

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 13 日現在

機関番号：11101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26860968

研究課題名(和文)肝細胞癌の低酸素応答特性に基づいたYC-1-DEB TACE法の有用性

研究課題名(英文)The efficacy of YC-1 transarterial chemoembolization based on hypoxia response

研究代表者

藤田 大真(fujita, hiromasa)

弘前大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：30720742

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：癌細胞が低酸素環境において、治療抵抗性を獲得することは過去の研究で知られている。肝細胞癌も同様である。本研究では、この治療抵抗性改善の戦略としてYC-1という薬剤と薬剤溶出性ビーズという新しい塞栓物質を併用の有用性検討をした。YC-1と薬剤溶出性ビーズの組み合わせのよい条件は見出すことができなかった。一方、我々は他の薬剤の使用についても検討していた。我々はメトホルミンが低酸素環境における治療抵抗性を改善することを明らかにすることができた。

研究成果の概要(英文)：Previous studies reported that cancer cell get therapeutic resistance in hypoxia. Hepatocellular carcinoma has same report. In this study, we investigated the efficacy of combination of YC-1 and drug eluting beads. We could not find good conditions of combination of these. On the other hand, we investigated other drug. We find that metformin improve therapeutic resistance of hepatocellular carcinoma in hypoxia.

研究分野：放射線科学

キーワード：低酸素 肝細胞癌

### 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、予後不良の疾患であり世界では悪性新生物内の死因第2位となっている。日本において、2013年の主要部位別がん年齢調整死亡率(人口10万対)では第5位となっている。年齢調整死亡率では減少傾向ではあるが、死亡実数は依然として毎年3万人を超えていると報告される。

肝細胞癌の局所療法としては手術、ラジオ波焼灼術、カテーテルによる動脈化学塞栓療法(TACE)が主となる。この中でカテーテル治療は、ほかの治療より適応の範囲が広く高頻度に行われる治療である。一方で、ほかの治療と比較して局所再発の頻度が高い。

カテーテル治療は栄養動脈の塞栓による阻血および抗癌剤の長期停滞を治療の本幹としている。

近年の研究の報告では、癌細胞は低酸素環境において、治療抵抗性を獲得する性質が明らかとなっている。肝細胞でも同様の報告がある。

この低酸素環境での治療抵抗性を改善させること局所再発の改善につながると考える。

### 2. 研究の目的

低酸素環境下において、核内に蓄積する hypoxia-inducible factor-1 (HIF1-) が重要な役割を占めていることが近年報告されている。この HIF1- を阻害する薬剤が YC-1 である。

またメトホルミンは日常臨床において2型糖尿病の治療薬として使用されている薬剤であるが、近年の研究で癌治療への効果が明らかになりつつある。中でも低酸素環境における癌治療抵抗性の改善の報告が他癌腫において存在する。

これらの薬剤を TACE に用いる手段として、薬剤溶出性ビーズを選択した。これは均一に作成された微小なビーズであり、薬剤を吸着し、塞栓した血管内で薬剤が徐放性に周囲の効果を与える。海外ではすでに使用されており、2014年日本でも正式に認可された。これを用いることで、前述の薬剤を腫瘍局所で高濃度にすることができる。

これらによる肝細胞癌の低酸素環境における治療抵抗性改善の検討を目的とする。

### 3. 研究の方法

#### ・薬剤溶出性ビーズの YC-1 徐放性の検討

薬剤溶出性ビーズで YC-1 は一般的に使用される薬剤ではなく、その徐放性を確認する必要がある。

#### (1) 薬剤溶出性ビーズの準備:

血管塞栓用マイクロスフィア「ヘパスフィア®」(販売:日本化薬株式会社)を使用する。

YC-1 を PBS に溶解し、1mM の溶液を 10ml 作成。この溶液内にヘパスフィア 25mg を入れて、薬剤を含浸させる。

#### (2) YC-1 の徐放性の検討:

培養した VX-2 細胞を 10%FBS および penicilin/streptomycin 添加した DMEM を培地として 6well dish に播種し、37、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。細胞の定着を確認。YC-1 を吸着させたビーズを入れた培地と YC-1 を直接溶解した培地、それぞれで細胞を培養した。その後、細胞を 0.1%trypsin で回収し、PBS で 500 μL の懸濁液とした。懸濁液 10 μL と trypanblue 10 μL を混和し、TC20 セルカウンターにて生細胞数を測定した。

生細胞の数を用いて、その徐放の効果を確認した。

#### ・低酸素環境における肝細胞癌の治療抵抗性の検討、およびメトホルミンによる治療効果改善の検討

#### (1) 低酸素環境における肝細胞癌 (HepG2 細胞) の白金製剤 (CDDP) に対する治療効果の検討:

##### 通常酸素条件下

培養した HepG2 細胞を 10%FBS および penicilin/streptomycin 添加した DMEM を培地として 24well dish に播種し、37、5%CO<sub>2</sub> の条件下で培養した。細胞の定着を確認後、CDDP を 0,1,5,10,25,50,100,200 μM の濃度となるように各 well に添加した。37、5%CO<sub>2</sub> で 48 時間培養した。その後、細胞を 0.1%trypsin で回収し、PBS で 500 μL の懸濁液とした。懸濁液 10 μL と trypanblue 10 μL を混和し、TC20 セルカウンターにて生細胞数を測定した。

##### 低酸素条件下

同条件で HepG2 細胞を定着。CDDP 投与後、1%低酸素条件下で 48 時間培養した。1%低酸素条件は、低酸素チャンバーを用いて、95%N<sub>2</sub>/5%CO<sub>2</sub> の混合ガスを一定時間通期後に低酸素モニターを用いて、チャンバー内の酸素濃度が 1±0.05%となることを確認した。低酸素培養後、前述と同様に trypanblue 染色で生細胞数を測定した。

#### (2) メトホルミンの細胞毒性の検討:

##### 通常酸素条件下

同条件で HepG2 細胞を定着させた。メトホルミンを 0,0.1,0.2,0.5,1,2,5,10mM の濃度となるように各 well に添加した。37、5%CO<sub>2</sub> で 48 時間培養した。前述と同様に trypanblue 染色で生細胞数を測定した。

##### 低酸素条件

薬剤添加までは上記(2)と同様の工程で行う。メトホルミン添加後、1%低酸素条件下で 48 時間培養した。低酸素培養後、前述と同様に trypanblue 染色で生細胞数を測定した。

(3)低酸素条件下での CDDP、メトホルミン併用の効果の検討：

同条件下で細胞を定着させた。CDDP 0,1,5,10 $\mu$ M の濃度条件、およびメトホルミン 0, 1mM の組み合わせで合計 8 条件について検討した。各 well に薬剤を投与した。1%低酸素条件下で 48 時間培養した。その後前述と同様に trypanblue 染色で生細胞数を測定した。

(4) アポトーシス誘導の検討：

同条件下で細胞を定着させた。CDDP 0,5,10 $\mu$ M、メトホルミン 0 or 1mM の 6 条件について検討した。低酸素条件下で 48 時間培養した。その後 0.1%trypsin で細胞を回収した。AnnexinV および 7-AAD で細胞を染色した。フローサイトメトリー BECKMANCOULTER Cytoflex でアポトーシス解析をした。

#### 4. 研究成果

・薬剤溶出性ビーズの YC-1 徐放性の検討

今回の研究において薬剤溶出性ビーズからの YC-1 の徐放性を検討した。今回の検討において、YC-1 ビーズについて安定した薬剤含浸・徐放の条件は見いだせなかった。

同時に検討していたメトホルミンの基礎研究で有用性が期待された。このため以後メトホルミンの検討にエフォートをさいた。

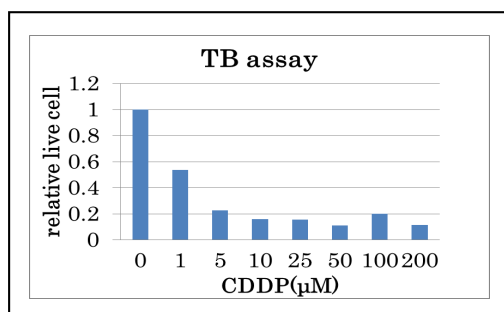
・低酸素環境における肝細胞癌の治療抵抗性の検討、およびメトホルミンによる治療効果改善の検討

(1)低酸素環境における肝細胞癌 (HepG2 細胞) の白金製剤 (CDDP) に対する治療効果の検討：

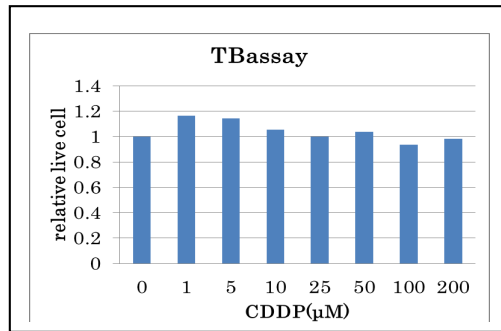
最初に通常の酸素環境での CDDP の HepG2 細胞に対する反応を確認した。HepG2 細胞は CDDP に対して濃度依存性に生細胞が減少した。

しかし、低酸素環境においては control 群と CDDP 投与群で生細胞数に変化は見られなかった。低酸素環境では CDDP の抗腫瘍効果が低下することが確認された。

通常酸素条件



低酸素条件

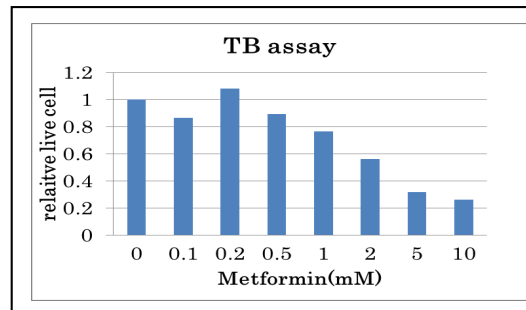


(2)メトホルミンの細胞毒性の検討：

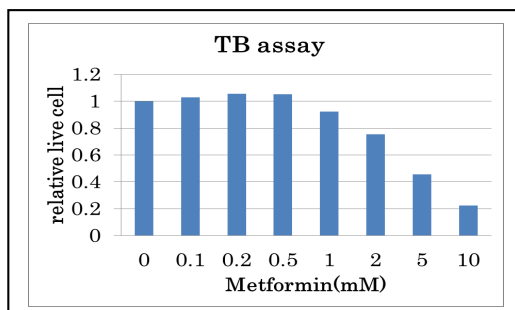
メトホルミンは通常酸素環境で、濃度依存性に生細胞の減少することを確認した。

また、メトホルミンは低酸素環境においても濃度依存性に生細胞が減少した。

通常酸素条件



低酸素条件

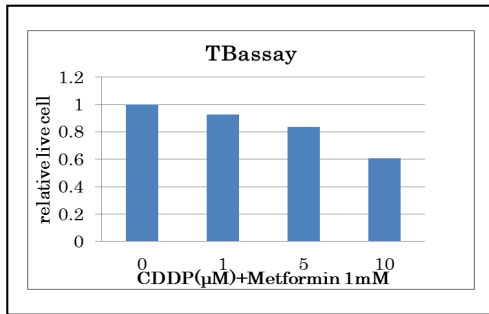


(3)低酸素条件下での CDDP、メトホルミン併用の効果の検討：

(2)の結果をもとに、併用するメトホルミンの濃度は単独での細胞毒性の少ない 1mM として薬剤併用の効果を確認した。

この濃度のメトホルミンと CDDP を併用して、細胞を培養したところ、低酸素環境においても CDDP の濃度依存性に生細胞が減少した。

少量のメトホルミンを併用することで、低酸素環境における CDDP の抗腫瘍効果の改善されることを確認できた。

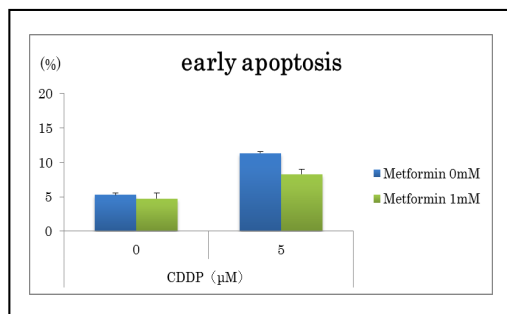


#### (4) アポトーシス誘導の検討；

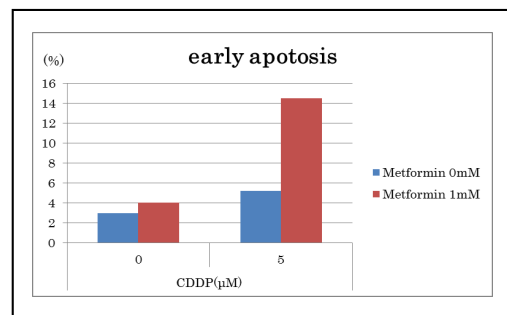
通常酸素条件においては、CDDP とメトホルミンの併用でアポトーシスの誘導にはあまり変化の傾向は見られなかった。

一方低酸素環境においては CDDP とメトホルミンを併用することでアポトーシスの誘導の傾向がみられた。しかし、今回の検討では十分な検討を確認するまでには至っていない。

#### 通常酸素条件



#### 低酸素条件



#### (結論)

当初予定した YC-1 と薬剤溶出性ビーズによる治療を検討していたが、今回の検討では十分な条件は見いだせなかった。

一方、今回の研究においてメトホルミンが低酸素環境での肝細胞癌に対する治療抵抗性を改善させるという重要な結果を見出した。CDDP、メトホルミンこれらはいずれもそれぞれ実臨床で使用されている薬剤である。今後さらなる検討を重ねることで、実臨床へ応用することが十分可能と推測される。

#### 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〕  
 出願状況 (計 0 件)  
 取得状況 (計 0 件)  
 〔その他〕  
 ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

藤田大真 (FUJITA, Hiromasa)  
 弘前大学医学部附属病院・医員  
 研究者番号：30720742

##### (2) 研究分担者

なし

##### (3) 連携研究者

なし

##### (4) 研究協力者

高井 良尋 (TAKAI, Yoshihiro)  
 一般財団法人 脳神経疾患研究所  
 南東北 BNCT 研究センター・センター長

佐藤 まり子 (SATOU, Mariko)  
 弘前大学大学院医学研究科・助教