週間経過して肝腫瘍が形成された後、sorafenib を 10, 30, 100mg/Kg で毎日経口投与した。14 日後にマウスを解剖し、肝を摘出した。いずれの肝細胞癌株移植マウスにおいても sorafenib 投与による腫瘍サイズの減少が認められた。KYN2 と Li7 は高率に肝内転移を来す肝細胞癌であるが、KYN2 は sorafenib 投与により、肝内転移巣の減少傾向が認められ、組織学的検索では、血管侵襲の少傾向が認められた。一方、Li7 では sorafenib による転移抑制傾向はみられなかった。(図 5)

図 5 Sorafenib が HCC 移植マウス肝における転移抑制効果

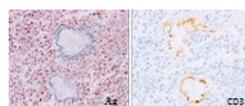


FGFR4 抗体を用いた免疫染色では、KYN2 腫瘍は control 群が FGFR4 を発現しているが、sorafenib100mg/Kg 投与群では FGFR4 は発現低下、消失が認められた。一方、Li7 腫瘍においては、FGFR4 の発現の変化が認められない。

(5) 肝細胞癌分子標的治療薬臨床症例の検討

Sorafenib を投与され、有効と判断された肝細胞癌症例では、組織学的に、高度の好中球浸潤を伴う壊死、腫瘍部と肝非腫瘍部の血管内皮障害、細網線維減少が認められた(図 6)。Sorafenib は腫瘍細胞に障害を来すほか、血管構造にも影響を及ぼしていると考えられる。腫瘍壊死が強いいためか、FGFR4、LYN などの抗体を用いた免疫染色では、有意な染色結果が得られなかった。

図 6 肝細胞癌 sorafenib 投与症例



(6) 結論

Sorafenib は in vitro および in vivo において、肝細胞癌の増殖抑制効果を示した。

更に、肝細胞株 KYN2 においては肝内転移抑制の効果も認められた。増殖抑制と肝内転移抑制効果のある KYN2 と増殖抑制や転移抑制効果の低い Li7 の間の相違を検討した結果、Microarray では LYN、FGFR3、FGFR4 などの発現が KYN2 と Li7 間に差が認められた。Western blot では KYN2 において LYN の発現が Li7 より多く、さらに sorafenib 投与による LYN のリン酸化抑制も認められた。生体モデルでは、KYN2 腫瘍において FGFR4 の発現は sorafenib の投与により抑制された。FGFR4、LYN などの分子は sorafenib の効果予測因子の候補になりうると考える。これから、in vivo の検体と臨床検体の検体数をさらに増やし、sorafenib 効果予測候補因子の発現を計測し、候補因子の有用性について検討すべきと考える。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

辻川 華子, 杜 ぶん林(代表者), 真杉洋平, 土谷 薫, 瀧 和博, 泉 並木, 坂元 亨宇: 分子標的薬ソラフェニブが投与された肝細胞癌の 1 剖検例、第 101 回日本病理学会総会、2012 年 4 月 27 日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

杜 ぶん林 (DU WENLIN)
慶應義塾大学・医学部・助教
研究者番号: 90348798