

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 13 日現在

機関番号：15501

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23590978

研究課題名(和文) 進行肝細胞癌に対する鉄キレート剤と分子標的治療薬併用による新規治療法の開発

研究課題名(英文) The development of new combination therapy with deferasirox and sorafenib on advanced hepatocellular carcinoma

研究代表者

山崎 隆弘 (YAMASAKI, Takahiro)

山口大学・医学(系)研究科(研究院)・教授

研究者番号：00304478

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円、(間接経費) 1,200,000円

研究成果の概要(和文)：切除不能肝癌治療薬である分子標的治療薬ソラフェニブは、肝癌再発抑制効果も期待されている。しかし、肝機能不良例や副作用の問題でその使用には制限がある。我々は鉄キレート剤deferoxamineが肝線維化ならびに前癌病変を抑制することを報告してきた。

我々は、経口鉄キレート剤deferasirox(DFX)とソラフェニブ併用による肝線維化・発癌抑制効果とSorafenibの副作用抑制効果を検討した。併用療法により、単独群より著明に肝線維化ならびに前癌病変を抑制し、さらにソラフェニブ群と比較して副作用も軽減させた。DFXとソラフェニブ併用は、肝癌根治後の再発予防療となりうる。

研究成果の概要(英文)：Sorafenib is expected to have a chemopreventive effect on hepatocellular carcinoma (HCC). However, there are limitations to its use because of adverse effects, including effects on liver function. We have reported that the iron chelator deferoxamine can prevent liver fibrosis and preneoplastic lesions. We investigated the influence of administering an oral iron chelator, deferasirox (DFX), on the effects of sorafenib. The combination of DFX+sorafenib markedly prevented liver fibrosis and preneoplastic lesions better than the other treatments. Furthermore, the combination therapy produced significantly fewer adverse effects such as body weight and hand-foot skin syndrome compared with the sorafenib group. The combination therapy with DFX and sorafenib may be a useful adjuvant therapy to prevent recurrence after curative treatment of HCC.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

キーワード：鉄キレート剤 CDAAModel Deferasirox Sorafenib Deferoxamine DEN肝発癌モデル 肝細胞癌

1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌(以下肝癌)は、本邦では癌死亡第4位(年間約3万人)の癌であり、他の癌腫と異なり、年率15-20%と再発率が高く、5年で約80%の患者が再発を余儀なくされる。2009年版肝癌診療ガイドラインには、肝癌治療は肝機能と腫瘍占拠の状態により、肝切除・局所療法・塞栓・動注・肝移植・緩和ケアを選択するよう記載されており、再発を繰り返すたびに、そのときの背景肝および癌の状態により、治療法が選択されているのが現状である。

近年、RAF-MEK-ERKを介する増殖因子伝達シグナル系と血管新生のシグナル伝達系などを選択的に阻害する分子標的治療薬 Sorafenib が欧米の global trial において門脈浸潤あるいは遠隔転移を有する進行肝癌に対して有効であるとの結果が示され、2009年5月から肝癌にも保険適応となった。Sorafenib は既存の治療法とは異なり、内服薬で癌をコントロールする薬剤であり、現在 Sorafenib を用いた様々な臨床試験が行われており、今後計画されているが、上述の既存の治療法(肝切除、局所療法、塞栓、動注)との組み合わせにより予後が向上することが期待されている。しかしながら、わが国の市販後調査における有害事象の発生頻度は高く、また日本人における Sorafenib の有効性および安全性に関する情報は少ない。高齢者の多いわが国の実情を考えると、有害事象を軽減させ、長期継続治療をさせる工夫が必要であり、なおかつ有効性の向上が望まれる。鉄キレート剤である Desferoxamine(DFO)は、慢性鉄過剰症に対して用いられる薬剤であり、我々はすでに DFO が in vitro において肝癌細胞株の増殖を抑制し、アポトーシスの誘導を引き起こすことを確認しており、細胞周期関連蛋白の評価にて、Cyclin D1 や Cyclin dependent kinase 4 などの発現低下を認めた。in vivo においても初期の肝硬変状態では前癌病変の減少ならびに線維化改善効果が確認されたが、末期の肝癌合併肝硬変状態においては十分な抗腫瘍効果は認められず、鉄キレート剤単独での効果は不十分であった。また 2008年6月より内服剤 Deferasirox(DFX)も慢性鉄過剰症に対して使用可能となったため、Sorafenib の有害事象を軽減しつつも、有効性向上を狙うカウンターパートナーとして鉄キレート剤 Deferasirox(DFX)を使用した研究に至った。

2. 研究の目的

肝発癌動物モデルを使用して、分子標的治療薬 Sorafenib と鉄キレート剤併用による肝細胞癌・肝線維化治療への相乗効果とその機序について解析した。

3. 研究の方法

(1) 肝線維化・発癌モデルラットを使用した治療効果の検討

Rat CDAA 食モデルに DFX 単剤群(DFX 20mg/kg/day)、単剤群(Sorafenib 16mg/kg/day)、DFX+Sorafenib 併用群を経口投与し 16~20 週間飼育した。肝前癌病変抑制効果を GST-P 染色と肝組織 8-OHdG, 4HNE 染色と ELISA で評価、肝線維化抑制効果を Azan, Sirius red 等免疫染色と定量 PCR 解析で Collagen1, TIMP1, 2 mRNA 等線維化関連遺伝子を評価した。また組織 DNA array で変動遺伝子発現の網羅的解析を行い、皮膚症状・出血傾向等評価した。

(2) 肝癌合併肝硬変マウスモデルを使用した治療効果の検討

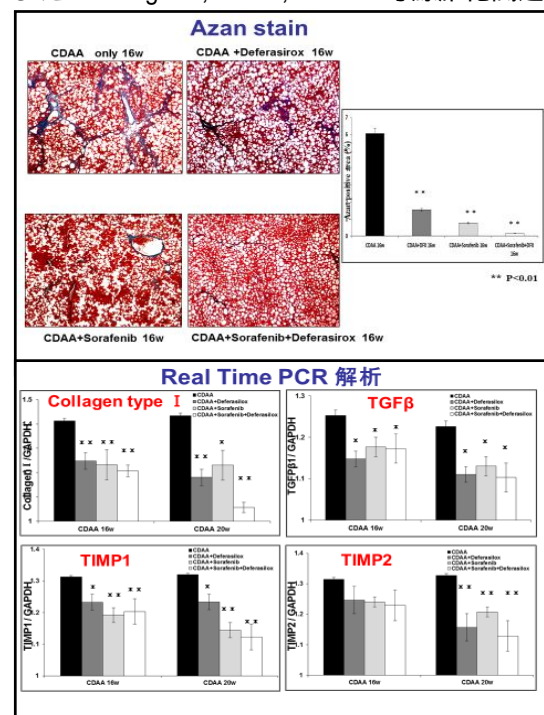
生後 2w のマウスに DEN 10mg/kg 腹腔内投与し、6w 後より CCl₄ 0.5mg/kg 週 2 回投与を開始し、4 カ月後に肝癌合併肝硬変モデルを作成、肝臓組織を摘出し、肝線維化抑制・肝腫瘍の抑制効果を解析・検討した。

(3) 肝癌細胞株を使用した in vitro での検討

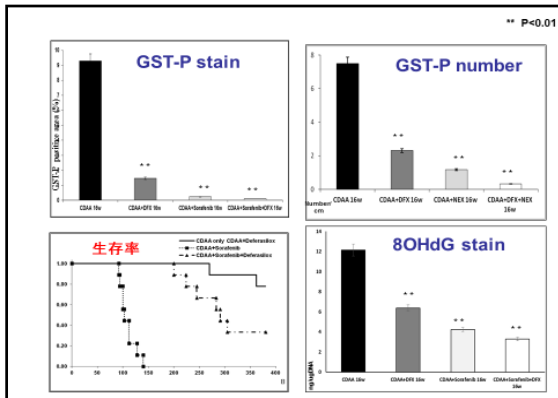
HepG2、HuH7、Hep3B を用いて、Sorafenib、Sorafenib+Deferasirox、Deferasirox の投与による細胞増殖制御の有無、アポトーシスの誘導等を評価した。また Sorafenib と Deferasirox の効果のメカニズムを解析するために、DNA-Chip にて評価を行い、Western Blot にて Cell cycle 関連蛋白(Cyclin D1、Cyclin dependent kinase 4)などの発現を検証した。

4. 研究成果

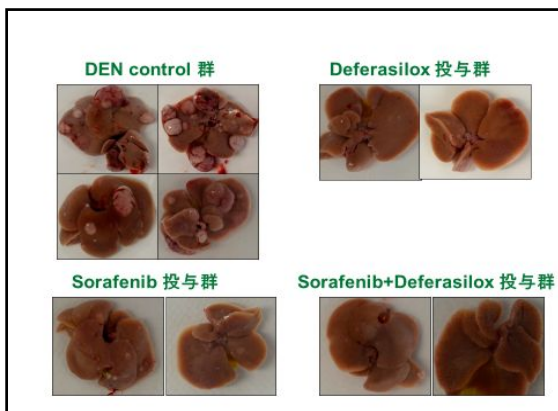
(1) Rat CDAA 食モデルで Azan, Sirius Red 染色より肝線維化は DFX 単剤群、Sorafenib 単剤群も抑制を認めたが、DFX+Sorafenib 併用群の方がより有意に抑制していた。また Collagen1, TIMP1, 2 mRNA 等線維化関連



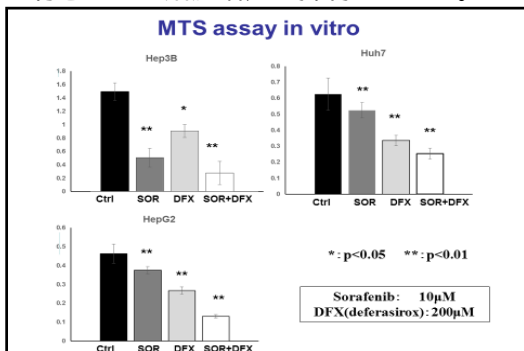
遺伝子の発現も有意に抑制した(P<0.01)。GST-P 陽性前癌病変は個数・サイズ共に DFX+Sorafenib 併用群で有意に抑制し、組織 80HdG, 4HNE の発現も抑制した(P<0.01)。紅斑等皮膚症状や体重減少・出血傾向等 Sorafenib の副作用症状は DFX+Sorafenib 併用群で有意に抑制し、生存率も改善した。



(2) DEN /CC1₄ 発癌モデルの解析では、DFX 単剤群、Sorafenib 単剤群もそれぞれ腫瘍の個数・範囲ともに抑制傾向を認めたが、DFX+Sorafenib 併用群の方がさらに腫瘍の範囲・個数共により有意に抑制していた。



(3) HepG2、HuH7、Hep3B 等のヒト肝細胞癌株を用いた Sorafenib 投与群、Sorafenib+Deferasirox 併用投与群、Deferasirox 投与群での細胞増殖制御の有無を MTS アッセイで確認したところ、DFX 単剤群、Sorafenib 単剤群も肝がん細胞増殖抑制を認めたが、DFX+Sorafenib 併用群の方がより有意にがん細胞増殖を抑制していた。



また Caspase3 activity アッセイでは DFX 単剤群、Sorafenib 単剤群も肝がん細胞のアポトーシス作用を認めたが、DFX+Sorafenib 併用群の方がより有意にアポトーシス作用を認めた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

(雑誌論文)(計 11 件)

Ishikawa T, Shiratsuki S, Matsuda T, Iwamoto T, Takami T, Uchida K, Terai S, Yamasaki T, Sakaida I. Occlusion of portosystemic shunts improves hyperinsulinemia due to insulin resistance in cirrhotic patients with portal hypertension. J Gastroenterol. 査読有 2013 Oct 5.

Oono T, Yamasaki T, Zaitzu J, Saeki I, Iwamoto T, Harima Y, Marumoto Y, Hidaka I, Urata Y, Ishikawa T, Takami T, Segawa M, Uchida K, Terai S, Kunitugu I, Tanabe T, Sakaida I. Association of tyrosine with insulin resistance in hepatitis C virus-related chronic liver disease. Hepatol Res. 査読有 2013 Aug 1. doi: 10.1111/hepr.12213.

Zaitzu J, Yamasaki T, Saeki I, Harima Y, Iwamoto T, Harima Y, Matsumoto T, Urata Y, Hidaka I, Marumoto Y, Ishikawa T, Takami T, Yamamoto N, Kaino S, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Serum transferrin as a predictor of prognosis for hepatic arterial infusion chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma. Hepatol Res. 査読有 2014 May;44(5):481-90. Epub 2013 May 22. doi: 10.1111/hepr.12141.

Sato A, Sata M, Ikeda K, Kumada T, Izumi N, Asahina Y, Osaki Y, Chayama K, Kaneko S, Sakai A, Onji M, Hiasa Y, Omura T, Ozeki I, Yokosuka O, Shiina S, Itsubo M, Nishiguchi S, Hirano K, Ide T, Sakisaka S, Yamasaki T, Hidaka I, Tanaka M, Kim SR, Ichida T. Clinical characteristics of patients who developed hepatocellular carcinoma after hepatitis C virus eradication with interferon therapy: current status in Japan. Intern Med. 査読有 2013;52(24):2701-6.

Saeki I, Terai S, Fujisawa K, Takami T, Yamamoto N, Matsumoto T, Hirose Y, Murata Y, Yamasaki T, Sakaida I. Bortezomib induces tumor-specific cell death and growth inhibition in hepatocellular carcinoma and improves liver fibrosis. J Gastroenterol. 査読有 2013 Jun;48(6):738-50. doi:10.1007/s00535-012-0675-z. Epub 2012 Sep 26.

Tsuchiya M, Yamasaki T, Sakaida I. Evaluation of a novel non-invasive (13) C-glucose breath test for the identification of diabetes mellitus in cirrhotic patients. *Hepatol Res*. 査読有 2012Dec;42(12):1196-201. doi:10.1111/j.1872-034X.2012.01035.x. Epub 2012 May 14.

Koda M, Murawaki Y, Hirooka Y, Kitamoto M, Ono M, Sakaeda H, Joko K, Sato S, Tamaki K, Yamasaki T, Shibata H, Shimoe T, Matsuda T, Toshikuni N, Fujioka S, Ohmoto K, Nakamura S, Kariyama K, Aikata H, Kobayashi Y, Tsutsui A. Complications of radiofrequency ablation for hepatocellular carcinoma in a multicenter study: An analysis of 16 346 treated nodules in 13 283 patients. *Hepatol Res*. 査読有 2012 Nov;42(11):1058-64. doi: 10.1111/j.1872-034X.2012.01025.x. Epub 2012 May 14.

Okita K, Yamasaki T, Hamabe S, Saeki I, Harima Y, Terai S, Sakaida I. Hepatic arterial infusion chemotherapy in combination with pegylated interferon- α 2b for advanced hepatocellular carcinoma. *Hepatogastroenterology*. 査読有 2012 Mar-Apr;59(114):533-7. doi: 10.5754/hge10013.

Yamasaki T, Saeki I, Harima Y, Zaitzu J, Maeda M, Tanimoto H, Iwamoto T, Hidaka I, Urata Y, Ishikawa T, Takami T, Yamaguchi Y, Uchida K, Terai S, Sakaida I. Effect of transcatheter arterial infusion chemotherapy using iodized oil and degradable starch microspheres for hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol*. 査読有 2012Jun;47(6):715-22. doi:10.1007/s00535-012-0537-8. Epub 2012 Feb 11.

Yamasaki T, Sakaida I. Hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma and future treatments for the poor responders. *Hepatol Res*. 査読有 2012 Apr;42(4):340-8. doi:10.1111/j.1872-034X.2011.00938.x. Epub 2011 Dec 13.

Yamasaki T, Terai S, Sakaida I. Deferoxamine for advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med*. 査読有 2011 Aug 11;365(6):576-8. doi: 10.1056/NEJMc1105726

[学会発表](計 17 件)

Yamasaki T. Iron chelator therapy for advanced hepatocellular carcinoma 8th international Symposium on Alcoholic Liver and Pancreatic Diseases and

Cirrhosis, ALPD2013(招待講演), 2013 年 11 月 16 日, The Ashok New Delhi India

Yamamoto N, Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, et al. The new oral iron chelator, Defeasirox, is the new drug to prevent Liver fibrosis and Hepatocarcinogenesis, 64th Annual Liver Meeting in AASLD 2013, 2013 年 11 月 5 日, Washington Convention Center Washington DC USA

Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, et al. Association of tyrosine with insulin resistance in hepatitis C virus-related chronic liver disease, 64th Annual Liver Meeting in AASLD 2013, 2013 年 11 月 4 日, Washington Convention Center Washington DC USA

Yamamoto N, Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, et al. The new oral iron chelator prevent Liver fibrosis and preneoplastic lesions in liver cancer and liver cirrhosis model, 21th United European gastroenterology Week (UEGW) 2013, 2013 年 10 月 15 日, ICC Berlin Germany

Yamamoto N, Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, et al. The new oral iron chelator prevent Liver fibrosis and preneoplastic lesions in liver cancer and liver cirrhosis model, 23th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2013, 2013 年 6 月 8 日, Suntec Singapore, Singapore

Yamasaki T, Yamamoto N, Terai S, Sakaida I, et al. Serum transferrin as a predictor of prognosis for hepatic arterial infusion chemotherapy in advanced hepatocellular carcinoma, 23th Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver (APASL) 2013, 2013 年 6 月 7 日, Suntec Singapore, Singapore

佐伯 一成, 山崎 隆弘, 坂井田 功. 進行肝細胞癌に対する鉄代謝からみた肝動注化学療法の適応と限界, 第 49 回日本肝臓学会総会, 2013 年 6 月 6 日, 京王プラザホテル, 東京

佐伯 一成, 山崎 隆弘, 浦田 洋平, 寺井 崇二, 坂井田 功. 進行肝癌の治療のパラダイムシフト-肝動注化学療法から鉄キレート剤治療. 第 98 回日本消化器病学会中国支部例会, 2012 年 12 月 1 日, ANA クラウンプラザホテル宇部, 宇部

Sakaida I. Iron and cancer therapy, 20th Yonsei International Gastroenterology Symposium(招待講演), 2012 年 11 月 3 日, Yonsei Seoul, Korea

山崎隆弘, 浦田洋平, 坂井田 功. 進行

肝細胞癌に対するソラフェニブ治療の問題点を克服する鉄キレート剤治療. 第20回JDDW, 2012年10月10日, 神戸ポートピアホテル, 神戸

山崎 隆弘, 土屋昌子, 坂井田 功. 肝硬変における糖代謝異常の現状と肝性糖尿病の新規スクリーニング検査法の有用性. 第20回JDDW, 2012年10月10日, 神戸ポートピアホテル, 神戸

浦田 洋平, 山崎 隆弘, 寺井 崇二, 坂井田 功, 他. 肝細胞癌に対するソラフェニブ治療の問題点の検証-とくに肝予備能と病態制御に注目して-. 第48回日本肝臓学会, 2012年7月21日, 石川県立音楽堂, 金沢

山本 直樹, 寺井 崇二, 山崎 隆弘, 坂井田 功, 他. 肝細胞癌治療に対する鉄キレート剤の新規治療薬としての可能性. 第48回日本肝臓学会総会, 2012年6月7日, ANAクラウンプラザホテル, 金沢

浦田 洋平, 山崎 隆弘, 坂井田 功. 進行肝細胞癌に対する肝動注化学療法の治療成績と限界. 2011年12月9日, 岡山コンベンションセンター, 岡山

Yamasaki T, Terai S, Sakaida I, et al. Effect of a novel transcatheter arterial infusion chemotherapy for hepatocellular carcinoma, 5th ILCA Annual Conference, 2011年9月1日, Hong Kong, China

山崎 隆弘, 寺井 崇二, 坂井田 功, 他. 肝細胞癌に対する新たな塞栓療法: リピオドール+微小デンプン球併用肝動注化学療法(Lipi+DSM-TAI). 第47回日本肝臓学会, 2011年7月29日, 静岡県コンベンションアーツセンター, 静岡

山崎 隆弘, 浦田洋平, 坂井田 功. 肝細胞癌に対するリピオドール+微小デンプン球併用化学療法(Lipi+DSM-TAI): 奏功に寄与する因子の検討. 第47回日本肝臓学会総会, 2011年6月4日, ホテルグランパシフィック LE DAIBA, 東京

〔図書〕(計 1 件)

山崎 隆弘, 山本 直樹, 寺井 崇二, 坂井田 功, 他. へるす出版 コンセンサス癌治療(最新の肝細胞癌の診断と治療), 進行肝臓に対する鉄キレート剤の効果, 2013年 116(112-113)

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称: ソラフェニブの副作用低減剤

発明者: 山本 直樹 山崎 隆弘
坂井田 功

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特許願 2012-243488 号

出願年月日: 24年11月5日

国内外の別: 国内

名称: 分岐鎖アミノ酸(BCAA)による分子標的薬ソラフェニブの副作用軽減効果

発明者: 山本 直樹 坂井田 功

権利者: 山口大学

種類: 特許

番号: 特許願 2011-264687 号

出願年月日: 23年12月2日

国内外の別: 国内

取得状況(計 0 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等: なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山崎 隆弘 (YAMASAKI, Takahiro)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 00304478

(2) 研究分担者

山本 直樹 (YAMAMOTO, Naoki)

山口大学・大学教育機構・講師

研究者番号: 90448283

寺井 崇二 (TERAI, Shuji)

山口大学・大学院医学系研究科・准教授

研究者番号: 00332809

坂井田 功 (SAKAIDA, Isao)

山口大学・大学院医学系研究科・教授

研究者番号: 80263763