

東北医科薬科大学

審査学位論文（博士）

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 の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た検討 -
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 の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た検討-

東北医科薬科大学大学院薬学研究科 薬学専攻博士課程

臨床薬剤学教室

高橋将典

目次

1. 略語集	1
2. 緒言	2
3. 実験材料及び実験方法	7
4. 結果	
4.1. PLC/PRF/5 細胞と HepG2 細胞における Lenvatinib (LEN)の用量反応	15
4.2. PLC/PRF/5 細胞の低酸素下 LEN 抗腫瘍作用抵抗性に関する網羅的遺伝子 解析	15
4.3. 低酸素下培養における PLC/PRF/5 の HIF1A および FN1 遺伝子発現レベル	16
4.4. HCC 細胞株の fibronectin 蛍光免疫染色および培養液中の fibronectin 定量.	17
4.5. PLC/PRF/5 細胞に対する FN1 knockdown による低酸素での LEN 効果...	18
4.6. PLC/PRF/5 細胞および HepG2 細胞の ERK1/2 タンパク質の発現解析.....	18
5. 考察	20
6. 謝辞	26
7. 引用文献	27
8. 図表	39

1.略語集

本文中の略語は以下に示す一覧表に従って用いた

ACTB	β -actin
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DMSO	dimethyl sulfoxide
ECM	extracellular matrix
ERK1/2	extracellular signal-regulated kinase 1/2
FGF	fibroblast growth factor
FGFR	fibroblast growth factor receptor
GLUT1	glucose transporter 1
HBV	hepatitis B virus
HCC	hepatocellular carcinoma
HCV	hepatitis C virus
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
KIT	tyrosine-protein kinase
LEN	lenvatinib mesylate
MAPK	mitogen-activated protein kinase
NCCN	national comprehensive cancer network
PAGE	polyacrylamide gel electrophoresis
PBS	phosphate buffered saline
PD-1	programmed death receptor-1
PDGFR	platelet-driven growth factor receptor
PVDF	polyvinylidene fluoride
RET	rearranged during transfection
SDS	sodium dodecyl sulfate
SFB	sorafenib tosilate
TBS-T	tris buffer saline
TKI	tyrosine kinase inhibitor
VEGF	vascular endothelial growth factor
VEGFR	vascular endothelial growth factor receptor

2. 緒言

肝癌は2020年での世界における部位別がん死亡割合の中で第2位となっており、肝癌患者の中で肝細胞癌 (hepatocellular carcinoma : HCC) の割合は75-85%を占めている¹⁾。HCCの主要な危険因子はhepatitis B virus (HBV) や hepatitis C virus (HCV) の慢性感染、アフラトキシンに汚染された食品の摂取、アルコールの大量摂取、体重過多、2型糖尿病への罹患、喫煙などが挙げられる²⁾。かつてはHBVとHCVがHCCの発症要因として多くを占めていたが、近年では抗ウイルス薬の発展もあり世界の多くの地域で肥満 (体重過多) と2型糖尿病、非アルコール性脂肪性肝疾患の罹患がHCCの発症要因として増加傾向にある³⁾。HCCの治療アルゴリズムは病期により決定されており、the Barcelona-clinic Liver Cancer 病期分類が標準的な指標として使用されている⁴⁾(Fig. 1A)。現在のHCC治療の選択肢は肝切除術、経動脈的化学塞栓術、肝臓焼灼術、肝移植、放射線治療および全身化学療法などがあり⁴⁻⁶⁾、早期であれば肝切除術や肝臓焼灼術、肝移植などが推奨されているが、切除不能といった advanced stage になると全身化学療法の適応となる⁷⁾。臨床病期が早期の患者であっても、治療の蓄積による肝臓への負荷が重なることや、病勢進行などにより、いずれ全身化学療法へ移行することが一般的である。全身化学療法の一次治療としては、sorafenib tosilate (SFB)、

lenvatinib mesylate (LEN)、atezolizumab と bevacizumab の併用療法が National Comprehensive Cancer Network (NCCN) ガイドラインで推奨されている⁸⁾ (Fig. 1B)。近年、HCC の全身化学療法については使用可能な薬剤が増えつつあるが、それでも治療選択肢は限られている。

第一選択薬の中の LEN は LEN が登場する以前の標準治療薬であった SFB との比較試験において、全生存期間で非劣勢を示している。さらに、副次評価項目として固形癌への抗癌剤の有効性を示す基準である Response Evaluation Criteria in Solid Tumor (RECIST) 1.1 と RECIST に血流評価を加えた HCC に対する同様の基準である modified RECIST (mRECIST) に基づき、無増悪生存期間と進行までの期間が評価され、盲検下の独立画像判定において奏効率が評価されたが、これらの副次評価項目については、LEN が優位であった⁹⁾。LEN は vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR) 1-3, fibroblast growth factor receptor (FGFR) 1-4, platelet-derived growth factor receptor (PDGFR), rearranged during transfection (RET), tyrosine-protein kinase (KIT) に対するマルチターゲットの tyrosine kinase inhibitor (TKI) であり、経口投与が可能である。HCC は非常に血管が発達しているため VEGFR、FGFR といった血管新生シグナルを標的とすることは HCC に対して合理的な治療法である¹⁰⁾。LEN は in vitro において、FGF シグナル伝達経路を活性化した HCC 細胞の増殖を阻害し、前臨床のヒト HCC

異種移植腫瘍においても FGF シグナル伝達経路を抑制することが明らかとなっている¹¹⁾。HCC においては fibroblast growth factor 19 (FGF19) と FGFR4 が共通して発現が上昇することが示されており¹²⁾、FGF19 の発現は HCC の進行に関与すること¹³⁾、FGF19 の過剰発現が HCC の発症を誘発することも示されている¹⁴⁾。これにより、FGFR をターゲットとし、FGF シグナル伝達経路を抑制する LEN は SFB よりも臨床上有用であると考えられているが、治療選択肢の限られる HCC ではその治療抵抗性は大きな課題となっている。

固形癌における治療抵抗性には微小環境が関与するとされており、腫瘍細胞では正常組織に比べ血管と細胞の間が広く、不規則な血流に陥ることから栄養分供給が滞り細胞増殖が遅くなることによる抗癌剤へ抵抗性をもつことや、解糖系の関与などによる腫瘍内酸性による抗癌剤の細胞内取り込みの減少、低酸素や酸性により腫瘍内 autophagy が誘導され細胞の生存を促進させること、腫瘍内における低酸素領域への薬物分布の低下、放射線治療などの治療間の腫瘍の再増殖などが一因として挙げられている¹⁵⁾。その中でも腫瘍内低酸素は、腫瘍細胞と血管との距離が遠いため細胞毒性を示す濃度の薬剤を投与できないこと、腫瘍抑制タンパク質である p53 の消失により apoptosis が消失し血管新生や浸潤性が増大する可能性があること、P-glycoprotein をコードする MDR 遺伝子など薬物抵抗性に関与する遺伝子発現の上昇により薬剤排泄が促進すること、細胞

生存を促進する腫瘍内 autophagy を誘導することが知られている¹⁵⁾。進行した HCC は複数の小結節として現れることが多く¹⁶⁾、正常な肝臓と肝細胞周囲はどちらも血管密度が大きく、結節内での腫瘍細胞の増殖は大量の酸素を消費するためしばしば低酸素状態の微小環境を作り出す¹⁷⁾。HCC は最も腫瘍内低酸素を示す腫瘍の一つであり、酸素濃度の中央値は 0.8%であると報告されている¹⁸⁾。HCC に対する SFB の低酸素の治療抵抗性には、autophagy が関与する報告¹⁹⁾、Immune checkpoint inhibitors がターゲットとする programmed death receptor-1 (PD-1) の発現増加が関与する報告²⁰⁾、低酸素において細胞増殖や細胞生存、apoptosis、細胞接着、血管新生、糖代謝に関わるタンパク質の調整に重要な転写因子として広く知られている Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)²¹⁾が Glucose transporter 1 (GLUT1)、VEGF などの発現増加に関与する報告^{22,23)}がある。さらに、ヒト HCC 臨床検体についての研究では、腫瘍内の HIF-1 α タンパク質レベルが有意に上昇し²⁴⁾、発現が上昇すると予後の悪化と関連することが報告されている²⁵⁾。HCC 患者の治療を成功させるために低酸素での薬剤抵抗性の解明は非常に重要である。

LEN の治療抵抗性については、これまでに hepatocyte growth factor (HGF) の受容体である c-MET が高発現している細胞において HGF が抗増殖作用、pro-apoptosis、抗浸潤効果を低下させることで LEN の効果を減弱させる報告²⁶⁾、血

管新生などの転写制御因子である ETS-1 が VEGFR を介した LEN 抗腫瘍作用抵抗性に関与する報告²⁷⁾がある。しかし、低酸素での HCC に対する LEN 抗腫瘍作用抵抗性については報告がない。本研究は既報において¹¹⁾LEN 低感受性を示した 2 種類の HCC 細胞株 (PLC/PRF/5 細胞, HepG2 細胞) を用いて、低酸素の LEN 治療抵抗性に関与するメカニズムについて明らかにすることを目的とした。

3. 実験材料および実験方法

Cells line and Cell culture

PLC/PRF/5 および HepG2 の 2 つの HCC 細胞株は、東北大学生物医学研究用細胞資源センター（日本、仙台）から入手した。これらの細胞株は、10%のウシ胎児血清（FBS, Gibco）を含む高グルコース DMEM（Gibco, Grand Island, NY, USA）で培養した。細胞は、37°Cの通常酸素環境（95%大気、5%CO₂）または低酸素環境（94%N₂、5%CO₂、1%O₂）下で培養した。

Cell proliferation assay

96 ウェルプレートに 1×10^4 個の細胞を播種し、通常酸素または低酸素下で一晩培養した。次に、2 倍連続希釈したレンバチニブメシル酸塩（フナコシ、東京、日本）または溶媒（DMSO）で細胞を処理した。さらに、通常酸素下または低酸素下で 72 時間培養した後、CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Cell Proliferation Assay（Promega, WI, USA）を用いて細胞生存率を測定した。各ウェルに MTS（[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulphophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt]）試薬を 20 μ L ずつ加え、DMSO で培養した細胞をコントロールとし、490 nm の波長で吸光度（OD）を測定した。阻害率は、

次の式に従って算出した：実験 OD 値 / コントロール OD 値 × 100%。データは、
平均値 ± 平均の標準誤差 (SEM) として示し、3 回の独立した実験を行った。

Microarray analysis

60mm ディッシュに 5×10^5 個の PLC/PRF/5 細胞を播種し、通常または低酸素条件下で 12 時間前培養した。17.5 μ M の LEN を添加した後、さらに通常または低酸素条件下で 72 時間インキュベートした。TRIzol 試薬 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) を用いて PLC/PRF/5 細胞から Total RNA を抽出した。網羅的 mRNA 解析は、東レの 3D-Gene mRNA オリゴチップ v.16 (東レ株式会社、東京) を用いて行った。RNA サンプルとインキュベートした後、チップを東レのプロトコールに従って厳密に洗浄し、3D-Gene Scanner 3000 で蛍光シグナルをスキャンし、2 色法にて 3D-Gene Extraction ソフトウェアを用いて解析した。各 mRNA の発現レベルは、各マイクロアレイのすべての mRNA のシグナル強度をバックグラウンドで減算した値を用いて正規化した。低酸素下での LEN の効果を減弱させる分子遺伝学的要因を調べるために、以下の手順で mRNA リストを作成した。実験は、通常酸素 LEN 非添加群の global normalization の中央値の少なくとも 4 倍の値を示す遺伝子に対して行った。まず、通常酸素下での LEN 非添加群と LEN 添加群を比較して、global normalization の値が 1.5 倍以上減少した mRNA を同定

した。次に、通常酸素下 LEN 添加群と低酸素下 LEN 添加群を比較し、global normalization の値が 1.5 倍以上増加した mRNA を同定した。最後に、各比較対象に共通する mRNA を抽出し、今後の解析に使用した。

Quantitative real-time PCR (q-RT-PCR)

遺伝子発現は以下の方法を用いて q-RT-PCR で定量した。60 mm ディッシュ上に PLC/PRF/5 細胞を 5×10^5 個で播種し、通常または低酸素下で 12 時間前培養し、LEN もしくは DMSO を添加後通常酸素または低酸素下で 0~72 時間培養した。上述の方法で total RNA を回収し、プロトコールに従って High-Capacity RNA-to-cDNA™ Kit を用いて cDNA を逆転写した (Thermo Fisher Scientific, MA, USA)。リアルタイム RT-PCR は、PowerUp™ SYBR™ Green Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) を用いて行った。プライマーは以下のものを使用した。: FN1, forward, 5'-AGGACTGGCATTCACTGATGTG-3' and reverse, 5'-GTCACCCTGTACCTGGAAACTTG-3'; HIF1A, forward, 5'-GCAGAATGCTCAGAGAAAGCG-3' and reverse, 5'-TAGCTGCATGATCGTCTGGC-3'. ACTB, forward, 5'-CGTCTTCCCCTCCATCGTG-3' and reverse, 5'-TCGTCGCCCCACATAGGAATC-3'.

Gene ontology functional enrichment analysis and protein-protein interaction analysis

Gene Ontology (GO) 解析には DAVID 6.8 Bioinformatics Resources (<https://david.ncifcrf.gov/>)²⁸⁻²⁹⁾を使用した。本研究では、同定された差次的発現遺伝子の有意に集積された生物学的プロセスの GO 用語について分析を行った。タンパク質-タンパク質相互作用ネットワークは、STRING (<https://string-db.org/>) オンライン検索ツールを用いて確立した³⁰⁾。STRING 分析では、中程度の信頼度のタンパク質相互作用スコア 0.4 を使用した。

Immunofluorescence microscopy

Fibronectin の発現を調べるために、PLC/PRF/5 細胞と HepG2 細胞で fibronectin 染色を行った。細胞はチャンバースライド上で 5×10^5 個で、通常酸素下で 12 時間培養した。その後、PLC/PRF/5 細胞は 17.5 μM LEN で、HepG2 細胞は 25 μM LEN で、通常酸素下または低酸素下で 48 時間処理した。細胞を PBS で洗浄し、4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS 中 0.5% Triton X-100 で透過処理し、ブロッキング溶液で前処理した。固定して非特異的結合をブロックした後、チャンバースライドを、ウサギの蛍光標識抗 fibronectin 抗体 (Alexa Fluor[®] 488 Anti-Fibronectin, Abcam plc.) とともに、遮光しながら室温で 1 時間インキュベートした。その後、DAPI 含有退色防止試薬 (Fluoro-KEEPER[®], Nacalai Tesque Inc)

をスライドガラスに添加した。準備したものを蛍光顕微鏡（Keyence, BZ-X700, Osaka, Japan）を用いて分析した。

ELISA

100 mm ディッシュ上に 2×10^6 個で PLC/PRF/5 細胞または HepG2 細胞を播種し、通常酸素下で 12 時間前培養した後、PLC/PRF/5 細胞には $17.5 \mu\text{M}$ LEN を、HepG2 細胞には $25 \mu\text{M}$ LEN を添加し、それぞれ通常酸素下または低酸素下で 48 時間培養した後、細胞培養上清中の fibronectin 発現量を評価した。ELISA は、Human Fibronectin Kit (R&D, MN, USA) に記載された手順に従って実施した。簡潔に述べると、 $100 \mu\text{L}$ の標準ヒト fibronectin または細胞培養上清（キット内のバッファーで 100 倍に希釈）を ELISA プレートに準備し、 $50 \mu\text{L}$ の各ヒト fibronectin 抗体溶液を加えた。その後、プレートをマイクロプレートシェーカーで 2 時間、室温でインキュベートした。次に、すべての内容物をデカンテーションし、プレートをキットの洗浄バッファーで 4 回洗浄し、 $200 \mu\text{L}$ のヒト fibronectin コンジュゲートを加えた。さらに、プレートを室温で 2 時間、マイクロプレートシェーカーでインキュベートした。内容物をすべてデカンテーションした後、プレートをキット洗浄バッファーで 4 回洗浄し、 $200 \mu\text{L}$ の基質溶液を加えた。最後に $50 \mu\text{L}$ の 2N 硫酸の停止液を加えた。波長 450 nm のマイクロプレートリー

ダーを用いて、プレートの各ウェルの光学濃度を測定した。

Small interfering RNA transfection

ヒト fibronectin に対する低分子干渉 RNA (siRNA) 二重鎖 (sc-29315) および非標的 siRNA (sc-36869) は Santa Cruz (TX, USA) の siRNA コレクションから入手した。PLC/PRF/5 細胞を 96 ウェルプレートに 1×10^4 個で播種し、INTERFERin トランスフェクション試薬 (Polyplus, Illkirch, France) を用いて、メーカーのプロトコールに従って 1nM の siRNA をトランスフェクトした。36 時間後、低酸素下において LEN の曝露処理を行った。

Western blotting

PLC/PRF/5 細胞または HepG2 細胞を 2×10^6 個で 100mm ディッシュ上に播種し、通常酸素下で 12 時間前培養した。次に、PLC/PRF/5 細胞と HepG2 細胞を、それぞれ 17.5 μ M と 25 μ M の LEN で、通常酸素下または低酸素下で 48 時間処理した。細胞は、プロテイナーゼ阻害剤 (Santa Cruz Biotechnology, TX, USA) を添加した M-PER™ Mammalian Protein Extraction Reagent (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) で溶解した。タンパク質濃度は、BCA protein assay kit (Fuji Film, Tokyo, Japan) を用いて測定した。等量のタンパク質 (20 μ g) を、ドデシ

ル硫酸ナトリウム (SDS) -ポリアクリルアミドゲル電気泳動 (PAGE) (4%
-12%標準ゲル) を用いて、150V の定電圧で 50 分間分離した。ウェスタンブロッ
ット分析は、標準的なプロトコールに従って行った。タンパク質をポリビニリデ
ンジフルオライド (PVDF) メンブレン (Bio-Rad, CA, USA) に 24V の定電
圧で 30 分間ブロッキングした。その後、メンブレンを Blocking One-P (Nacalai
Tesque, Kyoto, Japan) で 4°Cにて一晩ブロッキングした。その後、0.1%Tween20
洗剤を含むトリス緩衝生理食塩水 (TBS-T) を用いてメンブレンを洗浄し、
p44/42 MAPK (ERK1/2) を標識した一次抗体 (CST, MA, USA; Cat. p44/42
MAPK (ERK1/2) (CST, MA, USA; Cat. #9102)、phospho-p44/42 MAPK (p-ERK1/2)
(CST, MA, USA; Cat. #9101)、および β -actin (CST, MA, USA; Cat. #4967) で標識し
た一次抗体と一緒に、遮光しながら室温で 1 時間インキュベートした。その後、
メンブレンを二次抗体と室温で 1 時間、暗所でインキュベートした。抗体濃度
は、TBS-T で 1:1000 (一次抗体) および 1:5000 (二次抗体) とした。ブロッ
トの検出には、ECL prime western blotting detection reagents (Amersham cytiva,
Tokyo, Japan) を用いた。化学発光バンドは Lumino Graph III (ATTO, Tokyo, Japan)
および Image J 1.53 (<http://imagej.nih.gov/ij>) を用いて可視化した。

Statistical analysis

解析には JMP 14.2 (SAS Institute, NC, USA) を使用した。データは, ANOVA (ポストホックテストとして Tukey 検定) または Student の t-検定を行って解析した。統計的有意性は $p < 0.05$ とした。

4. 結果

4.1. PLC/PRF/5 細胞と HepG2 細胞における Lenvatinib (LEN) の用量反応測定

PLC/PRF/5 細胞および HepG2 細胞における通常酸素及び低酸素での LEN に対する用量反応について、細胞生存率での評価を MTS assay により行った。通常酸素下に比べ低酸素下での LEN 12.5 μ M の濃度において PLC/PRF/5 細胞では 47.2%、HepG2 では 13.2%の細胞生存率の増加が見られた (Fig. 2A and 2B)。IC₅₀ 値については、PLC/PRF/5 細胞では通常酸素で 13.0 \pm 0.8 μ M、低酸素で 21.3 \pm 1.1 μ M と低酸素において有意な増加がみられたが、HepG2 細胞においては通常酸素で 23.0 \pm 0.8 μ M、低酸素で 26.3 \pm 1.1 μ M と有意差は認められなかった。通常酸素に対する低酸素での IC₅₀ の増加率については PLC/PRF/5 細胞および HepG2 細胞でそれぞれ 63.8 \pm 3.3 %、14.3 \pm 0.9 %であり PLC/PRF/5 細胞においてより著明な増加がみられた (Fig. 2C)。これにより LEN は用量依存的に細胞増殖阻害を示したが、PLC/PRF/5 細胞においては低酸素で LEN の細胞増殖抑制作用に対して抵抗性を示した。また、実験における LEN の濃度は、PLC/PRF/5 細胞において差の大きかった濃度の間の 17.5 μ M に設定した。

4.2. PLC/PRF/5 細胞の低酸素下 LEN 抗腫瘍作用抵抗性に関する網羅的遺伝子解析

PLC/PRF/5 細胞から抽出した total RNA を用いて網羅的遺伝子解析を行った。通常酸素環境下において、LEN 添加群では LEN 非添加群に比べ、921 個の発現抑制された遺伝子が抽出された。Table 1 に発現抑制比率が大きい上位 50 の遺伝子一覧を示した。低酸素下での LEN 添加により、通常酸素下での LEN 添加群と比較して、発現量が上昇した遺伝子が 409 個抽出された。Table 2 に発現上昇比率が大きい上位 50 の遺伝子一覧を示した。さらに、実験方法に記載した手順により低酸素下 LEN 抗腫瘍作用抵抗性に関連する 200 個の異なる遺伝子が同定された。Table 3 には、前述の 2 条件の比率の比較において変化率の大きい上位 50 の遺伝子一覧を示した。同定された mRNA は、主に細胞外エクソソーム、細胞膜、膜結合小胞などの細胞構成に関連する成分に属していた。mRNA の機能的役割を検討するために DAVID bioinformatics tool を使用して Gene Ontology (GO) analysis (cell component) を行ったところ、主に extracellular matrix (ECM) に関連する GO term が含まれていた (Fig. 3A)。さらなる解釈のため、識別された遺伝子の機能的相互作用ネットワークについて STRING ソフトウェアを使用して解析したところ、ECM 成分である fibronectin をコードする FN1 遺伝子がハブとして同定された (Fig. 3B)。

4.3. 低酸素下培養における PLC/PRF/5 の HIF1A および FN1 遺伝子発現レベル

PLC/PRF/5 細胞に対する低酸素培養の影響について検討するために、通常酸素および低酸素での HIF-1 α をコードする HIF1A の mRNA 発現量の解析を行った。前培養 12 h を行った直後 (0 h) において、通常酸素に比べて低酸素での HIF1A の有意な増加がみられた (Fig. 4A)。FN1 遺伝子についても同様に mRNA 発現量の評価を行ったところ、各時間において通常酸素に比べて低酸素で有意に増加が見られ、特に 48 h においてその差が顕著であった (Fig. 4B)。

4.4. HCC 細胞株の fibronectin 蛍光免疫染色および培養液中の fibronectin 定量

PLC/PRF/5 細胞および HepG2 細胞において通常酸素、低酸素での fibronectin について、培養 48 h におけるタンパク質発現量の解析を行った。蛍光免疫染色法による解析では、PLC/PRF/5 細胞において低酸素で細胞内外での fibronectin の発現増加が見られた。また、LEN 添加により、通常酸素および低酸素において fibronectin 発現は低下する傾向が認められた。HepG2 細胞ではいずれの条件でも fibronectin の発現に大きな変化が認められなかった (Fig. 5A)。培養液中の fibronectin 濃度について ELISA により測定したところ、PLC/PRF/5 細胞では通常酸素 (LEN-) で 24.0 ± 1.5 ng/mL、低酸素 (LEN-) で 54.8 ± 7.1 ng/mL と低酸素で有意に増加した。また、通常酸素 (LEN+) で 23.5 ± 8.8 ng/mL、低酸素 (LEN+) で 38.6 ± 7.3 ng/mL と LEN 存在下においても低酸素での fibronectin の

発現量は増加傾向にあった (Fig. 5B)。HepG2 細胞においては、低酸素における培養液中の fibronectin 濃度の増加は認められず、発現レベルは PLC/PRF/5 細胞に比べて低かった (Fig. 5C)。

4.5. PLC/PRF/5 細胞に対する FN1 knockdown による低酸素での LEN 効果

FN1 knockdown による低酸素での PLC/PRF/5 細胞に対する LEN の効果について検討した。PLC/PRF/5 細胞に対し、36 h の fibronectin 特異的 siRNA 導入後、有意な FN1 遺伝子発現レベルの低下が認められた (Fig. 6A)。続いて、FN1 knockdown 後、通常酸素と低酸素で LEN 添加し 48 h 培養を行った。通常酸素での培養に比べ PLC/PRF/5 細胞に対する LEN の細胞増殖抑制作用の有意な改善が認められた (Fig. 6B)。

4.6. PLC/PRF/5 細胞および HepG2 細胞の ERK1/2 タンパク質の発現解析

低酸素の LEN 抗腫瘍作用抵抗性機序について検討するために、細胞内生存シグナルである extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK 1/2) について、ERK1/2 のタンパク質全体 (w-ERK1/2) とその活性化タンパク質であるリン酸化 ERK1/2 (p-ERK1/2) の発現を western blotting 法により解析した。PLC/PRF/5 細胞においては 24 h 時点で低酸素での p-ERK が発現上昇し、48 h 時点では通常酸素、低

酸素ともに LEN (+) で p-ERK1/2 の発現上昇が認められた (Fig. 7A)。同様に HepG2 細胞で検討を行ったところ、24 h 時点では通常酸素 LEN (-) に比べ、通常酸素 LEN (+) および低酸素 LEN (-) で p-ERK が発現低下し、48h 時点においては、低酸素で LEN (+) 、LEN (-) とともに p-ERK の発現上昇が認められた (Fig. 7B)。

5. 考察

本研究では HCC 細胞株を用いて低酸素における LEN 抗腫瘍作用抵抗性を確認した。低酸素において IC₅₀ 上昇率が大きかった PLC/PRF/5 細胞について解析を行い、低酸素での LEN 抗腫瘍作用抵抗性には ECM が関与すること、その中でも中心的な役割を果たす fibronectin の発現量が有意に上昇することを示した。本研究は HCC 細胞に対する低酸素での LEN 抗腫瘍作用抵抗性に関する初めての報告となる。

PLC/PRF/5 細胞および HepG2 細胞については、低酸素での SFB 抗腫瘍作用抵抗性は既に検討されている^{22,23)}。低酸素の LEN 効果の検討では PLC/PRF/5 細胞においては SFB の先行研究と類似の傾向を示したが、HepG2 細胞においては低酸素下の SFB 先行研究と比べ、本研究では IC₅₀ の上昇率は小さかった。PLC/PRF/5 細胞は SFB、LEN 共に低感受性の細胞であることが報告されており¹¹⁾、低酸素の影響によりさらに感受性が低下したと考えられる。一方、HepG2 細胞については LEN よりも SFB のほうで感受性が高い報告³¹⁾があるが、通常酸素でも低感受性を示した本研究の結果を支持するものとする。

低酸素での LEN 抗腫瘍作用減弱のメカニズムを解析するために bioinformatics analysis を行い fibronectin の関与が重要であることを明らかにした。Fibronectin

は細胞接着や移動、創傷治癒など正常細胞での役割³²⁻³⁶⁾のほかに腫瘍細胞の転移、放射線抵抗性、細胞増殖に関与していることが報告³⁷⁾されている。外科的に切除された HCC は正常肝細胞に比べて fibronectin が過剰発現していたという報告³⁸⁾からも HCC においてはその関与が大きい可能性がある。Fibronectin などの ECM が抗癌剤の抵抗性に関与する報告は胃癌、乳癌などの癌種で報告³⁹⁻⁴¹⁾され、がん患者の検体を用いて化学療法抵抗性を検討した研究においても ECM の関与が示唆されている⁴²⁾。さらに、低酸素が ECM の発現調節に関係していることについても報告がある^{43,44)}。PLC/PRF/5 細胞での検討では、HIF1A 発現レベルは、低酸素培養後に速やかにピークに達し、FN1 発現レベルは HIF1A 発現レベルのピーク時点から 48 h 後に最も上方制御された。今回の結果は、HCC における HIF1A の発現量は低酸素培養後 24 時間以内に上昇するが、別のがん種における低酸素下での FN1 の発現量は、HIF1A の発現量よりも遅れて上昇するという過去の報告を支持するものであった^{45,46)}。蛍光免疫染色で検討した PLC/PRF/5 細胞の fibronectin 発現量は低酸素下で細胞内外において大きく上昇し、通常酸素下の LEN 添加により低下する傾向であった。さらに ELISA で検討した PLC/PRF/5 細胞の培養液中の fibronectin 濃度は LEN (-) 条件では通常酸素に比べて低酸素で 2.3 倍に上昇し、LEN (+) 条件では通常酸素に比べ低酸素では 1.6 倍に上昇した。以上のことと、PLC/PRF/5 細胞の網羅的遺伝子解析により、通常

酸素での LEN 添加により下方制御され、低酸素で上方制御された遺伝子群の代表として FN1 が抽出されたことを踏まえると、PLC/PRF/5 細胞においては、通常酸素下では LEN の直接的な標的ではないが fibronectin を低下させる効果があるが、低酸素下では HIF-1 α などの転写調節因子が誘導され、fibronectin の産生が亢進することで LEN の効果が減弱することが薬剤抵抗性を引き起こすメカニズムのひとつであると推察される。一方、HepG2 細胞においては、fibronectin の蛍光免疫染色および培養液中の ELISA いずれにおいても発現量の大きな変動は見られなかった。HepG2 細胞または PLC/PRF/5 細胞の上皮間葉転換 (EMT) マーカーを調べた報告によると、通常酸素と低酸素によらず、fibronectin と同様の EMT マーカーである vimentin の発現レベルが両細胞間で大きく異なることが報告されている⁴⁷⁾。また、vimentin と fibronectin の発現には相関関係があることも報告されている^{48,49)}。これらのことから、PLC/PRF/5 細胞と HepG2 細胞では、fibronectin の発現量に違いがあり、低酸素下での fibronectin の挙動は、PLC/PRF/5 細胞に特有の現象であると推測される。Fibronectin が低酸素下における LEN 治療に重要な鍵になることを踏まえて、膵臓癌細胞の fibronectin 存在下の gemcitabine の治療抵抗性を fibronectin 阻害剤である RGDS の併用により克服した報告⁵⁰⁾を参考に、PLC/PRF/5 細胞を用いて低酸素下で LEN と RGDS の併用実験を行ったが、有意な LEN 抗腫瘍作用抵抗性解除は示されなかった (data not

shown)。一方、PLC/PRF/5 細胞において FN1 knockdown により低酸素下で LEN 抗腫瘍作用の回復を示したことから、PLC/PRF/5 細胞のような低酸素で fibronectin の産生が上昇するような性質をもつ HCC に対して、競合的な阻害ではなく効率的に fibronectin の合成や下流シグナルを阻害することは、低酸素下 LEN 抗腫瘍作用抵抗性の解除に重要なストラテジーとなる可能性がある。

さらに、細胞増殖に関して重要なシグナル伝達経路として知られる mitogen-activated protein kinase (MAPK)の key signaling molecule である ERK1/2 についてタンパク質の発現解析を行った。ERK1/2 は、LEN の作用点である FGFR の下流タンパク質として知られ、HCC 細胞株である Hep3B2.1-7 細胞、Huh-7 細胞を用いた実験で ERK1/2 の活性化タンパク質である p-ERK1/2 が LEN の作用により下方制御されるという報告がある⁵¹⁾。本研究において PLC/PRF/5 細胞において低酸素下 24 h での p-ERK1/2 の発現上昇を確認した。一方、低酸素は ERK を活性化し、活性化された ERK は HIF-1 α を上方制御することが知られている⁵²⁾。ERK1/2 はリン酸化されることにより活性化し、転写因子を含む様々な基質をリン酸化することにより細胞増殖や分化、生存、細胞死など細胞の機能発現に関係する⁵³⁾ことを考慮すると、PLC/PRF/5 細胞において低酸素でみられた ERK1/2 の活性化はさらに下流の細胞内プロセスに影響を与え、HIF-1 α の活性化と fibronectin の発現亢進にも貢献していると推定された。一方、通常酸素および低

酸素下 48 h では LEN 添加群の p-ERK1/2 発現上昇は、先行研究⁵¹⁾を参考とした想定とは異なる結果であった。前立腺癌に対して TKI である nilotinib を作用させたところ細胞増殖抑制と同時に p-ERK1/2 の活性化が観察されている⁵⁴⁾。PLC/PRF/5 細胞では LEN 感受性の Hep3B2.1-7 細胞、Huh-7 細胞とは異なり LEN の作用が MAPK 経路の抑制を主標的とせず、MAPK 経路に対してはパラドキシカルな作用をもたらし、他経路の抑制の代償として LEN 存在下で p-ERK1/2 が活性化した可能性を考える。HepG2 細胞の p-ERK1/2 の挙動は PLC/PRF/5 細胞と異なり、低酸素下 48 h で発現上昇が確認された。HepG2 細胞の 48 時間後の p-ERK1/2 の発現パターンは、PLC/PRF/5 細胞の 24 時間後の発現パターンと同様であった。低酸素による HepG2 細胞の化学療法への耐性を調べた先行研究では、低酸素培養開始から 48 時間後に p-ERK1/2 の発現がピークに達することが報告されている⁵⁶⁾。今回の結果と合わせて考えると、HepG2 細胞の低酸素による p-ERK1/2 の発現上昇は、PLC/PRF/5 細胞の p-ERK1/2 の発現上昇よりも遅く起こると推察される。細胞腫による反応の多様性がうかがえる結果となった。

本研究では HCC 細胞株を用いて、低酸素での LEN 抗腫瘍作用抵抗性を確認し、その機序として ECM である fibronectin が HCC 細胞株 PLC/PRF/5 細胞の低酸素で誘発される LEN 抗腫瘍作用抵抗性に重要な役割を果たすことを示唆した。Fibronectin はインテグリンと結合し細胞内シグナルを伝達することが知られて

いる⁵⁷⁾が、今回の結果を踏まえると、ERK1/2 の活性化は LEN の作用の代償としての活性化だけではなく、HCC の再発・増悪に関与することも考えられる (Fig.8)。Fibronectin 及び Fibronectin 関連経路を阻害する薬剤の開発は fibronectin 産生が亢進している HCC に対する LEN 治療に多大な貢献をもたらすと考えられる。

6. 謝辞

本論文の作成にあたり、終始御懇篤な御指導、御鞭撻を賜りました東北医科薬科大学薬学部薬理学教室 丹野孝一教授、東北医科薬科大学薬学部微生物学教室 久下周佐教授に深く感謝申し上げます。

本研究を行うにあたり、終始御懇篤な御指導と御鞭撻を賜りました東北医科薬科大学薬学部臨床薬剤学教室 村井ユリ子教授ならびに中村仁教授、東北医科薬科大学薬学部病院薬剤学教室 岡田浩司准教授に心より感謝申し上げます。また、研究を行う上で御助言・技術など幅広く御指導いただきました東北医科薬科大学薬学部臨床薬剤学教室 鈴木裕之先生、金野太亮先生、東北医科薬科大学薬学部病院薬剤学教室 薄井健介先生、大内竜介先生に心より感謝申し上げます。東北医科薬科大学医学部内科学第二 (消化器内科) 教室 佐藤賢一教授、小暮高之先生、佐藤麻理先生に多くのご協力を頂きましたことを心より感謝申し上げます。

大学院進学にあたり多大なる御助言を賜りました東北医科薬科大学薬学部病院薬剤学教室 渡邊善照客員教授に心より感謝申し上げます。

本研究の機会を与えてくださり、多大なる御支援を賜りました東北医科薬科大学理事長・学長 高柳元明先生に深く感謝の意を表します。

7. 引用文献

- 1) Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, Bray F, Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 cancers in 185 Countries, CA CANCER J CLIN, 2021, 0, 1-41.
- 2) Cancer Epidemiology and Prevention. In: Liver cancer 4th ed., edited by Thomas LW, Petrick JL and McGlynn KA, Oxford University Press, pp. 635-660
- 3) Marengo A, Rosso C, Bugianesi E. Liver cancer: connections with obesity, fatty liver, and cirrhosis. Annu Rev Med. 2016; 67:103-117.
- 4) Waller LP, Deshpande V, Prysopoulos N, Hepatocellular carcinoma: A comprehensive review, World J Hepatol, 2015, 18; 7(26):2648-63
- 5) Jordi Bruix, Josep M Llovet, Prognostic prediction and treatment strategy in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2002 Mar; 35(3):519-24.
- 6) Hashem B El-Serag 1, Jorge A Marrero, Lenhard Rudolph, K Rajender Reddy, Diagnosis and treatment of hepatocellular carcinoma. Gastroenterology. 2008 May; 134(6):1752-63.
- 7) European Association for the Study of the Liver (2018), EASL Clinical practice Guidelines: Management of hepatocellular carcinoma, J Hepatol, 69, 182-236.

- 8) National Comprehensive Cancer Network. (2021). Hepatobiliary Carcinoma (version 2.2021). https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/hepatobiliary.pdf
- 9) Masatoshi Kudo , Richard S Finn, Shukui Qin, Kwang-Hyub Han, Kenji Ikeda, Fabio Piscaglia, Ari Baron, Joong-Won Park, Guohong Han, Jacek Jassem, Jean Frederic Blanc, Arndt Vogel, Dmitry Komov, T R Jeffrey Evans, Carlos Lopez, Corina Dutcus, Matthew Guo, Kenichi Saito, Silvija Kraljevic, Toshiyuki Tamai, Min Ren, Ann-Lii Cheng, Lenvatinib versus sorafenib in first-line treatment of patients with unresectable hepatocellular carcinoma: a randomised phase 3 non-inferiority trial, *Lancet*, 2018;391(10126):1163-1173.
- 10) Andrew X Zhu, Nagaraj S Holalkere, Alona Muzikansky, Kerry Horgan, Dushyant V Sahani, Early antiangiogenic activity of bevacizumab evaluated by computed tomography perfusion scan in patients with advanced hepatocellular carcinoma, *Oncologist*, 2008 ;13(2):120-5.
- 11) Masahiro Matsuki, Taisuke Hoshi, Yuji Yamamoto, Megumi Ikemori-Kawada, Yukinori Minoshima, Yasuhiro Funahashi, Junji Matsui, Lenvatinib inhibits angiogenesis and tumor fibroblast growth factor signaling pathways in human hepatocellular carcinoma models, *Cancer Med*, 2018 ;7(6):2641-2653.
- 12) L R Desnoyers, R Pai, R E Ferrando, K Hötzel, T Le, J Ross, R Carano, A D'Souza, J

Qing, I Mohtashemi, A Ashkenazi, D M French, Targeting FGF19 inhibits tumor growth in colon cancer xenograft and FGF19 transgenic hepatocellular carcinoma models, *Oncogene*. 2008; 27(1):85-97.

13) Seiki Miura, Noboru Mitsuhashi, Hiroaki Shimizu, Fumio Kimura, Hiroyuki Yoshidome, Masayuki Otsuka, Atsushi Kato, Takashi Shida, Daiki Okamura and Masaru Miyazaki, Fibroblast growth factor 19 expression correlates with tumor progression and poorer prognosis of hepatocellular carcinoma, *BMC Cancer*. 2012; 12: 56.

14) Katrina Nicholes, Susan Guillet, Elizabeth Tomlinson, Kenneth Hillan, Barbara Wright, Gretchen D Frantz, Thinh A Pham, Lisa Dillard-Telm, Siao Ping Tsai, Jean-Philippe Stephan, Jeremy Stinson, Timothy Stewart, Dorothy M French, A mouse model of hepatocellular carcinoma: ectopic expression of fibroblast growth factor 19 in skeletal muscle of transgenic mice, *Am J Pathol*, 2002 ;160(6):2295-307.

15) Qian Tan, Jasdeep K Saggar, Man Yu, Marina Wang, Ian F Tannock, Mechanisms of Drug Resistance Related to the Microenvironment of Solid Tumors and Possible Strategies to Inhibit Them, *Cancer J*. 2015;21(4):254-62.

16) Manuel Schlageter, Luigi Maria Terracciano, Salvatore D'Angelo, and Paolo Sorrentino, Histopathology of hepatocellular carcinoma, *World J Gastroenterol*. 2014; 20(43): 15955–15964.

- 17) Chu Chen and Tao Lou, Hypoxia inducible factors in hepatocellular carcinoma, *Oncotarget*. 2017; 8(28): 46691–46703
- 18) S R McKeown, Defining normoxia, physoxia and hypoxia in tumours—implications for treatment response, *Br J Radiol*. 2014; 87(1035): 20130676.
- 19) Hong Wu, Tao Wang, Yiqiang Liu, Xin Li, Senlin Xu, Changtao Wu, Hongbo Zou, Mianfu Cao, Guoxiang Jin, Jinyi Lang, Bin Wang, Mitophagy promotes sorafenib resistance through hypoxia-inducible ATAD3A dependent Axis. *J Exp Clin Cancer Res*. 2020; 39: 274.
- 20) Yunching Chen, Rakesh R Ramjiawan, Thomas Reiberger, Mei R Ng, Tai Hato, Yuhui Huang, Hiroki Ochiai, Shuji Kitahara, Elizabeth C Unan, Tejaswini P Reddy, Christopher Fan, Peigen Huang, Nabeel Bardeesy, Andrew X Zhu, Rakesh K Jain, Dan G Duda. CXCR4 inhibition in tumor microenvironment facilitates anti-programmed death receptor-1 immunotherapy in sorafenib-treated hepatocellular carcinoma in mice. *Hepatology*. 2015 May; 61(5):1591-602.
- 21) Gregg L Semenza, Targeting HIF-1 for cancer therapy, *Nat Rev Cancer*. 2003; 3(10):721-32.
- 22) Haitao Xu, Liang Zhao, Qiuju Fang, Jianmin Sun, Songyan Zhang, Chao Zhan, Shujie Liu, Yubao Zhang, MiR-338-3p inhibits hepatocarcinoma cells and sensitizes these cells

to sorafenib by targeting hypoxia-induced factor 1 α . PLoS One. 2014 Dec 22; 9(12):e115565.

23) Yingjian Liang, Tongsen Zheng, Ruipeng Song, Jiabei Wang, Dalong Yin, Luoluo Wang, Haitao Liu, Lantian Tian, Xiang Fang, Xianzhi Meng, Hongchi Jiang, Jiaren Liu, Lianxin Liu, Hypoxia-mediated sorafenib resistance can be overcome by EF24 through Von Hippel-Lindau tumor suppressor-dependent HIF-1 α inhibition in hepatocellular carcinoma. Hepatology. 2013 May; 57(5):1847-57.

24) Chen-Xin Dai, Qiang Gao, Shuang-Jian Qiu, Min-Jie Ju, Ming-Yan Cai, Yong-Feng Xu, Jian Zhou, Bo-Heng Zhang, Jia Fan, Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with inflammation, angiogenesis and MYC, is a critical prognostic factor in patients with HCC after surgery, BMC Cancer. 2009 Dec; 9:418.

25) Sheng-Li Yang, Li-Ping Liu, Jian-Xin Jiang, Zhi-Fan Xiong, Qian-Jin He, Chao Wu, The correlation of expression levels of HIF-1 α and HIF-2 α in hepatocellular carcinoma with capsular invasion, portal vein tumor thrombi and patients' clinical outcome, Jpn J Clin Oncol. 2014; 44(2):159-67.

26) Rongdang Fu, Shaotao Jiang, Jieyuan Li, Huanwei Chen, Xiaohong Zhan, Activation of the HGF/c-MET axis promotes lenvatinib resistance in hepatocellular carcinoma cells with high c-MET expression, Med Oncol. 2020 Mar; 37(4):24.

- 27) Zhongwei Zhao, Dengke Zhang, Fazong Wu, Jianfei Tu, Jingjing Song, Min Xu, Jiansong Ji, Sophoridine suppresses lenvatinib-resistant hepatocellular carcinoma growth by inhibiting RAS/MEK/ERK axis via decreasing VEGFR2 expression, *J Cell Mol Med.* 2021 ;25(1):549-560.
- 28) Glynn Dennis Jr, Brad T Sherman, Douglas A Hosack, Jun Yang, Wei Gao, H Clifford Lane, Richard A Lempicki, DAVID: Database for Annotation, Visualization, and Integrated Discovery. *Genome Biol.* 2003;4(5):P3
- 29) Da Wei Huang, Brad T Sherman, Richard A Lempicki, Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources, *Nat Protoc.* 2009; 4(1):44-57.
- 30) Damian Szklarczyk, Annika L Gable, David Lyon, Alexander Junge, Stefan Wyder, Jaime Huerta-Cepas, Milan Simonovic, Nadezhda T Doncheva, John H Morris, Peer Bork, Lars J Jensen, Christian von Mering, STRING v11: protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets, *Nucleic Acids Res.* 2019; 47(D1):D607-D613.
- 31) María A Rodríguez-Hernández, Raquel Chapresto-Garzón, Miryam Cadenas, Elena Navarro-Villarán, María Negrete, Miguel A Gómez-Bravo, Victor M Victor, Francisco J Padillo, Jordi Muntané, Differential effectiveness of tyrosine kinase inhibitors in 2D/3D

culture according to cell differentiation, p53 status and mitochondrial respiration in liver cancer cells. *Cell Death Dis.* 2020 May 7; 11(5):339.

32) S Aota, M Nomizu, K M Yamada, The short amino acid sequence Pro-His-Ser-Arg-Asn in human fibronectin enhances cell-adhesive function, *J Biol Chem.* 1994 Oct 7;269(40):24756-61.

33) Razia S Aziz-Seible, Carol A Casey, Fibronectin: functional character and role in alcoholic liver disease, *World J Gastroenterol.* 2011 May 28; 17(20):2482-99.

34) Purva Singh, Jean E Schwarzbauer, Fibronectin and stem cell differentiation - lessons from chondrogenesis, *J Cell Sci.* 2012 Aug 15;125(Pt 16):3703-12.

35) Jennifer Veevers-Lowe, Stephen G Ball, Adrian Shuttleworth, Cay M Kielty, Mesenchymal stem cell migration is regulated by fibronectin through $\alpha 5\beta 1$ -integrin-mediated activation of PDGFR- β and potentiation of growth factor signals, *J Cell Sci.* 2011 Apr 15;124(Pt 8):1288-300.

36) Matthew Brentnall, David B Weir, Anthony Rongvaux, Adam I Marcus, Lawrence H Boise, Procaspase-3 regulates fibronectin secretion and influences adhesion, migration and survival independently of catalytic function, *J Cell Sci.* 2014 May 15;127(Pt 10):2217-26.

37) Fredrik Jerhammar 1, Rebecca Ceder, Stina Garvin, Reidar Grénman, Roland C

Grafström, Karin Roberg, Fibronectin 1 is a potential biomarker for radioresistance in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Biol Ther.* 2010 Dec 15;10(12):1244-51.

38) Michael Torbenson M.D., Jianzhou Wang M.D., Michael Choti M.D., Raheela Ashfaq M.D., Anirban Maitra M.D., Robb E Wilentz M.D. & John Boitnott M.D., Hepatocellular Carcinomas Show Abnormal Expression of Fibronectin Protein. *Mod Pathol.* 2002 Aug; 15(8):826-30.

39) Tomoyuki Uchihara, Keisuke Miyake, Atsuko Yonemura, Yoshihiro Komohara, Rumi Itoyama, Mayu Koiwa, Tadahito Yasuda, Kota Arima, Kazuto Harada, Kojiro Eto, Hiromitsu Hayashi, Masaaki Iwatsuki, Shiro Iwagami, Yoshifumi Baba, Naoya Yoshida, Masakazu Yashiro, Mari Masuda, Jaffer A Ajani, Patrick Tan, Hideo Baba, Takatsugu Ishimoto. Extracellular Vesicles from Cancer-Associated Fibroblasts Containing Annexin A6 Induces FAK-YAP Activation by Stabilizing β 1 Integrin, Enhancing Drug Resistance. *Cancer Res.* 2020 Aug 15; 80(16):3222-3235.

40) Ozge Saatci, Aysegul Kaymak, Umar Raza, Pelin G Ersan, Ozge Akbulut, Carolyn E Banister, Vitali Sikirzhytski, Unal Metin Tokat, Gamze Aykut, Suhail A Ansari, Hayriye Tatli Dogan, Mehmet Dogan, Pouria Jandaghi, Aynur Isik, Fatma Gundogdu, Kemal Kosemehmetoglu, Omer Dizdar, Sercan Aksoy, Aytekin Akyol, Aysegul Uner, Phillip J Buckhaults, Yasser Riazalhosseini, Ozgur Sahin. Targeting lysyl oxidase (LOX)

overcomes chemotherapy resistance in triple negative breast cancer. *Nat Commun.* 2020 May 15; 11(1):2416.

41) Hassan Yousefi, Mousa Vatanmakanian, Mojdeh Mahdiannasser, Ladan Mashouri, Nikhilesh V Alahari, Mohammad Rafiee Monjezi, Shahrzad Ilbeigi, Suresh K Alahari. Understanding the role of integrins in breast cancer invasion, metastasis, angiogenesis, and drug resistance. *Oncogene.* 2021 Feb; 40(6):1043-1063.

42) Leonie Rossow, Simona Veitl, Sandra Vorlová, Jacqueline K Wax, Anja E Kuhn, Verena Maltzahn, Berin Upcin, Franziska Karl, Helene Hoffmann, Sabine Gätzner, Matthias Kallius, Rajender Nandigama, Daniela Scheld, Ster Irmak, Sabine Herterich, Alma Zerneck, Süleyman Ergün, Erik Henke. LOX-catalyzed collagen stabilization is a proximal cause for intrinsic resistance to chemotherapy. *Oncogene.* 2018 Sep; 37(36):4921-4940.

43) Samata M. Kakkad, Marie-France Penet, Alireza Akhbardeh, Arvind P. Pathak, Meiyappan Solaiyappan, Venu Raman, Dieter Leibfritz, Kristine Glunde, and Zaver M. Bhujwalla. Hypoxic Tumor Environments Exhibit Disrupted Collagen I Fibers and Low Macromolecular Transport. *PLoS One.* 2013; 8(12): e81869.

44) Wen-Yi Wang, Chih-Wen Twu, Yi-Chun Liu, Hui-Hua Lin, Chun-Jung Chen, Jin-Ching Lin. Fibronectin promotes nasopharyngeal cancer cell motility and proliferation.

Biomed Pharmacother. 2019 Jan; 109:1772-1784.

45) Li F, Yang R, Zhang X, Liu A, Zhao Y, Guo Y. Silencing of hypoxia-inducible adrenomedullin using RNA interference attenuates hepatocellular carcinoma cell growth in vivo. *Mol Med Rep.* 2014. 10: 1295-302.

46) Kogita A, Togashi Y, Hayashi H, Sogabe S, Terashima M, De Velasco MA, Sakai K, Fujita Y, Tomida S, Takeyama Y, Okuno K, Nakagawa K, Nishio K. Hypoxia induces resistance to ALK inhibitors in the H3122 non-small cell lung cancer cell line with an ALK rearrangement via epithelial-mesenchymal transition. *Int J Oncol.* 2014. 45: 1430-6.

47) Murata K, Suzuki H, Okano H, Oyamada T, Yasuda Y, Sakamoto A. Hypoxia-induced des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. *Int J Oncol.* 2010. 36: 161-70.

48) Javle MM, Gibbs JF, Iwata KK, Pak Y, Rutledge P, Yu J, Black JD, Tan D, Khoury T. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and activated extracellular signal-regulated kinase (p-Erk) in surgically resected pancreatic cancer. *Ann Surg Oncol.* 2017. 14: 3527-33.

49) Sudo T, Iwaya T, Nishida N, Sawada G, Takahashi Y, Ishibashi M, Shibata K, Fujita H, Shirouzu K, Mori M, Mimori K. Expression of mesenchymal markers vimentin and

fibronectin: the clinical significance in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2013. 3: S324-35

50) Manoj Amrutkar, Monica Aasrum, Caroline S Verbeke, Ivar P Gladhaug. Secretion of fibronectin by human pancreatic stellate cells promotes chemoresistance to gemcitabine in pancreatic cancer cells. *BMC Cancer.* 2019 Jun 17; 19(1):596.

51) Taisuke Hoshi, Saori Watanabe Miyano, Hideki Watanabe, Regina Mikie Kanada Sonobe, Yuki Seki, Etsuko Ohta, Kenichi Nomoto, Junji Matsui, Yasuhiro Funahashi, Lenvatinib induces death of human hepatocellular carcinoma cells harboring an activated FGF signaling pathway through inhibition of FGFR-MAPK cascades. *Biochem Biophys Res Commun.* 2019 May 21; 513(1):1-7.

52) Minet E, Arnould T, Michel G, Roland I, Mottet D, Raes M, Remacle J, Michiels C, ERK activation upon hypoxia: involvement in HIF-1 activation. *FEBS Lett.* 2000 Feb 18; 468(1):53-8.

53) Marie Cargnello, Philippe P Roux, Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2011 Mar; 75(1):50-83.

54) Meike Schneider, Nina Korzeniewski, Konstanze Merkle, Julia Schüler, Carsten Grüllich, Boris Hadaschik, Markus Hohenfellner, Stefan Duensing, The tyrosine kinase

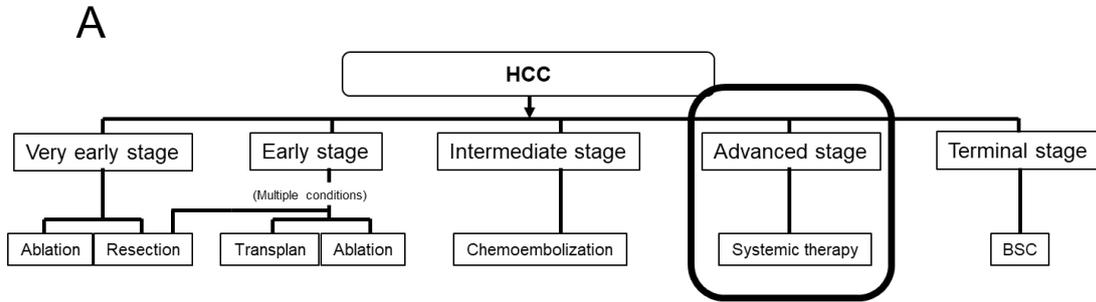
inhibitor nilotinib has antineoplastic activity in prostate cancer cells but up-regulates the ERK survival signal-Implications for targeted therapies. *Urol Oncol*. 2015 Feb; 33(2):72.e1-7.

55) Wang C, Jin H, Gao D, Liefink C, Evers B, Jin G, Xue Z, Wang L, Beijersbergen RL, Qin W, Bernards R. Phospho-ERK is a biomarker of response to a synthetic lethal drug combination of sorafenib and MEK inhibition in liver cancer. *J Hepatol*. 2018 Nov; 69(5):1057-1065.

56) Zhu H, Luo SF, Wang J, Li X, Wang H, Pu WY, Zhang H, Zhuang ZX. Effect of environmental factors on chemoresistance of HepG2 cells by regulating hypoxia-inducible factor-1 α . *Chin Med J (Engl)*. 2012. 125: 1095-103.

57) Shingo M, Ben-Zion K, Robert M. L, Kenneth M. Y. Fibronectin and Integrins in Cell Adhesion, Signaling, and Morphogenesis. *Ann N Y Acad Sci*. 1998. 23: 119-129.

8. 図表



B

First-Line Systemic therapy

Preferred Regimens	Other Recommended Regimens	Useful in Certain Circumstances
<ul style="list-style-type: none"> Atezolizumab+bevacizumab (Child-Pugh class A only) 	<ul style="list-style-type: none"> Sorafenib (Child-Pugh Class A only or B7) Lenvatinib (Child-Pugh Class A only) 	<ul style="list-style-type: none"> Nivolumab (Child-Pugh Class A only or B7) FOLFOX (Child-Pugh Class A only)

BCLC[Barcelona Clinic Liver Cancer] staging system and treatment strategy in European Association for the Study of the Liver
NCCN Guidelines Version 2. 2021 Hepatocellular Carcinoma

Fig. 1 The position of LEN in HCC. (A) BCLC (Barcelona Clinic Liver Cancer) staging system and treatment strategy in European Association for the Study of the Liver. (B) NCCN Guidelines Version 2. 2021 Hepatocellular Carcinoma.

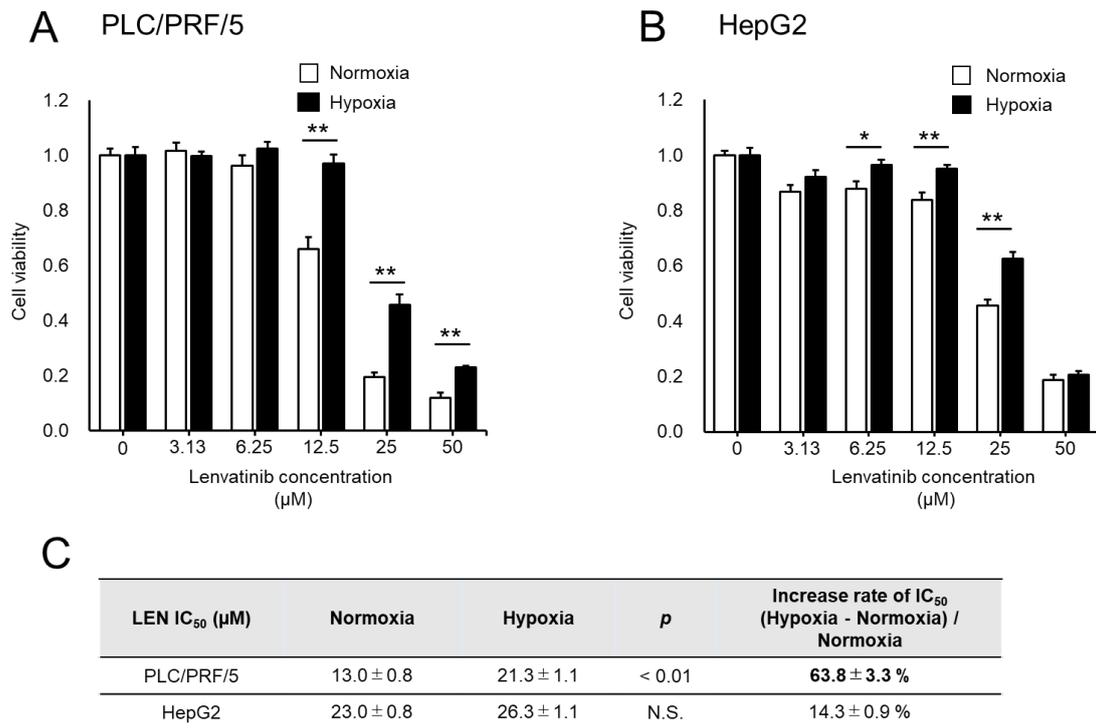


Fig. 2 Hypoxia induce resistance to lenvatinib-induced cytotoxicity while lenvatinib dose response effects differ among hepatocellular carcinoma (HCC) cell lines. (A) PLC/PRF/5 cells and (B) HepG2 cells seeded on 96-well plates at a density of 1×10^4 cells/well, were incubated with increasing concentrations of lenvatinib for 72 h in normoxia (95% air and 5%CO₂) or hypoxia (94%N₂, 1%O₂ and 5%CO₂) condition and evaluated for cell viability using the MTS assay. Data are mean \pm SEM of triplicate determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ for normoxia vs hypoxia conducted by student's t-test. (C) IC₅₀ values for lenvatinib in different HCC cell lines were calculated using JMP 14.2 software.

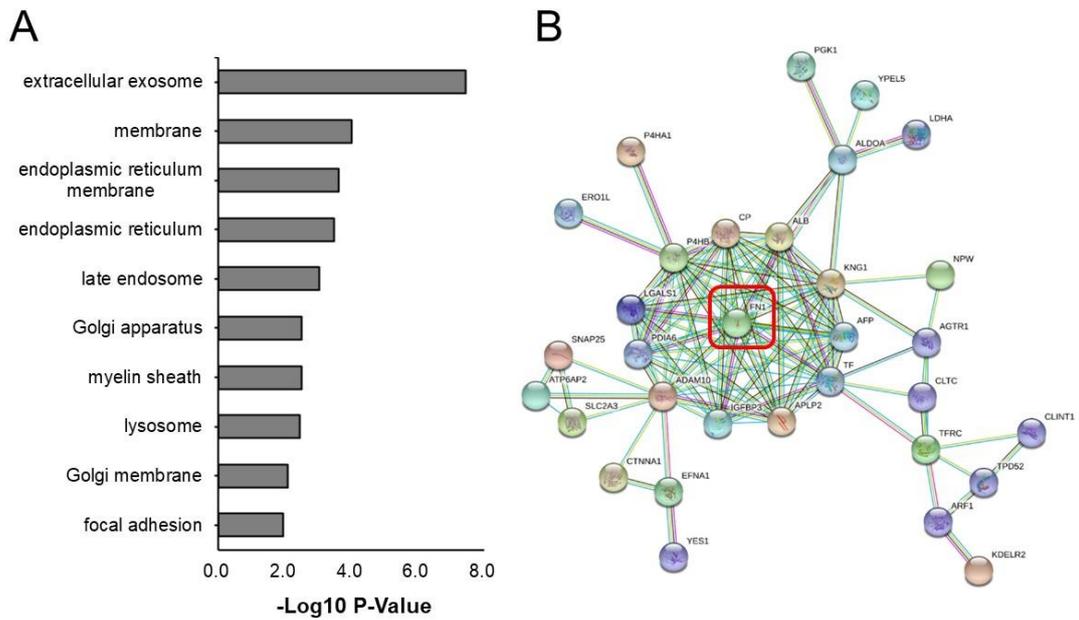


Fig. 3 Global gene expression profiling shows the involvement of the extracellular matrix component fibronectin for the resistance of lenvatinib under hypoxia in PLC/PRF/5 cells. (A) Gene Ontology (GO) analysis using the DAVID. The representative cell component terms with top 10 enrichment score are presented. The horizon axis represents the significance (p value) for each term, vertical axis represents the GO terms for cell component. (B) The protein-protein interaction network analysis using the STRING. FN1 is surrounded by a red frame.

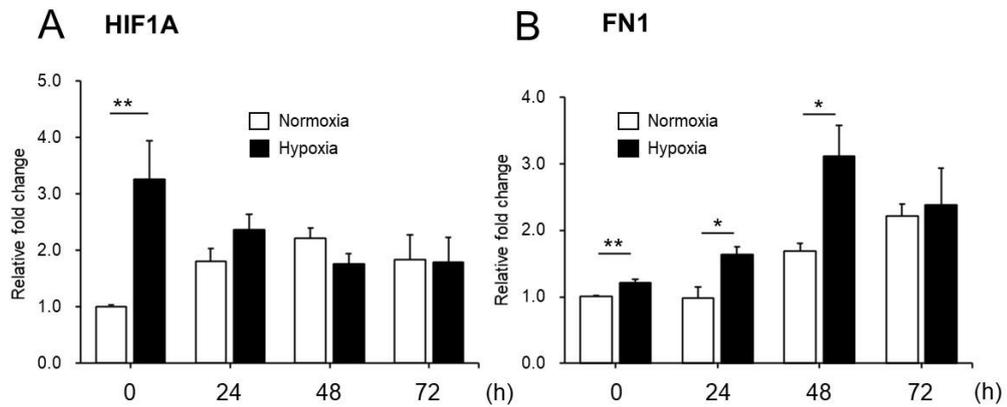


Fig. 4 The mRNA expression levels of HIF1A and FN1 in PLC/PRF/5 cells under normoxia and hypoxia. (A) The mRNA expression levels of (A) HIF1A (0 h under normoxia HIF1A/ACTB=1) and (B) FN1 (0 h under normoxia FN1/ACTB=1). 0 h refers to the time after 12-h pre-culture. Data are mean \pm SEM of duplicate determinations. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, conducted by two-way ANOVA followed by Turkey's post hoc test.

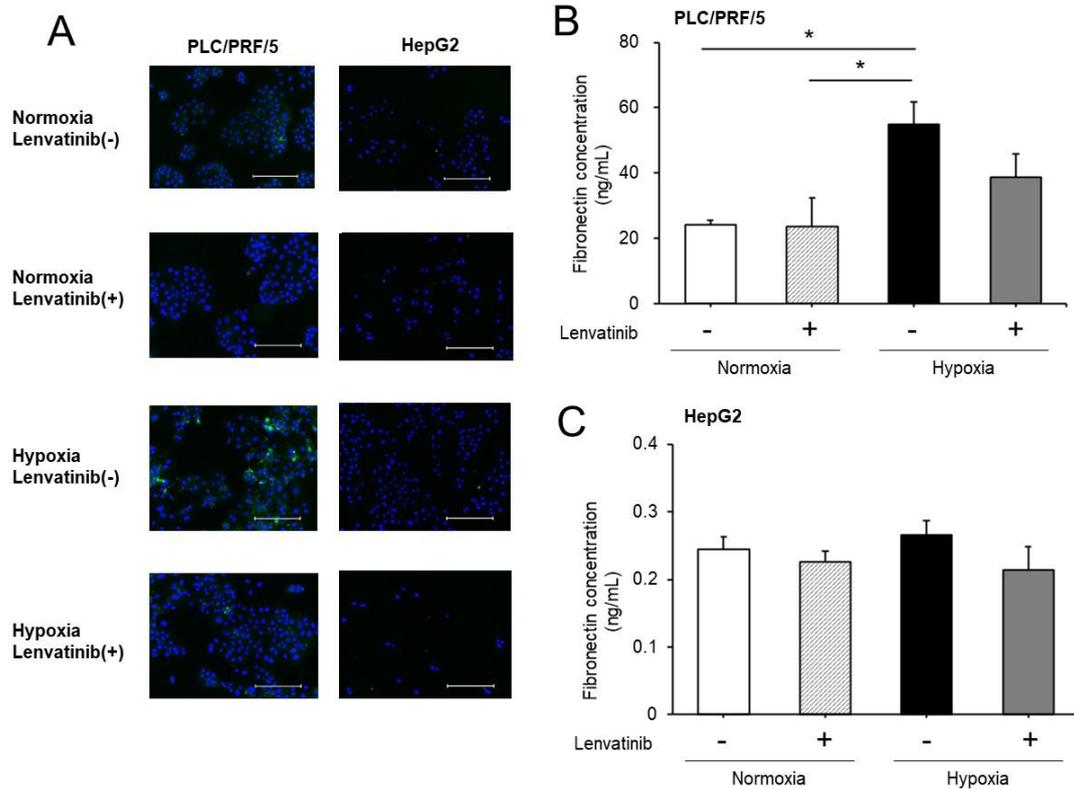


Fig. 5 Fibronectin around PLC/PRF/5 cells and in culture medium is upregulated under hypoxia. (A) The fibronectin localization was analyzed by immunofluorescence staining in PLC/PRF/5 and HepG2 cells. The green color indicates the localization of fibronectin. Nuclei were visualized with DAPI staining in blue. Scale bar represents 200 μ m. Fibronectin concentration in culture medium at (B) PLC/PRF/5 cells and (C) HepG2 cells using ELISA. Data are mean \pm SEM of duplicate determinations. * $p < 0.05$, conducted by one-way ANOVA followed by Turkey's post hoc test. (LEN concentration; PLC/PRF/5 : 17.5 μ M, HepG2 : 25 μ M.)

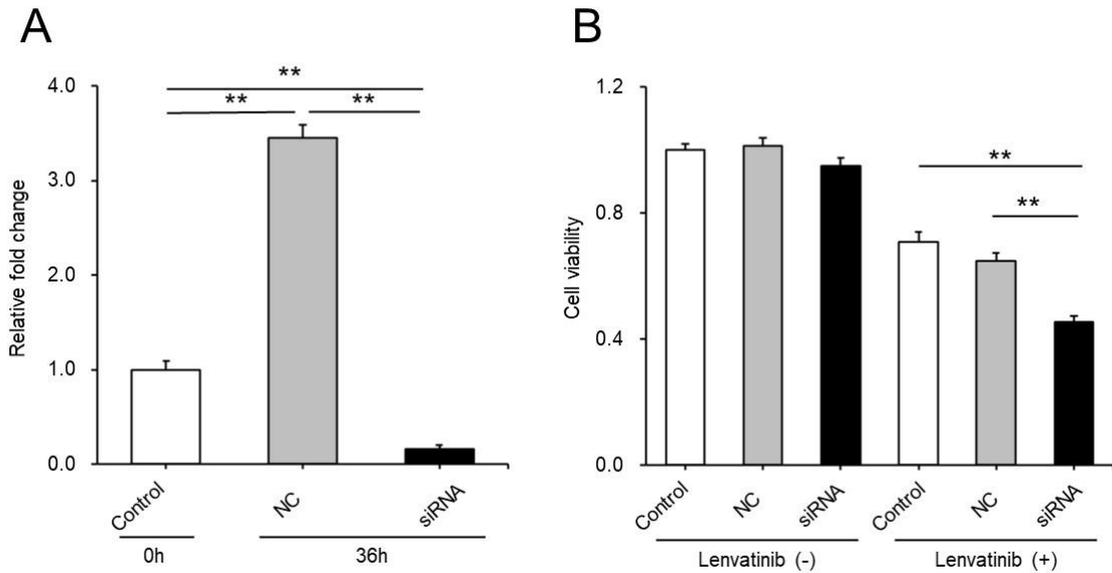


Fig. 6 Knockdown effect of FN1 for lenvatinib effect under hypoxia in PLC/PRF/5 cells. (A) FN1 mRNA expression levels 36 h after siRNA knockdown of FN1 in PLC/PRF/5 cells cultured in normoxia compared with negative control siRNA. It is shown by a fold change with the expression levels at 0 h as 1. (B) To study the effect of lenvatinib on FN1 knockdown in hypoxia, cell viabilities was examined at 48 h by using MTS assay for PLC/PRF/5 cells cultured in hypoxia with FN1 siRNA or a negative control siRNA. Data are mean \pm SEM of duplicate determinations. ** $p < 0.01$, conducted by one-way ANOVA followed by Turkey's post hoc test. LEN concentration; PLC/PRF/5 : 17.5 μ M, HepG2 : 25 μ M. Control, without transfection reagent; NC, negative control siRNA; siRNA, FN1 siRNA

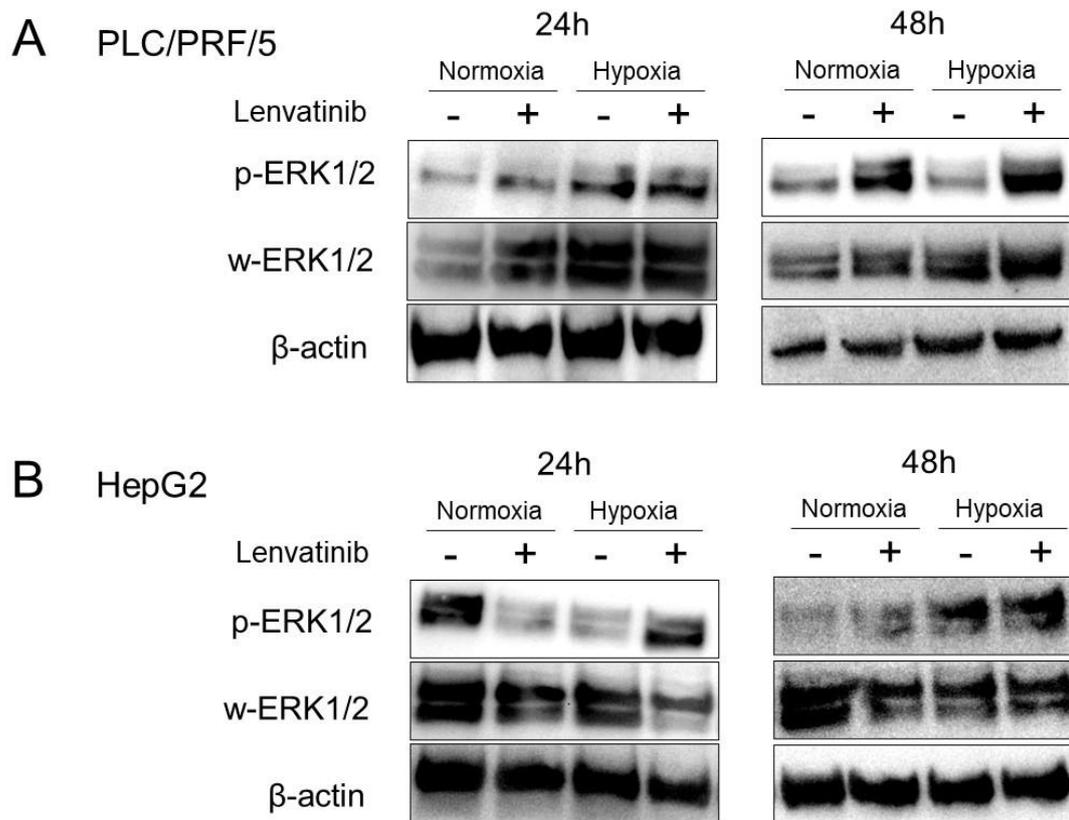


Fig. 7 ERK1/2 is activated under hypoxia in PLC/PRF/5 cells. (A) PLC/PRF/5 cells and (B) HepG2 cells for ERK1/2 expression levels using the western blot analysis. β -actin was used as a loading control. LEN concentration; PLC/PRF/5 : 17.5 μ M, HepG2 : 25 μ M. p-ERK1/2, phospho-ERK1/2; w-ERK, whole ERK1/2

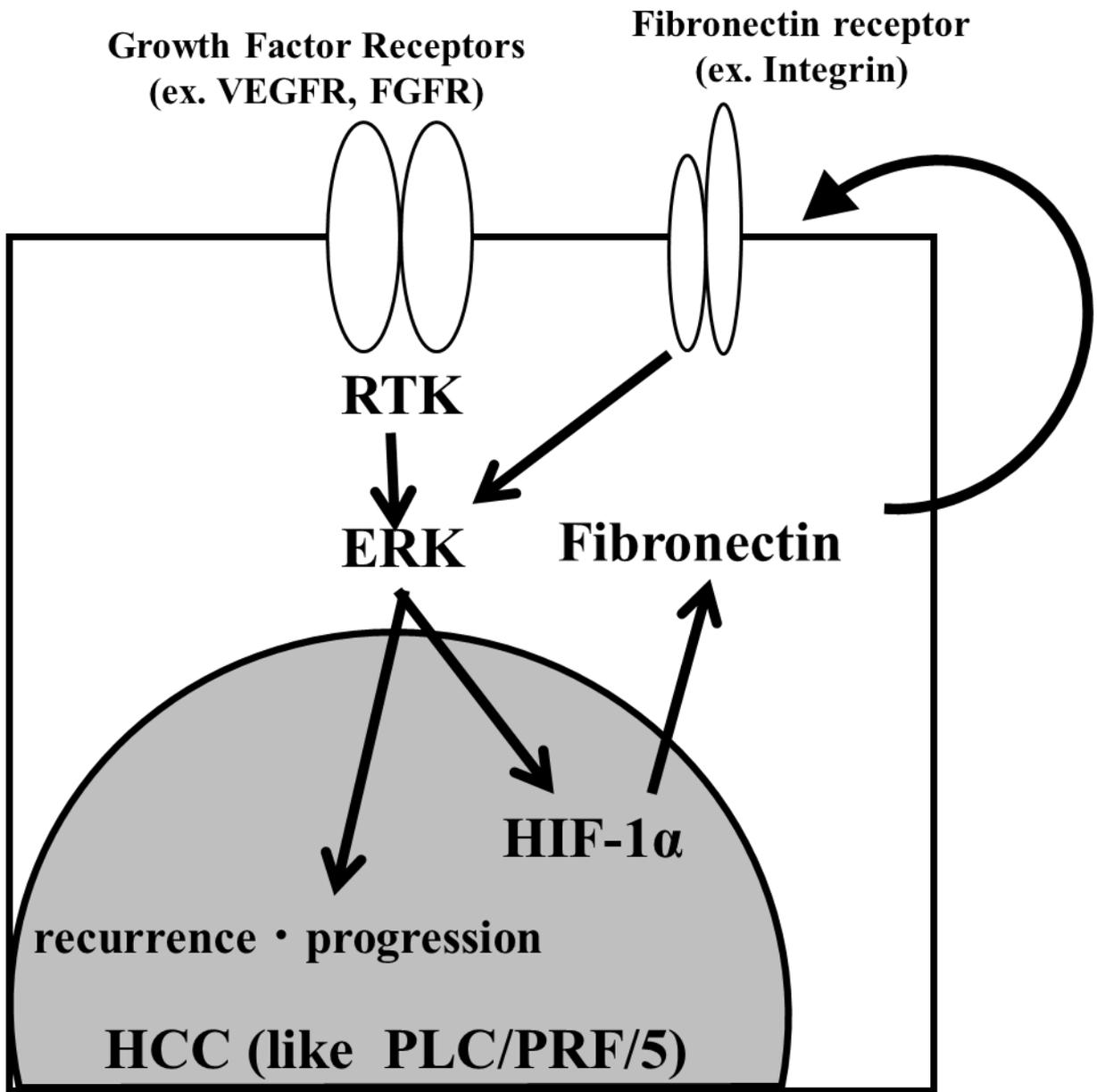


Fig. 8 Speculation of Lenvatinib resistance under hypoxia mechanism for hepatocellular carcinoma obtained from this study.

Table. 1 List of top 50 the most down-regulated genes with lenvatinib compared to without lenvatinib under normoxia.

RefSeq_id	symbol	description	ratio
XR_942480.1	PGM3	phosphoglucosyltransferase 3	0.16
NM_006931.2	SLC2A3	solute carrier family 2 member 3	0.20
NM_001134.2	AFP	alpha fetoprotein	0.21
NR_046371.1	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	0.21
XM_011522450.1	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family	0.23
NM_015303.3	VPS8	VPS8, CORVET complex subunit	0.23
XM_011535916.1	AHI1	Abelson helper integration site 1	0.24
XR_931950.1	PIGB	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class B	0.26
XM_011519179.1	WDR34	WD repeat domain 34	0.26
NR_036462.1	APITD1	apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1	0.27
NM_000935.2	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	0.27
NM_212474.2	FN1	fibronectin 1	0.30
NM_031935.2	HMCN1	hemicentin 1	0.32
XM_011516792.1	NDRG1	N-myc downstream regulated 1	0.33
NM_001402.5	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	0.33
NM_021979.3	HSPA2	heat shock protein family A (Hsp70) member 2	0.33
NM_003670.2	BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40	0.35
NM_016378.3	VCX2	variable charge, X-linked 2	0.36
NM_001127400.1	YPEL5	yippee like 5	0.37
NM_001282663.1	MICAL2	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 2	0.38
NM_001317120.1	ZNF331	zinc finger protein 331	0.38
NM_153365.2	TAPT1	transmembrane anterior posterior transformation 1	0.38
NR_002780.1	HIGD2B	HIG1 hypoxia inducible domain family member 2B	0.39
NM_032049.3	AGTR1	angiotensin II receptor type 1	0.40
NM_004354.2	CCNG2	cyclin G2	0.40
XM_005254117.2	ADAM10	ADAM metalloproteinase domain 10	0.41
NM_001301837.1	C12orf57	chromosome 12 open reading frame 57	0.41
NM_001013398.1	IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3	0.41
NM_138391.4	TMEM183A	transmembrane protein 183A	0.42
NM_001063.3	TF	transferrin	0.43
NM_001122839.1	SLC50A1	solute carrier family 50 member 1	0.43
NM_001166451.1	KN1G1	kininogen 1	0.43
NM_018004.2	TMEM45A	transmembrane protein 45A	0.43
XM_005244940.3	EFNA1	ephrin-A1	0.43
NM_152288.2	ORAI3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	0.43
NM_017582.6	UBE2Q1	ubiquitin conjugating enzyme E2Q family member 1	0.43
NM_022735.3	ACBD3	acyl-CoA binding domain containing 3	0.43
XM_006711051.1	TMEM59	transmembrane protein 59	0.45
NM_012180.2	FBXO8	F-box protein 8	0.45
NM_000756.3	CRH	corticotropin releasing hormone	0.45
NM_018433.5	KDM3A	lysine demethylase 3A	0.45
XM_006721903.1	NBR1	neighbor of BRCA1 gene 1	0.46
XM_011517299.1	DERL1	derlin 1	0.46
NM_183065.2	TMEM107	transmembrane protein 107	0.46
NM_001253384.1	RPL15	ribosomal protein L15	0.46
NM_080605.3	B3GALT6	Beta-1,3-galactosyltransferase 6	0.47
NM_001823.4	CKB	creatine kinase, brain	0.47
NM_013332.3	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	0.47
XR_926244.1	TDP2	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2	0.47
NM_001243280.1	ALCAM	activated leukocyte cell adhesion molecule	0.48

Table. 2 List of top 50 the most up-regulated genes with lenvatinib under hypoxia compared to with lenvatinib under normoxia.

RefSeq_id	symbol	description	ratio
XM_011516792.1	NDRG1	N-myc downstream regulated 1	24.37
NM_006931.2	SLC2A3	solute carrier family 2 member 3	15.47
NM_013332.3	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	9.55
NM_001823.4	CKB	creatine kinase, brain	7.03
NM_000935.2	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	5.64
XR_942480.1	PGM3	phosphoglucomutase 3	4.72
XM_005244940.3	EFNA1	ephrin-A1	4.62
NM_018004.2	TMEM45A	transmembrane protein 45A	4.52
NM_015303.3	VPS8	VPS8, CORVET complex subunit	4.24
NM_001142595.1	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1	3.99
XM_011536684.1	ERO1A	endoplasmic reticulum oxidoreductase alpha	3.97
XM_011522450.1	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family	3.92
NR_033361.1	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	3.81
NR_046371.1	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	3.76
NM_003670.2	BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40	3.74
NM_001013398.1	IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3	3.67
XM_011519179.1	WDR34	WD repeat domain 34	3.59
NM_001289910.1	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	3.58
NM_001292030.1	TTC39C	tetratricopeptide repeat domain 39C	3.47
NM_001001701.3	C4orf3	chromosome 4 open reading frame 3	3.45
NM_001300965.1	CSRP2	cysteine and glycine rich protein 2	3.41
XR_926244.1	TDP2	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2	3.39
XM_011536684.1	ERO1A	endoplasmic reticulum oxidoreductase alpha	3.38
NM_001291737.1	CD24	CD24 molecule	3.34
NM_000756.3	CRH	corticotropin releasing hormone	3.28
NM_001284213.2	CAST	calpastatin	3.14
NR_036462.1	APITD1	apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1	3.13
NM_001063.3	TF	transferrin	3.11
NM_001317120.1	ZNF331	zinc finger protein 331	3.06
NM_001122839.1	SLC50A1	solute carrier family 50 member 1	3.06
XM_011540001.1	ALDH18A1	aldehyde dehydrogenase 18 family member A1	3.01
NM_001127400.1	YPEL5	yippee like 5	2.89
NM_001134.2	AFP	alpha fetoprotein	2.83
NM_001005353.2	AK4	adenylate kinase 4	2.81
XM_006718315.1	C11orf49	chromosome 11 open reading frame 49	2.76
NM_004354.2	CCNG2	cyclin G2	2.74
XM_011519493.1	PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	2.73
NM_002305.3	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	2.73
NM_000158.3	GBE1	glucan (1,4-alpha-), branching enzyme 1	2.71
NM_000291.3	PGK1	phosphoglycerate kinase 1	2.71
NM_152288.2	ORAI3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	2.68
XM_011524267.1	LRRC37B	leucine rich repeat containing 37B	2.67
NM_001160094.1	ACOT13	acyl-CoA thioesterase 13	2.62
XM_011509387.1	TMEM9	transmembrane protein 9	2.61
NM_018433.5	KDM3A	lysine demethylase 3A	2.58
NM_001301837.1	C12orf57	chromosome 12 open reading frame 57	2.57
NM_001102426.1	TBC1D8	TBC1 domain family member 8	2.57
NM_212474.2	FN1	fibronectin 1	2.53
NR_033421.1	SLC11A2	solute carrier family 11 member 2	2.49
XR_931950.1	PIGB	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class B	2.44

Table. 3 List of the top 50 genes that were common to two comparisons and had the highest rate of change. ("Ratio of global normalization value with lenvatinib under hypoxia compared with lenvatinib under normoxia" versus "ratio of global normalization value with lenvatinib as compared to without lenvatinib under normoxia")

RefSeq_id	symbol	description	rate of change
NM_006931.2	SLC2A3	solute carrier family 2 member 3	76.40
XM_011516792.1	NDRG1	N-myc downstream regulated 1	73.82
XR_942480.1	PGM3	phosphoglucomutase 3	30.05
NM_000935.2	PLOD2	procollagen-lysine, 2-oxoglutarate 5-dioxygenase 2	20.56
NM_013332.3	HILPDA	hypoxia inducible lipid droplet associated	20.28
NM_015303.3	VPS8	VPS8, CORVET complex subunit	18.31
NR_046371.1	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)	17.55
XM_011522450.1	RAB26	RAB26, member RAS oncogene family	17.13
NM_001823.4	CKB	creatine kinase, brain	14.99
XM_011519179.1	WDR34	WD repeat domain 34	13.89
NM_001134.2	AFP	alpha fetoprotein	13.52
NR_036462.1	APITD1	apoptosis-inducing, TAF9-like domain 1	11.56
XM_005244940.3	EFNA1	ephrin-A1	10.75
NM_003670.2	BHLHE40	basic helix-loop-helix family member e40	10.67
NM_018004.2	TMEM45A	transmembrane protein 45A	10.56
XM_011535916.1	AH11	Abelson helper integration site 1	9.84
XR_931950.1	PIGB	phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis class B	9.56
NM_001013398.1	IGFBP3	insulin like growth factor binding protein 3	8.90
NM_212474.2	FN1	fibronectin 1	8.51
NM_001317120.1	ZNF331	zinc finger protein 331	8.05
NM_001127400.1	YPEL5	yippee like 5	7.84
NR_033361.1	TMCC1	transmembrane and coiled-coil domain family 1	7.63
XM_011536684.1	ERO1A	endoplasmic reticulum oxidoreductase alpha	7.45
NM_031935.2	HMCN1	hemicentin 1	7.34
NM_001063.3	TF	transferrin	7.31
NM_000756.3	CRH	corticotropin releasing hormone	7.31
NM_001122839.1	SLC50A1	solute carrier family 50 member 1	7.19
NM_001001701.3	C4orf3	chromosome 4 open reading frame 3	7.17
XR_926244.1	TDP2	tyrosyl-DNA phosphodiesterase 2	7.15
NM_004354.2	CCNG2	cyclin G2	6.85
NM_001142595.1	P4HA1	prolyl 4-hydroxylase subunit alpha 1	6.78
NM_001301837.1	C12orf57	chromosome 12 open reading frame 57	6.24
NM_152288.2	ORAI3	ORAI calcium release-activated calcium modulator 3	6.23
XM_011536684.1	ERO1A	endoplasmic reticulum oxidoreductase alpha	5.96
NM_001292030.1	TTC39C	tetratricopeptide repeat domain 39C	5.89
NR_002780.1	HIGD2B	HIG1 hypoxia inducible domain family member 2B	5.79
NM_018433.5	KDM3A	lysine demethylase 3A	5.70
NM_001291737.1	CD24	CD24 molecule	5.65
NM_001289910.1	IDH2	isocitrate dehydrogenase 2 (NADP+), mitochondrial	5.53
NM_021979.3	HSPA2	heat shock protein family A (Hsp70) member 2	5.36
XM_011524267.1	LRRRC37B	leucine rich repeat containing 37B	5.35
NM_138391.4	TMEM183A	transmembrane protein 183A	5.33
NM_001300965.1	CSRP2	cysteine and glycine rich protein 2	5.09
XM_011509387.1	TMEM9	transmembrane protein 9	5.07
NM_032049.3	AGTR1	angiotensin II receptor type 1	5.04
NM_001402.5	EEF1A1	eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	5.02
XR_946695.1	ECHDC2	enoyl-CoA hydratase domain containing 2	4.96
NM_001282663.1	MICAL2	microtubule associated monoxygenase, calponin and LIM domain containing 2	4.95
XM_011519493.1	PFKFB3	6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 3	4.93
NM_002305.3	LGALS1	lectin, galactoside-binding, soluble, 1	4.91

論文目録

本博士論文は以下の原著論文を基に作成した。

1) 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.