

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：20101

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2017～2019

課題番号：17K09433

研究課題名（和文）ソラフェニブ治療抵抗性肝細胞癌におけるHIF1- の役割

研究課題名（英文）The role of HIF1 alfa in sorafenib resistant hepatocellular carcinoma

研究代表者

阿久津 典之（Akutsu, Noriyuki）

札幌医科大学・医学部・助教

研究者番号：50531191

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）：肝細胞癌のソラフェニブ治療耐性は、HIF-1 がPD-L1発現を亢進させることが一因と仮定した。コバルト添加や、低酸素チャンバーで肝癌細胞株を培養し対象群と比較。HIF1 が発現亢進するがPD-L1はRT-PCRおよびウエスタンブロット法いずれでも発現亢進しなかった。HIF-1 を強制的に発現させPD-L1の変化を検討したがタンパク発現は変化しなかった。肝細胞癌株にIFN を添加し培養するとPD-L1の発現亢進を認め、コバルト添加でさらに発現が亢進することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

IFN を添加することでPD-L1の発現が亢進され、さらに低酸素状態でPD-L1発現が増強する結果から、低酸素が何らかの間接的な影響でIFN を産生し、肝細胞癌株に対してPD-L1の発現を亢進し、腫瘍免疫回避に働いている可能性が考えられた。今後、間接的な作用についてさらなる研究を進めていきたいと考えている。

研究成果の概要（英文）：We hypothesized that the resistance of sorafenib treatment in hepatocellular carcinoma occurs by increasing PD-L1 expression that is directly enhanced by HIF1 . We cultured hepatocellular carcinoma cell lines using cobalt addition or a hypoxic chamber, and compared with control cell lines cultured under normoxia. HIF1 was upregulated in the culture with cobalt and hypoxia chamber. However, PD-L1 expression was not enhanced by either RT-PCR or Western blotting. PD-L1 expression was enhanced by adding IFN to hepatocellular carcinoma cell lines and was further enhanced by the addition of cobalt.

研究分野：肝

キーワード：肝細胞癌

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

切除不能肝細胞癌に対しては、ソラフェニブが大規模臨床比較試験で延命効果を示し、標準治療となっている。ソラフェニブは B-RAF、C-kit、VEGFR1-3、PDGFR および FGFR への阻害活性を有する多目的キナーゼ阻害薬である。ソラフェニブの HCC に対する作用機序は、血管新生抑制と腫瘍細胞増殖抑制とされている。

申請者は、進行肝細胞癌患者に対するソラフェニブ投与後の 2 週間以内の高血圧発症が、早期治療効果予測となる臨床関連因子であることをいち早く見出した。一般に、血管内皮細胞に VEGF の刺激が加わると、PI3K の活性化により、PIP2 から PIP3 が産生される。PIP3 は細胞質の Akt を細胞膜ヘリクルートし、そこで PDK1 によってリン酸化を受け、活性化された Akt は、さらなるリン酸化により eNOS を活性化して、NO を産生させ血管拡張を引き起こす。ソラフェニブ投与はこの経路を抑制することによって、投与後の血圧上昇に関わっていると考えられる。すなわち、投与後の高血圧発症 (VEGF の制御) が、肝局所における血管新生抑制をきたし治療効果につながるものと考えられている。しかしながら、ソラフェニブ投与後高血圧を発症するすべての HCC 患者で治療効果が認められるわけではなく、逆に増悪する症例も存在する。加えて、ソラフェニブ投与開始後の効果減弱に関する明らかな機序は未だに解明されてはいない。

### 2. 研究の目的

我々の臨床研究結果から、ソラフェニブによる VEGF の制御が、本薬剤自体に対する治療抵抗性に関与しているのではないかと考えた。そこで、次に注目したのは、肝細胞癌の予後悪化因子の 1 つである Hypoxia-inducible factor (HIF) 1- $\alpha$  である。ソラフェニブの抗 VEGF 抑制作用が肝組織における低酸素状態を誘導し、HIF1- $\alpha$  発現誘導につながるものが予測されている。HIF1- $\alpha$  は、VEGF や NOS の転写因子として作用する。従って、ソラフェニブ投与が HIF1- $\alpha$  の肝局所発現が誘導し、VEGF の転写が亢進することでソラフェニブの効果が減弱するという機序が推測される。さらに、HIF-1 $\alpha$  は、骨髄由来免疫抑制細胞を用いた研究において臓器局所の PD-L1 発現を亢進させることが報告されている。PD-1/PD-L1 チェックポイント・シグナル伝達は腫瘍免疫に対する腫瘍細胞の抵抗性に強く関与していることから、ソラフェニブ投与が HIF1- $\alpha$  の肝局所発現の誘導し PD-L1 の局所発現増強することで T 細胞不活性化が誘導される。これらのことから、ソラフェニブの治療開始後、HIF-1 $\alpha$  の発現低下状態では、抗腫瘍効果が持続する。ソラフェニブ投与に伴う HIF-1 発現増強が生じた場合、PD-L1 発現増強による抗腫瘍効果の減弱が生じる可能性を考えた。申請者は上記の仮説を証明するために、臨床検体ならびに腫瘍移植マウスモデルを用いて研究を遂行することとした。

### 3. 研究の方法

1) 複数の肝がん細胞株を用いて、HIF-1 の発現および PD-L1 の発現を RT-PCR 法にて検討。

2) 低酸素状態における HIF-1 および PD-L1 の関連

擬似低酸素状態を誘導するコバルトを、肝がん細胞株に 100 $\mu$ M および 500 $\mu$ M で添加して 24 時間培養。何も添加していない肝がん細胞株と比較して HIF-1 と PD-L1 の発現の変化を RT-PCR およびウエスタンブロット法で検討。

肝がん細胞株 HuH7 と HLF に 500 $\mu$ M のコバルトを添加して 24 時間、48 時間、72 時間培養後に、HIF-1 と PD-L1 の発現を RT-PCR およびウエスタンブロット法で検討。

低酸素チャンバーを用いて、HuH7 と HLF を 24 時間、48 時間、72 時間培養。正常酸素下で培養したものと比較、HIF-1 と PD-L1 の発現の違いを RT-PCR およびウエスタンブロット法で検討。

HIF-1 を強制的に発現させ PD-L1 の変化を検討。

サイトカインを介した間接的な影響を検討。

### 4. 研究成果

1) 肝がん細胞株における HIF-1 および PD-L1 の発現

複数の肝がん細胞株を用いて、HIF-1 の発現および PD-L1 の発現を RT-PCR 法にて検討したところ、HIF-1 は HuH7 や HLF で発現が高く、PD-L1 は HLF、HLE、PLC/PRF/5 で発現が高かった。

2) 低酸素状態における HIF-1 および PD-L1 の発現

擬似低酸素状態を誘導するための試薬であるコバルトを、肝がん細胞株に 100 $\mu$ M および 500 $\mu$ M で添加して 24 時間培養し、何も添加していない肝がん細胞株と比較して HIF-1 と PD-L1 の発現が変化するかどうかを、RT-PCR およびウエスタンブロット法で検討した。コバルトを 500 $\mu$ M 加えた場合に HuH7 および HLF で HIF-1 の発現亢進を認めた。しかし PD-L1 は RT-PCR およびウエスタンブロット法いずれにおいても差を認めなかった。次に培養時間の経時的変化を明らかにすることを目的に、肝がん細胞株 HuH7 と HLF に 500 $\mu$ M のコバルトを添加して 24 時間、48 時間、72 時間培養後に、HIF-1 と PD-L1 の発現を RT-PCR およびウエスタンブロット法で検討したところ、HIF-1 は経時的に発現亢進を認めたが、PD-L1 は経時的にみても変化は認めなかった。

次にコバルトではなく実際に低酸素チャンバーを用いて、24 時間、48 時間、72 時間培養した HuH7 と HLF と、正常酸素下で培養したそれらとにおける HIF-1 と PD-L1 の発現を、RT-PCR およびウエスタンブロット法で比較検討した。いずれの細胞株でも HIF-1 は経時的に発現亢進し、低酸素下ではさらに発現亢進が認められた。しかしながら PD-L1 は低酸素チャンバーを用いても培養時間を増やしても発現に差を認めなかった。

次に HIF-1 の発現が PD-L1 の発現に直接的な影響を与えているか否かの検討を行うため、HIF-1 を強制的に発現させ PD-L1 の変化を検討した。野生型および ODD domain の Proline を

Alanine に置換した変異型の二つのプラスミドを作成し、複数の肝がん細胞株に transfection を試みた。しかし、transfection 効率が悪く様々な工夫を行ってみたが、肝がん細胞株での強制発現系の実験系の確立ができなかった。そこで 293T 細胞に対して 2 種類の HIF-1 強制発現プラスミドを transfection し、PD-L1 の発現をウエスタンブロット法にて検討した。HIF-1 野生型、変異型いずれも強制発現を確認できたが、想定した PD-L1 のタンパク発現は変化を認めなかった。以上の結果から肝細胞癌において HIF-1 が直接 PD-L1 の発現に影響する可能性は低いと考えた。

次にサイトカインを介した間接的な影響を検討することとし、PD-L1 の発現を亢進すると報告されている IFN に注目し検討を行うこととした。まず、HuH7、HLF、Hep3B に IFN 20ng/ml を添加し 24 時間培養したところ、RT-PCR およびウエスタンブロット法で PD-L1 の発現亢進を認めた。次にコバルトを添加し同様の検討を行ったところ、コバルト添加しない場合に比較して PD-L1 発現が亢進されることが分かった。レセプター発現の変化を検討するため通常酸素下と低酸素チャンバー下で HuH7 および HLF を 24 時間培養し、RT-PCR にて IFN レセプター1 および IFN レセプター2 の発現を検討した。すると、いずれの細胞株においても低酸素下で IFN レセプター1 発現が亢進し、レセプター2 が発現低下していた。48 時間、72 時間と培養時間を増やしてさらに検討したところ、レセプター1 は時間依存性に発現が亢進し、レセプター2 は時間依存性に低下を認めた。以上より、低酸素が肝がん細胞株において IFN レセプター1 の発現亢進に関わることが判明した。

以上より、IFN を添加することで PD-L1 の発現が亢進され、さらに低酸素状態で IFN レセプター1 発現が亢進し、さらに PD-L1 発現が増強する結果から、低酸素が肝細胞癌の IFN- レセプター発現を亢進させることで IFN シグナル伝達が増強し、肝細胞癌株の PD-L1 発現が亢進して、腫瘍免疫回避に働いている可能性が考えられた。HIF1 は間接的に PD-L1 の発現亢進に作用していると考ええる。今後、その他の間接的な作用についてさらなる研究を進めていきたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----