

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 2 日現在

機関番号：14401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24790694

研究課題名(和文) 肝癌幹細胞の細胞死回避機構の解析

研究課題名(英文) The impact of chemotherapy on innate immune system and cell death signaling in liver cancer.

研究代表者

清水 聡 (Shimizu, Satoshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号：90623041

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では抗癌剤の肝癌細胞に対する影響を先天免疫および細胞死シグナルの両面より明らかにすることを目的としている。今回転移性肝癌モデルマウスを用いて5-FU投与により先天免疫が活性化されることを示した。先天免疫を活性化するaGalCerと5-FUを併用し5-FU単独治療を上回る治療効果が認められた。またソラフェニブ添加下では肝癌細胞におけるネクロプトーシス関連分子の発現が上昇すること、ネクロプトーシス阻害剤存在下ではソラフェニブの効果が減弱することが示された。本研究により抗癌剤治療が先天免疫および細胞死シグナルに与える影響が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：In this project, we aimed to clarify the impact of chemotherapy on innate immune system and cell death signaling in liver cancer, which may provide insights to improve the therapeutic outcome. First, we studied the effect of 5-FU in mice with metastatic liver cancer. 5-FU treatment resulted in an upregulation of NKG2D activating molecules. Depletion of NK cells inhibited the antitumor efficacy of 5-FU. Combination therapy of aGalCer and 5-FU showed a synergistic antitumor effect. Regarding the effect on cell death signaling, we examined the expression of RIPK3 in Huh7 cells in vitro. When Huh7 cells were treated with sorafenib, increased expression of RIPK3 was observed by western blot and RT-PCR. Next, we treated Huh7 cells with sorafenib in combination with necroptosis inhibitor necrostatin-1. Necrostatin-1 attenuated the effect of sorafenib and increased the cell viability, which raises the possibility that necroptosis pathway is involved in the action mechanism of sorafenib.

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：肝癌 細胞死

## 1. 研究開始当初の背景

肝癌に対して外科的治療やラジオ波焼灼術などの局所治療の進歩はめざましいが、化学療法に関しては未だ選択枝が少ない。近年認可された分子標的薬であるソラフェニブにおいても、実際に腫瘍の縮小や消失を得られる症例は少ないのが現状である。

肝臓は NK 細胞、NKT 細胞などの先天免疫担当細胞を豊富に含有する臓器であり、癌細胞の先天免疫逃避機構を明らかにすることは肝癌の治療抵抗性を改善する上で重要である。肝癌細胞に対する NK 細胞応答は NK 細胞活性化リガンドである MICA に依存していることや (Jinushi M, et al. J Hepatol, 2005)、肝癌細胞の培養上清中にソラフェニブを添加すると膜結合型 MICA の発現が上昇することが報告されているが (Kohga K, et al. Hepatology, 2010)、in vivo における検討は未だ多くない。

またソラフェニブは RAF/MEK/ERK 経路を介してアポトーシスを誘導することが報告されている。プログラム細胞死の機序としてアポトーシス経路、オートファジー細胞死経路およびネクロトーシス経路の 3 つの経路が知られているが、近年アポトーシス関連分子によるネクロトーシスの抑制 (Kaiser WJ, et al. Nature. 2011)、ネクロトーシス関連分子によるオートファジー誘導への関与 (Zhang N, et al. Autophagy. 2011) が相次いで報告され、それらの相互関係が注目されている。

## 2. 研究の目的

本研究においては切除不能肝癌に対する治療効果を改善するため、肝癌における抗

癌剤治療抵抗性の機序を先天免疫および細胞死シグナルの両面より明らかにするとともに、肝癌細胞の細胞死や抗癌剤感受性、NK 細胞感受性を狙った新規治療法の開発を目的とした。

## 3. 研究の方法

本研究では、抗癌剤治療時における先天免疫の関与について抗癌剤が肝癌細胞に細胞死を誘導する分子的機序についてという 2 つの視点より検討を行った。

< 抗癌剤治療時における先天免疫の関与について >

転移性肝癌モデルマウスを作成し、抗アシアロ GM1 抗体を用いて NK 細胞を除去した後に 5-FU による治療実験を行った。同モデルマウスを用いて、先天免疫を活性化させることが知られている a-GalCer と 5-FU の併用治療実験を行い、その治療効果および NK 細胞活性化レセプターの発現に与える影響について解析を行った。また MC38 細胞の培養上清中に 5-FU を加え、フローサイトメトリ法により NK 細胞活性化レセプター NKG2D のリガンドである RAE-1/H60 の発現を検討した。

< 抗癌剤が肝癌細胞に細胞死を誘導する分子的機序について >

ヒト肝癌細胞株 Huh7 の培養上清中にネクロトーシス阻害剤である necrostatin-1 を添加することによりネクロトーシス経路を阻害し、ソラフェニブの効果に与える影響を検討した。また siRNA を用いて RIPK1 分子をノックダウンし、その効果を解析した。Huh7 の培養

上清中にソラフェニブを添加し、ネクロプトーシス経路関連分子の発現をウェスタンブロット法およびリアルタイム PCR 法を用いて解析した。

#### 4. 研究成果

< 抗癌剤治療時における先天免疫の関与について >

転移性肝癌モデルマウスに対し抗アシアロ GM1 抗体を用いて NK 細胞を除去した後 5-FU による治療実験を行ったところ、NK 細胞除去群では非除去群と比較して 5-FU の効果減弱が認められ治療効果への先天免疫の関与が示唆された。続いて同モデルマウスを用いて a-GalCer と 5-FU の併用治療実験を行ったところ a-GalCer/5-FU 併用治療群は a-GalCer 単独もしくは 5-FU 単独治療群と比較して優位に治療効果が優れていた。これらの機序について検討するべく、a-GalCer もしくは 5-FU をマウスに投与後、肝 NK 細胞を回収し NK 細胞活性化レセプターの発現について検討した。a-GalCer 投与群のマウスより回収した肝 NK 細胞は対照群と比較して NKG2D 分子および DNAM1 分子が高発現であった。5-FU 投与による NKG2D/DNAM1 分子の発現量への影響は認められなかった。一方、MC38 細胞の培養上清中に a-GalCer もしくは 5-FU を加え RAE-1/H60 の発現を検討したところ、5-FU 投与群は対照群と比較して RAE-1/H60 の発現が上昇していた。また 5-FU 投与群の MC38 細胞においては NK 細胞に対する感受性が亢進しており、その効果は抗 Rae-1 抗体もしくは抗 H60 抗体により減弱した。5-FU は腫瘍の NKG2D リガンドの発現上

昇を介して先天免疫を活性化しうると考えられた。

< 抗癌剤が肝癌細胞に細胞死を誘導する分子的機序について >

ネクロプトーシス阻害剤存在下において肝癌細胞株 Huh7 の培養上清中にソラフェニブを添加し、ネクロプトーシス経路の関与について検討した。ネクロプトーシス阻害剤添加群においては非添加群と比較して優位に生細胞数が多く、ソラフェニブの誘導する細胞死にネクロプトーシス経路が関与している可能性が示唆された。さらにネクロプトーシス関連分子である RIPK1 の関与について検討するため siRNA を用いてノックダウン実験を行ったところ、RIPK1 ノックダウン群においては対照群と比較してソラフェニブの効果の減弱が認められた。次にネクロプトーシス関連分子である RIPK3 の発現量についてウェスタンブロット法を用いて検討した。肝癌細胞の培養上清中にソラフェニブを添加すると添加 6 時間後より RIPK3 の蛋白発現が著明に上昇した。mRNA の発現量についても検討したところ、同様にソラフェニブ添加後早期より RIPK3 mRNA の発現上昇が認められ転写レベルで制御されていると考えられた。

5-FU は腫瘍の NKG2D リガンドの発現を、また a-GalCer は NK 細胞活性化レセプター NKG2D/DNAM1 の発現をそれぞれ上昇させることにより先天免疫を活性化すると考えられた。これらの結果より a-GalCer/5-FU 併用治療の可能性が示された。またソラフ

エニブが肝癌細胞に細胞死を誘導する機序として新たにネクロプトーシスの関与が示唆され今後新たな治療標的となる可能性が示された。

#### 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4件)

Shimizu S, Takehara T, Hikita H, Kodama T, Tsunematsu H, Miyagi T, Hosui A, Ishida H, Tatsumi T, Kanto T, Hiramatsu N, Fujita N, Yoshimori T, Hayashi N. (2012) Inhibition of autophagy potentiates the anti-tumor effect of the multi-kinase inhibitor sorafenib in hepatocellular carcinoma. *Int J Cancer*. 131: 548-557. 査読有.

Aketa H, Tatsumi T, Kohga K, Tsunematsu H, Aono S, Shimizu S, Kodama T, Nawa T, Shigekawa M, Hikita H, Sakamori R, Hosui A, Miyagi T, Hiramatsu N, Kanto T, Hayashi N, Takehara T. (2013) The combination therapy of  $\beta$ -galactosylceramide and 5-fluorouracil showed antitumor effect synergistically against liver tumor in mice. *Int J Cancer*. 133: 1126-1134. 査読有.

Honma Y, Shimizu S, Takehara T, Harada M. (2014) Sorafenib enhances proteasome inhibitor-induced cell death via inactivation of Akt and stress-activated protein kinases. *J*

*Gastroenterol*. 49: 517-526. 査読有.

Kodama T, Hikita H, Kawaguchi T, Saito Y, Tanaka S, Shigekawa M, Shimizu S, Li W, Miyagi T, Kanto T, Hiramatsu N, Tatsumi T, Takehara T. (2013) The Bcl-2 Homology Domain 3 (BH3)-only Proteins Bim and Bid Are Functionally Active and Restrained by Anti-apoptotic Bcl-2 Family Proteins in Healthy Liver. *J Biol Chem*. 288: 30009-30018. 査読有.

[学会発表](計6件)

Satoshi Shimizu, Tsugiko Oze, Minoru Shigekawa, Takahiro Kodama, Hayato Hikita, Takuya Miyagi, Atsushi Hosui, Harumasa Yoshihara, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2012) The impact of interferon therapy for chronic hepatitis C on methylation status in the liver. DDW2012. San Diego, USA, May 19-22.

Satoshi Tanaka, Hayato Hikita, Tasuku Nakabori, Yoshinobu Saito, Satoshi Shimizu, Wei Li, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tomohide Tatsumi, Tetsuo Takehara. (2013) The crosstalk between apoptosis and autophagy in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 2 - 5.

Takatoshi Nawa, Tomohide Tatsumi, Akira Nishio, Seiichi Tawara, Yoshiki

様式 C - 19、F - 19、Z - 19、CK - 19 (共通)

Ohnishi, Satoshi Aono, Satoshi Shimizu, Hayato Hikita, Ryotaro Sakamori, Takuya Miyagi, Naoki Hiramatsu, Tetsuo Takehara. Hepatitis C virus infection reduces chemo-sensitivity of the hepatocellular carcinoma cells through enhancing cancer stem cell characters. The 64th Annual Meeting of the American Association for the study of Liver Disease. Washington, USA, November 2 - 5.

清水 聡、巽 智秀、小玉尚宏、疋田隼人、宮城琢也、竹原徹郎. IFN 治療が C 型肝炎の肝メチル化に与える影響について. 第 71 回癌学会総会. 2012 年 9 月 19-21 日. 札幌.

川口 司、疋田隼人、巽 智秀、田中聡司、青野悟志、向井香織、清水 聡、宮城琢也、友國 晃、永野浩昭、土岐祐一郎、森 正樹、竹原徹郎. 肝細胞癌における CD26 分子発現の意義. 第 49 回肝臓学会総会. 2013 年 6 月 6-7 日. 東京.

林 義人、辻井正彦、赤坂智史、重川 稔、清水 聡、疋田隼人、阪森亮太郎、新崎信一郎、宮城琢也、巽 智秀、竹原徹郎. 大腸癌細胞の p53 欠損は間質細胞進展に寄与する. 第 72 回癌学会総会. 2013 年 10 月 3-5 日. 横浜.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

該当なし

取得状況(計 0 件)

該当なし

〔その他〕

ホームページ等:

[http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research\\_a.html](http://www.med.osaka-u.ac.jp/pub/gh/research_a.html)

データ更新中

6. 研究組織

(1) 研究代表者

清水 聡 (Shimizu Satoshi)

大阪大学・医学部附属病院・医員

研究者番号: 906123041