

令和元年6月4日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H05287

研究課題名(和文) 難治性消化器癌に対する次世代型鉄キレート剤治療の確立

研究課題名(英文) Effects of a novel oral iron chelator on refractory digestive system cancers

研究代表者

山崎 隆弘 (YAMASAKI, Takahiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号：00304478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,100,000円

研究成果の概要(和文)：我々は鉄キレート剤(DFO)による肝癌治療法を開発してきた。近年経口鉄キレート剤(DFX)が登場し、次世代型治療法となる可能性があるため、肝癌および膵癌のDFX効果を検証した。in vitroでは、容量依存的増殖抑制効果を、in vivoでも腫瘍抑制効果を認めた。膵癌にて塩酸ゲムシタピンとDFX併用は、ribonucleotide reductaseの制御を介した相乗的効果であることを解明した。進行肝癌患者に対するDFX治療では有効性が検証できず、肝癌の臨床応用はDFO動注が適していると考えた。さらに、DFOの耐性機序を解明することで、DFOの新たな治療戦略の可能性を見出している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝癌・膵癌ともに、他の消化器癌に比べ、難治かつ予後不良である。また日本は超高齢化社会を迎えており、両者とも高齢かつ進行癌で発見される患者が多い現状がある。進行癌の標準治療は化学療法である。肝癌の分子標的治療薬は高齢者にも導入可能だが、肝機能不良例には適応がない。一方、膵癌の化学療法は副作用が強く、高齢者には厳しい。本研究は、経口鉄キレート剤DFXにて抗腫瘍効果を検証した。鉄キレート剤は、抗癌剤でない故、高齢者にも優しい治療である。肝癌ではDFOの新たな治療戦略を、膵癌では抗癌剤併用DFX治療を提言でき、独創性もあり、意義のある研究と考える。

研究成果の概要(英文)：We have demonstrated the efficacy of deferoxamine (DFO) in hepatocellular carcinoma (HCC). Recently, deferasirox (DFX), a new oral iron chelator, has been developed. We evaluated the effects of DFX against HCC and pancreatic cancer which belong to refractory digestive system cancers. DFX inhibited the proliferation of hepatoma or pancreatic cell lines in a dose-dependent manner. In vivo, DFX treatment significantly suppressed the development of liver or pancreatic tumors. The combination therapy using DFX and gemcitabine against pancreatic cancer has significant anticancer effects though the suppression of ribonucleotide reductase. As the efficacy of DFX for advanced HCC patients in the pilot clinical study could not demonstrated, we considered an arterial infusion of DFO as a clinical application in advanced HCC patients. In addition, we found the mechanism for DFO resistance, which has the possibility of a novel treatment strategy for DFO.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 膵癌 鉄キレート剤 deferasirox deferoxamine

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

1. 研究開始当初の背景

(1) 消化器癌のなかでも膵臓癌(以下膵癌)と肝細胞癌(以下肝癌)は、本邦のがん死亡第4位と第5位を占める予後不良な難治性消化器癌である。膵癌は早期発見が困難なこともあり、進行癌で発見されることが多く、一方近年肝癌も、ウイルス関連肝癌の激減により非ウイルス性肝癌(NBNC肝癌)が増加し進行癌での発見が増えている。進行膵癌および進行肝癌に対して、化学療法があるが、すべての症例に導入することは困難である。そこで、上記の難治性消化器癌に対して、全く作用機序の異なる新規治療薬の開発と治療法の確立が望まれる。

(2) 癌の状態では、多くの鉄を必要とすることから、鉄制御が肝癌の新規治療となることを見出し、既存の抗癌剤でない新規治療として、「抗癌剤耐性の進行肝癌に対する鉄キレート剤(DF0)を用いた肝動注療法」を世界に先駆けて開発し、有用性を報告した(Yamasaki T, et al. *N Engl J Med* 2011; 365: 576-8)。

2. 研究の目的

近年、DF0より半減期の長い経口鉄キレート剤(deferasirox, DFX)が登場し、次世代型治療法となる可能性もある。そこで肝癌および膵癌に対する経口鉄キレート剤の治療効果を *in vitro* および *in vivo* で検証し、作用メカニズム機序を解明することで、進行肝癌・膵癌に対する新たな治療法を確立させるのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 肝癌細胞株および膵癌細胞株を用いて DFX の細胞増殖抑制効果ならびにアポトーシス誘導について解析する。

(2) DEN による肝腫瘍作成マウスを用いて DFX の腫瘍抑制効果を解析する。

(3) 膵癌細胞株を皮下に移植した膵癌マウスモデルを用いて DFX、塩酸ゲムシタピン(GEM)、および DFX+GEM 併用の腫瘍抑制効果を解析する。

(4) 膵癌細胞株を用いて DFX+GEM 併用の相乗効果の機序を解析する。

(5) 膵癌細胞株を用いて DFX による浸潤および遊走能低下の機序を解析する。

(6) 抗癌剤耐性の進行肝癌患者に対して、研究倫理審査委員会(IRB)の承認後、パイロットスタディを行い、臨床的評価を行う。

(7) DF0耐性株を作製し、その耐性機構をメタボローム解析、遺伝子発現解析を行い評価する。

4. 研究成果

(1) 肝癌の DFX による *in vitro*: 肝癌細胞株(HepG2, Hep3B, HuH7)に対して DFX は、Caspase-3 活性誘導を伴う容量依存的な細胞増殖抑制効果を示した。

(2) 肝癌の DFX による *in vivo*: DEN 投与による肝腫瘍作成マウス(5カ月後肝腫瘍発生)に対して DFX を12週間投与し、腫瘍抑制効果と生存率の改善を確認した(図1)。DFX による体重減少もなく、DFX 群にて ALT の有意な低下を認めた。また、腫瘍部/非腫瘍部において hepcidin, transferrin receptor1, HIF-1 の有意な変動を確認した。

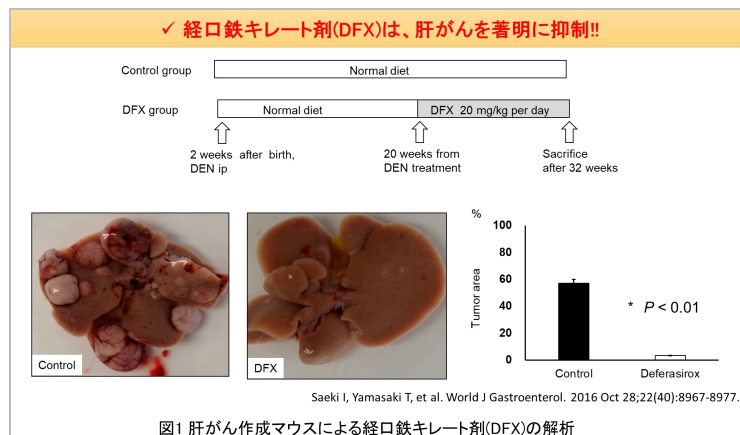


図1 肝がん作成マウスによる経口鉄キレート剤(DFX)の解析

(3) 抗癌剤耐性の進行肝癌患者に対する DFX 治療: パイロットスタディを6名の患者に施行した。Dose-escalation trial で、DFX10mg/kg から開始したが、全例に腎機能障害を認めたため、高容量の DFX が投与できず、1例はプロトコル途中で中止した。5例の治療効果解析では、不変1例以外はすべて進行であり、肝癌患者における DFX の有用性は検証できなかった。以上のことから、肝癌の臨床応用は DF0 動注が適していると結論づけた。

(4) DF0耐性機序の解析: DF0耐性株での検討にて、解糖系の遺伝子発現増加、解糖系に関わる代謝産物の増加およびミトコンドリア抑制を確認した。さらに DF0 により蓄積する乳酸の排泄抑制効果を検討し、一部の癌細胞増殖に対し乳酸排泄抑制剤と DF0 との相乗効果を確認しており、DF0 における新たな治療戦略となる可能性を見出している。

(5) 膵癌の DFX による *in vitro*: 膵癌細胞株(BxPC-3, HPAF-II, Panc10.05)に対して DFX は容量依存的な細胞増殖抑制効果を示し、低用量(10 μ M)ではS期の細胞周期の休止を、高容量(50, 100 μ M)ではアポトーシスを誘導していることを確認した。

(6) 膵癌の DFX による *in vivo*: BxPC-3 をヌードマウス皮下に移植する膵癌マウスモデルに対して3群容量設定(120, 160, 200 mg/kg)した DFX を3週間投与した。160/200 mg/kg DFX 投与にて腫瘍抑制効果および血清と組織内フェリチンの有意な低下を確認した。さらに遺伝子アレイ解析にて、DFX が TGF- β シグナルの抑制を介して働いていることを解析した。

(7) 膵癌の DFX+GEM 併用による *in vitro*: 膵癌細胞株(BxPC-3)に対して、DFX+GEM 併用は、そ

それぞれの単独投与と比較し、有意な細胞増殖抑制効果とアポトーシス誘導を認められた。

(8) 膵癌の DFX+ GEM 併用による in vivo: BxPC-3 による膵癌マウスモデルに対して DFX+GEM 併用は、それぞれの単独投与と比較し、体重減少等の合併症なく、有意な腫瘍抑制効果とアポトーシス誘導を認められた。

(9) DFX+GEM 併用の相乗効果の機序解析: BxPC-3 を用いた in vitro にて Ribonucleotide reductase (RR) subunit 1(RRM1)と RR subunit 2(RRM2)を解析したところ、DFX が RRM1 および RRM2 を抑制していた。すなわち、GEM 耐性に RR の up regulation が関与していることから、DFX+GEM 併用は、RR を制御することで、GEM 耐性をプロテクトし、相乗効果をもたらすことが示唆された。

(10) 膵癌に対する DFX の浸潤・転移に関する解析: 膵癌細胞株(BxPC-3, HPAF-II, Panc-1)にて浸潤および遊走能を解析し、DFX 投与が Cdc42, Rac1 発現を低下させることで浸潤および遊走能を低下させることを解明した。

(11) 鉄キレート剤 (DFO) による代謝変化に着目した抗がん療法の検討

DFO を HeLa 細胞に投与すると増殖抑制やミトコンドリア活性の低下が見られ、遺伝子発現パターンも細胞周期抑制やタンパク合成停止、ミトコンドリア活性低下、低酸素応答を示すパターンが示された。次に DFO 耐性株を作製し代謝産物や遺伝子発現の変化を評価したところ、耐性には増殖能低下、解糖系優位の代謝への変化、ヌクレオチド代謝の変化などが重要であることがわかった。そこでこれらの変化を抑制することで、DFO の抗がん作用が増強するか検討したところ、乳酸排泄抑制剤との併用が有効であった。

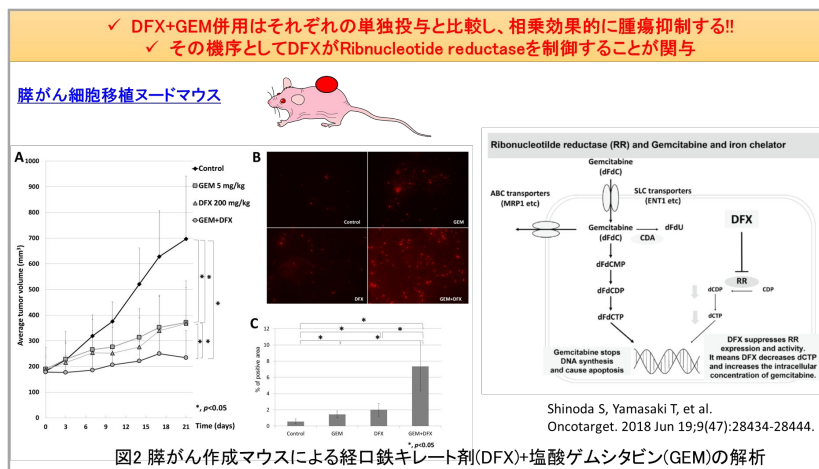


図2 膵がん作成マウスによる経口鉄キレート剤(DFX)+塩酸ゲムシタピン(GEM)の解析

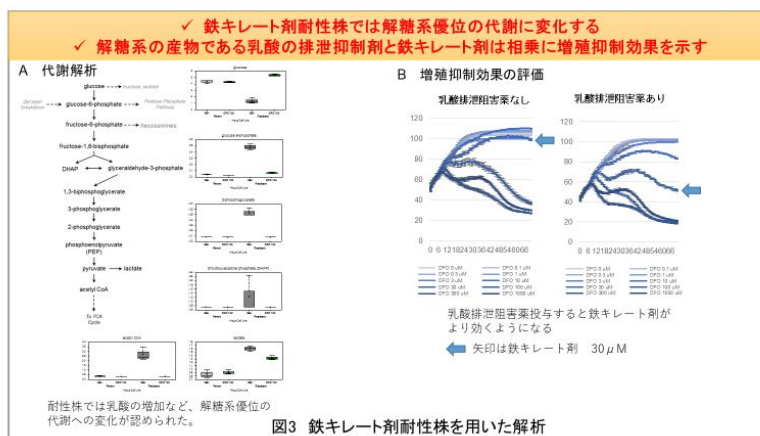


図3 鉄キレート剤耐性株を用いた解析

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計50件)

Saeki I, Yamasaki T, Maeda M, Hisanaga T, Iwamoto T, Fujisawa K, Matsumoto T, Hidaka I, Marumoto Y, Ishikawa T, Yamamoto N, Suehiro Y, Takami T, Sakaida I. Treatment strategies for advanced hepatocellular carcinoma: Sorafenib vs hepatic arterial infusion chemotherapy. World J Hepatol. 2018 Sep 27;10(9):571-584. doi: 10.4254/wjh.v10.i9.571. 査読有

Shinoda S, Kaino S, Amano S, Harima H, Matsumoto T, Fujisawa K, Takami T, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I. Deferasirox, an oral iron chelator, with gemcitabine synergistically inhibits pancreatic cancer cell growth in vitro and in vivo. Oncotarget. 2018 Jun 19;9(47):28434-28444. doi: 10.18632/oncotarget.25421. 査読有

Fujisawa K, Takami T, Okada S, Hara K, Matsumoto T, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I. Analysis of Metabolomic Changes in Mesenchymal Stem Cells on Treatment with Desferrioxamine as a Hypoxia Mimetic Compared with Hypoxic Conditions. Stem Cells. 2018 Aug;36(8):1226-1236. doi: 10.1002/stem.2826. 査読有

Saeki I, Yamasaki T, Maeda M, Hisanaga T, Iwamoto T, Matsumoto T, Hidaka I, Ishikawa T, Takami T, Sakaida I. Evaluation of the "assessment for continuous treatment with hepatic arterial infusion chemotherapy" scoring system in patients with advanced

hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 2018 Feb;48(3):E87-E97. doi: 10.1111/hepr.12932. 査読有

Saeki I, Yamamoto N, Yamasaki T, Takami T, Maeda M, Fujisawa K, Iwamoto T, Matsumoto T, Hidaka I, Ishikawa T, Uchida K, Tani K, Sakaida I. Effects of an oral iron chelator, deferasirox, on advanced hepatocellular carcinoma. World J Gastroenterol. 2016 Oct 28;22(40):8967-8977. 査読有

Takami T, Yamasaki T, Saeki I, Matsumoto T, Suehiro Y, Sakaida I. Supportive therapies for prevention of hepatocellular carcinoma recurrence and preservation of liver function. World J Gastroenterol. 2016 Aug 28;22(32):7252-63. doi: 10.3748/wjg.v22.i32.7252. 査読有

Harima H, Kaino S, Takami T, Shinoda S, Matsumoto T, Fujisawa K, Yamamoto N, Yamasaki T, Sakaida I. Deferasirox, a novel oral iron chelator, shows antiproliferative activity against pancreatic cancer in vitro and in vivo. BMC Cancer. 2016 Aug 31;16:702. doi: 10.1186/s12885-016-2744-9. 査読有

Yamamoto N, Yamasaki T, Takami T, Uchida K, Fujisawa K, Matsumoto T, Saeki I, Terai S, Sakaida I. Deferasirox, an oral iron chelator, prevents hepatocarcinogenesis and adverse effects of sorafenib. J Clin Biochem Nutr. 2016 May;58(3):202-9. doi: 10.3164/jcbrn.15-127. 査読有

〔学会発表〕(計 37 件)

佐伯一成, 山崎隆弘, 坂井田功. 肝癌診療におけるサルコペニア評価の問題点. 第 54 回日本肝臓学会総会. 2018 年

佐伯一成, 前田雅喜, 高見太郎, 山崎隆弘, 坂井田功. 体組成評価及び ACTH スコアによる進行肝癌治療アルゴリズム: 肝動注とソラフェニブ治療との棲み分け. 第 54 回日本肝臓学会. 2018 年

Saeki I, Yamasaki T, Maeda M, Takami T, Sakaida I. Impact of body composition in patients with advanced hepatocellular carcinoma: sorafenib versus hepatic arterial infusion chemotherapy. 12th ILCA Annual Conference. 2018 年

山崎隆弘. がん治療 up to date. 日本消化器病学会中国支部例会 第 26 回教育講演会. 2017 年

佐伯一成, 山崎隆弘, 坂井田功. 体組成評価及び ACTH スコアによる進行肝癌治療アルゴリズムの提唱. 第 42 回日本肝臓学会西部会. 2017 年

Yamasaki T, Saeki I, Maeda M, Takami T, Sakaida I. Multicenter study assessing complications of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma: An analysis of 10,855 patients between 2011 and 2015. 11th ILCA Annual Conference. 2017 年

Saeki I, Yamasaki T, Maeda M, Takami T, Sakaida I. Non-sarcopenia with high visceral fat area as a favorable prognostic factor in with advanced hepatocellular carcinoma treated with sorafenib. 11th ILCA Annual Conference. 2017 年

佐伯一成, 山崎隆弘, 坂井田功. 体組成評価は、進行肝癌に対する肝動注とソラフェニブ治療の棲み分けを可能とする. 第 21 回日本肝臓学会大会. 2017 年

Yamasaki T, Saeki I, Sakaida I. Iron chelator therapy for Hepatocellular Carcinoma. 第 15 回日本臨床腫瘍学会学術集会. 2017 年

Saeki I, Yamasaki T, Yamamoto N, Fujisawa K, Matsumoto T, Takami T, Sakaida I. Effects of iron chelator, deferasirox, on hepatocellular carcinoma in basic and clinical studies. 10th ILCA Annual Conference. 2016 年

Yamasaki T, Saeki I, Maeda M, Hisanaga T, Iwamoto T, Matsumoto T, Hidaka I, Ishikawa T, Takami T, Sakaida I. Evaluation of ACTH (Assessment of Continuous Treatment with Hepatic arterial infusion chemotherapy) score in patients with advanced hepatocellular carcinoma. 10th ILCA Annual Conference. 2016 年

篠田崇平, 高見太郎, 山崎隆弘, 坂井田功. 経口鉄キレート剤とゲムシタピン併用による新たな肝癌治療の基礎的検討. 第 75 回日本癌学会総会. 2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称: がんの診断用バイオマーカー

発明者: 末廣寛、山崎隆弘、星田朋美

権利者: 国立大学法人 山口大学

種類: 特願

番号: 2018-139564

出願年: 2018 年

国内外の別: 国内

取得状況（計1件）

名称：ソラフェニブの副作用低減剤
発明者：山本直樹、坂井田功、山崎隆弘
権利者：国立大学法人 山口大学
種類：特許
番号：第 6179904 号
取得年：2017 年 7 月 28 日
国内外の別： 国内

〔その他〕

ホームページ等
山口大学大学院医学系研究科 臨床検査・腫瘍学講座
<http://ds.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~jnaka/kouza>
山口大学大学院医学系研究科 消化器内科学
<https://www.ichinai-yamaguchi.jp/>

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤澤 浩一
ローマ字氏名：FUJISAWA, Koichi
所属研究機関名：山口大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：助教
研究者番号（8桁）：00448284

研究分担者氏名：高見 太郎
ローマ字氏名：TAKAMI, Taro
所属研究機関名：山口大学
部局名：大学院医学系研究科
職名：講師
研究者番号（8桁）：60511251

研究分担者氏名：佐伯 一成
ローマ字氏名：SAEKI, Issei
所属研究機関名：山口大学
部局名：医学部附属病院
職名：助教
研究者番号（8桁）：60634756

研究分担者氏名：山本 直樹
ローマ字氏名：YAMAMOTO, Naoki
所属研究機関名：山口大学
部局名：大学教育機構
職名：准教授
研究者番号（8桁）：90448283

(2)研究協力者

なし