

肝がん細胞株におけるオーロラキナーゼ阻害剤・ソラフェニブ併用療法の解析

大澤 まみ¹⁾・松田 康伸²⁾・若井 俊文³⁾・廣瀬 雄己³⁾・永橋 昌幸³⁾
坂田 純³⁾・小林 隆³⁾・藤巻 隼⁴⁾・窪田 正幸¹⁾

Key words : 肝がん, オーロラキナーゼ, ソラフェニブ

要旨

【目的】肝細胞癌（肝がん）は、化学療法の効果が乏しい予後不良な悪性疾患である。本研究では、新規の分子標的薬オーロラキナーゼ阻害剤の肝がんに対する作用機序を解析した。

【方法】肝がん細胞株HepG2にオーロラキナーゼ阻害剤AZD1152を添加し、細胞シグナルをウエスタン・ブロットで解析した。また分子標的薬ソラフェニブをAZD1152と併用して、アポトーシス誘導率や細胞増殖を観察した。

【結果】AZD1152単剤は、がん細胞の増殖は抑制するものの、細胞殺傷効果は認められなかった。AZD1152添加後のがん細胞では、ストレスキナーゼERKが著明に活性化しており、ERK阻害剤やソラフェニブを併用するとアポトーシス細胞数がAZD1152単剤に比べ約20倍に増加した ($p < 0.01$)。

【総括】AZD1152は肝がんに対する殺傷効果が極めて弱く、ERK活性化がその原因であることが示唆された。ソラフェニブはERK阻害作用を有しており、有意にオーロラキナーゼ阻害剤の効果を増強した。

緒言

肝細胞癌（肝がん）は、肝炎ウイルス感染患者・大酒家において高頻度に発症する悪性腫瘍である。肝がん患者はアジア・アフリカを中心にいまだ増加中であり、近年では、欧米などの先進国における脂肪肝炎からの肝がんの発症も増加している¹⁻³⁾。肝がんは、以下の理由で予後不良のケースが多いとされる。すなわち、（1）肝予備能が低下しているために外科的治療が困難な場合が多いこと、（2）治療後に短期間・高頻度に再発する症例が半数以上を占めること、（3）腫瘍に伴う症状が乏しいため、早期発見が困難である、などが挙げられる。進行性肝がんにおいては、シスプラチンなどDNA傷害性の抗がん剤の効果は乏しい。したがって肝がんに対して奏功性の高い治療法の確立は、医学上の重要課題のひとつと言える^{1),2)}。

近年、特定の細胞内シグナル経路を阻害する「分子標的薬」が、従来のDNA傷害性抗がん剤とは異なる化学療法の候補として注目を集めている⁴⁾。分子標的薬はこれまでの抗がん剤とは異なり、DNAに傷をつけることなく、特定の細胞増殖・生存シグナル経路を阻害して抗腫瘍効果を発揮するものである。しかしながら、分子標的薬は一般に高額であり、進行がん患者の延命効果は乏しい。例えば肝がんにおいては、現在唯一、臨床使用が認可されているソラフェニブ(Sorafenib)がもたらす延命効果は約3カ月に過ぎない⁵⁾。最近ではSorafenibとは異なる分子標的薬による併用療法が試みられており⁶⁾、高効率な併用療法の理論的根拠の礎になる研究成果が求められている。

オーロラキナーゼは細胞分裂に重要な役割を果たす酵素であり、がん治療の重要な標的因子として現在までに複数の阻害剤が医薬品として開発中である^{7),8)}。

- 1) 新潟大学大学院医歯学総合研究科小児外科学
- 2) 新潟大学医学部保健学科検査技術科学専攻
- 3) 新潟大学大学院医歯学総合研究科消化器・一般外科学分野
- 4) 新潟大学医歯学総合病院検査部

平成26年9月22日受理

これまでAurora-A, B, Cの3種類のキナーゼが同定されており、特に紡錘体形成・染色体凝縮・細胞質分裂に関与するAurora-Bは、多くのがん細胞で過剰発現しているため抗がん剤の有力な候補である。実際に、急性骨髄性白血病に対するAurora-B阻害剤AZD1152 (Barasertib)の臨床試験が数か国で開始されており、一定の臨床効果が確認されている⁹⁾。

しかしながら肝がんにおいては、オーロラキナーゼ阻害剤による治療効果の報告は少なく、臨床応用には至っていない^{10,11)}。また、どのような医薬品と併用すれば抗腫瘍効果を増強できるか、全く明らかでない。そこで本研究では、Aurora-B阻害剤AZD1152をヒト肝がん細胞株HepG2に添加して、様々な細胞内シグナルの変動を解析し、薬剤効果を阻害するシグナル経路を探索した。さらに、実際に進行肝がん患者に対して用いられているSorafenibとの併用効果についても観察した。

方法

細胞培養

ヒト肝がん細胞株HepG2細胞(American Type Culture Collection)を、10%ウシ血清含有DMEM培地で37℃ 5% CO₂条件下で培養した。既報に従い^{10,11)}、AZD1152 (Toronto Research Chemicals Inc., Canada) 20-100 nM添加して、24-72時間後に細胞増殖・細胞死・シグナル解析を行った。併用療法の実験においては、Sorafenib(Tronto Research ; IC₅₀ =4-7 μM) 7.5 μMを同時に添加した。

各種シグナル阻害剤は、AZD1152添加1時間前に培地に加えた。使用した阻害剤は、以下の通りである；U0126 (ERK阻害剤), SP600125 (JNK阻害剤), SB203580 (p38MAPK阻害剤), LY294002 (Akt阻害剤), KU55933 (ATM阻害剤), Schisandrin B (ATR阻害剤), DMNB (DNA-PK阻害剤), SB218078 (Chk1阻害剤)。

MTT アッセイ (細胞増殖観測)

HepG2細胞を0.3 x 10⁵ cells/mL濃度で24時間培養後、AZD1152を添加して、さらに48-72時間後にCell Counting Kit-8 (Dojindo Co., Japan)を用いて呈色反応を行った。生細胞増殖は、450 nm吸光度測定値により観察した。

細胞死アッセイ

死細胞がtrypan blue染色陽性になることを利用し、

AZD1152添加後のHepG2細胞をトリプシン処理してプレートから剥がし、TC20™全自動セルカウンター (Bio-Rad, USA)で陽性率を計測した。

アポトーシス細胞は、アポトーシス初期に細胞膜に露出するホスファチジルセリンに結合する性質を持つAnnexin V染色を用いて観察した。蛍光標識Annexin Vで細胞を染色した後、パラホルムアルデヒド固定して、蛍光顕微鏡下で独立した3視野における100個の細胞をカウントし、Annexin V平均陽性細胞率を計算した。

ウエスタン・ブロット

培養細胞をプロテアーゼ阻害剤含有lysis bufferで溶解後、電気泳動・PVDF (poly-vinylidene difluoride)メンブレン転写を行い、1次抗体と4℃一晩反応させた。2次抗体として用いるHRP標識抗ウサギ抗体 (Amersham Biosciences, USA)との結合は、ECL Prime ウエスタンブロットング検出試薬(GE Healthcare, USA)で暗室内フィルム露光によって検出した。各反応は3回繰り返して行い、タンパク発現を示すバンドの平均濃度はImageJソフトウェア(オープンソース)で測定した。用いた一次抗体は以下の通りである；p21, p(リン酸化)-Histone H3, cleaved PARP, Mcl-1, p-ERK, p-JNK, p-p38MAPK, p-Akt, p-cRaf (Cell Signaling Technology Co., USA), およびβ-actin (Santa Cruz Biotechnology, USA)。

統計学的解析

全てのアッセイにおいて、独立した実験を3回行い、得られたデータは平均値±標準誤差で表し、Student's t-testで統計解析して、p<0.05を有意差とした。

結果

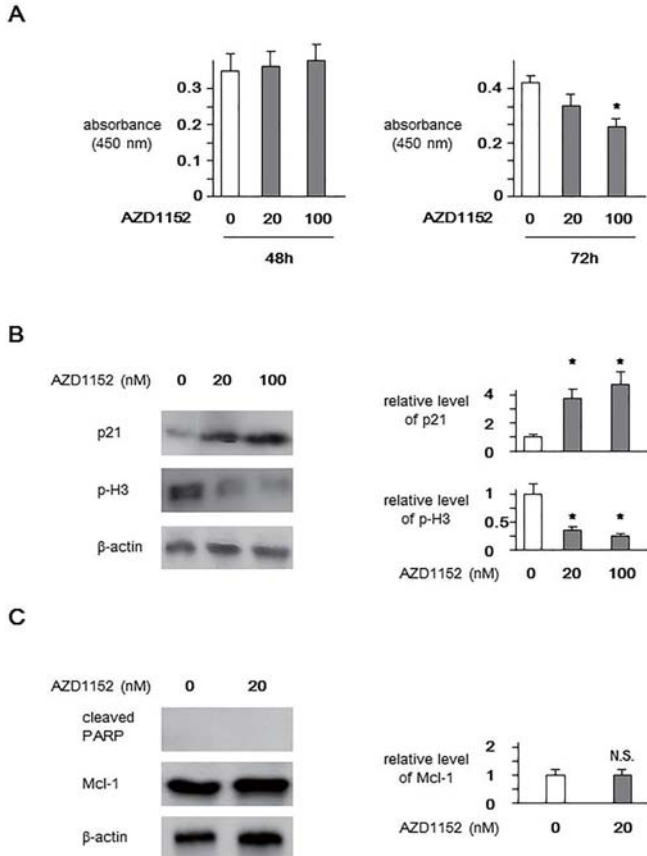
1. AZD1152は肝がん細胞増殖を抑制する

MTTアッセイを用いて細胞増殖度を計測した結果、HepG2細胞は、AZD1152添加48時間後では細胞増殖に有意な変化はなく、72時間後において濃度依存性に増殖が抑制された (図1A)。

AZD1152添加24時間後におけるウエスタン・ブロット解析の結果では、細胞停止を誘導するp21が3.5-4.2倍に増加している一方で、細胞分裂時に上昇することが知られている、リン酸化ヒストンH3は0.2-0.4倍に減少した (図1B)。アポトーシスマーカーであるcleaved PARPやMcl-1には有意な変化が認められないことから (図1C)、AZD1152は細胞増殖を抑制する作

図1 AZD1152添加後HepG2細胞の細胞増殖・シグナル解析

- A. MTTアッセイによる細胞増殖度の解析
 B. AZD1152添加24時間後の細胞分裂因子のwestern blotting
 C. AZD1152添加24時間後のアポトーシス因子のwestern blotting
 (*, $p < 0.05$; N.S., not significant)



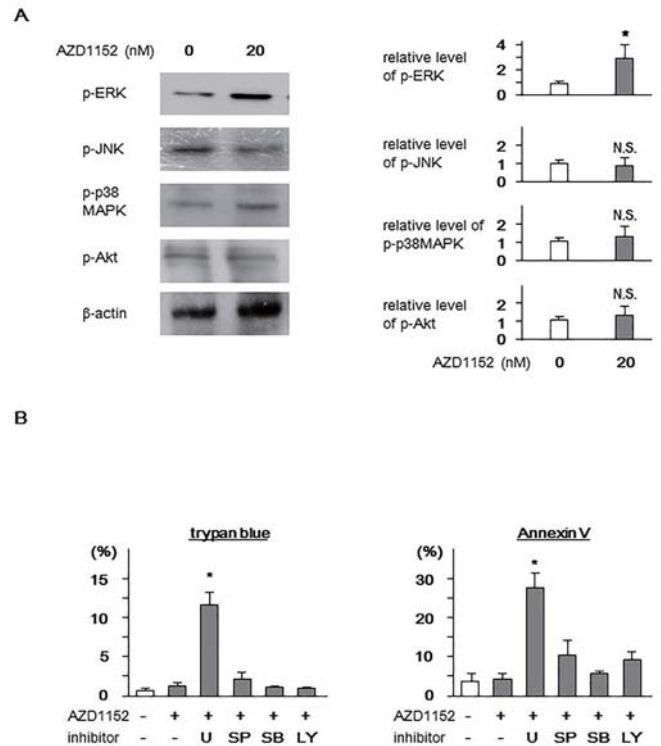
用は有しているが、アポトーシス誘導作用は乏しいことが明らかになった。

2. AZD1152とストレスキナーゼ群の相互関係

AZD1152の肝がんに対する殺細胞作用が弱い原因を探る目的で、同剤添加24時間後の細胞内ストレスキナーゼをウエスタン・ブロット解析した。その結果、細胞増殖を促すERK (Extracellular Signal-regulated Kinase)のリン酸化(活性化)レベルが約2.8倍に増加した(図2A)。様々なストレスキナーゼ阻害剤とAZD1152を併用してHepG2細胞に添加すると、ERK阻害剤(U0126)存在下で細胞死の著明な増加が認められた (trypan blue 染色; $12 \pm 3\%$, Annexin V; $26 \pm 5\%$, $p < 0.05$) (図2B)。

図2 AZD1152とストレスキナーゼ因子の関連性の解析
 A. AZD1152添加24時間後におけるストレスキナーゼのwestern blot

- B. trypan blue・Annexin V染色体によるアポトーシス細胞の計測
 (U; ERK阻害剤, SP; JNK阻害剤, SB; p38MAPK阻害剤, LY; Akt阻害剤)
 (*, $p < 0.05$; N.S., not significant)



3. ERK調節機構の解析

AZD1152処理細胞でERKが活性化される理由を探る目的で、ATM, ATR, DNA-PKなどDNA障害修復因子の阻害剤存在下でAZD1152を添加した。その結果、リン酸化ERKは、Schisandrin B (ATR阻害剤)とDMNB (DNA-PK阻害剤)存在下で有意に減少した ($p < 0.05$) (図3A)。これらの阻害剤はAZD1152によるリン酸化ヒストンH3の減少も阻害した (図3B)。

4. SorafenibによるERK経路調節の解析

Sorafenib添加24時間後のHepG2細胞におけるERKのリン酸化レベルをウエスタン・ブロットで解析した結果、ERKのみならずERK調節因子c-Rafのリン酸化も著明に減少していた ($p < 0.05$) (図4)。

5. SorafenibはAZD1152の抗がん作用を増強する

Sorafenib・AZD1152併用療法の効果を観察する目的

図3 AZD1152とDNA傷害修復因子の関連性の解析

A. DNA傷害修復因子阻害剤添加24時間後におけるERKのwestern blotting
 B. DNA傷害修復因子添加24時間後のリン酸化ヒストンH3のwestern blot
 (KU ; ATM阻害剤, Sh ; ATR阻害剤, DN ; DNA-PK阻害剤, Sb ; Chk1阻害剤)
 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; N.S., not significant)

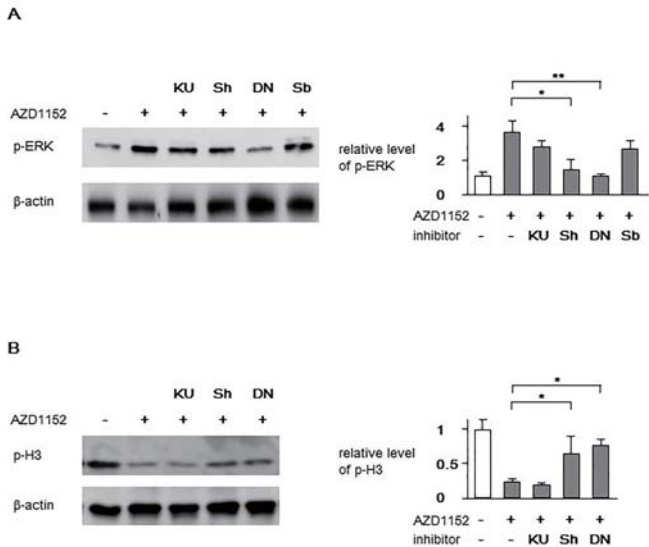
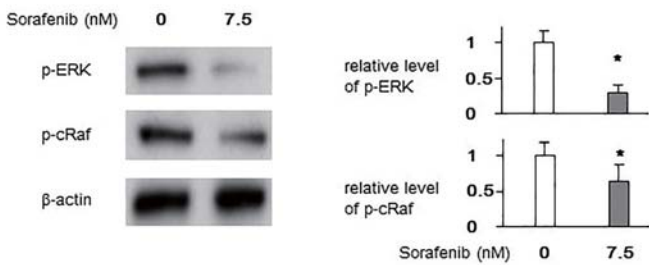


図4 sorafenib添加24時間後におけるFRK/Raf経路のwestern blotting

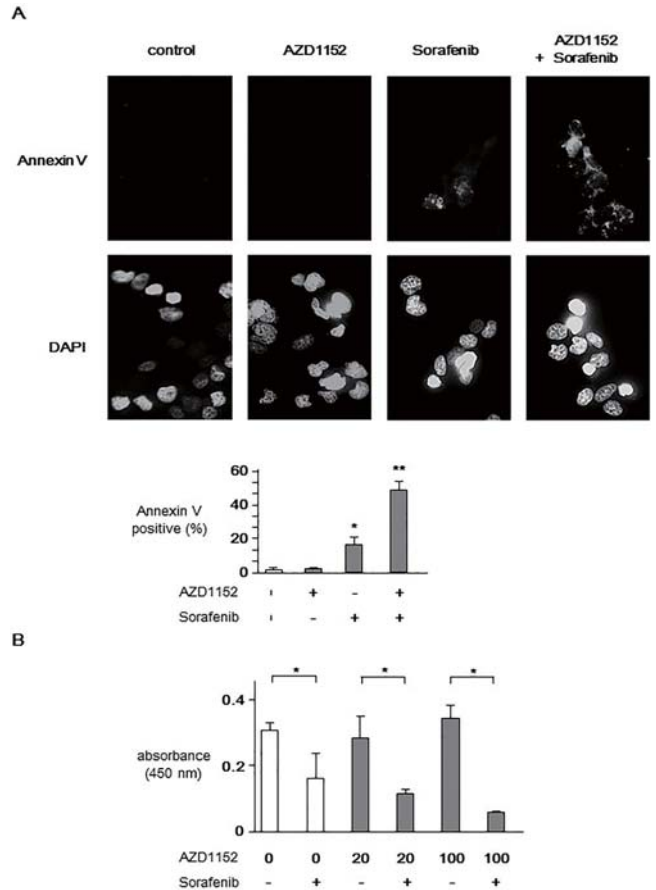
(* , $p < 0.05$; N.S., not significant)



で、両剤を添加24時間後にHepG2細胞をAnnexin V染色して、アポトーシス細胞の観察を行った。その結果、AZD1152単剤を添加した場合にはAnnexin V陽性細胞は3%以下であり無処置細胞と有意差は認められないが、AZD1152とsorafenibを併用した場合には45-55%前後にアポトーシス細胞が著増した(図5A)。MTTアッセイで細胞増殖を計測した結果では、AZD1152単剤に比べて、sorafenibとの併用では細胞増殖の著明な阻害が観察された(AZD1152 20 nMの場合: AZD1152単剤 vs. AZD1152・Sorafenib併用; 0.28 ± 0.05 vs. $0.08 \pm$

図5 AZD1152・Sorafenib併用療法の検討

A. Annexin V染色体を用いたアポトーシス細胞の観察(DAPI ; 核染色)
 B. MTTアッセイを用いた細胞増殖度の計測
 (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$)



0.02 nm, $p < 0.05$) (図5B)。

考察

ヒトの細胞分裂は、様々なタンパクがリン酸化されるプロセスで制御されている。この一連のタンパクリン酸化は、分裂期キナーゼと呼ばれるいくつかの酵素によって調節されており、なかでもオーロラキナーゼと呼ばれるセリン・スレオニンキナーゼは中心的な役割を果たすものとして注目されている^{7,9,10}。オーロラキナーゼの名前の由来は、同遺伝子欠損細胞が細胞分裂時に染色体を均等分配する機能をもつ「紡錘体」が機能不全になり、分極を1個しか持たない異常な紡錘体(単極紡錘体)の周囲に放射状に紡錘糸が広がる現象が、オーロラが細胞内に発生しているようにみえることから命名されたものである。

ヒトのオーロラキナーゼにはAurora-A, B, Cが存在するが、特にAurora-Bは細胞分裂期の存在パターンはユニークである。すなわちAurora-Bは分裂初期では染色体と共に存在するが、中期には微小管（細胞分裂の際に形成される星状体・紡錘体・染色体の複合体）に乗り換えて、最終的には分裂溝（細胞分裂に伴い、分離した染色体の間に形成される細胞表層のくびれの部分）に局在するという、様々な箇所を乗り換えて移動するような動向を示す。したがってAurora-Bは「染色体パッセンジャー」とも呼ばれている¹²⁾。

近年ではAurora-Bに対する阻害剤が、抗がん剤として開発中である¹³⁾。代表格であるAZD1152は、既に慢性骨髄性白血病患者に対して臨床試験が開始されており⁹⁾、他の悪性腫瘍への可能性があるのか興味を持たれるところである。肝がんは、高頻度に再発しやすい予後不良な悪性腫瘍であり、抗がん剤に対して抵抗性を示すために、新しいタイプの薬剤の開発が望まれてきた。現在、肝がんの有効性が証明された分子標的薬はERK阻害剤Sorafenibだけであり、オーロラキナーゼ阻害剤による作用機序は、いまだ明らかにされていない。

本研究では、ヒト肝がん細胞株HepG2にAZD1152を添加して、作用機序を詳細に検討した。添加量は既報に従い、生体内で副作用を伴わないレベルの20-100 nMに設定して細胞増殖を観察した結果、添加48時間後ではほとんど変化が認められず、72時間後に薬剤処理細胞の細胞数が有意に減少した。このことは、AZD1152が、細胞自体には毒性がなく、分裂時にのみ作用する可能性を強く示唆している。実際に、AZD1152処理細胞では、細胞増殖停止を誘導するp21は24時間後に増加した一方で、アポトーシスマーカーであるPARPやMcl-1は不変であった。

興味深いことに、本剤の抗がん作用をどうすれば増強できるのかを探る目的で、AZD1152処理細胞のストレスキナーゼのリン酸化レベルを解析した結果、細胞増殖を誘導するERKが著明に増加していることを見いだした。ERK阻害剤とAZD1152を同時に添加した細胞は、著しくアポトーシスが増加したことから、ERKがAZD1152の作用を左右する、重要な薬剤耐性因子であると示唆された。

なぜAZD1152が、がん細胞のERKを活性化するのは、これまでに類似報告がなく不明である。そこで本研究では、シスプラチンなどの抗がん剤耐性に関与することが知られているDNA傷害修復因子に対する阻害剤をAZD1152と併用してHepG2細胞に添加して検討

してみた。その結果、DNA修復因子ATRおよびDNA-PK存在下では、AZD1152によるERK活性化が阻害されることを見いだした。したがって、AZD1152は、オーロラキナーゼを阻害する作用に加えて、何らかのメカニズムを介してATR/DNA-PK/ERK経路を活性化しており、このシグナル経路が薬剤耐性に関与していると推測される。

本研究では、ERK活性を阻害する薬剤を同時に投与すれば、AZD1152の抗がん作用を増強できるのではないかと考えた。ウエスタン・ブロットで検討した結果、現在臨床で使用されているSorafenibが単独でHepG2細胞のリン酸化ERKを著明に抑制することを確認できた。さらにSorafenibとAZD1152を併用してHepG2細胞に添加した結果では、アポトーシスの著明な増加が誘導されることを見いだした。両剤の併用療法に関する報告はこれまでになく、今後の研究報告が待たれる。

肝がんに対する効率的で安全性の高い分子標的薬の治療の開発は、医学上大きな課題である¹⁴⁻¹⁷⁾。今後は、AZD1152とSorafenib併用時における副作用の検討など、実験結果を臨床応用できる可能性について、さらに検討する必要があると考える。

結論

オーロラキナーゼ阻害剤AZD1152は、肝がん細胞の増殖を抑制する一方、アポトーシスは誘導しないため抗がん剤としての作用は弱い。同剤の作用を減弱させる原因のひとつはERKであり、ERK活性を阻害する分子標的薬SorafenibとAZD1152の併用療法は、有効ながん治療法である可能性が示唆される。

利益相反

本研究にあたり、開示すべき利益相反はない。

参考文献

1. El-Serag HB. Hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med.* 2011; 365:1118-27.
2. Forner A, Llovet JM, Bruix J. Hepatocellular carcinoma. *Lancet.* 2012; 379:1245-55.
3. Ludwig J, McGill DB, Lindor KD. Review: Nonalcoholic steatohepatitis. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997;12:398-403.
4. Cao H, Phan H, Yang LX. Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2012;32:1379-86.
5. Rimassa L, Santoro A. Sorafenib therapy in advanced hepatocellular carcinoma: the SHARP trial. *Expert Rev Anticancer Ther.* 2009; 9:739-745.

6. Finn RS. Emerging targeted strategies in advanced hepatocellular carcinoma. *Semin Liver Dis.* 2013;33 Suppl 1:S11-9.
7. Mehra R, Serebriiskii IG, Burtneess B, et al. Aurora kinases in head and neck cancer. *Lancet Oncol.* 2013;14:e425-35.
8. Tanaka S, Arai S. Molecularly targeted therapy for hepatocellular carcinoma. *Cancer Sci.* 2009;100:1-8.
9. Dennis M, Davies M, Oliver S, et al. Phase I study of the Aurora B kinase inhibitor barasertib (AZD1152) to assess the pharmacokinetics, metabolism and excretion in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer Chemother Pharmacol.* 2012;70:461-9.
10. Aihara A, Tanaka S, Yasen M, et al. The selective Aurora B kinase inhibitor AZD1152 as a novel treatment for hepatocellular carcinoma. *J Hepatol.* 2010;52:63-71.
11. Lin ZZ, Jeng YM, Hu FC, et al. Significance of Aurora B overexpression in hepatocellular carcinoma. Aurora B Overexpression in HCC. *BMC Cancer.* 2010;10:461.
12. van der Horst A, Lens SM. Cell division: control of the chromosomal passenger complex in time and space. *Chromosoma.* 2014;123:25-42.
13. Keen N, Taylor S. Aurora-kinase inhibitors as anti-cancer agents. *Nat Rev Cancer.* 2004;4:927-36
14. Zhu AX, Abrams TA, Miksad R, et al. Phase 1/2 study of everolimus in advanced hepatocellular carcinoma. *Cancer* 2011;117:5094-102.
15. Cao H, Phan H, Yang LX. Improved chemotherapy for hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2012;32:1379-86.
16. Carr BI. Some new approaches to the management of hepatocellular carcinoma. *Semin Oncol.* 2012;39:369-73.
17. Muntané J, De la Rosa AJ, Docobo F, et al. Targeting tyrosine kinase receptors in hepatocellular carcinoma. *Curr Cancer Drug Targets.* 2013;13:300-12.

Combination treatment of aurora kinase inhibitor and sorafenib on hepatoma cells

Mami OSAWA¹⁾, Yasunobu MATSUDA²⁾, Toshifumi WAKAI³⁾, Yuki HIROSE³⁾, Masayuki NAGAHASHI³⁾
Jun SAKATA³⁾, Takashi KOBAYASHI³⁾, Shun FUJIMAKI⁴⁾ and Masayuki KUBOTA¹⁾

- 1) Division of Pediatric Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 2) Department of Medical Technology, Niigata University School of Health Sciences, Faculty of Medicine Graduate School of Health Sciences
- 3) Division of Digestive and General Surgery, Niigata University Graduate School of Medical and Dental Sciences
- 4) Division of Laboratory Medicine, Niigata University Medical and Dental Hospital

Key words : Hepatocellular carcinoma, Aurora kinase, Sorafenib

Abstract Objective: Chemoresistance in hepatocellular carcinoma (HCC) is a critical obstacle for the treatment of the patients with HCC. We addressed whether aurora kinase inhibitor effectively induces the cell death in HCC cells.

Methods: Hepatoma HepG2 cells were treated with aurora kinase inhibitor AZD1152 with or without sorafenib for 24-72 hours. Cell signaling was analyzed by Western blotting, cell apoptosis was calculated by annexin V and trypan blue, and cell proliferation was examined by MTT assay.

Results: Trypan blue and annexin V assays showed that AZD1152 alone rarely induced cell apoptosis. AZD1152 treatment resulted in the increased level of phosphorylated ERK. Combination treatment with AZD1152 and chemical inhibitor of ERK or sorafenib effectively increased the cell apoptosis in HepG2 cells ($p < 0.01$).

Conclusion: ERK is a critical mediator of drug resistance of AZD1152 in hepatoma cells. Combination treatment with sorafenib and AZD1152 might be an effective tool for treating HCC.

Accepted : 2014.9.22