

令和 4 年 6 月 14 日現在

機関番号：31201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K07737

研究課題名(和文) TGF-シグナルの調節機構に基づいた進行肝癌のオーダーメイド化学療法の開発

研究課題名(英文) Development of personalized chemotherapy for hepatocellular carcinoma: Targeting TGF- β signaling

研究代表者

王 挺 (WANG, TING)

岩手医科大学・歯学部・特任講師

研究者番号：70416171

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：1.Sorafenibは細胞増殖に対して強力な抑制作用を示す反面、TGF- β と類似な細胞浸潤を誘導する作用も示した。一方、LenvatinibはSorafenibに比べ、弱い細胞毒性を示したが、TGF- β による細胞の浸潤誘導を抑制した。2.Sorafenibは、Lenvatinibに比べ、細胞毒性作用が弱く、血管新生を誘導した。一方、Lenvatinibは濃度依存的に細胞毒性作用を示し、TGF- β による血管新生の誘導を抑制した。その二つの分子標的薬の作用には、TGF- β シグナルとVEGFシグナルの制御が関与することが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

現在、進行肝癌に対して、SorafenibおよびLenvatinibを代表となる各種分子標的薬の臨床応用が中心となっている。SorafenibおよびLenvatinibの抗癌作用は血管新生を抑制するだけでなく、増殖シグナルも抑制するが、その作用機構にTGF- β シグナルの制御が関与するかどうかはまだ明らかになっていない。本研究は、これら治療に対する癌細胞の反応性の根底に位置すると考えられるTGF- β シグナルの作用機構を明らかにすることによって、肝癌のみならず抗がん治療に共通する治療薬および併用薬の開発に繋がれると考えている。

研究成果の概要(英文)：1.In comparison to Lenvatinib, Sorafenib shows potent effects on inhibiting the proliferation of a human hepatoma cell line HepG2. On the other hand, Sorafenib can also induce the invasion of the cells, whereas Lenvatinib inhibits cell invasion. Our results indicate that the regulation of TGF- β signaling plays important roles in the function of both molecularly targeted drugs. 2.In comparison to Lenvatinib, Sorafenib shows less potent effects on inhibiting the proliferation of human endothelial cells (HUVEC), but more potent effects on stimulating the angiogenesis of the cells. On the contrary, Lenvatinib inhibits the angiogenesis of HUVEC. Our results indicate that both TGF- β signaling and VEGF signaling are related with the function of Sorafenib, whereas VEGF signaling is related with the function of Lenvatinib.

研究分野：肝臓学

キーワード：進行肝癌 分子標的薬 TGF- β シグナル VEGFシグナル 細胞増殖 細胞浸潤 血管新生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

B型、C型肝炎ウイルスに対する抗ウイルス療法の進歩により、肝癌の減少が見込まれているが、日本では高齢者の感染者が大半を占めることから、進行肝癌の低侵襲治療が大きな課題となっている。進行肝癌に対して、5-FUとPEG-IFN-2bの併用療法が高い有効性を示すことが知られているが、その機序は明らかにされていない。我々は、肝癌の発生および進展に重要な役割を担うTGF- α およびそのシグナルに着目し、5-FUが肝癌細胞株HepG2に対して細胞毒性を示す反面、TGF- α シグナルを介して浸潤性の増強など生物学的悪性度を増強する作用もある可能性を明らかにした。5-FUに併用するIFN-2bの生物学的作用に関して我々は、IFN-2bがTGF- α の浸潤シグナルを抑制することによって、相乗的な治療効果を発揮する可能性を示した。また、併用療法の効果は、B型、C型肝炎ウイルス背景によって異なる可能性もあると考えられる(Kasai K, et al., *Cancer*, 2012; Okada Y, et al., *Cell Death Discov.* 2018)。しかし、5-FUは現在、進行肝癌の治療では応用せず、IFN-2bも副作用や保険適応の問題から、担癌患者に対して適用が限られている。現在、進行肝癌に対して、SorafenibおよびLenvatinibを代表とする各種分子標的薬の臨床応用が中心となっている。SorafenibおよびLenvatinibの抗癌作用は血管新生を抑制するだけでなく、増殖シグナルも抑制するが、その作用機構にTGF- α シグナルの制御が関与するかどうかはまだ明らかになっていない。本研究は、これら治療に対する癌細胞の反応性の根底に位置すると考えられるTGF- α シグナルの作用機構を明らかにすることによって、肝癌のみならず抗がん治療に共通する治療薬および併用薬の開発に繋がられると考えている。

2. 研究の目的

本研究は悪性腫瘍全般に共通するTGF- α シグナルに着目し、その制御により抗癌剤、特に分子標的薬の有効性を高めることを最終目的としている。本研究では、分子標的薬のうち、SorafenibおよびLenvatinibの細胞生存/細胞死、または細胞浸潤と血管新生に及ぼす影響を比較し、その作用の分子機構にTGF- α シグナルが関与するか否かを検討する。

3. 研究の方法

1) 分子標的薬によるヒト肝癌細胞株(HepG2)の生存および浸潤誘導に対する影響

HepG2にSorafenib、RegorafenibおよびLenvatinibをそれぞれ0~100 nMを添加し、24時間後、生細胞測定試薬を添加し、吸光度の測定によって細胞生存率を評価した。

5ng/ml TGF- α 添加により細胞浸潤の*in vitro*モデルを作成し、Sorafenib、およびLenvatinibは、の実験で確定した細胞に毒性少ない濃度を細胞に添加し、TGF- α による細胞の浸潤促進作用に対する分子標的薬の影響をmigration assay及びinvasion assayで検討した。

2) 分子標的薬によるHepG2の浸潤誘導に対する作用の分子機構の検討

TGF- α シグナルの関与については、細胞にSorafenibおよびLenvatinibを別々に添加し、TGF- α の浸潤に関与するシグナル分子のタンパク質レベルをWestern blotで分析した。また、TGF- α の発現およびTGF- α シグナル分子の活性化の影響について、分子標的薬は以前の実験で確認した5-FU(30mg/ml)と比較した。

TGF- α シグナル及びVEGFシグナルへの影響については、5ng/ml TGF- α 及び10ng/ml VEGFが単独添加及び分子標的薬と混合添加で細胞を処理し、細胞内のVEGFシグナル分子および

TGF- β シグナル分子のタンパク質レベル Western blot で分析した。

また、TGF- β 受容体の阻害剤(LY2109761)および MAPK の阻害剤(U0126)を用い、HepG2 の浸潤誘導に対する分子標的薬の作用に TGF- β シグナルの関与について確認した。

- 3) 分子標的薬によるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)の生存および血管新生に対する影響
HUVEC に Sorafenib、および Lenvatinib をそれぞれ 0 ~ 100 nM を添加し、24 時間後、生細胞測定試薬を添加し、吸光度の測定によって細胞生存率を評価した。
5ng/ml TGF- β 添加により血管新生の *in vitro* モデルを作成し、の実験で確定した細胞に毒性少ない濃度の Sorafenib および Lenvatinib を細胞に添加し、TGF- β による細胞の血管新生の促進作用に対する分子標的薬の影響を血管新生キットで検討した。
- 4) 分子標的薬による HUVEC の血管新生に対する作用の分子機構の検討
TGF- β シグナルの関与については、Sorafenib および Lenvatinib は細胞を処理し、細胞内の TGF- β シグナル分子 (p-TGF- β R2, p-ERK1/2) のタンパク質レベルを Western blot で分析した。
TGF- β シグナル及び VEGF シグナルへの影響については、5ng/ml TGF- β 及び 10ng/ml VEGF が単独添加及び分子標的薬との混合添加で細胞を処理し、細胞内の TGF- β シグナル分子および VEGF シグナルのタンパク質レベルを Western blot で分析した。
また、TGF- β 受容体の阻害剤(LY2109761)および VEGF シグナル分子である Akt の阻害剤 (GSK690693)を用い、HUVEC の血管新生に対する分子標的薬の作用に TGF- β シグナルおよび VEGF シグナルの関与について確認した。

4. 研究成果

- 1) 分子標的薬によるヒト肝癌細胞株(HepG2)の生存および浸潤誘導に対する影響
Sorafenib は 10nM、Regorafenib は 100nM から細胞増殖抑制作用を示した。これに対して Lenvatinib は 1 μ g までは細胞増殖促進作用を示した。
Sorafenib は TGF- β による細胞の浸潤促進作用に対し相乗効果を示した。一方、Regorafenib は、TGF- β の浸潤促進作用に対する影響を示さず、Lenvatinib は TGF- β の浸潤促進作用を著明に抑制した。
以上の結果から、Sorafenib は肝癌細胞に対し強力な細胞毒性を示す反面、TGF- β による細胞の浸潤性誘導を増強する作用もある可能性を示した。一方、Lenvatinib は Sorafenib に比べ弱い細胞毒性を示したが、細胞の浸潤誘導を抑制した (Fig.1)。
- 2) 分子標的薬による HepG2 の生存および浸潤誘導に対する作用の分子機構の検討
Sorafenib および Regorafenib は 5FU と同様に細胞内 TGF- β の発現を誘導したが、Sorafenib のみは TGF- β の細胞浸潤に関連するシグナル分子 MAPK(ERK1/2) のリン酸化タンパク質レベルを著明に促進した。一方、Lenvatinib は、細胞内 TGF- β の発現および ERK1/2 のリン酸化タンパク質レベルに影響しなかった。
HepG2 では、TGF- β は VEGF シグナル因子である p-VEGFR2, p-PLC 1 のタンパク質レベルを上昇させたが、p-Akt への影響が認められなかった。一方、VEGF は TGF- β シグナル因子(p-TGF- β R2, p-SMAD2,)のタンパク質レベルを誘導しなかった。
HepG2 では、TGF- β による促進した SMAD2 の活性化に対する両剤の影響が認められなかったが、TGF- β による促進した TGF- β R2 および ERK1/2 の活性化は、Lenvatinib によって抑制され、Sorafenib によってさらに加乗効果を示した。
Sorafenib は、TGF- β と同様に、HepG2 細胞の浸潤を促進することを示した。その作用は、

MAPK の阻害剤である U0126 および TGF- β 受容体阻害剤である LY2109761 により抑制された。また、Sorafenib による誘導された MAPK の活性化は、U0126 および LY2109761 により抑制された。

以上の結果から、TGF- β は HepG2 において VEGF シグナルを活性化する可能性があることが示唆された。Sorafenib は、TGF- β R2/MAPK を介して HepG2 細胞の浸潤を促進することを示した。また、TGF- β による浸潤誘導に対する Lenvatinib の抑制作用は TGF- β R2/MAPK の制御が関与していることが示唆された。一方、Sorafenib と Lenvatinib の持つ肝癌細胞生存抑制作用には、TGF- β の細胞死誘導シグナルの中心分子である SMAD2 が関与しないことが示唆された (Fig.2)。

3) 分子標的薬によるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC) の生存および血管新生に対する影響

Lenvatinib は HUVEC において 10 nM から細胞増殖抑制作用を示した。一方、Sorafenib は 1 μ M までは細胞増殖促進作用を示した。

Lenvatinib は TGF- β による HUVEC の血管新生の促進作用を著明に抑制したが、Sorafenib はさらに加乗効果を示した。

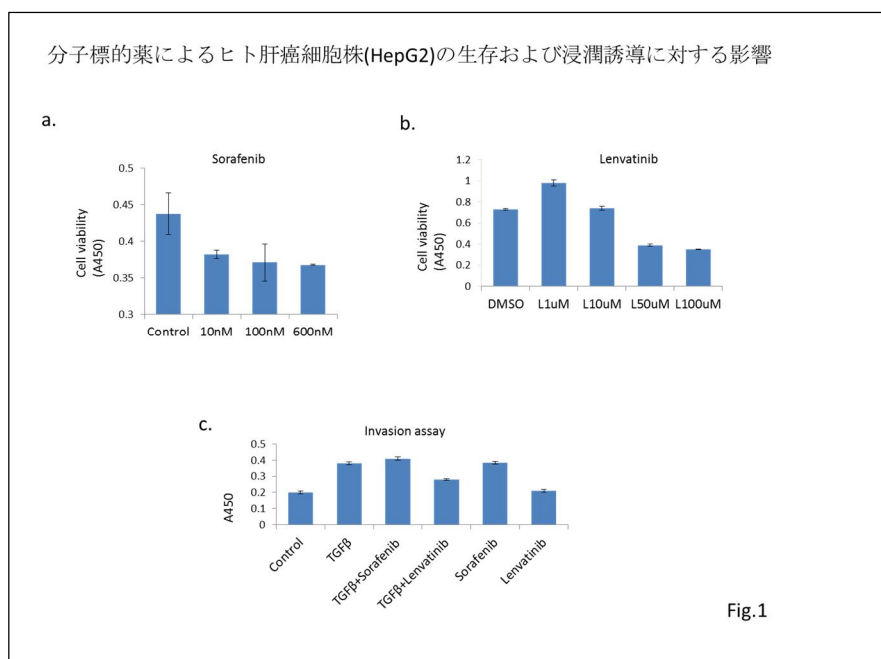
以上の結果から、Lenvatinib は濃度依存的に細胞毒性作用を示し、TGF- β による血管新生の誘導を抑制した。一方、Sorafenib は、Lenvatinib に比べ、細胞毒性作用は弱く、TGF- β と同様に血管新生を誘導した (Fig.3)。

4) 分子標的薬による HUVEC の血管新生に対する作用の分子機構の検討

HUVEC では、TGF- β は p-VEGFR2, p-PLC 1, p-Akt など VEGF シグナル因子のタンパク質レベルを上昇させたが、TGF- β の浸潤誘導シグナル因子である p-TGF- β R2 および p-ERK1/2 の活性化誘導が認められなかった。一方、Sorafenib は上述のシグナル因子のうち p-TGF- β R2, p-VEGFR2, p-ERK1/2 および p-Akt のタンパク質レベルを上昇させた。Lenvatinib は TGF- β による促進した VEGF シグナル因子の活性化を抑制した。

HUVEC 細胞において Sorafenib は血管新生を誘導することを示した。その作用は LY2109761 および Akt の阻害剤である GSK690693 により抑制された。また、Sorafenib による促進した Akt の活性化は LY2109761 および GSK690693 により抑制された。

以上の結果から、Sorafenib は、HUVEC 細胞の血管新生への誘導作用があること、また、その作用機構には、TGF- β シグナルおよび VEGF シグナルが両方関与することを示した。一方、Lenvatinib は、VEGF シグナルを抑制することによって血管新生を抑制することが示唆された (Fig.4)。



分子標的薬によるHepG2の生存および浸潤誘導に対する作用の分子機構の検討

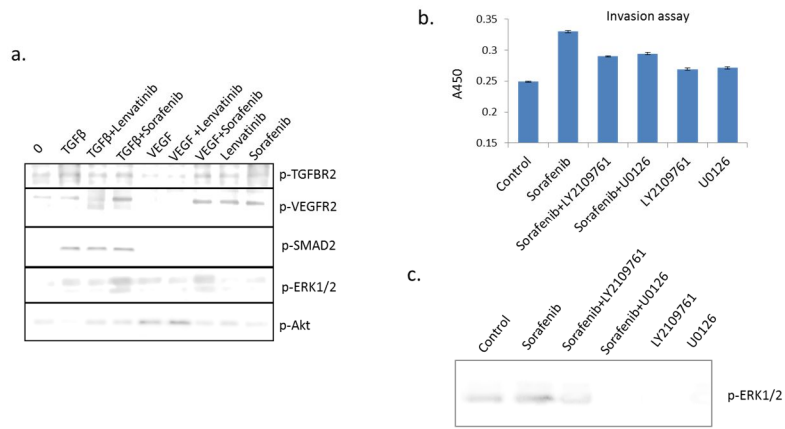


Fig. 2

分子標的薬によるヒト臍帯静脈内皮細胞 (HUVEC)の生存および血管新生に対する影響

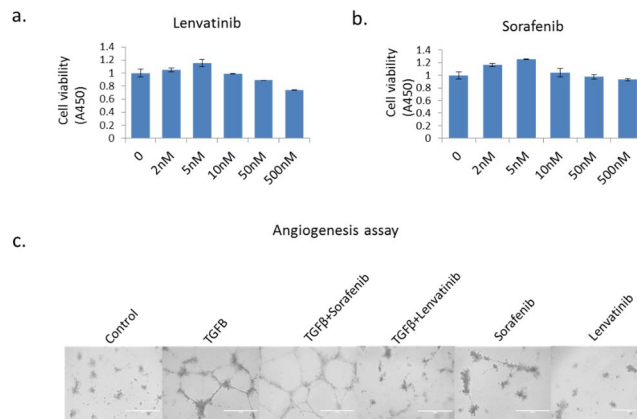


Fig. 3

分子標的薬によるHUVECの血管新生に対する作用の分子機構の検討

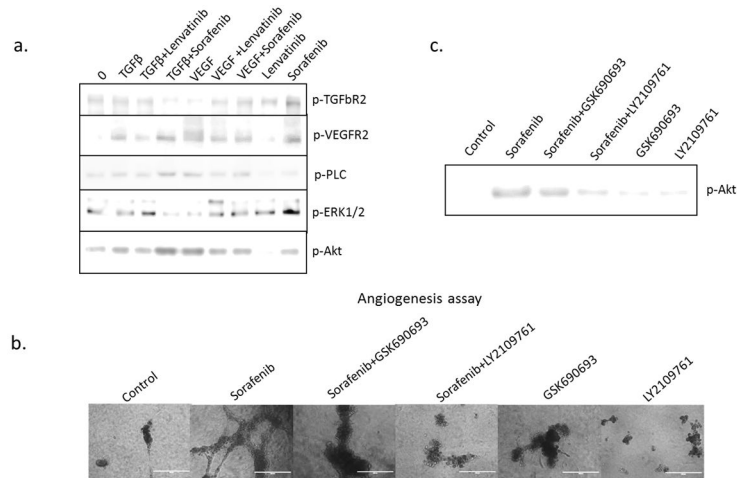


Fig. 4

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Sutoh Y, Hachiya T, Suzuki Y, Komaki S, Ohmomo H, Kakisaka K, Wang T, Takikawa Y, Shimizu A.	4. 巻 10
2. 論文標題 ALDH2 genotype modulates the association between alcohol consumption and AST/ALT ratio among middle-aged Japanese men: a genome-wide G×E interaction analysis.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Sci Rep.	6. 最初と最後の頁 16227
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-73263-1	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 -
1. 著者名 Miyasaka A, Yoshida Y, Wang T, Takikawa Y	4. 巻 25
2. 論文標題 Next-generation sequencing analysis of the human T-cell and B-cell receptor repertoire diversity before and after	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Hum Vaccin Immunother	6. 最初と最後の頁 1-16
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1080/21645515.2019.1600987	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 -
1. 著者名 Sasaki T, Suzuki Y, Kakisaka K, Wang T, Ishida K, Suzuki A, Abe H, Sugai T, Takikawa Y	4. 巻 0
2. 論文標題 IL-8 induces transdifferentiation of mature hepatocytes toward the cholangiocyte phenotype.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 FEBS Open Bio	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/2211-5463.12750.	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 -
1. 著者名 Wang T, Suzuki K, Chiba T, Kakisaka K, Takikawa Y	4. 巻 0
2. 論文標題 Supplementation with Branched-Chain Amino Acids Induces Unexpected Deleterious Effects on Astrocyte Survival and Intracellular Metabolism with or without Hyperammonemia: A Preliminary In Vitro Study.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Int J Hepatol	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1155/2021/7615126	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 -

1. 著者名 Wang T, Ishikawa T, Sasaki M, Chiba T.	4. 巻 0
2. 論文標題 Oral and Gut Microbial Dysbiosis and Non-alcoholic Fatty Liver Disease: The Central Role of Porphyromonas gingivalis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Front Med (Lausanne)	6. 最初と最後の頁 0
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmed.2022.822190.	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2件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 王挺、鈴木一幸、滝川康裕
2. 発表標題 肝性脳症に対するBCAA とカルニチンの併用療法の合理性に関する基礎的検討
3. 学会等名 第43回日本肝臓学会東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 王挺
2. 発表標題 JNKの制御によるoval細胞および正常肝細胞の増殖に対する影響
3. 学会等名 第23回肝不全治療研究会
4. 発表年 2021年

〔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

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------