

令和 3 年 4 月 23 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K18083

研究課題名（和文）肝細胞癌細胞と腫瘍血管内皮細胞におけるPFKFB3の発現解析と新規治療法の開発

研究課題名（英文）Analysis of PFKFB3 expression in tumor cells and tumor endothelial cells in hepatocellular carcinoma and new therapy exploration

研究代表者

松本 謙一（Matsumoto, Kenichi）

大阪大学・医学系研究科・招へい教員

研究者番号：60781721

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 1,300,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、肝細胞癌における解糖系促進因子PFKFB3の意義について検討した。肝細胞癌切除標本において、腫瘍細胞および腫瘍血管内皮細胞におけるPFKFB3共陽性群は有意に予後不良であった。PFKFB3阻害剤の有用性を細胞実験とマウス皮下腫瘍モデルで検証したところ、PFKFB3阻害剤は腫瘍増殖抑制効果を示し、腫瘍血管正常化を誘導した。肝細胞癌におけるPFKFB3の高発現は予後不良因子であり、腫瘍増殖の抑制および腫瘍血管正常化によりPFKFB3は肝細胞癌の有望な治療標的となりうることを示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

肝細胞癌に対する最も有効な治療法は外科手術であるが、根治切除後にも高率に肝内転移あるいは肝外転移を来す（5年無病生存率は約30%）。一方、他癌種と比較しても肝細胞癌に対する全身化学療法を選択肢は非常に限られており、新規治療薬の開発は喫緊の課題である。当研究により、肝細胞癌に対して、PFKFB3阻害薬PFK15が糖代謝制御により腫瘍細胞増殖を抑制し、また腫瘍血管正常化を誘導できることが明らかとなった。この結果はPFKFB3を標的とした治療が肝細胞癌の転移を抑制し、再発の減少につながられる可能性を示唆する。

研究成果の概要（英文）：We aimed to investigate the significance of PFKFB3 in HCC, and the effects of the PFKFB3 inhibitor, PFK15, in HCC tumor cells and tumor endothelial cells. Double immunofluorescent staining of PFKFB3 and CD31 in HCC tissues revealed that high PFKFB3 expression in both tumor cells and tumor endothelial cells was significantly correlated with poor prognosis. PFK15 suppressed proliferation of HCC cell line and tumor endothelial cells in vitro. In a subcutaneous tumor model of the HCC cell line with tumor endothelial cells, PFK15 suppressed tumor growth and induced apoptosis. Moreover, PFK15 treatment induced tumor vessel normalization, decreasing vessel diameter with pericyte attachment and improving vessel perfusion. High PFKFB3 expression in both tumor cells and tumor endothelial cells was identified as a novel prognostic marker in HCC. Targeting PFKFB3 via PFK15 might be a promising strategy for suppressing tumor growth and inducing tumor vessel normalization.

研究分野：消化器外科

キーワード：腫瘍血管正常化 解糖系 肝細胞癌

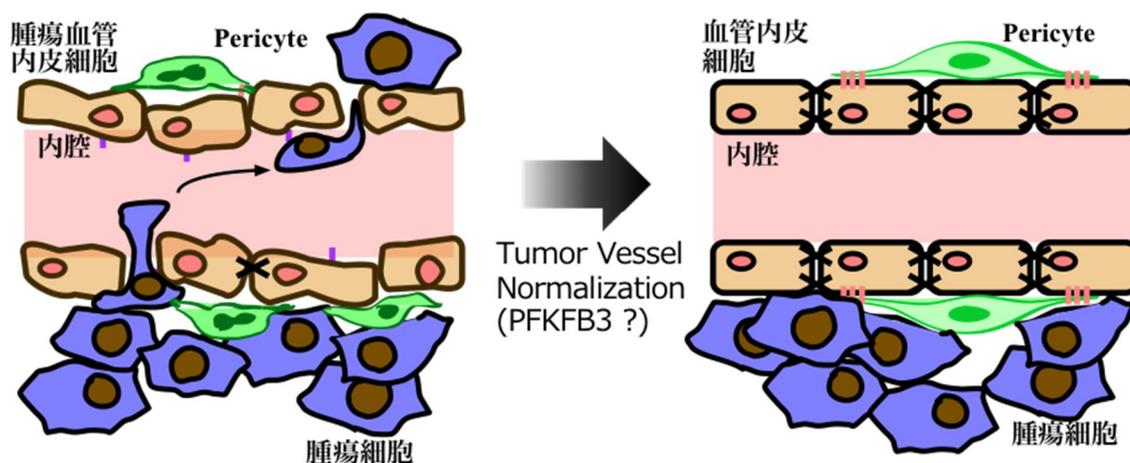
### 1. 研究開始当初の背景

・肝細胞癌は、本邦における癌死亡数の第 5 位に位置付けられており、年間約 3 万人が亡くなっている。主たる治療法は外科的切除であるが再発率は高く依然として予後不良である(5 年無病生存率は約 30%)。肝細胞癌の特徴として豊富な血流支配を受けた多血性腫瘍であることが挙げられる。例えば、支配動脈を塞栓物質により閉塞させ、栄養動脈の遮断を行う、肝動脈化学塞栓術が切除不能肝癌に対する治療選択肢となり、また VEGF 受容体に対する分子標的薬が臨床的に使用されている。しかし上記の治療においても、肝細胞癌を根治せしめることは不可能であり、新たなアプローチが必要である。

・正常血管と腫瘍血管の違い：正常血管(図 1 右)では血管内皮細胞が管腔を形成し、壁細胞やペリサイトが裏打ちしている。腫瘍血管(図 1 左)は正常血管と比較して病理組織学的に未熟である。内皮細胞間の接着が疎であり、壁細胞やペリサイトの裏打ちも未熟であるため、血管透過性は亢進している。このため、異常な腫瘍血管は転移を引き起こすと考えられている。また、蛇行して走行し、内腔が不規則であるため酸素運搬や抗癌剤の到達が不十分となると考えられている。

・腫瘍血管正常化(Tumor Vessel Normalization, 図 1)は、2005 年に初めて提唱された概念で、腫瘍血管新生を阻害するのではなく、腫瘍血管を正常血管に近い安定した形態へ変化させることにより血流を安定化させ、腫瘍の転移を抑制し、抗癌剤の効果を改善させる (Jain RK, et al. Science 2005)。

図1. 腫瘍血管正常化のシエマ



これは、腫瘍を兵糧攻めにすることをコンセプトにしていた従来の血管新生阻害薬が長期的に耐性を生じ、抗腫瘍効果が持続しないという臨床的知見の蓄積と、過剰な血管新生阻害はむしろ hypoxia や acidosis といった腫瘍に有利な環境を生じた結果、耐性化や転移を促進するという基礎研究結果に基づく (当教室からも肝細胞癌について報告した: Yamada D, et al. Ann Surg Oncol 2012)。

・PFKFB3(6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2, 6bisphosphatase3) は解糖系を構成する酵素の一つで主要な律速因子である。癌細胞は、大量のグルコースに依存しており、癌治療において糖代謝が新たな治療ターゲットとして注目を浴びつつある。PFKFB3 が複数種の癌細胞で高発現し、治療対象となりうるということが報告されてきている。その中で、腫瘍血管内皮細胞における PFKFB3 を介した糖代謝が、癌の転移および化学療法に関与していることが報告された (Cantelmo, et al. Cancer Cell 2016)。

研究課題の核心をなす学術的「問い」

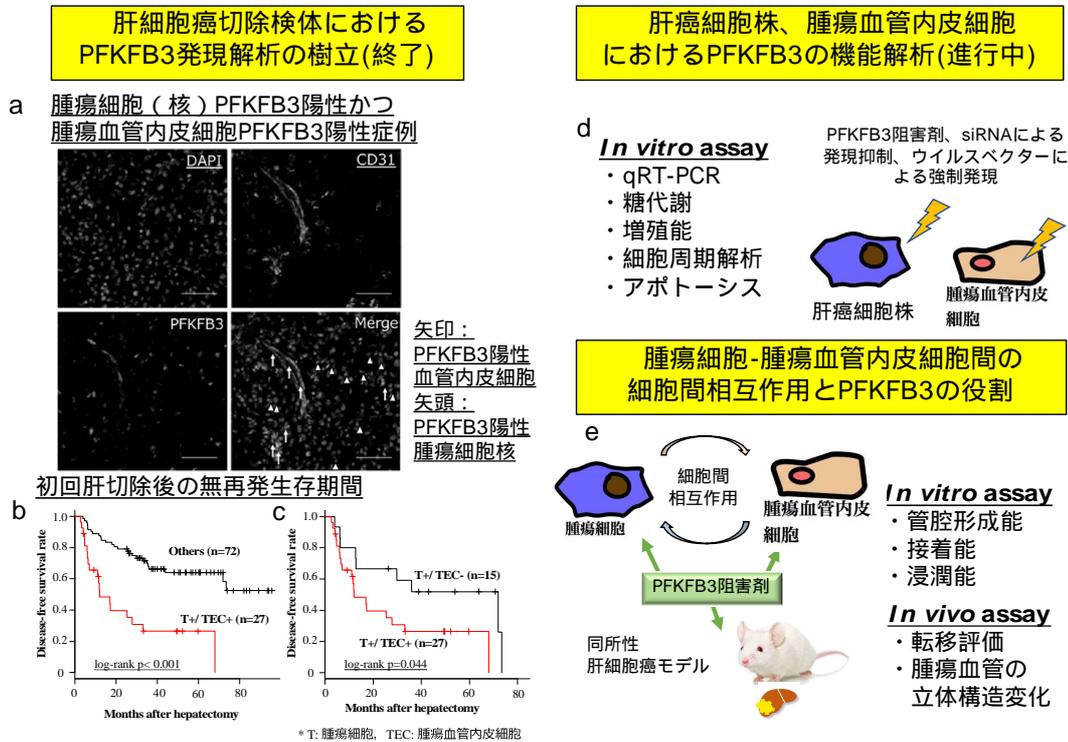
：本研究ではこのような背景から、肝細胞癌に対して、PFKFB3 を介した糖代謝制御により腫瘍細胞増殖を抑制し、また腫瘍血管正常化により、転移を抑制し、再発の減少につなげられるのではないかと考えた。

### 2. 研究の目的

肝細胞癌における腫瘍血管正常化と糖代謝制御によって新規治療法探索をすること。

### 3. 研究の方法

## 図2. 研究実施計画



### (1) 肝細胞癌切除検体における PFKFB3 発現解析 (図 2a-c)

肝細胞癌切除検体において、癌部および腫瘍血管内皮細胞における PFKFB3 の発現を蛍光 2 重免疫染色にて解析を行った。図 2a は腫瘍細胞および腫瘍血管内皮細胞の共陽性例の染色結果である。腫瘍細胞および腫瘍血管内皮細胞の共陽性例(T+/TEC+, 赤線)は、共陰性例や片群のみ陽性例(Others)と比較して有意に予後不良であった(図 2b)。特に、腫瘍細胞陽性例(T+)のうち、腫瘍血管内皮細胞における PFKFB3 の発現の有無によって再発予後に差が見られた(T+/TEC+, 赤線 vs. T+/TEC-, 黒線, 図 2c)ことは、腫瘍血管内皮細胞の PFKFB3 発現が患者の予後に影響を及ぼしていることが示唆される。

### (2) 癌細胞株および腫瘍血管内皮細胞における PFKFB3 の機能解析 (図 2d)

ヒト肝癌細胞株において、in vitro にて PFKFB3 の発現を qRT-PCR, Western blot にて検討する。PFKFB3 の機能解析として、PFKFB3 阻害剤や siRNA などによる発現抑制、ウイルスベクターによる強制発現による細胞機能の変化を検討する。糖代謝を Glycolysis assay、増殖能を MTT assay、細胞周期・アポトーシスの変化を Flow cytometry により検討する。腫瘍血管内皮細胞は、肝細胞癌切除検体から磁気細胞分離法(MACS)により分離培養し、同様の解析を行う。

### (3) 癌細胞-腫瘍血管内皮細胞間における細胞間相互作用と PFKFB3 の役割 (図 2e)

共培養による血管内皮細胞-癌細胞間の接着能、浸潤能を in vitro にて評価する(正常血管内皮細胞と腫瘍血管内皮細胞の比較)。

in vivo ではマウス同所性肝細胞癌モデルを用いて、PFKFB3 阻害薬による腫瘍および腫瘍血管への影響を評価する(転移の増減、腫瘍血管の構造変化等)。腫瘍血管の立体的構造変化は、組織透明化法と蛍光免疫染色法により 3 次元にて評価する。

## 4. 研究成果

(1) 当院にて根治切除を施行した肝細胞癌 99 例を用いた 2 重蛍光免疫組織染色により、腫瘍細胞と TEC における PFKFB3 の発現を評価し予後との関連を検討した。TEC は腫瘍組織内の CD31 陽性細胞とした。腫瘍細胞と TEC のいずれにおいても PFKFB3 を発現していた 27 例 (PFKFB3 共発現群)は、その他の 72 例と比較して、年齢・性別・肝機能・腫瘍個数・腫瘍径等に差を認めなかった。しかし PFKFB3 共発現群は、その他の群と比較して予後不良であった(2 年無病生存率:40% vs 79%,  $p < 0.001$ ; 2 年全生存率:76% vs 99%,  $p = 0.026$ )。また単変量・多変量解析の結果、腫瘍個数、腫瘍径、PFKFB3 の共発現は、無病生存率(DFS)における独立予後不良因子であった。

(2) マウス肝癌細胞株(BNL 1 ME A.7R.1)を用いてマウス皮下腫瘍モデルを作成し、抗 CD31 抗体を用いた磁気細胞分離法により、腫瘍組織から TEC および NEC を精製・培養した。PFKFB3 の発現を、蛍光細胞染色および western blot により解析した。BNL と TEC は、NEC と比較して PFKFB3 を高発現していた。選択的 PFKFB3 阻害剤(PFK15)による解糖系への影響を、細胞内 Fructose 6-phosphate(F6P)量、培養上清における ATP・乳酸産生量にて評価した。また細胞増殖への効果を検討した。BNL と TEC は、PFK15 により、細胞内 F6P 量の増加および ATP・乳酸産生の低下を認めた。また、BNL と TEC は、より低濃度の PFK15 で細胞増殖が抑制された。siRNA を用いた PFKFB3 遺伝子発現抑制でも同様の結果であった。

(3) 次に、マウスに BNL と TEC を混合して皮下腫瘍を作成し、腫瘍形成率および腫瘍体積の変化を検討し、また腫瘍における Ki67 陽性細胞数を検討した。BNL と TEC を混合した皮下腫瘍は BNL のみで作成した皮下腫瘍と比較して、腫瘍形成率の増加および腫瘍体積の増加を認め、また Ki67 陽性細胞数の有意な増加を認めた。BNL と TEC を混合した皮下腫瘍モデルにおいて、PFK15 腹腔内投与による抗腫瘍効果を検討した。さらに摘出した腫瘍における Ki67 陽性細胞数、アポトーシスの有無を検討した。PFK15 投与により腫瘍体積の有意な縮小、および Ki67 陽性細胞数の低下、アポトーシス陽性細胞数の増加を認めた。摘出した腫瘍における腫瘍血管の血管径を計測し、CD31 と  $\alpha$ -SMA の蛍光 2 重免疫染色によりペリサイト定着率、さらに腫瘍灌流域の検出に DyLight649 標識トマトレクチン、低酸素領域の検出にピモニダゾールを用いて評価した。PFK15 投与により腫瘍血管の血管径は縮小し、ペリサイト定着率が有意に増加していた。また腫瘍灌流域の増加、および腫瘍内低酸素領域の減少を認めた。

(4) 以上より、肝細胞癌において腫瘍細胞および腫瘍血管内皮細胞における PFKFB3 共発現が予後因子である可能性が示された。また解糖系酵素 PFKFB3 の機能抑制は、腫瘍細胞に対する増殖抑制効果および腫瘍血管正常化の誘導を介して、肝細胞癌に対する有効な治療法となりうることを示唆された。

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 0件）

1. 著者名 Matsumoto Kenichi, Noda Takehiro, Kobayashi Shogo, Sakano Yoshihiro, Yokota Yuki, Iwagami Yoshifumi, Yamada Daisaku, Tomimaru Yoshito, Akita Hirofumi, Gotoh Kunihito, Takeda Yutaka, Tanemura Masahiro, Umeshita Koji, Doki Yuichiro, Eguchi Hidetoshi	4. 巻 500
2. 論文標題 Inhibition of glycolytic activator PFKFB3 suppresses tumor growth and induces tumor vessel normalization in hepatocellular carcinoma	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Cancer Letters	6. 最初と最後の頁 29 ~ 40
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.canlet.2020.12.011	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 松本謙一
2. 発表標題 肝細胞癌における解糖系酵素PFKFB3の機能抑制は腫瘍増殖を抑制し腫瘍血管正常化を誘導する
3. 学会等名 第76回日本消化器外科学会総会
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
---------	---------