

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)

新潟大学大学院医歯学総合研究科

氏名 大澤 まみ

(以下要約を記入する)

【背景と目的】

肝細胞がん (Hepatocellular carcinoma; HCC) は原発性肝がんの 8 割を占める悪性腫瘍である。現在、進行性 HCC に対する first-line の治療に用いる分子標的薬としては sorafenib が認められている。sorafenib は vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR)、platelet-derived growth factor receptor (PDGFR)、Raf *etc.* といったマルチキナーゼ阻害作用をもつ。しかしながら、sorafenib は投与患者の平均生存率の短さや腫瘍縮小効果が小さいことなど様々な課題が報告されており、sorafenib の奏効率を向上させるためには、sorafenib 耐性のメカニズムを明らかにすることが重要と考えられる。そこで本研究では、これまで分子標的薬の耐性因子として報告の少ない細胞外の液性因子に着目して、sorafenib 耐性に関する液性因子の探索やメカニズムの解明、併用療法の可能性について検討した。

【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 刺激で分泌する液性因子を探る目的で、sorafenib 処理した肝がん細胞株 HepG2 培地を一旦洗浄して薬剤を除去した後、一定期間培養を続けて培養上清のみを回収した (SOR-CM; sorafenib-treated conditioned media)。次に、あらかじめ別に準備していた HepG2 を SOR-CM 下で培養し、sorafenib 刺激を行った後に WST アッセイ・Annexin V 染色を行い、無処理のコントロール細胞由来の培地 (CON-CM; control conditioned media) との細胞増殖率・アポトーシス率を比較した。また、SOR-CM 中の液性因子を抗体アレイで網羅解析し、ELISA、Western blotting (WB) を用いて、抗体アレイの再現性を確認した。

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、SOR-CM で有意に増加することが判明した uPA に対する阻害剤 (UK122, amiloride) と sorafenib の併用効果を、WST アッセイ・Annexin V 染色を用いて検討した。また sorafenib 刺激に伴う uPA の分泌機構を探るため、複数の細胞内シグナルを WB 解析した。さらに uPA-siRNA を導入した HepG2 に対して sorafenib を添加し、WST アッセイ・Annexin V 染色・遊走能アッセイを行い、sorafenib 耐性における uPA の関与を遺伝子レベルで検討した。

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 を皮下移植したヌードマウスに sorafenib と amiloride を単独あるいは併用投与して、

腫瘍体積の計測および HE 染色・細胞増殖マーカー免疫組織染色を行った。

【結果】

1. sorafenib 耐性に関与する液性因子の同定

SOR-CM 培養下 HepG2 においては、sorafenib 添加後の生存率は CON-CM と比較して 1.6 倍増加した一方、アポトーシス率は 27%減少した ($p < 0.01$, $p < 0.01$)。また抗体アレイ解析の結果、SOR-CM では uPA が CONT-CM に比して有意に増加することを見いだした (CON-CM; 92.3 ± 3.5 pg/mL、SOR-CM; 272.3 ± 17.7 pg/mL, $p < 0.01$)。sorafenib 処理細胞は ERK, p38MAPK, JNK/SAPK が減少する一方で、Akt のリン酸化は約 31 倍増加しており、Akt 阻害により SOR-CM の uPA が抑制されたことから ($p < 0.01$)、sorafenib 刺激に伴う uPA 分泌の相加は、Akt が関与している可能性が示唆された。

2. uPA 阻害剤と sorafenib 併用効果の検討

uPA 阻害剤 (UK122, amiloride) と sorafenib を併用して HepG2 に添加すると、各々 sorafenib 単剤と比して細胞生存率が 0.5 倍、0.4 倍に減少した ($p < 0.01$, $p < 0.01$)。さらに uPA-siRNA 導入細胞における sorafenib 添加後の生存率とアポトーシス率は、各々コントロール siRNA 導入細胞の 0.4 倍、2.4 倍であった ($p < 0.01$, $p < 0.05$)。また sorafenib で促進される遊走能は、uPA-siRNA 導入細胞で有意に低下した ($p < 0.05$)。

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

HepG2 移植マウスに sorafenib と amiloride を併用投与した結果、腫瘍体積は sorafenib 単剤投与群よりも縮小した (sorafenib vs. sorafenib + amiloride; 759 ± 338 mm³ vs. 283 ± 136 mm³, $p < 0.05$)。sorafenib-amiloride 併用投与群では、組織の崩壊や出血が顕著に認められ、腫瘍内の PCNA・Ki-67 陽性細胞も有意に減少した ($p < 0.01$)。

【考察】

本研究の結果、肝がん細胞は sorafenib 刺激に伴い、uPA などの液性因子を分泌することで薬剤耐性を獲得することが初めて明らかとなった。また sorafenib 添加後の肝がん細胞では Akt が活性化しており、uPA 分泌の促進因子として作用することも見いだした。uPA 阻害剤は sorafenib の作用を著明に増強したことから、uPA は肝がんの sorafenib 耐性に関与しているものと思われた。さらに sorafenib で惹起される遊走も uPA ノックダウンで減弱したため、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。動物モデルにおいても HepG2 皮下移植マウスに sorafenib と amiloride の併用投与で抗腫瘍効果を認めたことから、sorafenib-uPA 阻害剤併用は、臨床応用の可能性があるものと考えられた。uPA は腫瘍増殖・転移への関与が知られているが、肝がんの分子標的薬耐性における uPA の関与についての報告はこれまでなく、今後、本研究の実用性についてさらに検討すべきと思われる。

【結論】

uPA は肝がんの sorafenib 耐性獲得に関与している。uPA 阻害剤と sorafenib 併用療法は、肝がんの薬剤耐性克服の一助になる可能性が示唆された。