

研究種目：基礎研究（C）
 研究期間：2007～2009
 課題番号：19590796
 研究課題名（和文）
 骨髄由来前駆細胞をベクターとし血管新生抑制を目的とした肝細胞癌への遺伝子治療
 研究課題名（英文） Antiangiogenic gene therapy for hepatocellular carcinoma with bone marrow-derived progenitor cells
 研究代表者
 鳥村 拓司（TORIMURA TAKUJI）
 久留米大学 医学部 准教授
 研究者番号：60197986

研究成果の概要（和文）：

マウス骨髄細胞を培養し血管内皮前駆細胞(EPC)と平滑筋前駆細胞(SMPC)への分化を証明した。EPCもSMPCも皮下に肝癌細胞を接種して作成したマウスに尾静脈から投与すると選択的に腫瘍組織へ遊走しその一部は血管内皮細胞や周細胞へ分化した。SMPCにアデノウイルスベクターを用いて可溶性flk-1 cDNAを遺伝子導入し担癌マウスに投与すると腫瘍組織での血管新生が抑制され腫瘍の増大もわずかではあるが抑制された。

研究成果の概要（英文）：

Mouse bone marrow derived mononuclear cells differentiated to endothelial progenitor cells (EPC) and smooth muscle progenitor cells (SMPC) in vitro. EPC and SMPC injected via tail vein selectively migrated to tumor tissue. These cells partly differentiated to endothelial cells and pericytes. Antiangiogenic gene therapy with SMPC transfected flk-1 cDNA by adenovirus vector suppressed vascular development and tumor growth.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
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(細目番号 7202)

キーワード：

肝細胞癌、血管新生抑制、遺伝子治療、flk-1、VEGF、骨髄細胞、平滑筋前駆細胞、血管内皮前駆細胞

1. 研究開始当初の背景

近年、血管の形成には既存の血管の内皮細胞が分裂して新たに血管が伸長する血管新生と、炎症や腫瘍局所への特異的な遊走能を有している骨髄由来の血管内皮前駆細胞が遊走し局所で血管を形成する血管発生という2種類の機序が存在することが明らかとなった。(Asa

hara, et al. Science 275;964-967, 1997) さらに、血管周囲の平滑筋細胞に分化する骨髄由来の平滑筋前駆細胞も存在することが証明された。(Simper, et al. Circulation 106;1199-1204, 2002)

血管の形成はあらゆる悪性腫瘍の進展に不可欠であり、一般に、腫瘍径が2 mmを超える

と腫瘍内には血管の形成が認められるといわれている。肝細胞癌は悪性腫瘍のうちでも血管が豊富な腫瘍として知られており、我々を含めて多くの研究から肝細胞癌の血管形成には腫瘍組織から分泌されるVascular endothelial growth factor (VEGF) と血管内皮細胞表面に発現しているVEGFレセプターが重要な働きをしていることが明らかとなった。(Torimura, et al. Hum Pathol 29;986-991, 1998) さらに、VEGFレセプターのうちVEGF receptor2がVEGF receptor1に比較してより強くVEGFからのシグナル伝達に関与していることも明らかとなった。

約30年前にFolkmanによって提唱された血管新生抑制療法(Folkman, et al. New Engl. J Med. 285;1182-1186, 1971)は悪性腫瘍に対する新しい概念の治療法として注目され、様々な血管新生抑制物質が試された結果ヒト型抗VEGF抗体が始めて臨床応用されるに至った。(Yang, et al. New Engl. J Med. 349;427-434, 2003)我々は、ラット肝発癌モデルに対し血管新生抑制剤であるTNP-470の全身投与にて肉眼的肝発癌率の低下、腫瘍容積の抑制、肺転移の抑制が認められたこと(Kin, et al. Int J Oncol. 16;375-382, 2000)とヌードマウスの肝に肝癌細胞株を接種して作成した腫瘍に対し血管新生抑制物質であるKring1-5のcDNAを尾静脈から遺伝子導入することで腫瘍容積の抑制、肝内転移の抑制、予後の改善を認めたことを明らかにした。(Torimura, et al. Gastroenterology 130;1301-1310, 2006)このような結果から、血管新生抑制療法は肝細胞癌の治療法として有用であることが予想されるが、より血管新生抑制療法の効果を高め、副作用を最小限にする工夫が求められる。

2. 研究の目的

血管新生抑制物質である分泌型f1k-1 (VEGF receptor2)のcDNAを遺伝子導入した腫瘍局所への遊走能を有する血管内皮前駆細胞と平滑筋前駆細胞を各々肝癌結節を有するマウスに投与し、腫瘍局所でのみ強力に血管新生を抑制しかつ副作用の少ない治療効果が得られることを証明する。

3. 研究の方法

*in vitro*の検討

- (1) GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞を採取し、培養液中にVEGFもしくはPDGF-BBを添加し、血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞に分化することをCD31, VEGF receptor-2(f1k-1), α SM actin, Calponinに対する抗体を用いたFACSにて証明する。
- (2) 採取した血管内皮前駆細胞および平滑筋

前駆細胞に対し、スタンフォード大学のDr. Kuoから供与されたf1k-1 cDNAをアデノウイルスをベクターとして最適条件下で遺伝子導入し培養液中へのf1k-1の分泌をWestern blottingにて確認する。

- (3) f1k-1 cDNAを遺伝子導入した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞とHUVECを各々共培養して分泌されるf1k-1によるHUVECおよび血管内皮前駆細胞、平滑筋前駆細胞の増殖抑制効果をテトラゾリウムアッセイにて検討する。

*in vivo*の検討

- (1) ヌードマウスの皮下にヒト肝癌細胞株を接種して腫瘍を作成後、GFP トランスジェニックマウスの骨髄細胞から分化させて作成した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞を尾静脈から細胞数を振って投与し、最も高率に肝癌組織に取り込まれる細胞数を決定する。
- (2) 投与した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞の肝癌組織での局在を経時的に採取した肝癌組織にてCD31や α SM actinに対する抗体を用い共焦点レーザー顕微鏡にて観察する。
- (4) 肝癌結節に対する抗腫瘍効果検討のために最も有効的にf1k-1 cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞を反復投与するためのプロトコル作成を行う。
- (5) f1k-1 cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞を反復投与することによる、ヌードマウスの皮下に作成した肝癌結節に対する抗腫瘍効果を3種類のヒト肝癌細胞株(KYN-2, HAK1-B, HuH-7)を用いて経時的に対照群と比較する。
- (6) f1k-1 cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞を反復投与することによる、ヌードマウスの肝に作成した肝癌結節の腫瘍容積、生存期間を対照群と比較する。
- (7) 肝癌結節内の血管数を細胞治療群と対照群とで比較する。
- (8) 肝癌結節におけるVEGF, angiopoietin-1, 2の発現を細胞治療群と対照群とでWestern blottingにて比較する。
- (9) 体重減少、肝障害、骨髄抑制などの副作用を細胞治療群と対照群とで比較する。

4. 研究成果

*In vitro*の研究成果:

- (1) GFP トランスジェニックマウスの骨髄から採取した単核球を培養液中にVEGFも

しくは PDGF-BB を添加し,7 日間培養し血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞に分化することを CD31, flk-1, α SMA 抗体を用いた FACS 解析にて明らかにした。培養した血管内皮前駆細胞に対してアデノウイルスに組み込まれた可溶性の flk-1cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞と HUVEC を Boyden chamber を用いて共培養すると HUVEC の増殖は対照群に比べて抑制された。

- (2) Western blotting にて可溶性 flk-1cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞の培養液中への可溶性 flk-1 の分泌は培養時間の経過とともに培養後 7 日目までは増加した。
- (3) 骨髄単核球を培養液中に VEGF もしくは PDGF-BB を添加し,7 日間培養し血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞に分化させセルソーターにて血管内皮前駆細胞と平滑筋前駆細胞に分離することに成功した。分離効率は約 90%であった。
- (4) flk-1cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞と平滑筋前駆細胞の増殖能は血管内皮前駆細胞で対照に比べ抑制された。

In vivo の研究成果 :

- (1) GFP トランスジェニックマウスの骨髄から採取培養した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞をヌードマウスの皮下に肝がん細胞を接種して作成した肝癌マウスの尾静脈から 100 万個投与し 7 日目に屠殺し肝癌組織への遊走を確認した。肝癌組織内へ遊走した血管内皮前駆細胞は一部腫瘍血管内皮細胞へ分化し,平滑筋前駆細胞の一部は周細胞へ分化していたが多くの腫瘍の間質に存在していた。
- (2) 可溶性 flk-1cDNA を遺伝子導入した血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞を HuH-7 をマウスの皮下に接種したモデルに尾静脈から一回 100 万個、週 1 回投与し,経時的に観察すると腫瘍の増大がほぼ同等度に抑制された。しかし,可溶性 flk-1cDNA を遺伝子導入しない血管内皮前駆細胞および平滑筋前駆細胞を投与した場合は血管内皮前駆細胞投与群のほうが腫瘍増大が著しかったため以後の検討は平滑筋前駆細胞で行うこととした。
- (3) 可溶性 flk-1cDNA を遺伝子導入した平滑筋前駆細胞を KYN-2, HAK1-B 細胞を用いた皮下腫瘍モデルに投与すると腫瘍の増大は抑制された。
- (4) KYN-2 細胞を肝に接種したモデルでも腫瘍の増大は抑制され,生存期間も延長した。また,腫瘍内血管密度は治療群で抑制されていた。腫瘍組織での VEGF の産生は治療群で亢進していた。
- (5) 体重減少,骨髄抑制,肝障害などの副作用は観察されなかった。

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 6 件)

- 1) Ueno T, Torimura T, Nakamura T, et al. 2 番目 Epigallocatechin-3-gallate improves nonalcoholic steatohepatitis model mice expressing nuclear sterol regulatory element binding protein-1c in adipose tissue. Int J Mol Med. 2009 ;24:17-22.
- 2) Ishida H, Oka M, Torimura T, et al. 9 番目 Validating a markov model of treatment for hepatitis C virus-related Hepatocellular carcinoma. Method Inf med. 2008; 47:529-540.
- 3) Fukushima N, Kuromatsu R, Torimura T, et al. 8 番目 Hyperplastic nodular hepatic lesions following endo-to-side portacaval shunting in childfood. Intern. Med. 2007;46:1203-1208.
- 4) Sumie S, Taniguchi E, Torimura T, et al. 12 番目 Significance of glucose intolerance and SHIP2 expression in hepatocellular carcinoma patients with HCV infection. Oncol Rep. 2007;18:545-552.
- 5) Nagaoka S, Yoshida T, Torimura T, et al. 5 番目 Serum C-reactive protein levels predict survival in hepatocellular carcinoma. Liver Int. 2007;27:1091-1097
- 6) Nakamura T., Torimura T., Ueno T et al. 2 番目 Significance and therapeutic potential of endothelial progenitor cell transplantation in a cirrhotic liver rat model. Gastroenterology. 2007;133:91-107.

[学会発表] (計 6 件)

- 1) 鳥村拓司 VEGF Trap (Aflibercept) によるマウス肝癌の増殖抑制機序に関する検討
肝臓洞壁細胞研究会 2009 年 12 月 13

- 日、大阪
- 2) Torimura T. Mechanisms of anti-angiogenic effect of VEGF Trap (Aflibercept) for hepatocellular carcinoma in mice. AASLD 2009年11月2日、Boston
- 3) Torimura T. VEGF Trap suppresses tumor growth of hepatocellular carcinoma in mice mediated by the inhibition of angiogenesis and vasculogenesis. AASLD . 2008年11月2日、Boston
- 4) Torimura T. VEGF Trap suppresses tumor growth of hepatocellular carcinoma in mice 日本癌学会 2008年10月29日名古屋
- 5) Torimura T. SELECTIVE HOMING OF ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS WITH CYTOSINE DEAMINASE cDNA TO TUMOR TISSUES SUPPRESSES GROWTH OF HEPATOCELLULAR CARCINOMA BY 5-FLUOROURACIL SECRETION. AASLD . 2007年10月30日、SF
- 6) Torimura T. 5-FU SECRETED BY ENDOTHELIAL PROGENITOR CELLS WITH CYTOSINE DEAMINASE IN TUMOR SUPPRESSES GROWTH OF HEPATOMA. 日本癌学会 2007年10月3日、横浜

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0件)

名称：

発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳥村 拓司 (TORIMURA TAKUJI)
久留米大学 医学部 准教授
研究者番号：60197986

(2) 研究分担者

上野 隆登 (UENO TAKATO)
久留米大学先端癌治療研究センター教授
研究者番号：70176618

中村 徹 (NAKAMURA TOURU)
久留米大学 医学部 助教
研究者番号：30341332

谷口 英太郎 (TANIGUCHI EITARO)
久留米大学 医学部 助教
研究者番号：50341318

(3) 連携研究者

中島 恵美 (NAKASHIMA EMI)
慶応大学 薬学部 教授
研究者番号：90115254