

機関番号：32612

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2010

課題番号：21790366

研究課題名(和文)

ヒト肝癌増殖・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 proliferation and 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

研究成果の概要(和文): 近年、Sorafenib など分子標的治療薬が開発され、肝細胞癌に対しても従来の抗癌剤より良い効果が得られたと報告されたが、分子標的治療薬は腫瘍細胞における分子レベルの作用機序がある程度分かっているにもかかわらず、腫瘍の浸潤・転移など複雑な生物学的現象に与える影響や機能について解明されていないところが多い。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 で肝細胞株に対し sorafenib を投与した結果、KYN2 は Li7 より細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導が顕著にみられた。マウスモデルにおいても、KYN2 は sorafenib 投与による肝内転移抑制傾向が認められたが、Li7 にはそのような傾向はみられない。Microarray の結果より、KYN2 は Li7 より FGFR4, LYN などの発現が多く、western blotting でも KYN2 ではこれらの分子のリン酸化が sorafenib 投与により低下している結果が得られた。これらの分子は治療効果予測因子として有用性が期待できる。

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 reduced the phosphorylation level of LYN on KYN2, but not on Li7. Microarray resulted the signal of LYN, FGFR4 of KYN2 were more than Li7. The difference expression of these tyrosinkinase molecular could be useful to find candidate biomarkers for prediction of sorafenib response.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：分子標的薬、肝細胞癌

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は日本においてその罹患率が高

く、年間および3万5千人でありさらに増加傾向を示している。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、肝細胞癌全体としての予後は依然として不良である。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、有効な化学療法が確立されていないのが現状である。

近年、癌の増殖、浸潤、転移に関するさまざまな分子が同定されるにつれ、それらの分子を標的とする治療薬の開発が進められている。最近、肝細胞癌に対する分子標的治療が注目されるようになり、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。欧米ではこれらの分子標的治療薬についての第 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。肝細胞癌では、RAS/MAPK, PI3K/Akt/mTOR pathway や VEGF, PDGFR シグナリングカスケードなどが腫瘍の進展に重要な役割を果たすと考えられるが、Sorafenib は受容体である FLT 3, VEGFR(1-3)および PDGFR - を標的とし、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。Sorafenib について上記のように細胞分子レベルの機序が解明されているが、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元現象である。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る。

## 2 . 研究の目的

本研究では、転移を高率に来すヒト肝細胞癌株を用いた肝細胞癌転移モデルを利用して、分子標的治療薬の肝癌の浸潤・転移における効果とそのメカニズムを明らかにし、分子標的治療の有効性の予測や治療効果の判定への応用を検討する。

## 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、RPMI 1640 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 RPMI 1640 で 5% CO<sub>2</sub>, 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 μM ~ 10 μM) を添加し、5% CO<sub>2</sub>, 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 μM ~ 10 μM) を添加した 48 時間後、細胞を 0.25% trypsin で培養皿から剥がし、Annexin V 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/ウェルで 6 ウェルプレートで 24 時間培養後、sorafenib を最終濃度 1 μM, 5 μM, 10 μM 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 μg 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

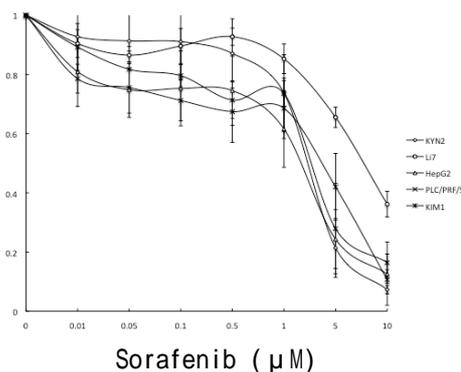
ヒト肝細胞癌株 (KYN-2, Li7, HepG2, Alexander, KIM1) は  $3 \times 10^6 / 20 \mu\text{l}$  を重度免疫不全マウス NOD/SCID の肝内に移植する。2 週後に sorafenib を 10mg/Kg, 30mg/Kg, 100mg/Kg 毎日 1 回投与する。溶媒のみ投与するコントロール群も作製する。Sorafenib 投与 2 週後にマウス肝臓を摘出し、肝の全重量、腫瘍の重量とサイズ、肝内転移の有無と転移巣数の計測を行う。また、一部の実験マウスは解剖せず、生存期間の検討を行う。摘出されたマウス肝に形成された腫瘍組織に対して、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。

### 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)

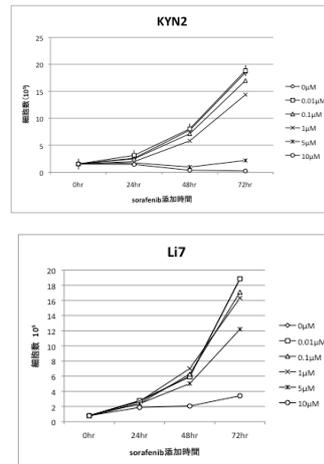
図 1 Sorafenib 添加後の肝細胞癌の増殖能 WST-1 アッセイ



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。

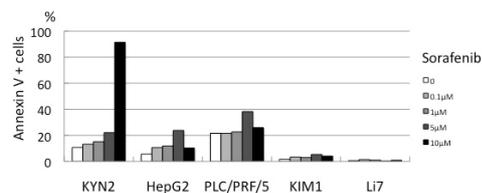
接着培養時と類似して、KYN2 と HepG2 は sorafenib による増殖抑制効果が顕著に認められたが、Li7 の増殖抑制効果は低い。KIM1 と PLC/PRF/5 は KYN2 と Li7 の中間に相当する抑制がみられた。但し、KIM1 は浮遊培養時増殖能が低い。

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 がみられるが、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 V でアポトーシス細胞を測定した。KYN2 は sorafenib に濃度依存性に apoptosis 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



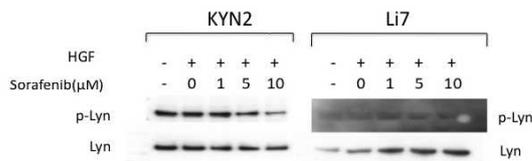
KYN2 と Li7 の sorafenib によるアポトーシス誘導性の違いは有意であると考える。

### (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。

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)

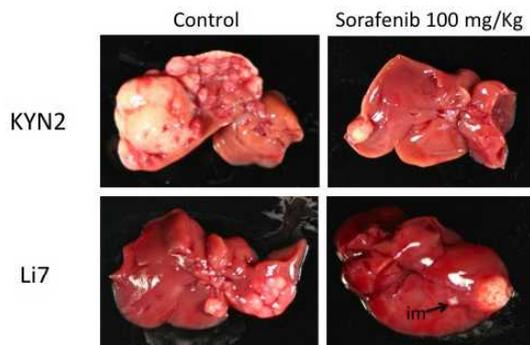
図 4 Sorafenib が KYN2 の LYN リン酸化を阻害する。



### (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 3X10<sup>6</sup> 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、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効果



### (5) 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、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。Microarray では LYN の他、FGFR3, FGFR4 などの発現も KYN2 と Li7 間に差が認められた。これらの分子は 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 の検体と臨床検体について候補因子の発現を計測し、候補因子の有効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 なし

### 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

#### (2) 研究分担者

なし

#### (3) 連携研究者

なし