

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：24601

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K17473

研究課題名(和文)肝内胆管癌に対するNOTCH/YAP経路のクロストーク制御を介する新規治療の開発

研究課題名(英文)Cross-talk between NOTCH and YAP pathways in human intrahepatic cholangiocarcinoma growth

研究代表者

才川 宗一郎 (Soichiro, Saikawa)

奈良県立医科大学・医学部・助教

研究者番号：10790347

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)：進行肝内胆管癌は予後不良とされ、全身化学療法の効果も限局的である。本研究では肝内胆管癌の病態に關与するHippo/YAPシグナルおよびNOTCHシグナルの制御を介した新たな治療法の開発を目的とした。既報でYAP活性化を抑制することが知られるアンジオテンシンII拮抗剤を選択的NOTCH1阻害薬に併用することで、細胞の増殖抑制、アポトーシス誘導、血管新生抑制などの機序を介して効率的にヒト肝内胆管癌の発育を抑制することを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

切除不能な肝内胆管癌に対して国内外で標準治療としてゲムシタピン(GEM)+シスプラチン(CDDP)療法が位置付けられているが、しかし生存期間、奏効率ともに十分な治療効果は得られていない。そのため、肝内胆管癌に対して新たな抗癌治療戦略を考えることは急務である。本研究においてYAPおよびNOTCHの制御が肝内胆管癌の発育を効率的に抑えることを明らかにしたことで、今後の肝内胆管癌治療における新たなオプションとして臨床への応用を見据えた展開が期待できると思われる。

研究成果の概要(英文)：Advanced intrahepatic cholangiocarcinoma is associated with poor prognosis and limited response to systemic chemotherapy. The aim of this study was to develop a new therapeutic approach through the regulation of Hippo/YAP and NOTCH signaling, which are involved in the pathogenesis of intrahepatic cholangiocarcinoma. We found that the combination of an angiotensin II blocker, which is known to inhibit YAP activation, with a selective NOTCH1 inhibitor efficiently suppressed the development of human intrahepatic cholangiocarcinoma through mechanisms such as cell growth inhibition, apoptosis induction, and angiogenesis inhibition.

研究分野：慢性肝疾患

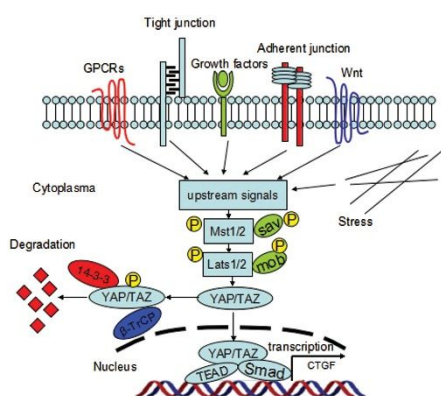
キーワード：肝内胆管癌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

手術不能の肝内胆管癌に対して、国内外で標準治療としてゲムシタピン(GEM)+シスプラチン(CDDP)療法が位置付けられている。しかし生存期間中央値は 12 カ月を超えず、また奏効率も 26.1%と十分な治療効果は得られていない。GEM+S-1 や GEM+CDDP+S-1 などの臨床試験も進行しているが、肝内胆管癌に対して新たな抗癌治療戦略を考えることは急務となっている。

Hippo 経路は活性化すると下流の転写共役因子 YAP1/TAZ をリン酸化する。種々の癌細胞においてはこの Hippo 経路が破綻しており、YAP1/TAZ の脱リン酸化に伴い YAP1 が核内移行して転写因子 TEAD が活性化している。肝内胆管癌や混合型肝癌において、YAP1 の核内発現が顕著に亢進しており、発癌の一因が Hippo 経路の破綻にあることが示唆されている。また TEAD の活性化が肝内胆管癌



の増殖や薬剤抵抗性、血管新生を促進することが報告されている¹⁾(左図)。この Hippo/YAP 経路を制御する因子は多数報告されているが、アンジオテンシン(AT-II)が YAP の核内移行を促進して活性化を促すことが明らかとなっている²⁾。

申請者らはこのことに着目して、最近の報告で肝内胆管癌細胞において AT-II 受容体が発現し、AT-II により Hippo 経路の不活性化を介して YAP の核内移行が促進すること、ARB により YAP 核内移行の抑制とともに腫瘍増殖、血管新生が抑えられることを明らかにしている³⁾。ところが、実臨床において ARB 単剤による抗腫瘍効果は十分ではなく、申請者らも以前から ARB は肝細胞癌や膵癌に対してそれぞれソラフェニブや GEM と併用することでそれらの抗腫瘍効果を増強させることを報告している^{4,5)}。

一方で申請者らは以前より肝前駆細胞の胆管細胞への分化において NOTCH 経路、特に NOTCH1 が重要な役割を果たしていることを報告してきた。また肝内胆管癌の増殖過程では NOTCH 経路が活性化しており、-secretase inhibitor などその経路を阻害することにより肝内胆管癌の増殖抑制効果が得られることが報告されている。さらに、より特異的な作用と有害事象の軽減を目的として、Interprotein 社により NOTCH1 選択的阻害剤が開発され、以前より申請者らと共同研究下に実験を行っている。

2. 研究の目的

本研究では新たな肝内胆管癌治療の標的として、Hippo/YAP 経路および NOTCH1 経路の 2 つに注目して、新たな治療法の確立を模索する。まず新規薬剤である NOTCH1 選択的阻害剤の肝内胆管癌に対する有効性を安全性とともに基礎的に検討する。また、最近の報告では Hippo/YAP 経路と NOTCH 経路のクロストークが報告されており、双方のブロックが相乗効果を生む可能性が示唆されている。そこで、次に NOTCH1 阻害剤と ARB の併用による肝内胆管癌に対する抗腫瘍効果と NOTCH1-Hippo/YAP シグナル伝達の解析を目標とする。さらに上記の検討を踏まえて、肝内胆管癌における薬物療法の治療効果を評価するのに有用な新規バイオマーカーについて網羅的に解析、検証を行う。

3. 研究の方法

細胞試験: ヒト肝内胆管癌株(HuCCT-1、KKU-M213)に両薬剤を添加し、増殖能(WST assay)、細胞周期・アポトーシス関連因子発現の変化、NOTCH 経路・YAP 経路の標的遺伝子の発現(RT-PCR 法、

Western Blotting 法)を検討する。

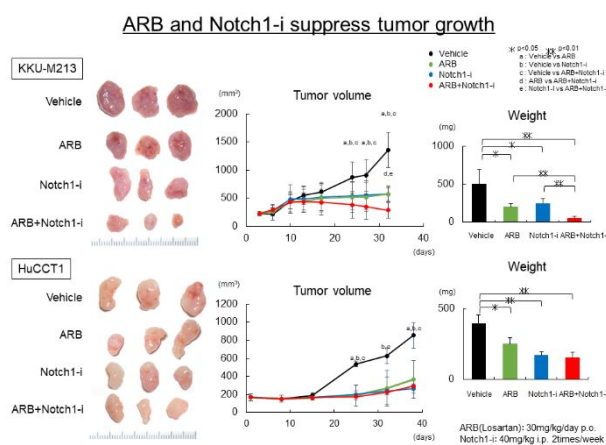
マウス試験: 上述の 2 種類の肝内胆管癌株を用いて xenograft モデルを作成して検討する。BALB/c-nude マウスに肝内胆管癌株を1か所あたり 1×10^6 個接種し、無治療群と NOTCH1 選択的阻害剤投与群(40mg/kg, 週2回)、ARB 投与群(30mg/kg/日)、両剤併用群の4群(各群n=10)に分けて飼育する。腫瘍容積をモニタリングしながら 4 週後に犠死させ、腫瘍重量・容積を評価する。癌細胞増殖抑制、アポトーシス促進効果を病理組織、細胞周期・アポトーシス関連因子の変化(RT-PCR 法、Western blotting 法)で確認する。さらに腫瘍微小環境に対する効果として腫瘍内血管新生の変化について解析する。また、NOTCH-Hippo/YAP 経路の関与について皮下腫瘍内の関連遺伝子・蛋白発現(RT-PCR 法、Western Blotting 法)を評価して検討する。

臨床試験: マウス研究において、各群の皮下腫瘍サンプルを用いて transcriptome 解析を行い、治療前後で変化する遺伝子群の中で NOTCH1 経路、Hippo/YAP 経路に関連する遺伝子を探索、同定する。さらに化学療法前の肝内胆管癌患者の腫瘍生検サンプルを用いて、同定したマーカーが治療効果予測に有用であるかを治療効果、予後と比較することにより臨床的に retrospective に検証する。

4 . 研究成果

In vitro の検討に おいて、ヒト肝内胆管癌株(HuCCCT-1、KKU-M213)に NOTCH1 阻害薬および ARB(ロサルタン)両薬剤を添加したところ、両薬剤ともに単剤で細胞増殖を用量依存的に抑制し、TUNEL 陽性のアポトーシスを誘導した。さらに、ERK、AKT のリン酸化および Cleaved Caspase-3 の発現を有意に抑制していた。また、NOTCH1 阻害薬の添加により、その下流にある Hey/Hes や Sox9 の発現の低下が確認できた。さらに両薬剤を併用したところ、各単剤に比較し増殖抑制・アポトーシス誘導効果が増強された。次に、上述の 2 種類の肝内胆管癌株を用いて xenograft モデルを作成し、NOTCH1 阻害薬、ARB による肝内胆管癌に対する抗腫瘍効果と NOTCH-Hippo/YAP 経路の関与を検証した。1.無治療群、2.ARB 単剤投与群、3.NOTCH1 阻害薬単剤投与群、4.ARB+NOTCH1 阻害薬併用群を作成して、皮下腫瘍の病理学的、分子生物学的検討を行ったところ、In vitro での結果を反映して、ARB 単独群、NOTCH1 阻害薬単独群では腫瘍内の Ki67 陽性の腫瘍細胞の増殖が有意に抑制され、TUNEL 陽性のアポトーシス細胞が有意に増加していた。また、両剤併用群では細胞増殖抑制、アポトーシス誘導が 各単剤群に比べて顕著であった (下図)。

興味深いことに、NOTCH1 阻害薬単独群においても YAP 活性を反映する下流の CTGF,CYR61、



ANKRD1, MFAP5 の mRNA 発現レベルは低下を認め、NOTCH1-YAP の pathway の抑制が関与している可能性が考えられた。一方で、ARB 単独群における NOTCH シグナルの抑制は認められなかった。さらに、ARB 単独群、NOTCH1 阻害薬単独群、併用群において皮下腫瘍内の CD34 陽性血管新生が有意に抑制されていた。

現在、皮下腫瘍を用いた transcriptome 解析、および臨床検体の収集を行っており、研

究期間終了後にも検討を継続する予定としている。

参考文献

- 1) Marti P, Stein C, Blumer T, et al. YAP promotes proliferation, chemoresistance, and angiogenesis in human cholangiocarcinoma through TEAD transcription factors. *Hepatology* 62:1497-1510, 2015.
- 2) Wennmann DO, Vollenbröcker B, Eckart AK, et al. The Hippo pathway is controlled by Angiotensin II signaling and its reactivation induces apoptosis in podocytes. *Cell Death Dis* 5:e1519, 2014.
- 3) Saikawa S, Kaji K, Nishimura N, et al. Angiotensin receptor blockade attenuates cholangiocarcinoma cell growth by inhibiting the oncogenic activity of Yes-associated protein. *Cancer Lett* 434:120-129, 2018.
- 4) Yoshiji H, Noguchi R, Namisaki T, et al. Combination of sorafenib and angiotensin-II receptor blocker attenuates preneoplastic lesion development in a non-diabetic rat model of steatohepatitis. *J Gastroenterol* 49:1421-1429, 2014.
- 5) Noguchi R, Yoshiji H, Ikenaka Y, et al. Synergistic inhibitory effect of gemcitabine and angiotensin type-1 receptor blocker, losartan, on murine pancreatic tumor growth via anti-angiogenic activities. *Oncol Rep* 22:355-360, 2009.

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------