

平成30年6月14日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K09020

研究課題名(和文) 進行肝細胞癌におけるTGF- $\beta$ とそのシグナルを標的としたIFN併用化学療法の展開

研究課題名(英文) Regulation of transforming growth factor is involved in the efficacy of combined 5-fluorouracil and interferon alpha-2b therapy of advanced hepatocellular carcinoma

研究代表者

王挺(WANG, TING)

岩手医科大学・医学部・助教

研究者番号：70416171

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)：基礎的研究：5-FUは、肝細胞癌細胞においてTGF- $\beta$ の発現および分泌を誘導する。また、5-FUは、TGF- $\beta$ の細胞死シグナルを抑制し、ERKを介して細胞浸潤シグナルを増強する。一方、IFN- $\alpha$ -2bは、5-FUのこれらの作用を抑制することが明らかになった。

臨床的研究：IFN/5-FU併用療法の治療効果を認めた進行肝癌患者では、TGF- $\beta$ の血中濃度が治療後に著明に減少した。しかし、C型肝炎の背景を持つ患者については、症状改善例群と不応例群では、治療後TGF- $\beta$ の血中濃度が治療前よりはすべて低下し、群間有意差は認められなかった。

研究成果の概要(英文)：Experimental Study: 5-FU increased both the expression and secretion levels of TGF- $\beta$ 1 in hepatoma cells, but not in normal hepatocytes. 5-FU inhibited TGF- $\beta$ -mediated apoptosis signaling but stimulated TGF- $\beta$ -mediated EMT signaling via ERK1/2. On the other hand, IFN- $\alpha$ -2b can antagonize the effects of 5-FU on TGF- $\beta$  expression and TGF- $\beta$ -mediated signaling.

Clinical study: The serum levels of TGF- $\beta$ 1 prior to the therapy were significantly decreased after the combination therapy. However, in cases with a HCV background, although the serum levels of TGF- $\beta$  decreased after the combination therapy in all the patients, 41.2% of the cases responded poorly to the therapy with a continued worsening of their condition, and there were no significant differences in TGF- $\beta$  levels between patients who worsened and improved.

研究分野：肝臓学、細胞生物学

キーワード：TGF- $\beta$  IFN/5-FU 併用療法

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌に対する治療法は、肝切除をはじめ、肝動脈塞栓術(TACE)、ラジオ波焼灼術(RFA)など多くの選択肢がある一方で、門脈内腫瘍栓など脈管侵襲および他臓器に転移を有する進行性癌については、有効な治療法は極めて少ないのが現状である。我々は、2007年より臨床研究として進行肝細胞癌に対する5-fluorouracil(5-FU)とpegylated interferon -2b(PEG-IFN -2b)の併用療法の有効性を検討し、従来の治療法に比し、生存期間の延長を確認した(Kasai K, 2012)。この結果をさらに有効性の高い治療法の開発、あるいは有効症例の予知・選択に繋げるためには、併用療法の作用機序の解明が不可欠である。

これまで、進行性肝癌に対するIFN/5-FU併用療法の作用機序として、(1) IFN レセプター(IFNAR)を介する癌細胞アポトーシス誘導効果；(2) Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand (TRAIL)シグナルによる免疫抑制の阻害；および(3) Angiopoietin 2が関与する抗血管新生作用の三つの側面から報告されている(Nagano H, 2010, 2011; Wada H, 2007; Nakamura M, 2007)。しかし、これらは、進行肝癌の持ついくつかの特性について個別に検討した結果である。我々は、これらすべての特性に共通する分子としてTGF- $\beta$ を想定し、その発現やシグナルに対する併用療法の影響を解明する研究を立案した。TGF- $\beta$ は、SMAD依存性シグナルを介して上皮系細胞に対する強力な増殖抑制作用を示すことから、当初は癌の進展を抑制する因子として注目されていた。しかし、多くの癌では、TGF- $\beta$ のII型受容体やSMAD2などシグナル分子の遺伝子変異があるため、TGF- $\beta$ の抗癌シグナルがうまく伝達されず、代わりにTGF- $\beta$ がJNK、ERKなどSMAD非依存性シグナルを介して上皮-間葉移行(EMT)を引き起こし、癌の浸潤を誘導する。さらに、TGF- $\beta$ は癌組織で過剰に分泌され、癌幹細胞の維持、免疫抑制、血管新生など癌の生物学的悪性度を促進する。

## 2. 研究の目的

進行肝癌においてTGF- $\beta$ およびそのシグナルが重要な役割を担うことは知られているが、5-FU/IFNの併用療法がTGF- $\beta$ およびそのシグナルを介して作用するかはまだ知られていない。本研究では、肝癌の発生および進展に重要な役割を担うTGF- $\beta$ およびそのシグナルに着目し、5-FU/IFN併用療法の抗腫瘍機構の解明および治療効果の制御/予知因子の同定を行う。

## 3. 研究の方法

基礎的検討：

1) 5-FUによる肝細胞におけるTGF- $\beta$ の蛋白質発現および分泌の影響

肝癌細胞株HuH7、HepG2および正常肝細胞株AML-12に5-FUを0から100  $\mu$ g/mlを添

加し、24時間後、細胞ライセートを調製する。TGF- $\beta$ のタンパク質発現をWestern blotによって測定する。

HuH7、HepG2およびAML-12に5-FU単独添加およびIFN -2bとの混合添加を行い、培養細胞の上清を回収し、TGF- $\beta$ のレベルをELISAキットで測定する。

2) 5-FUによる肝癌細胞の浸潤性誘導作用についての検討、

肝癌細胞株HepG2に5-FUを0から30  $\mu$ g/mlを添加し、24時間後、生細胞測定試薬を添加し、吸光度の測定によって、細胞生存率を評価した。

HepG2細胞に前述と同じ方法で処理し、細胞の浸潤性をmigration assay及びinvasion assayで検討した。また、既に前の実験で確認した30  $\mu$ g/mlの5-FUによるTGF- $\beta$ の分泌誘導実験を再現し、回収した上清をTGF- $\beta$ 活性化処理及び5-FUの濃度希釈を行い(5-FU処理上清)細胞に添加し、細胞の浸潤性をmigration assay及びinvasion assayで検討した。

3) 5-FUによる肝癌細胞の浸潤性誘導作用の分子機構およびIFN -2bの抑制作用についての検討

HepG2細胞に5-FU処理上清を単独添加、IFN -2bとの混合添加を行い、24時間処理した。細胞内のTGF- $\beta$ シグナル分子(TGF- $\beta$ RII、SMAD2、p15INK4b、snail、-cateninなど)およびIFNシグナル分子(IFNAR、STATなど)の発現および活性化についてWestern blotで分析した。

HepG2細胞に30  $\mu$ g/ml TGF- $\beta$ 、2 IU/ml IFN -2bをそれぞれ単独添加、およびTGF- $\beta$ とIFN -2bの混合添加を行い、24時間処理した。細胞浸潤に關与するTCF8/ZEB1、claudin-1、ZO-1、vimentin、slugの蛋白質レベル、及び、MAPKファミリーのメンバーであるERK1/2、JNK、p38MAPKのリン酸化蛋白質レベルをWestern blotで分析した。

MAPK/ERKの阻害剤U0126 (10  $\mu$ M)と30  $\mu$ g/ml 5-FUの混合添加を加えて、と同じ条件で細胞を処理した。細胞内E-cadherinおよびclaudin-1の蛋白質レベルを分析した。

4) IFN -2bの代替としてTGF- $\beta$ の阻害剤の応用の可能性についての検討

肝癌細胞株HepG2にTGF- $\beta$ 阻害剤(A83-01、SB525334およびSB431542)を1 ng/mlから3 ng/mlまでの濃度で添加し、1時間後にTGF- $\beta$  1/2を1 ng/mlを添加し、24時間から48時間後生細胞測定試薬を添加し、吸光度の測定によって、細胞生存率を評価した。

上述TGF- $\beta$ 阻害剤と同じ方法でIFN -2bを0.2 IU/mlで添加し、TGF- $\beta$ による細胞生存作用に対するIFN -2bの影響を評価した。

臨床的検討

1) 併用療法を受けたStage-IVの患者(n=27)に対し、5-FU/IFN-2b併用療法治療後改善の有無と治療前後血中TGF-βのレベルの増減を比較し、相関関係を評価した。

2) C型肝炎背景を持つ進行性肝細胞癌患者(n=17)を治療後症状改善例群と不応例群を分けて、各群の治療前後の血中TGF-βのレベルの変化(治療後TGF-βのレベル/治療前TGF-βのレベル)を計算し、群間の有意差の有無をt-testで検定した。

4. 研究成果

基礎的研究結果:

1) 5-FUによる肝細胞におけるTGF-βの蛋白質発現および分泌の影響

5-FUは、正常肝細胞ではなく、肝細胞癌細胞においてTGF-βの発現(図1)および分泌(図2)を誘導する。一方、IFN-2bは、5-FUの作用を抑制した。

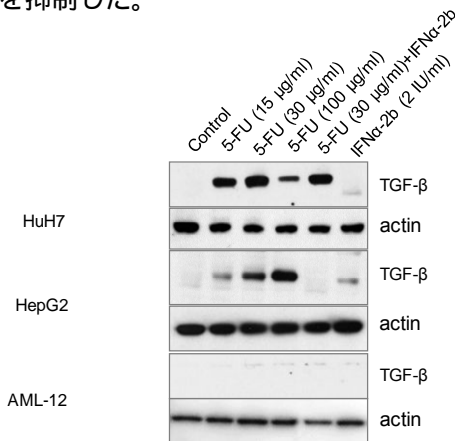


図1. 5-FU 単独および IFN-2b との混合添加による TGF-β の蛋白質発現

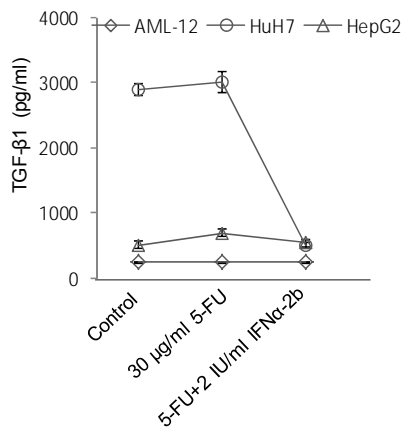


図2. 5-FU 単独および IFN-2b との混合添加による TGF-β の分泌

2) 5-FUによる肝細胞の浸潤性誘導作用についての検討、

5-FUは、0.5 μg/mlの濃度超える範囲で著明な細胞死を誘導した。

5-FUは、0.5 μg/mlで細胞浸潤の誘導が認められなかったが、5-FU処理上清で著明な細胞浸潤が示された。

3) 5-FUによる肝細胞の浸潤性誘導作用の分子機構およびIFN-2bの抑制作用についての検討

5-FU 処理上清で細胞内 TGF-β RII、p-SMAD2 及び p15INK4b の蛋白質発現が減少し、snail および β-catenin への影響が認められなかった。これに対し、IFN-2b との混合添加では、TGF-β RII、p-SMAD2 および p15INK4b の蛋白質発現が回復した。一方、IFN-2b による IFNAR の蛋白質発現への影響が認められなかったが、STAT-3 の活性化が促進された。

5-FUは、claudin-1の蛋白質レベルを減少し、ERK1/2のリン酸化蛋白質レベルを増加した。これに対し、IFN-2bとの混合添加では、claudin-1の蛋白質レベルおよび ERK 1/2 のリン酸化蛋白質レベルがコントロールレベルまで回復した。5-FUは、TCF8 /ZEB1、ZO-1、vimentin および slug の蛋白質レベル、または、JNK、p38MAPK のリン酸化蛋白質レベルに影響しない(図3)。

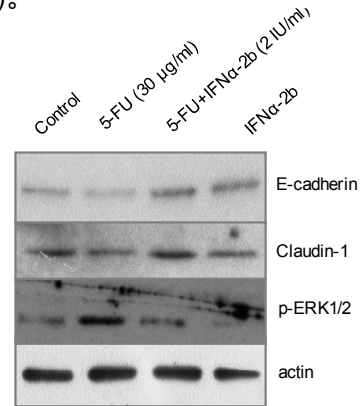


図3. 5-FU 単独および IFN-2b との混合添加による EMT シグナル分子への影響

MAPK/ERKの阻害剤は、IFN-2b と同じように5-FU による低下したE-cadherin および claudin-1 の蛋白質レベルを上昇させた(図4)。

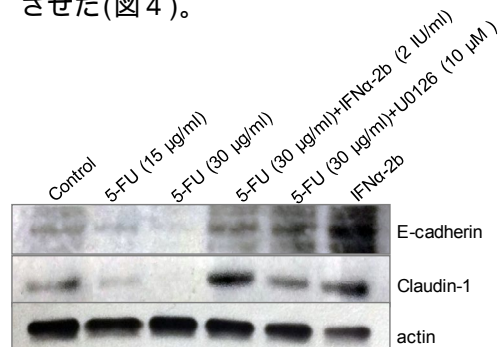


図4. 5-FU による EMT シグナル分子の影響における ERK の関与

4) IFN-2bの代替としてTGF-βの阻害剤の応用の可能性についての検討

コントロール細胞に比べ、TGF-βは24時間の細胞生存を低下させ、24時間から48

時間の細胞増殖を抑制した。これに対し、SB525334、A83-01およびSB431542は、TGF- $\beta$ による細胞生存および増殖の影響を濃度依存的に解除した。

IFN- $\alpha$ 2bは、24時間添加で、TGF- $\beta$ による細胞生存の影響を解除したが、48時間の処理でTGF- $\beta$ による細胞増殖の抑制を著明に促進した。

#### 臨床的検討

1) 総計 27 名の患者の中では、治療後の改善例の中に血中 TGF- $\beta$  のレベルが低下した例の割合(a)は 55.58%で、血中 TGF- $\beta$  のレベルが上昇した例の割合(b)は 6.18%で( $p < 0.05$ , vs a)であった。治療後の増悪例の中に血中 TGF- $\beta$  のレベルが低下した例の割合は 12.06%( $p < 0.05$ , vs a)で、血中 TGF- $\beta$  のレベルが上昇した例の割合は(26.18%)でした。治療の改善と血中 TGF- $\beta$  のレベルの減少の相関性( $r = 0.85$ ,  $t = 2.23$ ,  $p = 0.08$ )。また、治療後の増悪と血中 TGF- $\beta$  のレベルの上昇の相関性( $r = 0.84$ ,  $t = 2.22$ ,  $p = 0.08$ )については、有意差はなかったが、高い相関を示した。

2). C型肝炎の背景を持つ患者( $n = 17$ )については、治療後症状改善例( $n = 10$ )群と不応例群( $n = 7$ )では、治療後TGF- $\beta$ の血中濃度が治療前に比べ、すべて低下し、群間有意差は認められなかった(図5)。

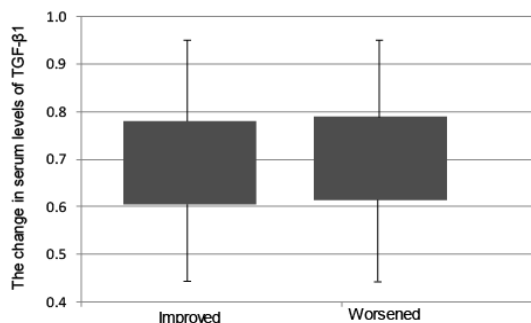


図 5. C 型肝炎の背景を持つ患者における治療効果と TGF- $\beta$  の血中濃度の比較

以上の結果から、1. 5-FU は、正常肝細胞ではなく、肝細胞癌細胞において TGF- $\beta$  の発現および分泌を誘導する。また、5-FU は、TGF- $\beta$  の細胞死シグナルを抑制し、ERK を介して細胞浸潤シグナルを増強する。一方、IFN- $\alpha$ 2b は、5-FU のこれらの作用を抑制することが明らかになった。

2. 細胞実験において5-FUによるEMT現象の直接誘導及びIFN- $\alpha$ 2bの抑制作用の確認は困難であった原因としては、5-FU単独およびIFN- $\alpha$ 2bとの併用は、強い細胞死を誘導したことによると考えられる。

3. IFN- $\alpha$ 2bの代替としてTGF- $\beta$ 阻害剤の選択の可能性、また、血中TGF- $\beta$ レベルは、治療効果の評価及び予後因子になる可能性に対し、今後、更なる検討が必要であると考えられる。

#### 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 11 件)

1. Okada Y, Wang T, Kasai K, Suzuki K, Takikawa Y. Regulation of transforming growth factor is involved in the efficacy of combined 5-fluorouracil and interferon alpha-2b therapy of advanced hepatocellular carcinoma. Cell Death Discov. 査読有、2018、doi:10.1038/s41420-018-0040-y.
2. Miyasaka A, Yoshida Y, Yoshida T, Murakami A, Abe K, Ohuchi K, Kawakami T, Watanebe D, Hoshino T, Sawara K, Takikawa Y. The Real-world Efficacy and Safety of Ombitasvir/Paritaprevir/Ritonavir for Hepatitis C genotype 1. Intern Med. 査読有、2018、doi: 10.2169/internalmedicine.0810-18.
3. Endo K, Kuroda H, Kakisaka K, Oikawa T, Sawara K, Ishida K, Sugai T, Takikawa Y. Hepatic Angiomyolipoma Staining in the Post-vascular Phase of Contrast-enhanced Ultrasound Due to the Presence of Macrophages. Intern Med. 査読有、57巻、2018、1247-1251.
4. Wang T, Takikawa Y. Carnosic acid protects normal mouse hepatocytes against H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced cytotoxicity via sirtuin 1-mediated signaling. Hepatol Res. 査読有、46巻、2016、239-246.
5. 滝川康裕、王挺. 進行肝癌に対するインターフェロン併用 5-FU 療法の有効性に関する基礎的検討. 犬山シンポジウム記録集、査読有、3巻、2016、53-56.
6. Suzuki Y, Katagiri H, Wang T, Kakisaka K, Kume K, Nishizuka SS, Takikawa Y. Ductular reactions in the liver regeneration process with local inflammation after physical partial hepatectomy. Lab Invest. 査読有、96巻、2016、1211-1222.
7. Suzuki A, Kakisaka K, Suzuki Y, Wang T, Takikawa Y. c-Jun N-terminal kinase-mediated Rubicon expression enhances hepatocyte lipoapoptosis and promotes hepatocyte ballooning. World J Gastroenterol. 査読有、22巻、2016、6509-6519.
8. Suzuki K, Kuroda H, Sawara K, Yoshida Y, Kakisaka K, Suzuki Y, Suzuki A, Onodera M, Oikawa T, Wang T, Endo R, Kato A and Takikawa Y. Predictive biomarkers for diagnosis of minimal hepatic encephalopathy in patients with liver cirrhosis: A preliminary

- result in a single center study in Japan. Biomed Res Clin Prac. 査読有、2016、1巻、97-102.
9. Suzuki K, Onodera M, Hidekatsu K, Kakisaka K, Yoshida Y, Sawara K, Miyamoto Y, Wang T, Endo R, Kato A, Takikawa Y. Reevaluation of Serum Carnitine Status in Patients with Liver Cirrhosis. J Liver Res Disord Ther. 査読有、2巻、2016、00025.
10. Altinel K, Hashimoto K, Wei Y, Neuveut C, Gupta I, Suzuki AM, Dos Santos A, Moreau P, Xia T, Kojima S, Kato S, Takikawa Y, Hidaka I, Shimizu M, Matsuura T, Tsubota A, Ikeda H, Nagoshi S, Suzuki H, Michel ML, Samuel D, Buendia MA, Faivre J, Carninci P. Single-Nucleotide Resolution Mapping of Hepatitis B Virus Promoters in Infected Human Livers and Hepatocellular Carcinoma. J Virol. 査読有、90巻、2016、10811-10822.
11. Yamashita H, Kusudo T, Takeuchi T, Qiao S, Tsutsumiuchi K, Wang T, Wang Y. Dietary supplementation with evodiamine prevents obesity and improves insulin resistance in ageing mice. Journal of Functional Foods. 査読有、19巻、2015、320-329.
- 〔学会発表〕(計 2 件)
1. Wang T. The effects of 5-fluorouracil (5-FU) on TGF- $\beta$ -related signaling molecules. EUROPEAN SOCIETY FOR MEDICAL ONCOLOGY (ESMO) 2017 Congress, 2017.
2. Wang T. Effects of 5-fluorouracil (5-FU) combined with interferon alpha (IFN $\alpha$ )-2b on the protein expression and secretion of TGF $\beta$ . International Liver Cancer Association (ILCA)10<sup>th</sup> Annual Conference, 2016.

〔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 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〕  
 ホームページ等

6. 研究組織  
 (1)研究代表者  
 王挺 ( WANG TING )  
 岩手医科大学・医学部・助教  
 研究者番号：70416171

(2)研究分担者  
 なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
 滝川 康裕 ( Takikawa Yasuhiro )  
 岩手医科大学・医学部・教授  
 研究者番号：50254751  
 宮坂 昭生 ( Miyasaka Akio )  
 岩手医科大学・医学部・准教授  
 研究者番号：80382597

(4)研究協力者  
 なし ( )