

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：16101

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K15968

研究課題名(和文) 肝細胞癌に対する新規分子標的薬併用化学放射線療法の相乗効果とその機序

研究課題名(英文) Synergistic effects of chemoradiotherapy with novel molecular targeted agents against hepatocellular carcinoma

研究代表者

田中 宏典 (TANAKA, Hironori)

徳島大学・病院・特任助教

研究者番号：40792388

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：各肝細胞株に対してレンバチニブを添加し細胞生存率を評価したところ、用量依存性に抗腫瘍効果が認められた。次いで、最も抗腫瘍効果が高かったHuH-7細胞を用いて、レンバチニブの投与および放射線の照射を行ったところ、用量(線量)依存的に抗腫瘍効果が認められた。以上の結果をもとに併用治療のCombination indexを算出したところ、CI<1.0を示し相乗効果が確認された。続いて、アポトーシス誘導の有無をフローサイトメトリー法により評価したところ、レンバチニブ群及び放射線群ではAnnexin V 陽性細胞率が高かった。さらに、併用群では4群の中で最も強いアポトーシス誘導が観察された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

最近、ソラフェニブに加え、レンバチニブなどの新しいTyrosine kinase inhibitor (TKI)が開発され、進行肝細胞癌に対する治療薬として承認された。治療困難な門脈浸潤を有する肝癌に、これらのTKIと放射線照射を組み合わせれば、より高い抗腫瘍活性を発揮し、腫瘍浸潤を制御しうることが期待される。また、治療の作用機序を解明することにより、有効な症例を選別する、あるいは拮抗薬や作動薬を併用して効果を高めることが可能になると期待される。

研究成果の概要(英文)：Lenvatinib was added to each hepatoma cell line, and cell viability was evaluated, revealing a dose-dependent antitumor effect. Next, lenvatinib was administered and irradiated, and a dose-dependent antitumor effect was observed. Based on these results, the combination index of the combination treatment was calculated, showing a CI<1.0, showing a synergistic effect. Next, the apoptosis induction was evaluated by flow cytometry, and the rate of Annexin V positive cells was high in the lenvatinib and radiation groups. Furthermore, the strongest apoptosis induction was observed in the combination group among the four groups.

研究分野：肝癌

キーワード：hepatocellular carcinoma radiotherapy chemotherapy

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

最近、ソラフェニブに加え、レゴラフェニブ、レンバチニブ、カボザンチニブなどの新しい Tyrosine kinase inhibitor (TKI)が開発され、進行肝細胞癌に対する治療薬として承認された。特に、最近承認されたレンバチニブは抗腫瘍活性が高く、第3相試験における奏効率は40%に及ぶ。

治療困難な門脈浸潤を有する肝癌に、これらのTKIと放射線照射を組み合わせれば、より高い抗腫瘍活性を発揮し、腫瘍浸潤を制御しうることを期待される。また、治療の作用機序を解明することにより、有効な症例を選別する、あるいは拮抗薬や作動薬を併用して効果を高めることが可能になると期待される。

このように、肝癌細胞に対する化学放射線療法において、アポトーシス誘導や細胞増殖抑制の効果およびその機序を解明することは、薬剤感受性(耐性)因子の同定、耐性の克服、個別化治療など肝癌の有効な治療法の確立にきわめて重要である。

2. 研究の目的

本研究では、まず肝癌細胞株を用いてレンバチニブ、レゴラフェニブ、ソラフェニブ、カボザンチニブと放射線治療の相乗効果の有無(程度)を明らかにする。また、相乗効果の得られた薬剤を用いて、アポトーシス誘導や細胞増殖抑制の機序ならびに相乗効果の機序検討をする。

3. 研究の方法

肝癌細胞株(HuH-1、HuH-7、PLC/PRF5、HepG2、HLE、HLF、SKHep1、Hep3Bなど)に対して分子標的薬(ソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ、カボザンチニブ)の添加、X線照射を行い、その相乗効果の有無を確認する。相乗効果が得られた肝癌細胞株を用いてWestern Blot法により抗腫瘍効果にかかわる蛋白を同定する。

(1) 肝癌細胞株に対するソラフェニブ、レゴラフェニブ、レンバチニブ、カボザンチニブの殺細胞効果およびX線との相乗効果の検討

薬剤の殺細胞効果に関しては、3000個の肝癌細胞株を播種させ、24時間後に各薬剤の希釈溶液を添加する。その72時間後にWST-8アッセイにより細胞生存率を算出する。同様に肝癌細胞株を96wellプレートに播種させ、24時間後に各薬剤希釈溶液を添加、直後に0~10GyのX線照射を行い、さらに120時間後に細胞生存率を算出する。求められた細胞生存率を用いてmedian-effect法により各薬剤とX線の相乗効果の有無、程度を求める。

(2) 薬剤およびX線照射によるアポトーシス誘導効果

相乗効果が確認された肝癌細胞株をフラスコに播種させる。24時間後に薬剤の添加および、X線の照射を行い、120時間後に蛋白を回収する。回収された蛋白をWestern Blot法によりアポトーシスシグナル伝達に関わる蛋白の発現を検討する。検討する蛋白の発現としては、Bim、Bik、Bid、Bad、Puma、Noxa、Bax、Bak、Caspase-3、8、9、PRAP、Bcl-2、Bcl-xl、Mcl-1等を予定している。

4. 研究成果

肝癌細胞株に対するレンバチニブの殺細胞効果およびX線との相乗効果の検討

各肝癌細胞株(HuH-7、HepG2、Hep3B、PLC/PRF5、HLE、HLF)を96well plateに播種後、24時間後に種々の濃度のレンバチニブを添加、72時間後にWST-8 assayを用いて細胞生存率を評価したところ、レンバチニブの用量依存性に抗腫瘍効果が認められた(図1)。

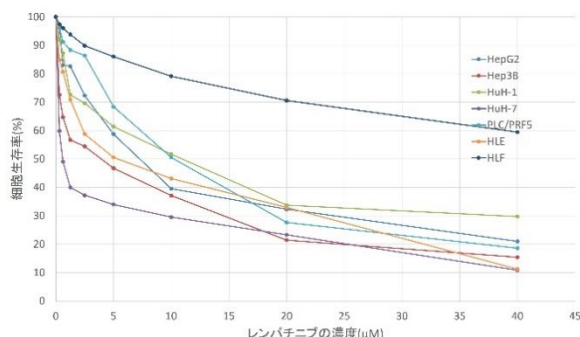


図1.レンバチニブ濃度と細胞生存率の関係

同様に、細胞播種の翌日に種々の線量のX線を照射し、120時間後に細胞生存率を評価したところ、放射線の線量依存性に抗腫瘍効果を認めた(図2)。

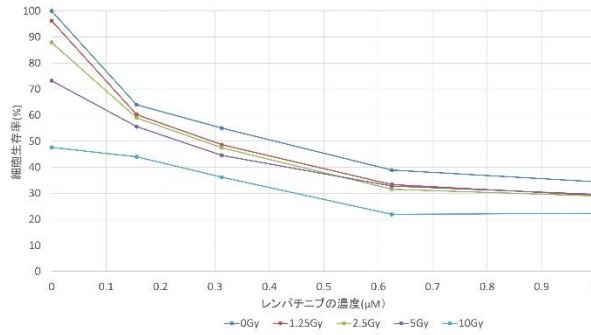


図2. 各放射線照射量でのHuH-7細胞の細胞生存率の比較(レンバチニブ添加時)

次いで、最も抗腫瘍効果が高かった HuH-7 細胞を用いて、播種翌日にレンバチニブの投与および放射線の照射を行い、120時間後に細胞生存率を評価したところ、いずれに対しても用量(線量)依存的に抗腫瘍効果が認められた。以上の結果をもとに併用治療の Combination index を算出したところ、レンバチニブと放射線の組み合わせにおいて CI<1.0 を示し、相乗効果が確認された(図3)。

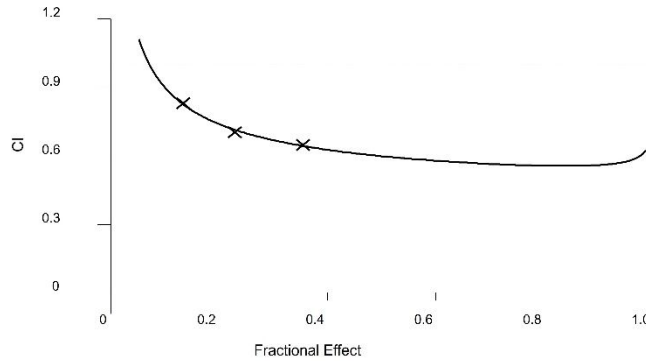


図3. レンバチニブとX線の併用治療によるCombination Index(CI)

続いて、抗腫瘍効果の機序についてアポトーシス誘導の有無をフローサイトメトリー法により評価したところ、コントロール群と比較してレンバチニブ単独群及び放射線単独群では Annexin V 陽性細胞率が高かった。さらに、併用群では4群の中で最も Annexin V 陽性細胞率が高く、強いアポトーシス誘導が観察された(図4,5)。

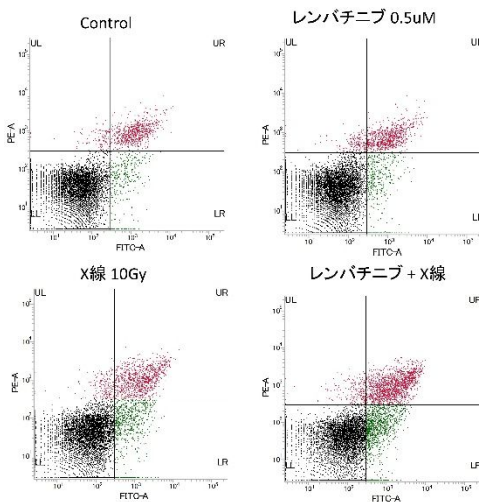


図4 flow cytometryによる解析結果

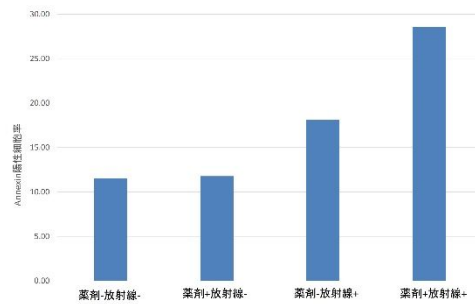


図5 Annexin陽性を示す細胞の割合

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