

平成 30 年 6 月 6 日現在

機関番号：35303

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K19374

研究課題名(和文) 肝細胞癌に対するDPP4阻害剤の抗腫瘍効果とその分子機構

研究課題名(英文) The therapeutic role of DPP-4 inhibitor for the progression of Hepatocellular carcinoma

研究代表者

仁科 惣治 (Nishina, Sohji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70550961

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ヌードマウス肝癌細胞皮下移植腫瘍に対し、DPP4阻害剤は腫瘍内NK細胞浸潤を亢進させ有意に腫瘍増大を抑制したが、CXCR3中和抗体や抗アジアロGM1の併用によりその効果はキャンセルされた。また、DPP4阻害剤はCXCL10刺激によるNK細胞の腫瘍細胞への走化性を亢進させた。一方、Huh7細胞の培養上清にCXCL10を添加するとHuh7由来のDPP4活性によりCXCL10のジペプチド分解を認めしたが、DPP4阻害剤はこれを抑制した。したがって、肝癌由来のDPP4活性はCXCL10-CXCR3 axisを介したNK細胞走化性を阻害するが、DPP4阻害剤はこれを抑制し抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。

研究成果の概要(英文)：Anagliptin significantly suppressed the growth of nude mice xenograft tumors (HCC) in vivo. Anagliptin also induced NK cells infiltrations to necrotic lesion in tumor more vigorously. The reduction in growth of xenograft tumor by anagliptin was completely canceled by depleting NK cells with anti-CXCR3 antibody or anti-ASGM1. Anagliptin significantly enhanced the mobility of NK cells in the presence of CXCL10. CXCL10(1-77aa) is truncated at its N-terminus through DPP-4 activity and a N-terminal truncated CXCL10(3-77aa) acts as chemokine antagonist. We quantified the concentration of intact CXCL10 and truncated CXCL10. DPP4 inhibitors almost completely suppressed CXCL10 to be truncated, indicating that NK cell trafficking is enhanced through the prevention of CXCL10 from being truncated by DPP4 inhibitors. Thus, DPP-4 inhibitor suppressed HCC progression through activation of NK cell chemotaxis.

研究分野：肝臓

キーワード：肝細胞癌 DPP4阻害剤 CXCL10 NK細胞 走化性

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌 (HCC) は悪性腫瘍による死因の上位を占める疾患であるが、治療薬については唯一の分子標的薬 (ソラフェニブ) が認可されているのみである。加えて次世代の治療薬候補が存在しない。こうした状況において、既に臨床で使用されている薬剤の中から HCC に抗腫瘍効果を示す薬剤を見出し、その作用機序を明らかにすることは、新規薬剤の開発と比べて極めて短期間にかつ低コストに臨床応用可能な HCC 治療薬を開発し得る。

CD26 は免疫調節作用等の多様な機能を有した膜タンパクであるが、細胞外ペプチダーゼとしても作用し、Dipeptidyl peptidase-4 (DPP-4) とも言われている。CD26 は様々な癌細胞における発現が報告されており、CD26 蛋白の過剰発現は様々な悪性腫瘍の増殖・浸潤に影響を及ぼすことが指摘されている。しかし、HCC の進展に対する CD26 の影響については明らかにされていない。

そこで申請者らは、ヒト HCC 組織標本を用いて、HCC 進展と CD26 との関連性について検討した [H26~27 年度科学研究費補助金 {若手 (B)}]。その結果、CD26 高発現群は低発現群と比べ、中低分化度・stage 進行症例・被膜外浸潤症例が有意に多く、細胞増殖能 (MIB1-Labeling index) や血管新生 (CD34 陽性微小血管) が亢進していた。上記臨床データから、HCC 病態進展関連分子として CD26 を同定することにより、CD26 を標的とした肝発癌抑制目的の新たな治療戦略へと発展する可能性が期待された。

一方、HCC 患者は高頻度に糖尿病を合併する。DPP-4 阻害剤は臨床的に広く投与される糖尿病治療薬であるが、HCC に対して DPP-4 阻害剤が及ぼす影響は明らかではない。DPP-4 阻害剤が HCC の病態制御に有効であることが証明されれば、糖尿病患者に対する即戦力としての肝発癌抑制および HCC 治療に対する選択肢の一つとなることも期待できる。

## 2. 研究の目的

研究代表者らは、DPP-4 の多様な生物学的活性に焦点を当て、NK 細胞による抗腫瘍免疫等の観点から DPP-4 阻害剤の抗腫瘍機構を明らかにするとともに、抗腫瘍効果が真に DPP-4 活性の抑制に基づくものが否かを明らかにするべく基礎的検討を行った。

## 3. 研究の方法

A. 肝癌細胞 (Li7) 皮下移植ヌードマウスに対する DPP-4 阻害剤による抗腫瘍効果の検討

6 週齢 ヌードマウス (BALBc-nu/nu) に

対し肝癌細胞 (Li7) を皮下移植した。皮下腫瘍径が 100-150mm<sup>2</sup> となった時点で、MF 食 (control 群)、DPP-4 阻害薬添加 MF 食 (100mg/kg/day; 低用量群)、DPP-4 阻害薬添加 MF 食 (300mg/kg/day; 高用量群) を経口投与する 3 群に分類した。上記食餌投与開始 21 日後に sacrifice し以下の項目を比較した。a) 体重の推移、b) 食量の推移、c) 生化学所見、d) 腫瘍組織 CD26 蛋白発現 (Western Blotting)、e) 腫瘍体積の経時的推移。

B. DPP4 阻害剤による肝癌増殖抑制効果に対する、CXCR3 陽性 NK 細胞による抗腫瘍免疫の関与の検討

ヌードマウス肝癌細胞 (Huh7) 皮下移植モデルに対して抗 CXCR3 抗体もしくは抗アシアロ GM1 (NK depletion 処理) を投与し、DPP-4 阻害剤による抗腫瘍効果に CXCL10-CXCR3 axis 活性化を介した NK 細胞による抗腫瘍免疫が関与しているのかどうかを検討した。

C. DPP-4 活性抑制による、HCC 病態進展制御機序についての基礎的検討

) 【DPP-4 阻害剤が免疫細胞 (NK 細胞) の走化性に及ぼす影響の検討】

健常者より採取した末梢血を、MACS 磁気細胞分離法により CD56+NK 細胞に分離した。次に、リアルタイム細胞動態解析装置 (EZ-TAXIScan) を用い、走化性因子 CXCL-10 刺激による免疫細胞 (CD56+NK 細胞) の肝癌細胞への走化性に対して DPP-4 阻害薬が及ぼす影響を検討した。

また、DPP-4 阻害剤が細胞走化性に及ぼす影響における CXCL-10 の関与を明らかにするため、CXCL-10 中和抗体を投与した。具体的には、マイクロチャンバー (深さ 4 μm) の一端に CD56+NK 細胞を apply した。次にマイクロチャンバーの他端に CXCL-10 を含む肝癌細胞 (Huh7 細胞) と、DPP-4 阻害剤、CXCL-10 中和抗体を下記 ~ のアームの如く種々の組合せで混合し 2 時間 pre-incubate させたものを apply した。

Huh7 細胞培地のみ、Huh7 細胞培地 + CXCL-10、Huh7 細胞培地 + CXCL10 + CXCL-10 中和抗体、Huh7 細胞培地 + DPP-4 阻害薬、Huh7 細胞培地 + DPP-4 阻害薬 + CXCL-10、Huh7 細胞培地 + DPP-4 阻害薬 + CXCL-10 + CXCL-10 中和抗体

) 【DPP-4 阻害剤による CXCL-10 分解阻害効果の検討】

上記 ) の実験結果で示された「DPP-4 阻害剤の NK 細胞走化性亢進作用」において、実際

に肝癌細胞(Huh7)培養上清由来の DPP-4 活性により CXCL-10 のジペプチド分解が生じ、それに対し DPP-4 阻害剤が CXCL-10 のジペプチド分解を抑制しているのか否かの疑問が生じた。

一方、CXCL10(1-77aa) は CXCR3 に結合して NK 細胞走化性を促進するが、DPP4 活性により N 末端の 2 アミノ酸が切断され不活性化型の truncated CXCL10(3-77aa) となる。そこで、Full-length CXCL-10 (N 末端 ; Val) と short-form CXCL-10 (N 末端 ; Lau) の N 末端の 1 アミノ酸の違いに注目し、以下の行程で実験を行った。

； Huh7 細胞培地に DPP-4 阻害剤投与を添加し (コントロールとして無添加群も) incubate。； 得られた培地を一部回収し、CXCL-10 抗体を用いた免疫沈降操作後 SDS-PAGE にて total CXCL-10 peptide を分離し抽出。； 得られた CXCL-10 の N 末端に HPLC 検出用ラベル標識 (PITC) をし、Edman 分解 にて N 末端の 1 アミノ酸のみ分離。； HPLC(高速液体クロマトグラフィー) にて上記 2 種類のペプチドを定量した。

#### 4 . 研究成果

A . 肝癌細胞(Li7)皮下移植ヌードマウスに対する DPP-4 阻害剤による抗腫瘍効果の検討

MF 食(control 群)、 DPP-4 阻害薬添加 MF 食(100mg/kg/day; 低用量群)、 DPP-4 阻害薬添加 MF 食(300mg/kg/day; 高用量群)の 3 群間において、体重推移、食事量推移、血液生化学的特徴(空腹時血糖、空腹時インスリン濃度、TG、T-cho、LDL-cho)すべての項目で有意差を認めなかった。

また、皮下腫瘍組織中の CD26/DPP-4 蛋白発現 (Western Blotting) においても上記 3 群間では有意差を認めなかった。

皮下腫瘍の肉眼的観察において、DPP-4 阻害剤の投与は、移植された肝癌細胞の腫瘍体積を有意に減少させた。具体的には、Control 群と比べ DPP-4 阻害剤投与群において、投与量に依存した腫瘍体積減少作用が認められた。さらには、DPP-4 阻害剤の投与により、腫瘍組織への NK 細胞浸潤亢進効果を認めた。

B. DPP4 阻害剤による肝癌増殖抑制効果に対する、CXCR3 陽性 NK 細胞による抗腫瘍免疫の関与の検討

ヌードマウス肝癌細胞 (Huh7) 皮下移植モデルにおいて DPP-4 阻害剤が濃度依存性に認められた抗腫瘍効果に対して、CXCR3(活性化 NK 細胞受容体) 中和抗体や抗アジアロ GM1(NK depletion 処理)を併用投与することにより、DPP-4 阻害剤により認められた腫瘍増大抑制効果

はキャンセルされた。

C . DPP-4 活性抑制による、HCC 病態進展制御機序についての基礎的検討

)【DPP-4 阻害剤が免疫細胞 (NK 細胞)の走化性に及ぼす影響の検討】

DPP4 阻害剤は CXCL10 刺激による NK 細胞の腫瘍細胞への走化性を亢進させたが、この効果は CXCL10 中和抗体によりキャンセルされた。したがって、DPP4 阻害剤は肝癌細胞由来の DPP4 活性による CXCL10 不活化を抑制することで NK 細胞走化性を亢進させると考えられた。

)【DPP-4 阻害剤による CXCL-10 分解阻害効果の検討】

Huh7 の培養上清に CXCL10 を添加すると Huh7 由来の DPP4 活性により truncated CXCL10 への分解を認めたが、DPP4 阻害剤はこの CXCL10 のジペプチド分解を抑制した。この抑制効果の IC50 は  $3.7 \pm 1.9$  nM で、ヒトにおける anagliptin の IC50 に近似していた。

今回の検討における結論として、DPP4 阻害剤は in vivo において抗腫瘍効果を認めた。この作用機序として、DPP4 活性は CXCL10-CXCR3 axis を介した NK 細胞走化性を阻害するが、DPP4 阻害剤はこの作用を抑制することで抗腫瘍効果を発揮すると考えられた。

#### 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 8 件)

1. Sohji Nishina、DPP-4 inhibitor, anagliptin suppress the progression of Hepatocellular carcinoma, AASLD The Liver Meeting 2017、2017 年 10 月 23 日、サンフランシスコ(アメリカ)

2. 仁科惣治、DPP4 阻害剤の NK 細胞走化性促進作用を介した肝細胞癌進展抑制効果の基礎的検討、第 21 回日本肝臓学会大会(JDDW 2017)、2017 年 10 月 13 日、福岡国際会議場(福岡)

3. 仁科惣治、肝細胞癌に対する DPP4 阻害

剤の抗腫瘍効果についての基礎的検討、第 53 回日本肝臓学会総会、2017 年 6 月 8 日、リーガロイヤルホテル広島(広島)

4. 仁科惣治、糖尿病合併高齢肝細胞癌に対する抗腫瘍治療選択としての DPP4 阻害剤の基礎的検討、第 103 回日本消化器病学会総会、2017 年 4 月 22 日、京王プラザホテル(東京)

5. Sohji Nishina、DPP-4 inhibitor suppresses the progression of hepatocellular carcinoma through activation of chemotaxis of NK cells in mice、The Asian Pacific Association for Study of the Liver (APASL) Single Topic Conference 2017(国際学会)、2017 年 4 月 10 日、ホテルオークラ JR ハウステンボス(長崎)

6. 仁科惣治、肝細胞癌進展抑制における DPP4 阻害薬の分子学的機序、第 20 回日本肝臓学会大会(JDDW 2016)、2016 年 11 月 4 日、神戸コンベンションセンター (神戸)

7. Sohji Nishina、The therapeutic role of DPP-4 inhibitor for the progression of Hepatocellular carcinoma、AASLD The Liver Meeting 2016、2016 年 11 月 11 日、ボストン (アメリカ)

8. 仁科惣治、肝細胞癌に対する DPP4 阻害剤の抗腫瘍効果とその分子機構、第 52 回日本肝臓学会総会、2016 年 5 月 9 日、ホテルニューオータニ幕張(東京)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1 件)

名称：肝細胞癌の予防又は治療のための医薬

発明者：仁科惣治、日野啓輔、後藤守兄

権利者：同上

種類：特許願

番号：特願 2015-09736

出願年月日：平成 27 年 4 月 27 日

国内外の別：国内

取得状況(計 0 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

仁科 惣治(Nishina Sohji)

川崎医科大学・医学部・講師

研究者番号：70550961

(2)研究分担者

( )

研究者番号：

(3)連携研究者

( )

研究者番号：