

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20590780

研究課題名(和文) 肝癌進展と血管新生の新規メカニズム

研究課題名(英文) Novel mechanism for the angiogenesis in hepatocellular carcinoma

研究代表者

白羽 英則 (SHIRAHA HIDENORI)

岡山大学・岡山大学病院・助教

研究者番号：40379748

研究成果の概要(和文)：Des-gamma carboxy prothrombin (DCP)は、血管内皮細胞の KDR に作用し、細胞移動能(2.2倍)、細胞増殖能(1.5倍)を亢進させた。これら効果は KDR 阻害剤により消失した。肝癌細胞のシーケンズ解析から exon2 の脱落した  $\Delta 2$ -gamma-glutamyl carboxylase(GGCX)を同定し、クローニングした。肝癌細胞において  $\Delta 2$ -GGCX 発現は DCP 産生細胞(69%)において非産生細胞(8%)と比較して優位に高く、本来 DCP 非産生細胞である HLE, SK-Hep-1 は、 $\Delta 2$ -GGCX 遺伝子導入により DCP 産生機能を持つようになった。これらの結果より肝癌における  $\Delta 2$ -GGCX の発現は、DCP 産生の一因であることが解明された。 $\Delta 2$ -GGCX 導入 Hep3B は、parental Hep3B に対して約 10 倍の DCP を産生し、逆に WT-GGCX 導入 Hep3B は、DCP の産生が消失した。それぞれの細胞を、ヌードマウス皮下に接種し 8 週間飼育した。 $\Delta 2$ -GGCX 遺伝子導入細胞(腫瘍体積 632mm<sup>3</sup>)においては、WT-GGCX 遺伝子導入細胞(腫瘍体積 153mm<sup>3</sup>)と比較して 4.2 倍と大きな腫瘍をヌードマウス皮下に形成し、血管新生も多く認められた。HCC 患者組織(手術標本)でも DCP 産生、血管新生の検討を行った。免疫組織染色の検討では、DCP 発現と血管新生を示す CD31 発現の相関が認められた。また、造影 CT で評価した HCC の vascularity と、血清 DCP の値にも相関が認められた。これらの結果より、DCP は臨床検体においても血管新生と密接な関連を持つことが判明した。

研究成果の概要(英文)：Des-gamma carboxy prothrombin (DCP) stimulated KDR in human umbilical vein epithelial cell; enhanced cell migration by 2.2-fold and enhanced cell proliferation by 1.5-fold. KDR inhibitor abrogated these effects. Sequence analysis revealed that exon 2 skipping splice variant gamma-glutamyl carboxylase ( $\Delta 2$ -GGCX) was expressed in DCP-positive hepatocellular carcinoma (HCC) cells. DCP-positive HCC cells expressed 69% of  $\Delta 2$ -GGCX, while DCP-negative HCC cells expressed 8% of  $\Delta 2$ -GGCX. The introduction of  $\Delta 2$ -GGCX converted DCP-negative HCC cells into DCP-positive HCC cells. On the other hand, the introduction of wild type (WT)-GGCX converted DCP-positive HCC cells into DCP-negative HCC cells. WT-GGCX and  $\Delta 2$ -GGCX expressing Hep3B cells were injected subcutaneously into nude mice.  $\Delta 2$ -GGCX-Hep3B formed more angiogenic tumors and 4.2-fold larger tumors than WT-GGCX-Hep3B. HCC tissue samples demonstrated a positive correlation between DCP production and angiogenesis determined by CD31 index. The serum DCP level of hypervascular HCC was significantly higher than that of hypovascular HCC. *In toto*, DCP expression is associated with tumor angiogenesis in HCC.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

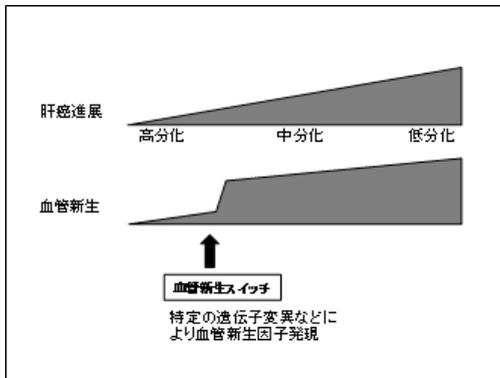
研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：内科系臨床医学・消化器内科学

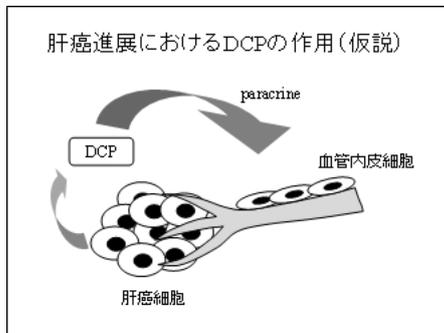
キーワード：細胞増殖、肝細胞癌、血管新生

## 1. 研究開始当初の背景

肝細胞癌は5年生存率が50%以下の予後不良の癌である。わが国の癌死亡原因の第3位で近年増加傾向にあり、早期にその有効な治療法の開発が望まれる。肝癌は実質臓器の癌の中でも腫瘍血管に富むことが特徴的であり、高分化から中分化、低分化癌へと進展していく過程において血管新生を伴う腫瘍へと変化していく。臨床病理学的に高分化型肝癌は血管新生を伴う腫瘍はまれであるが、中分化型や高分化型肝癌ではほとんどの腫瘍が血管新生を伴っている。この現象はangiogenic switch (血管新生スイッチ) と呼ばれ、そのドラスティックな変化をもたらす分子機構の存在が予測されるが、未だその全容



の解明には至っていない。近年の分子標的薬開発によりがん治療における腫瘍血管新生を制御する治療法が癌治療のひとつの現実的な新規治療法となりつつあり、肝癌進展の血管新生スイッチを制御するための標的分子の同定は急務である。当該研究者は、肝癌の腫瘍産生物質で従来は、特異的腫瘍マーカーPIVKA-IIとして知られていた異常prothrombin; Des-gamma-carboxy prothrombin (DCP)が、肝細胞癌の増殖亢進作用を持つことを解明した(*Journal of Biological Chemistry* 280(8): 6409-15, 2005)。更にDCPは、血管内皮細胞を刺激する増殖因子であることも解明している(*Journal of Biological Chemistry*



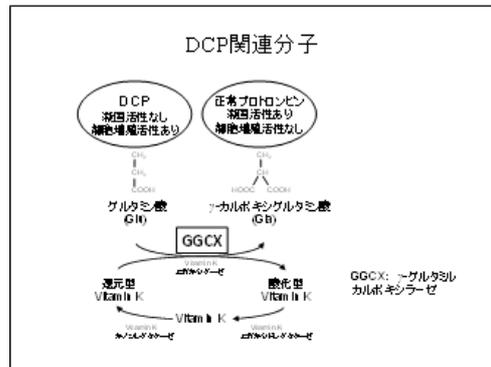
282(12): 8741-8, 2007)。これら検討の結果よりDCPの産生は肝癌の悪性化に深く関与し、特に血管新生を介して肝癌の進展に寄与している可能性が高い。

## 2. 研究の目的

肝癌進展における血管新生スイッチの分子機構を解明し、それら分子をターゲットとした分子標的治療の基盤を確立する。具体的には以下の項目についての検討を行う。

(1) DCPの血管新生作用とシグナル: 培養細胞を用いて、DCPの血管内皮細胞に対する効果とそのシグナル伝達経路・分子を同定する。

(2) DCP産生機構: DCP産生機構とその関連分子の同定を行う。DCPは、肝癌細胞で産生される異常プロトロンビンであるが、その詳細な産生機構は不明である。DCPを正常プロトロンビンに変換する酵素はγ-グルタミルカルボキシラーゼ(GGCX)であり、予備的検討において肝癌におけるDCP産生は変異GGCXの出現に原因がある可能性が高いことを突き止めている。



(3) 肝癌臨床検体におけるDCP出現と血管新生: 肝癌臨床検体を用いて、血管増生とDCPの出現及びその産生機構に関わる分子の発現や変異を検討する。

(4) ノードマウス実験モデルにおける血管新生抑制効果の検討: GGCXの活性制御

(DCP産生制御)を行える肝癌細胞を遺伝子工学の手法を用いて作成した後ノードマウスに接種し、その生体内での血管新生に与える影響について検討するとともに、関連分子の発現、knockdownによる効果を検討し、分子標的治療の基盤を確立する。

## 3. 研究の方法

(1) DCPの血管新生作用の検討: DCPの血管新生作用は、当該研究者らのこれまでの成果で血管内皮細胞に対する細胞増殖因子様作用があることが証明されている(*Journal of Biological Chemistry* 280(8): 6409-15, 2005, *Journal of Biological Chemistry* 282(12): 8741-8, 2007)。そこで実際に血管新生を引き起こされるかどうかの検討を行う。ヒト臍帯静脈血管内皮細胞(HUVEC)を用いて、その細胞増殖能、細胞移動能を検討する。細胞増殖能はMTT assay及び<sup>3</sup>H-thymidineの取り込みで評価する。細胞移動能は*in vitro* wound healing

assay で評価する。更に basement protein 上で HUVEC を培養する tubular formation assay (CosmoBio *in vitro* 血管新生アッセイキット ECMatrix<sup>TM</sup>)により管腔形成能の評価を行う。

(2) DCP の血管内皮細胞増殖因子のシグナル伝達機構の解析: DCP のシグナルの入り口である受容体は血管内皮細胞増殖因子の受容体である KDR の可能性が高いことがこれまでの検討で解明できている(*Journal of Biological Chemistry* 282(12): 8741-8, 2007)。

KDR と DCP の結合を Far Western blot analysis 及び免疫沈降法を用いて確認する。DCP のその他の細胞表面受容体との結合はアレイを用いて解析を行う。KDR は血管内皮細胞増殖因子の受容体であるため下流のシグナルは血管内皮細胞増殖因子と共通の可能性が高く、そのリン酸化および下流のシグナル伝達分子の活性化を Western blot により解析する。シグナルが異なる場合は、適宜アレイ解析を組み合わせて解析を行う。

(3) DCP 産生機構の解析: DCP の詳細な産生機序については解明されていない。DCP は異常プロトロンビンであるが、正常プロトロンビンともどもプロトロンビン前駆体より γ-グルタミルカルボキシラーゼ (GGCX) と vitamin K の働きにより変換される。肝細胞癌培養細胞のうち DCP 産生能が高いもの (PLC, Hep3B, Huh7) と DCP 非産生のもの (HLE, SK-Hep1, HLF) とを用いて GGCX の働きについての以下の検討を行う。

#### ① GGCX のシーケンス解析と変異 GGCX の確認

予備的検討では DCP 産生細胞において変異 GGCX の出現が認められることが確認できている。GGCX 遺伝子の sequence 解析を行う (ABI Prism 3100 Avant を使用) ことで変異 GGCX を同定する。

#### ② GGCX 酵素活性の測定

酵素活性の測定には、[C<sup>14</sup>]標識 CO<sub>2</sub> を用いその細胞への取り込み能を測定することにより評価する。

#### ③ WT 及び変異 GGCX のクローニングと細胞実験系の確立

GGCX 遺伝子は、NCBI で公開されているシーケンスを元に設計したプライマーを用いて、RT-PCR によりクローニングし、哺乳動物細胞において conditional な発現制御可能な MMTV promoter を持つ発現 vector 及び tet system 発現 vector (BD Biosciences) へ組み込む。GFP 及び poly His tag を付加し、細胞内での機能解析に備える。WT-GGCX 及び変異 GGCX 遺伝子は、肝細胞癌 cell line に electroporator (BioRad GenePulser) により導入し stable transfection 細胞を樹立する。細胞内での mRNA 及び蛋白の発現は、Real-time PCR (Roche LightCycler を使用) と Western blot (イメージアナライザー Roche LumiImager

F1) により確認する。導入細胞の形態変化及び GFP 融合蛋白発現・局在は位相差顕微鏡、蛍光顕微鏡及びデジタルカメラシステム (オリンパス IX-50, BX-51, DP-50 を使用) により評価する。

#### ④ RNAi による GGCX knockdown

GGCX 遺伝子は、RNAi 技術により knockdown を試みる。target site を検討し更に RNA 二次構造予測 (DNASTAR lasergene を使用) により決定する。塩基配列は複数個設計し、少量の siRNA 合成を行い直接細胞を刺激し、最も効率のよい物を選択し以下の検討に用いる。既に GGCX siRNA は一種類設計、合成を終了し knockdown には成功しているが、更に効率の良いものを得て、tetracycline による制御が可能な pSuperior (Oligo Engine) に組み込む。pSuperior は、細胞内に遺伝子導入し、さらにネオマイシンを用いて stable transfection の細胞を確立する。

(4) 肝組織での検討: 肝臓組織の採取前に術前診断として血管造影検査もしくは、dynamic CT で高血流群と低血流群に分類する。それぞれの標本の癌部、非癌部組織を用いて検討を行う。また、それぞれの組織は病理学的検討を行い、組織学的な高分化群、中分化群、低分化群の評価・分類を行う。

実際の肝細胞癌組織中でこれまでの研究結果と一致しているかどうかの検証を行う。具体的には以下の検討を行う。

① 血管内皮細胞に特異的なエンドセリン、CD31 を免疫組織染色により確認し、各組織での血管新生を評価する。

② 各種分子発現解析 vitamin K, DCP, GGCX の発現を Western blot 及び免疫組織染色により評価する。

③ GGCX 発現および変異 GGCX の発現を RT-PCR により解析する。

④ KDR の活性化を Western blot 及び免疫組織染色により評価する。

肝組織での検討結果と *in vitro* 実験での解析結果に解離がある場合には、分化度別、血流量別の組織を用いたマイクロアレイ解析を用いて、その他の血管新生スイッチ分子の抽出を行う。

(5) ノードマウスへの腫瘍細胞接種: DCP 産生肝細胞癌 cell line (Hep3B, PLC)、非産生肝細胞癌 cell line (HLE, SK-Hep1) をノードマウス腹腔内に接種し、2, 4, 6, 8 週で剖検し、腹腔内での腫瘍系、重量より腫瘍の原発巣の進展を評価する。検討 4 と同様に血管新生に与える影響について評価を行う。

*In vitro* における転移能の評価は、上記細胞をそれぞれノードマウスの脾臓内に接種し同様に 2, 4, 6, 8 週で剖検し、肝臓内への転移巣の個数、腫瘍系により評価を行なう。

検討(3)で作成した DCP 発現コントロール可能な細胞を接種し、同様の検討を行うことで、



は  $\Delta 2$ -GGCX の発現は認めなかった。

③ DCP 産生細胞において優位な  $\Delta 2$ -GGCX mRNA 発現量の検討

RT-PCR にて GGCX mRNA 定量解析を行った。WT-GGCX 発現量は DCP 産生細胞群と非産生細胞群との比較では有意差を認めなかったが、 $\Delta 2$ -GGCX ではそれぞれアクチン比  $69.3 \pm 45.2\%$ 、 $7.7 \pm 3.5\%$  と有意差が認められた。DCP 産生細胞では GGCX 全体量と比較し  $\Delta 2$ -GGCX 発現量は約 18.5% であった。

④ DCP 産生細胞における  $\Delta 2$ -GGCX 蛋白の発現量の検討

作成した抗 WT-GGCX 抗体、抗  $\Delta 2$ -GGCX 抗体を用いてウェスタンブロット解析を行い、蛋白の発現量の検討を行った。～約 87.5kDa に WT-GGCX のバンドが確認され、DCP 産生細胞では抗  $\Delta 2$ -GGCX 抗体にてバンドが確認され、リアルタイム PCR の結果同様  $\Delta 2$ -GGCX 蛋白の発現量は GGCX 発現全体量の約 20% であった。

⑤ DCP 非産生細胞への  $\Delta 2$ -GGCX cDNA 導入による DCP 産生能獲得

$\Delta 2$ -GGCX cDNA を DCP 非産生細胞に導入した結果、DCP 産生が確認された。また DCP 産生細胞内では  $\Delta 2$ -GGCX 発現が全体量の約 20% 程度と少ないため、少量の  $\Delta 2$ -GGCX 発現の効果を確認する目的で、WT-GGCX と  $\Delta 2$ -GGCX の導入比率(10:0, 9:1, 8:2, 5:5, 1:9, 0:10)を変えた co-transfection を行った。その結果 10% の  $\Delta 2$ -GGCX を導入した DCP 非産生細胞にても DCP が産生されることが確認された。

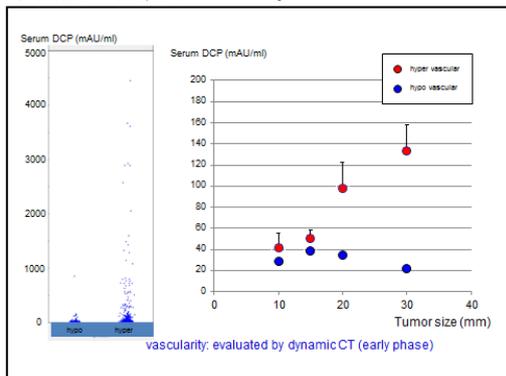
⑥ DCP 産生細胞への WT-GGCX 導入による DCP 産生能喪失

CMVp を用いて DCP 産生細胞に WT-GGCX を強発現させると DCP 産生能が失われた。

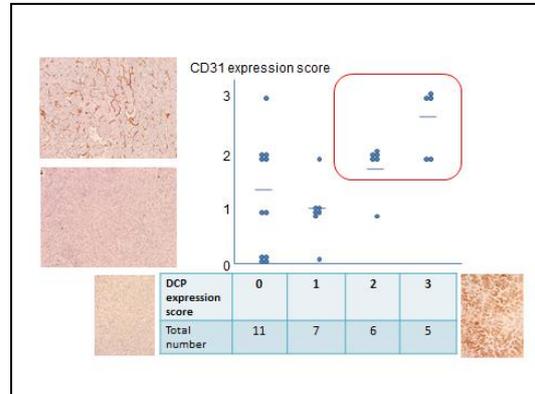
(4) 肝組織の検討 (DCP 産生と血管新生)

① DCP 産生と肝癌の vascularity

Dynamic CT の動脈相で評価した vascularity と血中 DCP の関連性の検討をおこなった。Hyper vascular な腫瘍は、DCP 産生の高いものが多く、腫瘍径ごとに分類すると、hypervascular な腫瘍は腫瘍サイズが大きくなるに従って DCP は高くなるが、hypovascular な腫瘍はサイズが大きくなっても DCP の血中濃度は変化なかった。

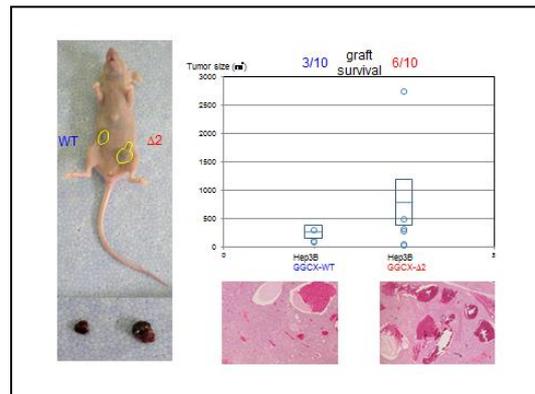


② 肝癌組織における DCP 発現と vascularity  
肝癌組織における DCP 発現と血管新生を反映する血管内皮細胞に発現する CD31 の発現スコアをプロットすると DCP 発現の高い肝癌組織では、CD31 発現も高いことが判明した。



(5) スードマウスへの腫瘍細胞接種

スードマウスに WT-GGCX および  $\Delta 2$ -GGCX を導入した Hep3B 細胞を接種し、8 週間後に腫瘍のサイズと正着を評価した。DCP 産生能をもつ  $\Delta 2$ -GGCX 導入 Hep3B の方がサイズも大きく生着率も高かった。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 9 件)

- ① Kuwaki K, Kobayashi Y, Nakamura S, Onishi H, Shiraha H, Kobashi H, Yamamoto K, et.al. Prognostic model for hepatocellular carcinoma with time-dependent factors. Acta Med Okayama、査読有、65(1) 巻、2011、11-19
- ② Nakanishi Y, Shiraha H, Ohnishi H, Nakamura S, Kobayashi Y, Yamamoto K, et.al. Loss of runt-related transcription factor 3 expression leads hepatocellular carcinoma cells to escape apoptosis. BMC Cancer、査読有、11 巻、2011、312
- ③ Shiraha H, Nishina SI, Yamamoto K. Loss of

- runt-related transcription factor 3 causes development and progression of hepatocellular carcinoma. J Cell Biochem., 査読無、112(3) 巻、2011、745-749
- ④ Iwadou S, Kobayashi Y, Nakamura S, Ohnishi H, Shiraha H, Yamamoto K, et.al. Time-dependent analysis of predisposing factors for the recurrence of hepatocellular carcinoma. Liver Int., 査読有、30(7) 巻、2010、1027-1032
  - ⑤ Nouse K, Kobayashi Y, Nakamura S, Shiraha H, Yamamoto K, et.al. Application of radiofrequency ablation for the treatment of metastatic liver cancers. Hepatogastroenterology., 査読有、57(97) 巻、2010、117-120
  - ⑥ Nouse K, Shiraha H, et. al. Evolution of prognostic factors in hepatocellular carcinoma in Japan. Aliment Pharmacol Ther., 査読有、31(3) 巻、2010、407-414
  - ⑦ Matsuo N, Shiraha H, et. al. Twist expression promotes migration and invasion in hepatocellular carcinoma. BMC Cancer, 査読有、9 巻、2009、240-251
  - ⑧ Fujikawa T, Shiraha H, Yamamoto K. Significance of des-gamma-carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma. Acta Medica Okayama, 査読有、63(6) 巻、2009、299-304
  - ⑨ Ueda N, Shiraha H, et. al. Exon 2 deletion splice variant of  $\gamma$ -glutamyl carboxylase causes des- $\gamma$ -carboxy prothrombin production in hepatocellular carcinoma cell lines. Molecular Oncology, 査読有、2(3) 巻、2008、241-249

[学会発表] (計10件)

- ① 白羽英則 Des-gamma-carboxy prothrombin and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. 37th Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers 平成22年9月5日 ミュンヘン
- ② 白羽英則 肝細胞癌の分子標的探索と臨床応用 RUNX3 欠損による肝癌のシグナル活性化 第46回日本肝臓学会総会 平成22年5月27日 山形
- ③ 白羽英則 異常プロトロンビンの血管新生促進効果の検討 第96回日本消化器病学会総会 平成22年4月23日 新潟
- ④ 白羽英則 異常プロトロンビンと肝癌血管新生 第13回 Vitamin K & aging 研究会 平成22年2月20日 東京
- ⑤ 白羽英則 カルボキシラーゼ活性による EMT制御 第14回 Vitamin K & aging 研究会 平成22年2月19日 東京
- ⑥ 白羽英則 Des-gamma-carboxy

- prothrombin promotes growth and angiogenesis in hepatocellular carcinoma. 37th Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers 平成21年9月29日 アムステルダム
- ⑦ 白羽英則 血管新生因子としての異常プロトロンビン *in vivo*における検討 日本肝臓学会総会 平成21年6月4日 神戸
  - ⑧ 白羽英則 カルボキシラーゼ異常による肝癌血管新生誘導 第12回 Vitamin K & aging 研究会 平成21年2月14日 東京
  - ⑨ 白羽英則 Gamma-Glutamyl-Carboxylase Regulates Development of Hepatocellular Carcinoma. 36th Congress of the International Society of Oncology and Biomarkers 平成20年10月14日 東京
  - ⑩ 白羽英則 肝癌の分子標的治療 カルボキシラーゼ異常による血管新生誘導 DDW2008 平成20年10月1日 東京

[その他]  
ホームページ等  
<http://www.okayama-u.ac.jp/user/gastro/049kantansuikenkyu.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

白羽 英則 (SHIRAHA HIDENORI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：40379748

### (2) 研究分担者

小橋 春彦 (KOBASHI HARUHIKO)  
岡山大学・岡山大学病院・講師  
研究者番号：00403486  
大西 秀樹 (ONISHI HIDEKI)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・助教  
研究者番号：30595468 (H22)  
中村 進一郎 (NAKAMURA SHINICHIRO)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：70514230  
山本 和秀 (YAMAMOTO KAZUHIDE)  
岡山大学・大学院医歯薬学総合研究科・教授  
研究者番号：90140491  
小林 功幸 (KOBAYASHI YOSHIYUKI)  
岡山大学・岡山大学病院・助教  
研究者番号：20379746 (H20~H21)