

令和元年6月7日現在

機関番号：32661

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08945

研究課題名(和文) 進行性肝細胞がんに対する糖鎖依存性細胞傷害と分子標的治療薬による制御

研究課題名(英文) Regulation of glycan-dependent cytotoxicity against advanced HCC by the molecular target drug

研究代表者

梶貝 孝慈 (HIGAI, Koji)

東邦大学・薬学部・准教授

研究者番号：70297711

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、KLRsの糖鎖リガンドの生合成に関するhST3Gal3およびタンパク性リガンドのULBP-1のプロモーター領域およびその制御機構を明らかにした。さらに、それらの分子がソラフェニブによる発現調節を受けることを明らかにした。また、ソラフェニブによる自然免疫における直接的なマクロファージの活性化作用を明らかにした。また、実臨床における肝がん患者の血中濃度の測定を測定した結果、投与量と血中濃度に相関が認められなかったことから、長期にわたり効果的な薬物濃度を保つことが重要であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により進行性肝細胞がんを標的としたソラフェニブの新規作用と免疫系への影響を明らかにすることができた。この結果は、今後のNK細胞を利用した免疫療法に対して重要な知見が得られたものと考えられる。また、ソラフェニブを投与されたHCC患者におけるソラフェニブの血中濃度測定結果から、実臨床におけるソラフェニブの適正使用における血中濃度測定の重要性が示唆された。

研究成果の概要(英文)： In this study, we identified a transcriptional promoter region of hST3Gal3, the enzyme related biosynthesis of glycan ligands against KLRs, and ULBP-1 (protein-ligand of NKG2D).

Furthermore, we clarified that these molecules were regulated by sorafenib and that macrophage was directly activated by sorafenib. We quantitatively determined the concentration of sorafenib in sera obtained from patients with HCC. The lack of a correlation between serum levels of sorafenib and the orally administered dose in patients suggests that it may be critical to maintaining an effective drug concentration in plasma for a long period of time.

研究分野：肝細胞がん

キーワード：NK細胞 分子標的薬 肝細胞がん

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

Sialyl Lewis X (sLeX) は、細胞表面や血清中タンパク質上に存在し、血管内皮細胞上の E-セレクトリンとの接着を介して、癌の転移を成立させると考えられている。また、血清タンパク質中にも sLeX が発現しており、癌などの病態により量的・質的に変化することから、私は、血清中 sLeX に注目し、その合成機構と構造変化などを明らかにすべく研究を行ってきた。特に sLeX が、ナチュラルキラー細胞(NK 細胞)の糖鎖リガンドであることを明らかにし、グルコサミノグリカンや硫酸化多糖類をさらなる新規糖鎖リガンドとして同定し、その糖鎖リガンドに対する受容体の親和性を明らかにした。これらの受容体である KLRs や NCR のタンパク質性リガンドの変化に関しては、いまだ知見が少ないのが事実である。一方、進行性肝細胞がんは、肝動脈化学塞栓療法や 5-fluorouracil (5-FU) や cisplatin を用いた肝動注化学療法(HAIC)などの血管内治療法と、分子標的薬であるマルチキナーゼ阻害剤であるソラフェニブによる治療が現在行われている。しかしながら、ソラフェニブは長期間投与により、長期間 MEK/MAPK シグナルを抑制することで、様々な標的遺伝子の発現に影響を与えることが示唆される。したがって、分子標的薬の長期投与は、糖鎖依存性細胞傷害のリガンド糖鎖やリガンドの生合成を改変し、免疫応答に影響を及ぼすことが考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、NK 細胞による糖鎖依存性細胞傷害を利用した臨床的展開を目指し、進行性肝細胞がんを標的とした、糖鎖依存性細胞傷害による免疫療法の基盤的検討を行う。そして、臨床で使用されている分子標的薬との併用を見据え、臨床血清検体から、血中治療薬濃度と治療効果推移等を多面的に解析し、さらには Reverse Translational research 的アプローチにより進行性肝がんにおける、分子標的薬の新規作用や治療効果、新規免疫療法適用の可能性を明らかにする。

## 3. 研究の方法

ソラフェニブによる網羅的 mRNA 発現変動は、cDNA マイクロアレイ(SurePrint G3 Human GE 8x60K Ver.2.0 microarray)により行った。プロモーター活性の測定および mRNA 発現の解析は、Dual-luciferase assay および *realtime* RT-PCR により行った。タンパク質発現は、ウェスタンブロットにて発光検出を行った。患者血清中のソラフェニブ濃度の測定は、液相抽出および逆相 HPLC による検出系を構築し、定量を行った。

## 4. 研究成果

はじめに、肝がん細胞株 HepG2 細胞に対して細胞毒性を示さない濃度の Sorafenib (0.32  $\mu\text{mol/L}$ ) で処理後、Killer Lectin Receptors のタンパク質性リガンド (MICA、ULBP1-3) および糖鎖リガンドの生合成に関与する ST3Gal1-6 の遺伝子発現変化を cDNA Microarray により解析した結果、MICA、ULBP-1、ULBP-3、ST3Gal2,3,5 の mRNA 発現が増加していることが示唆された。そこで、CD94 や NKG2D/A などの糖鎖リガンドである N 結合型の多分岐 2-3 シアル酸の生合成に関与する (1) ST3Gal3 の遺伝子発現制御機構の解析および NKG2D のリガンドタンパク質リガンドである (2) ULBP-1 の遺伝子発現制御機構の解析をおこなった。また、ソラフェニブの免疫系への作用として共同分担者の永井らにより、肝臓における常在性マクロファージのクッパー細胞の活性化が見出されていることから、(3) ソラフェニブによる RAW264.7 細胞の活性化への影響を解析した。そして、臨床における検討として、(4) ソ

ラフェニブを投与している肝がん患者37例の血中ソラフェニブ濃度の解析を行った。さらに、共同分担者の永井は、進行肝細胞がん症例における血中ソラフェニブ濃度とその免疫学的変動を検討した。

#### (1) ST3Gal3の遺伝子発現制御機構の解析

ST3Gal3 遺伝子の転写調節領域をクローニングし、Sorafenib によるプロモーター活性の変化を Luciferase assay で解析した結果、増加が認められた。そして、mRNA 発現を real time PCR 法で解析した結果、Sorafenib により濃度依存的に ST3Gal3 mRNA の増加が認められた。さらに、ST3Gal3の5' 上流非翻訳領域およびその欠失体を作製し、Sorafenib による ST3Gal3 プロモーター活性への影響を解析した結果、転写開始点より 5' 上流約 100 nt の領域で転写活性の増加が認められたことから、この領域で調節されていることが示唆された。

#### (2) ULBP-1の遺伝子発現制御機構の解析

初めに、5' 上流非翻訳領域およびその欠失体を作製し、Sorafenib による ULBP-1 プロモーター活性への影響を解析した結果、転写開始点より 5' 上流約-500 から-400 および-290 から-100 の領域で調節されていることが示唆された。さらに、Tet-ON system により恒常的転写活性のある CA-EIk-1 を発現誘導した結果、上記の2つの領域のプロモーター活性が上昇したことから、肝細胞における ULBP-1 は eIk-1 による調節を受けることを明らかにした。

#### (3) ソラフェニブによるRAW264.7細胞の活性化への影響

先行研究として、進行肝細胞癌症例に対する Sonazoid® 造影超音波を用いて、クッパー細胞の貪食能の評価を、Sonazoid® 造影超音波による解析にて行った。その結果、後期血管相 (Kupffer phase) の肝実質内MBIに高音圧超音波ビームを照射した際、SF投与前後で、MB崩壊距離が短くなることから、ソラフェニブ投与によりKupffer細胞の貪食能が増加する可能性を示した。また、血清中TNF-濃度やTh1細胞比率は、SF投与により上昇が認められたことから、サイトカインを介したマクロファージ系細胞の活性化が示唆された。そこで、ソラフェニブによる直接的なマクロファージ系細胞の活性化に及ぼす影響を明らかにするために、RAW 264.7細胞に対するソラフェニブの効果を、NO産生に着目し解析した。ソラフェニブによるNO産生を解析した結果、SF刺激によりNO産生能の増加が認められた。そこで、NO合成酵素のうち、誘導型NO合成酵素 (iNOS) に着目し、そのタンパク質発現を解析した結果、SF処理によりiNOSの誘導が認められたため、iNOSのmRNA発現量をReal-time PCRで測定した結果、ソラフェニブ処理により増加が認められた。そこで、iNOSのプロモーター活性を測定した結果、SF処理により増加が認められた。これらの結果から、ソラフェニブは、Th1細胞比率の増加による間接的なサイトカインを介したマクロファージ系細胞の活性化に加えて、直接マクロファージ系に作用し、NO産生の誘導を引き起こす可能性が示唆された。

#### (4) ソラフェニブを投与している肝がん患者37例の血中ソラフェニブ濃度の解析

血清中のソラフェニブ濃度の測定にあたり、Samar、Heinz および Escudero-Ortiz の既報を改変し、測定法を確立した。また、この方法は、LC-MS 解析により、主な代謝物である M2(3)および M-4 の同時測定が可能であった。検出限界は、0.007 mg/L であり、報告されている定常状態の sorafenib のトラフ値 (約 4.9 mg/L) から考慮すると、十分な感度であった。また、濃度既知の検量線用試料との相関係数は 0.9993 ( $R^2$ ) と非常に良い相関性を示した。本法を用いて、Sorafenib を投与された患者血清中の Sorafenib の定常状態における血中濃度と、投与量および体重あたりの投与量との相関性は認められなかった。また、ソラフェニブ投与量と

血中濃度に相関関係は認められなかった患者の尿検体から、グルクロン酸抱合ソラフェニブが検出されたことから、腎排泄の亢進が血中濃度の低下に寄与する可能性を見出した。その他、手足症候群の発現に、ソラフェニブの血中濃度依存的ではないことやソラフェニブと肝動注化学療法の併用順序により予後に変動があることなどが明らかとなった。

これらの結果から、ソラフェニブは、NK細胞上の存在するKLRsリガンドの生合成に影響を与え、NK細胞による傷害を誘導する可能性が示唆された。また、サイトカインのバランスを変動させ免疫応答を調節する作用が示唆された。さらに、実臨床におけるソラフェニブの血中濃度測定的重要性が明らかになった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 5 件)

Nagai H., Mukozu T., Kobayashi K., Amanuma M., Yoshimine N., Ogino YU., Matsui D., Daido Y., Matsukiyo Y., Matsui T., Wakui N., Momiyama K., Shinohara M., Higai K., Igarashi Y. Influence of Sorafenib on Host Immunity in Patients with Liver Cirrhosis With Advanced Hepatocellular Carcinoma Stratified by Etiology. *Anticancer Res.* 39(4):2183-2191 2019. (査読有) doi: 10.21873/anticancer.13333.

Kobayashi K., Higai K., Matsuo K., Bannai Y., Horie H., Otakara Y., Li W., Koike K., Yanagino S., Watanabe K., Yoshio T., Wakui N., Nagai H.: Quantitative measurements of sorafenib in patients with advanced hepatocellular carcinoma. *International Journal of Research Studies in Medical and Health Sciences*, 3(2), 14-19, 2018 (査読有) <http://ijrsmhs.com/v3-i2>

Higai K., Otsuka N., Tanaka Y., Matsumoto K., Matsui M., Yanai K., Wakui N., Nagai H.: Sorafenib Decreases Dihydropyrimidine Dehydrogenase Gene Expression in Hepatocellular Carcinoma HepG2 Cells. *Austin J Pharmacol Ther.* 6(1).1102. 2018 (査読有)

<https://www.austinpublishinggroup.com/pharmacology-therapeutics/v6-i1.php>

Ito K., Kawana M., Iwata T., Higai K.: Transcriptional Regulation of the Natural Cytotoxicity Receptor NKp44 Gene in Human NK cell Leukemia. *J of Glycomics Lipidomics* 7:1, 2018 (査読有) doi: 10.4172/2153-0637.1000144

Ito K., Shiraiishi R., Higai K.: Globo-A binds to the recombinant natural cytotoxicity receptor NKp44 *Biol. Pharm. Bull.*, 41, 1480-1484, 2018 (査読有) doi: 10.1248/bpb.b18-00312

〔学会発表〕(計 17 件)

桧貝 孝慈、小林 康次郎、白石 凌、和久井 紀貴、永井 英成: Sorafenib による NKG2D リガンド ULBP1 発現、日本薬学会第 139 年会、幕張メッセ、2019

小林 康次郎、白石 凌、桧貝 孝慈、和久井 紀貴、永井 英成: Sorafenib による NKG2D リガンド ULBP1 発現への影響、第 18 回日本肝がん分子標的治療研究会、伊藤謝恩ホール、2018

白石 凌、伊藤 健一郎、桧貝 孝慈: Natural cytotoxicity receptors (NCRs) の糖鎖リガンドの特異性、日本薬学会第 138 年会、金沢、2018

石橋 由花、小林 康次郎、桧貝 孝慈、向津 隆規、和久井 紀貴、松尾 和廣、永井

英成：分子標的治療薬ソラフェニブによるマクロファージ活性化作用、日本薬学会第 138 年会、金沢、2018

石橋 由花、小林 康次郎、桧貝 孝慈、向津 隆規、和久井 紀貴、松尾 和廣、永井 英成：分子標的治療薬ソラフェニブによるマクロファージ活性化作用、第 14 回東邦大学 5 学部合同学術集会、東邦大学医学部キャンパス、2018

小林 康次郎、白石 凌、桧貝 孝慈、和久井 紀貴、永井 英成：Sorafenib による NK2D リガンド ULBP1 発現への影響、プレナリーセッション、第 17 回日本肝がん分子標的治療研究会、パシフィコ横浜、2018

石橋 由花、小林 康次郎、桧貝 孝慈、向津 隆規、和久井 紀貴、松尾 和廣、永井 英成：分子標的治療薬ソラフェニブによるマクロファージ活性化作用、第 61 回日本薬学会関東支部大会、慶應義塾大学薬学部、2017

小林康次郎、桧貝 孝慈、松尾 和廣、和久井 紀貴、永井 英成：分子標的薬 Sorafenib の 5-FU 代謝に対する影響、第 61 回日本薬学会関東支部大会、慶應義塾大学薬学部、2017

石橋 由花、小林 康次郎、桧貝 孝慈、向津 隆規、和久井 紀貴、松尾 和廣、永井 英成：分子標的治療薬ソラフェニブによるマクロファージ活性化作用、第 16 回日本肝がん分子標的治療研究会、ルネッサンスリゾートナルト、2017

小林康次郎、桧貝 孝慈、松尾 和廣、和久井 紀貴、永井 英成：分子標的薬 Sorafenib の 5-FU 代謝に対する影響、第 16 回日本肝がん分子標的治療研究会、ルネッサンスリゾートナルト、2017

向津 隆規、永井 英成、松井 太吾、小林 康次郎、荻野 悠、松清 靖、松井 哲平、和久井 紀貴、初山 浩一、五十嵐 良典、住野 泰清、松尾 和廣、桧貝 孝慈：分子標的治療薬ソラフェニブの Kupffer 細胞活性化の可能性、JDDW 第 20 回日本肝臓学会大会、2016

坂内 良規、堀江 熙妃、松井 睦、大財 ゆい、松尾 和廣、桧貝 孝慈、永井 英成：ソラフェニブの RAF/MEK/MAPK 経路非依存的な HNF-4 に対する制御、第 26 回日本医療薬学会年会、国立京都国際会館、2016

松井 太吾、永井 英成、向津 隆規、小林 康次郎、荻野 悠、松井 哲平、和久井 紀貴、初山 浩一、篠原 美絵、五十嵐 良典、住野 泰清、松尾 和廣、桧貝 孝慈：進行肝細胞癌合併肝硬変症例に対するソラフェニブ投与の肝線維化活性抑制効果、第 52 回日本肝癌研究会、虎ノ門ヒルズフォーラム、2016

向津 隆規、永井 英成、松井 太吾、小林 康次郎、荻野 悠、松清 靖、松井 哲平、和久井 紀貴、初山 浩一、五十嵐 良典、住野 泰清、松尾 和廣、桧貝 孝慈：分子標的治療薬ソラフェニブの Kupffer 細胞活性化の可能性、第 52 回日本肝癌研究会、虎ノ門ヒルズフォーラム、2016

永井 英成、松井 太吾、向津 隆規、小林 康次郎、荻野 悠、和久井 紀貴、初山 浩一、篠原 美絵、五十嵐 良典、住野 泰清、松尾 和廣、桧貝 孝慈：進行肝細胞癌に対するソラフェニブと肝動注化学療法の有効性、第 52 回日本肝癌研究会、虎ノ門ヒルズフォーラム、2016

松井 太吾、永井 英成、向津 隆規、小林 康次郎、荻野 悠、松井 哲平、和久井 紀貴、初山 浩一、篠原 美絵、五十嵐 良典、住野 泰清、松尾 和廣、桧貝 孝慈：進行肝細胞癌合併肝硬変症例に対するソラフェニブ投与の肝星細胞の抑制効果、第 14 回日本肝がん分子標的治療研究会、スペース 36、2016

向津 隆規、永井 英成、松井 太吾、小林 康次郎、荻野 悠、松清 靖、松井 哲平、和久井 紀貴、初山 浩一、五十嵐 良典、住野 泰清、松尾 和廣、桧貝 孝慈：  
分子標的治療薬ソラフェニブの Kupffer 細胞活性化の可能性、第 14 回日本肝がん分子標的  
治療研究会，スペース 36，2016

〔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

なし

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：永井 英成

ローマ字氏名：NAGAI Hidenari

所属研究機関名：東邦大学

部局名：医学部

職名：准教授

研究者番号 (8 桁)：30349899

### (2)研究協力者 該当者なし

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。