

## 総説

(平成 27 年 6 月 19 日 (金) 開催, 第 146 回東邦医学会例会)

シンポジウム「新たながん分子標的療法の開発に向けて」

# 進行肝細胞癌に対する分子標的治療薬 Sorafenib : 基礎から

梶貝 孝慈

東邦大学薬学部病態生化学研究室

**要約** : Sorafenib は, 腎癌・肝細胞癌に対して用いられる経口分子標的治療薬であり, がん細胞に対して直接的な増殖抑制作用を示すほか, 腫瘍血管新生阻害作用を示す. しかしながら, 進行肝細胞癌に対する sorafenib の投与量や他の抗がん剤とのコンビネーションなど, 検討課題はいまだに多い. 共同研究者の東邦大学医療センター大森病院の永井ほかは, 脈管浸潤合併進行肝細胞癌症例に対して, 分子標的治療薬 sorafenib を先行投与により, 動注化学療法 (5-fluorouracil [5-FU] + cisplatin) の抗腫瘍効果が増強されることを既に報告している. この sorafenib の 5-FU に対する adjuvant としての可能性を, 5-FU の代謝やトランスポートの転写制御の解析結果を踏まえ, 基礎的立場から述べる.

東邦医学会誌 63 (3) : 180-181, 2016

**KEYWORDS** : sorafenib, 5-fluorouracil, transcriptional regulation

近年, 特異的な分子を標的にした分子標的医薬品の開発が進み, 多くの疾患を対象として使用されている. Sorafenib は, 経口 multikinase 阻害薬でがん細胞の Raf-1 を阻害して, 増殖を低下させる一方で, 周辺細胞の vascular endothelial growth factor (VEGF) シグナルを抑制し, 血管新生を阻害することでさらなる抗がん作用を示す分子標的薬である. 臨床データでは, プラセボ群と比較して増悪までの期間および生存期間がともに有意な延長を認めている<sup>1)</sup>.

進行細胞癌に対する治療としては, 血管内治療が挙げられる. リザーバー導入治療は, cisplatin (CDDP) を biochemical modulator として用い 5-fluorouracil (5-FU) + CDDP をリザーバーに導入し, 肝血管を介して癌部位に少量で的確に化学療法剤を導入できる方法である. 5-FU はフッ化ピリミジン系の代謝拮抗剤で, 肝臓で代謝・活性化され deoxyribonucleic acid (DNA) 合成や ribonucleic acid (RNA) プロセッシングや翻訳を阻害する<sup>2)</sup>. 共同研究者の永井ほかは, 脈管浸潤合併進行肝細胞癌症例に対して, 分子標的治療薬 sorafenib を先行投与により, 5-FU を用いた動注化学療法の抗腫瘍効果が増強されることを既

に報告している<sup>3)</sup>. Sorafenib は mitogen-activated protein extracellular signal-regulated kinase kinase (MEK)/mitogen-activated protein kinase (MAPK) 経路の主要なシグナル伝達を抑制することから, 5-FU の代謝や排出に関与する遺伝子発現への影響が考えられる. そこで 5-FU の代謝を担う dihydropyrimidine dehydrogenase (DPYD) およびさまざまな薬剤排出トランスporterである breast cancer resistance protein (BCRP) 遺伝子の発現制御に着目して, sorafenib による発現調節機構を解析した.

## Sorafenib による DPYD 遺伝子発現制御

細胞内に入った 5-FU は DPYD により細胞内で分解され不活化されることが知られている. そのため, DPYD の高い発現は 5-FU 有効細胞内濃度の低下を引き起こすことが危惧される. そこで, 肝癌細胞株 HepG2 を用いて, sorafenib による DPYD 遺伝子発現への影響を解析した. はじめに, HepG2 細胞に対して細胞毒性を示さない 0.32  $\mu$ M sorafenib 処理により, 5-FU への細胞毒性感受性の増加が認められた. 次に, sorafenib 処理による 5-FU の取り込みや代謝に関連する遺伝子発現変化を complemen-

tary DNA (cDNA) microarray により解析した結果、細胞内で 5-FU の不活化を行う DPYD の発現がわずかに減少していることが示唆された。そこで、sorafenib による DPYD messenger RNA (mRNA) 発現およびタンパク発現を quantitative reverse transcriptional polymerase chain reaction (qRT-PCR) およびウェスタンブロットにより定量した結果、sorafenib 濃度依存的な DPYD mRNA およびタンパク質発現の低下が認められた。また、DPYD 遺伝子は、promoter 領域の 3 箇所の Sp1 結合部位を介した発現調節が報告されている。そこで、promoter 領域の転写活性を測定した結果、sorafenib 処理によりプロモーター活性の抑制が認められた。さらに、転写開始点に最も近い Sp1 結合サイト (Sp1C) の変異体を用いたルシフェラーゼや electrophoresis mobility sift assay (EMSA) により、sorafenib は Sp1C サイトを介して DPYD 遺伝子の発現調節を行っていることが明らかとなった。

以上の結果から、sorafenib による 5-FU 感受性増大の 1 つの要因として、sorafenib による raf の阻害は、MEK/MAPK 経路からの Sp1 の活性化を抑制することで DPYD 発現低下を誘導し、5-FU の不活化抑制を引き起こす機構が示唆された。また一方で、低酸素誘導モデル系を用いた検討により、sorafenib が DPYD 遺伝子の hypoxia inducible factor-1 alpha (HIF-1 $\alpha$ ) によるエンハンサーを介した発現上昇を抑制する機構を見いだしており、低酸素環境における 5-FU 代謝の亢進を抑制することも考えられる。

### Sorafenib による BCRP 遺伝子発現制御

ABC トランスポーターである BCRP (ATP-binding cassette transporter G2: ABCG2) は、ヒト乳癌から発見された排出型トランスポーター<sup>4)</sup>であり、その基質としてカンプトテシンやメトトレキサートなどさまざまな薬剤が知られている。5-FU も、BCRP により肝細胞内から胆管への排泄が行われることが知られている。そこで、BCRP に着目して、sorafenib による発現調節機構を解析した。

はじめに、sorafenib 処理による BCRP mRNA 発現の変化を qRT-PCR にて解析した結果、sorafenib 濃度依存的な mRNA 発現の低下が認められた。BCRP 遺伝子は、異なる Exon1 を持つ mRNA isoform が知られており、組織特異的な promoter が知られている。そこで、sorafenib による BCRP の発現制御機構を明らかにするために、HepG2 細胞における BCRP 遺伝子の転写開始点を 5'-

Rapid Amplification of cDNA End (5'-RACE) 法により解析した結果、BCRP 遺伝子の Exon2 の上流 -18 k 付近に、2 つの転写開始点が存在することが明らかとなった。それぞれの転写開始点から 5' 上流約 500 塩基を pGL4.11 にクローニングし、転写活性を測定した結果、プロモーター活性を示す領域 (E1 $\alpha$ , E1 $\beta$ ) を特定した。これらの領域に結合する転写因子を介して sorafenib は BCRP 遺伝子を制御している可能性が示された。以上の結果から、sorafenib による BCRP 発現の低下が認められた。このことは、5-FU のみならず他の薬剤の細胞内動態に、sorafenib が遺伝子の転写制御を介して影響を及ぼす可能性が考えられる。

本研究により細胞系の実験ではあるが、細胞増殖に影響を与えない低濃度の sorafenib 処理により、5-FU の感受性が増強される可能性をいくつか示すことができた。このことは、臨床において、sorafenib が肝細胞癌治療における adjuvant としての役割も持ち合わせる可能性を示すものであり、今後はより詳細な解析を行うとともに、臨床での sorafenib の適正使用化および副作用発現の抑制への情報提供を引き続き行っていく予定である。本研究は、東邦大学 4 学部合同学術集会を介して東邦大学医療センター大森病院消化器内科・永井英成准教授との共同研究により得られた結果であり、引き続き東邦大学医薬合同プロジェクトの一環として精力的に活動して行きたいと思う。

臨床研究および臨床におけるさまざまな知見や的確な御助言を下さった東邦大学医療センター大森病院消化器内科・永井英成准教授に心から御礼申し上げます。また、同消化器内科の諸先生方に深謝いたします。

### 文 献

- 1) Llovet JM, Ricci S, Mazzaferro V, et al: Sorafenib in advanced hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med* **359**: 378-390, 2008
- 2) West CM, Jones T, Price P: The potential of positron-emission tomography to study anticancer-drug resistance. *Nat Rev Cancer* **4**: 457-469, 2004
- 3) Nagai H, Mukozu T, Ogino YU, et al: Sorafenib and hepatic arterial infusion chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein tumor thrombus. *Anticancer Res* **35**: 2269-2277, 2015
- 4) Doyle LA, Yang W, Abruzzo LV, et al: A multidrug resistance transporter from human MCF-7 breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**: 15665-15670, 1998