

平成 21 年 5 月 14 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007-2008
 課題番号：19591575
 研究課題名（和文）血管新生を制御する細胞間シグナル分子調節による抗腫瘍療法及び、肝再生促進の試み
 研究課題名（英文）Antitumor effects and promotion of liver regeneration by controlling angiogenetic signal transduction
 研究代表者
 氏名（ローマ字）：清水 宏明（SHIMIZU HIROAKI）
 所属機関・部局・職：千葉大学・大学院医学研究院・講師
 研究者番号：80272318

研究成果の概要：(1)ChM-1 cDNA を組み込んだ発現ベクターを作成後、肝細胞癌株に遺伝子導入したが、transfectant における ChM-1 がごく僅かであり、現在、再検討中である。(2)Wistar 系ラットを用い、総胆管結紮による黄疸肝モデルにて 70% 肝切除を行ったところ、閉塞性黄疸ではすでに Hepatic stellate cells の活性化を認め、肝切除後には残肝組織での HGF 産生のピークが消失、さらに抑制因子である TGF- β 1 の産生が高く、肝再生の遅延がおこると考えられ、したがってこれらの因子の manipulation することにより肝再生促進の可能性が示唆された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
年度			
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：外科系臨床医学・消化器外科学

キーワード：遺伝子、癌、再生医学、細胞・組織

1. 研究開始当初の背景

(1) 血管新生は、固形腫瘍の増大・進展、さらには、予後にかかわる重要な因子であることが、明らかにされている。現在まで、多くの悪性腫瘍について研究がなされてきたが、血管新生の過程にはさまざまな細胞間シグナル分子が介在し、かつ、促進因子と抑制因子のバランスの上で成り立っているとされる。したがって、癌治療としては、血管新生抑制因子の導入、あるいは、促進因子を制

御する戦略が考えられる。

(2) 肝臓という臓器の再生現象を解き明かすうえで、類洞壁細胞の増殖・再生機序を解き明かすこと、とくに増殖した肝実質細胞への血液供給のための類洞の増殖過程の究明は必要不可欠と考える。増殖正負の因子である VEGF、Angiopoietin-1, -2、さらには HGF、TGF β を制御し、肝硬変、黄疸肝切除後の肝再生促進を誘導する手法について展開したい。

2. 研究の目的

(1) 軟骨の無血管性に着目して発見された血管侵入抵抗性組織に特異的に発現する chondromodulin-1 (ChM-1) を用いて、癌の増殖抑制についてのさらなる研究を進めていきたい。これまでの報告では、軟骨肉腫においては、腫瘍での ChM-1 の発現は消失しており、その投与により、血管進入阻害に基づいた抗腫瘍効果が認められたとしている。ChM-1 は、既存の血管内皮細胞が増殖因子からのシグナルに応答して起こすとされる血管基底膜、細胞外基質の破壊、内皮細胞の遊走、増殖、管腔形成といったほとんどすべての血管新生に関わるステップに抑制作用をもつと考えられ、肝細胞癌 (HCC) などの hypervascular な腫瘍においては、強力な増殖抑制効果も期待される。そこで、ChM-1 cDNA をアデノウイルスベクターに組み込み、まずは、in vitro での肝細胞癌株に遺伝子導入し、ChM-1 が発現のされることを確認し、そして、マトリジェル上にて血管内皮と混合培養し、その増殖抑制効果を検討する。

(2) 我々は、肝切除後の再生肝における類洞の伸長過程において VEGF、Angiopoietin-1, -2, その受容体を介した各細胞間の cross talk を解析し、さらには、黄疸肝切除後における肝再生を増殖因子、抑制因子の面から検討し、報告した。肝切除後の類洞再生過程は、肝細胞から VEGF の産生がおこり、類洞内皮細胞膜上の発現の亢進した受容体に作用し、肝細胞増殖に遅れて類洞内皮細胞の増殖が誘導され、増殖肝細胞の群塊のなかに類洞内皮細胞が侵入、正常な肝細胞と類洞の関係が回復することを我々は提唱した。さらには血管内皮細胞の発芽、成熟、安定を TIE-2 受容体を介して調節する Angiopoietin-Tie system は、VEGF system にやや遅れ作用すること、つまり、肝再生後期に Ito 細胞にて、Ang-1 の産生が亢進し、類洞の安定化を導き、さらには、VEGF 非存在下の ang-2 の発現により、アポトーシスが誘導、血管の退縮、類洞のリモデリングが完成する

ことも最近、報告した。今後もこの一連の研究をさらに進め、VEGF、Angiopoietin-1, -2, さらには、増殖正負の因子である HGF、TGF β を制御し、肝硬変、黄疸肝切除後の肝再生促進を誘導する手法について展開したい。

3. 研究の方法

(1) 血管新生を制御する細胞間シグナル分子の調節による抗腫瘍療法の試み:

Invitrogen の ViraPower adenoviral expression system を用い、制限型アデノウイルスを 293 細胞で増殖させ、ChM-1 cDNA (シーケンスはすでに入手済み) 組み込み、HEPG2 細胞 (ヒト肝細胞癌株)、CT-26 細胞 (BALB/c マウス大腸癌株) にトランスフェクションする。その発現の程度を、ノーザンブロット法、さらには、ChM-1 抗体 (SantCruz) を用いたウェスタンブロット、免疫染色法などで解析する。遺伝子導入効率も検討する。ベクターの開発ができれば、肝細胞株 (Ang-2 陽性) CT-26 細胞 (BALB/c マウス大腸癌株)、線維芽細胞株に取り込ませ、その発現の違いをフローサイトメトリーで評価する。さらに、それらの transfectant をマトリジェル上で、血管内皮細胞 (HUVEC) と混合培養し、血管内皮細胞の増殖能をチミジンの取り込みから、評価するとともに、管腔様構造などの形態学的変化も検討したいと考えている。

(2) 黄疸肝、硬変肝の肝切除後肝再生促進の試み:

Wistar 系ラット (200-250 g) を用い、総胆管結紮による黄疸肝モデル、さらに四塩化炭素を投与した肝硬変モデルを作成し、それぞれに 70% 肝切除を行い、肝切除前、直後、3, 6, 12, 24, 72, 120 時間後に以下の検討を行う。

再生肝組織より凍結切片を作製し、抗 VEGF 抗体、抗 Ang1 抗体、Ang2 抗体、及び、TIE2 抗体、さらには、抗 HGF 抗体を用い、それぞれの蛋白の発現を経時的に評価、また同時に再生肝組織より mRNA を分離し、RT-PCR 法を用いて、VEGF、Ang1、Ang2、及び TIE2、HGF の mRNA の発現の推移を検討し、正常肝ラットの

その発現の推移と比較検討する。

この実験結果の data を解析し、これまでの肝切除後の肝細胞、類洞内皮細胞のそれぞれの PCNA labeling の data を加え、黄疸肝、硬変肝の肝切除後肝再生遅延の原因となる因子を解明する。さらに、その解析より、VEGF、Ang2、HGF をどの時期にどのようなかたちで投与・補充すれば、再生過程の遅延が回復し、正常肝と同様な再生過程がえられるか考察する。

リコンビナント VEGF、Ang2、HGF を至適時期に投与（静注あるいは、腹腔内）さらには、浸透圧ポンプによる抗 TGF β 中和抗体の持続投与も考慮し、その再生過程（肝重量、PCNA labeling index）を正常肝群の肝再生と比較・検討する。

4. 研究成果

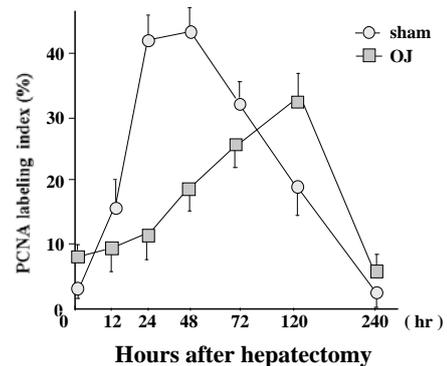
(1) 血管新生を制御する細胞間シグナル分子の調節による抗腫瘍療法の試み：

ChM-1 cDNA を pcDNA プラスミドベクターに組み込んだ発現ベクターを作成後、まずは、in vitro での HEPG2 細胞（ヒト肝細胞癌株）に遺伝子導入し、ChM-1 が発現した stable transfectant 作成する計画であったが、transfectant における ChM-1 がごく僅かであり、現在、繰り返し実験を行い、再検討中である。

(2) 黄疸肝、硬変肝の肝切除後肝再生促進の試み：Wistar 系ラット（200-250 g）を用い、総胆管結紮による黄疸肝モデル（OJ 群）を作成し、それぞれに 70% 肝切除を行い、肝切除施行前後に経時的に肝組織を採取し、再生肝重量、PCNA Labelling Index、増殖因子の発現を RT-PCR にて評価した。結果：BDL 2 週群にて肝組織中の HGF、VEGF mRNA の発現は増加。さらに TGF- β 1 mRNA の発現も sham 群に比し有意に亢進しており、TGF- β 1 は Hepatic stellate cells (HSCs) にて強発現していた。OJ 群では肝切除前より PCNA L. I. が sham 群に比して高く、肝切除後の肝再生は遅延していた（図 1）。さらに、TGF- β 1 mRNA の発現は sham 群に比し、肝切除前から肝切除後 48 時間まで有意に高値であった。sham 群では肝切除後に HGF mRNA 発現の急激な上昇を認め、12-24 時間にピークとなったのに対し、OJ 群ではその発現のピークは消失していた。結論：閉塞性黄疸ではすでに HSC が活性化を認め、肝切除後には HGF のピークが消失、さらに抑

制因子である TGF- β 1 の産生が高く、これらにより肝再生の遅延がおこると考えられた。

図 1



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 5 件）

Shimizu H, Sawada H, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Clinical Significance of Biliary Vascular Anatomy of the Right Liver for Hilar Cholangiocarcinoma Applied to Left Hemihepatectomy. *Ann Surg* 2009; 249:435-439.

Shimizu H, Kataoka M, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Role of Kupffer Cells in Tolerance Induction After Portal Venous Administration of Alloantigens. *Hepato-Gastroenterol* 2009. (in press)

Shimizu H, Nukui Y, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Induction of Antitumor Response by in Vivo Allogeneic Major Histocompatibility Complex Gene Transfer Using Electroporation. *J Surg Res* 2009. (in press)

Kuboki S, Shimizu H, Mitsuhashi N, Kusashio K, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Miyazaki M. Angiopoietin-2 levels in the hepatic vein as a useful predictor of tumor invasiveness and prognosis in human hepatocellular carcinoma. *J Gastroenterol Hepatol* 2008; 23:157-64.

Shimizu H, Kimura F, Yoshidome F, Ohtsuka M, Kato A, Yoshitomi H, Nozawa S, Furukawa K, Mitsuhashi M, Takeuchi D,

Suda K, Miyazaki M. Aggressive surgical approach for Stage IV gallbladder carcinoma based on Japanese Society of Biliary Surgery Classification. J Hepatobiliary Pancreat Surg 2007; 14:358-365.

〔学会発表〕(計 2 件)

Shimizu H, Nukui Y, Kimura F, Yoshidome H, Ohtsuka M, Kato A, Miyazaki M. Induction of antitumor response by in vivo allogeneic major histocompatibility complex gene transfer using electroporation. 16th United European Gastroenterology Week 2008, 10月24日Vienna, Austria

清水宏明、木村文夫、吉留博之、大塚將之、加藤厚、吉富秀幸、野沢聡志、古川勝規、三橋登、竹内男、須田浩介、吉岡伊作、宮崎勝。肝細胞癌遠流領域の肝静脈血のAngiopoietin-2値と測定の意義：予後因子としての肝静脈血Angiopoietin-2の有用性について。第107回日本外科学会定期学術集会。2007年4月11日。大阪

〔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

清水 宏明(SHIMIZU HIROAKI)

千葉大学大学院医学研究院・講師

研究者番号：80272318

(2)研究分担者

宮崎 勝(MIYAZAKI MASARU)

千葉大学大学院医学研究院・教授

研究者番号：70166156

木村 文夫(KIMURA FUMIO)

千葉大学大学院医学研究院・准教授

研究者番号：70334208

大塚 將之(OHTSUKA MASAYUKI)

千葉大学医学部附属病院・講師

研究者番号：90334185

三橋 登 (MITSUHASHI NOBORU)

千葉大学フロンティアメディカル工学

研究開発センター・准教授

研究者番号：80400985

須田 浩介(SUDA KOUSUKE)

千葉大学医学部附属病院・助教

研究者番号：50400908

(3)連携研究者

なし