

令和 2 年 6 月 4 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K10430

研究課題名(和文) 肝細胞癌の低酸素応答特性に基づいたTACE/Metformin併用療法の有用性

研究課題名(英文) The usefulness of the combination of metformin with TACE based on hypoxia response characteristics of hepatocellular carcinoma

研究代表者

佐藤 まり子 (Sato, Mariko)

弘前大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：30645263

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：肝癌細胞株HepG2を用い、シスプラチン(CDDP)の抗腫瘍効果に対する低酸素の影響をアポトーシス解析によって評価したところ、低酸素(1% O₂)細胞ではCDDP抵抗性が認められた。CDDPとメトホルミン 1 mMの併用により、通常酸素(21% O₂)細胞ではCDDP単独と比較してアポトーシス細胞の割合の変化がなかったが、低酸素細胞ではアポトーシス細胞の割合を有意に増加させた。

本研究では、低容量メトホルミンが低酸素HepG2細胞におけるCDDPの抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。低容量メトホルミンがTACEの局所効果向上につながる可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する肝動脈化学塞栓療法(TACE)は肝機能や肝内血管開存性を温存できるという利点を有し、生存率を有意に延長するが、再発は8割にも昇る。TACEによる抗腫瘍効果を高める目的で、腫瘍増殖抑制作用や化学療法および放射線治療の増感作用が報告されているメトホルミンに着目した。

肝癌細胞株HepG2を用いたアポトーシス解析の結果、低酸素(1% O₂)細胞ではシスプラチン抵抗性が認められたが、低容量メトホルミンをシスプラチンに併用することで、低酸素細胞におけるシスプラチンの抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。低容量メトホルミンがTACEの局所効果向上につながる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We investigated the impact of hypoxia on cytotoxic effect of cisplatin (CDDP) using apoptosis analysis. In hypoxic (1% O₂) cells, the resistance to CDDP was observed. And, the combination of CDDP and 1 mM metformin increased the apoptotic cells compared to treatment with CDDP alone in hypoxic cells. However, CDDP combined with metformin did not affect apoptosis in normoxic cells.

In this study, we have shown that a low concentration of metformin attenuates hypoxia-induced resistance to CDDP in liver cancer HepG2 cells. Thus, low-dose metformin has high potential to enhance the therapeutic effect of CDDP in hepatoblastoma and to improve the prognosis of patients.

研究分野：放射線腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 治療抵抗性 低酸素 シスプラチン メトホルミン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(HCC)に対する肝動脈化学塞栓療法 Transarterial Chemoembolization (TACE)は、肝機能や肝内血管開存性を温存できるという利点を有し、生存率を有意に延長する。しかしTACE後再発は8割に昇り、再発様式は実にその半数以上が局所再発、かつ治療後12か月以内の早期に出現するものが大半を占める(Dig. Dis. Sci. 2013)。故にTACE後の局所再発を防ぐ方策こそが、必然的にHCC患者の長期生存率向上に貢献することは想像に難くない。

TACE後の局所再発にはTACE誘発性の低酸素環境に起因する癌幹細胞の誘導が関与する。TACEの塞栓手技中に生じる急性の低酸素に対し、HCCの腫瘍細胞はその特異な性質のため抗アポトーシスタンパク質 Mcl-1 の発現や Bax/Bcl-2 の減少に伴うアポトーシス抵抗性の獲得を介して急速に治療抵抗性となる(J. Biol. Chem. 2005, Oncogene 2000)。そして最終的な塞栓終了後には血流遮断によって腫瘍組織内のシビアな慢性的低酸素状態により局所再発の主要原因となる癌幹細胞(CSC)が誘導されることが我々の先行研究より明らかになっている(ASTRO Annual meeting, 2015)。

近年分子標的治療薬の開発検討がされてきたがTACEのkey drugは依然 Cisplatin (CDDP)であり、これに代わるkey drugは十数年余見出されていない。このためCDDPの増感薬剤の検討を含めたTACE治療効果の増強改善手段の検討が求められているのが現状である。

今回我々は、ビッグナイド系糖尿病薬であるMetforminに着目した。MetforminはCSC指向性にPI3K/Akt/mTOR経路の活性を阻害する他、ミトコンドリア膜でのATP産生阻害と電子伝達系阻害によるROS過剰産生を介して腫瘍増殖抑制作用や化学療法および放射線治療の増感を達成することがin vitroおよびin vivoの研究で明らかとなってきた(J Clin. Oncol. 2009, Cancer Res. 2009, Sci. Rep. 2012)が、生体においては有効濃度で乳酸アシドーシス等の重篤な代謝関連有害事象を容易に生じることが大きな問題として残存し、癌治療の領域においてははまだ臨床応用に至っていない。しかしTACEにおけるマイクロカテーテルを用いた腫瘍栄養血管への選択的動注療法を併用しさえすれば、正常肝細胞への障害をスペアし重篤な有害事象を回避しつつ腫瘍細胞に有効な濃度を局所的に作用させることができ、TACE/Metformin併用療法は現実的な治療法になる。

またTACEのkey drugであるCDDPは腫瘍細胞に対し直接的なDNA損傷を生じるだけでなくミトコンドリア膜傷害を起点とする膜電位変化と活性酸素ROSの発生を通じ、相乗的に細胞致死効果を発現する。Metforminによるミトコンドリア電子伝達系阻害に起因するROS産生はシビアな低酸素状態でさらに増強されるため(J Bioenerg Biomembr. 2006)、TACEの塞栓手技とともにMetforminを併用することで二重三重にROS産生を増強させることが可能となり、相乗的に腫瘍致死作用を高めることが期待できる。

2. 研究の目的

本研究の目的は「TACEとともにMetforminを併用することでCDDPの抗腫瘍効果を高め、TACE後の局所再発を抑制することが可能であることを明らかにする」ことである。TACEによって正常肝細胞への障害をスペアし重篤な代謝関連有害事象を回避しつつCDDPとMetforminの両者を有効濃度で腫瘍細胞に到達させ、それぞれの相乗効果により強力に抗腫瘍効果を高めることで局所再発を抑制し、HCC患者の長期生存を達成することを目指す。

3. 研究の方法

実験にはヒト肝癌細胞株HepG2を用いた。まず、HepG2細胞の増殖能に対する低酸素の影響をトリパンブルー色素排除試験で評価した。細胞を24well plateへ播種して通常酸素(21% O₂)下で培養し、12、24、36、48時間にTC20™を用いて細胞数を計測した。低酸素チャンバーにより低酸素(1% O₂)下で培養した細胞についても同様にトリパンブルー色素排除試験を行い、通常酸素細胞と比較した。さらに、通常酸素または低酸素下で24時間培養後、PI染色し、フローサイトメトリーにて細胞周期解析を行った。CDDPの細胞毒性評価には、CDDPを0、1、5、10、25 μMの濃度でそれぞれ培地に投与し、通常酸素または低酸素下で培養した細胞を用いて、トリパンブルー色素排除試験を行った。また、メトホルミンの細胞毒性評価目的に、0、0.5、1、2、5 mMのメトホルミンを培地へ投与して同様の実験を行った。

次に、CDDPの抗腫瘍効果に対する低酸素の影響をアポトーシス解析にて評価した。通常酸素または低酸素下で12時間培養したあと、CDDPを0、1、5 μMでそれぞれ培地に投与して24時間または48時間培養した。細胞を回収してAnnexin Vと7-AADで染色し、フローサイトメトリーでアポトーシス細胞の割合を測定した。また、CDDPのアポトーシス誘導に対するメトホルミンの影響を評価するため、CDDPに加えて1 mMメトホルミンも投与して培養した細胞でアポトーシス解析を行った。

メトホルミンの抗腫瘍効果発現における作用機序解明のため、ウェスタンブロット法にてHIF-1α、Akt、mTOR、AMPKなどのタンパク質発現を評価した。さらに、HIF-1αの関与を評価する目的で、siRNAにてHIF-1αをノックダウンした細胞を用い、CDDPとメトホルミンを投与してトリパンブルー色素排除試験を行った。

4. 研究成果

トリパンブルー色素排除試験の結果、HepG2細胞は通常酸素下の培養では時間に依存して生細

胞数が増加したが、低酸素下では 12 時間までは正常酸素下と同等であるものの、24、48 時間でも 12 時間時点とほぼ同等の細胞数にとどまった。細胞周期解析では、24 時間低酸素下で培養した細胞において G1 期細胞の割合が増加していた。また、S 期、G2/M 期細胞の割合は通常酸素細胞と比較して有意に減少しており、低酸素暴露による G1 アレストを認めた。

CDDP の細胞毒性をトリパブルー色素排除試験で評価したところ、通常酸素細胞と比較して低酸素細胞では毒性が减弱され、5 μM 以上で有意差を認めた。通常酸素細胞を用いたアポトーシス解析では CDDP 濃度に依存してアポトーシス細胞の有意な増加を認めたが、低酸素細胞ではこのような CDDP の濃度による抗腫瘍効果の増強は認められなかった。通常酸素細胞では、CDDP 投与後 24 時間で 5 μM CDDP によるアポトーシス細胞の割合の増加がみられ、48 時間時点では 1 および 5 μM で有意な増加を認めた。一方低酸素細胞では、CDDP 投与後 24 時間において 5 μM CDDP によるアポトーシス細胞が増加したが、48 時間ではアポトーシス細胞の誘導を認めなかった。

メトホルミンは通常酸素、低酸素細胞のいずれにおいても、5 mM で生細胞数を有意に抑制した。したがって、以降の実験には細胞毒性を示さない 1 mM メトホルミンを用いた。アポトーシス解析の結果、低酸素細胞では CDDP 単独投与と比べて、CDDP とメトホルミンの併用によりアポトーシス誘導作用が増強された (図 1)。言い換えると、低酸素細胞における CDDP 抵抗性がメトホルミンにより减弱した。通常酸素細胞では、メトホルミンのこのような作用は認められなかった (図 2)。

メトホルミンにより HIF-1 α 発現は减弱し、また、Akt および mTOR のリン酸化が抑制された。HIF-1 α ノックダウン細胞と対照細胞で、CDDP 単剤群とメトホルミン併用群での生細胞数に有意な変化はみられなかったが、HIF-1 α ノックダウン細胞では対照細胞と比較してメトホルミンによる変調が乏しい印象であった。

今回、低容量メトホルミンが低酸素 HepG2 細胞における CDDP の抗腫瘍効果を増強することが明らかとなった。低容量メトホルミンが TACE の局所効果向上につながる可能性がある。

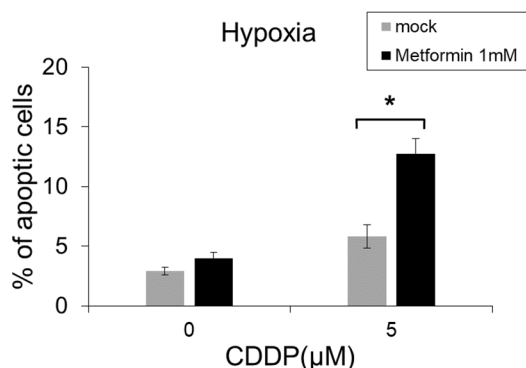


図 1 低酸素細胞におけるアポトーシス細胞の割合

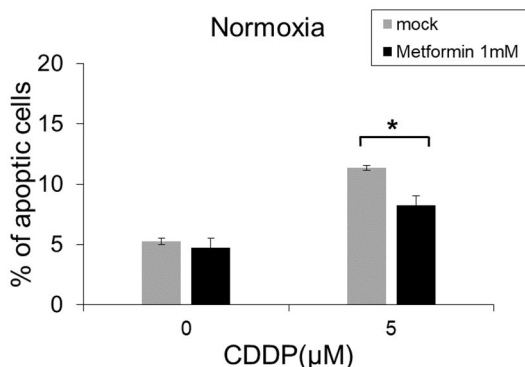


図 2 通常酸素細胞におけるアポトーシス細胞の割合

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 1件）

1. 著者名 Fujita Hiromasa, Hirose Katsumi, Sato Mariko, Fujioka Ichitaro, Fujita Tamaki, Aoki Masahiko, Takai Yoshihiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Metformin attenuates hypoxia-induced resistance to cisplatin in the HepG2 cell line	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Oncology Letters	6. 最初と最後の頁 2431-2440
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） https://doi.org/10.3892/ol.2018.9869	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔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
研究分担者	廣瀬 勝己 (Hirose Katsumi) (60623767)	一般財団法人脳神経疾患研究所・南東北BNCT研究センター・診療所長 (81603)	