

令和元年5月29日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15478

研究課題名(和文) In silico肝内転移予測評価モデルの確立と創薬研究への応用

研究課題名(英文) Construction of the model for the prospective evaluation of intrahepatic metastasis in silico and its application for the drug discovery.

研究代表者

稲垣 善則 (Inagaki, Yoshinori)

東京大学・医学部附属病院・助教

研究者番号：40733390

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)：肝内転移評価モデルの構築は、肝細胞癌の治療法の開発において有効である。本研究では、肝内転移を評価するためのin vivoモデルを確立し、それに基づいたin silico予測評価モデルの構築を行った。その結果、肝細胞癌細胞をマウスの脾臓に移植し、肝転移を成立させるin vivoモデルを確立した。肝細胞癌細胞の移動と転移に関するデータを蓄積させたin silicoシステムによる評価は、in vitro実験で得られた細胞移動のデータと相関する結果を示したが、ばらつきが大きく正確な定量的予測を可能とするには至らなかった。当該システムの評価精度の向上には、多種のデータの蓄積が必要であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究で構築したin vivo肝内転移モデルは、肝細胞癌細胞の転移を評価するのに有効であり、開発が立ち遅れている肝細胞癌に対する抗癌剤を開発する創薬研究などにおいて有用であると考えられる。また、肝細胞癌の肝内転移に関する分子メカニズムの解明はまだ不十分であり、本モデルは肝細胞癌細胞の転移に重要な分子種の解明に貢献できると考えられる。

研究成果の概要(英文)：The construction of the model for the evaluation of intrahepatic metastasis is effective for the development of therapeutic method for hepatocellular carcinoma (HCC). The present study aimed to establish the in vivo and the in silico predictive model of evaluating the intrahepatic metastasis. As results, the mouse model of metastasis that shows metastatic foci in the liver by transplanting HCC cells into the spleen was established. In addition, the in vitro cell migration assay was also performed, and the data from those in vitro assay and in vivo model was accumulated in the in silico system. The predictive evaluation of cell migration and metastasis by the in silico system was correlated with those experimental data. However, the quantitative capability of the present in silico system was low because of the large variations in the experimental data. Accumulation of more experimental data is necessary for the accuracy enhancement of the in silico system.

研究分野：腫瘍学

キーワード：肝細胞癌 肝内転移 化学療法

1. 研究開始当初の背景

癌による死亡率が上昇し続けている現在の日本において、肝胆膵領域の臓器における癌の患者、なかでも肝細胞癌患者の増加が深刻化している。近年の外科的切除術の進歩によって、切除適応の肝細胞癌症例の予後は肝胆膵外科領域における他の癌疾患と比較して良好だが、切除適応外となった症例に関しては依然として予後が悪い。さらに、切除などの根治的治療が行われた患者においては、肝細胞癌の再発が非常に高頻度に発生している。そのため、切除適応外の症例に対する治療や根治術後の補助療法として化学療法が有効となるが、DNA 合成阻害剤のような従来の抗癌剤は副作用が問題となっているほか、それが軽減される分子標的治療薬は肝細胞癌治療においては開発が遅れている。以上のことから、肝細胞癌に対する有効な化学療法の構築が至急の課題となっている。肝癌診療ガイドラインによると、肝細胞癌患者の術後の経過を左右する予後因子として腫瘍数のほか、脈管浸潤が挙げられている。従って、肝細胞癌の化学療法では、腫瘍の増殖抑制のほか、脈管浸潤やそれに伴う肝内転移の抑制を視野に入れた分子標的治療薬の開発が非常に有効であるといえる。

申請者は、浸潤や転移に着目した肝細胞癌に対する分子標的薬の開発を目的として、中国・山東大学との協力によって日中間で構築された共同研究体制に属して研究を展開してきた。当該共同研究体制により設立された山東大学中日新薬スクリーニングセンターの協力の下、天然薬物及びその活性成分誘導体(新規合成化合物)について肝細胞癌に対する抗癌効果を評価し、天然薬物である Cinobufacini、Aminopeptidase を標的とした新規合成化合物が肝細胞癌の増殖や浸潤を抑制することを見出した[1,2]。当該研究における *in vivo* 試験では、肝細胞癌細胞のマウス皮下移植モデルを用いた腫瘍の生育抑制効果の解析を実施した。前述の通り、肝細胞癌の予後決定因子として重要な脈管浸潤及び肝内転移の阻害効果を *in vivo* 試験で評価するために脾臓移植モデルなどの確立を試みたが、肝不全や脾梗塞が発症して個体に対して重篤な副作用が生じてしまうため、肝細胞癌細胞による動物モデルでの安定的な転移の誘導には至っていない。

近年、動物愛護の重要性から高等動物を用いた *in vivo* 試験を可能な限り削減し、高等動物を使用しない方法での評価が求められる。過去の研究では、初代培養を必要とする正常肝細胞を用いた化合物の毒性試験を回避する方法として、分裂期の状態と静止期の状態を人工的に作出できる肺線維芽細胞を用いた評価法を確立した。本法は、大部分が静止期の状態にある生体の正常細胞に対する毒性評価の代替法として有用であり、正常組織に対して毒性の少ない化合物の *in vitro* スクリーニング法として特許化を図っている。一方、本研究の研究協力者である Chen らは、細胞を用いた *in vitro* での移動試験と *in silico* での細胞の増殖及び移動のデータ解析を総合的に計算・統合し、*in vitro* での移動試験の結果から生体内での細胞の浸潤性を評価するシステムを確立した。本システムは、細胞の接触を画像から判定し、個々の細胞の増殖と移動の性質を評価するアルゴリズムを基盤としており、薬剤が細胞の移動に及ぼす効果を評価することが可能である。これを応用することにより、技術的及び倫理的に困難さを有する生体内での癌細胞の肝内転移評価法の確立につながると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、動物モデルでは構築が不十分であった肝内転移評価法を *in silico* のモデルで構築することを目的とする。なお、*In silico* システムへのデータの蓄積のために、肝内転移を模擬した *in vivo* モデルを構築し、肝細胞癌細胞の転移に関する研究のツールとしての提案を行う。さらに、そのシステムを応用して、肝細胞癌患者の予後の悪化に大きく関与する脈管浸潤及び肝内転移を抑止するのに有効な化学療法剤の創出を図る。

3. 研究の方法

(1) 細胞培養

各種癌培養細胞株(肝細胞癌培養細胞株:HuH-7、HepG2、HepG2.2.15、大腸がん細胞株:HCT-116)は、10% ウシ胎児血清(FBS)を含有させたダルベッコ改変イーグル培地(DMEM)を用いて 37℃、5% CO₂ 存在下で培養した。細胞の剥離には、0.25% トリプシン-EDTA を用いた。

(2) *In vitro* での細胞移動能の評価

継代培養した各種細胞を 10% FBS-DMEM に回収し、2×10⁵ 細胞/mL の密度に調製した。6 ウェルプレートに 4×10⁵ 細胞/ウェルで播種し、overnight 培養して細胞を接着させた。細胞が confluent となった後、Wound healing tool を用いて線を引いた。線を引いた区域を移動する細胞をタイムラプス顕微鏡を用いて経時的に観察し、各条件における細胞の移動能の変化を評価した。

(3) *In vivo* 肝転移モデルの作製

継代培養した各種細胞を無血清 DMEM に回収し、 2×10^5 細胞/50 μ L の密度に調製した。6 週齢の BALB/c ノードマウスに麻酔をかけ、側腹部を切開して脾臓を露出させた。30G の注射針を用いて細胞懸濁液を 50 μ L 脾臓に低速で注入し、十分な止血を行った後に閉腹した。2~3 週間後、再びマウスの腹部を切開し、肝臓における腫瘍の転移巣の数を計測した。

(4) *In silico* システムとの相互性の検討

上記の *in vitro* 及び *in vivo* 実験の結果で示された細胞の移動及び肝臓への転移巣形成に関するデータを *in silico* システムに導入し、データを蓄積させた。既存の化学療法剤で処理した条件における細胞の移動能の変化 (*in vitro*) に関する結果を入力し、モデルマウスの肝臓における転移巣形成数の結果 (*in vivo*) と関連付ける。この関連付けられたデータをもとに、癌細胞の *in vitro* での移動能への効果に関するデータから *in vivo* での肝臓転移巣形成数の予測評価システムの構築を試みた。

4. 研究成果

(1) 種々の細胞を用いた肝転移モデルの構築

BALB/c ノードマウスを用いた癌細胞の肝転移モデルは、これまで大腸癌肝転移を模擬したモデルは構築されていたが、大腸癌以外の癌種では構築されていなかった。本研究では、まず既存の大腸癌肝転移モデルを応用して、肝細胞癌細胞をマウスの脾臓に移植し、肝臓への転移巣形成を可能とするモデルの確立を試みた。その結果、肝細胞癌細胞を脾臓に移植したマウスも大腸癌細胞を移植したマウスと共に生育可能であり、3 週間後に肝臓に転移巣を形成した。我々のグループでは、肝機能検査で汎用されているインドシアニンググリーン (ICG) を肝細胞癌患者に静注すると ICG が肝細胞癌組織に滞留し、その滞留した ICG 由来の蛍光発光が体外からの観察によって肝細胞癌組織特異的にみとめられることを見出した[3,4]。その ICG の性質を利用し、転移巣形成が認められたマウスに ICG を静注し、24 時間後に蛍光発光を観察したところ、肝臓に形成された肝細胞癌転移巣組織のみから ICG 由来の蛍光発光をみとめた (図 1)。以上の結果から、肝転移モデルは、大腸癌細胞だけでなく肝細胞癌細胞でも構築可能であることを明らかにした。なお、肝細胞癌細胞を移植したマウスは、大腸癌細胞を移植したマウスに比べて移植後数日で死ぬものが多かった。その原因は脾梗塞の発生であると考えられたため、移植細胞を調製する方法を改善することにより状況は改善された。



図 1. 肝転移モデルマウスの摘出肝臓における肝細胞癌細胞由来の転移巣とその ICG 由来蛍光発光像。

(2) *In vitro* での細胞移動能評価

In silico システムへの細胞移動に関するデータの蓄積を目的として、Wound healing tool を用いて細胞の移動能を *in vitro* で評価する実験系の構築を試みた。肝細胞癌細胞を confluent の状態にし、Wound healing tool によって引いた線を移動する細胞をリアルタイム顕微鏡で経時的に観察し、移動する細胞の携帯や移動距離を評価する実験系を確立した (図 2)。続いて、モデル化合物として標的が明確な cetuximab を用いて、肝細胞癌細胞の移動に対する阻害効果を当該 *in vitro* 実験系で評価できるかを検討した。その結果、cetuximab を作用させた条件においては、Wound healing tool によって引いた線を移動する細胞の中で仮足を延ばす細胞の数が有意に減少した。仮足形成は細胞の移動において重要な生理学的現象であり、癌細胞の浸潤においても大きな役割を担うと考えられている[5]。本研究で実施したりアルタイムでの *in vitro* 細胞移動評価系によって、cetuximab が肝細胞癌細胞の仮足形成を阻害し、細胞の移動能を減衰させる効果を有することを明らかにした。以上の結果から、cetuximab は肝細胞

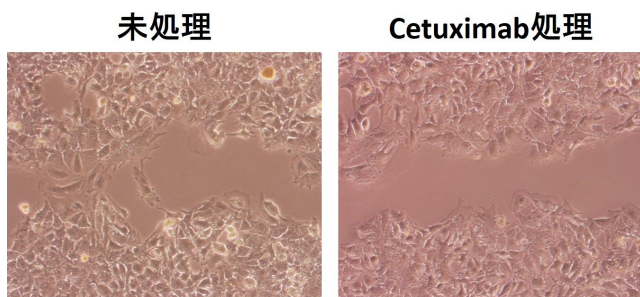


図 2. *In vitro* 細胞移動評価系を用いた肝細胞癌細胞の移動。未処理条件においては、仮足を形成した細胞の移動が確認できるが、cetuximab 処理条件では確認できない。

癌細胞の移動及び浸潤の阻害を介して有効な化学療法剤として機能し得ることが示唆された。

(3) *In silico* システムへのデータの蓄積と予測評価

本研究の協力者である Chen らは、*in vitro* 細胞移動試験と *in silico* での細胞の増殖及び移動のデータを総合的に解析し、*in vitro* での移動試験の結果から生体内での細胞の浸潤性を評価するシステムを確立した。本研究では、その技術を応用して各種細胞の細胞移動の評価データを基にした細胞移動の予測評価システムを構築し、化合物が細胞の移動に与える効果の予測を試みた。前述の通り、各種癌細胞を用いた *in vitro* での細胞移動の評価を繰り返し実施し、*in silico* システムへのデータの蓄積を実施した。同時に、前述の研究でモデル化合物として使用した cetuximab を作用させた条件下での細胞移動の評価データも蓄積させた。そして、構築された *in silico* のデータセットに基づき、特定濃度の cetuximab 作用条件下における肝細胞癌細胞の細胞移動を予測させた。その結果、実際の *in vitro* 実験での結果と *in silico* システムの予測結果との間で連関性はみられたものの、*in vitro* 実験結果において生じるばらつきに *in silico* システムの予測が対応できない場合もみられた。従って、当該 *in silico* システムは予測精度において課題を有しており、さらなるデータの蓄積によって精度の向上を図る必要があると考えられる。

一方、前述の研究項目で確立した肝転移モデルに関してもデータの蓄積を実施するために、肝細胞癌細胞あるいは大腸癌細胞をマウスに移植して、肝臓に形成された転移巣の数や場所に関するデータを収集した。その結果、肉眼的に観察可能な転移巣の形成数は 2~5 個で、ばらつきは目立たなかったものの、転移巣が形成される場所に関してはばらつきが顕著であった。Cetuximab 処理を実施した細胞を移植したマウスにおいては、肝臓における転移巣形成数に減少傾向はみられたものの有意差は得られず、形成場所に関しては未処理と同様にばらつきが顕著であった。従って、当該モデルを用いて cetuximab による転移巣形成数の減少の効果を明確にするためには、モデルの再検討が必要と考えられる。

<引用文献>

1. Xia JF, Gao JJ, Inagaki Y, Kokudo N, Nakata M, Tang W. Flavonoids as potential anti-hepatocellular carcinoma agents: recent approaches using HepG2 cell line. *Drug Discov Ther.* 2013;7(1):1-8.
2. Inagaki Y, Tang W, Zhang L, Du G, Xu W, Kokudo N. Novel aminopeptidase N (APN/CD13) inhibitor 24F can suppress invasion of hepatocellular carcinoma cells as well as angiogenesis. *Biosci Trends.* 2010;4(2):56-60.
3. Ishizawa T, Fukushima N, Shibahara J, Masuda K, Tamura S, Aoki T, Hasegawa K, Beck Y, Fukayama M, Kokudo N. Real-time identification of liver cancers by using indocyanine green fluorescent imaging. *Cancer.* 2009;115(11):2491-504.
4. Ishizawa T, Masuda K, Urano Y, Kawaguchi Y, Satou S, Kaneko J, Hasegawa K, Shibahara J, Fukayama M, Tsuji S, Midorikawa Y, Aburatani H, Kokudo N. Mechanistic background and clinical applications of indocyanine green fluorescence imaging of hepatocellular carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014;21(2):440-8.
5. Choi S, Bhagwat AM, Al Mismar R, Goswami N, Ben Hamidane H, Sun L, Graumann J. Proteomic profiling of human cancer pseudopodia for the identification of anti-metastatic drug candidates. *Sci Rep.* 2018;8(1):5858.

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計6件)

1. Inagaki Y, Kokudo T, Kamiya M, Uno SN, Sato M, Kaneko J, Kokudo N, Urano Y, Hasegawa K. A novel liver-specific fluorescent anti-cancer drug delivery system using indocyanine green. *Sci Rep.* 2019;9(1):3044.
2. Nishioka Y, Shindoh J, Inagaki Y, Gonoj W, Mitsui J, Abe H, Yoshioka R, Yoshida S, Fukayama M, Tsuji S, Hashimoto M, Hasegawa K, Kokudo N. Host MICA Polymorphism as a Potential Predictive Marker in Response to Chemotherapy for Colorectal Liver Metastases. *Dig Dis.* 2018;36(6):437-445.
3. Kaneko J, Kokudo T, Inagaki Y, Hasegawa K. Innovative treatment for hepatocellular carcinoma (HCC). *Transl Gastroenterol Hepatol.* 2018;3:78.
4. Shirata C, Kaneko J, Inagaki Y, Kokudo T, Sato M, Kiritani S, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K, Kokudo N. Near-infrared photothermal/photodynamic therapy with indocyanine green induces apoptosis of hepatocellular carcinoma cells through oxidative stress. *Sci Rep.* 2017;7(1):13958.
5. Xia J, Rong L, Sawakami T, Inagaki Y, Song P, Hasegawa K, Sakamoto Y, Tang W. Shufeng Jiedu Capsule and its active ingredients induce apoptosis, inhibit migration and invasion, and enhances doxorubicin therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother.* 2018;99:921-930.

6. Xia J, Inagaki Y, Gao J, Qi F, Song P, Han G, Sawakami T, Gao B, Luo C, Kokudo N, Hasegawa K, Sakamoto Y, Tang W. Combination of Cinobufacini and Doxorubicin Increases Apoptosis of Hepatocellular Carcinoma Cells through the Fas- and Mitochondria-Mediated Pathways. Am J Chin Med. 2017;45(7):1537-1556.

〔学会発表〕(計5件)

1. Tanimoto M, Kokudo T, Arita J, Inagaki Y, Akamatsu N, Kaneko J, Sakamoto Y, Hasegawa K. Expression of OATP1B3 in Cases with Indocyanine Green Excretory Defect. 13th IHPBA World Congress. 2018.
2. Abe S, Kokudo T, Inagaki Y, Kaneko J, Akamatsu N, Arita J, Sakamoto Y, Hasegawa K. The Effect of C-Met Inhibitor on HCC Associated with Portal Vein Tumor Thrombosis. APASL(the Asian Pacific Association for the Study of the Liver) Single Topic Conference on HCC: Strategy in the New Era. 2018.
3. 谷本芽弘理、國土貴嗣、有田淳一、稲垣善則、赤松延久、金子順一、阪本良弘、長谷川潔. ICG 不耐症を疑う症例における OATP1B3 の発現解析. 第 73 回日本消化器外科学会総会. 2018.
4. 西岡裕次郎、進藤潤一、稲垣善則、五ノ井渉、阿部浩幸、山下俊、有田淳一、赤松延久、金子順一、阪本良弘、國土典宏、長谷川潔. 大腸癌肝転移に対する術前化学療法の奏功規定因子の探索. 第 118 回日本外科学会定期学術集会. 2018.
5. 早阪誠、金子順一、白田力、稲垣善則、國土貴嗣、有田淳一、赤松延久、阪本良弘、長谷川潔. 肝細胞癌に対する新規治療としての Indocyanine green を用いた光線力学療法の作用メカニズムの検討. 第 118 回日本外科学会定期学術集会. 2018.

〔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：
国内外の別：

○取得状況(計0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

該当なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：陳 ユ

ローマ字氏名：CHEN, Yu

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。