

博士論文の要旨及び審査結果の要旨

氏名 大澤 まみ
学位 博士 (医学)
学位記番号 新大院博 (医) 第 976 号
学位授与の日付 令和3年3月23日
学位授与の要件 学位規則第4条第1項該当
博士論文名 Urokinase-type Plasminogen Activator Is a Therapeutic Target for Overcoming Sorafenib Resistance in Hepatoma Cells.
(ウロキナーゼ型プラスミノゲン活性化因子は肝がんにおけるソラフェニブ耐性克服の標的因子である)

論文審査委員 主査 教授 西條 康夫
副査 准教授 小林 隆
副査 准教授 高村 昌昭

博士論文の要旨

【背景と目的】

肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma; HCC) は早期発見が困難で、化学療法の反応が乏しい、予後不良な悪性腫瘍である。現在、進行性 HCC の標準的な一次治療として分子標的薬 sorafenib が認可されている。sorafenib は HCC で高発現する vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)、Raf etc. のキナーゼ阻害薬であるが、投与患者の平均生存率は約 3 カ月と奏効率は低い。最近では sorafenib と化学療法の併用療法などが報告されたが、肝毒性といった副作用が問題になっている。そのため HCC 患者の生存率を向上させる併用療法の実用化にあたっては、sorafenib 耐性機構の解明が極めて重要である。これまで様々な細胞内因子と sorafenib 耐性の関連が明らかにされたが、細胞内因子を標的にした治療は容易でない。

そこで本研究では、これまで報告の少なかった sorafenib 耐性に関与する液性因子を追求し、液性因子を標的にした治療について検討した。具体的には、sorafenib 処理後のヒト肝がん細胞の培養液中で増加する液性因子を探索し、その阻害剤と sorafenib の併用療法の効果を in vitro と in vivo で検討した。

【方法】

1. sorafenib 耐性に関与する液性因子の同定

肝がん細胞が sorafenib 刺激で培養液中に分泌する耐性因子を探る目的で、sorafenib 処理したヒト肝がん細胞株 HepG2 培地を洗浄して薬剤を除去した後、さらに一定期間培養を続けて培養上清を回収した (SOR-CM; sorafenib-treated conditioned media)。回収した SOR-CM 下で培養した HepG2 に sorafenib を添加し、無処理細胞の培養上清 (CON-CM; control conditioned media) との増殖率・アポトーシス率の差異を細胞増殖アッセイ・Annexin V 染色で検討した。sorafenib 添加に伴う培養液中の液性因子の変動は抗体アレイで解析し、同定因子は ELISA、ウエスタンブロッティング (WB; Western blotting) で確認した。

2. urokinase-type plasminogen activator (uPA) 阻害剤と sorafenib 併用効果の検討

上記実験の結果、sorafenib 刺激で培養液中に増加することが明らかになった uPA に対する阻害剤 (UK122, amiloride) と sorafenib の併用効果を、細胞増殖アッセイ・Annexin V 染色で検討した。また uPA の調節因子を探索するため、複数のストレスキナーゼを WB 解析した。さらに uPA-siRNA を導入した HepG2 に sorafenib を添加して細胞増殖アッセイ・Annexin V 染色・遊走能アッセイを行うことにより、sorafenib 耐性における uPA の関与を遺伝子レベルで確認した。

3. 動物モデルにおける uPA 阻害剤と sorafenib の併用療法の検討

HepG2 を皮下移植したマウスに sorafenib と uPA 阻害剤 (amiloride) を一定期間投与して、腫瘍体積の計測や HE 染色・細胞増殖マーカー免疫染色を行った。

【結果】

1. sorafenib 耐性に関与する液性因子の同定

SOR-CM で培養した HepG2 は、CON-CM に比べて sorafenib 添加後の細胞数が約 1.6 倍増加した。一方、アポトーシス細胞は約 0.2 倍に減少した ($p < 0.01$, $p < 0.01$)。抗体アレイで計 71 種の液性因子を検討した結果、sorafenib 添加培地では uPA が有意に増加することを見いだした (コントロール; 92.3 ± 3.5 pg/mL、sorafenib 添加後; 272.3 ± 17.7 pg/mL, $p < 0.01$)。細胞内のリン酸化ストレスキナーゼ (ERK, p38MAPK, JNK/SAPK) は sorafenib 処理で減少する一方、Akt は約 31 倍リン酸化した。Akt 阻害剤を添加すると uPA の増加が有意に抑制されたため ($p < 0.01$)、Akt が uPA 調節因子であることが示唆された。

2. uPA 阻害剤と sorafenib 併用効果の検討

uPA 阻害剤 (UK122, amiloride) と sorafenib の併用は、sorafenib 単剤と比較して有意に細胞数を減少させた (吸光度; sorafenib vs. sorafenib + UK122 vs. sorafenib + amiloride; 0.50 ± 0.02 vs. 0.24 ± 0.03 vs. 0.21 ± 0.04 ; $p < 0.01$, $p < 0.01$)。uPA-siRNA 導入細胞の sorafenib 添加後の細胞数とアポトーシス率は、各々コントロールに比して 0.4 倍、2.4 倍であった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。また低濃度 sorafenib ($0.5 \cdot M$) で惹起される遊走能も uPA-siRNA 導入細胞で顕著に低下した ($p < 0.05$)。

3. 動物モデルにおける uPA 阻害剤と sorafenib の併用療法の検討

肝がん移植マウスに sorafenib と amiloride を併用投与した結果、腫瘍体積は sorafenib 単剤群よりも著明に縮小しており (sorafenib vs. sorafenib + amiloride; 759 ± 338 mm³ vs. 283 ± 136 mm³, $p < 0.05$)、腫瘍組織の崩壊や腫瘍内出血の明らかな増加を認めた。また腫瘍内の PCNA・Ki67 陽性細胞は有意に減少した ($p < 0.01$)。

【考察】

本研究の結果、肝がん細胞は sorafenib 刺激により薬剤耐性を促す液性因子を分泌することが初めて明らかとなった。さらに抗体アレイ解析の結果、uPA がその有力な候補であることを見いだした。過去の報告と同様、sorafenib 添加後の肝がん細胞では Akt が活性化されており、この Akt が uPA 増加の原因であると推測された。uPA 阻害剤や遺伝子ノックダウン条件下で sorafenib を肝がん細胞に添加すると、sorafenib 単剤時に比べて細胞増殖は抑制される一方、アポトーシス率は著明に増加したことから、uPA が肝がんの sorafenib 耐性に重要な役割を果たしているものと思われた。また低濃度 sorafenib で惹起される遊走性も uPA-siRNA 導入細胞で減弱したことから、uPA の阻害はがん転移の抑制にもつながる可能性が示唆された。

培養実験の結果は動物モデルでも確認することができた。HepG2 皮下移植マウスにおいて、sorafenib と uPA 阻害剤 amiloride を併用投与すると腫瘍体積や細胞増殖数が有意に抑制されており、同併用療法の実用性が示唆された。

uPA はプラスミノゲンをプラスミンに変換する触媒酵素であり、腫瘍増殖・転移・化学療法耐性への関与が知られている。これまで肝がんの分子標的薬における uPA の関与の報告はなく、uPA 阻害剤の実効性

については今後さらに検討すべきと思われる。

【結論】

uPA は、肝がんが sorafenib 耐性を獲得する際の有力な液性因子であり、uPA 阻害剤と sorafenib 併用は抗腫瘍効果の高い有望な治療法になる可能性が示唆された。

審査結果の要旨

現在、進行性 HCC の標準的な一次治療として sorafenib が認可されている。sorafenib は (VEGFRPDGFR、Raf etc. のキナーゼ阻害薬である。本研究では、sorafenib 耐性に関与する液性因子を追求し、液性因子を標的にした治療について検討した。sorafenib 処理した HepG2 培地に

urokinase-type plasminogen activator (uPA) が増加していた。HepG2 に uPA を加えることにより、sorafenib の効果が減弱した。そこで、uPA 阻害剤 (UK122, amiloride) と sorafenib の併用効果を検討した結果、sorafenib 単剤と比較して有意に細胞数を減少させた。肝がん移植マウスに sorafenib と amiloride を併用投与した結果、腫瘍体積は sorafenib 単剤群よりも著明に縮小しており腫瘍組織の崩壊や腫瘍内出血の明らかな増加を認めた。また腫瘍内の PCNA・Ki67 陽性細胞は有意に減少した。本研究の結果、肝がん細胞は sorafenib 刺激により薬剤耐性を促す液性因子を分泌することが初めて明らかとなった。また、HepG2 皮下移植マウスにおいて、sorafenib と uPA 阻害剤 amiloride を併用療法の実用性が示唆された。

本研究で、uPA は肝がんが sorafenib 耐性を獲得する際の有力な液性因子であり、uPA 阻害剤と sorafenib 併用は抗腫瘍効果の高い有望な治療法になることを示しえおり、学位論文として価値があると判断する。