

# 東北医科薬科大学

## 審査学位論文（博士）要旨

氏名（本籍）	タカハシ マサノリ 高橋 将典（北海道）
学位の種類	博士（薬学）
学位記番号	博薬学第 19 号
学位授与の日付	令和 4 年 3 月 8 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条 1 項該当
学位論文題名	低酸素環境における Lenvatinib 抗腫瘍作用抵抗性機序の 解明 - ヒト肝細胞癌細胞株を用いての検討 -
論文審査委員	主査 教授 丹野孝一
	副査 教授 久下周佐
	副査 教授 村井ユリ子

## 低酸素環境における Lenvatinib 抗腫瘍作用抵抗性機序の解明

### -ヒト肝細胞癌細胞株を用いての検討-

東北医科薬科大学大学院薬学研究科

臨床薬剤学教室 高橋 将典

肝細胞癌（Hepatocellular Carcinoma: HCC）治療において、経口投与可能な全身化学療法薬である lenvatinib mesylate（LEN）は限られた選択肢のひとつであり LEN に対する治療抵抗性の克服が大きな課題となっている。HCC は腫瘍内の低酸素状態が最も顕著な腫瘍であり、この低酸素状態が多くの抗悪性腫瘍薬の治療抵抗性発現の一因であることが示されている。しかしながら HCC 治療における LEN の低酸素下での抗腫瘍作用抵抗性についての報告は現在までになされていない。そこで本研究の目的はヒト HCC 細胞株を用いて低酸素環境における LEN の抗腫瘍作用抵抗性のメカニズムを解明することとした。

初めに HCC 細胞株において低酸素状態での LEN 抗腫瘍作用抵抗性を確認した。PLC/PRF/5 細胞で LEN の IC<sub>50</sub> は、通常酸素環境においては  $13.0 \pm 0.8 \mu\text{M}$  であったが、低酸素環境では  $21.3 \pm 1.1 \mu\text{M}$  であり、有意に上昇がみられた。一方、HepG2 細胞では有意な上昇は見られなかった。低酸素環境での PLC/PRF/5 細胞

の LEN 抗腫瘍作用抵抗性メカニズムを解明するために、マイクロアレイ解析を行い、このメカニズムに関連すると考えられる遺伝子を抽出した。さらに、*in-silico* 解析により、細胞外マトリックスに関わる遺伝子の有意な変化が確認され、その中でもフィブロネクチン (FN) をコードする FN1 が遺伝子群のハブとして同定された。一方免疫蛍光染色により解析すると、PLC/PRF/5 細胞における FN の発現は、低酸素環境では細胞内外で有意に上昇し、通常酸素環境で LEN を投与すると減少する傾向にあった。また、PLC/PRF/5 細胞の培養液中の FN 濃度を ELISA で調べたところ、LEN (-) 条件では低酸素環境では通常酸素環境に比べて 2.3 倍、LEN (+) 条件では低酸素環境で通常酸素下よりも 1.6 倍上昇していた。PLC/PRF/5 細胞では、通常酸素環境では LEN の直接的な標的ではないが FN を低下させる効果があるが、低酸素環境では HIF-1 $\alpha$  などの転写因子が誘導されるため、FN の産生が促進され、LEN の効果が減弱して薬剤の抗腫瘍作用抵抗性を引き起こすことが推察される。このことは、FN1 遺伝子を knockdown した PLC/PRF/5 細胞を用いた実験の結果、低酸素環境で LEN の効果が回復したことから FN の薬剤抗腫瘍作用抵抗性への関与が支持された。さらに細胞外だけではなく細胞内での機序について検討するために、細胞増殖に重要な役割を果たすシグナル伝達経路である mitogen-activated protein kinase (MAPK) の主要タンパク質である ERK1/2 についてタンパク質発現解析を行った。PLC/PRF/5 細胞で

は、低酸素環境で LEN 非投与群において 24 h で ERK1/2 の活性型である p-ERK1/2 の発現が上昇し、LEN 投与群においても 48 h で p-ERK1/2 の発現上昇を確認した。複数の HCC 細胞株を用いた LEN の実験において、pERK1/2 の発現が低下した報告があったことから、本研究でも p-ERK1/2 の発現が低下する想定をしていたが、その想定とは異なる結果であった。この結果により LEN が MAPK を主標的としないことが考えられ、LEN による他経路の抑制の代償として LEN 存在下で ERK1/2 が活性化したこと、LEN 非投与群の p-ERK1/2 の上昇は HIF-1 $\alpha$  をコードする HIF1A の遺伝子発現レベルの上昇が確認されたことから HIF-1 $\alpha$  が関与したことが推察される。また、検討した 2 種類の細胞株において、HepG2 細胞では変動を示した結果がみられなかったことから、低酸素環境における LEN 曝露による FN の挙動は、少なくとも本研究で用いた 2 つの細胞株のうち PLC/PRF/5 細胞に特異的なものであることが示唆された。

以上のことから、低酸素下 LEN 抗腫瘍作用抵抗性は、低酸素状態で FN の上流転写因子である HIF-1 $\alpha$  が上昇し、FN の高発現が機序の根底としてあることが示唆される結果となった (図 1)。また、本研究では MAPK が主標的とされていないことが示唆されたため、臨床において FN が高発現した HCC には LEN 療法を使用せず、作用機序の異なるベバシズマブ・アテゾリズマブ併用療法へ早期に切り替えるなど、患者への負担軽減や治療変更により HCC の治療成績の向上

を見込める治療戦略策定、すなわち患者個別化医療の一端を担うことができると考えられる。

<参考文献>主論文(原著論文)

Masanori Takahashi, Kouji Okada, Ryusuke Ouchi, Taisuke Konno, Kensuke Usui, Hiroyuki Suzuki, Mari Satoh, Takayuki Kogure, Kennichi Satoh, Yoshiteru Watanabe, Hitoshi Nakamura, Yuriko Murai. Fibronectin plays a major role in hypoxia-induced Lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma PLC/PRF/5 cells, *Die Pharmazie*, 2021, 76, 594-601.

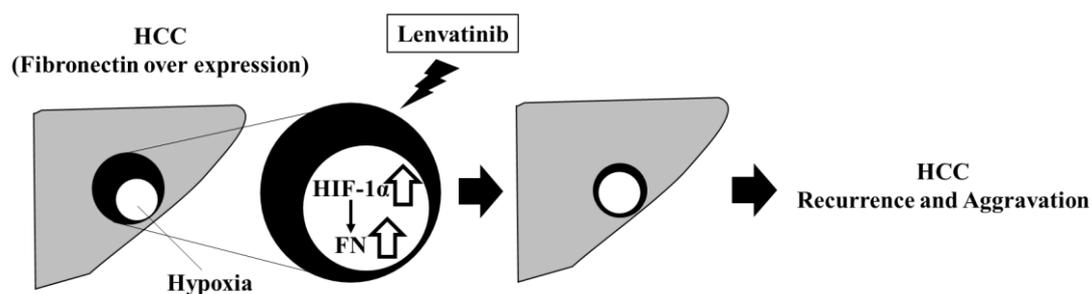


Fig. 1 Mechanism of Lenvatinib resistance in Hypoxia.