

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 8 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24592005

研究課題名(和文) 肝細胞癌における血管新生因子アペリンの機能解析と新規分子標的治療への応用

研究課題名(英文) Functional and clinical analysis of angiogenic factor apelin in hepatocellular carcinoma

研究代表者

杉町 圭史 (Sugimachi, Keishi)

九州大学・大学病院・特別教員

研究者番号：90452763

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：肝細胞癌(HCC)の進展における血管新生因子アペリン-APJ経路の役割を明らかにするために本研究を行った。HCC臨床検体におけるアペリン-APJのタンパク発現を免疫組織染色で検討した。アペリンはHCC細胞、受容体APJは腫瘍血管の周皮細胞に高発現、アペリン-APJは中低分化HCCで高発現した。HCC培養細胞株はアペリン投与により変化はなかったが、マウス肝癌皮下腫瘍モデルではAPJアンタゴニスト投与により腫瘍増大が抑制された。以上よりアペリン-APJはHCCの血管新生を促進し腫瘍の進展に寄与していることが分かった。アペリン-APJ経路はHCCに対する新たな治療標的となりうる。

研究成果の概要(英文)：The aim of this study was to clarify the role of the apelin-APJ system which regulates angiogenesis in tumor progression of hepatocellular carcinoma (HCC). Expressions of angiogenic factors and vascular markers were investigated in specimens from 90 HCC patients. A subcutaneous HCC tumor mouse model was treated with the APJ antagonist, F13A, and tumor growth and vascular development were assessed. APJ expression was observed in arteriole-smooth muscle. Higher amounts of APJ+arteriole and apelin were detected in tumors ( $p < 0.001$  for both). APJ+arteriole and apelin expression were more commonly observed in moderately- and poorly-differentiated than in well-differentiated HCC ( $p = 0.003$ ). HCC with irregular dilated arteries expressed higher levels of apelin ( $p = 0.012$ ). Tumor growth was inhibited by treatment with F13A ( $p < 0.001$ ), and arterioles were decreased in the treated group ( $p = 0.047$ ), in vivo. Apelin-APJ is overexpressed, and works as a signal for arteriogenesis in HCC.

研究分野：消化器外科、肝胆膵外科

キーワード：肝細胞癌 血管新生 アペリン F13A CD34

## 1. 研究開始当初の背景

本邦において肝臓癌は死亡者数第3位、罹患率第4位を占めている。肝細胞癌に対して切除、局所療法、塞栓療法、肝移植などの集学的な治療が発展してきたが、ほとんどの患者がウイルス性肝炎や肝硬変を合併していることもあり未だに治療後に高頻度に再発を来し、全症例の5年生存率は35.4%である。このような現況を踏まえると肝細胞癌の治療成績の向上のためにはその腫瘍の分子的性質を解析し、肝細胞癌に特異的な新しい分子標的治療を開発することが急務であると考えられる。

生体組織の成長には酸素・養分の運搬経路として血管が必須である。正常組織では組織形成の終了とともに血管新生過程も終了するが、固形癌組織ではがん幹細胞の増殖は制限されないために癌細胞の増殖とともに血管新生も継続する。つまり血管新生は固形癌の進展に必須の生理過程であり、また血管新生を制御することで腫瘍そのものを制御することが可能になるかもしれない。

固形癌における病的血管新生において、アンジオポエチン系とVEGF系という二つの経路が重要な役割を果たすことが分かっている。腫瘍細胞からアンジオポエチン-2が分泌されると、アンジオポエチン-1の作用を拮抗し血管内皮細胞に存在するTie2受容体の活性化が抑制される。すると血管内皮細胞と周囲の壁細胞の接着にゆらぎが生じ、内皮細胞が低酸素領域すなわち腫瘍内部に移動することが可能になる。腫瘍内部では血管内皮成長因子(VEGF)が存在し、内皮細胞増殖、運動性亢進、間質マトリックス消化などの血管新生のほぼ全ての過程に重要な役割を果たす。

我々はこれまでに、肝細胞癌におけるアンジオポエチン-Tie2経路の機能について研究してきた。肝細胞癌においてアンジオポエチン-2が高発現しており腫瘍新生血管に重要な機能を果たすことを明らかにした

(Sugimachi K et al. *Surgery* 2002, Sugimachi K et al. *J Clin Pathol* 2003)。またVEGFも肝細胞癌において高発現が確認されておりそのVEGF中和抗体などを応用した治療も進んでいる(Zhu AX et al. *Nat Rev Clin Oncol* 2011)。

抗血管新生治療が進む一方で、現行の血管新生抑制剤のみでは十分に血管新生が抑制できないことや、一旦腫瘍が縮小しても腫瘍周囲から再発することが動物モデルや臨床的に分かってきた。我々は組織学的検討から、腫瘍内部の脆弱な細い血管には血管新生抑制剤が感受性を示すのに対して腫瘍周囲の壁細胞化を伴う太い成熟血管は耐性を持つという仮説を立てた。

アペリンはGタンパク共役型受容体APJに対する結合因子として単離された分子である。アフリカツメガエルの遺伝子ノックダウンにてアペリン/APJシステムが血管発生に必須であることが分かり、またヒトにおいてもAPJが血管内皮細胞などに分布していることから血管形成に関与また、アペリンのノックアウトマウスでは正常マウスに比較して血管が狭小化していることが判明した。

血管新生が生じている組織ではVEGFが過剰に産生され、その刺激によってAPJが血管内皮細胞に強く発現する。アペリンは周皮細胞から分泌されるアンジオポエチン-1が血管内皮細胞膜のTie2に結合することで血管内皮細胞から分泌される。VEGFの存在下でアペリンを添加すると内皮細胞の増殖が増強され、太い血管が形成される(Kidoya H et al. *Blood* 2010)。つまり、アペリン/APJ系はアンジオポエチン・VEGFと高度に協調しながら内皮細胞の増殖と集塊形成を誘導し、太い成熟血管の形成に関わっている。

固形癌においては、乳癌、非小細胞肺癌においてアペリンの発現が増えているとの報告があり(Sorli SC et al. *Oncology* 2007, Berta J et al. *J Thorac Oncol.* 2010)、腫瘍血管新生にアペリンが重要な役割を果たしていること

が注目されている。肝細胞癌におけるアペリンの発現はまだ不明であるが、これまでのアンジオポエチン・VEGFの研究からアペリンは肝細胞癌の血管新生においても重要な役割を果たしている可能性が極めて高いと考えられ、その研究の必要性は高いと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、肝細胞癌における血管新生因子アペリンの発現異常の解析と新しい治療法への応用を検討することである。そのためには肝細胞癌におけるアペリン発現異常の解析を行い、さらに新規分子標的治療への応用を目指したアペリンの機能制御に関する基礎的検討を行うこととした。これらの解析は、癌の発生・進展のメカニズムの解明に非常に重要であるだけでなく、新しい治療法開発に向けて、その研究の進展が期待された。

## 3. 研究の方法

1. ヒト肝細胞癌臨床検体（切除標本）において免疫組織染色法を用いてアペリン、APJ、腫瘍新生血管の発現の有無および局在を同定する。
2. リアルタイムPCR法を用いて、アペリン、APJ、アンジオポエチン、VEGFのそれぞれ癌部・非癌部における定量的発現解析を行い、その異常発現と腫瘍の悪性度や予後を含めた臨床病理学的因子との関連を解析する。
3. 肝癌細胞株、血管内皮細胞株の共培養系を用いて、血管新生および腫瘍増殖におけるアペリン/APJの機能解析を行う。
4. マウス肝癌モデルにてアペリンのantagonistを投与し、腫瘍血管新生の変化および血管新生抑制による抗腫瘍効果を検討する。

## 4. 研究成果

<HCCにおけるアペリン・APJの免疫組織学的解析>

肝細胞癌(HCC)におけるアペリン・APJの発現の有無および局在を同定するために免疫組織学的検討を行った。アペリンおよびその受容体APJ、さらに腫瘍血管の評価のためにCD34による評価を90症例にて行った。HCC切除標本においてアペリンタンパクは非癌部と比較して癌部で有意に高発現していることがわかった。CD34陽性の腫瘍新生血管の周皮細胞にアペリンの受容体であるAPJが発現していた。腫瘍新生血管の多い腫瘍ではアペリンが有意に相関して高発現していることがわかった。組織学的因子との相関を検討したところ、CD34陽性血管とAPJ陽性血管は肝細胞癌の組織学的分化度が低下するにつれて増加することがわかった。

<HCCにおけるリアルタイムPCR法を用いた血管新生関連因子の発現解析>

HCC90症例において、リアルタイムPCR法を用いてアペリン、アンジオポエチン-1、-2、VEGFの各分子発現の定量的解析を行った。HCC切除標本よりRNAを抽出しcDNAライブラリーを作成した。各血管新生因子の発現量を解析した。アペリンは非癌部と比較して癌部でmRNA発現が有意に発現が亢進しており、癌における血管新生に関わっている事が分かった。各臨床病理学的因子とアペリン発現の相関を解析したところ、組織学的分化度が低分化になるにつれ発現が増加していることがわかった。またアペリン高発現群ではVEGF、アンジオポエチン-2の発現が亢進しており、各血管新生因子が相互的に機能していることが示唆された。

<HCC細胞株を用いたアペリンの機能解析>

HCC細胞株(Huh7, PLC/PRF/5)を用いてアペリンの機能解析を行った。血管新生におけるアペリンの機能解析の目的にて、低酸素状態で細胞培養を行うとアペリンの発現が有意に上昇することを確認した。次に、HCC培養

細胞にアペリンおよびアペリン阻害剤 F13A を投与した。Huh7、PLC/PRF/5、MH134 (マウス HCC 細胞株) にアペリンを投与したところ細胞の増殖活性に変化は見られなかった。一方、CASMC 細胞 (血管平滑筋細胞株) ではアペリンの投与により細胞増殖活性が上昇し、かつアペリン阻害剤(F13A)にて下がることが確認された。

<マウス肝細胞癌皮下モデルを用いた血管新生阻害による抗腫瘍効果の検討>

アペリン-APJ に対する分子標的治療の開発のために肝細胞癌(HCC)の皮下腫瘍モデルを作成した。C3H マウスの皮下に HCC 細胞株 MH134 を注入した。アペリン受容体 APJ のアンタゴニスト F13A をマウスに投与するとコントロールマウスと比較して腫瘍発育が有意に抑制された。腫瘍発育抑制は投与 7 日目から見られ、観察最終日 (28 日目) まで持続した。皮下腫瘍作成後 14 日目に腫瘍組織を摘出し、HE 染色を行い組織学を観察した。腫瘍の大きさは F13A 治療マウスでコントロールマウスと比較して有意に縮小していたが、壊死領域の広さに差はなかった。CD34 による免疫染色にて micro vessel density (腫瘍内血管密度) を測定したところ、コントロールマウスと比較して有意に F13A 治療マウスで血管密度が低かった。また caldesmon による免疫染色にて arterial vessel density (腫瘍内動脈血管密度) を測定したところ、同様にコントロールマウスと比較して有意に F13A 治療マウスで動脈血管密度が低かった。アペリンは血管新生因子としてだけでなく、血管拡張因子としても作用することがわかっているため、10  $\mu$  m 以上の腫瘍内動脈の数を測定した。F13A 治療マウスでは 10  $\mu$  m 以上の動脈の数が有意に減少していた。F13A 治療マウスはコントロールマウスと比較して体重減少や血液生化学検査値異常はみられず、治療による明らかな有害事象・副作用は見られなかった。これらの結果より、F13A はアペリ

ン-APJ による血管新生・血管拡張作用を抑制することによる抗腫瘍効果をもたらすことが明らかになった。

## 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 12 件)

1.Ishibashi M, Kogo R, Shibata K, Sawada G, Takahashi Y, Kurashige J, Akiyoshi S, Sasaki S, Iwaya T, Sudo T, Sugimachi K, Mimori K, Wakabayashi G, Mori M. Clinical significance of the expression of long non-coding RNA HOTAIR in primary hepatocellular carcinoma. *Oncol Rep.* 2013 Mar;29(3):946-50.

doi: 10.3892/or.2012.2219. 査読有り

2.Yokobori T, Iinuma H, Shimamura T, Imoto S, Sugimachi K, Ishii H, Iwatsuki M, Ota D, Ohkuma M, Iwaya T, Nishida N, Kogo R, Sudo T, Tanaka F, Shibata K, Toh H, Sato T, Barnard GF, Fukagawa T, Yamamoto S, Nakanishi H, Sasaki S, Miyano S, Watanabe T, Kuwano H, Mimori K, Pantel K, Mori M. Plastin3 is a novel marker for circulating tumor cells undergoing the epithelial-mesenchymal transition and is associated with colorectal cancer prognosis. *Cancer Res.* 2013 Apr 1;73(7):2059-69.

doi: 10.1158/0008-5472. 査読有り

3.Takahashi Y, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, Ishibashi M, Takano Y, Akiyoshi S, Iwaya T, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Microarray analysis reveals that high mobility group A1 is involved in colorectal cancer metastasis. *Oncol Rep.* 2013 Sep;30(3):1488-96.

doi: 10.3892/or.2013.2602. 査読有り

4.Sawada G, Ueo H, Matsumura T, Uchi R, Ishibashi M, Mima K, Kurashige J, Takahashi Y, Akiyoshi S, Sudo T, Sugimachi K, Doki Y, Mori M, Mimori K. Loss of COP1 expression determines poor prognosis in patients with gastric cancer. *Oncol Rep.* 2013 Oct;30(4):1971-5.

doi: 10.3892/or.2013.2664. 査読有り

5.Sugimachi K, Yokobori T, Inuma H, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Suzuki A, Maehara Y, Mori M, Mimori K. Aberrant expression of platin-3 via copy number gain induces the epithelial-mesenchymal transition in circulating colorectal cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 2014 Oct;21(11):3680-90.

doi: 10.1245/s10434-013-3366-y. 査読有り

6.Takahashi Y, Iwaya T, Sawada G, Kurashige J, Matsumura T, Uchi R, Ueo H, Takano Y, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Up-regulation of NEK2 by microRNA-128 methylation is associated with poor prognosis in colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Jan;21(1):205-12.

doi: 10.1245/s10434-013-3264-3. 査読有り

7.Sugimachi K, Yokobori T, Inuma H, Ueda M, Ueo H, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Suzuki A, Maehara Y, Mori M, Mimori K. Aberrant expression of platin-3 via copy number gain induces the epithelial-mesenchymal transition in circulating colorectal cancer cells. *Ann Surg Oncol.* 2014 Oct;21(11):3680-90.

doi: 10.1245/s10434-013-3366-y. 査読有り

8.Sugimachi K, Niida A, Yamamoto K, Shimamura T, Imoto S, Inuma H, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Watanabe M, Tanaka J, Kudo S, Hase K, Kusunoki M, Yamada K,

Shimada Y, Sugihara K, Maehara Y, Miyano S, Mori M, Mimori K. Allelic imbalance at an 8q24 oncogenic SNP is involved in activating MYC in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Dec;21 Suppl 4:S515-21.

doi: 10.1245/s10434-013-3468-6. 査読有り

9.Sawada G, Takahashi Y, Niida A, Shimamura T, Kurashige J, Matsumura T, Ueo H, Uchi R, Takano Y, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Sugimachi K, Miyano S, Doki Y, Mori M, Mimori K. Loss of CDCP1 expression promotes invasiveness and poor prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014 Dec;21 Suppl 4:S640-7.

doi: 10.1245/s10434-014-3740-4. 査読有り

10.Matsumura T, Sugimachi K, Takahashi Y, Uchi R, Sawada G, Ueda M, Hirata H, Sakimura S, Ueo H, Takano Y, Kurashige J, Shinden Y, Eguchi H, Sudo T, Yamamoto H, Doki Y, Mori M, Mimori K. Clinical significance of GAB2, a scaffolding/docking protein acting downstream of EGFR in human colorectal cancer. *Ann Surg Oncol.* 2014 Dec;21 Suppl 4:S743-9.

doi: 10.1245/s10434-014-3889-x. 査読有り

11. Muto J, Shirabe K, Yoshizumi T, Ikegami T, Aishima S, Ishigami K, Yonemitsu Y, Ikeda T, Soejima Y, Maehara Y. The apelin-APJ system induces tumor arteriogenesis in hepatocellular carcinoma. *Anticancer Res.* 2014;34(10):5313-20.

査読有り

12.Hirata H, Sugimachi K, Takahashi Y, Ueda M, Sakimura S, Uchi R, Kurashige J, Takano Y, Nanbara S, Komatsu H, Saito T, Shinden Y, Iguchi T, Eguchi H, Atsumi K, Sakamoto K, Doi T, Hirakawa M, Honda H, Mimori K.

Downregulation of PRRX1 Confers Cancer Stem Cell-Like Properties and Predicts Poor Prognosis in Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol.* 2014 Nov 18.  
doi:10.1245/s10434-014-4242-0. 査読有り

[学会発表] (計 5 件)

1. 武藤純, 調憲, 前原喜彦. 分子標的治療の限界を超える新しい肝癌治療法の開発 肝細胞癌における apelin/APJ 系を介した新しい血管新生阻害療法の可能性. 第 54 回日本消化器病学会大会 (2012. 10)
2. 武藤純, 調憲, 吉屋 匠平, 的野 る美, 戸島 剛男, 播本 憲史, 池上 徹, 山下 洋一, 内山 秀昭, 吉住 朋晴, 副島 雄二, 前原喜彦. 肝細胞癌における血管新生因子としての apelin/APJ 系の意義. 第 113 回日本外科学会定期学術集会 (2013. 4)
3. 杉町圭史, 友國晃, 石橋正久, 山下晋也, 江口英利, 主藤朝也, 調憲, 前原喜彦, 森正樹, 三森功士. 骨髄中における microRNA および遺伝子の包括的・統合解析による肝細胞癌の再発に関与する宿主側因子の解明. 第 68 回日本消化器外科学会 (2013. 7)
4. 杉町圭史, 平田秀成, 高橋佑典, 松村多恵, 上尾裕紀, 新田吉陽, 江口英利, 主藤朝也, 調憲, 前原喜彦, 三森功士. 肝細胞癌における上皮間葉移行誘導因子 PRRX1 の発現異常とがん幹細胞性の獲得に関する解析. 第 114 回日本外科学会定期学術集会 (2014. 4)
5. 平田秀成, 杉町圭史, 内龍太郎, 藏重淳二, 上田正射, 崎村正太郎, 新田吉陽, 江口英利, 平川雅和, 本田浩, 三森功士. 肝細胞癌における PRRX1 の発現異常とがん幹細胞性・治療抵抗性獲得に関する検討. 第 52 回日本癌治療学会 (2014. 8)

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

杉町 圭史 (SUGIMACHI, Keishi)  
九州大学 大学病院・特任准教授  
研究者番号 : 90452763

### (2) 研究分担者

調 憲 (SHIRABE, Ken)  
九州大学 医学(系)研究科(研究院)・准教授  
研究者番号 : 70264025

前原 喜彦 (MAEHARA, Yoshihiko)  
九州大学 医学(系)研究科(研究院)・教授  
研究者番号 : 80165662

江口 英利 (EGUCHI Hidetoshi)  
九州大学 大学病院・講師  
研究者番号 : 90527756

井口 友宏 (IGUCHI Tomohiro)  
九州大学 大学病院・助教  
研究者番号 : 30598959

秋吉 清百合 (AKIYOSHI Sayuri)  
九州大学 大学病院・助教  
研究者番号 : 50567360  
(平成 25 年度まで)

主藤 朝也 (TOMOYA Sudo)  
九州大学 大学病院・助教  
研究者番号 : 50309803  
(平成 25 年度まで)