

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月17日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15950

研究課題名(和文)肝細胞癌の化学放射線療法におけるアポトーシスおよびオートファジーの役割

研究課題名(英文) Role of apoptosis and autophagy in chemoradiotherapy for hepatocellular carcinoma

研究代表者

田中 宏典 (TANAKA, Hironori)

徳島大学・病院・医員

研究者番号：40792388

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)：肝癌培養細胞を用いてミリプラチン(MPT)と放射線の相乗効果を調べその機序を検討した。HuH-7、HepG2細胞にMPTの活性体(DPC)を添加してX線を照射し、相乗効果を評価したところDPCとX線の併用では相乗効果を認めた。薬剤及びX線処理後の細胞を用いて、アポトーシス誘導関連蛋白の発現をWestern blot法で解析したところ、抗癌剤単独群、X線単独群でもcleaved PARP発現が増加したが、併用群ではさらに強くその発現が増加した。アポトーシス関連蛋白ではPUMAの発現が増加した。MPTとX線の併用は相乗効果を有し、その機序としてPUMAを介するアポトーシスが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまで肝癌における化学療法と放射線療法の併用による相乗効果の有無については十分に解明されていなかった。今回、我々の研究では抗癌剤ミリプラチンと放射線の併用により相乗効果が示され、その機序としてアポトーシス誘導が示唆された。脈管浸潤を伴う肝癌の予後は極めて不良であり、その理由として既存の治療での奏効率が低いことが挙げられている。ミリプラチン併用化学放射線療法の相乗効果が示されたことにより、今後は進行肝癌の治療選択肢が増えることにつながると考えられる。

研究成果の概要(英文)：We investigated anti-cancer activity including synergistic effect of MPT and radiation combination using HCC cells and the mechanism of apoptosis induction. Human HCC cell lines HepG2 and HuH-7 were treated with DPC (active form of MPT) and X-ray irradiation, and synergistic effect was evaluated using combination index (CI). Combination of DPC and irradiation decreased cell viability. The CI was <1 in both cell lines, indicating their synergistic effect against HCC cells. Expression of apoptosis-related proteins was analyzed by Western blotting. Treatment with DPC and X-ray irradiation induced cleaved PARP much more strongly, suggesting their synergistic effect on apoptosis. expression level of PUMA was significantly increased in the combination group of both cell lines. Our data suggested that the combination with MPT and radiation showed their synergistic effect on apoptosis induction in HCC cells and that PUMA played an important role in apoptosis.

研究分野：消化器内科学

キーワード：肝細胞癌 ミリプラチン 放射線療法 相乗効果

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

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌の死亡率はわが国を含むアジアにおいて高く、全世界においても悪性腫瘍死亡率の第 5 位を占めており、有効な治療法の確立が急務である。局所治療であるラジオ波焼灼療法 (RFA) や手術の可能な症例では比較的予後良好であるが、これらの治療の不可能な症例では肝動脈化学塞栓療法 (TACE) やソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブなどの全身化学療法が行われているが予後不良な経過をたどる。

また、進行肝癌ではしばしば門脈浸潤をきたすが、ひとたび門脈浸潤を来たせば有効な治療法は無く極めて予後不良である。同様に、静脈浸潤や胆管浸潤をきたし症例に対する有効な治療法は無い。

近年、このような門脈浸潤、静脈浸潤、胆管浸潤などを有する症例にシスプラチンを用いた化学放射線療法の有効性が報告されているが (J Vasc Interv Radiol 2015.)、未だ有効な治療法として位置付けられておらず汎用されるには至っていない。その理由としては、シスプラチン併用化学放射線療法の効果が必ずしも十分では無く、その作用機序も解明されていないことが考えられる。また、シスプラチンは腫瘍組織における滞留性が高くなく、消化管障害や腎障害などの副作用が強いことも問題点として挙げられている。

ミリプラチンは、TACE に使用されるリピオドールに親和性の高い新規抗癌剤であり癌組織への滞留性も良く、全身循環への移行が少ない特徴を持つため、安全で有効な薬剤と考えられる。そのためミリプラチンを用いた CRT は高い有効性が期待されるが、その有効性については十分に解明されていない。

2. 研究の目的

まず肝癌細胞株にミリプラチン (DPC) 単独、X 線単独、ミリプラチン (DPC) と X 線の併用 (CRT) を行い、各治療によるアポトーシス誘導の有無 (程度) を検討した。同様に、アポトーシス関連蛋白である BH3-only 蛋白、Bcl-2 ファミリー蛋白などの変化を調べ、アポトーシスの機序を検討した。さらに、肝癌細胞株の siRNA によるノックダウン実験を行い、アポトーシスが增強または減弱するかどうかを検討し、薬剤感受性因子、耐性因子を明らかにした。

3. 研究の方法

(1) 肝癌細胞株に対するミリプラチン (DPC)、シスプラチン、放射線の殺細胞効果の検討

薬剤の殺細胞効果に関しては、肝癌細胞株 (HuH-7、HepG2) を 96well プレートに播種させた。24 時間後にミリプラチン (DPC) またはシスプラチンの希釈溶液 (0 ~ 10 μ M) を添加した。その 48 ~ 120 時間後に WST-8 試薬を各 well に添加し、2 時間後に 450nm の吸光度を測定することにより細胞生存率を算出した。

放射線の殺細胞効果に関しては同様に細胞播種から 24 時間後に細胞/動物用 X 線照射装置 (MBR-1520R) を用いて 0 ~ 10Gy の X 線照射を行い、その 48 ~ 120 時間後に WST-8 法により細胞生存率を算出した。

(2) 各薬剤と X 線の相乗効果の検討

肝癌細胞株 HuH-7、HepG2 を 3,000 個/well となるように 96well プレートに播種させる。24 時間後にミリプラチン (DPC) またはシスプラチンの希釈溶液 (0 ~ 10 μ M) を添加し、直後に 0 ~ 10Gy の X 線照射を行った。

さらに 120 時間後に WST-8 法により細胞生存率を算出し、求められた細胞生存率を用いて median-effect 法により抗癌剤と X 線の相乗効果の有無を求めた。

(3) 薬剤および X 線照射によるアポトーシス誘導効果

肝癌細胞株 HuH-7、HepG2 をフラスコに播種させ、24 時間後に薬剤の添加および、X 線の照射を行い、24 時間後に蛋白を回収した。回収された蛋白をウエスタンブロット法によりアポトーシスのシグナル伝達に関わる蛋白の発現を検討した。

(4) アポトーシス関連蛋白ノックダウンによるアポトーシスの評価

肝癌細胞株 HuH-7、HepG2 を 6well プレートに播種させ、24 時間後に siRNA を用いて関連蛋白 PUMA をノックダウンした。24-96 時間後に細胞を回収し、RNA を抽出ノックダウン効率は real-time PCR 法により評価した。

同様に PUMA をノックダウンした肝癌細胞株 HuH-7、HepG2 細胞に対して抗癌剤の添加および X 線照射を行い、24 時間後に細胞を回収後、Annexin V を添加しフローサイトメトリーによりアポトーシスが增強、減弱されるか検討した。

4. 研究成果

(1) 肝癌細胞株に対するミリプラチン (DPC)、シスプラチン、放射線の殺細胞効果の検討 (図 1)

CDDP 及び DPC のいずれにおいても HuH-7 の生存率は用量依存的に低下したが、DPC の 50% 発育素子濃度 (IC50) が低値であった (1.0 vs 2.0 μ M)。

同様に HepG2 に対する IC50 はそれぞれ 3.6 μ M と 6.6 μ M であり DPC で低値であった。

X 線単独照射では、いずれの細胞も線量依存的に生細胞数が減少し、両細胞とも 50% 有効線量

(ED50)は5Gyであった。

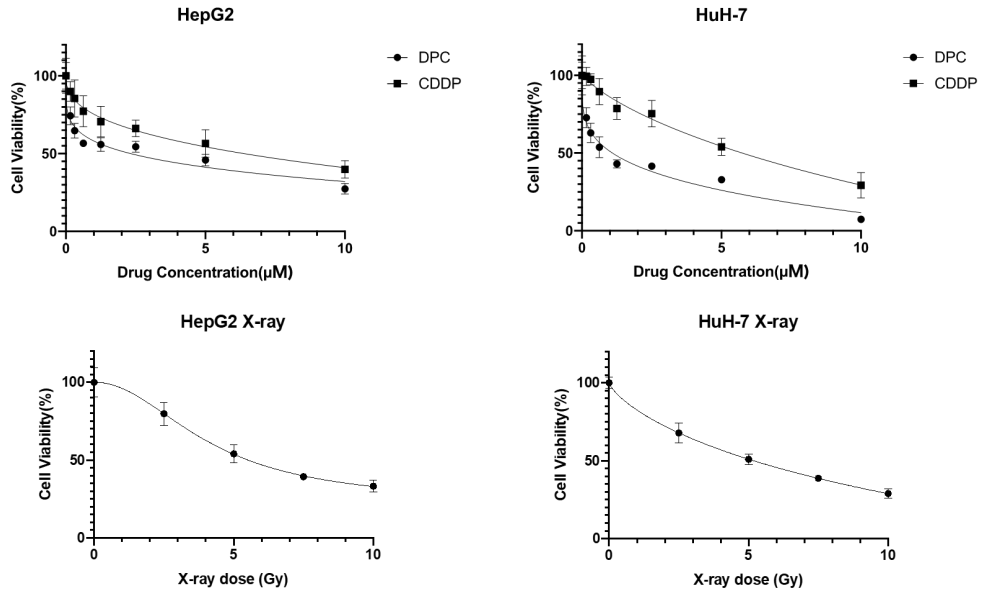


図1.肝癌細胞株に対するミリプラチン(DPC)、シスプラチン、放射線の殺細胞効果の検討

(2) 各薬剤とX線の相乗効果の検討(図2)

DPCとX線の併用ではDPCの濃度依存性、X線の線量依存性の細胞生存率は低下した。得られた細胞生存率をもとにcombination indexを算出すると、HuH-7、HepG2細胞ともに1未満となり相乗効果を認めた。

一方CDDPではcombination indexは1未満とはならず相乗効果を認めなかった。

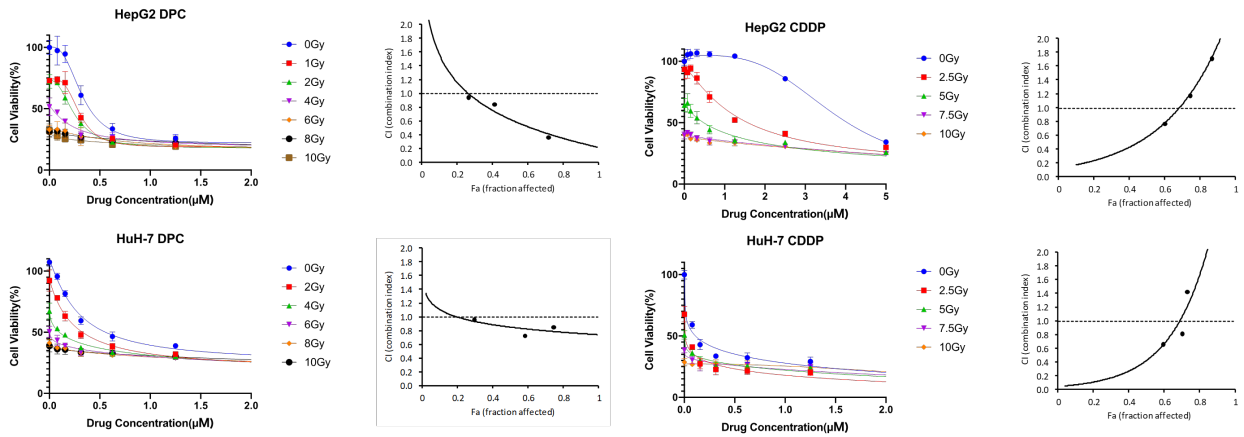


図2.各薬剤とX線の相乗効果の検討

(3) 薬剤およびX線照射によるアポトーシス誘導効果(図3)

DPC単独群、X線単独群でもcleaved PARP発現が増加した。DPCとX線の併用ではさらに強くcleaved PARPの発現が増加した。

アポトーシス関連蛋白ではBim、Bik、Bid、Bad、Noxa、Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-x1、Mcl-1の発現は変化しなかったが、DPC単独およびX線単独でPUMAの発現が増加していた。また、PUMAの発現はその併用群でより最も強く誘導された。

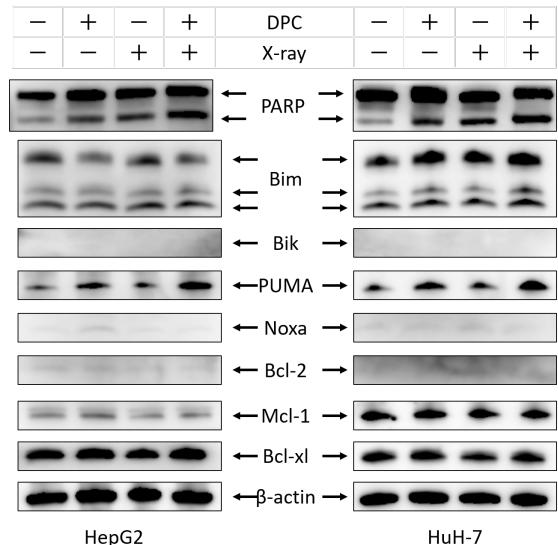


図3.薬剤およびX線照射によるアポトーシス誘導効果

(4) アポトーシス関連蛋白ノックダウンによるアポトーシスの評価(図4)

HuH-7 細胞および HepG2 細胞において siRNA を用いて PUMA をノックダウンしたところ、処理後から 96 時間後まで 80%相当のノックダウン効率であった。control siRNA 群と比較して、PUMA をノックダウンした細胞では DPC および放射線照射を行うもアポトーシスは減弱を認めた。

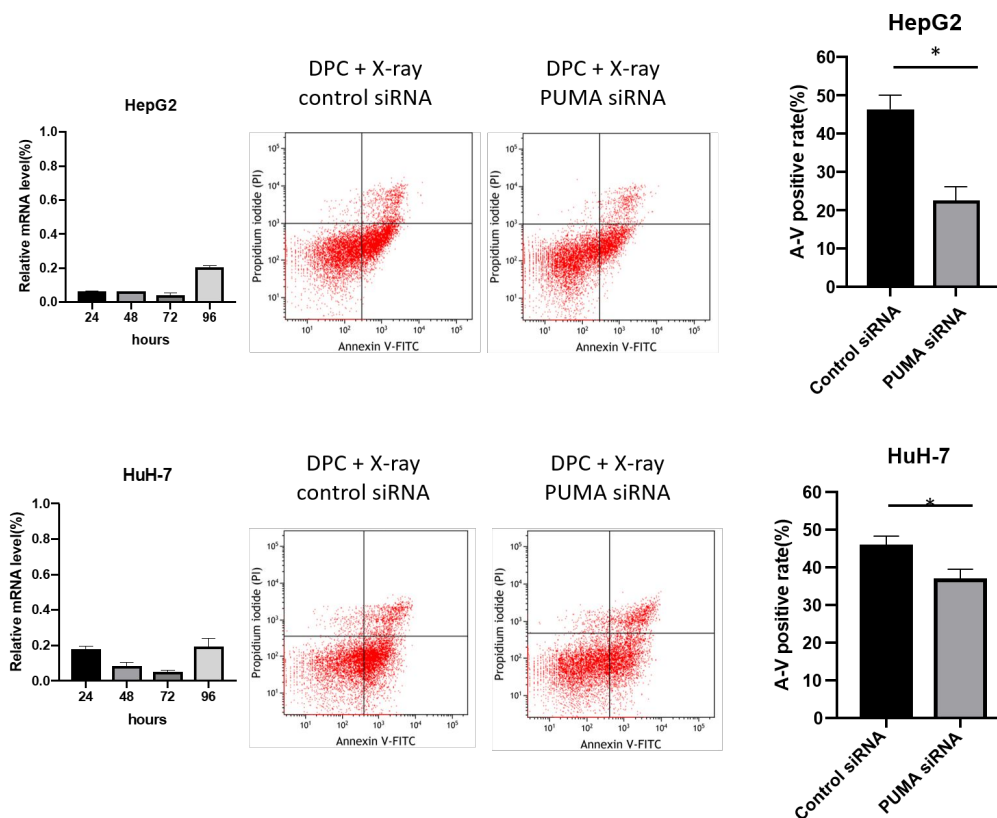


図4.アポトーシス関連蛋白ノックダウンによるアポトーシスの評価

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)
 投稿準備中

〔学会発表〕(計 3 件)

田中宏典, 田中貴大, 友成哲, 岡本耕一, 佐藤康史, 北村晋志, 藤野泰輝, 宮本弘志, 三井康裕, 岡田泰行. Therapeutic efficacy of miriplatin in combination with radiotherapy for advanced hepatocellular carcinoma. 第 17 回日本臨床腫瘍学会学術集会, 京都, 2019.7.18-20. (発表予定)

Hironori Tanaka, Tetsu Tomonari, Takahiro Tanaka, Akihiro Hirao, Fumika Nakamura, Kumiko Tanaka, Koichi Okamoto, Yasushi Sato, Masahiro Sogabe, Hiroshi Miyamoto, Naoki Muguruma, Tetsuji Takayama. THERAPEUTIC EFFICACY OF CHEMORADIOTHERAPY WITH MIRIPLATIN FOR HEPATOCELLULAR CARCINOMA. DDW2019, May 18-21, San Diego, San Diego Convention Center.

田中宏典, 友成哲, 高山哲治. 肝細胞癌に対するミリプラチン併用化学放射線療法の検討. 第 54 回日本肝臓学会総会, 大阪, 2018.6.14-15.

〔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

なし

(2)研究協力者

なし

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。