

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590962

研究課題名(和文) サイトカイン干渉シグナルに着目したチロシンキナーゼ阻害薬併用療法の開発

研究課題名(英文) Molecular Analysis of Cytokine-mediated Sorafenib Resistance

研究代表者

松田 康伸 (MATSUDA, YASUNOBU)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40334669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：ソラフェニブ(sorafenib)は、進行性肝がんに対する分子標的薬である。肝癌細胞株にサイトカインとsorafenibを同時処理して検討した結果、TGF-betaが強い耐性因子であることを見いだした。数十種の現行医薬を検討した結果、抗てんかん薬valproic acidとsorafenibを併用して投与した場合においてのみ、ソラフェニブの作用が10-25倍に増強されることを見いだした。以上の実験結果から、TGF-betaはsorafenibの耐性因子であり、valproic acidを併用すれば薬剤耐性を克服できるものと思われた。

研究成果の概要(英文)：Sorafenib is a multi-kinase inhibitor for hepatocellular carcinoma. To address whether cytokine-mediated signaling is involved in the drug resistance, hepatoma cells were treated with sorafenib in the presence of several cytokines/growth factors. Obtained results showed that the effect of sorafenib on cell growth was significantly inhibited by TGF-beta. When TGF-beta-treated cells were treated with sorafenib and valproic acid, apoptotic cell numbers were increased as compared with those treated with sorafenib alone. Collectively, combination treatment of valproic acid and sorafenib might improve the efficacy of sorafenib.

研究分野：消化器内科

キーワード：肝がん ソラフェニブ 分子標的薬 薬剤耐性

1. 研究開始当初の背景

ソラフェニブ(sorafenib)は、肝がん治療に唯一有効性が認められている分子標的薬であり、Raf キナーゼや VEGFR (vascular endothelial growth factor receptor) ,PDGFR (platelet-derived growth factor)- β ,KIT , FLT-3 ,RET 等のチロシンキナーゼ阻害作用をもっている。しかしながら現在、ソラフェニブは様々な課題を有していることも明らかにされつつある。例えば、i) 本剤の薬価は極めて高価だが、予後延長効果は3ヶ月に満たないこと、ii) ソラフェニブによる肝癌の完全寛解は0%・部分奏功2.3%と、抗腫瘍効果は高くないこと、iii) 肝障害度が軽度(Child-Pugh分類A)の場合と、中等度の場合(Child-Pugh B)を比較した場合、後者の治療効果が非常に低いこと、などが挙げられる。ソラフェニブは、高度な副作用も有するため、“医薬品と低用量ソラフェニブを併用することによって、低副作用&高奏功な治療法を確立できないか？”という疑問が、臨床現場から派生するのは自然なことと思われる。

そこで本研究では、ソラフェニブの抗腫瘍効果が培養細胞 vs. 臨床現場の間で大きく異なっていること、大半の肝がん患者が慢性肝炎・肝硬変であることに着目し、がん周囲組織で産生されるサイトカインが、ソラフェニブの薬効に何らかの影響を及ぼしている可能性を調べることにした。

2. 研究の目的

本研究は、肝がんの発生源地である慢性肝炎で過剰産生されることが知られているサイトカインが、ソラフェニブの薬効に干渉している可能性について着目した。さらに、本研究で見いだしたサイトカイン干渉作用に基づき、有用な併用療法を確立することが、本研究の最終目標である。

3. 研究の方法

(1) サイトカイン存在下におけるソラフェニブ効果の観察：

肝がん細胞株 (HepG2, PLC/PRF/5 etc.) にあらかじめサイトカイン (HGF, EGF, TGF- β) を添加した状態でソラフェニブ処理を行い、MTT アッセイ (細胞増殖アッセイ) やアネキシンV染色による細胞死の観察を行い、また western blotting による cleaved PARP・などのアポトーシスシグナルを解析し、ソラフェニブを阻害するサイトカインシグナルを検討した。

(2) TGF- β によるソラフェニブ阻害機序の解明：

上記実験の結果、サイトカインの一種 TGF- β がソラフェニブの阻害因子であることが明らかになった。この理由を明らかに

する目的で、様々なストレスキナーゼ・セリンスレオニンキナーゼのリン酸化レベルを western blot 解析した。

(3) TGF- β シグナルを指標にしたソラフェニブ併用療法の探索：

前述の実験(2)の結果、TGF- β 存在下では、ソラフェニブが肝がん細胞のストレスキナーゼ p38MAPK 活性を抑制することができなくなるを見いだした。そこで p38MAPK 活性を指標に、ERK, Raf などの MAPK 経路との関連が既に知られている医薬品をソラフェニブと併用して肝がん細胞株に添加して、TGF- β 存在下でも、ソラフェニブが抗がん作用を発揮できる併用薬を探索した。

4. 研究成果

(1) ソラフェニブ阻害因子の発見：

検討した各種サイトカインのうち、TGF- β のみが、ソラフェニブの殺細胞作用を著明に抑制することを見いだした。TGF- β は、ソラフェニブの殺細胞効果を30-60%に減弱させた。TGF- β は、cleaved PARP を代表とするアポトーシス因子も著明に阻害した。

(2) TGF- β 干渉シグナル因子の発見：

TGF- β がソラフェニブの薬効を阻害する理由を探るため、様々なストレスキナーゼを western blotting 解析した結果、ソラフェニブ本来の作用である、p38MAPK の抑制が TGF- β 存在下では発揮されていないことを見いだした。肝がん細胞株を p38MAPK 阻害剤で前処置した場合は、TGF- β によるソラフェニブ阻害作用が認められなかったことから、TGF- β は、p38MAPK 活性を増強することによって、ソラフェニブの効果を干渉している可能性が示唆された。

(3) TGF- β /p38MAPK シグナルを指標にしたソラフェニブ併用療法の確立：

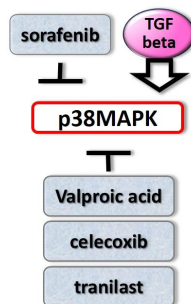
数十種の現行医薬を検討した結果、candesartan・tranilast・celecoxib・valproic acid の組み合わせが、TGF- β による p38MAPK 活性化を抑制し、かつソラフェニブの作用を10-25倍に増強することを見いだした。特に valproic acid (抗てんかん薬) の併用効果は強く、ソラフェニブの効果を3-6倍に増強した。

(4) 考察および今後の展望：

これまでソラフェニブ耐性メカニズムに関する報告は多くなされている。しかしながら、サイトカイン干渉に着目した研究はない。本研究は、肝がん分子標的薬の薬効が、細胞外環境のひとつであるサイトカインに影響されることを初めて明らかにできた。今後は、この新規メカニズムを考慮して、がん治療を行う必要があるものと考えられる(図1)。

(図1) 本研究で明らかになったソラフェニブ耐性機構：ソラフェニブはp38MAPKを抑制する。一方、TGF-betaはp38MAPKを活性化するので、ソラフェニブの効果を相殺する。valproic acidなどの医薬品は、p38MAPKを抑制するので、ソラフェニブ併用療法の有用な候補になりうるものと思われる。

(図1)



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 21 件)

1. Nagahashi M, Matsuda Y, Wakai T. (他 5 名; 7/8 番目) Sphingosine-1-phosphate transporters as targets for Cancer therapy. *Biomed Res Int* 2014;651727 (2014) 査読有
2. Matsuda Y, Wakai T, Takamura M, Yamagiwa S. (他 10 名; 1/3/11/12 番目) Hepatitis B virus X stimulates redox signaling through activation of ataxia telangiectasia mutated kinase. *Int J Clin Exp Pathol* 7(5):2032-2043 (2014) 査読有
3. Matsuda Y, Wakai T, Takamura M, Yamagiwa S. (他 7 名; 1/2/9/10 番目) Valproic acid overcomes transforming growth factor- β -mediated sorafenib resistance in hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol* 7(4):1299-1313 (2014) 査読有
4. Yamagiwa S, Takamura M, Matsuda Y. (他 9 名; 1/3/10 番目) Increase of fucosylated alpha-fetoprotein fraction at the onset of autoimmune hepatitis and acute liver failure. *Hepatology Res in press* (DOI: 10.1111/hepr.12318) 査読有
5. Wakai T. (他 20 名; 20 番目) Development and external validation of a nomogram for overall survival after curative resection in serosa-negative, locally advanced gastric cancer. *Ann Oncol* 25(6):1179-1184 (2014) 査読有
6. Yamagiwa S, Takamura M. (他 5 名; 1/3 番目) Presence of Antibodies against Self Human Leukocyte Antigen Class II Molecules in Autoimmune Hepatitis. *Int J Med Sci* 11(9): 850-856 (2014) 査読有
7. Matsuda Y, Wakai T. (他 4 名; 1/2 番目) P27 is a critical prognostic biomarker in non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocellular carcinoma. *Int J Mol Sci* 14(12):23499-23515 (2013) 査読有
8. Matsuda Y, Wakai T. (他 4 名; 2/5 名). Effects of rapamycin on granulation formation in response to centrally doubled coiled stents as a tracheal substitute. *J Pediatr Surg* 48(12):2416-2424 (2013) 査読有
9. Matsuda Y, Wakai T. (他 4 名; 1/2 番目) Mycotoxins are conventional and novel risk biomarkers for hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol* 19(17):2587-2590 (2013) 査読有
10. Matsuda Y, Wakai T, Takamura M, Yamagiwa S. (他 7 名; 1/2/4/5 番目) Clinical significance of cell cycle inhibitors in hepatocellular carcinoma. *Med Mol Morphol* 46(4):185-192 (2013) 査読有
11. Yamagiwa S, Wakai T, Matsuda Y. (他 11 名; 8/11/13 番目) Hepatitis B virus X induces cell proliferation in the hepatocarcinogenesis via up-regulation of cytoplasmic p21 expression. *Liver Int* 33(8):1218-1229 (2013) 査読有
12. Matsuda Y, Wakai T, Takamura M, Yamagiwa S. (他 5 名; 1/2/5/6 番目) DNA Damage Sensor γ -H2AX is increased in preneoplastic lesions of hepatocellular carcinoma. *Sci World J* 2013:597095:1-7 (2013) 査読有
13. Matsuda Y, Wakai T, Takamura M, Yamagiwa S. (他 6 名; 2/3/8/9 番目) P21-activated kinase-2 is a critical mediator of transforming growth factor- β -induced hepatoma cell migration. *J Gastroenterol Hepatol* 28(6):1047-1055 (2013) 査読有
14. Takamura M, Yamagiwa S, Matsuda Y. (他 2 名; 1/2/3 番目) Involvement of liver-intestine cadherin in cancer progression. *Med Mol Morphol* 46(1): 1-7 (2013) 査読有
15. Wakai T, Matsuda Y. (他 9 名; 2/4 番目) Risk of subsequent biliary malignancy in patients undergoing cyst excision for congenital choledochal cysts. *J Gastroenterol Hepatol* 28(2): 243-247 (2013) 査読有
16. Matsuda Y, Wakai T, Takamura M, Yamagiwa S. (他 6 名; 2/3/6/7 番目) Blockade of ataxia telangiectasia mutated sensitizes hepatoma cell lines to sorafenib by interfering with Akt signaling. *Cancer Lett* 319(1):98-108 (2012) 査読有
17. Matsuda Y. (他 11 名; 7 番目) Plasma cells and the chronic nonsuppurative destructive cholangitis of primary biliary cirrhosis. *Hepatology* 55(3):846-855 (2012) 査読有
18. Yamagiwa S, Takamura M, Matsuda Y, Wakai T. (他 7 名; 2/4/5/8 番目) Reduced NKG2D ligand expression in hepatocellular carcinoma correlates with early recurrence. *J Hepatol* 56(2):381-388 (2012) 査読有
19. Wakai T. (他 7 名; 1 番目) Histologic evaluation of intrahepatic micrometastases in patients treated with or without neoadjuvant chemotherapy for colorectal carcinoma liver metastasis. *Int J Clin Exp Pathol* 5(4):308-314 (2012) 査読有

20. **Takamura M, Yamagiwa S.** (他 10 名; 5/6 番目) Increased susceptibility to severe chronic liver damage in CXCR4 conditional knock-out Mice. *Dig Dis Sci* 57(11): 2892-2900 (2012) 査読有
21. **Takamura M, Yamagiwa S.** (他 8 名; 4/8 番目) Phase I study of miriplatin combined with transarterial chemotherapy using CDDP powder in patients with hepatocellular carcinoma. *BMC Gastroenterol* 12(1):127 (2012) 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

発表者：松田康伸

標題：VALPROIC ACID CONFERS RESISTANCE TO SORAFENIB IN MICE WITH HEPATOCELLULAR CARCINOMA.

学会名：欧州消化器病学会(UEG)

発表日：2013 年 10 月 12 日

場所：ベルリン(ドイツ)

発表者：松田康伸

標題：TGF-BETA IS A CRITICAL MEDIATOR OF SORAFENIB RESISTANCE IN HEPATOCELLULAR CARCINOMA.

学会名：日本癌学会

発表日：2014 年 9 月 25 日

場所：パシフィコ横浜(神奈川県・横浜市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

なし

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松田 康伸 (MATSUDA, Yasunobu)

新潟大学・医歯学系・准教授

研究者番号：40334669

(2)研究分担者

若井 俊文 (WAKAI, Toshifumi)

新潟大学・医歯学系・教授

研究者番号：50372470

高村 昌昭 (TKAMURA, Masaaki)

新潟大学・医歯学総合病院・特任助教

研究者番号：20422602

山際 訓 (YAMAGIWA, Satoshi)

新潟大学・医歯学系・助教

研究者番号：10419327

(3)連携研究者

なし