

論 文 内 容 要 旨

題目 MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma
(肝細胞癌におけるソラフェニブの新しい耐性因子としての MRP3)

著者 Tetsu Tomonari, Shunsaku Takeishi, Tatsuya Taniguchi, Takahiro Tanaka, Hironori Tanaka, Shota Fujimoto, Tetsuo Kimura, Koichi Okamoto, Hiroshi Miyamoto, Naoki Muguruma, Tetsuji Takayama.

平成 28 年 2 月発行 Oncotarget 第 7 巻第 6 号
7207 ページから 7215 ページに発表済

内容要旨

悪性腫瘍における肝細胞癌の死亡率は全世界で第 5 位であり、とくに本邦をはじめとするアジアにおいて高く、有効な治療法の確立が急務である。肝細胞癌はほとんどの抗癌剤に自然耐性を示すことから、経動脈的化学塞栓療法やラジオ波焼灼療法などの局所治療を中心に行われている。一方、近年、肝癌細胞の増殖や血管新生に関わる複数のキナーゼを阻害する分子標的薬ソラフェニブが開発され、大規模臨床試験 (SHARP study) により進行肝細胞癌患者の生存期間を有意に延長することが示された。この結果を基に、諸外国及び本邦においてソラフェニブが進行肝細胞癌の標準治療として広く用いられるようになった。しかし、ソラフェニブの奏功率はわずか数%と低く、その有効性を予測するバイオマーカーも確立されていない。そこで本研究では、肝細胞癌培養細胞株よりソラフェニブ耐性細胞を樹立し、ソラフェニブ耐性の機序を検討した。

まず、肝細胞癌培養細胞株 PLC/PRF5 を低濃度のソラフェニブを含む培地で培養し、濃度を徐々に上昇させることによりソラフェニブ耐性株 (mixed population) を樹立した。その後限界希釈法によりクローニングを行い、耐性クローン PLC/PRF5-R1 及び PLC/PRF-R2 を選択した。これらの耐性クローンのソラフェニブに対する IC50 はそれぞれ $9.2 \pm 0.47 \mu\text{M}$ と $25 \pm 5.1 \mu\text{M}$ であり、親株 ($5.4 \pm 0.17 \mu\text{M}$) に比べて 1.8 倍、4.6 倍に上昇していた。

ソラフェニブは、RAS/RAF/MEK/ERK (MAP キナーゼ) 経路の RAF をブロックする

様式 (8)

ことで細胞増殖を抑制することから、耐性クローンにおける MAP キナーゼ経路及びその代替経路として知られる AKT/mTOR 経路の活性化の有無を調べたが、親株と有意な差を認めなかった。つまり、ソラフェニブ耐性クローンでは、ソラフェニブを添加しているにもかかわらず、シグナル伝達の阻害効果が認められないことが明らかになった。そこで、耐性クローンにおける薬剤排出及び流入に関与する細胞膜トランスポーターの発現を Western blot 法により調べたところ、MDR1、MRP2、MRP4、BCRP、BSEP、Oct 1 の発現は親株と同程度であったが、MRP3 の発現は親株に比べて明らかに増加していた。耐性クローンにおける MRP3 発現を siRNA を用いてノックダウンしたところ、ソラフェニブに対する感受性が回復した。すなわち、耐性クローンでは薬剤排出ポンプである MRP3 が過剰発現し、ソラフェニブを細胞外に排出することが耐性獲得の一つの機序であることが明らかとなった。一方、ソラフェニブの RAF1 キナーゼ結合部位である activation motif の遺伝子変異の有無を調べるため、耐性クローンより DNA を抽出してシーケンスを行ったが、明らかな変異は認められなかった。

さらに、ソラフェニブ治療を行った進行肝細胞癌 9 症例を対象に、治療前の癌組織における MRP3 発現を免疫染色により調べ、有効性との関係を検討した。その結果、奏功しなかった症例では高率に MRP3 発現が陽性 (3/5) であったが、奏功した症例ではいずれも陰性であった (0/4)。

以上より、本研究では肝細胞癌培養細胞株よりソラフェニブ耐性クローンを樹立し、薬剤排出ポンプである MRP3 がソラフェニブの耐性因子の一つであることを明らかにした。肝細胞癌における MRP3 の過剰発現は、ソラフェニブに対する獲得耐性のみならず、自然耐性にも関与することが示唆された。

論文審査の結果の要旨

報告番号	甲医第1295号	氏名	友成 哲
審査委員	主査 六反 一仁 副査 島田 光生 副査 常山 幸一		

題目 MRP3 as a novel resistance factor for sorafenib in hepatocellular carcinoma
 (肝細胞癌におけるソラフェニブの新しい耐性因子としてのMRP3)

著者 Tetsu Tomonari, Shunsaku Takeishi, Tatsuya Taniguchi, Takahiro Tanaka, Hironori Tanaka, Shota Fujimoto, Tetsuo Kimura, Koichi Okamoto, Hiroshi Miyamoto, Naoki Muguruma, Tetsuji Takayama.

平成28年2月発行 Oncotarget 第7巻第6号
 7207 ページから 7215 ページに発表済
 (主任教授 高山 哲治)

要旨 近年、肝細胞癌の増殖や血管新生に関わる複数のキナーゼを阻害する分子標的薬ソラフェニブが開発され、大規模臨床試験により進行肝細胞癌患者の生存期間を有意に延長することが示された。この結果を基に、諸外国及び本邦においてソラフェニブが進行肝細胞癌の標準治療として広く用いられるようになった。しかし、ソラフェニブの奏功率はわずか数%と低く、その有効性を予測するバイオマーカーは確立されていない。そこで本研究では、肝細胞癌培養細胞株よりソラフェニブ耐性細胞を樹立し、ソラフェニブ耐性の機序を検討した。得られた結果は以下の如くである。

- 1) ソラフェニブを含む培地で肝癌細胞株 PLC/PRF5 を 24 ヶ月間継代培養し、2 つの耐性株をクローニングした。これらの耐性クローンのソラフェニブに対する IC_{50} は親株に比べてそれぞれ 1.8 倍、4.6 倍に上昇していた。
- 2) 耐性クローンにおける MAP キナーゼ経路及び AKT/mTOR 経路の活性化の有無を Western blot 法により検討したが、親株と有意な差を認めなかった。
- 3) 耐性クローンにおける各種細胞膜トランスポーターの発現を Western blot 法により調べたところ、MRP3 の発現は親株に比べて明らかに増加していた。
- 4) 耐性クローンにおける MRP3 発現を siRNA を用いてノックダウンしたところ、ソラフェニブに対する感受性が回復した。
- 5) 耐性クローンより DNA を抽出し、ソラフェニブの主な標的である RAF1 キナーゼの結合部位の DNA シーケンスを調べたが、変異を認めなかった。
- 6) ソラフェニブ治療を行った進行肝細胞癌 9 症例を対象に、治療前の癌組織における MRP3 発現を免疫染色により検討したところ、奏功群では高率に MRP3 発現が陽性 (3/5) であったが、非奏功群ではいずれも陰性であった (0/4)。

以上より、本研究では、肝細胞癌培養細胞株よりソラフェニブ耐性クローンを樹立し、薬剤排出ポンプである MRP3 がソラフェニブの耐性因子の一つであることを明らかにした。本研究の成果は、今後の肝癌治療の進歩に大きく寄与するものと考えられ、学位授与に値すると判定した。