

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 31 日現在

機関番号：34519

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24590998

研究課題名(和文) 肝癌由来増殖因子の血管新生と肝癌増殖における役割の検討

研究課題名(英文) Role of hepatoma-derived growth factor in the tumor angiogenesis and the growth of the hepatocellular carcinoma

研究代表者

榎本 平之(Enomoto, Hirayuki)

兵庫医科大学・医学部・准教授

研究者番号：40449880

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：本検討では臨床で使用可能な薬剤であるインターフェロンがSorafenibの抗腫瘍効果を増強する可能性を示すことができた。またHDGFの発現抑制が、肝癌細胞増殖と血管新生の両者を阻害することで肝癌増殖制御につながることを見出すことができた。またHDGFはVEGFの制御を受ける下流の遺伝子ではなく、逆にHDGFはVEGFの発現を誘導する因子と考えられる結果が得られた。以上の結果は肝癌増殖・血管新生の機序に関して、HDGFの役割を含む新たな知見であり、HDGFの制御による肝癌増殖治療の開発につながることを期待できる。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we showed the possibility that IFN treatment amplifies the antitumor effects of sorafenib for hepatocellular carcinoma (HCC). Down-regulation of HDGF shows antitumor effects for HCC through the inhibition of cancer cell proliferation and angiogenesis. We also found that VEGF treatment did not induce HDGF expression, while HDGF induced VEGF expression. These findings revealed new roles of HDGF in HCC growth and angiogenesis, and should contribute to the development of a new therapy for HCC by inhibiting the HDGF function.

研究分野：消化器病学

キーワード：HDGF 肝細胞癌 血管新生

1. 研究開始当初の背景

癌組織の形成・増大において血管新生の誘導は重要であり、血管新生抑制を目的とした肝癌への分子標的治療薬が臨床応用されて VEGF や PDGF、あるいは FGF といった増殖因子をターゲットとした治療が開発されている。しかしながら肝細胞癌に対しては、VEGF をターゲットとした Sorafenib 以外に有用性が証明されたものはない。

我々は肝癌の増殖に関与する新たな因子を求め、完全無血清培地で増殖可能な肝癌細胞株 Huh-7 の培養上清より Hepatoma-derived growth factor (肝癌由来増殖因子、以下 HDGF と記す) を発見し、更にその cDNA のクローニングにも成功した。

これまでに我々は、HDGF が肝細胞の増殖因子として働き、未分化な肝細胞や肝癌細胞に対する増殖促進作用を有すること、更に HDGF の発現レベルが肝臓癌手術後の患者における再発や予後の指標となることも示してきた。さらに我々は HDGF が血管新生誘導因子として作用して癌の進展に関与することを報告し、HDGF が肝癌細胞の増殖に深く関与する因子であることを明らかにしてきた。

一方でインターフェロン (IFN) / α は抗ウイルス作用に加えて抗腫瘍効果・血管新生抑制作用を有しており、我々は肝細胞癌においても抗癌剤との併用や根治治療後の再発予防における有効性も示唆されている。本研究は HDGF を中心に Sorafenib や IFN を含めて肝細胞癌に対する抗腫瘍効果について検討を行い、肝細胞癌に関する病態究明や新規治療開発へつながる成果の獲得を目指して開始した。

2. 研究の目的

肝癌由来増殖因子 HDGF は、我々のグループによって見出された新たな増殖因子である。これまでに HDGF が発癌および癌増殖に深く関与することを明らかにしてきたが、HDGF の作用やその機序については十分に解明されているとはいえない。

本研究は HDGF の肝癌増殖に対する作用について、血管新生誘導を含めて明らかにすることを目的とした。また VEGF を標的とした既存治療である Sorafenib について、腫瘍血管新生抑制作用を有する IFN についても解析を行った。そして Sorafenib HDGF、IFN を組み合わせ、肝癌増殖への新規治療法開発へつながる成果の獲得を目指した。

3. 研究の方法

(1) Sorafenib と IFN の併用療法についての検討

肝癌細胞株を免疫抑制マウスに移植する xenograft model を用いて、IFN の血管新生を介した抗腫瘍効果について検討した。

Hep3B 細胞を皮下に移植して形成される腫瘍に対して、移植 5 週間から 2 週間連続で Sorafenib 単独投与(経口) IFN 単独治療(傍腫瘍へ注入) 両者の併用治療を行い、*in vivo* における腫瘍増殖抑制効果を比較した。

(2) HDGF の発現抑制が肝癌細胞増殖に及ぼす効果に関する検討

HDGF の発現抑制株をリポフェクション法による sh-RNA の導入と G418 によるセレクションによって樹立した。2 つの異なる発現抑制株を用い、HDGF 抑制が肝癌増殖に及ぼす影響について *in vitro* および *in vivo* で検討した。なお *in vitro* での効果については MTS assay を用い、*in vivo* での効果については xenograft model を用いて検討した。

(3) HDGF の発現抑制による腫瘍血管新生抑制に関する *in vivo* での検討

HDGF の抗腫瘍効果における血管新生抑制の役割を明らかにするため、xenograft model で形成された腫瘍を用い、CD31 の免疫染色を行って腫瘍組織の血管を同定した。

(4) HDGF 発現と VEGF シグナルに関する検討

HDGF が血管新生因子であることに注目し、HDGF の発現と Sorafenib/VEGF signal との検討を行った。Sorafenib を肝癌細胞株に作用させ、HDGF の誘導の有無を検討した。また HDGF の発現抑制株における VEGF の発現について検討した。なお HDGF、VEGF の発現量の定量については、いずれも Real-time PCR 法で施行した。

4. 研究成果

(1) Sorafenib と IFN の併用療法についての検討

まず実臨床で使用されている薬剤である Sorafenib と IFN の組み合わせによる抗腫瘍効果と血管新生抑制について検討を行った。Xenograft model を用いた検討から、Sorafenib に IFN を組み合わせることで腫瘍の壊死範囲が拡大した。

また Sorafenib と IFN の併用を行うことで、腫瘍血管も Sorafenib 単独治療より抑制されていた。以上の結果から IFN は Sorafenib の抗腫瘍効果を増強すること、またその作用機序として血管新生抑制作用の増強があると考えられた。Sorafenib、IFN とも実用化されている薬剤であるため、これらの組み合わせによって腫瘍血管をターゲットする新規治療の可能性が示唆された。

(2) HDGF の発現抑制が肝癌細胞増殖に及ぼす効果

次いで本課題の主たる研究対象である HDGF に関する検討を行った。まず HDGF の発現を抑制した肝癌細胞株を作成した。そして Real-time PCR によって発現抑制を確認した (図 1)。

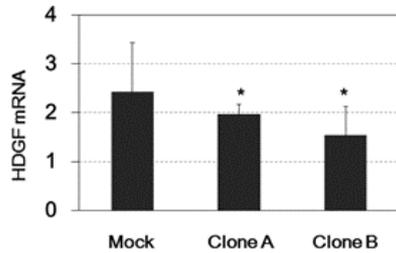


図 1: HDGF 発現抑制株の樹立

これら HDGF 発現抑制細胞では、*in vitro*での肝癌細胞の増殖が抑制されていたが、その程度は比較的軽度であった(図 2)。

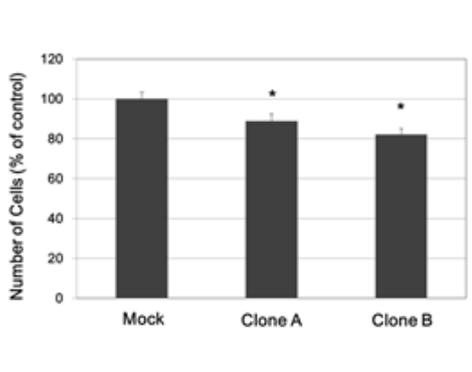


図 2: HDGF 発現抑制による *in vitro*での肝癌増殖抑制

しかしながらこれら HDGF の発現抑制株を免疫不全マウスへの移植したところ、形成される腫瘍は、対照(Mock)に比してサイズ(図 3a, 3c)も重量(図 3b)とも著明に低値であった。

すなわち HDGF の抑制による抗腫瘍効果は *in vitro*に比較して、*in vivo*で著明であった。この結果から、HDGF の制御による *in vivo*での腫瘍増殖抑制の有用性が示唆された。

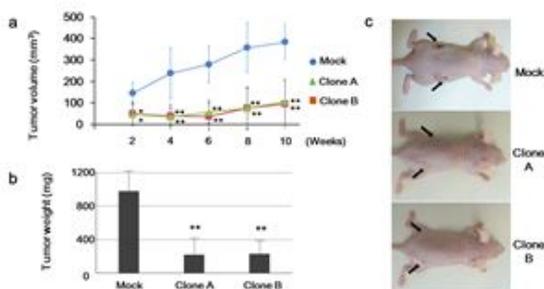


図 3: HDGF 抑制による *in vivo*肝癌増殖抑制

(3) HDGF の発現抑制による腫瘍血管新生抑制に関する検討

HDGF の抗腫瘍効果が *in vitro*に比べて *in vivo*で著明であったことから、肝癌細胞増殖

抑制以外の機序による抗腫瘍効果の存在が示唆された。

そこで CD31 の免疫染色を行って腫瘍組織の血管を同定したところ、HDGF の抑制により腫瘍血管が著しく減少していることが判明した(図 4)。この結果から、HDGF の抑制は肝癌細胞増殖と血管新生の両者の阻害をもたらすことで *in vivo*で高い抗腫瘍効果を発揮したと考えられた。

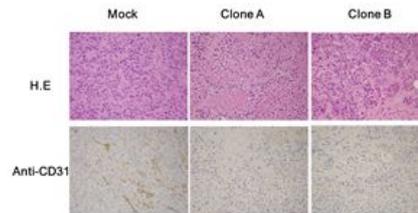


図 4: HDGF 抑制による腫瘍血管抑制作用

(4) HDGF 発現と VEGF シグナルに関する検討

HDGF の血管新生と Sorafenib/VEGF signal との関連を検討した。Sorafenib は HDGF の発現には影響を与えなかった(図 5)。

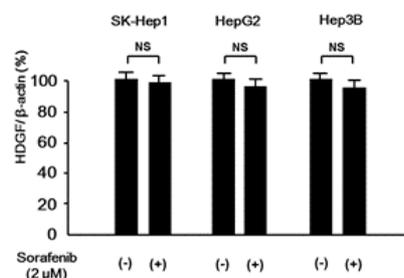


図 5: Sorafenib による HDGF 発現の変化

一方で HDGF の抑制株では、VEGF の発現が有意に抑制されていた(図 6)。以上のことから VEGF は HDGF の発現誘導には関与せず、一方で HDGF は VEGF の発現誘導に関与することが示された。

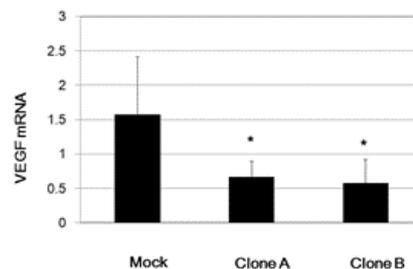


図 6: HDGF 抑制による VEGF 発現の変化

(4) 結果の総括

本検討では臨床で既に使用可能な薬剤で

ある IFN が Sorafenib の抗腫瘍効果を増強する可能性を示すことができた。また HDGF の発現抑制が、肝癌細胞増殖と血管新生の両者を阻害することで肝癌増殖制御につながることを示すことができた。また HDGF は VEGF の制御を受ける下流の遺伝子ではなく、逆に HDGF は VEGF の発現を誘導する因子と考えられる結果を得た。

以上より肝癌増殖・血管新生の機序に関して、HDGF の役割を含めて重要な知見を得ることが出来たと考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 7 件)

Enomoto H, Nishiguchi S, et al. Downregulation of HDGF inhibits the growth of hepatocellular carcinoma cells *in vitro* and *in vivo*. *Anticancer Res.* 査読有、35 巻、2015、6475-6480. 電子ジャーナル掲載なし

Enomoto H, Nishiguchi S, et al. Hepatoma-Derived Growth Factor: Its Possible Involvement in the Progression of Hepatocellular Carcinoma. *Int J Mol Sci.* 査読有、16 巻、2015、14086-97. DOI: 10.3390/ijms160614086.

Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. Role of hepatoma-derived growth factor in anti-angiogenic therapy for hepatocellular carcinoma. *Current Research in Gastroenterology and Hepatology.* 査読無、8 巻、2014、13-18. 電子ジャーナル掲載なし

Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. Regulation of hepatoma-derived growth factor (HDGF) for anti-cancer therapy. *Current Research in Cancer.* 査読無、8 巻、2014、1-6. 電子ジャーナル掲載なし

Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. Hepatoma-derived growth factor (HDGF) in liver disease. *Current Research in Hepatology.* 査読無、5 巻、2013、1-6. 電子ジャーナル掲載なし

Enomoto H, Nakamura H, Nishiguchi S. Hepatoma-derived growth factor (HDGF) as a potential target for cancer therapy. *Current Research in Cancer.* 査読有、7 巻、2013、1-12. 電子ジャーナル掲載なし

Enomoto H, Nishiguchi S. Suppression of hepatoma cell proliferation by vitamin K. *Current Research in Cancer.* 査読有、6 巻、2012、9-16. 電子ジャーナル掲載なし

〔学会発表〕(計 11 件)

Enomoto H, Tsujimura T, Nishiguchi S, et al. The pivotal role of

anti-angiogenic activity in the *in vivo* antitumor effects of type I interferon. The 65th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2014)、2014 年 11 月 10 日、Boston (USA)

榎本平之、今西宏安、西口修平 他、 Hepatoma-derived growth factor は sorafenib と異なる機序で肝癌増殖を抑制する、第 18 回日本肝臓学会大会 (JDDW2014)、2014 年 10 月 23 日、神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

Enomoto H, Imanishi H, Nishiguchi S, et al. HDGF (hepatoma-derived growth factor)-silencing inhibits the proliferation of hepatoma cells through a sorafenib-independent pathway. The 64th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases (AASLD2013)、2013 年 11 月 5 日、Washington (USA)

榎本平之、中村秀次、西口修平、 肝癌症例における Hepatoma-derived growth factor (HDGF) の血中濃度測定に関する検討、第 17 回日本肝臓学会大会 (JDDW2013)、2013 年 10 月 10 日、品川プリンスホテル (東京都・港区)

榎本平之、今西宏安、西口修平 他、 Hepatoma-derived growth factor の発現抑制による肝癌増殖抑制効果：Sorafenib との関係を含めての検討、2013 年 6 月 7 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

榎本平之、今西宏安、西口修平 他、 インターフェロンと Sorafenib の併用療法に関する基礎的検討、第 7 回日本肝がん分子標的治療研究会、2013 年 1 月 19 日、じゅうろくプラザ (岐阜県・岐阜市)

Enomoto H, Imanishi H, Nishiguchi S, et al. Hepatoma-derived growth factor as a possible target molecule for the treatment of hepatocellular carcinoma. The 10th JSH Single Topic Conference、2012 年 11 月 21 日、京王プラザホテル (東京都・新宿区)

榎本平之、今西宏安、西口修平 他、 Sorafenib とインターフェロンの併用療法に関する検討、第 16 回日本肝臓学会大会 (JDDW2012)、2012 年 10 月 10 日、神戸国際展示場 (兵庫県・神戸市)

榎本平之、 肝細胞癌に対する分子標的薬とインターフェロンの併用療法に関する基礎的検討、第 12 回肝疾患フォーラム学術集会、2012 年 9 月 29 日、ホテルグランヴィア大阪 (大阪府・大阪市)

榎本平之、今西宏安、西口修平 他、 Sorafenib とインターフェロンの併用療法に関する検討、第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2012 年 6 月 22 日、神戸商工会議所 (兵

兵庫県・神戸市)
榎本平之、今西宏安、西口修平 他、インターフェロンの血管新生抑制による抗腫瘍効果に関する検討、第 77 回日本インターフェロン・サイトカイン学会学術集会、2012 年 6 月 21 日、神戸商工会議所（兵庫県・神戸市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

榎本 平之 (ENOMOTO, HIRAYUKI)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：40449880

(2) 研究分担者

今西 宏安 (IMANISHI, HIROYASU)
兵庫医科大学・医学部・准教授
研究者番号：60340957

西口 修平 (NISHIGUCHI, SHUHEI)
兵庫医科大学・医学部・教授
研究者番号：60340957

(3) 連携研究者

なし ()