

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：16101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K08620

研究課題名(和文) 肝星細胞制御による薬剤耐性肝癌の肝内転移抑制機構の解明

研究課題名(英文) The mechanism of intrahepatic metastasis suppression of drug resistant hepatocellular carcinoma via suppression of hepatic stellate cells

研究代表者

居村 暁 (IMURA, Satoru)

徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・徳島大学専門研究員

研究者番号：90380021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：我々は、肝細胞癌に対する分子標的治療の耐性株を作成し、薬剤耐性には転写因子 Nrf2やPINK1発現が亢進すること、さらに癌細胞のみならず、腫瘍微小環境を構成する癌関連線維芽細胞(CAF)や腫瘍関連マクロファージ(TAM)が関与することを見出した。すなわち、耐性癌細胞から分泌されるBAFFがCAF内のNF-κB活性化・IL-6/8の分泌を促進すること、また耐性癌細胞から分泌されるexosome内のmiRNA XによりマクロファージをM2型に分極化させ、VEGF分泌を促進するという癌-微小環境間の相互作用を解明した。さらに漢方薬である大建中湯(TU-100)がその相互作用を抑制することも見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

難治性癌である肝細胞癌の薬剤耐性獲得・転移促進のメカニズムを解明することは喫緊の課題である。我々は、癌細胞のみならず、腫瘍微小環境を介した薬剤耐性獲得メカニズムを解明し、さらに漢方薬である大建中湯(TU-100)により癌-微小環境間の相互作用が抑制されることを見出した。本研究成果により、肝細胞癌の治療成績向上が期待されることから、学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：We made drug resistant cancer cell line (hepatocellular carcinoma), and revealed that Nrf2/PINK1 signal was related with drug resistance. Furthermore, the role of cancer associated fibroblast and tumor associated macrophage in drug resistance was also revealed. BAFF from resistant cell promoted NF-κB signal in CAF and secretion of IL-6/8. miRNA-X in exosome from resistant cell accelerate polarization of M2 macrophage and VEGF secretion. This is the mechanism of drug-resistance in cancer-microenvironment interaction. moreover, we elucidated that Daiken-chu-to (TU-100), herbal drug, suppressed this interaction.

研究分野：肝細胞癌の薬剤耐性獲得における腫瘍微小環境の役割

キーワード：肝細胞癌 腫瘍微小環境 肝内転移 薬剤耐性 癌関連線維芽細胞 腫瘍関連マクロファージ

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は、近年の治療法進歩にも関わらず予後不良の悪性腫瘍として知られており、その原因として抗癌剤や分子標的治療薬といった薬物療法に対する耐性を獲得すると悪性度がさらに上昇し治療抵抗性となることが挙げられる。我々は肝癌治療成績向上のため、癌細胞のみならず癌関連線維芽細胞(CAF)や腫瘍関連マクロファージといった腫瘍微小環境に着目し研究を進めている。すでにCAFがIL-6やCXCL10, osteopontinを介して、またTAM内で転写因子Nrf2発現が亢進することで肝細胞癌の悪性度上昇に関与することを報告した(*Cell Commun Signal.* 2018, *Anticancer Res.* 2020, *Oncotarget.* 2021.) (図1)。さらに、漢方薬である大建中湯(TU-100)が肝内CAFの活性化前形態である、肝星細胞(HSC)の機能を抑制することを確認している(*Surgery.* 2016)。そこで薬剤耐性肝癌においてもCAF/TAMといった腫瘍微小環境が関与し、TU-100が悪性度・薬剤耐性を解除できるのではないかと考えた。

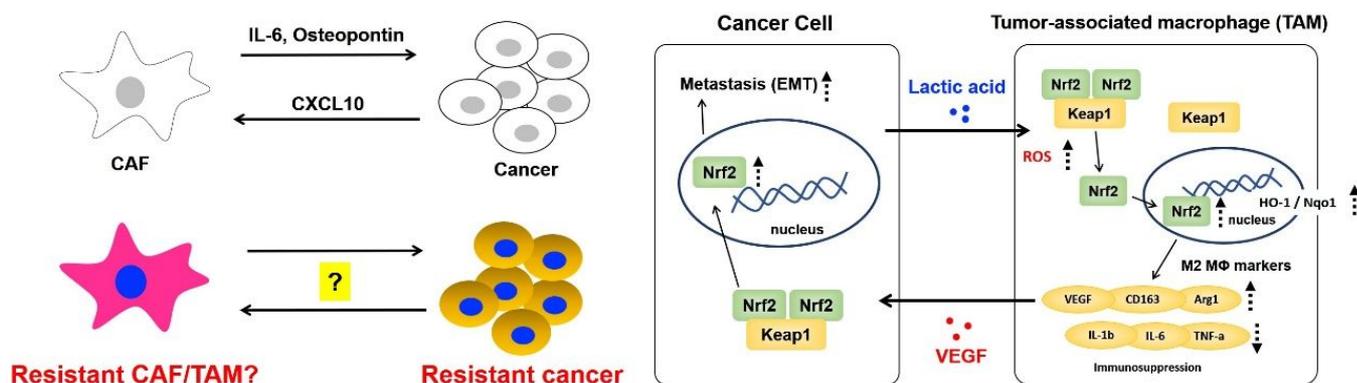


図1: 腫瘍微小環境が悪性度上昇に与える影響

2. 研究の目的

本研究の目的は、微小環境制御が薬剤耐性肝癌に与える影響について、その機序を解明することとした。抗癌剤、分子標的治療薬に対する耐性を獲得し悪性度が上昇(治療抵抗性)した肝癌細胞はさらに増殖・転移能が高まるが、腫瘍微小環境におけるCAF/TAMの役割、またその制御により増殖・転移の制御が可能となれば肝癌治療の成績向上が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 薬剤耐性の機序に関する検討

肝癌細胞株 Huh7 を用いて、Sorafenib, Lenvatinib 存在下に培養し耐性株を樹立した(図2)。

Sorafenib 耐性に関する検討

Sorafenib 耐性および非耐性の Huh7 と星細胞株 LX-2 を共培養することで2種類の CAFs を誘導し、RT-PCR で各種遺伝子発現の比較検討を行った。さらに、誘導された2種類の CAFs と Huh7 を共培養し、Sorafenib 処理下での生存率を確認した。

Lenvatinib 耐性に関する検討

耐性および非耐性株で悪性度を評価し、RT-PCR で各種遺伝子発現の比較検討を行った。また siRNA を用いて耐性株の Nrf2 をノックダウンし同様の比較検討を行った。さらに Nrf2 に関与する miRNA-X を同定し、耐性株の exosome を超遠心法で抽出。耐性株由来の培養液(CM)で naive 株を培養し(Recipient 株)、悪性度を評価。PTEN と下流シグナル、Nrf2 発現を測定し、naive 株と比較。耐性株由来の CM で培養した TAM を耐性 TAM とし、耐性 TAM の CM により培養した naive 株の悪性度を評価。耐性 TAM の PTEN と下流シグナル、Nrf2 発現を測定。さらに miRNA-X を阻害し同様の検討を行った。

(2) TU-100 が微小環境に与える影響についての検討

肝癌細胞の CM で培養した TAM に TU-100 を加え、通常の TAM と RT-PCR で各種遺伝子発現を比較検討した。また通常の TAM と TU-100 を加えた TAM の CM で肝癌細胞を培養し、悪性度を比較した。

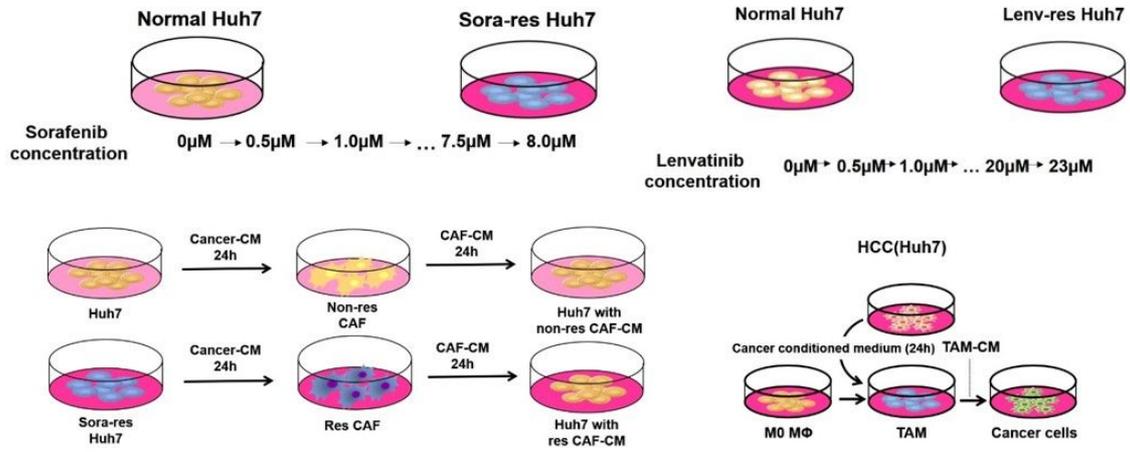


図2: 薬剤耐性株作成とCAF/TAMの誘導

4. 研究成果

(1) 薬剤耐性の機序に関する検討

Sorafenib 耐性株由来の CAFs では IL-6/IL-8 が多く分泌されており、共培養された非耐性 Huh7 悪性度上昇、耐性獲得を促進していた。サイトカインアッセイでは、耐性株において癌細胞の保護因子である BAFF が多く分泌されており CAFs の BAFF 受容体とその下流の NF- κ B シグナル伝達経路の活性化していた。耐性株において siRNA を用いて BAFF をノックダウンすると、耐性 CAFs の BAFF/NF- κ B シグナルの活性化、および IL-6/IL-8 分泌増加いずれもリセットされた。さらに耐性 CAFs と共培養された Huh7 においても耐性獲得は阻害された(図 3)。

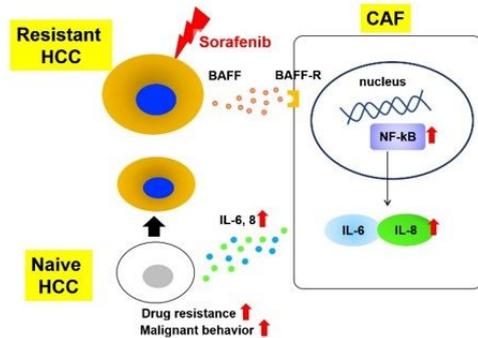


図3: ソラフェニブ耐性と微小環境

Lenvatinib 存在下で、耐性株は浸潤能、遊走能、増殖能が保たれていた。耐性株で Nrf2 の遺伝子発現は増強し、ABC トランスポーター (ABCA6, ABCC2, ABCG2) の発現増強と Stemness marker である Nanog, CD44, EPCAM の高発現を確認した。次に siRNA を用いて Nrf2 をノックダウンすると、耐性株の浸潤・遊走・増殖能は非耐性株と同程度にまで解除された。さらに耐性株では PINK1 発現が上昇していたが、これも Nrf2 ノックダウンにより PINK1 発現は低下した。

また、耐性株の miRNA-X は非耐性株に比べ高発現し、naïve 株と比べて PTEN 発現の低下、pGSK3 発現の上昇、Nrf2 の核内移行増強を認め、M2 マクロファージマーカーである CD163/206 も高発現であった。耐性 TAM の CM は VEGF 濃度が上昇しており、これにより培養した naïve 株は悪性度・耐性能が増強した。耐性 TAM の PTEN 発現は抑制され、PI3K/pGSK3 経路の活性化とともに Nrf2 核内移行増強を認め、miRNA-X を阻害するとこれらの効果はキャンセルされた(図 4)。

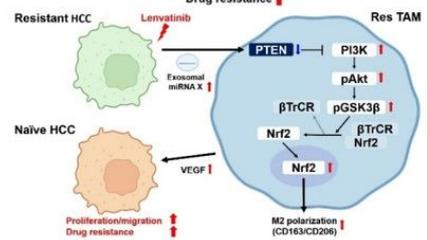
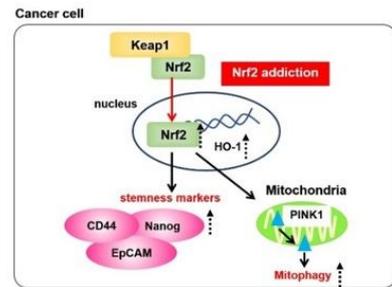


図4: レンバチニブ耐性と微小環境

(2) TU-100 が微小環境に与える影響についての検討

TU-100 は M2 マーカーである CD163 と CD206 発現を低下させ、また NF- κ B/TLR4/VEGF 発現も抑制した。さらに、TAM-CM で培養した癌細胞は proliferation, migration が亢進したが、TU-100 を投与し培養した癌細胞ではその亢進がキャンセルされた(図 5)。

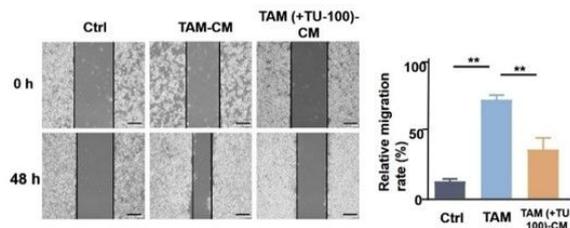


図5: TU-100がTAMと癌細胞に与える影響

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Tokuda K, Morine Y, Miyazaki K, Yamada S, Saito Y, Nishi M, Tokunaga T, Ikemoto T, Imura S, Shimada M	4. 巻 12
2. 論文標題 The interaction between cancer associated fibroblasts and tumor associated macrophages via the osteopontin pathway in the tumor microenvironment of hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Oncotarget.	6. 最初と最後の頁 333-343
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山田眞一郎, 陳術海, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 徳田和憲, 沖川昌平, 山下祥子, 宮崎克己
2. 発表標題 肝細胞癌微小環境におけるPAI-1発現の意義に関する検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 沖川昌平, 森根裕二, 徳田和憲, 齋藤裕, 山田眞一郎, 山下祥子, 宮崎克己, 池本哲也, 居村暁, 島田光生
2. 発表標題 腫瘍微小環境におけるOsteopontinの意義
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 寺奥大貴, 高露伴, 島田光生, 森根裕二, 居村暁, 池本哲也, 齋藤裕, 山田眞一郎, 徳田和憲, 沖川昌平, 山下祥子, 宮崎克己
2. 発表標題 肝細胞癌におけるSorafenib耐性獲得機序に関する検討
3. 学会等名 第121回日本外科学会定期学術集会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 徳田和憲, 森根裕二, 宮崎克己, 山下祥子, 沖川昌平, 山田眞一郎, 齋藤裕, 池本哲也, 居村暁, 島田光生
2. 発表標題 肝細胞癌の腫瘍微小環境におけるOsteopontinを介したCAF-TAM interactionについての検討
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
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
研究分担者	常山 幸一 (TSUNEYAMA Koichi) (10293341)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・教授 (16101)	
研究分担者	池本 哲也 (IKEMOTO Tetsuya) (20398019)	徳島大学・病院・教授 (16101)	
研究分担者	山田 眞一郎 (YAMADA Shinichiro) (30579884)	徳島大学・病院・特任助教 (16101)	
研究分担者	齋藤 裕 (SAITO Yu) (50548675)	徳島大学・病院・講師 (16101)	
研究分担者	森根 裕二 (MORINE Yuji) (60398021)	徳島大学・大学院医歯薬学研究部(医学域)・准教授 (16101)	

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
---------	---------